



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL
GEN DE CICLINA D2;2 DE MAÍZ (*Zea mays* L.) Y EL PROMOTOR
CONSTITUTIVO CaMV35S**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA PRESENTA:
VICTOR ALLAN SÁNCHEZ CAMARGO**

DIRECTOR: DR. JORGE MANUEL VÁZQUEZ RAMOS

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO

2012



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
 Área Académica de Biología



M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, UAEH

PRESENTE

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado al pasante de Licenciatura en Biología **Victor Allan Sánchez Camargo**, quien presenta el trabajo recepcional de tesis intitulado **"Análisis comparativo de la región promotora del gen de ciclina D2;2 de Maíz (*Zea mays* L.) y el promotor constitutivo CaMV35S"**, después de revisarlo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE:

Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún

PRIMER
VOCAL:

M. en C. Manuel González Ledesma

SEGUNDO
VOCAL:

Dr. Carlos Esquivel Macías

TERCER
VOCAL:

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos

SECRETARIO:

M. en C. Mario Segura Almaraz

PRIMER
SUPLENTE:

Dra. Ana Laura López Escamilla

SEGUNDO
SUPLENTE:

Dra. Raquel Cariño Cortés

(Handwritten signatures of the jury members over horizontal lines)

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi más atenta consideración.

ATENTAMENTE
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
 Mineral de la Reforma, Hidalgo a 20 de Febrero de 2012

(Handwritten signature of Magdalena Meza Sánchez)

M. en C. Magdalena Meza Sánchez
Coordinador Adjunto de la Licenciatura en Biología



c.c.p. Archivo



COORDINACIÓN ADJUNTA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
 Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Ciudad del Conocimiento
 Col. Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México C.P. 42184
 Tel. +52 771 7172000 exts. 6600 Fax: +52 771 7172112
M. en C. Magdalena Meza Sánchez
mmeza@uaeh.edu.mx primavera27mx@yahoo.es



Índice

Resumen	i
1 Introducción	1
2 Marco teórico	4
2.1 El maíz	4
2.1.1 Descripción botánica	9
2.1.2 Germinación	12
2.2 Ciclo celular	15
2.2.1 Ciclinas	16
2.2.1.1 Ciclinas en plantas	17
2.2.1.2 Dominios en ciclinas	18
2.2.1.3 Ciclinas tipo D	19
2.2.1.3.1 Expresión de ciclinas tipo D de maíz	22
2.3 Regulación de la expresión génica	22
2.3.1 Promotores	23
2.3.1.1 Tipos de promotores	25
2.3.2 Elementos de DNA <i>cis</i> -reguladores	25
2.4 Virus del mosaico de la coliflor	27
2.4.1 Promotor constitutivo 35S	28
2.5 Cultivo de tejidos vegetales	30
2.5.1 Tipos de cultivo	32
2.5.1.1 Cultivo de callo	32

2.5.1.2 Cultivo de células en suspensión	33
2.5.2 Fitohormonas	33
2.6 Transformación genética por biobalística	36
3 Justificación	38
4 Objetivos	39
4.1 Objetivo general	39
4.2 Objetivos particulares	39
5 Materiales y métodos	40
5.1 Amplificación y clonación de las regiones promotoras	41
5.2 Construcción de las fusiones de los promotores al gen reportero <i>GFP::GUS</i> en pBGWFS7.0	42
5.2.1 Preparación y transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	42
5.2.2 Reacción de recombinación	43
5.3 Sistemas modelo	46
5.3.1 Callo embriogénico de maíz	46
5.3.2 Epidermis de cebolla	47
5.4 Transformación por biobalística	48
5.4.1 Preparación de los microproyectiles de tungsteno	48
5.4.2 Acoplamiento del DNA a las micropartículas	48
5.4.3 Bombardeo con microproyectiles de tungsteno	49
5.5 Esquema de regeneración de plantas transgénicas	49
5.6 Extracción de proteínas de callo transgénico de maíz	50
5.6.1 Inmunodetección del reportero GUS	50
5.7 Extracción de DNA genómico de callo embriogénico maíz	51
6 Resultados	53
6.1 Obtención de las secuencias promotoras	53

6.2 Caracterización <i>in silico</i> del promotor de <i>CycD2;2</i>	55
6.3 Fusiones traduccionales a GFP	56
6.4 Transformación de callo embriogénico de maíz y células de epidermis de cebolla por biobalística	58
6.4.1 Amplificación del gen reportero <i>GFP</i> en callo de maíz transformado con <i>pCycD2;2</i>	62
6.4.2 Inmunodetección de reporteros en callo embriogénico	62
7 Discusión	64
7.1 Obtención y análisis <i>in silico</i> de la secuencia promotora de <i>CycD2;2</i> de maíz	64
7.2 Transformación de callo embriogénico de maíz y células de epidermis de cebolla	68
8 Conclusiones	72
9 Perspectivas	73
10 Referencias	74
Apéndices	87

Resumen

El control y avance del ciclo celular en eucariontes es regulado por heterodímeros proteicos formados por ciclinas (Cyc) (subunidad reguladora) y cinasas dependientes de ciclina (CDK) (subunidad catalítica). En estudios previos se caracterizaron los patrones de expresión de al menos 15 genes de ciclinas tipo D (CycD) de maíz durante la germinación, encontrando fluctuaciones a lo largo del ciclo celular y se demostró que responden a señales externas como sacarosa y algunas hormonas vegetales, por lo que se hipotetiza que existen elementos de respuesta a estos y a otros factores en sus regiones promotoras. Por lo tanto, en el presente trabajo se estudió la región promotora de un gen de ciclo celular, el de *CycD2;2* de maíz y el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor, para identificar y comparar, mediante análisis bioinformáticos (*in silico*), elementos de respuesta presentes en sus secuencias, encontrando elementos involucrados en la respuesta a auxinas, citocininas, ácido abscísico, azúcares y a diversos factores transcripcionales. Para corroborar si algunos de estos elementos son funcionales, se clonaron ambos promotores fusionados al gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP), y con éstas construcciones se transformó callo embriogénico de maíz mediante biobalística y se realizaron ensayos de expresión transitoria en epidermis de cebolla. Con el promotor 35S se observaron niveles de expresión de GFP constantes, mientras que el promotor de ciclina mostró un aumento en tratamientos con auxinas y una disminución notable en presencia de ácido abscísico, indicando que es un promotor inducible positiva o negativamente por hormonas que pueden promover o reprimir la proliferación celular en las plantas.

1 Introducción

El ciclo celular comprende una serie de eventos moleculares ordenados que resultan en la división de una célula en dos células hijas con la misma información genética, dichos eventos y su orden se encuentran altamente conservados entre los eucariontes. El ciclo se divide en cuatro fases (G1, S, G2 y M). El control del ciclo celular se da por una cascada de fosforilación de proteínas regulada por complejos formados por ciclina (Cyc)/cinasa dependiente de ciclina (CDK, por sus siglas en inglés), permitiendo superar los puntos de restricción durante las transiciones G1-S, G2-M y durante la metafase. Estos complejos comprenden heterodímeros en los cuales las CDKs son subunidades catalíticas y las Cycs son subunidades reguladoras. Las CDKs presentan niveles de expresión constantes a lo largo del ciclo celular, mientras que los niveles de las Cycs fluctúan periódicamente, hecho por el cual son denominadas ciclinas. Dentro de la familia de las ciclinas, se sabe que algunas ciclinas tipo D (CycD) participan en la regulación de la transición G1 a S del ciclo. En el grupo de trabajo del Dr. Jorge Vázquez Ramos de la Facultad de Química, en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se han estudiado los patrones de expresión de al menos 15 genes de CycD de maíz durante la germinación, los cuales muestran fluctuaciones a lo largo del ciclo celular y se demostró que responden a señales externas como sacarosa y algunas hormonas vegetales. En tratamientos con auxinas (AUX), citocininas (CK) o ácido abscísico (ABA) se observaron modificaciones de los patrones de expresión de todos estos genes, por lo que se hipotetiza que existen elementos de respuesta a estos y otros factores en sus regiones

promotoras, relacionados con las modificaciones en los patrones de expresión. Por lo tanto, en el presente trabajo se estudió la región promotora de un gen de ciclo celular, el de *CycD2;2* de maíz y un promotor constitutivo, el 35S del virus del mosaico de la coliflor. Mediante análisis bioinformáticos de la secuencia de DNA del promotor de ciclina, se identificaron elementos previamente descritos como necesarios para considerar dicha región como un promotor de plantas. También se analizaron ambos promotores para detectar elementos de respuesta en sus secuencias y se pudieron identificar elementos involucrados en la respuesta a AUX, CK, ABA, azúcares, factores transcripcionales (FTs) de las familias MYC y MYB, relacionados con la respuesta temprana a estrés hídrico, principalmente sequía; también se encontraron FTs del tipo DOF, proteínas de un solo dedo de zinc, relacionadas con la expresión de diversas familias de genes en plantas. Sólo el promotor de ciclina D2;2 presentó elementos de respuesta a E2F, factor transcripcional involucrado en la regulación de genes del ciclo celular.

Para corroborar si algunos de estos elementos son funcionales, se clonaron la región no traducible 5', así como 2022 pares de bases del promotor de ciclina y el promotor 35S, respectivamente, en un vector de expresión fusionados al gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP). Con estas construcciones se transformó callo embriogénico de maíz mediante biobalística y se realizaron ensayos de expresión transitoria en epidermis de cebolla en presencia de AUX o ABA.

El promotor 35S presentó niveles constantes de GFP a lo largo de los tratamientos debido a que es un promotor constitutivo y se utilizó como control positivo en el experimento. El promotor de ciclina mostró niveles más altos de GFP que 35S durante los tratamientos con AUX, mientras que en presencia de ABA, los niveles del reportero disminuyeron notablemente, lo cual indica que es un promotor inducible positivamente por AUX y

negativamente por ABA, hormonas que pueden promover o reprimir la proliferación celular en las plantas.

2 Marco teórico

2.1 El maíz

“El maíz es el cereal de los pueblos y culturas del continente americano. Las más antiguas civilizaciones de América –desde los olmecas y teotihuacanos en Mesoamérica, hasta los incas y quechuas en la región andina de Sudamérica– estuvieron acompañadas en su desarrollo por esta planta. Esta asociación entre cultura y agricultura del maíz ha motivado a científicos y humanistas a preguntarse: ¿cuál es el origen de este cereal? ¿cómo fue su evolución una vez que los diferentes grupos humanos lo adoptaron y cultivaron para su provecho? Estas preguntas nos han llevado a explorar el pasado, y en la actualidad, junto al desarrollo científico y tecnológico, se han podido descifrar varios de los enigmas que rodean la domesticación de este cultivo” (Hernández-Serratos, 2009).

El maíz es una planta de origen mesoamericano y fue un elemento de gran importancia para el desarrollo de las culturas antiguas de América. En la tabla 1 se muestra su clasificación taxonómica.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz (CONABIO, 2008).

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae
Género	<i>Zea</i> L.
Especie	<i>Z. mays</i> L.

El maíz y sus parientes silvestres, los teocintles, se clasifican dentro del género *Zea* (Tabla 2), perteneciente a la familia Poaceae, la cual se compone de cerca de 700 géneros y 11,000 especies, incluyendo importantes cultivos agrícolas como trigo, arroz, avena, sorgo, cebada y caña de azúcar.

Tabla 2. Divisiones taxonómicas del género *Zea* (Buckler y Stevens, 2005).

Género	Especie	Subespecie
<i>Zea</i>	<i>Z. mays</i> L.	<i>Z. mays</i> L. ssp. <i>huehuetenanguensis</i> <i>Z. mays</i> L. ssp. <i>mexicana</i> <i>Z. mays</i> L. ssp. <i>parviglumis</i> <i>Z. mays</i> L. ssp. <i>mays</i>
	<i>Z. nicaraguensis</i> <i>Z. luxurians</i> <i>Z. perennis</i> <i>Z. diploperennis</i>	

A excepción de *Z. mays* ssp. *nicaraguensis* y *Z. mays* ssp. *huehuetenanguensis*, los teocintles son endémicos de México, aunque algunos tienen una distribución muy restringida, como los teocintles perennes, que sólo están presentes en algunos sitios de la Sierra de Manantlán, en Jalisco (Sánchez-González *et al.*, 1998) (Figura 1), mientras que *Zea mays* L. ssp. *mays* es el maíz cultivado propiamente, distribuido en casi todo el territorio nacional (Doebley e Iltis, 1980) (Figura 2).

El maíz tiene su origen a partir de la domesticación del teocintle (*Z. mays* ssp. *parviglumis*) y se ha venido cultivando desde hace unos 7,000 años en nuestro país. La divergencia entre ambas subespecies ha sido establecida en un horizonte de 9000 años, en la región del río Balsas al suroeste de México, y su selección y diversificación ha sido ligada a la historia cultural de Mesoamérica (Benz, 2001; Doebley, 2004; Buckler y Stevens, 2005).

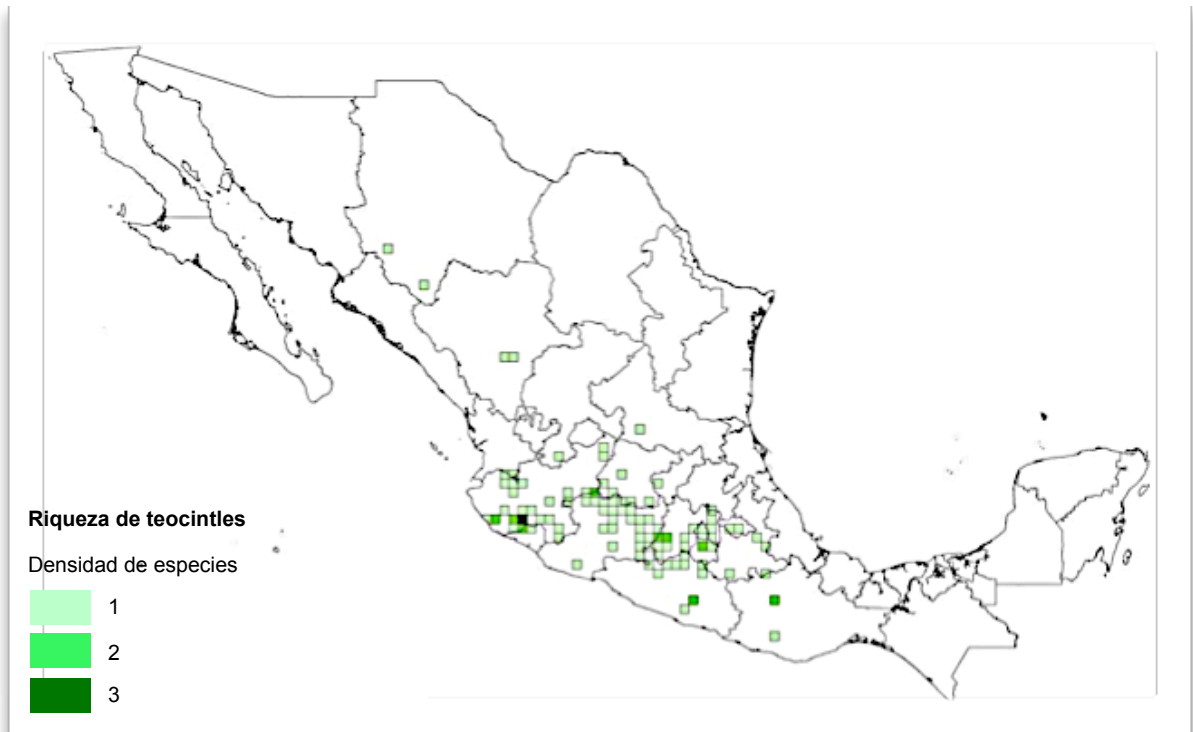


Figura 1. Mapa de distribución y riqueza de teocintles en México (Hernández-Serratos, 2009).

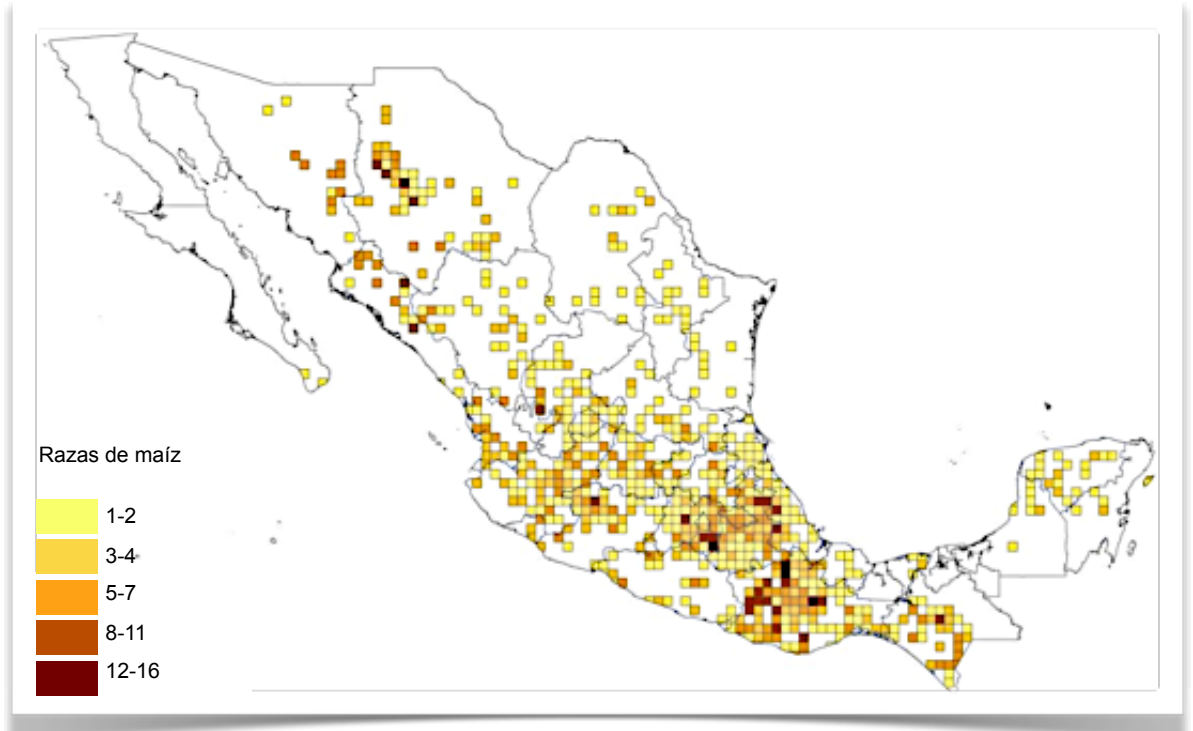


Figura 2. Distribución y riqueza de razas de *Z. mays* ssp. *mays* en territorio mexicano (Hernández-Serratos, 2009).

Los estudios arqueológicos e históricos demuestran que el maíz ha sido parte fundamental en la historia de Mesoamérica (Kato-Yamakake *et al.*, 2009). La presencia del maíz en México está plasmada en una gran cantidad de esculturas, pinturas, mitos, festividades y ceremonias. Su importancia también ha sido demostrada en los registros botánicos encontrados en excavaciones arqueológicas de los primeros asentamientos agrícolas, restos arqueobotánicos de maíz descubiertos en cuevas del Valle de Tehuacán, Puebla, México, con antigüedad de entre 4,500 a 7,000 años y así mismo, en la cueva de Guilá Naquitz en los valles centrales de Oaxaca, México, con una antigüedad de 6,200 años aproximadamente (Tabla 3) (Winter, 1973; Benz, 1997; Benz, 2001).

Tabla 3. Edad estimada de algunos restos macrobotánicos de maíz (CONABIO, 2008).

País	Localidad o región	Antigüedad (A. C.)
México	Tehuacán (Puebla)	4,500-7,000
	Guilá Naquitz (Oaxaca)	6,200
	Zohapilco (Tlapacoya, México)	5,000
	San Andrés (Tabasco)	4,562
	Norte de Sinaloa	4,500
	Cueva de la Perra (Tamaulipas)	4,500
	Cueva de Ocampo (Tamaulipas)	4,400
	Laguna Pompal (Veracruz)	4,250
	La Venta (Tabasco)	3,750-4,250
	Cueva de Valenzuela (Tamaulipas)	3,890
	Costa del Pacífico	3,400-3,550
	La Playa (Sonora)	3,000
	Cerro Juanaqueña (Chihuahua)	2,980
	Cueva del Valle (Chihuahua)	2,400-2,700
	San Blas (Nayarit)	2,400-2,700
Estados Unidos	Valle del Río Gila, Arizona	4,000
	Cueva del Murciélago, Nuevo México	4,000

Tabla 3 (continuación). Edad estimada de algunos restos macrobotánicos de maíz (CONABIO, 2008).

Guatemala	Laguna de Petenxil	4,000
Belice	Del Cuello	2,770-2,920
Honduras	Yojoa	2,280
	Gigante Rock Shelter	2,280
Panamá	Cueva de los ladrones	2,015

El uso más importante del grano de maíz hasta hoy, es el alimentario. Cabe mencionar que en México, la conservación de las razas nativas del maíz al interior de las parcelas de cultivo de los propios agricultores tradicionales, tiene un valor económico especial pues es el cultivo básico de la dieta mexicana (Boege-Schmidt, 2006). También se hace un uso intensivo de la planta completa ya que se emplean las hojas, los tallos, la espiga del maíz y hasta el hongo que en él crece, el huitlacoche (*Ustilago maydis*). Así mismo, se usan las raíces como abono o combustible. El tallo se emplea en la construcción y también en el tallado de figuras, se usa como medicina, abono, combustible y en la elaboración de bebidas refrescantes o embriagantes. La hoja sirve como envoltura de tamales, para fabricar objetos rituales o artesanales, como recipientes o para amarrar manojos de hierbas y especias (Kato-Yamakake *et al.*, 2009). El olote, se emplea como combustible y alimento para animales, como herramienta para desgranar mazorcas, para pulir madera e impurezas de alfarería, o como tapón de recipientes. En la actualidad se usa en la industria como forraje de grandes ganados, y en la obtención de compuestos químicos que son comercializados en alimentos, medicinas y cosméticos: miel de maíz, azúcar de maíz, dextrosa, almidón o fécula, aceite, color caramelo, dextrina, maltodextrina, ácido láctico y sorbitol. Por otro lado, se le considera un recurso energético renovable, ya que de él se obtiene el bioetanol, utilizado principalmente como combustible de automóviles y camiones (Kato-Yamakake *et al.*, 2009).

Los avances y resultados de los estudios acerca del origen y evolución de maíz, así como del registro documentado de sus múltiples usos, son sin duda, manifiesto del valor cultural, histórico, social y de su gran importancia económica sobre la agricultura y otras ramas productivas.

2.1.1 Descripción botánica (Según Mera-Ovando, 2009)

El maíz es una planta de porte robusto y de hábito anual; el tallo es simple, erecto, de elevada longitud alcanzando alturas desde uno hasta cinco metros, con pocos macollos o ramificaciones, su aspecto recuerda al de una caña de azúcar por la presencia de nudos y entrenudos y su médula esponjosa. Las hojas nacen en los nudos de manera alterna a lo largo del tallo; se encuentran abrazadas al tallo mediante la vaina que envuelve el entrenudo y cubre la yema floral, de tamaño y ancho variable. Las raíces primarias son fibrosas presentando además raíces adventicias, que nacen en los primeros nudos por encima de la superficie del suelo, ambas tienen la misión de mantener a la planta erecta (Jugenheimer, 1988).

Es una planta monoica de flores unisexuales, que presenta flores masculinas y femeninas bien diferenciadas en la misma planta: la inflorescencia masculina es terminal, se conoce como panícula (o espiga), consta de un eje central o raquis y ramas laterales; a lo largo del eje central se distribuyen los pares de espiguillas de forma polística y en las ramas con arreglo dístico y cada espiguilla está protegida por dos brácteas o glumas, que a su vez contienen en forma apareada las flores estaminadas; en cada florecilla componente de la panícula hay tres estambres donde se desarrollan los granos de polen. Las inflorescencias femeninas (mazorcas) se localizan en las yemas axilares de las hojas, son espigas de forma cilíndrica que consisten

de un raquis central u olote donde se insertan las espiguillas por pares, cada espiguilla con dos flores pistiladas una fértil y otra abortiva, estas flores se arreglan en hileras paralelas, las flores pistiladas tienen un ovario único con un pedúnculo unido al raquis, un estilo muy largo con propiedades estigmáticas donde germina el polen. La inflorescencia femenina puede formar alrededor de 400 a 1000 granos arreglados, en promedio, de ocho a 24 hileras por mazorca; todo esto encerrado en numerosas brácteas o vainas de las hojas (Figura 3).

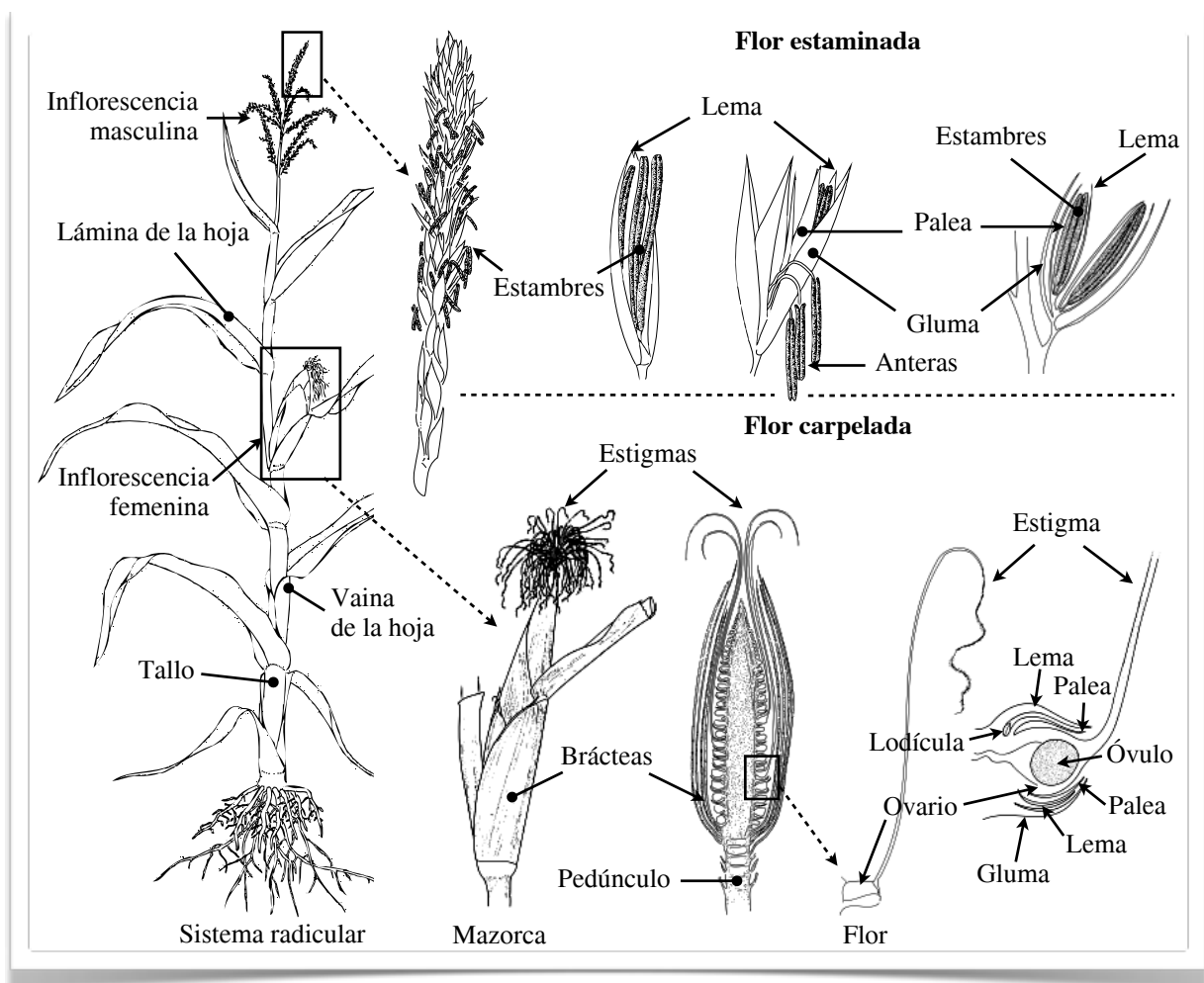


Figura 3. Representación de las principales estructuras de la planta de maíz. Modificado de Mackean y Mackean, 2004.

Por las características mencionadas, el maíz es una planta de polinización abierta (anemófila) propensa al cruzamiento, la gran mayoría de los granos de polen viajan de 100 a 1000 m (Reyes, 1990; Jugenheimer, 1988).

En la mazorca, cada grano o semilla es un fruto independiente llamado cariósipide que está insertado en el raquis cilíndrico u olote; la cantidad de grano producido por mazorca está limitada por el número de granos por hilera y de hileras por mazorca. Como cualquier otro cereal, las estructuras que constituyen el grano del maíz (pericarpio, endospermo y embrión) le confieren propiedades físicas y químicas (color, textura, tamaño, entre otras).

En la figura 4 se presenta la distribución del maíz cultivado en todo el mundo, así como su producción por hectárea. Es posible observar que es cultivado en una gran superficie del globo, a excepción de las zonas frías como la Antártida y la región del ártico, o en las zonas muy áridas de África, Asia y Australia (FAO, 2011).

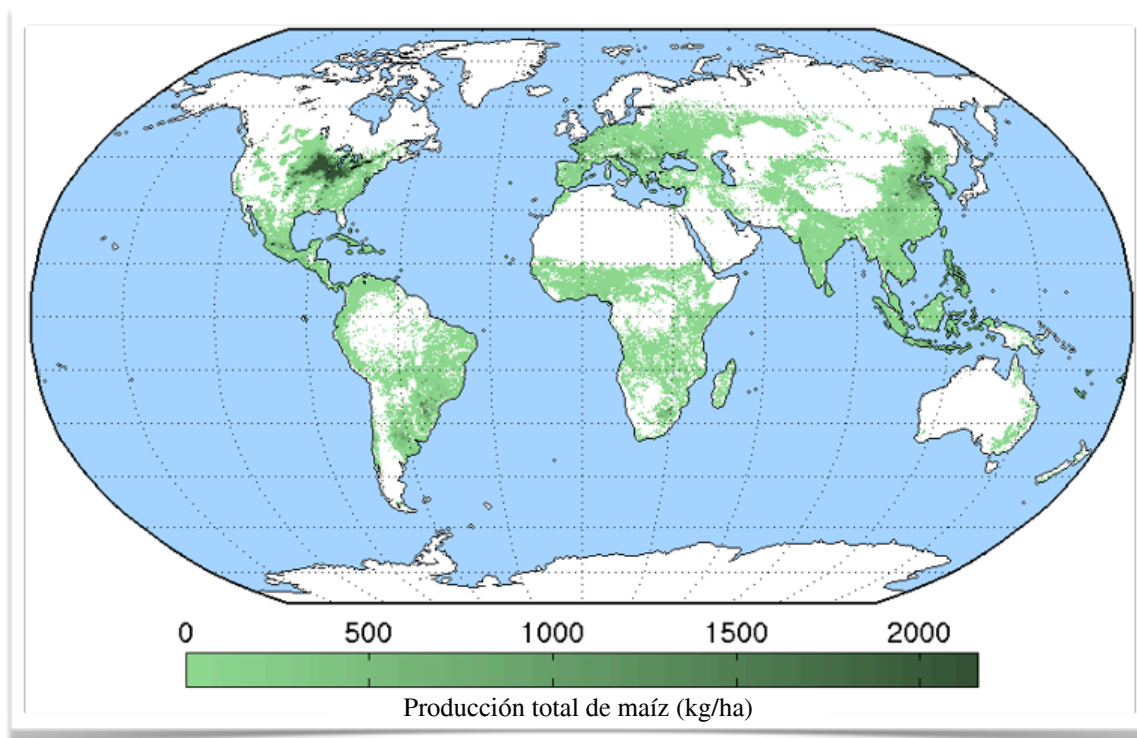


Figura 4. Distribución de los cultivos de maíz en todo el mundo y densidad de producción en kg/ha. Tomado de FAO, 2011.

2.1.2 Germinación de la semilla de maíz

Uno de los descubrimientos más importantes que dio pie a que ocurriera la domesticación de cultivos imprescindibles para las culturas antiguas como el maíz, fue el aprender de manera empírica, por ejemplo, que era posible generar una planta con las mismas características, a partir del contenido de un fruto o un grano proveniente de ésta, *i. e.* la germinación de la semilla (Bewley y Black, 1994).

La germinación tiene el propósito de reproducir la planta de la cual ha tenido origen la semilla. El proceso de germinación involucra la reactivación del metabolismo y el reinicio de los procesos de desarrollo, implicando que las semillas ya contienen o adquieren rápidamente la memoria bioquímica para llevar a cabo el programa morfogénico que dará lugar al desarrollo de la nueva planta. Como consecuencia de la entrada de agua, las células en los tejidos de la semilla se elongan y posteriormente comienzan a dividirse, proceso que lleva a la protrusión de la radícula, evento que marca el final de la germinación (Spiegel y Marcus, 1975; Bewley y Black, 1994).

Las células meristemáticas de la raíz regularmente son las primeras en ser activadas y entrar en el ciclo celular y proliferar. Existen evidencias experimentales de que la división celular no es necesaria para que la germinación visible ocurra, pero el establecimiento del ciclo celular es un evento esencial para el crecimiento y desarrollo de la planta (Spiegel y Marcus, 1975; Sánchez de Jiménez *et al.*, 1981; Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984; Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003).

Desde un punto de vista molecular, la germinación requiere restablecer condiciones aptas para el reinicio de la proliferación celular; es por ello que en el grupo de trabajo del Dr.

Jorge Vázquez Ramos de la Facultad de Química, UNAM, se ha adoptado una definición de germinación, la cual comprende una serie de procesos bioquímicos y moleculares que comienzan con la entrada de agua a la semilla y culminan con la conclusión de la primera ronda de ciclo celular exitoso.

La única condición que se requiere para el establecimiento de la germinación en semillas ortodoxas es la entrada de agua (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975). Este proceso consta de tres fases llamadas comúnmente como: hidratación (fase I), germinación (fase II) y crecimiento (fase III) (Ching, 1972) (Figura 5).

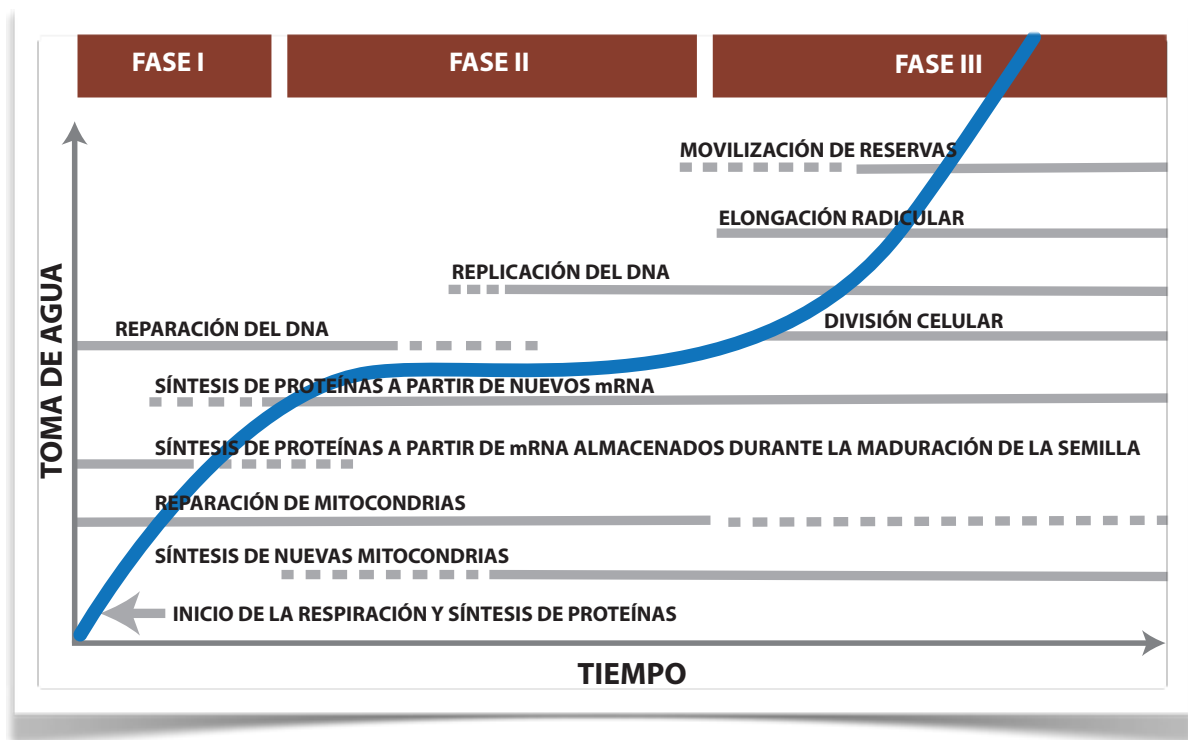


Figura 5. Representación esquemática de las fases de la germinación de semillas con relación a la toma de agua. Tomado y modificado de Obroucheva y Antipova, 1997.

La fase I es rápida, mecánica e independiente del estado metabólico de la semilla, incluso ocurre en semillas muertas; se producen rupturas en las membranas internas por el

cambio estructural de los lípidos de la membrana debido a las fuerzas de hidratación de los tejidos embrionarios, de las paredes celulares y de los organelos. Al reactivarse secuencialmente sus funciones, comienza la síntesis de proteínas a partir de mRNAs preexistentes, y la síntesis de nuevos mRNAs, tRNAs y rRNAs; el incremento en la absorción de agua también está acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria (Ching, 1972; Bove *et al.*, 2001).

La fase II es lenta y acompaña a los procesos metabólicos descritos anteriormente, durante esta fase se observa una reducción casi total en la entrada de agua a la semilla, se disminuyen los procesos reparativos y se incrementa el número de mitocondrias, comienza la replicación de DNA y normalmente en esta fase comienza la protrusión de la radícula (Osborne, 1983).

La fase III se considera como un evento tardío, es una fase rápida que se relaciona con el proceso de elongación celular previo a la división y ya hay movilización de reservas de la semilla. En esta fase comienza el crecimiento de la planta, por lo tanto depende también de factores externos como la temperatura (Osborne, 1983 ; Bewley y Black, 1994).

La emergencia de la radícula se debe inicialmente a la elongación celular y posteriormente a la proliferación celular. Durante la germinación ocurre el crecimiento de las células y su posterior división. Para que las células puedan dividirse y así formar parte de los tejidos que constituyen una planta madura, deben ocurrir una serie de pasos que se conocen como ciclo celular. Se ha reportado que durante la maduración de las semillas, la mayoría de las células del embrión quedan detenidas en la fase G1 del ciclo (Deltour y Jacquard, 1974; Masubelele *et al.*, 2005). La síntesis replicativa nuclear del DNA en embriones de maíz

comienza entre las 12 y 15 horas de imbibición, teniendo un máximo de actividad después de las 30 horas (Vázquez-Ramos y Osborne, 1986; Georgieva *et al.*, 1991).

2.2 Ciclo celular

La división celular es una característica fundamental de todos los organismos, pero sólo los eucariontes hacen uso de una separación temporal entre la replicación del DNA (fase S) y la segregación de los cromosomas a dos células hijas (fase M) (Figura 6).

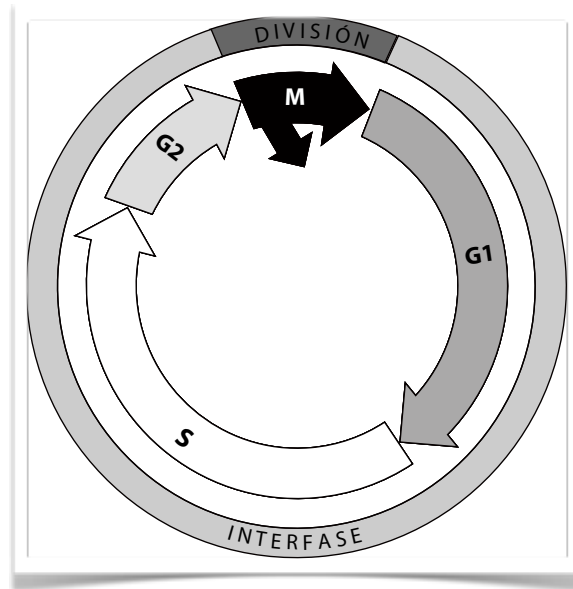


Figura 6. Esquema clásico que representa las distintas fases del ciclo celular.

La actividad de la división celular es finamente controlada por la maquinaria molecular que regula la progresión del ciclo celular, en coordinación con señales nutricionales, hormonales, de desarrollo y ambientales (Dudits *et al.*, 2007).

La progresión ordenada de las células a través de las distintas fases del ciclo es regulada por múltiples mecanismos, incluyendo la fosforilación reversible de proteínas, interacciones

proteína-proteína y degradación específica de proteínas. La fosforilación puede alterar la actividad protéica, localización subcelular, marcar proteínas para degradación e influenciar la dinámica de complejos protéicos (Eckhart *et al.*, 1979; Hunter y Sefton, 1980). Desde que la fosforilación es reconocida como el principal mecanismo de control de la progresión del ciclo celular, gran parte de los estudios en el área se ha enfocado en los complejos cinasa dependiente de ciclina (CDK)/ciclina (Chen *et al.*, 1989; Dudits *et al.*, 2007).

Dentro de los complejos protéicos heterodiméricos formados por CDKs y ciclinas, las ciclinas son la subunidad reguladora, mientras que CDKs son la subunidad catalítica. Estos complejos dirigen la progresión del ciclo celular fosforilando proteínas clave requeridas por las células para avanzar hacia fases posteriores del ciclo (Simanis y Nurse, 1986; Chen *et al.*, 1989; Gutiérrez *et al.*, 2005; Dudits *et al.*, 2007).

2.2.1 Ciclinas

En 1983, Tim Hunt y colaboradores, trabajando con huevos de erizo de mar (*Lytechinus pictus*), descubrieron dos proteínas que aparecían en momentos específicos del ciclo celular y mientras éste avanzaba eran degradadas, teniendo un nuevo pico de aparición después de la división celular, dichas proteínas fueron llamadas ciclinas debido a esta peculiaridad. Éstos estudios fueron los pioneros que proveyeron la principal pista hacia los mecanismos bioquímicos involucrados en la coordinación del ciclo celular y que esta maquinaria de control está conservada entre todos los eucariontes (Evans *et al.*, 1983; Novak *et al.*, 1998). En su reporte original sólo un par de ciclinas fue descrito, la ciclina A y la ciclina B,

correspondientes a fase S y fase M, respectivamente. Posteriormente se demostró que se asocian con una subunidad cinasa, resultando ser CDK1 (Lohka *et al.*, 1988).

Actualmente se conoce un gran número de ciclinas de levaduras, plantas y animales, que a su vez, se asocian con numerosas CDKs. La interacción ciclina/CDK es una estrategia de gran importancia, dado que sin ésta, las CDKs permanecen inactivas y en consecuencia la regulación de la síntesis, degradación o localización de la subunidad ciclina provee múltiples niveles de control para la formación de complejos activos, así como la posible asociación de diferentes ciclinas con diferentes CDKs (Lenburg y O'Shea, 1996; Fisher, 2005).

2.2.1.1 *Ciclinas en plantas*

Las ciclinas de plantas comparten homología con las clases A, B, C, D, H y L, de mamíferos, aunque los subgrupos dentro de estas clases no son conservados entre plantas y animales (Renaudin *et al.*, 1996; Yamaguchi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004; La *et al.*, 2006). La planta *Arabidopsis thaliana* no posee homólogos para las ciclinas E, F, G, I, y UNG de humanos (Wang *et al.*, 2004). En *Arabidopsis* se han identificado 50 homólogos de ciclinas, incluidas en 9 clases con 23 subgrupos y dos ciclinas más que pertenecen a otras clases (Renaudin *et al.*, 1996; Yamaguchi *et al.*, 2000; Barrôco *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Menges *et al.*, 2005). Estas ciclinas son CYCJ18 (Abrahams *et al.*, 2001) y una proteína parecida a ciclina, llamada CYL;1 (Menges *et al.*, 2005).

En arroz (*Oryza sativa* L.) se han encontrado al menos 50 ciclinas, de las cuales comparte diez clases con *Arabidopsis* (A, B, C, D, H, L, SDS, Q, T y P), y presenta una clase

adicional, las F (La *et al.*, 2006), de las cuales su función aún no ha sido determinada. Un hecho notable es que la familia de las ciclinas de plantas parece ser la más grande entre los eucariontes. Por ejemplo, el genoma del nemátodo *Caenorabditis elegans* tiene 34 ciclinas (Plowman *et al.*, 1999), mientras que el número de ciclinas en humanos es de, al menos, 22 (Nakamura *et al.*, 1995; Pines, 1995).

2.2.1.2 Dominios en las ciclinas

Las ciclinas contienen una región conservada de 250 aminoácidos, llamado núcleo de ciclina, que a su vez consiste de dos dominios: el dominio ciclina amino terminal (N) y el dominio ciclina carboxilo terminal (C) (Nugent *et al.*, 1991) (Figura 7). El dominio N ciclina, de alrededor de 100 aminoácidos, contiene la región de unión a CDK. Este dominio también es llamado caja ciclina y es el dominio que distingue a las ciclinas. El dominio ciclina C se encuentra menos conservado y está presente en la mayoría las ciclinas, pero no en todas. Algunas ciclinas poseen una caja de destrucción (D-box) (Wang *et al.*, 2004) y la mayoría presentan el motivo PEST, el cual podría conferir inestabilidad a estas proteínas (Rechsteiner y Rogers, 1996; Wang *et al.*, 2004) (Figura 7).

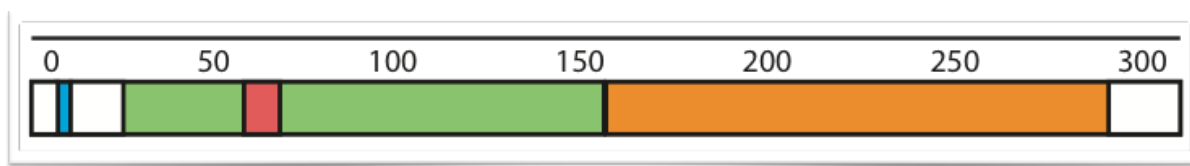


Figura 7. Representación esquemática de los diferentes dominios en las ciclinas. ■ Dominio N ciclina; ■ Dominio C ciclina; ■ caja ciclina; ■ motivo LxCxE. Escala: número de aminoácidos. Tomado de Bravo-Alberto y Buendía-Monreal, 2008.

2.2.1.3 Ciclinas tipo D

El primer punto de control durante el ciclo celular en plantas es la transición G1-S, en el cual la célula se compromete a la síntesis del DNA. Las ciclinas D (CycD) han sido propuestas como sensores primarios de las condiciones externas y por lo tanto, regulan este primer punto de control, dirigiendo la fosforilación de la proteína RBR, homólogo de plantas de la proteína retinoblastoma (Rb) (Boniotto y Gutiérrez, 2001; Dewitte y Murray, 2003; de Jager *et al.*, 2005; Uemukai *et al.*, 2005), la cual limita el avance hacia la fase S inactivando al factor transcripcional E2F, involucrado en la transcripción de genes que permiten el avance del ciclo (Figura 8).

La secuenciación completa del genoma de *Arabidopsis* muestra que el clado de las CycD consiste de 10 miembros, agrupados en 7 subclases. Su baja similaridad con las ciclinas D de animales impide establecer una relación de ortólogos entre ciclinas de plantas y animales (Wang *et al.*, 2004), aunque el dominio de unión a Rb se encuentra conservado entre ambas. Este dominio consiste en el motivo LxCxE y se ha demostrado que es necesario para la interacción *in vitro* entre CycD2;1 y CycD3;1 con RBR, respectivamente (Ach *et al.*, 1997; Huntley *et al.*, 1998). Las secuencias de CycD4;2 y CycD6;1 de *Arabidopsis* carecen de este motivo canónico LxCxE y CycD5;1 tiene un motivo ligeramente variado (Vandepoele *et al.*, 2002; Dewitte y Murray, 2003).

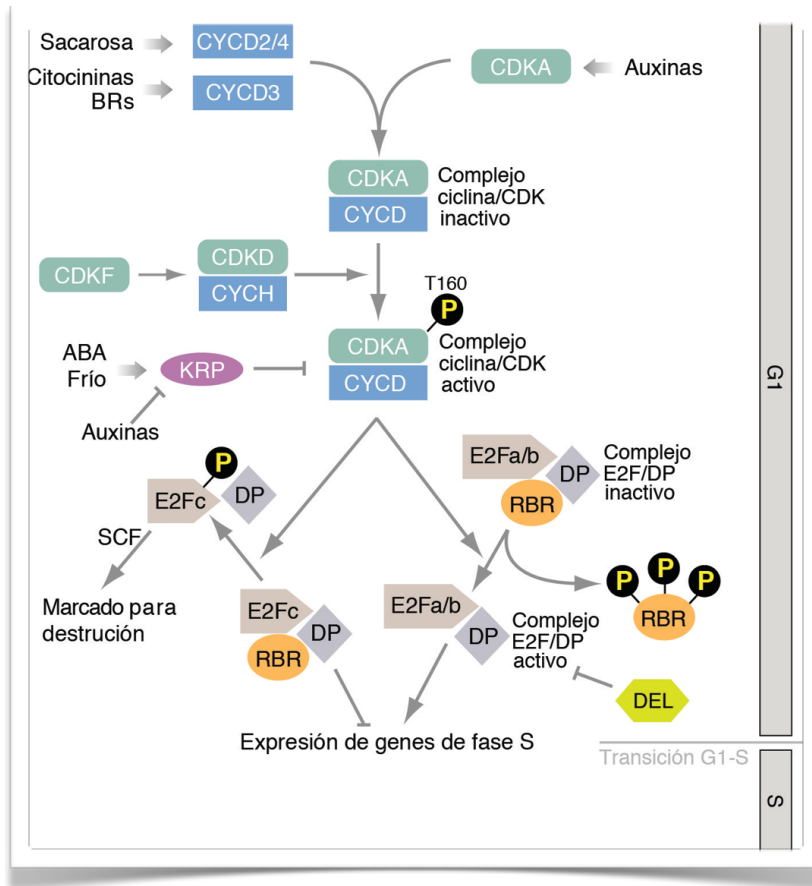


Figura 8. Participación de complejos CycD/CDK en la regulación de la transición G1-S en el ciclo celular de plantas. Adaptado de Inzé y De Veylder, 2006.

Se ha observado que en cultivos celulares de *Arabidopsis*, CycD2;1 y CycD3;1 forman complejos con CDKA pero no con CDKB1;1 (Healy *et al.*, 2001), de hecho el anticuerpo usado para inmunoprecipitar a CDKB reconocía a otras CDKB, incluyendo a CDKB2, mostrando que no hay interacción detectable con ninguna CDKB en inmunoprecipitados de estos cultivos celulares. En contraste, CycD4;1 se encontró unida a CDKB *in vitro*, aunque no fue confirmado por inmunoprecipitación de extractos celulares (Kono *et al.*, 2003). Se ha propuesto que el control de la transición G1-S por CycDs depende de la actividad de CDKA, la cual permanece presente a lo largo del ciclo, mientras que la actividad de CDKB se limita a la fase S y posteriores (Sorrell *et al.*, 2001; de Jager *et al.*, 2005).

CycD2;1 y CycD3;1 son las ciclinas D más estudiadas de *Arabidopsis*. Su expresión es regulada por señales externas como sacarosa, pero los niveles proteicos de CycD2;1 permanecen constantes cuando la sacarosa es retirada, mientras que los niveles de CycD3;1 siguen la cinética de su transcrito y caen más rápidamente (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000; Planchais *et al.*, 2004). A pesar de los niveles proteicos constantes de CycD2;1 y CycD3;1, la actividad de cinasa asociada a éstas decae al quitar la sacarosa. Ensayos de inmunoprecipitación en células en fase estacionaria, demostraron que CycD2;1 no está asociada con CDKA y se encuentra secuestrada en un complejo desconocido, mostrando actividad de cinasa nula, aun cuando los niveles proteicos se mantienen (Healy *et al.*, 2001). La expresión de CycD3;1, pero no la de CycD2;1, además de ser regulada por disponibilidad de sacarosa, responde fuertemente a fitorreguladores como citocininas y brasinosteroides (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2000; Oaekenfull *et al.*, 2002).

En cultivos celulares de *Arabidopsis* se observó que CycD3;1 es una proteína altamente inestable y se degrada vía proteasoma, y sus niveles dependen de su traducción continua (Planchais *et al.*, 2004). Además, cuando las células fueron tratadas con MG132, un inhibidor de proteasoma, se acumuló la forma hiperfosforilada de CycD3;1, mostrando un vínculo entre fosforilación y degradación (Vierstra, 2003).

2.2.1.3.1 Expresión de ciclinas tipo D de maíz

Los genes *Zeama;CycD2;2*, *Zeama;CycD4;2*, *Zeama;Cyc5;3a* y *Zeama;Cyc5;3b* (Buendía-Monreal *et al.*, 2011) (antes *Zeama;CycD2;1*, *Zeama;CycD4;1*, *Zeama;Cyc5;1* y *Zeama;Cyc5;2*, respectivamente) (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006) de maíz, muestran diferentes patrones de expresión durante la germinación de la semilla. *Zeama;CycD5;3b* se expresa durante las primeras horas de germinación, mientras que *Zeama;CycD4;2* muestra una acumulación desde niveles casi indetectables en semilla seca (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006). Al realizar tratamientos con adición de auxinas y citocininas exógenas durante la germinación de semillas maíz, se observó que los patrones de expresión de todas las ciclinas estudiadas se modificó; sin embargo, los tratamientos con citocininas produjeron un incremento de transcritos hacia las primeras horas de germinación (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006).

En 2011, Buendía-Monreal y col., reportaron el patrón de expresión de 13 genes adicionales de CycD, observándose que casi todas se expresan durante la germinación. Su expresión también se estudió en plántulas, en las que fueron expresadas a niveles altos en tejidos altamente proliferativos, como la raíz.

2.3 Regulación de la expresión génica

Existen varios niveles de regulación de la expresión génica, siendo el nivel transcripcional el primero en ocurrir. Posteriormente se da la regulación postranscripcional, como la maduración del mensajero y su exportación al citoplasma; después se encuentra el

control traduccional. Siguiendo a éste, encontramos el nivel postraduccional, consistiendo principalmente en modificaciones covalentes de proteínas, como fosforilación, ubiquitinación, metilación, sumoilación, entre otras.

Hasta ahora se conocen tres tipos de secuencias reguladoras en *cis* que controlan la transcripción: promotores, silenciadores y aumentadores (Klug *et al.*, 2008). En la figura 9 se muestran estos y otros elementos que controlan la expresión en genes eucarióticos.

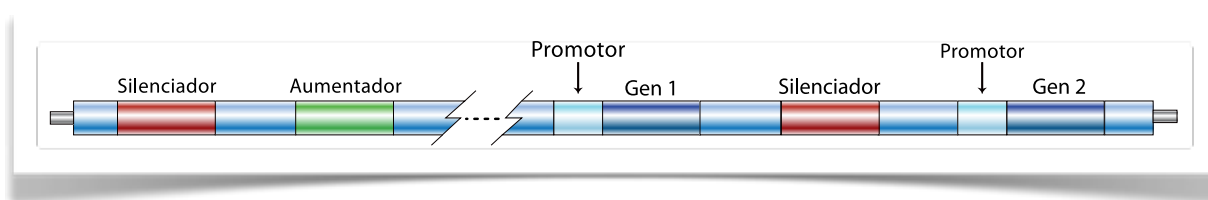


Figura 9. Modelo de los elementos contenidos en un promotor. Adaptado de Klug *et al.*, 2008.

La transcripción del DNA a una molécula de mRNA es un proceso muy complejo y altamente regulado, en el que se involucran varios tipos de secuencias de DNA e interacción de más de 100 proteínas, remodelado de la cromatina, plegamiento y formación de asas en el DNA (Klug *et al.*, 2008).

2.3.1 Promotores

Estas secuencias reguladoras en *cis* que participan en el control de la transcripción sirven como sitio de reconocimiento a la maquinaria transcripcional. Representan una región necesaria para iniciar la transcripción a nivel basal. La región promotora se encuentra adyacente al gen que regula, puede medir varios cientos de nucleótidos y especifica el sitio en

el que comienza la transcripción y la dirección que seguirá a lo largo del DNA (Klug *et al.*, 2008).

La región promotora de la mayoría de los genes posee varios elementos, incluyendo las cajas TATA, CAAT y GC. La región a la que se une la RNA polimerasa II es llamada caja TATA y también es referida como promotor núcleo. Se localiza de 25 a 30 pb (-25 a -30 pb) río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS); esta caja consiste en una secuencia consenso compuesta de pares de AT y generalmente se encuentran flanqueándola regiones ricas en GC. Los análisis genéticos muestran que mutaciones en secuencias TATA reducen la transcripción y sus deleciones pueden alterar el punto en que inicia la transcripción (Maniatis *et al.*, 1987).

Muchos promotores también contienen cajas CAAT. Estos elementos comprenden las secuencias consenso CAAT o CCAAT. Se localizan frecuentemente de -70 a -80 pb del TSS. Los análisis de mutaciones en cajas CAAT sugieren que son sitios de unión de proteínas al DNA que son críticas para facilitar la transcripción. Mutaciones a los lados de estas cajas no tienen efectos en la transcripción, mientras que mutaciones dentro de la secuencia CAAT disminuyen drásticamente los niveles. Otro elemento encontrado muy frecuentemente en los promotores, llamado caja GC, tiene la secuencia consenso GGGCGG y a menudo se localiza en la posición -110 pb. Los elementos CAAT y GC sirven para la unión de factores transcripcionales y funcionan como aumentadores de la transcripción (Maniatis *et al.*, 1987). Finalmente, las regiones promotoras de genes eucarióticos son módulos que varían en ubicación y organización. No existen elementos universales en los promotores; los genes

difieren en tipo, número, separación y orientación de los elementos de los promotores (Klug *et al.*, 2008).

2.3.1.1 Tipos de promotores

Las regiones promotoras pueden ser constitutivas o inducibles. Un promotor constitutivo es aquel que actúa en todos los tejidos bajo cualquier condición, mientras que uno inducible es únicamente activado en respuesta a estímulos específicos. Un promotor constitutivo puede tener distintos niveles de expresión, pero no puede ser silenciado en ningún tejido (Lessard *et al.*, 2002). El tiempo y lugar específicos en que se da la expresión de cada gen depende de las características de su región promotora.

2.3.2 Elementos de DNA *cis*-reguladores

La transcripción en eucariontes no se regula únicamente por la región promotora, sino también por secuencias de DNA llamadas aumentadores o represores. Estos elementos de respuesta pueden encontrarse a cualquier lado de un gen y a ciertas distancias, e incluso, dentro del mismo. Son llamados elementos *cis*-reguladores porque se encuentran estructuralmente adyacentes a los genes que regulan, a diferencia de los elementos en *trans* (e. g. proteínas de unión a DNA), los cuales pueden regular un gen en cualquier cromosoma (Serfling *et al.*, 1985).

Los elementos de respuesta normalmente interactúan con muchas proteínas reguladoras y factores transcripcionales, incrementando la eficiencia del inicio de la transcripción o la activación o represión de la misma (Higo *et al.*, 1999; Klug *et al.*, 2008).

En levaduras existen secuencias similares a los aumentadores, llamadas secuencias activadoras río arriba (UAS, por sus siglas en inglés), que pueden funcionar río arriba a distancias variables en cualquier sentido. Difieren de los aumentadores por que no pueden funcionar río abajo del TSS (Hughes *et al.*, 2000; Klug *et al.*, 2008).

Al igual que los promotores, los aumentadores son modulares y contienen varias secuencias cortas de DNA diferentes. Por ejemplo, el aumentador del virus SV40 (el cual es transcrito dentro de células eucariontes) tiene una estructura compleja, que consiste de dos secuencias adyacentes de 72 pb, localizadas alrededor de -200 pb del TSS. Cada una de las regiones de 72 pb contiene cinco secuencias que contribuyen con las tasas máximas de transcripción. Si alguna de estas dos regiones es suprimida no hay efecto sobre la transcripción, pero si ambas regiones se suprimen, la transcripción *in vivo* es reducida notablemente (Maniatis *et al.*, 1987).

Los aumentadores difieren de los promotores de varios modos. Mientras los promotores son esenciales para los niveles de transcripción basal, los aumentadores son necesarios para los niveles completos de transcripción. Además, los aumentadores son responsables de la expresión a nivel tejido específico. Estos elementos pueden estimular los niveles de transcripción a distancia, esto porque pueden unirse a ellos factores transcripcionales que modifican la estructura de la cromatina, y también doblando el DNA, para acercar aumentadores distantes a los promotores, formando complejos con factores transcripcionales y

polimerasas (Figura 10). En estas nuevas configuraciones, la transcripción es estimulada en niveles altos, incrementando la tasa de síntesis de RNA mensajero (Klug *et al.*, 2008).

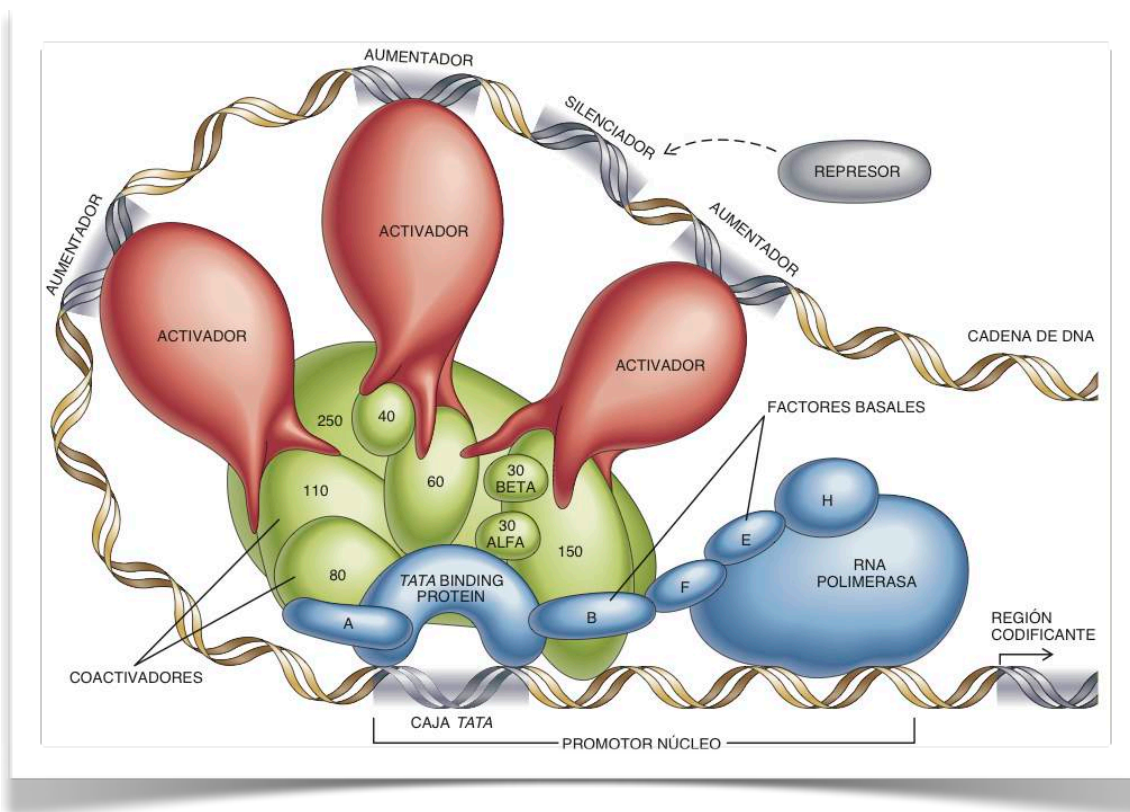


Figura 10. Complejo formado sobre el promotor y participación de los aumentadores o silenciadores durante el inicio de la transcripción. Modificado de Tjian, 1995.

2.4 Virus del mosaico de la coliflor

El virus del mosaico de la coliflor (CaMV) es un virus de la familia Caulimoviridae, perteneciente al Grupo VII de la clasificación de Baltimore (Virus de DNA bicatenario retrotranscrito). Este virus puede infectar una gran variedad de plantas de la familia Brassicaceae, principalmente col, coliflor, nabo y otras brasicáceas de ambientes templados (Tomlinson, 1987). El CaMV es transmitido por áfidos (Schoelz y Bourque, 1999) y es muy posible encontrarlo en cultivos en que estos insectos no son controlados adecuadamente, por

ejemplo en cultivos orgánicos. La infección inicial puede producir una baja en la calidad de los cultivos, pero infecciones tardías provocan síntomas en toda la planta. El virus infecta la mayoría de las células del hospedero y produce 105 partículas virales por célula. Cada partícula contiene una molécula del genoma viral, 8 kpb de DNA circular bicatenario con una copia de dos promotores, el 19S y el 35S (Hohn, 1999).

El ciclo de replicación del virus tiene dos fases, primero, el genoma viral es desnudado en el núcleo de la célula hospedera, forma un minicromosoma y es transcrito dando origen a dos RNAs, RNA 35S (utilizando el promotor 35S) y RNA 19S (usando el otro promotor). Posteriormente, estos RNAs son exportados al citoplasma, donde el RNA 35S sirve como template para transcripción reversa y también para ser traducido a varios productos génicos; el RNA 19S es traducido a un solo producto génico. El CaMV fue el primer virus de plantas encontrado que involucraba transcripción reversa en su replicación (Hull y Covey, 1983; Pfeiffer y Hohn, 1983; Hohn, 1999), actualmente se conocen mas de treinta virus con mecanismos de replicación similares.

2.4.1 Promotor constitutivo 35S

El promotor 35S fue descrito durante la década de 1980, inicialmente fueron descritos varios promotores de plantas que tenían usos potenciales en biotecnología. Este promotor confiere altos niveles de expresión de los genes que regula en la mayoría de las células a las que es transferido y esta expresión no depende de factores *trans*-activadores. Por esta razón es uno de los promotores más usados en biotecnología (Benfey y Chua, 1990).

Análisis de delección del promotor 35S revelaron la existencia de varios módulos reguladores de la expresión (Odell *et al.*, 1985; Ow *et al.*, 1987; Fang *et al.*, 1989). En tejido de callo y hoja de tabaco, una delección de -943 a -343 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción no disminuyó la expresión del reportero. Sin embargo, la delección hasta -105 pb disminuyó la transcripción a una tercera parte del valor control; posteriormente, la delección hasta -46 pb disminuyó la expresión a un veinteavo de la cantidad observada con -105 pb (Odell *et al.*, 1985). Estas observaciones sugieren que las regiones del promotor CaMV 35S entre -343 y -105 pb y -105 y -46 pb son importantes para la activación transcripcional. Un segundo estudio empleó delecciones 5' y 3' progresivas para definir de manera más precisa los elementos *cis*-reguladores. Se identificaron cuatro regiones que afectan la transcripción en hojas de tabaco (Fang *et al.*, 1989). Cuando la región entre -208 y -46 pb es suprimida, la transcripción decae a una veinteava parte del valor control. Esta región activa la transcripción en ambas direcciones, indicando que posee propiedades de aumentador. Posteriormente fue posible observar un efecto sinérgico al realizar combinaciones de elementos en *cis* del promotor. La región de -90 a +8 pb no presenta expresión detectable en tejido de hoja; de manera similar las fusiones del fragmento -343 a -208 pb unido al promotor mínimo 35S (-46 a +8 pb) no produjeron niveles de expresión detectables. Sin embargo, cuando los fragmentos -343 a -208 pb y -90 a +8 pb son fusionados, la expresión es detectada nuevamente en hoja (Fang *et al.*, 1989).

Estos análisis de delección en el promotor 35S sugieren que más de una región del promotor contribuye a la expresión. Cuando la región -90 a +8 es fusionada al gen estructural de cloranfenicol acetil-transferasa (CAT), la actividad de CAT es detectada en raíz pero no en hoja. Estudios más detallados de los módulos del promotor en distintos tipos celulares

mostraron que estas regiones regulan la expresión de manera diferencial dependiendo del tejido de que se trate, sin embargo, siempre se observan niveles basales de expresión en cualquier tejido y en cualquier etapa del desarrollo de la planta cuando se encuentra el promotor completo (Benfey y Chua, 1990).

2.5 Cultivo de tejidos vegetales

Los sistemas experimentales basados en el cultivo de células y tejidos vegetales se caracterizan por el uso de partes aisladas de plantas, llamadas explantes, obtenidos de plantas completas y mantenidos en medios nutritivos (Thorpe 1990 ; Sugiyama, 1999). Estos medios reemplazan el entorno de las células, tejidos o elementos conductores que rodean o se comunican con el explante. Estos sistemas experimentales son mantenidos usualmente en condiciones de asepsia. De otra manera, debido al rápido crecimiento de microorganismos contaminantes, el material cultivado podría ser rebasado rápidamente, resultando en la imposibilidad del análisis del objeto de estudio (Thorpe, 1981; Kyte y Kleyn, 1996; Neumann y Jafargholi-Imani, 2009).

El uso del cultivo de tejidos tiene como objetivo, al menos en estudios básicos, el ayudar a comprender mejor las respuestas bioquímicas, fisiológicas y anatómicas del material estudiado bajo factores específicos y en condiciones controladas, con miras a obtener una visión más acertada de lo que ocurre durante la vida de la planta en su entorno natural (Kyte y kleyn, 1996; Hazarika, 2006). Comparado con el uso de plantas completas, la principal ventaja de estos sistemas es el control más sencillo de factores ambientales físicos y químicos, los cuales pueden ser mantenidos constantes a costos razonables. También puede ser evaluado el

crecimiento y desarrollo de varias partes de la planta sin la influencia remota de otros componentes del cuerpo vegetal. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la histología del material cultivado experimenta cambios, y eventualmente podría perderse (Zimmerman, 1993). Actualmente es posible investigar la respuesta de ciertos tejidos a factores específicos, como lo es la influencia de nutrimentos u hormonas vegetales en el desarrollo y metabolismo relacionado al crecimiento de los tejidos (Vasil *et al.*, 1991; Neumann y Jafargholi-Imani, 2009).

Las ventajas de estos sistemas pueden verse contrarrestadas por algunas desventajas; por ejemplo, en sistemas heterótrofos y mixotróficos, en los que son requeridas altas concentraciones de azúcar (superiores al 2 %) y otros compuestos orgánicos, aumenta el riesgo de contaminación microbiana (Bhojwani y Razdan, 1983). Otras desventajas son las dificultades y limitaciones de la extrapolación de los resultados basados en cultivos celulares o de tejidos, para interpretar fenómenos que ocurren en organismos completos durante su desarrollo. Siempre ha de tenerse en cuenta que el cultivo de tejidos sólo es un sistema modelo, con todas las características positivas y negativas inherentes de tales montajes experimentales (Kyte y Kleyn, 1996; Hazarika, 2006).

La organización del sistema genético y de la estructura celular básica es esencialmente la misma, por lo tanto, el cultivo de tejidos de plantas superiores se adapta mejor como sistema modelo que los cultivos de algas, utilizados generalmente en investigaciones bioquímicas y fisiológicas (Dudits *et al.*, 1991; Ikeda *et al.*, 2006).

2.5.1 Tipos de cultivos

En esta disciplina, los términos *cultivo celular* y *de tejidos* son sumamente amplios y necesariamente inespecíficos. En términos prácticos, pueden distinguirse básicamente cinco áreas, las cuales son: cultivo de callos, suspensiones celulares, cultivo de protoplastos, cultivo de anteras y cultivo de órganos o meristemos (Neumann y Jafargholi-Imani, 2009).

2.5.1.1 *Cultivo de callo*

En este tipo de cultivo se utilizan partes aisladas de un cierto tejido llamado explante, mismo que es obtenidos asépticamente directamente del órgano de la planta, y cultivado en medio nutritivo. Después de transferir los explantes a condiciones promotoras de crecimiento, en la superficie del corte inicia la división celular, a modo de cicatrización de herida, ocurre un tipo de crecimiento desorganizado, dando inicio a la formación del callo (Constabel, 1984; Debergh y Zimmerman, 1993). Una vez comenzado este proceso, el medio se suplementa con hormonas de crecimiento, esta actividad de crecimiento desorganizado continuará y se mantendrá sin diferenciación morfológica evidente. Una de las ventajas de este montaje es que la diferenciación de órganos como raíces, tallos e incluso embriones, puede ser estimulada a partir de este tejido sin identidad morfológica (Smith, 1992). El cultivo de callo puede ser utilizado para estudiar procesos celulares y bioquímicos del crecimiento, relacionados con la división, alargamiento y diferenciación celular (Neumann y Jafargholi-Imani, 2009).

2.5.1.2 *Cultivo de células en suspensión*

Un cultivo de células en suspensión se caracteriza por ser una suspensión homogénea de células en división constante (King, 1984). Estos cultivos pueden utilizarse en estudios bioquímicos y sobre fisiología, así como para el estudio del crecimiento, metabolismo, biología molecular y en experimentos de ingeniería genética (Debergh y Zimmerman, 1993; Dudits *et al.*, 1995). También pueden ser usados para producción de metabolitos a gran escala (West y Mika, 1957; Tabata *et al.*, 1978). No existe un método estándar para generar cultivos en suspensión. Sin embargo, en la mayoría de los casos la transferencia de callo friable a medio líquido en agitación constante producirá la dispersión de las células. Los cultivos en suspensión crecen más rápido que el callo y son más homogéneos; a pesar de esto, la tasa de variabilidad genética también se incrementa, produciendo variaciones e inestabilidad en los cultivos (Dougall, 1990).

2.5.2 *Fitohormonas*

Las fitohormonas ocupan una posición central en la regulación del crecimiento y especialmente en la diferenciación de las plantas en general, así como en los sistemas de cultivos celulares y de tejidos. En analogía con las hormonas animales, las fitohormonas son definidas como sustancias producidas en algunos tejidos en determinadas etapas del desarrollo de una planta, se distribuyen por el sistema vascular y generalmente actúan en tejidos remotos, a concentraciones muy bajas (Maeda y Thorpe, 1979). Las fitohormonas forman parte de un tipo de sistema de señalización que coordina el desarrollo y crecimiento de las plantas. Las

funciones hormonales en sistemas animales son generalmente muy específicas y localizadas, mientras que en sistemas vegetales, las fitohormonas son un tanto inespecíficas, y a menudo se relacionan con el estado fisiológico o con la ubicación de las células o tejidos blanco. En estos sistemas, una reacción puede ser inducida por varias de estas sustancias, y a su vez, una sola fitohormona puede producir varias reacciones (Evans *et al.*, 1981; Gross y Parthier, 1994). Algunas reacciones en plantas completas se muestran en la tabla 4.

Con base en dichas respuestas, las fitohormonas son divididas en cinco grupos: auxinas, giberelinas, citocininas, compuestos gaseosos como el etileno, y un grupo asociado con el retardo del crecimiento y la abscisión, tal como el ácido abscísico y más recientemente también han sido descritos los brasinosteroides, el ácido jasmónico y el ácido salicílico (Evans *et al.*, 1981; Vasil y Thorpe, 1994; Davies, 1995; Brock y Kaufman, 1991); estos dos últimos, son parte de importantes mecanismos de defensa en las plantas. Existen también compuestos de origen sintético que inducen reacciones que son características de los grupos auxinas y citocininas, principalmente (George, 1993).

Tabla 4. Reacciones de plantas superiores después de la adición de fitohormonas (+, reacción positiva; -, reacción negativa).

Evento	Auxinas	Giberelinas	Citocininas	Etileno	ABA
Formación de raíz	+	-	-	+	-
Rompimiento de dormancia	+	+	-	-	-
Aumento de área de hoja	-	-	-	+	-
Desarrollo de brotes de hojas	-	+	-	-	-
Alargamiento de internodos	-	+	+	-	-
Senescencia de hojas	+	-	-	+	+
Activación de yemas laterales	+	+	-	-	-
Crecimiento de fruto	-	+	+	?	-
Abscisión de fruto	-	-	-	+	+

La síntesis de fitohormonas involucra distintas rutas metabólicas. Las auxinas son sintetizadas a partir del triptófano (Banrdusky *et al.*, 1995), las giberelinas son diterpenos (Sponsel, 1995), las citocininas son producto del metabolismo de nucleótidos (Binns, 1994) y el etileno es sintetizado a partir de metionina (Abeles *et al.*, 1992). La síntesis de ácido abscísico parte del metabolismo de diterpenos (Walton y Li, 1995). Las fitohormonas pueden ser clasificadas también como metabolitos secundarios, sin embargo, el metabolismo secundario es característico de células diferenciadas, con tasas de división bajas o nulas, pero las fitohormonas son sintetizadas en su mayoría, en tejidos jóvenes y con alta tasa de división celular, como los meristemos (Evans *et al.*, 1981; Brock y Kaufman, 1991).

Las fitohormonas y algunos reguladores de crecimiento sintéticos se encuentran en tres formas principales: 1) moléculas libres; 2) conjugados, en los que los compuestos se unen a moléculas de bajo peso molecular, como aminoácidos o carbohidratos y 3) moléculas unidas a estructuras de alto peso molecular, principalmente péptidos y proteínas. Cuando se encuentran como moléculas libres son fisiológicamente activas, mientras que los conjugados con moléculas pequeñas son formas de transporte y se encuentran inactivas. Las moléculas unidas a estructuras de alto peso molecular pueden funcionar como un tipo de inmovilización o almacenamiento inactivo en células (Chow y McCourt, 2006; Zhao, 2008; Neumann y Jafargholi-Imani, 2009).

2.6 Transformación genética por biobalística

Durante mucho tiempo la introducción de nuevas características en las plantas fue el fitomejoramiento vegetal tradicional, que implica la selección de individuos con características deseables, seguida de la hibridación sexual y finalmente la selección de plantas con el fenotipo deseado. La desventaja de este proceso estriba en que, para producir una nueva variedad se necesitan de 10 a 15 años (Okada *et al.*, 1986).

La ingeniería genética vegetal no sólo puede acelerar este proceso, también permite la transformación vegetal al introducir genes, ya sea por hibridación somática o utilizando una amplia gama de técnicas desarrolladas con el mismo fin (Iida *et al.*, 1991). Entre la amplia variedad de técnicas utilizadas para la transformación genética de células vegetales se encuentran las que van desde el sistema natural de transferencia génica por medio de *Agrobacterium* sp. y el tratamiento químico de protoplastos con polietilenglicol, hasta los procedimientos físicos que incluyen la electroporación de protoplastos y tejidos, la microinyección, la transformación mediada por fibras de carburo de silicio y el bombardeo de partículas (Southgate *et al.*, 1995).

En los últimos años la técnica del bombardeo de partículas se ha convertido en un método confiable para la producción de plantas transgénicas. Ésta se basa en la aceleración de microproyectiles (tungsteno u oro) cubiertos con DNA, por medio de una descarga explosiva o un gas presurizado (ej. dióxido de carbono, nitrógeno, helio) hasta una velocidad suficiente para penetrar la pared celular (Iida *et al.*, 1990). Una proporción de las células blanco permanece viable y el DNA una vez integrado en el genoma vegetal puede ser expresado (Southgate *et al.*, 1995; Vain *et al.*, 1995). Ésta técnica ha sido ampliamente aceptada y

además de extender el rango de organismos que pueden ser genéticamente transformados con diferentes fines, también tiene amplias aplicaciones en el campo de la biología molecular, donde se han desarrollado sistemas de expresión transitoria para monitorear de manera rápida la respuesta de los genes a factores ambientales, genéticos y tejido específicos (Morikawa *et al.*, 1989; Klein y Fitzpatrick-McElligot, 1993).

Muchos métodos de transformación están restringidos a un tipo de explante en particular; ejemplo de esto es la transformación mediada por fibras de carburo de silicio, que requiere de células en suspensión para llevarse a cabo, o la electroporación de protoplastos, los cuales necesitan bastante tiempo para su establecimiento y mantenimiento. Comparado con estas técnicas de transformación, el bombardeo de partículas permite la transformación de una gran variedad de células en suspensión, callos, protoplastos, tejidos meristemáticos y polen. Es así como el bombardeo de partículas cubiertas con DNA ha demostrado ser una técnica de fácil empleo, versátil y eficiente (Iida *et al.*, 1990; Southgate *et al.*, 1995).

3 Justificación

En el ciclo celular eucariótico, durante la transición de la fase G1 a S, han sido caracterizados complejos reguladores formados por cinasas dependientes de ciclina y ciclinas tipo D. Dentro de la familia de ciclinas D de maíz se han estudiado al menos 17 genes y se ha observado que existen fluctuaciones en su expresión durante la germinación. Al ser tratados con hormonas vegetales (auxinas, citocininas o ácido abscísico) estas fluctuaciones se modifican.

En reportes previos del grupo de trabajo del Dr. Jorge Vázquez Ramos, se demostró que algunos genes de ciclo celular responden a señales externas como la presencia de fuente carbonada u hormonas vegetales, elementos necesarios para que ocurra la germinación de la semilla de maíz. Estas observaciones llevan a suponer que en las regiones promotoras de los genes analizados pueden estar presentes elementos *cis* reguladores encargados o relacionados con dicha respuesta, por lo tanto, en el presente estudio se propone estudiar la región promotora de la ciclina D2;2 de maíz y la de un promotor constitutivo, el 35S del virus del mosaico de la coliflor, para detectar secuencias específicas de elementos *cis*-reguladores relacionados con la respuesta a hormonas vegetales, azúcares y a diversos factores transcripcionales involucrados principalmente en el control y establecimiento del ciclo celular. Este trabajo tiene como principal finalidad el proveer información sobre el posible papel de la región promotora de la ciclina D2;2 en el avance del ciclo celular percibiendo señales externas.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general



Analizar la región promotora del gen de ciclina D2;2 de maíz y el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), así como observar y comparar los niveles de expresión del gen reportero GFP bajo la regulación de ambos promotores en células de callo embriogénico de maíz y epidermis de cebolla, para conocer el papel que desempeñan en la respuesta a condiciones externas.

4.2 Objetivos particulares



Obtener la secuencia de los promotores de *CycD2;2* y CaMV35S para determinar tipo y posición de elementos *cis*-reguladores presentes en sus secuencias.



Clonar 2022 pb del promotor *CycD2;2* y el promotor CaMV35S, fusionados con el gen reportero GFP, respectivamente y transformar mediante biobalística callo embriogénico de maíz y epidermis de cebolla con las construcciones de ambos promotores para observar la actividad del gen reportero bajo la regulación de ambas regiones promotoras.



Comparar actividad de los promotores mediante la expresión de *GFP* para conocer su respuesta a distintas condiciones externas.

5 Materiales y métodos

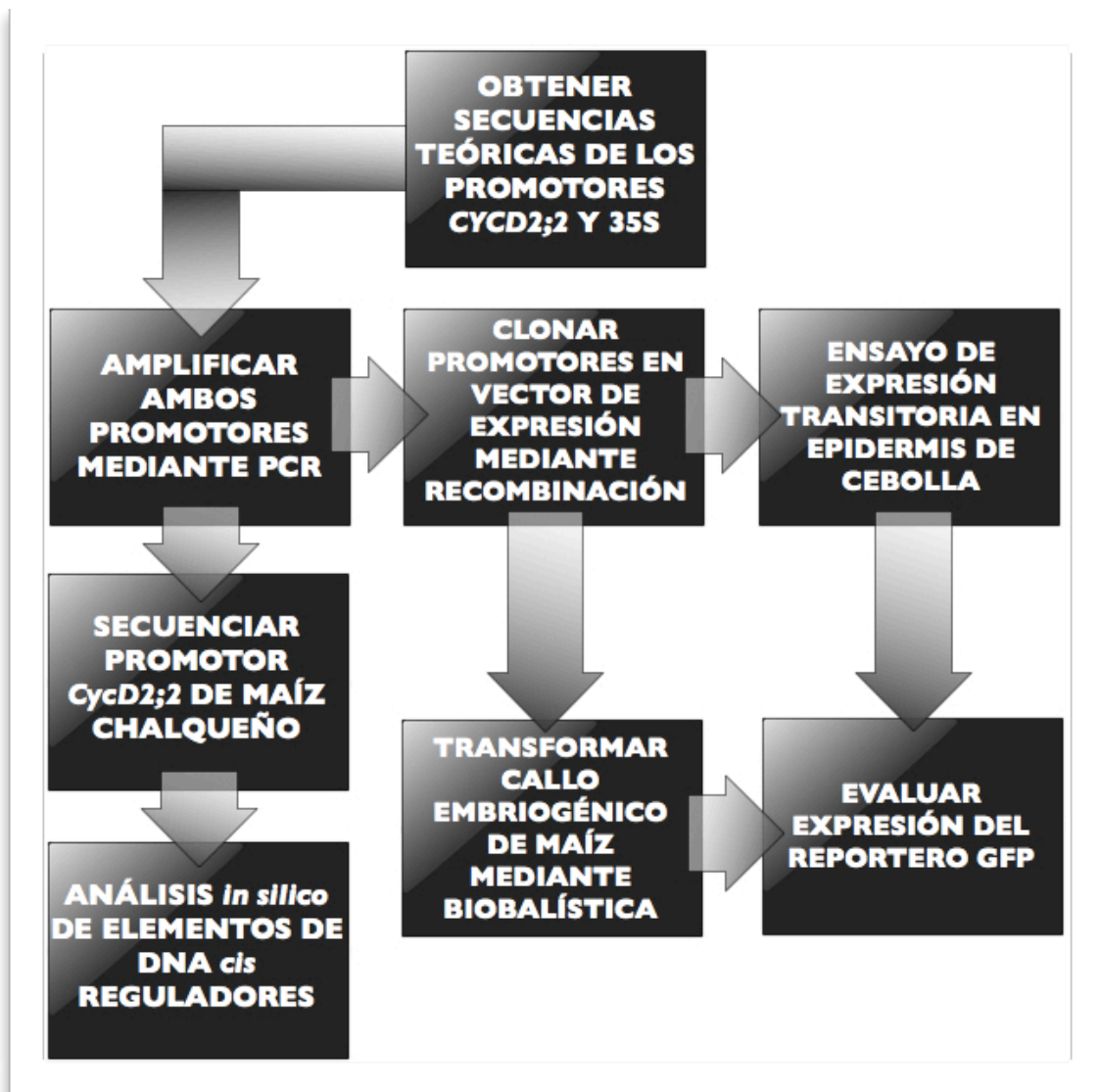


Diagrama que representa los pasos experimentales seguidos para cubrir satisfactoriamente los objetivos del trabajo.

5.1 Amplificación y clonación de las regiones promotoras

La secuencia del promotor de *CycD2;2* (*pCycD2;2*) de maíz se obtuvo de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante búsqueda con la herramienta de alineamiento básico local (BLAST, por sus siglas en inglés). Posteriormente se diseñaron cebadores de DNA específicos para *pCycD2;2* en las posiciones -2022 y -1 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, utilizando el programa AmplifX 1.5.4 (Jullien, 2008). La secuencia del promotor 35S (*p35S*) se obtuvo del vector *pEarleyGate103* (Earley *et al.*, 2006) (Apéndice 1A). Los cebadores fueron diseñados para amplificar el promotor completo (1335 pb), añadiéndoles la secuencia de los sitios de recombinación Gateway[®]. Al cebador *forward* de *pCycD2;2* se le añadió la secuencia CACC en el extremo 5' y fue clonado al vector *pENTRTM/D-TOPO[®]* (Invitrogen) (Apéndice 1B) siguiendo las indicaciones del fabricante (Tabla 5).

Tabla 5. Cebadores diseñados para amplificar los promotores mediante PCR

Cebador	Secuencia 5' → 3'	Fragmento esperado
<i>Forward pCycD2;2</i>	CAC CGG CCC CAT TTG TTT GGA AGT GT	2022 pb
<i>Reverse pCycD2;2</i>	TAG AAC GCC ACC TAC TTG CCG AA	
<i>Forward p35S</i>	AAA AGC AGG CTA GCT TAA CAG CAC AGT TGC TC	1335 pb
<i>Reverse p35S</i>	AGA AAG CTG GGC GTG TCC TCT CCA AAT GA	

Los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se llevaron a cabo utilizando *iProofTM High-Fidelity Master Mix* (Bio-Rad) siguiendo el protocolo del proveedor. Las condiciones para PCR fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 98° C durante 30 s; 35 ciclos de reacción (desnaturalización: 30 s a 98° C,

alineamiento 30 s a 61° C y extensión 15 s por kb a 72° C) y una extensión final de 5 min a 72° C. Los productos de PCR fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio, observado con transiluminador de luz UV y documentado con el Digital Science Image Station™ 440CF! (Kodak).

5.2 Construcción de las fusiones de los promotores al gen reportero GFP::*GUS* en pBGWFS7.0 (Sistema Gateway®)

Los promotores clonados en los vectores de entrada fueron subclonados en el vector de expresión para células vegetales pBGWFS7.0 (Apéndice 1C) utilizando la tecnología Gateway®, este es un método de clonación ampliamente usado que se basa en las propiedades de recombinación sitio-específico del bacteriófago lambda (Landy, 1989). Para esto, a los cebadores de p35S se les añadió el sitio de recombinación y se realizó la reacción de PCR; el vector pENTR™/D-TOPO® incluye los sitios en su secuencia, por lo que al realizar la clonación, éstos quedan fusionados a la secuencia de interés, dando origen a la clona de entrada directamente.

5.2.1 Preparación y transformación de células competentes de *Escherichia coli* DH5α

Se inoculó una colonia aislada de un stock en glicerol de la cepa de *E. coli* en 10 ml de caldo Luria (LB) en un matraz de 125 ml y se incubó a 37° C en agitación constante a 250 rpm durante toda la noche. Posteriormente se transfirieron 2 ml del cultivo a 200 ml de medio LB en un matraz de un litro y se incubaron a 37° C y 250 rpm hasta que el cultivo alcanzó una

absorbancia de 0.375 a 590 nm. Después, el cultivo se transfirió a 4 tubos estériles de 50 ml para centrífuga, y se incubaron durante 10 min a 4° C. Se centrifugaron a 3000 rpm a 4° C por 7 minutos y se resuspendió cada botón celular en 10 ml de CaCl₂ (60 mM, glicerol 15 %) frío. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm a 4° C por 5 min y se resuspendió cada botón celular en 10 ml de CaCl₂ (60 mM, glicerol 15 %) frío y se mantuvo en hielo por 30 min (nota: el contenido de los tubos puede juntarse en un mismo tubo). Se centrifugó a 3000 rpm a 4° C por 7 min, se resuspendió el botón celular en 2.5 ml de solución de CaCl₂ (60 mM, glicerol 15 %) fría y se hicieron alícuotas de 100 µl en tubos de microcentrífuga, las cuales se sumergieron en nitrógeno líquido hasta congelar y se almacenaron a -70° C.

Para transformar la cepa se tomó una alícuota de células competentes y se le adicionó de 0.1 a 1.0 µg de DNA plasmídico, se incubó en hielo 20 min y se le dio un choque térmico a 42° C durante 2 min, posteriormente se adicionó 1 ml de caldo Luria y se incubó 30 min a 37° C. Se plaqueó 0.1 ml de la muestra sobre una caja Petri con medio LB agar suplementado con el antibiótico apropiado.

La extracción de DNA plasmídico se realizó utilizando el illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) y PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen), siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante.

5.2.2 Reacción de recombinación

Una vez obtenido el fragmento esperado para p35S con los sitios de recombinación del sistema Gateway®, se realizó la primer reacción de recombinación utilizando como vector

donador al vector pDONRTM/Zeo (Invitrogen) (Apéndice 1D) con el BP ClonaseTM II Enzyme Mix (Invitrogen) (Figura 11), siguiendo las recomendaciones del fabricante, y se obtuvo la clona de entrada. Con ésta se transformó *E. coli* DH5 α y se plaqueó en cajas Petri de 15 x 100 mm con medio LB agar/zeocina (50 μ g/ml) y se incubaron a 37° C durante toda la noche.

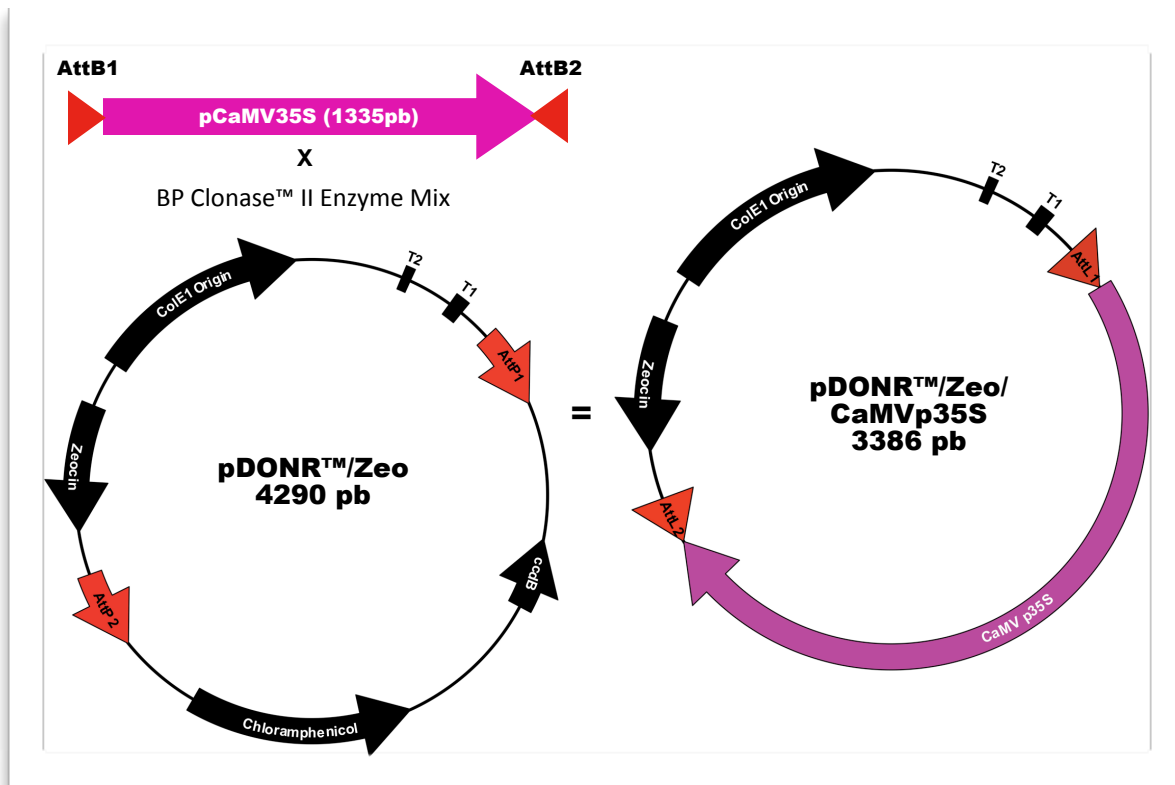


Figura 11. Representación de la reacción de recombinación entre el producto de PCR de p35S con los sitios de recombinación Gateway[®] (AttB1 y AttB2) y el vector donador pDONRTM/Zeo, dando origen a la clona de entrada pDONRTM/Zeo/CaMVp35S. Se observan los sitios de recombinación en color rojo y el inserto correspondiente al promotor p35S en rosa.

Las colonias obtenidas que corresponden a las transformantes se rayaron en cajas Petri con medio LB/zeocina y se duplicaron en cajas con LB/zeocina/cloranfenicol (50 μ g/ml; 50 μ g/ml), eligiendo aquellas que crecieron únicamente en la caja con zeocina. El mismo procedimiento se realizó para la clona pENTRTM/D-TOPO[®]/pCycD2;2, pero utilizando

kanamicina (50 µg/ml) como agente selectivo. Se realizó PCR en colonia para confirmar la presencia del inserto y posteriormente, la extracción de DNA plasmídico utilizando el ilustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit.

Con las clonas de entrada purificadas, se realizó la segunda reacción de recombinación, utilizando como vector destino el pBGWFS7.0 con el LR Clonase™ II Enzyme Mix, siguiendo las recomendaciones del fabricante, obteniendo como producto final la clona de expresión, que es el vector pBGWFS7.0 al cual se insertó el promotor *pCycD2;2* (Figura 12) y *p35S* (Figura 13), respectivamente, fusionados en marco de lectura con el gen reportero *GFP*.

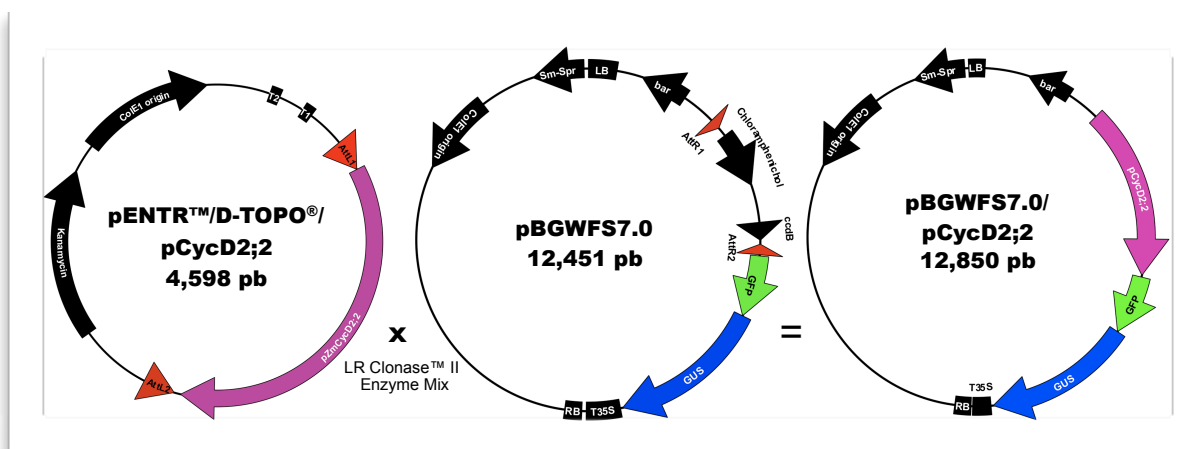


Figura 12. Representación de la reacción de recombinación entre el vector de entrada pENTR™/D-TOPO®/*pCycD2;2* y el vector pBGWFS7.0, resultando la clona de expresión pBGWFS7.0/*pCycD2;2*. Se observan en color rojo los sitios de recombinación, en verde y azul los reporteros *GFP* y *GUS*, respectivamente y el inserto correspondiente al promotor en rosa.

Se hizo una segunda transformación de *E. coli* DH5α con los productos de estas últimas recombinaciones. Las colonias obtenidas que corresponden a las células transformadas se rayaron en cajas con medio LB/espectinomicina (100 µg/ml) y se duplicaron en cajas con LB/espectinomicina/cloranfenicol (100 µg/ml; 50 µg/ml), eligiendo aquellas que crecieron

únicamente en espectinomycin. Se realizó PCR en colonia para confirmar la presencia del inserto y se extrajo plásmido usando el PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit, obteniendo así las construcciones con que se transformará el material biológico.

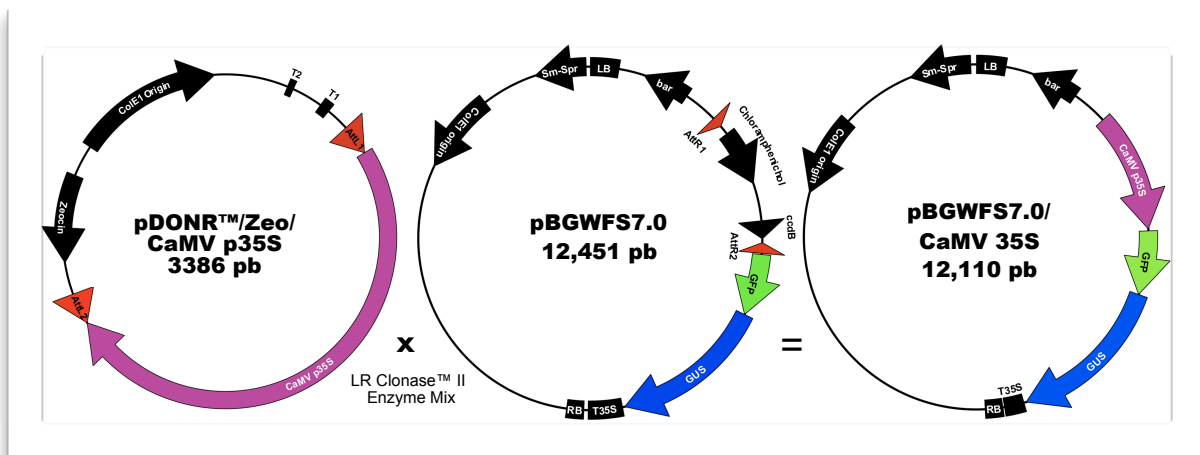


Figura 13. Representación de la reacción de recombinación entre el vector de entrada pDONR™/Zeo/CaMV p35S y el vector pBGWFS7.0, resultando la clona de expresión pBGWFS7.0/CaMVp35S. Se observan en color rojo los sitios de recombinación, en verde y azul los reporteros *GFP* y *GUS*, respectivamente y el inserto correspondiente al promotor en rosa.

5.3 Sistemas modelo

5.3.1 Callo embriogénico de maíz

El material biológico utilizado para transformación genética fue proporcionado por el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. Los cultivos de callo embriogénico fueron establecidos a partir de

embriones cigóticos inmaduros de maíz (*Zea mays* L., raza tuxpeño), cosechados 15–18 días después de la polinización. Se empleó medio N6p modificado (Chu *et al.*, 1975) (Apéndice 2A) para la inducción y proliferación. Los cultivos celulares fueron preparados durante los 3–4 meses previos a la transformación y subcultivados 12 días antes del bombardeo de partículas, siguiendo las condiciones establecidas por Guerrero-Andrade en 1998.

5.3.2 Epidermis de cebolla

Se empleó una cebolla de aprox. 150 g de peso y se desinfectó sumergiéndola en una solución de agua desionizada estéril con 10 % de hipoclorito de sodio, 4 gotas de tween-20 por cada 250 ml y 10 gotas de Microdín® por cada 250 ml. Se mantuvo en agitación constante durante 15 min. Una vez transcurrido este tiempo se hizo un segundo lavado con agua desionizada estéril por 10 min en agitación constante. Se escurrió el agua y se hizo un corte longitudinal, se tomó la tercera capa contando desde el centro. De ésta, se hicieron secciones de 1 cm² aprox. y se retiró la epidermis de la cara cóncava con ayuda de unas pinzas, colocándola en el centro de una caja Petri de 60 x 15 mm con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin sacarosa, adicionado con la hormona correspondiente a evaluar en el ensayo de expresión transitoria (AIA 0.5 µg/ml; ABA 1 µg/ml) . Posteriormente se realizó el bombardeo a 7.5 cm de distancia, a una presión de helio de 116 psi y un vacío de 20–22 in Hg. Se incubaron en iluminación constante durante 20 h a 25° C, para finalmente ser analizadas bajo microscopio confocal.

5.4 Transformación por biobalística

5.4.1 Preparación de los microproyectiles de tungsteno

Se pesaron 60 mg de partículas de tungsteno de 0.4 μm de diámetro (M5) y se colocaron en tubo de centrífuga de 10 ml, después se añadieron 2 ml de HNO_3 0.1 M y se sonicó en hielo durante 20 min. Posteriormente se eliminó el HNO_3 , se agregó 1 ml de agua desionizada estéril y se transfirió la muestra a un tubo de microcentrífuga, sonicándose brevemente. Las micropartículas se centrifugaron de 10 a 30 s a 10,000 rpm. Se eliminó el agua y se añadió 1 ml de etanol absoluto. Nuevamente se sonicó brevemente y se centrifugó de 10 a 30 s a 10,000 rpm para eliminar el etanol. Se agregó 1 ml de agua desionizada estéril y se sonicó brevemente. Posteriormente se colocaron 200 μl de la suspensión en tubos de microcentrífuga y se agregaron 750 μl de agua desionizada estéril. Finalmente se almacenaron a -20°C .

5.4.2 Acoplamiento del DNA a las micropartículas (Klein *et al.*, 1988)

En un tubo de microcentrífuga se colocaron 50 μl de la suspensión de micropartículas de tungsteno, a continuación se colocaron 50 μl de CaCl_2 2.5 M en la pared del tubo evitando mezclarlos con las partículas de tungsteno, después se agregaron 50 μl de DNA plasmídico (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) al CaCl_2 y se añadieron 20 μl de espermidina. Posteriormente se dio un pulso en vórtex a la mezcla y se centrifugó durante 10 s. Se eliminaron 100 μl del sobrenadante, resuspendiendo las partículas en el líquido restante. Finalmente se aplicaron 5 μl de las micropartículas cubiertas con el DNA en el centro del filtro del dispositivo de bombardeo.

5.4.3 Bombardeo con microproyectiles de tungsteno con cámara de baja presión (Bond *et al.*, 1992)

El bombardeo de partículas se llevó a cabo a una presión de helio de 120 psi a una distancia de 13 cm entre el filtro del dispositivo y el tejido blanco, en un vacío de 20–22 in Hg. Se tomaron los callos embriogénicos de 12 días después del subcultivo y se colocaron un día antes del bombardeo en cajas Petri de 60 x 15 mm con 15 ml de medio N6p sólido (2.8 g/l de Phytigel™) (Sigma-Aldrich). Se colocó una porción de callo de 1 cm de diámetro y 3 a 5 mm de espesor en el centro de la caja. Se procedió a realizar un disparo a cada caja, posteriormente se sellaron las cajas y se mantuvieron en recuperación durante los siguientes dos días a $25 \pm 2^\circ$ C, en condiciones de obscuridad.

5.5 Esquema de regeneración de plantas transgénicas

Dos días después del bombardeo el material fue pasado a medio de cultivo N6p líquido (2,4-D 2 mg/l, kinetina 0.15 mg/l) adicionado con de glufosinato de amonio (Basta®) 2 mg/l, en agitación a 200 RPM y obscuridad a $25 \pm 2^\circ$ C durante una semana. Se sustituyó el medio de cultivo con medio fresco y se mantuvo una semana más en las mismas condiciones. A la tercera semana se pasó el callo a medio sólido con 3 mg/l de Basta® en obscuridad. A la quinta semana se subcultivó en medio fresco bajo las mismas condiciones; en éste punto una porción del callo fue colocada en medio líquido y mantenida en agitación durante dos semanas para su análisis bajo microscopio confocal y otra porción fue almacenada para realizar ensayos de PCR y Western blot. A la séptima semana se cambió a medio de cultivo N6p sólido (2,4-D 1

mg/l, kinetina 0.075 mg/l) y 3 mg/l de Basta® en condiciones de fotoperiodo 16 h luz y 8 h oscuridad. A la décima semana el callo se cambió a medio MS sin hormonas y 1.5 mg/l de Basta®. Hasta este punto se mantendrán subcultivos periódicos bajo las mismas condiciones hasta observar puntos de regeneración.

5.6 Extracción de proteínas de callo embriogénico de maíz

Se pesaron 350 mg de callo y la muestra se congeló en nitrógeno líquido, posteriormente se pulverizó en mortero de porcelana y se almacenó a -70° C. El tejido se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se adicionaron 250 μ l de buffer de extracción (70 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 5 mM Na₂EDTA, 0.25 mM sacarosa, 7.5 mM DTT y 0.1 % Tritón X-100); los tubos se colocaron en vórtex por 5 min y se centrifugaron a 13,000 rpm a 4° C, se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se prosiguió con la cuantificación. Esta se realizó midiendo la absorbancia a 280 nm utilizando el equipo NanoDrop™ 2000c (Thermo scientific) con el software incluido, siguiendo las instrucciones del manual de usuario.

5.6.1 Inmunodetección del reportero GUS

Para la detección de la fusión de las proteínas GFP::GUS empleadas como reporteros en el vector, se corrieron 50 μ g de proteína total soluble en un gel de poliacrilamida al 10 % durante 90 min a 120 V. Posteriormente se transfirieron a una membrana PVDF de 0.45 μ m de poro (Millipore) previamente hidrolizada con metanol, utilizando como buffer de transferencia CAPS 1X en el Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) a 2.5 A y 25 V durante 7

min, repitiendo el programa de transferencia dos veces para asegurar la transferencia de la totalidad de las proteínas.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, ésta se bloqueó durante 2 h con una disolución de leche en polvo al 10 % en PBS 1X-Tween20 0.1 %, posteriormente se hicieron tres lavados de 10 min con PBS 1X. Después se añadió el anticuerpo primario anti- β -glucuronidasa (fracción de IgG de conejo) (Invitrogen) en proporción 1:1000 en una solución de leche en polvo 5 % en PBS 1X-Tween20 0.1 %, y se incubó durante toda la noche a 4° C en agitación constante. A continuación se hicieron tres lavados con PBS 1X-Tween20 0.1 % de 15 min cada uno y se adicionó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a la peroxidada alcalina (Sigma) en proporción 1:40,000, en una solución de leche en polvo al 5 % en PBS 1X-Tween20 0.1 %, incubándolo durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Finalmente se hicieron tres lavados más con PBS durante 15 min cada uno.

La identificación de proteínas se realizó por quimioluminiscencia bañando las membranas con el Western Blotting Detection Reagent (Millipore). El revelado se hizo en placas fotográficas Hiperfilm ECL 18 x 24 cm (Kodak) utilizando la solución de revelado GBX Developer (Kodak) y de fijación GBX fixer (Kodak).

5.7 Extracción de DNA genómico de callo embriogénico de maíz

Se molieron 350 mg de callo congelado en nitrógeno líquido y se colocaron en un tubo estéril de 15 ml. Después se adicionaron 9 ml de buffer CTAB modificado (2 % CTAB, 1.5 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris y 2 % 2-mercaptoetanol) y se resuspendió el tejido

molido. Posteriormente se incubó a 60° C durante 90 min en agitación continua, una vez transcurrido el tiempo se dejó enfriar la muestra y se adicionaron 4.5 ml de cloroformo-octanol (24:1) y se agitó lentamente por 10 min. Se centrifugó a 12,000 rpm 10 min a temperatura ambiente y se decantó la fase acuosa (superior) en un tubo nuevo y se repitió la extracción con cloroformo-octanol.

Se centrifugó nuevamente por 10 min a 12,000 rpm y la fase acuosa se recuperó en un tubo nuevo con 6 ml de isopropanol y se mezcló por inversión. Con una punta de pipeta Pasteur se colectó el DNA y se lavó con 2 ml de etanol 76 %, 0.2 M acetato de sodio por 20 min y después con 2 ml de etanol 76 %, 10 mM acetato de amonio. Se dejó secar la pastilla, se resuspendió en buffer TE o agua desionizada estéril (50-400 µl) y se almacenó a 4° C durante toda la noche. Finalmente se centrifugó por 10 min para separar los sólidos, en una microcentrífuga y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo para ser almacenado a 4° C o -20° C. Parte del DNA genómico extraído fue empleado para realizar ensayos de PCR para determinar que los callos fueron transformados de manera estable.

6 Resultados

6.1 Obtención de las secuencias promotoras

Se partió de la secuencia de cDNA de la ciclina D2;2 de maíz. Para obtener la región promotora se realizó una búsqueda BLAST en la base de datos de secuencias genómicas (gss) de maíz en el NCBI. Se eligieron las secuencias que permitieran extender el extremo 5' del gen de ciclina y se alinearon manualmente con la secuencia respectiva de cDNA, utilizando Seaview v4.2.6 y Geneious 5.0.3.

La secuencia obtenida como posible promotor se acotó a 2022 pb. Se diseñaron cebadores específicos para amplificar la secuencia por PCR (Tabla 5) a partir de DNA genómico extraído de ejes embrionarios de maíz (Figura 14). Posteriormente el producto de PCR fue clonado en el vector pENTR™/D-TOPO® (Figura 15A) y fue secuenciado para su corroboración (Apéndice 3).

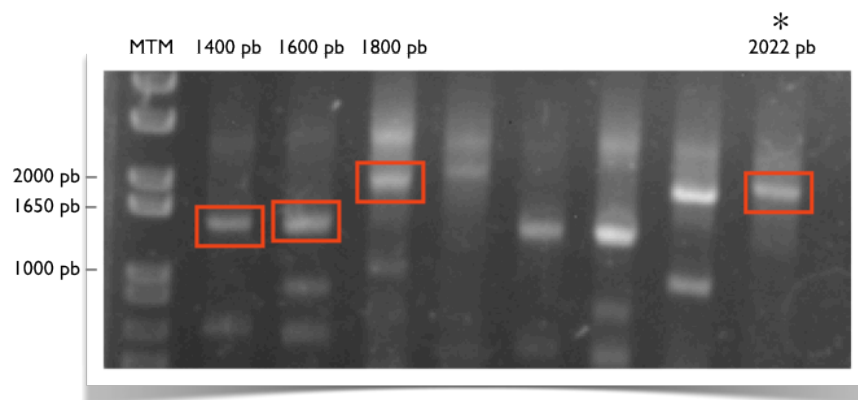


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación por PCR de diferentes tamaños del promotor de *pCycD2;2* en DNA genómico de ejes embrionarios de maíz. MTM (marcador de tamaño molecular); el tamaño de cada fragmento se indica en la parte superior del carril correspondiente, indicando el de 2022 pb con un asterisco.

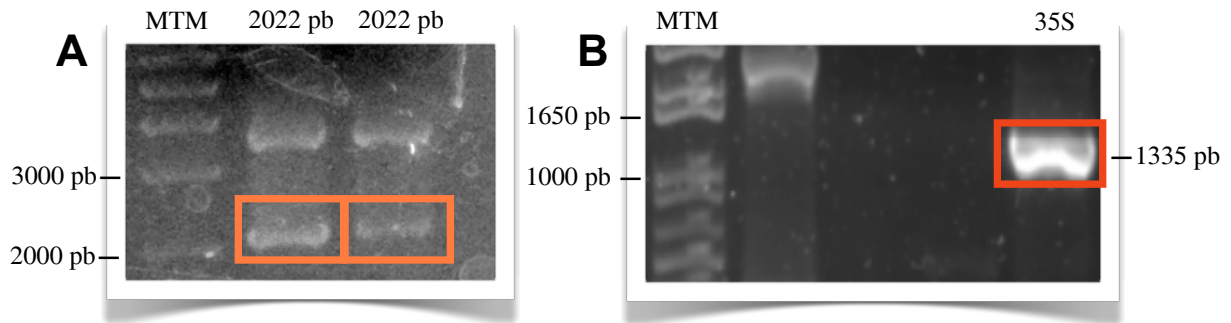


Figura 15. PCR en colonia de la cepa de *E. coli* transformada con los productos de la clonación. **A)** *pCycD2;2* en pENTR™/D-TOPO® y **B)** *p35S* en pDONR™/Zeo. MTM (marcador de tamaño molecular); fragmentos del tamaño esperado se rodean de color rojo.

Posteriormente se alineó la secuencia teórica del promotor del gen de ciclina D2;2 de maíz variedad B73, obtenida mediante BLAST en el NCBI, y la secuencia experimental clonada en pENTR™/D-TOPO®. El porcentaje de identidad fue de 98.4 % (Figura 16). El promotor 35S fue obtenido y amplificado del vector pEarleyGate103 (Figura 15B).

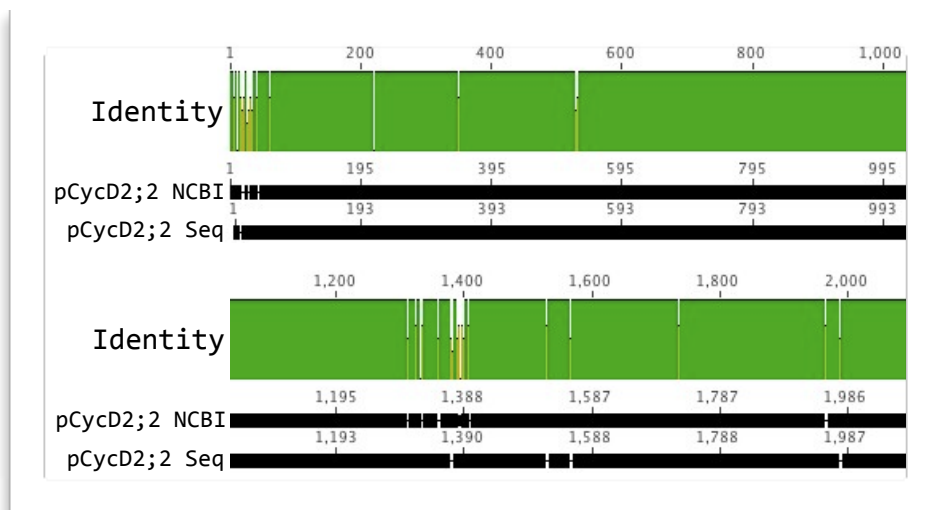


Figura 16. Alineamiento de las secuencias teórica (NCBI, maíz variedad B73) y experimental (clonada y secuenciada, variedad Chalqueño). En la representación de identidad se observa en color verde los nucleótidos idénticos entre las dos secuencias y las variaciones se muestran como líneas blancas.

6.2 Caracterización *in silico* del promotor de *CycD2;2*

La secuencia amplificada como posible promotor de *CycD2;2* fue sometida a un análisis *in silico* para corroborar que se trataba de un promotor de plantas. Dicho análisis se basó en el modelo propuesto por Yoshiharu y colaboradores en 2007 (Figura 17A), donde se describen los elementos que componen a un promotor canónico de plantas, los cuales son sitio de inicio de transcripción (TSS), caja TATA, un parche de pirimidinas o parche Y y una zona de regulación múltiple, denominada regulón. La secuencia analizada cumplió con todas las características anteriores, por lo que puede ser considerada como un promotor de plantas (Figura 17B).

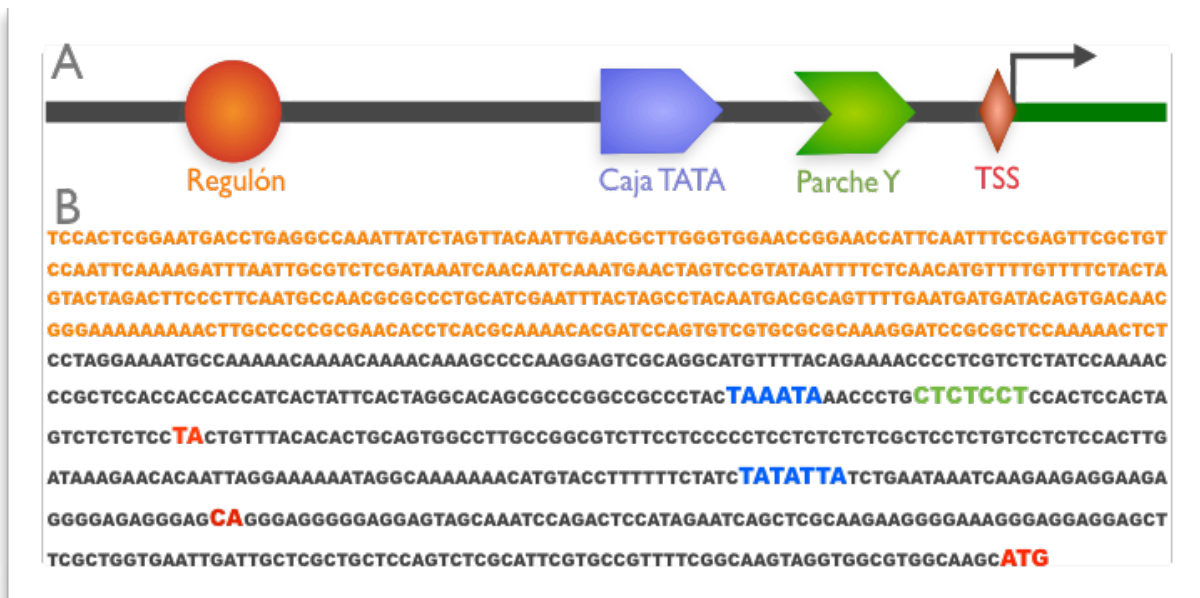


Figura 17. Estructura de un promotor de plantas. **A)** Estructura canónica de un promotor de plantas, descrita por Yoshiharu y col., 2007. **B)** Elementos presentes en la secuencia del promotor de *CycD2;2*, obtenidos mediante análisis *in silico*.

En el análisis fueron encontrados dos posibles sitios de inicio de la transcripción, ubicados a -144 y -333 pb (Bravo-Alberto y Buendía-Monreal, 2008), un parche Y a -356,

dos cajas TATA a -180 y -369 , y una zona correspondiente al regulón, la cual está compuesta por distintos tipos de elementos de respuesta. De esta zona se hizo un análisis detallado usando la base de datos PLACE (Higo *et al.*, 1999) para determinar los tipos de elementos de respuesta y su posición en la secuencia del promotor. Un resumen de los elementos encontrados, así como su posición se muestra en la (Figura 18), haciendo hincapié en los elementos de respuesta a fitohormonas (auxinas, citocininas, ácido giberélico, ácido abscísico y etileno) y azúcares. También se encontraron elementos de respuesta a factores transcripcionales como E2F, un regulador importante de genes de ciclo celular, y otros más, relacionados con la respuesta temprana y tardía a estrés hídrico como MYB y MYC, respectivamente, y de tipo DOF, una proteína de unión a DNA con un solo dedo de zinc, única en plantas, relacionada con el aumento de la transcripción de algunos genes.

6.3 Fusiones traduccionales a GFP

Los productos de PCR mostrados en la figura 15 fueron clonados y purificados, *pCycD2;2* en pENTRTM/D-TOPO[®], el cual ya contiene los sitios de recombinación del sistema Gateway[®]; p35S fue amplificado de pEarleyGate103 con los cebadores específicos diseñados, a los cuales se les añadieron los sitios de recombinación Gateway[®] mediante PCR. El fragmento amplificado fue purificado del gel de agarosa y cuantificado para posteriormente hacer la reacción de recombinación en el vector de entrada pDONRTM/Zeo, finalmente ambos promotores fueron subclonados por recombinación Gateway[®] en el vector pBGWFS7.0, obteniendo de este modo las clonas de expresión para células vegetales.

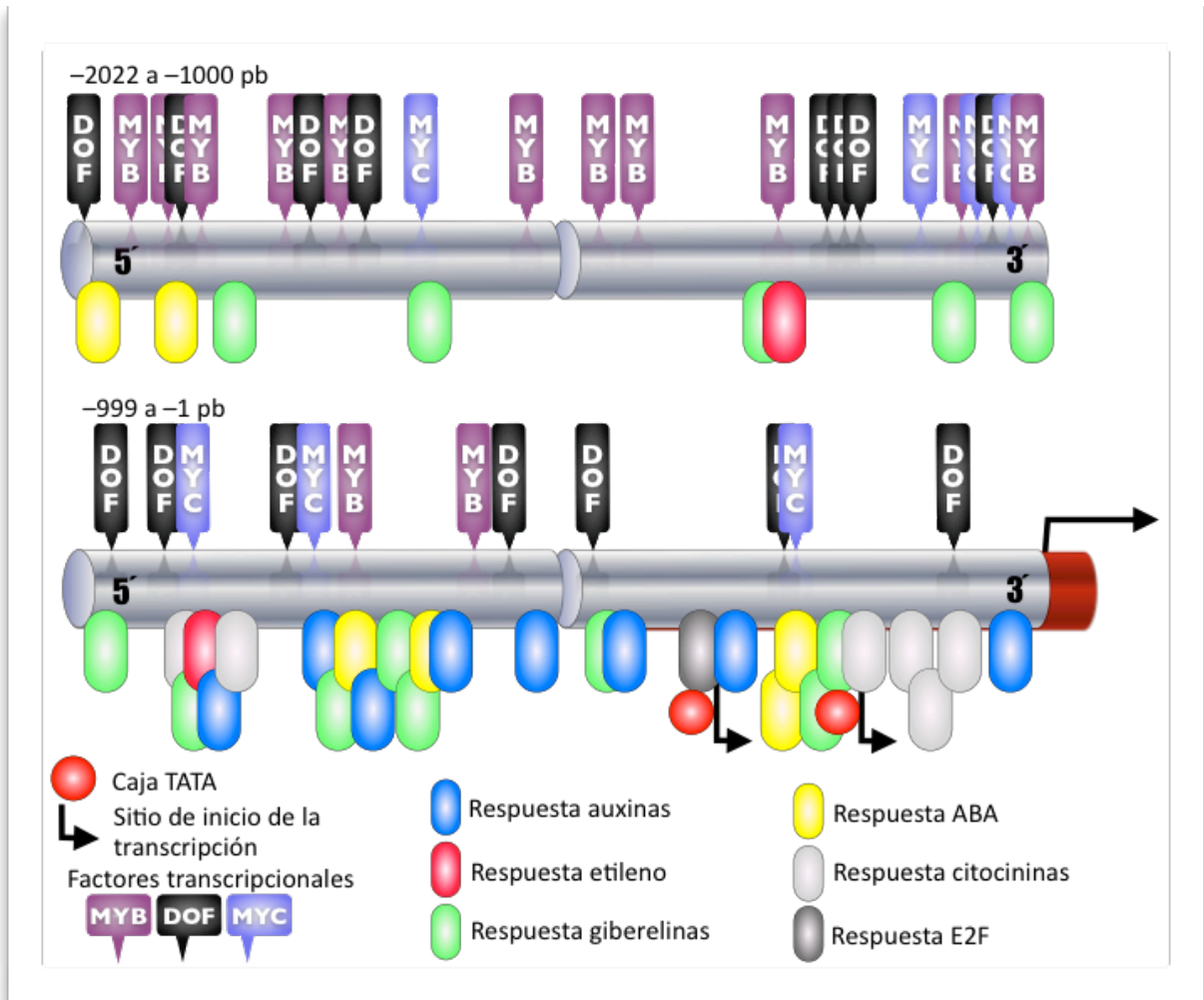


Figura 18. Representación gráfica de los distintos elementos de respuesta presentes en el promotor de *pCycD2:2* predichos por la base de datos PLACE, así como su ubicación aproximada en la secuencia. Se muestra en rojo la región de inicio de traducción correspondiente al gen de ciclina. Los elementos de respuesta del promotor 35S se muestran en el apéndice 4.

Después de realizar las clonaciones y recombinaciones necesarias se obtuvieron las construcciones deseadas, con las cuales fueron transformadas células de *E. coli*, mismas que fueron corroboradas por PCR en colonia (Figura 19).

Se puede observar que las construcciones fueron obtenidas correctamente ya que las bandas amplificadas por PCR corresponden al tamaño esperado. Con estas construcciones es

posible transformar material vegetal y monitorear la actividad de la proteína verde fluorescente (GFP) *in vivo*, así como medir los niveles de proteína mediante Western blot usando los anticuerpos contra GFP o GUS.

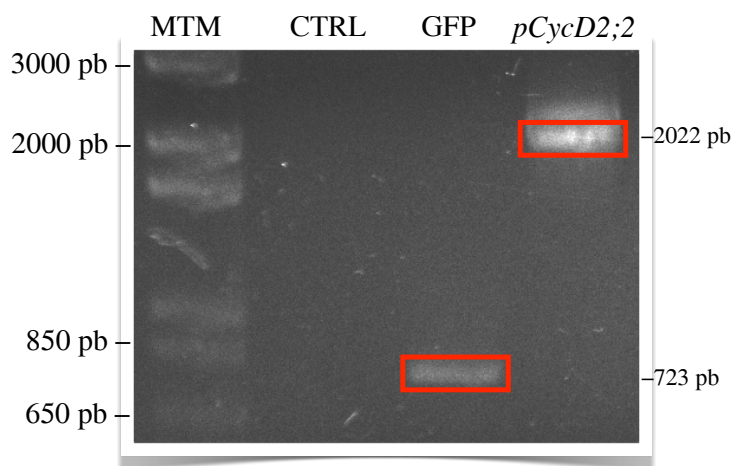


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR en colonia de la clona de expresión pBGWFS7.0/*pCycD2;2*. Se amplificó a GFP como control positivo y como control negativo se utilizó el vector vacío como templado con cebadores para *pCycD2;2*. Sobre cada carril se indica el fragmento al que corresponde; del lado derecho se indica el tamaño esperado de los fragmentos; MTM (marcador de tamaño molecular); CTRL (control negativo).

6.4 Transformación de callo embriogénico de maíz y células de epidermis de cebolla por biobalística

Utilizando una cámara de bombardeo de baja presión se transformaron callos embriogénicos de maíz con las construcciones de los promotores de *CycD2;2* y 35S, además se utilizó una construcción adicional como control negativo, la de la región no traducible 5' (UTR 5', por sus siglas en inglés) del promotor de *CycD2;2* de maíz, clonada en el mismo vector de expresión (Bravo-Alberto, 2011). Posterior al bombardeo, los callos fueron sometidos a un esquema de regeneración y selección con glufosinato de amonio, herbicida al cual confiere resistencia el vector, para favorecer la proliferación de las células transformadas. A las siete semanas del esquema de regeneración se realizaron observaciones de células en

suspensión, mantenidas en agitación constante y en condiciones de obscuridad durante dos semanas, para detectar a GFP mediante microscopía confocal (Figura 20).

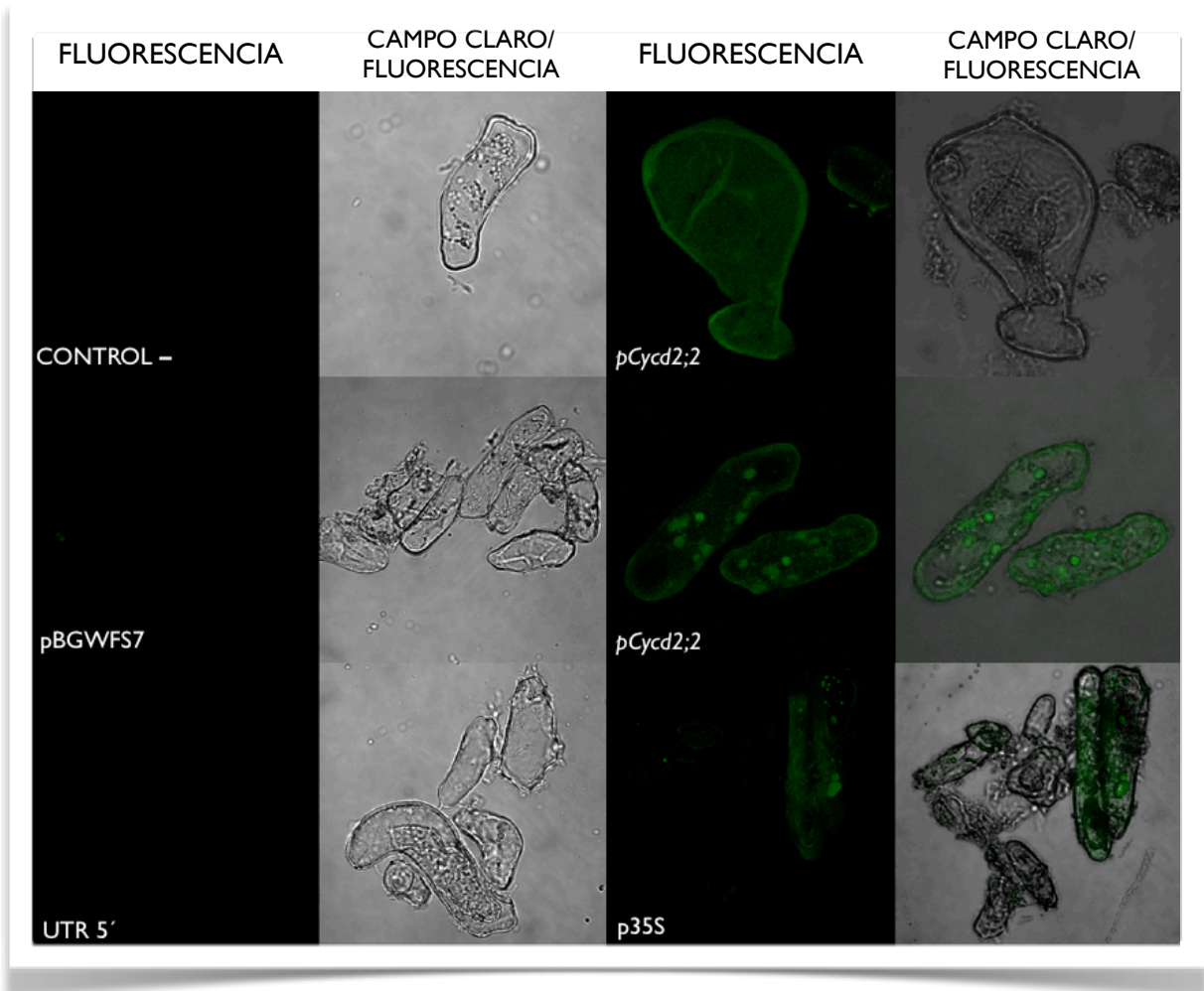


Figura 20. Imágenes de microscopía confocal de células de callo embriogénico de siete semanas bajo el esquema de selección, en suspensión, transformadas con las distintas construcciones expresando a GFP. pBGWFS7 (*GFP* sin promotor).

La figura 20 permite ver la señal emitida por la proteína verde fluorescente en las células de callos transformados con las construcciones de los promotores de ciclina y 35S, no siendo así en las de la construcción *pCycD2;2 UTR 5'* ni en el control negativo. Al comparar la señal emitida por *pCycD2;2* y 35S, fue apreciable el hecho de que el promotor regulable muestra una intensidad de señal mayor a la del promotor constitutivo. La construcción con la UTR no

muestra ninguna señal del reportero debido a que ésta no contiene ninguno de los elementos basales reconocidos por la maquinaria transcripcional para iniciar la expresión del gen, lo cual es consistente con el análisis *in silico* realizado para caracterizar el promotor.

Con las mismas tres construcciones se realizó un ensayo de expresión transitoria en epidermis de cebolla. Este sistema permite el observar en tan sólo 24 h la presencia del gen reportero, además de permitir variaciones en las condiciones en que se incubaba, por ejemplo, la adición de fitohormonas a distintas concentraciones, entre otras.

En la figura 21 se observa que la proteína verde fluorescente está presente bajo todas las condiciones, mientras que en la construcción con la UTR y en el control negativo no se observa (Figura 22), lo cual indica que los elementos basales para la expresión génica no están presentes en dicha construcción y a consecuencia de ello, no es posible la transcripción del reportero, luego entonces, no hay traducción de GFP.

Otro hecho interesante, es que al adicionar auxinas (AIA) en el ensayo de expresión transitoria se produce la inducción del gen reportero, la cual probablemente pueda deberse a los elementos de respuesta a auxinas presentes en la secuencia del promotor, y debido a estos elementos, es posible detectar niveles mayores de GFP en los tratamientos con auxinas que en el control sin hormonas. A diferencia del promotor de ciclina, el cual es un promotor regulable, el promotor constitutivo 35S no mostró ningún cambio en la expresión del reportero ante la presencia de la hormona (Figura 21).

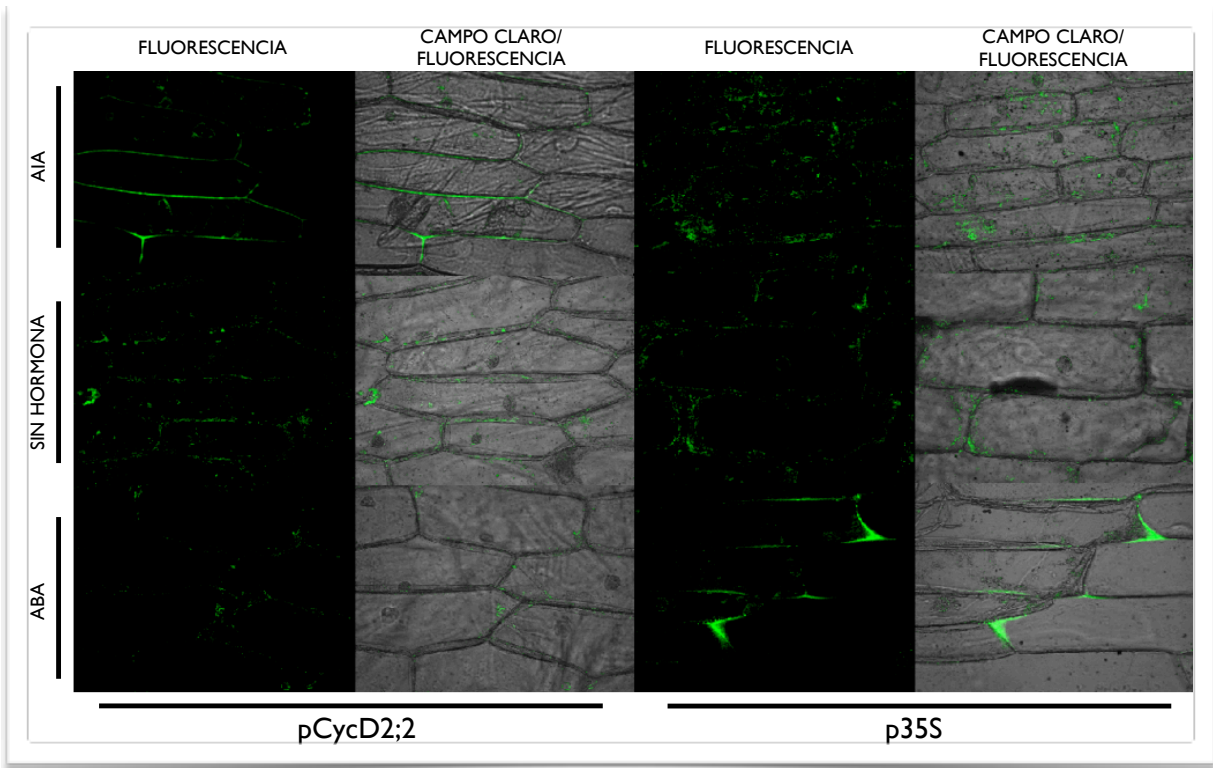


Figura 21. Ensayo de expresión transitoria en células de epidermis de cebolla en diferentes tratamientos hormonales. AIA (ácido indol-acético); ABA (ácido abscísico).

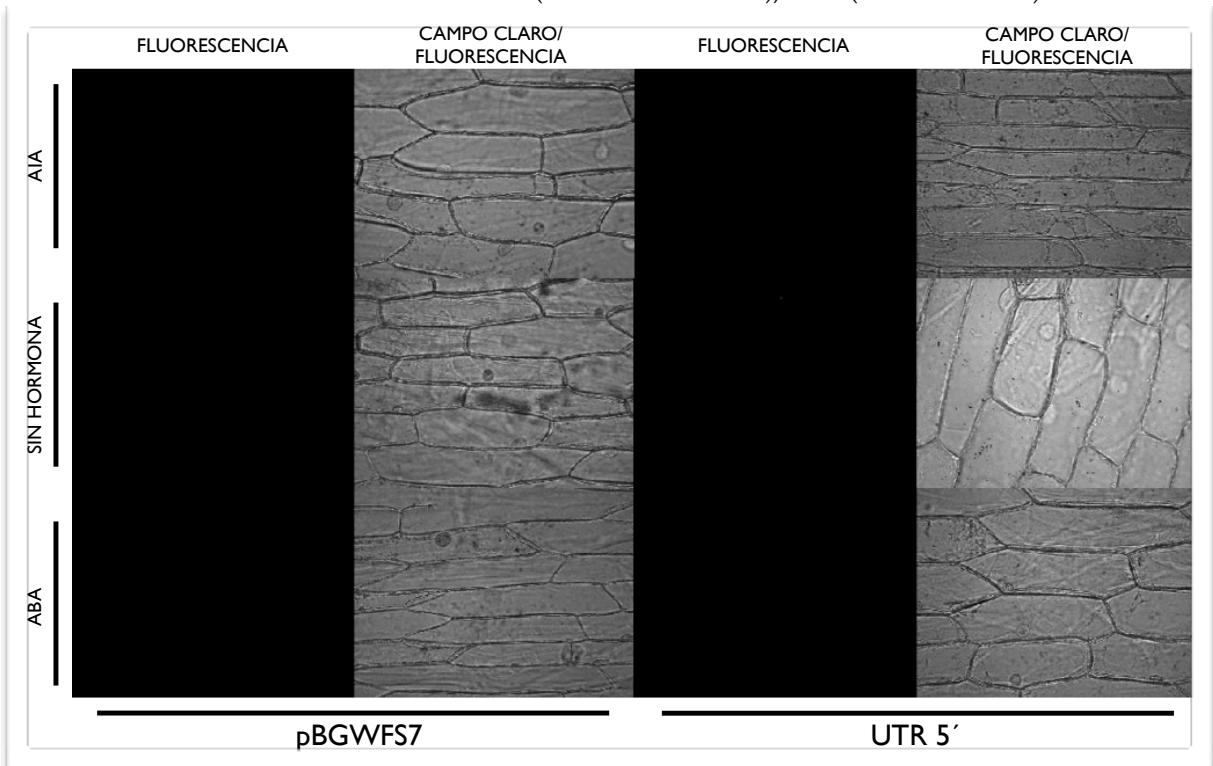


Figura 22. Ensayos de expresión transitoria de los controles negativos: pBGWFS7 (vector con *GFP* sin promotor); y construcción UTR 5'. AIA (ácido indol-acético); ABA (ácido abscísico).

6.4.1 Amplificación del gen reportero *GFP* en callo de maíz transformado con *pCycD2;2*

A partir de la extracción de DNA genómico de los callos transformados con la construcción *pCycD2;2*, se realizaron ensayos de PCR para verificar la inserción estable de los genes reporteros. Los resultados de la figura 23 muestran que la transformación y el esquema de selección fueron exitosos, y que en efecto, el gen reportero se encuentra insertado de manera estable en el genoma de las células del callo tratado, ya que fue posible amplificar el gen *GFP* completo, utilizando cebadores específicos.

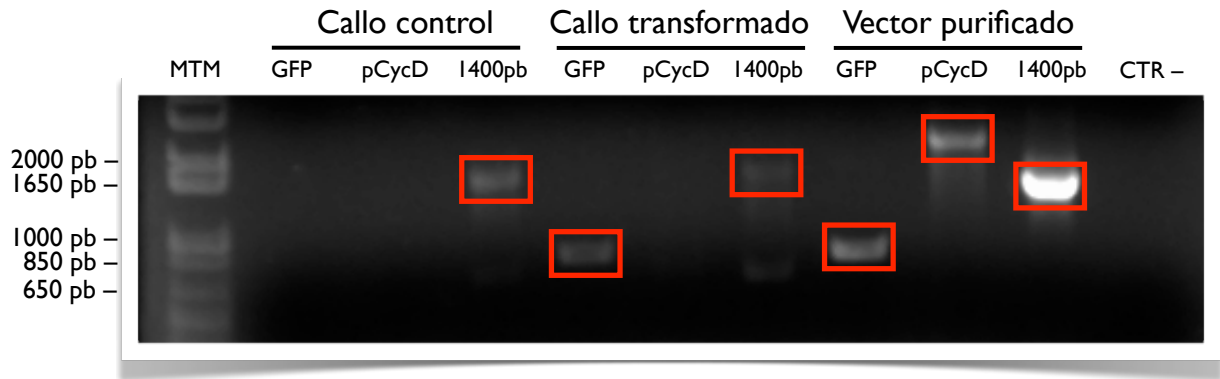


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR usando como templado: DNA genómico de callo sin transformar (callo control), callo transformado y un control positivo con el vector pBGWFS7.0/*pCycD2;2* purificado de la cepa de *E. coli* transformada. Se amplificó *GFP* (723 pb), *pCycD2;2* completo (2022 pb) y un fragmento de 1400 pb del mismo promotor. CTR- (el templado fue el vector sin promotor, usando cebadores para *pCycD2;2*). MTM (marcador de tamaño molecular).

6.4.2 Inmunodetección de reporteros en callo embriogénico

Para verificar si la fluorescencia detectada en los callos transformados efectivamente es debida a la expresión del reportero, se realizó la inmunodetección con el anticuerpo correspondiente a GUS a partir de extractos de proteína de callo seleccionado durante cuatro meses con glufosinato de amonio. Realizando ensayos de Western blot fue posible observar

una proteína de un peso cercano a los 100 kDa, correspondiente al peso de las proteínas de los genes reporteros, las cuales se encuentran fusionadas. Esta fusión GFP::GUS, tiene un peso de 98 kDa y no pudo ser observada en el tratamiento control transformado con el vector vacío, ni en callo sin transformar. Estos resultados indican que la fluorescencia detectada fue debida a la presencia de GFP y, en conjunto, demuestran que la transformación de los callos embriogénicos de maíz fue exitosa y que el promotor *CycD2;2* permite la expresión génica, conduciendo así la síntesis de la proteína reportera (Figura 24).

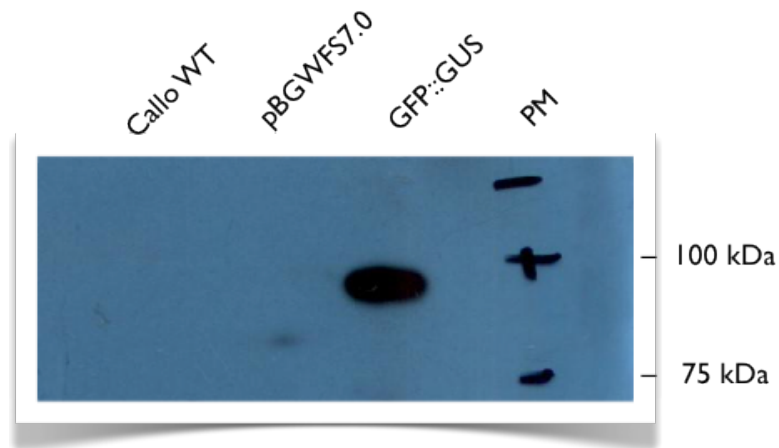


Figura 24. Western blot usando anticuerpo contra GUS, detectando a las proteínas GFP::GUS que se encuentran fusionadas en el vector de expresión y tienen un peso de 98 kDa. Callo WT (callo sin transformar); pBGWFS7.0 (callo transformado con el vector sin promotor); PM (peso molecular).

7 Discusión

7.1 Obtención y análisis *in silico* de la secuencia promotora de *CycD2;2* de maíz

Mediante una búsqueda BLAST en la base de datos del NCBI se obtuvo la secuencia del gen *CycD2;2* de maíz, el cual se ubica en el cromosoma 5, y mantiene las características de un gen de ciclina de la familia D2/4 de plantas. Su estructura comprende 6 exones y 5 intrones, estructura conservada en dicotiledóneas como *Arabidopsis*, álamo (*Populus trichocarpa*), alfalfa (*Medicago sativa* L.) y en monocotiledóneas (arroz y maíz), lo cual puede sugerir una función especializada (Menges *et al.*, 2007).

La secuencia del promotor de *CycD2;2* obtenida experimentalmente tiene una alta identidad con la obtenida del NCBI (98.4 %, figura 16). La pequeña diferencia entre ambas secuencias puede deberse a que la experimental proviene de la variedad chalqueño y la teórica de la variedad B73, presentando pequeñas variaciones genéticas entre ambas.

El análisis *in silico* realizado a la secuencia promotora de *CycD2;2* mostró que ésta se ajusta al modelo de promotor de plantas propuesto por Yoshiharu y col. en 2007, conteniendo los elementos necesarios para su función (Figura 17A). El promotor posee dos sitios de inicio de la transcripción, dos cajas TATA, que serán el primer motivo reconocido por la maquinaria transcripcional basal, y el parche Y que, debido a su naturaleza química, es una zona de fácil apertura de la doble hélice de DNA, que permitirá el posicionamiento de la maquinaria

transcripcional, y finalmente un regulón (de longitud indeterminada), cuya función es el proveer de un sitio de unión a diversos factores transcripcionales, ya sean aumentadores o represores de la expresión génica y que servirán como respuesta a las condiciones metabólicas o ambientales en que se encuentre la célula.

La constitución del promotor en cuanto a elementos de respuesta aporta más evidencia a que se trata de un gen de ciclo celular el que se encuentra regulando, ya que se encontraron secuencias relacionadas con respuesta a ciertos factores transcripcionales que responden en presencia de hormonas vegetales como auxinas (ARFs), citocininas, giberelinas o brasinosteroides, las cuales se encargan de conducir a las células a un estado de proliferación y por tanto, de división celular durante las distintas etapas del desarrollo de la planta. Otro hecho relevante fue la presencia de elementos de respuesta a ácido abscísico, un importante represor del ciclo celular en plantas que actúa inhibiendo la expresión de genes clave para la progresión del ciclo (Inzé y De Veylder, 2006; Benková y Hejátko, 2009; Kieffer *et al.*, 2010). Este trabajo, en conjunto con el realizado por Bravo-Alberto en 2011, presentan evidencia de que la expresión de genes de ciclinas D de plantas podría estar regulada en respuesta a hormonas y factores de crecimiento y proliferación, debido a la presencia de los elementos de respuesta en la región promotora.

Ésta evidencia apoya y concuerda con la teoría que propone a las ciclinas D como sensores primarios de condiciones externas, percibiendo señales externas y de desarrollo, acoplándolas a señales de proliferación (Dewitte y Murray, 2003; de Jager *et al.*, 2005; Inzé y De Veylder, 2006). Además, coloca a las ciclinas D como una familia de genes importantes

para la regulación del ciclo celular y para el cruce exitoso a través del primer punto de control, la transición G1-S.

La distribución de los elementos de respuesta a fitohormonas dentro de *pCycD2;2*, indica que la mayoría de la respuesta se regula dentro de los primeros 1000 pb del promotor, ya que aquí es donde se encuentra una mayor densidad de dichos elementos, siendo una zona que requiere especial atención para estudios posteriores sobre la regulación de la expresión del gen, la cual podría ser regulada fuertemente por señalización hormonal. Esto implicaría que esta región próxima a la región codificante es responsable de regular los niveles de mensajero en células en proliferación, como lo son las zonas meristemáticas, las cuales son necesarias para el establecimiento y crecimiento de la planta en general (Benková y Hejátko, 2009).

La siguiente región del promotor (-1000 a -2000 pb) presenta en su mayoría elementos relacionados con la respuesta a condiciones ambientales, como estrés hídrico, por lo que podría actuar como una región represora. Considerando el entorno fisiológico, en ciertas condiciones es vital el mantener arrestadas a las células en ciertas fases del ciclo, para de este modo no comprometer la supervivencia del organismo; por lo tanto, las regiones represoras también estarían desempeñando un papel fundamental en la regulación del ciclo celular, y en la prevalencia del organismo. En un estudio previo se mostró que los primeros 180 pb de este promotor son suficientes para mantener niveles de expresión basal (Bravo-Alberto, 2011), y que de -180 a -135 son los que regulan esta expresión, ya que la UTR 5' (-135 a -1) no muestra actividad del reportero. Al aumentar progresivamente el tamaño del promotor hasta 900 pb la expresión aumentó considerablemente, esto debido muy probablemente a la gran cantidad de elementos de respuesta a hormonas, principalmente aumentadores de la

transcripción, localizados en la zona. El presente estudio extendió la longitud del promotor y mostró que, a pesar de los elementos predichos como negativos, se observó un aumento en los niveles de expresión superior aun al de 900 pb, que contiene muy pocos elementos negativos. Recientemente Walcher y Nemhauser (2012), mostraron la existencia de elementos de respuesta que actúan de manera cooperativa e incluso, bipartita. Un ejemplo son los elementos de respuesta a auxinas (AuxREs), el cual comprende la secuencia canónica TGTCTC (Nemhauser *et al.*, 2004), dicho motivo puede presentar una variante, TGTGTCT, y al menos dos secuencias más, CACATG y CATGTG, todas comprobadas experimentalmente como funcionales; por otra parte, el elemento de respuesta a brasinosteroides, otra hormona que más recientemente ha ido cobrando importancia, responde a la secuencia CANNTG (siendo N cualquier nucleótido), también llamado caja E. Este motivo presenta dos variaciones con la misma secuencia que AuxRE, CACATG y CATGTG. Estos elementos fueron encontrados y descritos como funcionales experimentalmente en el promotor de *SAUR15*, un gen de *Arabidopsis* bien caracterizado por ser de respuesta temprana a auxinas, pero también se observó una respuesta importante a brasinosteroides, aun con los AuxREs mínimos. Posteriormente se encontró una doble función para el mismo elemento, la respuesta a ambas hormonas. También encontraron que gran parte de la respuesta depende de la secuencia contexto, incluyendo la presencia de elementos de respuesta a factores transcripcionales del tipo MYC o HUD, cercanos al elemento de respuesta. Estas secuencias fueron encontradas dentro de la región promotora de la ciclina D2;2 (datos no mostrados) y los contextos de las mismas coinciden. Estos hallazgos y la información experimental que se ha ido acumulando, suponen un nivel de regulación mucho más complejo del que se pensaba respecto a la función de los elementos en *cis* en las regiones promotoras (Walcher y Nemhauser, 2012).

7.2 Transformación de callos embriogénicos de maíz y células de epidermis de cebolla

Una vez obtenidos los plásmidos con las secuencias promotoras se realizaron los bombardeos correspondientes usando una cámara de bombardeo de baja presión proporcionada por el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Química de la UNAM.

Se pudo observar que los callos bombardeados efectivamente fueron capaces de expresar la proteína verde fluorescente y que sólo en los casos del plásmido con los reporteros sin promotor o con la UTR 5', no fue posible observarla, lo cual concuerda con lo esperado. Esto lleva a suponer que parte de la expresión observada pudo también ser inducida por la presencia de las fitohormonas en el medio de cultivo que ayudan a mantener las células en un estado altamente proliferativo, principalmente auxinas y citocininas.

El promotor 35S mostró niveles de expresión mayores a los del promotor de *CycD2;2* de 900 pb en cultivos celulares, pero dichos niveles fueron superados evidentemente por el promotor de 2022 pb (Figura 20), el cual posiblemente al encontrarse en un entorno propicio para la proliferación celular y en presencia de hormonas vegetales, en su mayoría positivos, mantuvo una respuesta constante a dichos estímulos, incrementando los niveles del reportero. También se puede deducir que los elementos en *cis* actúan de manera cooperativa, es decir, a mayor número de elementos de respuesta positivos en la región estudiada, la inducción del reportero será mayor (Bravo-Alberto, 2011). Además, las observaciones hechas en epidermis de cebolla muestran que al adicionar auxinas, los niveles de expresión se incrementan notablemente (Figura 21). Con esta evidencia se puede sugerir que, al menos algunos de los

AuxRE presentes en *pCycD2;2* son funcionales, y que al lograr inducir una mayor expresión del reportero, puede ocurrir también sobre el gen *CycD2;2 in vivo*.

Para probar si los niveles de expresión se debían a la respuesta del promotor ante hormonas vegetales, se realizaron ensayos de expresión transitoria bombardeando epidermis de cebolla y se trató con ácido indol-acético (AIA) o con ácido abscísico (ABA). Se hizo una comparación de las respuestas de ambos promotores. El promotor de ciclina, al ser un promotor inducible, mostró diferencias en los tratamientos hormonales respecto al control, aumentando en presencia de AIA y disminuyendo en presencia de ABA. Por otro lado el promotor 35S, como se esperaba, al ser un promotor constitutivo, mantuvo niveles de expresión constantes ante los tratamientos (Figura 21).

De esta manera, se demuestra que el promotor de la ciclina D2;2, o al menos las primeras 2,022 pb, responde positivamente al AIA y negativamente al ABA. También, se sugiere que la variación en los niveles de expresión de la proteína verde fluorescente es debida a los elementos de respuesta en el promotor. El análisis de expresión de genes de ciclinas D de maíz, realizado por Buendía-Monreal y colaboradores (2011), muestra que el gen de la *CycD2;2* se comporta del modo observado en este estudio en presencia de AIA y ABA, pero en distintos tiempos de germinación de ejes embrionarios. Toda ésta acumulación de evidencia sugiere que *in vivo*, el gen de la ciclina D2;2 puede ser regulado por estas dos familias hormonales, permitiendo su expresión en zonas de proliferación celular elevada y reprimiéndola en zonas de crecimiento y diferenciación (Figura 25).

La expresión de *CycD2;2* de maíz es elevada en zonas con división celular constante y disminuye hacia las zonas de diferenciación (Li *et al.*, 2010). La expresión del gen de la

CycD2;1 de *Arabidopsis*, el gen mas cercano al de la *CycD2;2* de maíz, muestra el mismo patrón de expresión elevada en la zona meristemática (alta proliferación), lugar donde son sintetizadas las auxinas y desde donde se distribuyen al resto de la planta; y una expresión disminuida hacia la zona de diferenciación, donde la concentración de auxinas es menor (Winter *et al.*, 2007).

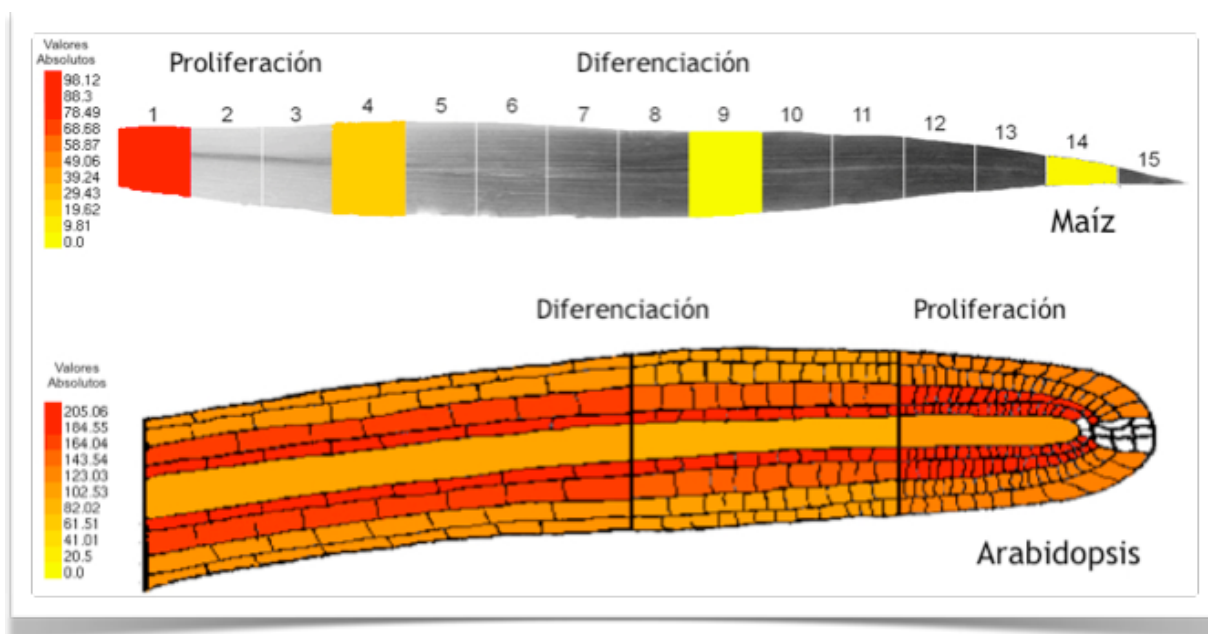


Figura 25. Expresión de los genes de ciclina D2;2 de maíz en hoja de plántula, y ciclina D2;1 de *Arabidopsis* en raíz, tejidos con zonas de proliferación y diferenciación. Tomado de Maize eFP Browser y *Arabidopsis* eFP Browser (The max Planck Institute, 2007).

Los resultados mostrados en la base de datos AtGenExpress Visualization Tool (The Max Planck Institute, 2007) indican que la expresión de *CycD2;1* de *Arabidopsis* reduce sus niveles en presencia de ABA y los incrementa con AIA. Este resultado concuerda con el obtenido en el presente trabajo, en que la respuesta del promotor de *CycD2;2* de maíz incrementa la expresión del reportero en presencia de AIA y la disminuye en presencia de ABA; también concuerda con los resultados de Buendía-Monreal y col., 2011, en que los

niveles de RNA mensajero de la *CycD2;2* son incrementados con AIA y disminuidos por ABA.

El mismo patrón de respuesta se ha observado en genes de la transición G1-S de plantas, como lo son *CDKA*, *CycD2;1*, *CycD3;1* de *Arabidopsis* (Inzé, 2007), y en la mayoría de los casos se ha propuesto que es debido a la estructura de sus regiones promotoras. Sin embargo, no se ha demostrado que elementos son compartidos por todos estos promotores, ni cuales son funcionales.

Los resultados encontrados en este trabajo, en conjunto con reportes del mismo grupo, llevan a proponer con mayor solidez que este gen efectivamente responde a auxinas y ácido abscísico, postulando al gen de ciclina D2;2 de maíz como un gen de respuesta temprana a entrada al ciclo celular, y muy posiblemente al participar activamente en el tránsito de las células hacia la fase S en acción conjunta con una CDKA (Gutiérrez *et al.*, 2005; Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006; Buendía-Monreal *et al.*, 2011).

Finalmente, la inserción estable de los genes reporteros al genoma de los callos transformados (Figura 23), la fluorescencia observada en las células transformadas (Figura 20) y la detección por Western blot de las proteínas GFP::GUS (Figura 24) bajo regulación del promotor de *CycD2;2*, indican la funcionalidad de la construcción insertada en el genoma del maíz. Toda esta evidencia nos lleva a suponer que el método de transformación fue establecido con éxito en callos embriogénicos, dejando la posibilidad a la regeneración de plantas transgénicas que permitan estudiar la expresión del gen de ciclina durante el ciclo de vida de la planta y su participación en la progresión del ciclo celular.

8 Conclusiones

- ☑ El promotor del gen de *CycD2;2* de maíz es un promotor con la estructura canónica de un promotor de plantas, conteniendo sitio de inicio de transcripción, caja TATA, y parche de pirimidinas. Es promotor de un gen de respuesta primaria a entrada a ciclo celular y contiene elementos de respuesta a diversas fitohormonas, como auxinas y citocininas, encargadas de la señalización de proliferación, crecimiento y desarrollo de la planta.
- ☑ El gen de la ciclina *D2;2* de maíz tiene dos sitios teóricos de inicio de transcripción ubicados a -333 y -144 pb a partir del sitio de inicio de la traducción.
- ☑ Se obtuvieron las fusiones traduccionales de los reporteros *GFP::GUS* bajo regulación de los promotores de *CycD2;2* y *35S*. Fue posible observar transformación estable y expresión de la proteína verde fluorescente en las líneas de callo embriogénico y expresión transitoria en epidermis de cebolla.
- ☑ El fragmento de 2022 pb del promotor de *CycD2;2* de maíz es capaz de regular la expresión del reportero *GFP*, misma que puede ser inducida en presencia de ácido indol-acético y reprimida por ácido abscísico, en ensayos de expresión transitoria en células de epidermis de cebolla.
- ☑ La respuesta a AIA y ABA posiblemente sea debida a los elementos de respuesta correspondientes, presentes en la región promotora del gen de ciclina *D2;2* de maíz.

9 Perspectivas

Regenerar plantas transgénicas de maíz a partir de las líneas de callos transformados, con la finalidad de observar la expresión tejido específica de la CycD2;2 desde la germinación de una semilla hasta el establecimiento de la planta, mediante el seguimiento de los genes reporteros GFP y GUS.

Realizar mutaciones específicas en ciertos grupos de elementos de respuesta para probar su funcionalidad en la regulación de la familia de genes CycD, para poder demostrar su participación y relevancia en la progresión del ciclo celular y el establecimiento de plantas.

10 Referencias

- Ach, R. A., Durfee, T., Miller, A. B., Taranto, P., Hanley-Bowdoin, L. Zambryski, P. C. y Gruissem, W.** (1997). RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma- related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Molecular Cell Biology*. 17: 5077–5086.
- Abeles, F. B., Morgan, O. W. y Sahveit, M. E.** (1992). *Ethylene in plant biology*, 2a ed. Academic Press. 325p.
- Barrôco, R. M., De Veylder, L., Magyar, Z., Engler, G., Inzé, D. y Mironov, V.** (2003). Novel complexes of cyclin-dependent kinases and a cyclin-like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60: 401–412.
- Abrahams, S., Cavet, G., y Oakenfull, E. A.** (2001). A novel and highly divergent *Arabidopsis* cyclin isolated by complementation in budding yeast. *Biochimical Biophysics Acta*. 1539: 1–6.
- Bandurski, R. S., Cohen, J. D. y Slovin, J.** (1995). Auxin biosynthesis and metabolism. En: Davies, P. J. (ed), *Plant hormones*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 39-65p.
- Benfey, P. N., y Chua, N. H.** (1990). The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. *Science*. 250: 959-966.
- Benková, E. y Hejátko, J.** (2009). Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Molecular Biology*. 69: 383-396.
- Benz, B. F.** (1997). Diversidad y distribución prehispánica del maíz mexicano. *Arqueología Mexicana*. 5 (25): 17:23.
- Benz, B. F.** (2001). Archaeological evidence of teosinte domestication from Guilá Naquitz, Oaxaca. *PNAS*. 98 (4): 2104-2106.
- Bewley, J. D. y Black, M.** (1994). *Seeds: Physiology of development and germination*. Plenum Press. Nueva York. 445p.
- Bhojwani, S. S. y Razdan, M. K.** (1983). *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier. Amsterdam. 530p.
- Binns, A. N.** (1994). Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic and molecular approaches. *Plant Molecular Biology*. 45:173-196.

- Boege-Schmidt, E.** (2006). Territorios y diversidad biológica: La agrobiodiversidad de los pueblos indígenas de México. En: Concheiro-Bórquez, L. y F. López-Barcenas (eds), *Biodiversidad y conocimiento tradicional en la sociedad rural*. Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. México. 247-308.
- Bond, J. E., McDonell, R., Finer, J. y Gresshoff, P. M.** (1992). Construction and use of low cost micro-projectile gene gun for gene transfer in plants. *Tennessee Farm and Home Science*. 162: 4-14.
- Boniotti, M. B. y Gutiérrez, C.** (2001). A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in *Arabidopsis*, a CDKA/cyclin D complex. *The Plant Journal*. 28: 341-350.
- Bove, J., Jullien, M. y Grappin, P.** (2001). Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology*. 3 (1): 1-5.
- Bravo-Alberto, C. E. y Buendía-Monreal, M.** (2008). Estudio de la región promotora de cuatro ciclinas D de maíz. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. México. 64p.
- Bravo-Alberto, C. E.** (2011). Caracterización de la región promotora de la ciclina D2;2 de maíz. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. México. 65p.
- Brock, T. G. y Kaufman, P. B.** (1991). Growth regulators: an account of hormones and growth regulation. En: Bidwell, R. G. S. (ed), *Plant physiology, a treatise, Vol. X. Growth and development*. Academic Press. EU. 277-340p.
- Buckler, E. S. y Stevens N. M.** (2005). Maize origins, domestication, and selection. En: Motley, T. J., Zerega, N. y Cross, H. (eds), *Darwin's Harvest*. Columbia University Press. EU. 67-90.
- Buendia-Monreal, M., Rentería-Canett, I., Guerrero-Andrade, O., Bravo-Alberto, C. E., Martínez-Castilla, L., García, E., Vázquez-Ramos, J. M.** (2011). The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiologia Plantarum*. 143: 297-308.
- Chen, P. L., Scully, P., Shew, J. Y., Wang, J. Y. J. y Lee, W. H.** (1989). Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell*. 58: 1193-1198.
- Chow, B. y McCourt, P.** (2006). Plant hormone receptors: perception is everything. *Genes Development*. 20: 1998-2008.
- Chu, C. C., Wang, C. C., San, C. S., Hsu, C., Yin, K. C. y Chu, C. Y.** (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica*. 18: 659-668.
- Ching, T. M.** (1972). Metabolism of germination in seeds. En: Kozlowski, T. T. (ed), *Seed Biology, Vol 3*. Academic Press. EU. 115-117.

- Comisión Nacional para el Uso y Conservación de la Biodiversidad, CONABIO.** (2008). *Información biológica-agronómica básica sobre los maíces nativos y sus parientes silvestres*. Documento de trabajo para el taller “Agrobiodiversidad en México: el caso del maíz”, junio de 2008. México.
- Constabel, F.** (1984). Callus culture: induction and maintenance. En: Vasil I. K. (ed), *Cell culture and somatic cell genetics of plants Vol. I*. Academic Press. EU. 27–35.
- Davies, P. J.** (ed) (1995). *Plant hormones*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 13-38.
- de Jager, S. M., Maughan, S., Dewitte, W., Scofield, S. y Murray, J. A.** (2005). The developmental context of cell-cycle control in plants. *Seminars in Cell & Development Biology*. 16: 385–396.
- Debergh, P. C. y Zimmerman, R. H.** (1993). *Micropropagation. Technology and application*. Kluwer Academic Publishers. Holanda. 258p.
- Deltour, R. y Jacquard, A.** (1974). Relation between water stress and DNA synthesis during germination of *Zea mays*. *Annals of Botany*. 38 (3): 529-534.
- Dewitte, W. y Murray, J. A.** (2003). The plant cell cycle. *Annual Reviews in Plant Biology*. 54: 235–264.
- Doebley, J. e Iltis, H. H.** (1980). Taxonomy of *Zea* (Gramineae). A subgeneric classification with key to taxa. *American Journal of Botany*. 67: 982-993.
- Doebley, J.** (2004). The genetics of maize development. *Annual Reviews in Genetics*. 38: 37–59.
- Dougall, D. K.** (1990). Somaclonal variation as a tool for the isolation of elite cell lines to produce secondary metabolites. En: Loyola-Vargas V. M. (ed), *Production of Secondary Metabolites from Plant Tissue Cultures and its Biotechnological Perspectives*. CICY. México 122–137p.
- Dudits, D., Bögre, L. y Györgyey, J.** (1991). Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *Journal of Cell Science*. 99: 473–482.
- Dudits, D., Cserhádi, M., Miskolczi, P. y Horváth, G. V.** (2007). The growing family of plant cyclin-dependent kinases with multiple functions in cellular and developmental regulation . En: Dirk Inzé (ed), *Cell cycle and plant development. Annual Plant Reviews, Vol. 32*. Blackwell Publishing Group. Inglaterra. 1-30.
- Dudits, D., Györgyey, J., Bögre, L. y Bakó, L.** (1995). Molecular biology of somatic embryogenesis. En: Thorpe, T. A. (ed), *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers. Holanda. 267–308p.
- Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K. y Pikaard, C. S.** (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*. 45: 616–629.
- Eckhart, W., Hutchinson, M. A., Hunter, T.** (1979). An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell*. 18 (4): 925-33.

- Evans, D. A., Sharp, W. R. y Flick, C. E.** (1981). Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T. A. (ed), *Plant cell culture: methods and applications in agriculture*. Academic Press. 45-113p.
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., y Hunt, T.** (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*. 133: 389-396.
- Fang, R. X., Nagy, F. Sivasubramaniam, S. y Chua, N. H.** (1989). Multiple *cis* regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants. *The Plant Cell*. 1: 141-150.
- Food and Agriculture Organization, FAO.** (2011). *FAOSTAT*. Recuperado en febrero de 2012 de <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Fisher, R. P.** (2005). Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *Journal of Cell Science*. 118: 5171–5180.
- George, E.** (1993). *Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology*. Edington Exegetics Ltd. Inglaterra. 387p.
- Georgieva, E. I., López-Rondas, G., Sendra, R., Gröbner, P. y Loidl, P.** (1991). Histone acetylation in *Zea mays*. Biological Significance of post-translational histone acetylation during embryo germination. *Journal of Biological Chemistry*. 266: 18751-18760.
- Gross, D. y Parthier, B.** (1994). Novel natural substances acting in plant growth regulation. *Journal of Plant Growth Regulation*. 13: 93-114.
- Guerrero-Andrade, O.** (1998). Transformación de células de maíz (*Zea mays* raza tuxpeño) por medio del bombardeo de partículas. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. México. 93p.
- Gutiérrez, R., Quiroz-Figueroa, F. y Vázquez-Ramos, J. M.** (2005). Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell Physiology*. 46: 166-173.
- Hazarika, B. N.** (2006). Morpho–physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*. 108: 105–120.
- Healy, J. M., Menges, M., Doonan, J. H. y Murray, J. A.** (2001). The *Arabidopsis* D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact *in vivo* with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 7041–7047.
- Hernández-Serratos, J. A.** (2009). *El origen y la diversidad del maíz en el continente americano*. Green Peace. México. 33p.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. y Korenaga, T.** (1999). Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research*. 27 (1): 297-300.

- Hohn, T.** (1999). Caulimoviruses molecular biology. En: Granoff, A. y R. B. Webster (eds), *Encyclopedia of Virology*. Academic Press. EUA. 1281-1285.
- Hu, Y., Bao, F. y Li, J.** (2000). Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 24: 693–701.
- Hull, R. y Covey, S. N.** (1983). Characterisation of cauliflower mosaic virus DNA forms isolated from infected turnip leaves. *Nucleic Acids Research*. 11: 1881-1895.
- Huntley, R., Healy, S., Freeman, D., Lavender, P., de Jager, S., Greenwood, J., Makker, J., Walker, E., Jackman, M., Xie, Q., Bannister, A. J., Kouzarides, T., Gutiérrez, C., Doonan, J. H. y Murray, J. A.** (1998). The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Molecular Biology*. 37: 155–169.
- Hughes, T. R., Marton, M. J., Jones, A. R., Roberts, C. J., Stoughton, R., Armour, C. D., Bennett, H. A., Coffey, E., Dai, H. y He, Y. D.** (2000). Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell*. 102: 109–126.
- Hunter, T y Sefton, B. M.** (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *PNAS*. 77 (3): 1311-1315.
- Iida, A., Morikawa, H. y Yamada, Y.** (1990). Stable transformation of cultured tobacco cells by DNA-coated gold particles accelerated by gas-pressure-driven particle gun. *Applied Microbiology Biotechnology*. 33: 560-563.
- Iida, A., Yamashita, T., Yamada, Y. y Morikawa, Y.** (1991). Efficiency of Particle-Bombardment-Mediated Transformation Is Influenced by Cell Cycle Stage in Synchronized Cultured Cells of Tobacco. *Plant Physiology*. 97: 1585-1587.
- Ikeda, M., Umehara, M. y Kamada, H.** (2006). Embryogenesis-related genes; Its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal*. 23: 153–161.
- Ikeda, M., Umehara, M. y Kamada, H.** (2006). Embryogenesis-related genes; Its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal*. 23:153–161.
- Inzé, D. (ed)** (2007). *Cell cycle control and plant development. Annual Plant Reviews No. 32*. Blackwell Publishing Group. Inglaterra. 364p.
- Inzé, D. y De Veylder, L.** (2006). Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annual Reviews in Genetics*. 40: 77–105.
- Jugenheimer, R. W.** (1988). *Maíz, variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas*. Limusa. México. 841p.

- Jullien, N.** (2008). *AmplifX versión 1.5.4*. Recuperado en enero de 2010 de <http://ifrjr.nord.univ-mrs.fr/AmplifX-Home-page>.
- Kato-Yamakake, T. A., Mapes-Sánchez, C., Mera-Orvando, L. M., Serratos-Hernández y Bye-Boettler, R. A. (eds)** (2009). *Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica*. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 116p.
- Kieffer, M., Neve, J. y Kepinski, S.** (2010). Defining auxin response contexts in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. 13: 12-20.
- King, P. J.** (1984). Induction and maintenance of cell suspension cultures. En: Vasil, I. K. (ed), *Cell culture and somatic cell genetics of plants, Vol. 1*. Academic Press. EU. 130–138p.
- Klein, T. M., Gradziel, T. Fromm, M. E. y Sanford, J. C.** (1988). Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. *Nature Biotechnology*. 6: 559-563.
- Klein, T. M. y Fitzpatrick-McElligott, S.** (1993). Particle bombardment: a universal approach for gene transfer to cells and tissues. *Current Opinion Biotechnology*. 4: 583-590.
- Klug, W. S., Cummings, M. R. y Spencer, C. A.** (2008). *Concepts of genetics*, 8a ed. Prentice hall. EUA. 677p.
- Kono, A., Umeda-Hara, C., Lee, J., Ito, M., Uchimiya, H. y Umeda, M.** (2003). *Arabidopsis* D-type cyclin CYCD4;1 is a novel cyclin partner of B2-type cyclin-dependent kinase. *Plant Physiology*. 132: 1315–1321.
- Kyte, L. y Kleyn, J.** (1996). *Plant from test tubes. An introduction to micropropagation*. Timber Press. EU. 402p.
- La, H., Li, J., Ji, Z., Cheng, Y., Li, X., Jiang, S. Venkatesh, P. N. y Ramachandran, S.** (2006). Genome-wide analysis of cyclin family in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Genetics and Genomics*. 275: 374–386.
- Landy, A.** (1989). Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. *Annual Review of Biochemistry*. 58: 913-949.
- Lenburg, M. E. y O’Shea, E. K.** (1996). Signaling phosphate starvation. *Trends in Biochemical Sciences*. 21: 383–387.
- Lessard, P. A., Kulaveerasingam, H., York, G. M., Strong, A. y Sinskey, A. J.** (2002). Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metabolic Engineering*. 4: 67–79.
- Li, P., Ponnala, L. y Gandotra, N.** (2010). The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. *Nature Genetics*. 42: 1060-1067.
- Lohka, M. J., Hayes, M. K. y Maller, J. L.** (1988). Purification of maturation-promoting factor, an

- intracellular regulator of early mitotic events. *PNAS*. 85: 3009–3013.
- Mackean, D. G. y Mackean, I.** (2004). *The Structure of Flowers*. Recuperado en Febrero de 2012 de <http://www.biology-resources.com/plants-flowers.html>.
- Maeda, E. y Thorpe, T. A.** (1979). Effects of various auxins on growth and shoot formation on tobacco callus. *Phytomorphology*. 29: 146-155.
- Maniatis, T., Goodbourn, S. y Fischer, J. A.** (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science*. 236 (4806): 1237–1245.
- Masubelele, N. H., Dewitte, W., Menges, M., Maughan, S., Collins, C., Huntley, R., Nieuwland, J., Scofield, S. y Murray, J. A.** (2005). D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in *Arabidopsis*. *PNAS*. 102: 15694-15699.
- Mayer, A. M. y Poljakoff-Mayber, A.** (1975). *The germination of seeds*, 2a ed. Macmillan Co. New York, 76-125.
- Menges, M., de Jager, S. M., Gruissem, W. y Murray, J. A.** (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *The Plant Journal*. 41: 546–566.
- Menges, M., Pavesi, G., Morandini, P., Bögre, L. y Murray, J. A.** (2007) Genomic organization and evolutionary conservation of plant D-type cyclins. *Plant Physiology*. 145: 1558-1576.
- Mera-Ovando, L. M.** (2009). Clasificación taxonómica del género *Zea* y parientes silvestres. En: Kato-Yamakake, T. A., Mapes-Sánchez, C., Mera-Orvando, L. M., Serratos-Hernández y Bye-Boettler, R. A. (eds), *Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica*. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 19-32p.
- Morikawa, H., Iida, A. y Yamada, Y.** (1989). Transient expression of foreign genes in plant cells and tissues obtained by a simple biolistic device (particle-gun). *Applied Microbiology Biotechnology*. 31: 320-322.
- Murashige, T. y Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Nakamura, T., Sanokawa, R., Sasaki, Y. F., Ayusawa, D., Oishi, M. y Mori, N.** (1995). Cyclin I: a new cyclin encoded by a gene isolated from human brain. *Experimental Cell Research*. 221: 534–542.
- National Center for Biotechnology Information, NCBI.** (2009). *BLAST tool*. Recuperado consatantemente durante 2010 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Nemhauser, J. L., Mockler, T. C. y Chory, J.** (2004). Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* 2 (9): e258.

- Neumann, K. H. y Jafargholi-Imani, A. K.** (2009). *Plant Cell and Tissue Culture-A Tool in Biotechnology: Basics and Application*. Springer. Alemania. 333p.
- Novak, B., Csikasz-Nagy, A., Gyorffy, B., Chen, K. y Tyson, J. J.** (1998). Mathematical model of the fission yeast cell cycle with checkpoint controls at the G1/S, G2/M and metaphase/anaphase transitions. *Biophysical Chemistry*. 72: 185–200.
- Nugent, J. H., Alfa, C. E., Young, T. y Hyams, J. S.** (1991). Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. *Journal of Cell Science*. 99: 669–674.
- Oakenfull, E. A., Riou-Khamlichi, C. y Murray, J. A.** (2002). Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 357: 749–760.
- Obroucheva, N. V. y Antipova, O. V.** (1997). Physiology of the initiation of seed germination. *Russian Journal of Plant Physiology*. 44: 250-264.
- Odell, J. T., Nagy, y F. y Chua, N. H.** (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*. 313: 810-812.
- Osborne, D. J.** (1983). Biochemical control systems operating in the early hours of germination. *Canadian Journal of Botany*. 61: 368-377.
- Okada, K., Takebe, I., y Nagata, T.** (1986). Expression and integration of genes introduced into highly synchronized plant protoplasts. *Molecular General Genetics*. 205: 398-403.
- Ow, D. W., Jacobs, J. D. y Howell, S. H.** (1987). Functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter determined by the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity. *PNAS*. 84: 4870-4874.
- Plowman, G. D., Sudarsanam, S., Bingham, J., Whyte, D. y Hunter, T.** (1999). The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: a model for signal transduction in multicellular organisms. *PNAS*. 13603–13610.
- Pfeiffer, P. y Hohn, T.** (1983). Involvement of reverse transcription in the replication of cauliflower mosaic virus: a detailed model and test of some aspects. *Cell*. 33: 781-789.
- Pines, J.** (1995). Cell Cycle. Confirmational change. *Nature*. 376: 294-295.
- Planchais, S., Samland, A. K. y Murray, J. A.** (2004). Differential stability of *Arabidopsis* D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. *The Plant Journal*. 38: 616–625.
- Quiroz-Figueroa, F. y Vázquez-Ramos, J. M.** (2006). Expression of maize D-type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin. *Physiologia Plantarum*. 128: 556-568.
- Rechsteiner, M. y Rogers, S. W.** (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in*

Biochemical Sciences. 21: 267–271.

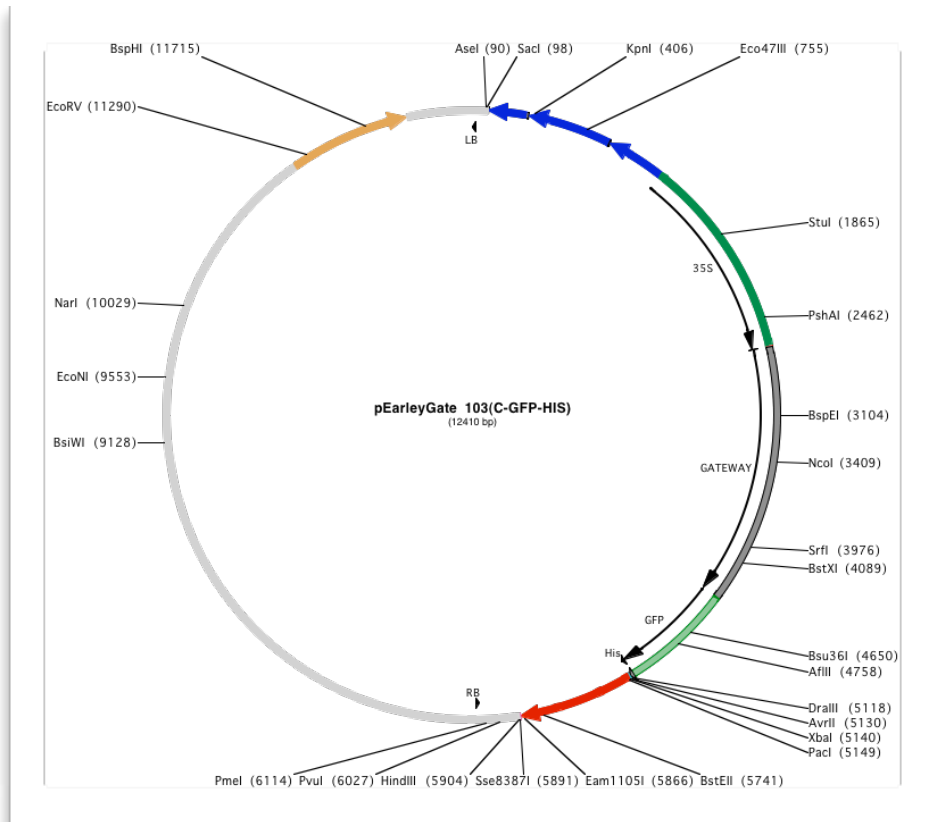
- Renaudin, J. P., Doonan, J. H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Rouzé, P., Sauter, M., Savouré, A., Sorrell, A. Sundaesan, V. y Murray, J. A.** (1996). Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Molecular Biology*. 32: 1003–1018.
- Reyes, C. P.** (1990). *El maíz y su cultivo*. AGT-EDITOR S.A. México. 460p.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacqumard, A. y Murray, J. A.** (1999). Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science*. 283: 1541–1544.
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J. M. y Murray, J. A.** (2000). Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Molecular Cell Biology*. 20: 4513–4521.
- Sánchez-González, J. J., Kato-Yamakake, T. A., Aguilar-Sanmiguel, M. A., Hernández-Casillas, J. M., López-Rodríguez, A. y Ruiz-Corral, J. A.** (1998). *Distribución y caracterización del teocintle. Libro Técnico Núm. 2*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México. 150p.
- Sánchez de Jiménez, E. y Aguilar, R.** (1984). Protein synthesis patterns. Relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant Physiology*. 75, 231–234.
- Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R. y López, S.** (1981). Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 99: 445–450.
- Schoelz, J. E. y Bourque, J. E.** (1999). Plant pararetroviruses (Caulimoviridae). En: Granoff, A. y R.B. Webster (eds), *Encyclopedia of Virology*. Academic Press. EUA. 1275-1281.
- Serfling, E., Jasinand, M. y Schaffner, W.** (1985). Enhancers and eukaryotic gene transcription. *Trends in Genetics*. 1: 224-230.
- Smith, R. H.** (1992). *Plant tissue culture. Techniques and experiments*. Academic Press. EU. 428p.
- Simanis, V. y Nurse, P.** (1986). The cell cycle control gene *cdc2+* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell*. 45: 261-268.
- Sorrell, D. A., Menges, M., Healy, J. M., Deveaux, Y., Amano, C., Su, Y., Nakagami, H., Shinmyo, A., Doonan, J. H., Sekine, M. y Murray, J. A.** (2001). Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiology*. 126: 1214–1223.
- Southgate, E. M., Davey, M. R., Power, J. B., y Marchant, R.** (1995). Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment. *Biotechnology Advances*. 13: 631–651.
- Spiegel, S. y Marcus, A.** (1975). Polyribosome formation in early wheat embryo germination independent

of either transcription or polyadenylation. *Nature*. 256: 228–230.

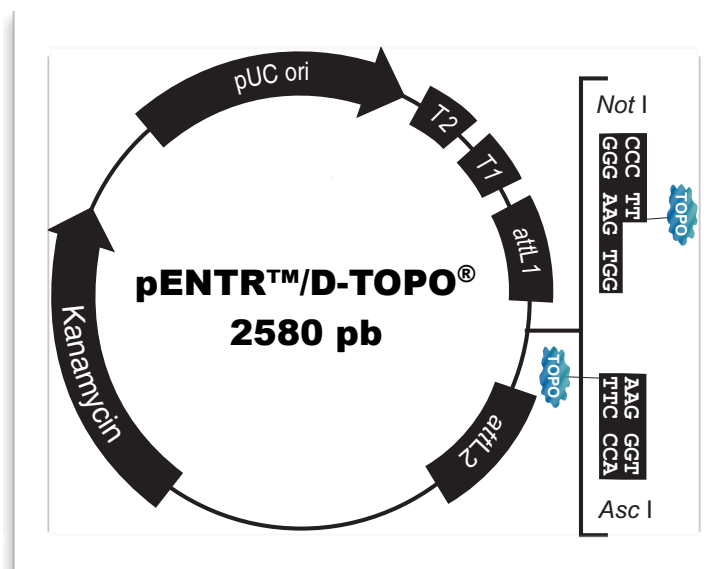
- Sponsel, V. M.** (1995). The biosynthesis and metabolism of gibberellins in higher plants. En: Davies, P. J. (ed), *Plant hormones*. Kluwer Academic Publishers. Holanda. 66-97 p.
- Sugiyama, M.** (1999). Organogenesis *in vitro*. *Current Opinion in Plant Biology*. 2: 61–64.
- Tabata, M., Ogino, T., Yoshioka, K., Yoshikawa, N. y Hiraoka, N.** (1978). Selection of cell lines with higher yield of secondary products. En: Thorpe, T. A. (ed), *Frontiers of Plant Tissue Culture*. The International Association for Plant Tissue Culture. Canada. 213–221p.
- The Max Planck Institute.** (2007). *AtGenExpress Visualization Tool*. Recuperado en octubre de 2011 de <http://www.weigelworld.org/resources/microarray/AtGenExpress>.
- Thorpe, T. A.** (1981). *Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture*. Academic Press. EU. 346p.
- Thorpe, T. A.** (1990). The current status of plant tissue culture. En: Bhojwani, S. S. (ed), *Developments in crop science. Plant tissue culture: applications and limitations*. Elsevier. Holanda. 1–33.
- Tjian, R.** (1995). Molecular Machines That Control Genes. *Scientific American*. 272 (2): 38-45.
- Tomlinson, J. A.** (1987). Epidemiology and control of vegetable diseases. *Annals of Applied Biology*. 110: 661-681.
- Uemukai, K., Iwakawa, H., Kosugi, S., de Umekay, S. Kato, K., Kondorosi, E., Murray, J. A., Ito, M., Shinmyo, A. y Sekine, M.** (2005). Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by co-transfection with the retinoblastoma-related protein: cyclin D expression overcomes this repressor activity. *Plant Molecular Biology*. 57: 83–100.
- Vain, P., McMullen, M. D. y Finer, J. J.** (1993). Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports*. 12: 84–88.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S. e Inzé, D.** (2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 14: 903–916.
- Vasil, I. K. y Thorpe, T. A. (eds)** (1994). *Plant cell and tissue culture*. Kluwer Academic Publishers. Holanda. 480p.
- Vasil, I. K., Vasil, V. y Redway, F.** (1991). Plant regeneration from embryogenic calli, cell suspension cultures and protoplasts of *Triticum aestivum* L. (Wheat). En: Nijkamp, H. J. J., Van der Plas, L. H. W. y Van Aartrijk, J. (eds), *Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers. Holanda. 33–37p.
- Vázquez-Ramos, J. M. y Osborne, D. J.** (1986). Chromatography analysis of the DNA synthesized during early germination of rye embryos using BND-cellulose chromatography. *Mutation Research*. 166: 39-47.

- Vázquez-Ramos, J. M. y Sánchez, M. P.** (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research*. 13: 113-130.
- Vierstra, R. D.** (2003). The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends in Plant Sciences*. 8: 135–142.
- Walcher, C. L. y Nemhauser, J. L.** (2012). Bipartite Promoter Element Required for Auxin Response. *Plant Physiology*. 158: 273–282.
- Walton, C. D. y Li, Y.** (1995). Abscisic acid biosynthesis and metabolism. En: Davies, P. J. (ed), *Plant hormones*. Kluwer Academic Publishers. Holanda. 141-157p.
- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., De Pamphills, C. W. y Ma, H.** (2004). Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiology*. 135: 1084–1099.
- West, F. R. Jr. y Mika, E. S.** (1957). Synthesis of atropine by isolated roots and root–callus cultures of belladonna. *Botanical Gazette*. 119: 50–54.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V. y Provart, N. J.** (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*. 2(8): e718.
- Winter, J.** (1973). The Distribution and Development of Fremont Maize Agriculture: Some Preliminary Interpretations. *American Antiquity*. 38(4): 439-452.
- Yamaguchi, M., Fabian, T., Sauter, M., Bhalerao, R. P., Schrader, J., Sandberg, G. y Uchimiya, H.** (2000). Activation of CDK-activating kinase is dependent on interaction with H-type cyclins in plants. *The Plant Journal*. 24: 11–20.
- Yoshiharu, Y. Y., Ichida, H., Abe, T., Suzuki, T., Sugano, S. y Obokata, J.** (2007). Differentiation of core promoter architecture between plants and mammals revealed by LDSS analysis. *Nucleic Acids Research*. 35 (18): 6219–6226.
- Zhao, Y.** (2008). The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. 11: 16–22.
- Zimmerman, J. L.** (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell*. 5: 1411–1423.

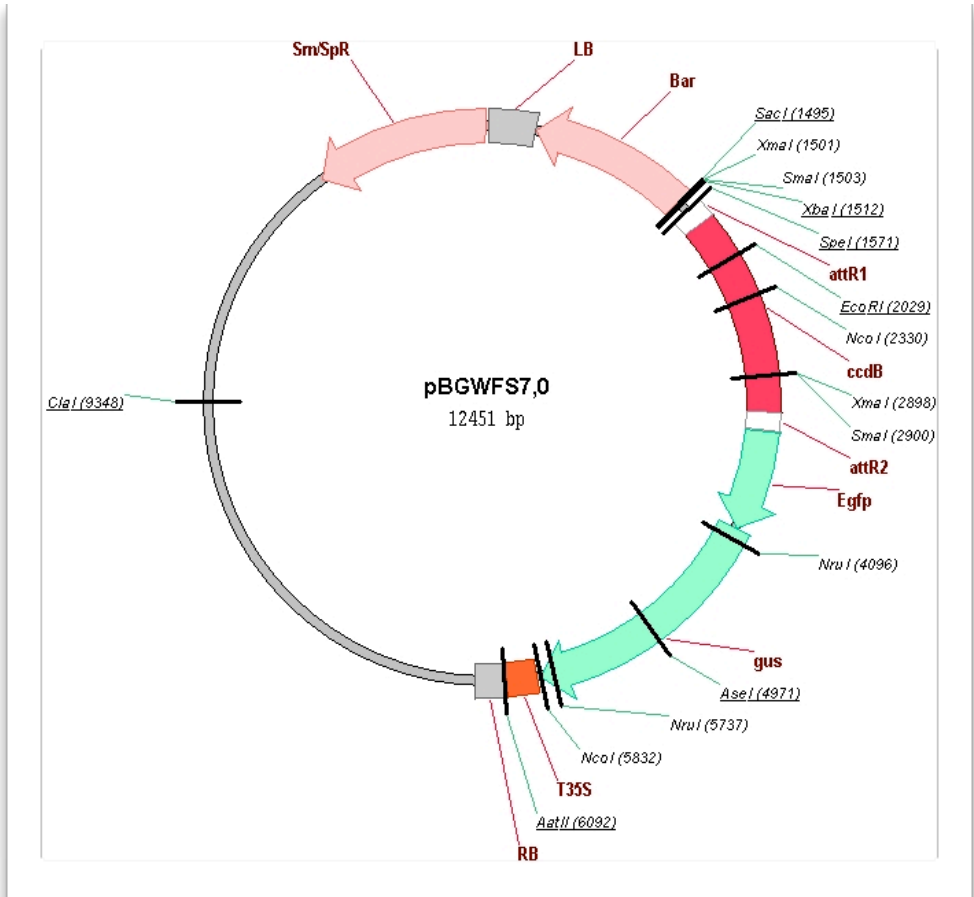
Apéndice 1. Mapas de los vectores de clonación utilizados



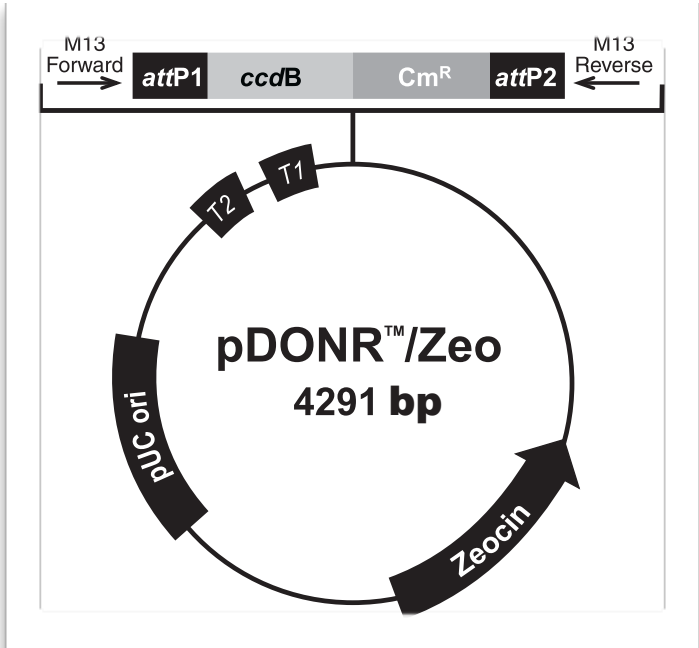
1A. Vector pEarleyGate103 (Earley *et al.*, 2006).



1B. Vector pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen).



1C. Vector pBGWFS7.0.



1D. Vector pDONR™/Zeo (Invitrogen).

Apéndice 2. Medios de cultivo

2A. Medio de cultivo N6p modificado (Chu *et al.*, 1975).

A) Soluciones de macro y micronutrientes

Solución I

Compuesto	PM (g)	(mg/l)	(mg/l)	Stock 10x (mM/l)
KNO ₃	101.10	2830	28.00	280
CaCl ₂ .7H ₂ O	147.02	166	1.13	11.3
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.48	185	0.75	7.5
KH ₂ PO ₄	136.09	400	2.94	29.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	132.06	463	3.50	35.0

Para 1 litro de solución de medio se toman 100 ml de esta solución.

Solución II

Compuesto	PM (g)	(mg/l)	(μ M/l)	Stock 100x (μ M/l)
MnSO ₄ .H ₂ O	169.01	5.97	35.32	280
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.54	1.50	5.21	11.3
H ₃ BO ₃	61.83	1.60	25.87	7.5
KI	166.01	0.80	4.82	29.4

Solución III

Compuesto	PM (g)	(mg/l)	(μ M/l)	Stock 100x (μ M/l)
FeSO ₄ .7H ₂ O	278.03	27.80	100.00	10,000
C ₁₄ H ₄ N ₂ O ₁₀ Na ₂ H ₂ O	372.30	37.30	100.00	10,000

B) Fuente de carbono

Compuesto	PM (g)	(g/l)	(mM/l)
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ (sacarosa)	342.31	30	87.63

C) Reguladores de crecimiento

Regulador	PM (g)	(mg/l)	(μ M/l)	Stock 10x (μ M/l)
2,4-D	221.04	1.0	4.52	45.2
Cinetina	215.21	1.0	4.64	46.4

Para agregar 2 mg del regulador correspondiente a 1 litro de medio se toman 20 ml de la solución stock.

D) Aminoácidos y otros

Compuesto	PM (g)	(mg/l)	(μ M/l)	Stock 100x (μ M/l)
C ₂ H ₅ NO ₂ (glicina)	75.07	1.0	13.32	133.2
C ₅ H ₅ N ₅ . 1/2 H ₂ SO ₄ (adenina)	184.20	10.0	54.30	543.0

Para añadir 1 mg de glicina o 10 mg de adenina a 1 litro de medio de cultivo se toman 10 ml de la solución stock correspondiente.

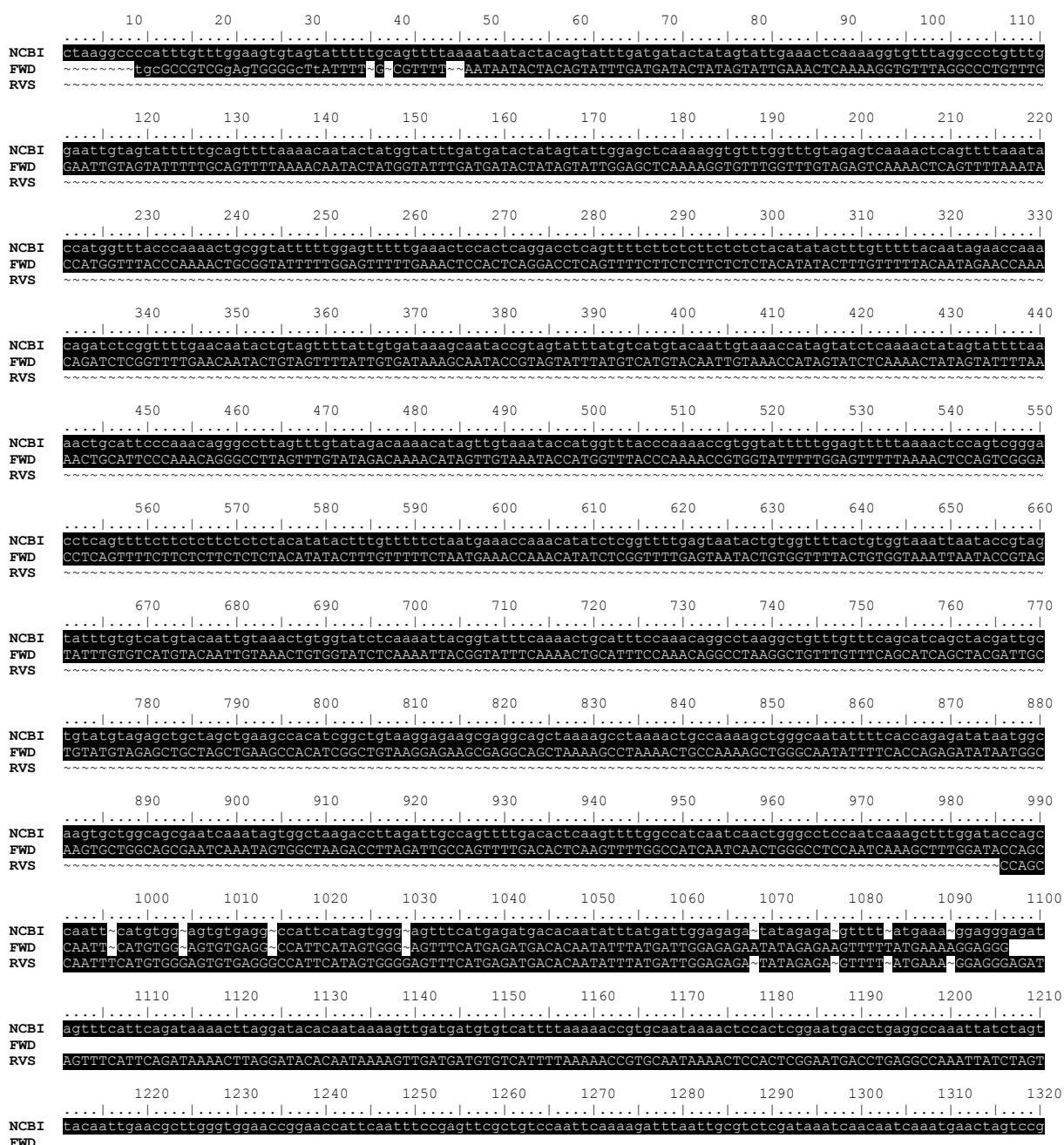
E) Vitaminas R2

Compuesto	PM (g)	(mg/l)	(μ g/l)	Stock 100x (μ M)
Inositol	180.160	100	555	5.5x10 ⁻⁴
Ácido nicotínico	123.110	1.0	8.12	812
Tiamina	337.270	2.0	5.93	593
Piridoxina	205.640	1.0	4.90	490

Para preparar 1 litro de medio se toman 10 ml de cada una de las soluciones.

Apéndice 3. Alineamiento de promotor teórico y experimental.

Alineamiento de las secuencias teórica (NCBI) y experimental del promotor de la ciclina D2;2 de maíz. (Se muestran la secuencia *forward* (FWD) y *reverse* complementaria (RVS), alineadas a la teórica). Es importante señalar que existen diferencias principalmente en los extremos donde inicia la secuenciación (dentro de los primeros 100 pb para cada cebador).



```

RVS  TACAATTGAACGCTTGGGTGGAACCGGAACCATCAATTTCCGAGTTCGCTGCCAATTCAAAAGATTTAATTGCGTCGATAAATCAACAATCAAATGAAC TAGTCCG
      1330      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400      1410      1420      1430
NCBI  tataat tttctcaacatg tttt gtttct actagtag acttag acttccctt caatgcca acgcgccctgc atcgaattt actagcctaca atgacgcag ttttgaatgatga
FWD
RVS  TATAATTTTCTCAACATGTTTGTGTTTCTACTAGTACTAGACTTCCCTTCAATGCCAACGCGCCCTGCATCGAATTTACTAGCCTACAATGACGAGTTTTGAATGATGA
      1440      1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510      1520      1530      1540
NCBI  tacagt gacaacgg gaaaaaaa acttgcccc gcaa- cacctc acgcaaaa cacgatcc agtgtcgtg cgcgcaa aggatccc gctccaaa actctcct agtagaaa
FWD
RVS  TACAGTGACAACGGGAAAAAAA AACTTGC CCCC GCGCACACCTC ACGC AAAACACGATCCAGTGTCTGTCGCGCAAAGGATCCCGCTCCAAAAACTCTCCTAGGAAAA
      1550      1560      1570      1580      1590      1600      1610      1620      1630      1640      1650
NCBI  tgccaaaa acaaaa caaa caaaag cccaagg agtgcg aggcatt gttttac agaaaacc cctcgtct ctatcc aaaaacc gctccc accacc accatca ctattc actagc
FWD
RVS  TGCCAAAAACAAAACAAAACAAAGCCCCAAGGAGTCGCAGGCATGTTTTACAGAAAACCCCTCGTCTCTATCCAAAACCGCTCCACCACCACCATCACTATTCACTAGG
      1660      1670      1680      1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750      1760
NCBI  cacagc gcccgg ccgccc ctacata aaccct gctctc ctccact cccact agtctc tctcct actggtt acacact gcagttg gccttg ccggcgt tcttcc tccccct cctc
FWD
RVS  CACAGCGCCCGGCGCCCTACATAAACCTGCTCTCCTCCACTCCACTAGTCTCTCTCTACTGTTTACACACTGCAGTGGCCTTGCCGGCGCTTCCCTCCCTCCTCT
      1770      1780      1790      1800      1810      1820      1830      1840      1850      1860      1870
NCBI  ctctcgt cctcct ctgctc ctccact tggata aagaac acaaat taggaa aaaaat aggc aaaaaa acatgt accttt tttctat ctatatt atctga aataat caagaag ag
FWD
RVS  CTCTCGCTCCTCTGTCTCTCCACTTGATAAAGAACACAAATTAGGAAAAAATAGGCAAAAAACATGTACCTTTTTTCTATCTATATTATCTGAATAAAATCAAGAAGAGG
      1880      1890      1900      1910      1920      1930      1940      1950      1960      1970      1980
NCBI  aagaggg gagaggg agcaggg agggg agggag tagcaaat ccagact ccataga atcagct cgcaga aggggaa agggag gaggag cttcgt ggtgaa ttgatt gctc
FWD
RVS  AAGAGGGGAGAGGGAGCAGGGAGGGGAGGAGTAGCAAATCCAGACTCCATAGAATCAGCTCGCAAGAAGGGGAAAGGGAGGAGGCTTCGCTGGTGAATTGATTGCTC
      1990      2000      2010      2020      2030      2040
NCBI  gctgct ccagct ctcgc attcgt gcg tttt cgg -aaagta ~~~~~ ggtggcgt
FWD
RVS  GCTGCTCCAGTCTCGCATTCGTGCCGTTTTTCGGACAAGTaAgactTCAGGTGGGGCCGct

```


Apéndice 4. Representación de los elementos de respuesta presentes en el promotor 35S, predichos por la base de datos PLACE.

