



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TRANSFORMACION DE CELULAS DE MAIZ (*Zea mays* raza tuxpeña) POR MEDIO DEL BOMBARDEO DE PARTICULAS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
OCTAVIO GUERRERO ANDRADE

DIRECTOR DE TESIS: DR. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ

MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

263845



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVANZADA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Transformación de Células de Maíz (Zea mays raza tuxpeño) por medio del Bombardeo de Partículas.
realizado por Guerrero Andrade Octavio.

con número de cuenta 8806783-2 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Estela Sánchez de Jiménez

Propietario Ing. Agrónomo Teresa Olivera Flores

Propietario Biólogo Alfredo Francisco Ayala Ochoa

Suplente Biólogo José Luis Busto Sánchez

Suplente M. en C. Guillermina Murguía Sánchez

Consejo Departamental de Biología

Dra. Edna María Suárez Díaz

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM; en colaboración con el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Transformación Genética del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM, ubicado en Cuernavaca, Morelos.

Durante el desarrollo del mismo conté con el apoyo económico otorgado por el SNI y FUNDACIÓN UNAM.

Este trabajo esta dedicado especialmente para mi papa Pedro Guerrero G.

y al recuerdo siempre presente de mi mama Sara Andrade J.

A mis hermanos con cariño.

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Estela Sánchez de Jiménez por la dirección de este trabajo y a la Ingeniero Agrónomo María Teresa Olivera Flores por su asesoría, el apoyo y la confianza que me ha brindado.

A la Dra. Georgina Hernández Delgado por su valiosa participación en la planeación experimental, el análisis de los resultados y la revisión crítica de esta tesis.

Al Biólogo Ramón Suárez Rodríguez por la asesoría técnica y las aportaciones hechas para mejorar este trabajo.

INDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
1. Embriogénesis somática, 5; 1.1 Embriogénesis somática en maíz, 8.	
2. Bombardeo de partículas o biobalística, 15; 2.1 Factores que afectan la transformación de las células vegetales por medio del bombardeo de partículas cubiertas con DNA, 16; 2.1.1 Construcción del DNA, 16; 2.1.2 Naturaleza de los microproyectiles y parámetros relacionados con el disparo, 20; 2.1.3 Selección del tejido blanco, 23; 2.1.4 Incorporación del DNA al genoma hospedero, 24.	
3. Bombardeo de partículas en maíz, 25.	
III. HIPÓTESIS	30
1. Objetivo general, 30; 1.1 Objetivos particulares, 30.	
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	32
1. Establecimiento y mantenimiento del cultivo de callos embriogénicos, 32; 1.1 Método de esterilización, 32; 1.2 Establecimiento del cultivo de callos, 32; 1.3 Proliferación de callos, 34; 1.4 Mantenimiento y regeneración, 34.	
2. Curva de tolerancia de callos embriogénicos de maíz obtenidos del medio N6 ¹ a kanamicina, 35.	
3. Purificación del DNA plasmídico, 35.	
4. Cuantificación del DNA, 37.	
5. Preparación de las partículas de tungsteno, 38.	
6. Precipitación del DNA, 38.	
7. Bombardeo con microproyectiles de tungsteno con pistola de baja presión, 39.	
8. Determinación de la actividad de β - <i>gus</i> por el método histoquímico, 41.	

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

42

1. Establecimiento y caracterización de la cinética de crecimiento de los cultivos de callos embriogénicos de maíz, 42.
2. Curva de tolerancia de callos embriogénicos del medio N6¹ a la kanamicina, 48.
3. Purificación del DNA plasmídico, 50.
4. Bombardeo de los callos embriogénicos de maíz con pistola de baja presión, 51.

4.1 Primer bombardeo, 53; 4.2 Segundo bombardeo, 58; 4.3 Tercer bombardeo, 61; 4.4 Cuarto bombardeo, 68.

VI. CONCLUSIONES

76

VII. PERSPECTIVAS

77

VIII. BIBLIOGRAFIA

78

Anexo 1. Composición de los medios de cultivo y suplementos

88

Anexo 2. Soluciones para preparar X-gluc y medir la expresión transitoria de *gus*

92

CLAVE DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

Reguladores del crecimiento vegetal:

ABA: Ácido Abscísico

BA: 6-Bencilaminopurina

Cinetina: 6-furfurilaminopurina

Dicamba: Ácido 3,6-Dicloro-o-anísico

IBA: Ácido indolbutírico

MCPP: Ácido 2-metil-4-clorofenoxipropiónico

NAA: Ácido naftalenacético

2,4-D: Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

Zip: 6-(γ,γ -Dimetilalilamino)-purina

Medios de cultivo:

MS: Medio nutritivo creado por Murashige & Skoog (1962).

N6: Medio nutritivo creado por Chu *et al.* (1975).

Peso:

μg : microgramos

mg: miligramos

g: gramos

Volumen:

μl : microlitros

ml: mililitros

l: litros

Longitud:

μm : micrómetros

nm: nanómetros

mm: milímetros

cm: centímetros

Concentración:

μM : Micromolar

mM: Milimolar

M: Molar

N: Normal

Varios:

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

RNAse: Enzima con actividad hidrolítica del RNA.

CaMV-35S: Secuencia promotora de la transcripción del Virus del Mosaico de la Coliflor.

β -*gus*: Enzima que hidroliza y rompe el enlace que une al grupo glucurónico e indolil del X-gluc (sustrato), posteriormente la acción oxidativa del oxígeno dimeriza los grupos indoxil y forma un precipitado color azul que puede ser visualizado fácilmente.

gus y *npt II*: son genes bacterianos (*Escherichia coli*) que codifican, el primero, para la enzima β -*gus*, y el segundo, para la neomicina fosfotransferasa II.

DMSO: Dimetilsulfoxido.

SDS: Lauril sulfato de sodio.

TE: Solución amortiguadora de Tris-EDTA.

X-gluc: 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- β -D-ácido glucurónico.

dH₂O: Agua desionizada.

D O: Densidad óptica.

pH: Potencial de hidrógeno.

g: gravedad.

°C: grados Celcius.

hr: horas.

in Hg: Pulgadas de mercurio.

psi: unidades de presión en el sistema inglés de medidas, 14.7 psi o lb.plg⁻²= 1 atmósfera.

RESUMEN

El presente trabajo se llevó a cabo en varias etapas. Durante la primera etapa se establecieron y caracterizaron los cultivos de callos embriogénicos de maíz utilizando para ello embriones cigóticos inmaduros, los cuales se inocularon en Medio N6 modificado, al cual se le adicionaron 30 g.l⁻¹ de sacarosa, hidrolizado de caseína y L-prolina. Como reguladores de crecimiento se utilizaron tres auxinas: Dicamba, MCPP y 2,4-D; en la etapa de proliferación se agregó la Cinetina. De los componentes orgánicos se probaron las vitaminas del medio MS, así como una mezcla de aminoácidos y vitaminas denominada cocktail 20. De los cuatro medios de cultivo que se probaron, todos indujeron la respuesta embriogénica.

En la segunda etapa se realizó la curva de tolerancia de los callos obtenidos del medio N6¹ a la kanamicina, escogiéndose la concentración de 155 mg.l⁻¹ para seleccionar las células transformadas después del bombardeo. De forma paralela en la tercera etapa se purificó el DNA plasmídico.

En la cuarta etapa se realizaron los bombardeos de los cultivos de callos que presentaron las mayores tasas de crecimiento (N6¹ y N6³). Los bombardeos fueron llevados a cabo con pistola de baja presión a tres distancias diferentes: 15.5, 10.5 y 8.0 cm, con microproyectiles de tungsteno de 0.4 µm de diámetro (M5), bajo un vacío de 20-22 in Hg y una presión de helio de 120 psi.

Los microproyectiles se encontraban cubiertos con el DNA del plásmido pBI426, el cual incluye una doble copia del promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor, fusionado a las secuencias codificadoras de los genes de *gus*

(reportero) y *nptII* (marcador selectivo), así como la secuencia de termino de la nopalina sintetasa (Nos Ter) y el aumentador de la transcripción del Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV).

A los callos bombardeados se les determinó la actividad de β -*gus* 48 horas después de realizado el bombardeo con el fin de medir la eficiencia en la transferencia del DNA plasmídico. Enseguida, la mitad de los callos bombardeados fueron colocados en el medio de proliferación y la otra mitad se transfirió a medio de proliferación al cual se le añadió la kanamicina para la selección de las células transformadas. La regeneración de las plantas se llevó a cabo reduciendo de manera gradual, subcultivo tras subcultivo, el contenido del hidrolizado de caseína, la L-prolina, la cinetina y las auxinas en un 25% de la concentración original del medio de proliferación.

De los callos bombardeados, se obtuvo la regeneración de plantas completas provenientes de la germinación de embriones somáticos, así como la formación de raíces y hojas, que eventualmente, fueron probadas para determinar la actividad de β -*gus*. Los resultados de esta determinación demostraron que los callos embriogénicos del medio N6³ eran mejores blancos para el bombardeo que los callos del medio N6¹. En busca de las condiciones que no provocaran demasiado daño a las células blanco, se estableció una distancia de 13 cm entre el filtro del bombardeador y el callo.

Los mejores resultados se obtuvieron en cultivos de callos del medio N6³ bombardeados a 13 cm de distancia, los cuales no fueron sometidos al agente selectivo. De estos callos se logró la regeneración de plantas completas, a las cuales se les determinó la actividad de β -*gus*, obteniendo como resultado que un 71% de las plantas probadas resultó positivo, presentando niveles de expresión de *gus* regulares y buenos en todos los tejidos probados.

De esta forma se establecieron las condiciones menos agresivas para la transformación de células embriogénicas de maíz (*Zea mays* raza tuxpeño) por medio del bombardeo de partículas. Mediante la determinación sistemática de la actividad de β -*gus* en los callos bombardeados y las plantas regeneradas se demostró, la expresión estable en las células embriogénicas y la obtención de plantas totalmente transformadas.

I. INTRODUCCIÓN

Los cereales fueron de las primeras plantas en ser domesticadas aproximadamente 10 mil años antes de nuestra era. Esta selección hecha por el hombre ha sostenido el desarrollo de la civilización humana, proveyendo invaluables fuentes de alimentación y nutrientes provenientes del trigo, arroz, maíz, cebada, sorgo, etc. Actualmente los cereales forman la parte central de la agricultura mundial y proveen más de la mitad de los alimentos consumidos por el hombre. Es por estas razones que el mejoramiento de los cereales ha sido el principal objetivo de los fitomejoradores en los últimos 50 años, esto ha dado como resultado un incremento en la producción y la calidad alimenticia de las plantas que pertenecen a este grupo. Sin embargo, tales incrementos no pueden ser sostenidos indefinidamente, debido a que el fitomejoramiento tradicional es un proceso lento y cuidadoso que tiene fuertes limitaciones biológicas. Otro factor que hace insostenible esta situación, es el gran aumento de la población mundial ya que disminuye la disponibilidad de la tierra cultivable y agota las ya disponibles (Vasil, 1994)

Debido a lo arriba mencionado las técnicas de la biología celular y molecular se han convertido en poderosas herramientas para complementar el fitomejoramiento tradicional, permitiendo el acceso a un amplio banco genético a través de la transferencia de genes con características deseables entre dos especies sin importar su relación taxonómica.

La transformación genética de especies vegetales de interés agronómico, se basa en la introducción, integración y expresión de genes en células vegetales que, posteriormente por medio de las técnicas del cultivo de tejidos permiten la regeneración de plantas transgénicas, siendo un requisito básico para la

obtención de las mismas, la regeneración eficiente de plantas normales y fértiles. Esto último ha sido muy difícil de obtener en las gramíneas debido a su naturaleza recalcitrante al cultivo *in vitro*. Este obstáculo ha podido ser rebasado por medio del cultivo de tejidos inmaduros e indiferenciados en estados definidos del desarrollo, sobre medios nutritivos con altas concentraciones de auxinas sintéticas fuertes (ej. 2,4-D) que han permitido la regeneración de plantas de los cereales de mayor importancia (Vasil, 1994).

Entre las técnicas novedosas para la transformación de células y tejidos intactos destaca el bombardeo de partículas, que emplea microproyectiles metálicos impulsados a altas velocidades para introducir DNA o RNA en las células vegetales (Sanford *et al.*, 1987; Christou *et al.*, 1988). El primer reporte en el que se utilizó un dispositivo de bombardeo fue hecho por Sanford *et al.* en 1987, quienes introdujeron partículas de tungsteno cubiertas con el RNA del Virus del Mosaico del Tabaco en células epidérmicas de cebolla (*Allium cepa*). En ese mismo año se reportó la introducción de DNA plasmídico también en células de cebolla (Klein *et al.*, 1987).

En monocotiledóneas, los primeros cereales transgénicos se obtuvieron por transferencia directa del DNA por medio de la electroporación y tratamiento con polietilenglicol de protoplastos. Estos experimentos fueron llevados a cabo con maíz (Rhodes *et al.*, 1988), arroz (Zhang & Wu, 1988) y un pasto forrajero (Horn *et al.*, 1988). Hasta 1990 esta estrategia permaneció como la vía principal para transformar monocotiledóneas. En años recientes, la transformación por medio del bombardeo de partículas cubiertas con DNA, se convirtió en la técnica más utilizada para transformar cereales. Ejemplos del éxito obtenido al utilizar esta técnica son los siguientes casos: la resistencia de arroz a la infestación por insectos, es mediada por la presencia de proteínas

de *Bacillus thuringiensis* y fue obtenida gracias a la introducción de genes que codifican para estas proteínas, vía la electroporación de protoplastos (Fujimoto *et al.*, 1993); posteriormente esta misma resistencia fue lograda en maíz usando el bombardeo de partículas cubiertas con DNA (Koziel *et al.*, 1993). Lo mismo sucedió con la resistencia al virus del rayado mediada por proteínas de la cápside, cuyos genes se introdujeron en arroz, mediante la transformación de protoplastos (Hayakawa *et al.*, 1992), esta respuesta también fue obtenida en maíz y cebada por medio del bombardeo de partículas (Murry *et al.*, 1993; Wan y Lemaux, 1994). La resistencia a sulfonilurea (un herbicida) se obtuvo utilizando el gen *als* de *Arabidopsis thaliana*, el cual fue introducido en maíz por medio del bombardeo de partículas. Asimismo la resistencia a otro herbicida, el glufosinato, conferida por el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* fue también introducida en varias gramíneas como: maíz (Gordon-Kamm *et al.*, 1990), arroz (Christou *et al.*, 1991), trigo (Vasil *et al.*, 1992), sorgo (Casas *et al.*, 1993), cebada (Wan & Lemaux, 1994), centeno (Castillo *et al.*, 1994) y triticale (Zimny *et al.*, 1994) de la misma forma.

Debido a la alta eficiencia de esta técnica para introducir el DNA en las células, tejidos u órganos y la regeneración de los mismos, parece ser el mejor método para lograr una transformación genotipo-independiente en muchos cultivos de importancia agronómica, traspasando así la limitación impuesta por la especificidad de *Agrobacterium sp.* para infectar dicotiledóneas y las dificultades asociadas a la regeneración de plantas normales y fértiles en sistemas como los de protoplastos o las células en suspensión. Debido a la naturaleza física de la técnica mencionada, teóricamente no existen limitaciones biológicas importantes para este proceso de introducción del DNA,

de esta forma el genotipo no es un factor limitante.

La finalidad del presente trabajo fue el establecimiento de las condiciones óptimas para la transformación de células embriogénicas de maíz (*Zea mays*) por medio del bombardeo de partículas cubiertas con el plásmido pBI426. Con este objetivo se utilizaron embriones cigóticos inmaduros de maíz de la raza tuxpeño para establecer los cultivos celulares, ya que en estudios anteriores (García *et al.*, 1998) habían demostrado tener capacidad para la formación de cultivos embriogénicos.

Éste pretende ser un primer paso en el establecimiento de programas de mejoramiento de razas criollas de maíz mediante la transformación genética por medio del bombardeo de partículas con genes reporteros y de marcadores selectivos, para posteriormente introducir genes que codifiquen para características agronómicas deseables.

II. ANTECEDENTES

1.0 Embriogénesis somática.

La embriogénesis somática, también llamada asexual o adventicia, es el proceso mediante el cual las células somáticas se desarrollan y dan origen a plantas completas a través de estados embriogénicos característicos (globular, corazón y torpedo en dicotiledóneas) sin que ocurra la fusión de gametos (Williams & Maheswaran, 1986 citados por Fransz & Schel, 1991a).

De esta manera un embrión somático se puede definir como una estructura bipolar producida de manera asexual (Raghavan *et al.*, 1978) sin conexión vascular con el tejido madre. Los embriones así formados son también denominados singámicos (más que embrioides) puesto que son estructural y bioquímicamente semejantes a los embriones cigóticos (Ammirato, 1987).

La embriogénesis somática es un fenómeno natural bien conocido. En muchos miembros de las Rutaceas especialmente en *Citrus spp.* los embriones se desarrollan de la nucela o el tegumento circundante (Esan, 1973 citado por Ammirato, 1983). También se ha observado que, de forma natural, los embriones pueden desarrollarse de una gran variedad de tejidos entre los cuales se encuentran el saco embrionario, las sinérgidas, las antípodas, el embrión o el óvulo mismo.

Afortunadamente este fenómeno ha sido observado de manera frecuente, en muchas especies y familias para demostrar que no es un hecho restringido a unos cuantos taxa. Por lo tanto, existe la posibilidad de que células de cualquier planta bajo el estímulo y las condiciones adecuadas puedan ser inducidas a manifestar el patrón embriogénico (Ammirato, 1983). De hecho,

son más numerosos los fenotipos celulares que presentan embriogénesis somática *in vitro* que aquéllos que la presentan *in vivo*.

La formación de embriones somáticos puede ocurrir en dos rutas (Sharp *et al.*, 1980). Ciertas células necesitan únicamente ser colocadas sobre un medio basal simple para comenzar el desarrollo embriogénico, mientras que otras requieren de un medio más complejo, en el cual se necesita del suministro de algún regulador del crecimiento, que generalmente, es una auxina. En el primer caso las células se encuentran predeterminadas para el desarrollo embriogénico, necesitando solamente las condiciones adecuadas para permitir su manifestación. En esta ruta conocida como embriogénesis directa, los embriones proceden de las "Células Predeterminadas para la Embriogénesis" (Kato & Takeuchi, 1966; Konar & Nataraja, 1965, citados por Sharp *et al.*, 1980). Esto ha sido observado frecuentemente en embriones cigóticos extirpados o en las plántulas que surgen de los mismos, usualmente en la región del hipocótilo.

En el segundo caso, el de la embriogénesis indirecta, las células del explante se encuentran ya diferenciadas o formando parte de zonas meristemáticas y tejidos maduros. En esta ruta es necesario un tratamiento de inducción para obligar a la redeterminación de esas células diferenciadas y el desarrollo de células embriogénicas determinadas. La embriogénesis indirecta proviene de la inducción y desarrollo de "Células Embriogénicas Determinadas" (Halperin, 1966; Steward *et al.*, 1970, citados por Ammirato, 1987)

El proceso de embriogénesis somática es sumamente complejo, difícil de caracterizar y se le ha descrito como de tipo eminentemente plástico en su desarrollo (Gerf *et al.*, 1994). Esta plasticidad es el resultado de cambios en la extensión de las etapas de la diferenciación y el desarrollo de los embriones

somáticos. En comparación con la secuencia normal de dichas etapas, algunos cambios pueden ser prematuros o sufrir algún retraso, la longitud de su expresión puede alargarse o acortarse, y los efectos pueden ser manifestados a niveles celulares de tejidos u órganos. Además de esto, los embriones somáticos responden a modificaciones en el medio de cultivo, motivo por el cual las secuencias morfogénicas pueden ser afectadas (J. de Jong *et al.*, 1993).

Existe la posibilidad de que la embriogénesis somática, tanto *in vivo* como *in vitro*, esté regulada por mecanismos represores, y que la ausencia de los mismos, determine su expresión (Carman, 1990). Entre los factores más importantes para la inducción de la embriogénesis somática se encuentran: el genotipo, la etapa de desarrollo del explante (Tomes & Smith, 1985), los constituyentes del medio de cultivo (Duncan *et al.*, 1985), la presión osmótica del medio de cultivo (Close & Ludeman, 1987; Brown *et al.*, 1989), el metabolismo del nitrógeno (Dougal & Verma, 1978), la luz y la temperatura, entre otros

El crecimiento y desarrollo de embriones a partir de tejidos somáticos por medio del cultivo de tejidos vegetales, fue descrito primero por Steward en 1958, así como por Reinert en 1958 y 1959 (citados por Ammirato, 1983); quienes utilizaron como explante la raíz principal de zanahoria (*Daucus carota* L.).

Las principales etapas en que se divide la embriogénesis somática son: inducción, crecimiento temprano, maduración y germinación.

En la actualidad, la lista de especies vegetales que presentan capacidad embriogénica *in vitro* se ha ido incrementado gracias al esfuerzo y la acertada elección de un gran número de tejidos utilizados como explantes para la inducción de embriogénesis. Esta elección se ha enfocado principalmente a

tejidos jóvenes como los embriones inmaduros, hojas, tallos, peciolos, microsporas, polen, etc.

1.1 Embriogénesis somática en maíz.

Entre las especies vegetales que tradicionalmente habían demostrado ser recalcitrantes al cultivo *in vitro* se encuentran las gramíneas (cereales y forrajeras), de las cuales actualmente se ha logrado obtener cultivos embriogénicos gracias al uso de embriones maduros e inmaduros, así como de tejidos no embriogénicos tales como: hojas inmaduras, meristemos primarios de raíz y tallo e inflorescencias inmaduras principalmente.

Los primeros esfuerzos para establecer la regeneración de plantas de maíz por medio del cultivo *in vitro* fueron hechos por La Rue en 1949 sin mucho éxito (Santos *et al.*, 1984).

Hasta 1975 se disponía de cultivos de células de maíz establecidos a partir del endospermo, de secciones de plantas recién germinadas, de inflorescencias inmaduras y embriones maduros, en los cuales no se había podido obtener la regeneración de plantas. Pero en ese mismo año, Green & Phillips reportaron por vez primera la regeneración de plantas de maíz por medio del cultivo de callos totipotentes. Estos autores establecieron que el uso de embriones inmaduros con una edad de 18 días después de la polinización, inoculados en medio MS modificado y suplementado con 2.0 mg.l^{-1} de 2,4-D, eran las mejores condiciones para generar cultivos de callos a partir del escutelo de los embriones inmaduros (Green & Phillips, 1975).

Sánchez de Jimenéz & Albores, 1979 reportaron el efecto del 2,4-D y el MCPP en la inducción de callo generado de embriones maduros, tallo y raíz de

diferentes genotipos criollos de maíz; encontraron que el MCPP puede reemplazar el uso del 2,4-D en la inducción y mantenimiento de los callos de maíz.

Torné *et al.*, 1980 lograron el establecimiento de cultivos de callos a partir de mesocótilos obtenidos de la germinación *in vitro* de embriones inmaduros de maíz. Estos cultivos fueron iniciados y mantenidos sobre medio MS modificado. La regeneración de plantas completas se llevó a cabo colocando a los callos generados durante 40 días en el mismo medio de inducción adicionado con 0.25 mg.l⁻¹ de 2,4-D y 1.0 mg.l⁻¹ de NAA, los brotes finalmente se transfirieron a un medio libre de 2,4-D pero con NAA y 2ip.

Lu *et al.*, 1982 fueron los primeros en reportar la regeneración de plantas completas de maíz por medio de la embriogénesis somática, utilizando como explante embriones cigóticos inmaduros de 1.0-1.5 mm de longitud de 12 genótipos de maíz. Sus experimentos mostraron que el medio MS suplementado con 0.5 mg.l⁻¹ de 2,4-D y 12% de sacarosa fueron las mejores condiciones para la producción de callos embriogénicos escutelares. Observaron también que algunos genotipos producían más embriones somáticos que otros.

Green & Rhodes, 1982 fueron los primeros en describir un tipo de callo friable de maíz, el cual contaba con un rápido crecimiento y una gran capacidad para regenerar plantas vía embriogénesis somática. Este tipo de callos pueden ser iniciados y mantenidos sobre medio MS o N6 adicionado con 0.5-1.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D. Los cultivos embriogénicos surgieron directamente del escutelo de los embriones inmaduros o de manera espontánea como puntos de crecimiento aislado en los cultivos embriogénicos de tipo compacto.

Tiempo después estos callos embriogénicos fueron denominados, los

compactos, como callos tipo I, y los friables, como callos tipo II (Green *et al.*, 1983, citado por Franz y Schel., 1991b).

Vasil *et al.*, 1983 observaron que la máxima proliferación de callos generados a partir de la región nodal del eje embrionario de embriones inmaduros de maíz, se obtuvo en medio MS adicionado con 0.5-1.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D y 6-12% de sacarosa, pero sólo a bajas concentraciones del 2,4-D (0.25-0.5 mg.l⁻¹) y sacarosa (3%) se pudo llevar a cabo la morfogénesis.

Chang, 1983 logró la regeneración de plantas completas de maíz utilizando como explante tejidos de hojas obtenidas de embriones cigóticos inmaduros germinados *in vitro*, los callos derivados de estos tejidos fueron iniciados y mantenidos sobre medio MS suplementado con 2.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D, también se observó la formación de hojas y posteriormente plantas, pero sólo cuando los callos fueron transferidos a medio N6 con 2.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D y 0.1 mg.l⁻¹ de zeatina.

Santos *et al.*: 1984 propusieron un método alternativo para la obtención de tejidos totipotentes de maíz. Estos autores lograron la proliferación de cultivos de callos a los cuales llamaron "meristemáticos", pues observaron que es el meristemo nodal el que da origen a este tipo de callos. Resaltaron la posibilidad de que éste sea un meristemo hipertrofiado originado durante el establecimiento del cultivo, el cual puede crecer y originar plantas de la misma manera en que lo hacen los callos totipotentes. Estos callos fueron obtenidos del primer nodo de plántulas que provenían de la germinación de semillas *in vitro*. La germinación de las semillas y la inducción de los cultivos de callos se llevaron a cabo en medio MS suplementado con 2.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D, la diferenciación de brotes se realizó en el mismo medio reduciendo el 2,4-D a 0.25 mg.l⁻¹ y añadiendo 1.0 mg.l⁻¹ de NAA más 0.05 mg.l⁻¹ de 2ip, la regeneración

se llevó a cabo eliminando el 2,4-D del medio anterior. Como parte de los esfuerzos anteriores Torné *et al.*, 1984 utilizaron embriones inmaduros de diferentes cultivares de maíz, los embriones fueron colocados en medio MS suplementado con 2.0 mg.l^{-1} de 2,4-D y colocados en luz, estas condiciones provocaron la germinación anómala de los mismos, dando origen a lo que han sido llamados "tejidos atrofiados", los cuales fueron utilizados para el establecimiento del cultivo de callos. Se observó que el mismo medio utilizado en la germinación de las semillas produjo dos tipos de callos totipotentes: los callos meristemáticos y callos de un color amarillo-blanquecino; ambos fueron capaces de regenerar plantas.

Lowe *et al.*, 1985 lograron la regeneración de plantas completas por medio de la organogénesis y embriogénesis somática en la línea B73 de maíz. Inocularon embriones inmaduros sobre medio MS adicionado con 0.5 mg.l^{-1} de 2,4-D y 12% de sacarosa, como resultado obtuvieron callos escutelaes de color blanco y consistencia compacta. Al transferir estos callos al mismo medio pero con 2% de sacarosa se formó un callo organogénico de color verde, el cual pudo ser separado del callo compacto. Se observó además que un sector del callo organogénico puede volverse embriogénico de manera espontánea, pudiendo ser seleccionado fácilmente por su friabilidad y rápido crecimiento.

Kamo *et al.*, 1985 reportaron el efecto benéfico del medio N6 sobre la producción de callos embriogénicos friables a partir de embriones inmaduros de la línea A188 de maíz. Observaron que la utilización de embriones cigóticos inmaduros de 1.7 mm de longitud sobre medio N6, al cual se le adicionaron 0.5 mg.l^{-1} de 2,4-D, 2% de sacarosa y 20 mM de prolina, son las mejores condiciones para el establecimiento de cultivos de callos embriogénicos friables. Al pasar los callos generados a un medio sin 2,4-D con 6% de

sacarosa se favoreció la formación de plantas. Estas condiciones les permitieron la regeneración de plantas con tan sólo un 5-10% de anomalías fenotípicas (hojas rizadas o manchadas y achaparramiento).

Armstrong & Green, 1985 reportaron el efecto de la fuente de nitrógeno y la adición de L-prolina sobre la formación de callos embriogénicos friables utilizando como explante embriones inmaduros de maíz. Establecieron que la adición de hasta 25 mM de prolina al medio N6 incrementaba la frecuencia de formación de callo embriogénico friable y embriones somáticos, mientras que la adición de 9 mM de prolina al medio MS no estimula la formación de embriones.

Novak *et al.*, 1987 probaron 60 líneas de maíz y un híbrido por su capacidad para la formación de embriones somáticos y la regeneración de plantas. La más alta frecuencia de regeneración de plantas fue expresada en la línea CH131; cuando esta línea fue cruzada con otra línea sin capacidad regenerativa, los híbridos resultantes F₁ y BC, expresaron capacidad regenerativa. Los resultados de cruza recíprocas demostraron que los principales responsables de la formación de callos embriogénicos y la regeneración *in vitro* de plantas de maíz son genes nucleares y factores citoplásmicos. También evaluaron la variación somaclonal inducida por radiaciones γ , concluyendo que probablemente no es cualitativamente diferente de la provocada por el cultivo *in vitro*, de manera que podrían utilizarse las radiaciones γ para la inducción de variabilidad genética en líneas mejoradas de maíz.

Wilkinson & Thompson, 1987 analizaron la relación del genotipo con el medio de cultivo sobre la obtención de callo regenerable. Estos autores, al igual que otros, resaltaron una vez más la dependencia de la respuesta morfogenética *in vitro* del genotipo, el cual implica una gran variedad genómica. Close & Ludeman, 1987 demostraron que la embriogénesis somática puede ser inducida

por una variedad de reguladores del crecimiento vegetal, que presentan una acción parecida a la de las auxinas y que a pesar de las diferentes respuestas dependientes del genotipo, algunos reguladores del crecimiento como cloramben, dicamba y tricamba son capaces de inducir la respuesta embriogénica en altas frecuencias en algunas líneas de maíz. Observaron además, que la adición de manitol (0 hasta 0.28 M) y ABA (0.5-1.0 mg.l⁻¹) en combinación con varias concentraciones de sacarosa (3-12%) incrementaban la embriogénesis, sugiriendo un requerimiento osmótico adicional en algunos genotipos.

Kamo *et al.*, 1987 lograron la formación de callo embriogénico a partir de protoplastos de maíz derivados del híbrido A188XB73. Los protoplastos fueron aislados a partir de cultivos embriogénicos en suspensión derivados de callo embriogénico friable, el cual había sido aislado de callos compactos producidos por embriones inmaduros. El medio de cultivo de los protoplastos fue el N6 con una concentración óptima de 4.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D y 0.3 M de manitol para inducir la división celular.

Wang, 1987 obtuvo la regeneración de plantas de maíz en cultivos de callos embriogénicos y organogénicos establecidos a partir de embriones maduros, sobre medio MS suplementado con 1-2 mg.l⁻¹ de 2,4-D. Observaron también que el callo crecía más lentamente y era compacto cuando se añadían altas concentraciones de sacarosa, la concentración óptima de este compuesto a la cual se obtuvo la mayor inducción de callo fue de 2%.

Songstand *et al.*, 1992 obtuvieron la proliferación de callo embriogénico friable utilizando como explante inflorescencias inmaduras de maíz, las cuales inocularon sobre medio N6 suplementado con 1.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D, 100 mg.l⁻¹ de caseína y 25 mM de prolina. La adición de 10 µM de AgNO₃ al medio, aumentó

significativamente la formación de este tipo de callo.

Zhong *et al.*, 1992 regeneraron plantas de maíz colocando la parte apical de plántulas obtenidas de la germinación de semillas *in vitro*. El explante fue colocado en medio MS con 500 mg.l⁻¹ de caseína y 9 µM de BA. La formación de brotes se obtuvo adicionando a este mismo medio 2.25 µM de 2,4-D, la formación de callo embriogénico se observó cuando se redujo la concentración de BA a 4.5 µM y se añadió la misma concentración de 2,4-D que en el caso de la formación de brotes. La regeneración de las plantas se realizó en medio MS con 2.25 µM de BA+1.8 µM de IBA.

Emons *et al.*, 1993 demostraron que manipulando los niveles de ácido abscísico, ácido giberélico, L-prolina, manitol y sacarosa en el medio de cultivo se puede regular el desarrollo de los embriones somáticos, para mejorar de esta manera su frecuencia y uniformidad de maduración y por añadidura la regeneración.

Emons & Kieft, 1995 demostraron la influencia del manitol sobre el potencial embriogénico de callos obtenidos de embriones inmaduros. Este compuesto actúa como un agente que mantiene la competencia para embriogénesis más que para rizogénesis e inhibe la germinación precoz de los embriones.

Puesto que la regeneración vegetal vía embriogénesis somática se da a partir de una sola célula o en algunos casos de algunas cuantas células, este tipo de regeneración es importante para la producción vegetal y la biotecnología en procesos tales como la propagación clonal, multiplicación de híbridos F₁ y especialmente para la transformación genética (Gordon-Kamm *et al.*, 1990).

2.0 Bombardeo de partículas o biobalística.

Durante miles de años el único método disponible para la introducción de nuevas características en las plantas fue el fitomejoramiento tradicional, que implica la selección de individuos con características deseables, seguida de la hibridación sexual y finalmente la selección de las 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.

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. 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 genética 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 rutinario y 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 o helio) hasta una velocidad suficiente para penetrar la pared celular. Una proporción de las células blanco permanece viable y el DNA una vez integrado al genoma vegetal puede ser expresado. (Southgate *et al.*, 1995; Vain *et al.*, 1995). Esta 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 (Klein & Fitzpatrick-McElligott, 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 y tejidos vegetales tales como: células en suspensión, callos, protoplastos, tejidos meristemáticos, embriones inmaduros, protocormos, coleoptilos y polen. Es así como el bombardeo de partículas cubiertas con DNA ha demostrado ser una técnica de fácil empleo, versátil y eficiente (Southgate *et al.*, 1995).

2.1 Factores que afectan la transformación de las células vegetales por medio del bombardeo de partículas cubiertas con DNA.

2.1.1 Construcción del DNA.

La recuperación de células vegetales transformadas requiere construcciones de genes, que aseguren una producción eficiente de un producto proteico funcional, en las células blanco. Las construcciones comúnmente

usadas en la transformación de células vegetales consisten de una unidad de expresión que contiene una región promotora, un sitio de iniciación de la transcripción, una porción 5' de la secuencia líder no traducible junto con un sitio de unión múltiple sintético y una señal de poliadenilación. El sitio de unión múltiple cuenta con varios sitios únicos de restricción, lo cual permite la inserción de secuencias codificantes derivadas de genes procarióticos o eucarióticos, incluyendo secuencias genómicas con intrones o cDNAs. Esta estructura permite la construcción de una gran variedad de unidades de expresión, que en combinación con genes reporteros, permiten una rápida detección del DNA transferido y la recuperación de células transformadas mediante los marcadores selectivos. La presencia del DNA introducido en las células vegetales puede ser demostrada en las 24 horas posteriores al bombardeo por medio de un ensayo de expresión transitoria. Estas pruebas se basan en la expresión de genes llamados "reporteros", los cuales pueden expresarse en las células aún sin haberse integrado al genoma. De esta forma estos genes reporteros son utilizados para demostrar la transferencia del DNA a las células vegetales, así como para estudiar los efectos sobre la expresión génica debidos a las modificaciones en la construcción del DNA transformante (Morrish *et al.*, 1993).

Los ensayos de expresión transitoria requieren de un producto que sea rápido y fácil de monitorear. El sistema reportero de *gus*, desarrollado por Jefferson *et al.* en 1987 utiliza el gen bacteriano *uidA* que codifica para la enzima β -*gus*, la cual actúa sobre el sustrato X-gluc y forma un producto que al oxidarse produce un precipitado color azul, de esta forma las células transformadas pueden ser identificadas por su coloración azul. Aunque este sistema ha sido el más utilizado en la transformación de cereales, también han

sido probados genes reporteros que codifican para la producción de antocianinas (*CI, B y R*), luminiscencia (Luciferasa, *LUC*) y el de la cloranfenicol acetil transferasa (*CAT*) (Morrish *et al.*, 1993).

Los genes introducidos requieren de un promotor para poder ser expresados en las células blanco, el cual puede ser de origen bacteriano, viral o vegetal. El promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV 35S por sus siglas en inglés) se ha empleado frecuentemente con varios grados de éxito en muchas especies vegetales, algunas veces en una doble o triple copia para incrementar la expresión del gen introducido (Bekkaoui *et al.*, 1990; Charest *et al.*, 1993, citados por Southgate *et al.*, 1995). Sin embargo, aunque el CaMV 35S funciona muy bien en la mayoría de las dicotiledóneas, no ha sido tan efectivo en monocotiledóneas (Christensen *et al.*, 1992, citado por Southgate *et al.*, 1995). Por esta razón se ha probado adicionalmente la acción de otros promotores en células de maíz, cebada, trigo y arroz, para lograr un incremento en la expresión génica. Chibbar *et al.*, 1993 compararon la eficiencia de distintos promotores en la transformación de células de cebada por medio del bombardeo de partículas. Sus construcciones incluyeron a los promotores de la alcohol deshidrogenasa de maíz (*Adh1*) y el de la actina de arroz (*Act1*), unidos a su respectivo primer intrón, así como los promotores 35S del CaMV y el aumentador de la transcripción 35S (E35S) duplicado, fusionados al primer intrón de la *Adh1* de maíz o al primer intrón del locus del achaparramiento del maíz (*sh1*), respectivamente. Todas estas construcciones estaban ligadas al terminador de la nopalina sintetasa (*nos*). Los más altos niveles de expresión fueron obtenidos con el promotor de la actina de arroz (*Act1*) junto con su primer intrón, seguido por el E35S unido al intrón del *sh1* (Chibbar *et al.*, 1993, citado por Southgate *et al.*, 1995).

El uso del promotor de maíz de la *Adh1* ligado a su primer intrón en células de maíz dio como resultado un incremento en la expresión génica en comparación con la expresión del CaMV 35S (Reggiardo *et al.*, 1991, citado por Southgate *et al.*, 1995). Sin embargo estudios llevados a cabo con maíz y arroz en los cuales se utilizaron los promotores de la *Adh1* de maíz y el CaMV 35S, ambos con el primer intrón de la *Adh1*; mostraron sólo un ligero incremento en la expresión de la *Adh1* (Bekkaoui *et al.*, 1990; Luehrsen & Walbot, 1991, citados por Southgate *et al.*, 1995). Estos resultados resaltan la importancia del primer intrón de la *Adh1* de maíz el cual tiene un efecto considerable sobre la expresión génica en monocotiledóneas.

Taylor *et al.*, 1991, citados por Southgate *et al.*, 1995 utilizaron el promotor del gen de la ubiquitina de maíz (*Ubi1*) con su primer exón y primer intrón en la transformación de células de maíz, trigo, *Panicum maximum*, *Pennisetum glaucum*, *P. purpureum* y *Saccharum officinarum*. En todos los casos los niveles de expresión de *gus* fueron superiores con el *Ubi1*, que con el *Adh1* y su primer intrón.

Los promotores se pueden expresar de manera constitutiva, tejido-específica o ser característicos de un estado del desarrollo. Su caracterización y análisis funcional es importante para el desarrollo de secuencias que proporcionen la expresión de genes en los sitios en que son requeridos, por ejemplo, la expresión de genes de proteínas de reserva en el embrión o en tallos y hojas para la protección contra insectos o virus (Morrish *et al.*, 1993).

Las construcciones de genes también han sido utilizadas para la introducción de marcadores selectivos para la recuperación de las células transformadas. Entre los genes utilizados se encuentran, el *nptII* que codifica

para la neomicina fosfotransferasa, confiriendo resistencia a los antibióticos neomicina, kanamicina, geneticina y paramomicina, el gen *hpt* que confiere resistencia a la higromicina, los genes como el *bar* o el *pat*, que codifican para la fosfotricina acetiltransferasa que confiere resistencia al herbicida bialafos (Southgate et al., 1995).

2.1.2 Naturaleza de los microproyectiles y parámetros relacionados con el disparo.

El éxito del bombardeo con microproyectiles depende de la penetración de los tejidos vegetales y la transferencia del DNA con daño mínimo para las células blanco. Entre los parámetros relacionados directamente con el bombardeo se encuentran los siguientes:

La naturaleza y el tamaño de los microproyectiles, éstos deben ser lo suficientemente pequeños para penetrar los tejidos sin causar daño excesivo a las células, pero suficientemente grandes y densos para llevar cantidades significativas de DNA y alcanzar el momento adecuado que les permita penetrar las paredes y capas celulares profundas.

Birch & Franks, 1990, citados por Southgate *et al.*, 1995 observaron que partículas con un diámetro de 0.8-1.2 μm fueron las mejores para la transformación de células vegetales grandes, mientras que Klein *et al.*, 1988 reportan que el uso de partículas de tungsteno con diámetro de 1.2 μm da niveles mayores de expresión en células de maíz que cuando se utilizan partículas de 0.6 ó 2.4 μm de diámetro.

La forma y naturaleza de los microproyectiles puede también influir la transformación, teóricamente las partículas esféricas causan menos daño a las

células. En general las partículas de tungsteno tienen una superficie irregular y tienden a aglomerarse durante la precipitación del DNA a su superficie, mientras que las de oro son casi esféricas y tienden a permanecer más tiempo separadas. Es requisito también que las partículas sean de materiales relativamente inertes para minimizar la interacción con el DNA adherido y las células blanco, así como los cuidados durante su precipitación con el DNA.

Algunos sistemas de transformación utilizan microproyectiles de tungsteno u oro. El tungsteno es más barato y se encuentra disponible en una gran variedad de tamaños pero es tóxico para ciertos tipos celulares, además puede sufrir oxidación superficial, lo que afecta la eficiencia de adsorción y degrada el DNA adherido. El oro es biológicamente inerte y no resultó ser tóxico para las células utilizadas por Sanford *et al.*, 1993, citado por Southgate *et al.*, 1995, asimismo tampoco actúa catalíticamente sobre el DNA adherido a su superficie.

La cantidad de DNA precipitado sobre los microproyectiles puede afectar significativamente el nivel de agregación de las partículas. Grandes aglomeraciones de las mismas pueden dañar excesivamente los tejidos bombardeados. Concentraciones mayores de 2 μg de DNA por miligramo de tungsteno tienen un efecto negativo sobre la expresión génica (Klein *et al.*, 1988).

La adherencia del DNA a los microproyectiles es otro factor importante en la introducción del DNA. El procedimiento más utilizado para la adsorción del DNA a los microproyectiles es el de Klein *et al.*, 1988, algunas veces modificado. Este método conlleva la adición del DNA plasmídico previamente disuelto en una solución amortiguadora idónea a una solución estéril con los microproyectiles de tungsteno, seguido por la adición de cloruro de calcio 2.5

M y espermidina 0.1 M.

Los parámetros que afectan la velocidad de los microproyectiles influyen también en su capacidad para introducir el DNA adherido a ellos. Los niveles de vacío dentro de la cámara en el momento del bombardeo están relacionados directamente con la velocidad de las partículas. Observaciones hechas al incrementar el vacío de 10 a 28 in Hg mostraron un incremento de 350 veces en la eficiencia de introducción del DNA (Klein *et al.*, 1988). El incremento en la eficiencia de introducción del DNA al aumentar el vacío se debe probablemente a la reducción de la resistencia del aire que sufren las partículas, lo que da como resultado una penetración más eficiente de las paredes y membranas celulares. Como ya se mencionó, la velocidad final de los microproyectiles está relacionada con la resistencia del aire. Por lo tanto, la distancia recorrida por los mismos afecta su velocidad y capacidad de penetración.

Cuando se colocaron células de maíz de la variedad Black Mexican Sweet a diferentes distancias del filtro del bombardeador, la mayor expresión se observó a una distancia de 6 cm, ya que al incrementar la distancia hasta los 17 cm, la expresión disminuye en un factor de tres (Klein *et al.*, 1988).

La frecuencia de transformación puede también ser incrementada por medio de bombardeos múltiples. En cultivos de células en suspensión de arroz y trigo, el incremento en la expresión génica, fue casi proporcional al número de bombardeos realizados (Wang *et al.*, 1988, citados por Morrish *et al.*, 1993). Al incrementar el número de bombardeos también se incrementa el daño al tejido blanco, por esta razón es importante determinar el balance entre el daño producido y la eficiencia en la transferencia del DNA para un tejido dado. Generalmente los trabajos de transformación por medio del bombardeo de

partículas se llevan a cabo con un solo bombardeo (Southgate *et al.*, 1995).

2.1.3 Selección del tejido blanco.

La mayor ventaja de la transformación por medio del bombardeo de partículas es la gran flexibilidad que tiene para seleccionar el tejido blanco. Cualquier tejido que presente la capacidad de regenerar plantas completas fértiles, es apropiado para la transformación por medio de esta técnica.

Sin embargo, las plantas regeneradas vía embriogénesis somática tienen mayor probabilidad de generar plantas totalmente transformadas, mientras que la regeneración via organogénesis, puede generar plantas transgénicas, pero sólo después de repetidas selecciones del tejido blanco después del bombardeo y durante la regeneración. En algunos sistemas que se basan en la regeneración directa de las plantas, la formación de quimeras, las cuales son plantas que contienen sectores transformados y no transformados, es inevitable; ejemplo de esta situación es el bombardeo de meristemos apicales de soya (McCabe *et al.*, 1988), algodón (McCabe & Martinell, 1993), caña de azúcar (Gambley *et al.*, 1993) y maíz (Lowe *et al.*, 1995) de los cuales, en todos los casos se han podido obtener brotes transformados, así como brotes quiméricos y no transformados.

Pero cuando no se dispone de un tejido con la capacidad de regeneración directa, los cultivos celulares con capacidad regenerativa resultarán de gran utilidad. Desgraciadamente, no todas las variedades comerciales pueden producir cultivos celulares útiles para la transformación por medio del bombardeo de partículas. En maíz sólo unos cuantos genotipos pueden producir callos embriogénicos tipo II, los cuales han sido utilizados exitosamente para

la transformación por medio de esta técnica (Gordon-Kamm *et al.*, 1990; Walters *et al.*, 1992; Murry *et al.*, 1993).

Otros factores tales como las condiciones de cultivo, el estado fisiológico y la edad del explante pueden afectar también la eficiencia de transformación. La osmolaridad del medio de cultivo juega un papel importante en la transformación mediada por el bombardeo de partículas. Perl *et al.*, 1992, citado por Southgate *et al.*, 1995 reportaron el mantenimiento de callos de trigo en 0.25 M de manitol antes y después del bombardeo, lo que dio como resultado un incremento de tres a cuatro veces de la expresión transitoria de *gus*.

2.1.4 Incorporación del DNA al genoma hospedero.

La expresión génica del DNA introducido se encuentra relacionada con la localización final de las partículas dentro de la célula. Estudios realizados por Yamashita *et al.*, 1991, citado por Southgate *et al.*, 1995, encontraron que después del bombardeo, la mayoría de las células de tabaco (>90%) que expresaban el gen *gus* introducido contenían una partícula en su núcleo.

La expresión génica depende, entre otros factores, de la incorporación del DNA introducido al genoma de la célula huésped. En la transformación por medio del bombardeo de partículas los niveles de expresión transitoria sobrepasan casi siempre a los de la expresión estable. Esto puede deberse entre otras razones a que la incorporación del DNA transferido lleva inicialmente a la expresión de la proteína en las células bombardeadas pero conforme se lleva a cabo la división celular, se observa una declinación en la expresión génica debido a pérdidas del gen introducido durante la duplicación

del DNA genómico. Los mecanismos naturales de reparación del DNA aseguran también que el DNA introducido no se replique (Southgate *et al.*, 1995).

Otro factor importante en la reducción de los niveles de la expresión del gen introducido, se refiere a la metilación de residuos de citosina ya que esto reduce su actividad transcripcional (Hepburn *et al.*, 1987, citado por Southgate *et al.*, 1995). Este factor es importante en el control de la expresión tejido-específica y puede verse amplificado bajo las condiciones de cultivo (Dynan, 1989; Kaepler & Phillips, 1993, citados por Southgate *et al.*, 1995).

Klein *et al.*, 1990, citado por Southgate *et al.*, 1995, sugirieron que las variaciones observadas en la expresión de *gus* en células en suspensión de maíz se debían a la metilación del DNA introducido. Puede suceder también que el DNA introducido se inserte en sitios metilados y por tanto ser susceptible de metilarse o que la expresión génica pueda ser silenciada por la metilación del DNA en la región promotora (Bussingler *et al.*, 1983, citados por Southgate *et al.*, 1995).

3.0 Bombardeo de partículas en maíz.

El gran desarrollo de la ingeniería genética vegetal, y en especial el del bombardeo de partículas, ha influido de manera considerable sobre la transformación de monocotiledóneas ya que ha permitido la transformación de varios tipos celulares, y ha disminuido de manera notable la dependencia que otros sistemas de transformación tenían de las largas y complejas técnicas del cultivo de tejidos. Actualmente las técnicas de cultivo *in vitro* requeridas para la transformación de monocotiledóneas son fáciles de implementar y no se

requiere del establecimiento de cultivos de células en suspensión o la obtención de protoplastos (Vain et al., 1995).

Una vez que se hubo demostrado que la aceleración de partículas cubiertas con DNA podía ser usada para transferir material genético foráneo a células y tejidos intactos, los esfuerzos se abocaron sobre el conocimiento de los factores que afectan la introducción del DNA por medio del bombardeo de partículas.

Klein *et al.*, 1988 bombardearon cultivos de células en suspensión de maíz con el gen *gus* y observaron que el número de células que expresaban la β -*gus* era 30 veces mayor cuando se bombardeaban las células sobre un soporte de papel filtro, que cuando sólo eran bombardeadas con una delgada cubierta de medio líquido. Determinaron también que la eficiencia de introducción del DNA estaba afectada por la talla, el número y la velocidad de los microproyectiles usados para el bombardeo, así como por la concentración de CaCl_2 y espermidina utilizados para adsorber el DNA a los microproyectiles.

Gordon-Kamm *et al.*, 1990 y Fromm *et al.*, 1990 fueron de los primeros en lograr la regeneración de plantas transgénicas de maíz al bombardear cultivos embriogénicos de células en suspensión.

Walters *et al.*, 1992 transformaron callos embriogénicos de maíz por medio del bombardeo de partículas con el gen de la higromicina fosfotransferasa, los callos transformados fueron seleccionados con higromicina y se obtuvieron tres líneas transformadas que presentaban una o más copias del gen introducido. La transmisión del gen fue demostrada en dos generaciones de plantas transgénicas fértiles, segregándose de manera dominante como un solo *locus*. Asimismo Spencer *et al.*, 1992 demostraron la herencia tipo mendeliana que sufrió el gen *bar* al ser introducido en cultivos embriogénicos de células en

suspensión de maíz por medio del bombardeo de partículas. Se observó que el gen se segregaba como una sola unidad en cuatro líneas transgénicas, pero era inestable y presentaba una transmisión pobre en otra de las líneas obtenidas.

Vain *et al.*, 1993 obtuvieron un incremento en la expresión transitoria y mayor recuperación de líneas transformadas de manera estable al tratar cultivos embriogénicos de células en suspensión de maíz con 0.2 M de manitol combinado con 0.2 M de sorbitol cuatro horas previas y 16 horas después del bombardeo.

Murry *et al.*, 1993 desarrollaron plantas transgénicas de maíz que presentaban resistencia a infecciones mezcladas de los virus del enanismo y del moteado clorótico del maíz, por medio del bombardeo de partículas o la electroporación de cultivos de células en suspensión con el gen que codifica para la proteína que forma la cápside de estos virus.

Koziel *et al.*, 1993 fueron los primeros en bombardear embriones inmaduros de maíz con un gen sintético que codificaba para una versión truncada de la proteína CryIA(b) derivada de *Bacillus thuringiensis*. Las plantas transgénicas resultantes se cruzaron con líneas comerciales mejoradas y dio como resultado la obtención de plantas resistentes al barrenador europeo del maíz.

Register III *et al.*, 1994 observaron que la expresión de los genes introducidos por medio del bombardeo de partículas puede ser de manera típica (como la observada por Walters, 1992 y Spencer, 1992) pero no siempre predecible ya que se presenta una baja transmisión y silenciación de los transgenes, fenómenos que pueden deberse en parte a la naturaleza del genoma del maíz.

Wan *et al.*, 1995 propusieron la utilización de callos tipo I como tejido blanco para el bombardeo con microproyectiles ya que gran parte de las

variedades de maíz forman callos de este tipo. Asimismo, dado que la regeneración de plantas transgénicas es posible, este sistema pretende hacer la transformación de maíz menos genotipo-dependiente sin limitarla sólo a las variedades que producen callos tipo II. Con el mismo objetivo Lowe *et al.*, 1995 bombardearon embriones cigóticos inmaduros de maíz, de los que regeneraron plantas quiméricas a las cuales les fue extirpado el meristemo apical para ser subcultivado en un medio con citocinina y un antibiótico. De esta forma se incrementaron y seleccionaron los sectores transgénicos para aumentar la posibilidad de recuperar plantas totalmente transformadas que provenían de esas líneas germinales.

Kausch *et al.*, 1995 investigaron los efectos del bombardeo sobre cultivos embriogénicos de células en suspensión de maíz, concluyendo que aunque si bien la recuperación de plantas transgénicas después del bombardeo ocurre con baja frecuencia, los requisitos mínimos para la transferencia exitosa del DNA han sido ya cubiertos y que la optimización de la transformación puede depender de factores adicionales como el estrés causado por el bombardeo o las condiciones de cultivo.

Zhong *et al.*, 1996 demostraron la competencia para la transformación de las células de ápices de maíz cultivados *in vitro*. Generaron plantas transgénicas al bombardear los ápices con dos plásmidos que contenían el gen *bar* y el *pinII* ligados o únicamente con el gen reportero de *gus*. Los ápices transformados fueron seleccionados y multiplicados adicionando de 3-5 mg.l⁻¹ de glufosinato de amonio.

Kemper *et al.*, 1996 llevaron a cabo estudios para optimizar la transformación de células competentes para la formación de embriones somáticos en callos de maíz inducidos del escutelo de embriones inmaduros. De

acuerdo con el análisis de expresión transitoria, concluyeron que el uso de partículas de 1.6 μm de diámetro, una presión de gas helio de 1800 psi y una distancia de 4.2 cm del blanco produjeron las mayores tasas de transformación de la tercera capa celular o aún otras más profundas. Estas condiciones provocan un daño excesivo el cual puede ser minimizado al tratar los embriones antes y después del bombardeo con 0.8 M de manitol.

III. HIPÓTESIS

Si las plantas completas regeneradas de los cultivos de callos embriogénicos friables, proceden de una sola célula, entonces, al transformar estos cultivos de callos embriogénicos por medio del bombardeo de partículas cubiertas con DNA, existen grandes probabilidades de recuperar plantas totalmente transformadas.

1.0 OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones óptimas para la introducción del gen reportero de la β -*gus* en células embriogénicas de maíz por medio del bombardeo de partículas.

1.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer cultivos de callos embriogénicos utilizando como explante embriones cigóticos inmaduros de maíz (15-18 días después de la polinización).
2. Caracterizar la cinética de crecimiento de los cultivos de callos para seleccionar los medios de cultivo que proporcionen una mayor proliferación celular y poder determinar el momento adecuado después del subcultivo para llevar a cabo el bombardeo.

3. Realizar la curva de tolerancia de los cultivos de callos a la kanamicina para determinar la concentración óptima que permita seleccionar después del bombardeo las células transformadas.
4. Determinar la distancia óptima del bombardeo de callos embriogénicos friables de maíz para lograr una máxima incorporación del DNA y un mínimo daño celular.
5. Determinar la expresión transitoria de *gus* mediante el ensayo histoquímico en los callos embriogénicos de maíz bombardeados.
6. Determinar histoquímicamente la expresión estable de *gus* en las plantas o cualquier estructura regenerada a partir de los callos bombardeados sometidos y no sometidos al agente selectivo de la kanamicina.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1.0 Establecimiento y mantenimiento del cultivo de callos embriogénicos.

Los cultivos de callos embriogénicos fueron establecidos a partir de embriones cigóticos inmaduros de maíz (*Zea mays* raza tuxpeño), cosechados 15-18 días después de la polinización y proporcionados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), Campo Experimental "Zacatepec".

1.1 Método de esterilización:

Los embriones se esterilizaron de la siguiente manera:

1. Se desgrana la mazorca obteniendo cada grano en forma individualizada y sin daño alguno.
2. Se colocan los granos en alcohol al 70% (v/v) durante un minuto.
3. Se enjuagan tres veces con agua desionizada estéril, durante dos minutos por cada enjuague.
4. Enseguida se colocan los granos en una solución de hipoclorito de sodio comercial (ingrediente activo al 6%) al 50% (v/v) más Tween 20 y Microdín® (5 y 15 gotas por cada 250 ml, respectivamente) durante 15 minutos con agitación constante
5. Finalmente se realizan cuatro enjuagues de cuatro minutos cada uno con agua desionizada estéril.

1.2 Establecimiento del cultivo de callos.

Una vez esterilizados los granos de maíz, se extrajeron los embriones inmaduros, los cuales se inocularon en frascos de vidrio con 20 ml de medio nutritivo N6 modificado. Los explantes fueron colocados con el eje

embrionario en contacto con el medio y se mantuvieron durante 21 días en condiciones de oscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Los medios de cultivo probados consistieron de las sales inorgánicas del medio N6 (anexo 1), suplementados con 30 g.l^{-1} de sacarosa como fuente de carbono, hidrolizado de caseína y L-Prolina. Como reguladores de crecimiento se utilizaron tres auxinas: Dicamba, MCPP y 2,4 D, en la etapa de proliferación se añadió la cinetina. De los componentes orgánicos también se probaron las vitaminas del medio MS, así como una mezcla de aminoácidos y vitaminas a la que denominamos cocktail 20. El pH fue ajustado antes de la esterilización con NaOH 1 N a 5.8 en el medio N6⁰ y 5.7 en los otros tres medios. Como agente gelificante se utilizó Phytigel 2.7 g.l^{-1} . Finalmente los medios se esterilizaron en autoclave vertical a una presión de 1.3 Kg.cm^{-2} ó 18 lb.pulg^{-2} durante 18 minutos. Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo utilizados en la inducción de callos embriogénicos de maíz.

N6 ⁰	N6 ¹	N6 ²	N6 ³
Sales inorgánicas N6	Sales inorgánicas N6	Sales inorgánicas N6	Sales inorgánicas N6
Vitaminas MS*	Cocktel 20**	Cocktel 20**	Cocktel 20**
	Caseína hidrolizada 200 mg.l^{-1}	Caseína hidrolizada 200 mg.l^{-1}	Caseína hidrolizada 200 mg.l^{-1}
L-Prolina 2.30 g.l^{-1}	L-Prolina 2.30 g.l^{-1}	L-Prolina 2.76 g.l^{-1}	L-Prolina 2.76 g.l^{-1}
Glicina 1.0 mg.l^{-1}	Adenina sulfatada 10.0 mg.l^{-1}	Adenina sulfatada 10.0 mg.l^{-1}	Adenina sulfatada 10.0 mg.l^{-1}
Dicamba 4.0 mg.l^{-1}	MCPP 2.0 mg.l^{-1}	Dicamba 2.0 mg.l^{-1}	2,4-D 2.0 mg.l^{-1}

*Vitaminas MS: Myo-inositol 100 mg.l^{-1} , ácido nicotínico 1 mg.l^{-1} , tiamina 2.0 mg.l^{-1} , piridoxina 1 mg.l^{-1} .

**Mezcla de aminoácidos y vitaminas (ver anexo 1).

1.3 Proliferación de callos.

En la etapa de proliferación se agregó la cinetina, 0.5 mg.l^{-1} en el N6^0 y 1.0 mg.l^{-1} en los otros tres medios, las auxinas se redujeron a la mitad de la concentración que tenían en el medio de inducción, los otros componentes no sufrieron cambios. Los subcultivos fueron hechos cada 21 días.

Después del primer subcultivo, se inocularon 0.5 g de callo de cada uno de los medios (dos repeticiones por medio) para obtener el peso seco dos veces por semana durante 24 días. Las dos repeticiones de cada medio fueron tomadas y puestas a secar envueltas en papel aluminio en estufa de vacío a 37°C durante 48 horas, finalmente se sacaron y se pesaron en una balanza analítica. El peso fresco se obtuvo inoculando 0.3 g de callo obtenido de cada uno de los medios probados (cinco repeticiones por medio) y se pesaron en condiciones de esterilidad dos veces por semana durante 24 días.

1.4 Mantenimiento y regeneración.

Los cultivos de callos fueron mantenidos reduciendo de manera gradual los niveles de caseína, L-prolina y los reguladores de crecimiento cuando se observaba la germinación de los embriones somáticos; esto es a partir del tercer o cuarto subcultivo.

La reducción de la caseína, L-prolina, cinetina y las auxinas se hizo en una primera ocasión al 50% de su concentración original en el medio de proliferación; observándose un decaimiento muy drástico en el crecimiento del callo, por lo que en posteriores ocasiones se redujo primero en un 25% de la concentración en el medio de proliferación y sucesivamente se redujeron en la

misma proporción subcultivo tras subcultivo hasta que fueron eliminadas completamente del medio.

Las plantas regeneradas de la manera anterior fueron resemebradas en medio MS suplementado con 30 g.l⁻¹ de sacarosa y mantenidas así hasta que alcanzaron una talla de aproximadamente 10 cm. Después fueron transferidas a una mezcla estéril de tierra con hojarasca (2:1) y mantenidas en condiciones de invernadero.

2.0 Curva de tolerancia de callos embriogénicos de maíz obtenidos del medio N6¹ a kanamicina.

Se inocularon 0.5 g de callo proveniente del medio N6¹ en tubos de ensaye de 50 ml que contenían 20 ml del mismo medio adicionado con kanamicina sulfatada, en concentraciones de 0, 5, 35, 65, 95, 125, 155, 185 y 215 mg.l⁻¹. De cada tratamiento se hicieron 10 repeticiones, de las cuales se tomó el peso fresco dos veces por semana durante 24 días para determinar la concentración en la cual el crecimiento era significativamente menor, y de esta manera seleccionar posteriormente las células transformadas.

3.0 Purificación del DNA plasmídico.

Es indispensable que el DNA utilizado para el bombardeo de partículas se encuentre lo más puro posible. El DNA plasmídico se purificó con el siguiente método (Brown, 1991).

1. Cultivar la cepa *Escherichia coli* DH5 α /PBI426 (Datla *et al.*, 1990) en 25 ml de medio LB con ampicilina (40-50 mg.l⁻¹) a 37°C durante toda la noche.

2. Centrifugar las células a 5 000 xg en rotor JA-20 por 10 minutos.
3. Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 5 ml de NaCl 10 mM, repetir la centrifugación.
4. Resuspender la pastilla en 0.6 ml de amortiguador de lisis (Tris HCl 25 mM [pH 8.0], EDTA 10 mM, sacarosa al 15% y Lisozima 2 mg.ml⁻¹), incubar 20 minutos en hielo.
5. Agregar 1.2 ml de solución conteniendo NaOH 0.2 M y SDS al 1%. Mezclar suavemente e incubar 10 minutos en hielo.
6. Agregar 0.75 ml de Acetato de Sodio 3 M, pH 5.2. Mezclar cuidadosamente e incubar 20 minutos en hielo. Centrifugar 15 minutos a 6500 xg en el rotor JA-20.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo. Agregar 5 µl de RNAsa [10 mg.ml⁻¹] e incubar 30 minutos a 37°C.
8. *Extraer dos veces con un volumen igual de fenol-cloroformo.*
9. Precipitar con dos volúmenes de etanol absoluto por 5 minutos a temperatura ambiente.
10. Centrifugar 10 minutos a 8 000 xg.
11. Lavar la pastilla con etanol al 70%, resuspender en 168 µl de agua estéril y transferir a un tubo eppendorf. Adicionar 32 µl de NaCl 5 M. Mezclar perfectamente y agregar 200 µl de Polietilenglicol 8000 al 13%.
12. Mezclar perfectamente e incubar en hielo por una hora
13. Centrifugar en frío durante 10 minutos a 12 000 xg.
14. Descartar el sobrenadante y centrifugar nuevamente tratando de eliminar la mayor cantidad posible de polietilenglicol.
15. Lavar la pastilla con etanol al 70%, centrifugar 5 minutos y secar en vacío 1-2 minutos.

16. Resuspender la pastilla en 50 μl de solución amortiguadora TE [pH 8.0] o bien agua estéril y cuantificar su concentración leyendo 1 μl a 260nm.
17. Hacer una electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar el estado del DNA purificado, así como su concentración.
18. Para verificar la presencia del inserto se deja cortando durante toda la noche 1 μg de DNA plasmídico con las enzimas de restricción Eco RI y Hind III y posteriormente se corre una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

4.0. Cuantificación del DNA.

Existen dos tipos de métodos comúnmente utilizados para medir la cantidad de ácidos nucleicos en una preparación. Cuando la muestra es lo suficientemente pura, es decir sin cantidades significativas de contaminantes como proteínas, fenol, agarosa u otro ácido nucleico, la medición espectrofotométrica de la cantidad de radiación ultravioleta absorbida por las bases es lo más adecuado. Las lecturas deben hacerse a una longitud de onda de 260 y 280 nm. La lectura a 260 nm permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico en la muestra. Una D O de 1.0 corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para DNA de doble cadena. Preparaciones puras de DNA poseen valores de 1.8 a 2.0 del coeficiente $D_{O_{260}}/D_{O_{280}}$. Si existe contaminación por otras sustancias que pueden absorber radiación ultravioleta como proteínas o fenol, la relación puede bajar significativamente y su adecuada cuantificación no es posible.

Si la cantidad de DNA en la muestra es muy pequeña o contiene cantidades significativas de impurezas, la cantidad de ácido nucléico puede ser estimada por la intensidad de fluorescencia emitida con bromuro de etidio, éste se

intercala en las moléculas de DNA, por lo que la cantidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de DNA y de esta manera puede ser visualmente estimada (Sambrook, 1989).

5.0 Preparación de las partículas de tungsteno.

1. Pesar 60 mg de partículas de tungsteno de 0.4 μm de diámetro (M5) y colocarlas en un tubo de centrifuga de 15 ml.
2. Agregar 2 ml de HNO_3 0.1 M y sonicar en hielo 20 minutos.
3. Eliminar el HNO_3 , agregar 1 ml de agua desionizada estéril, transferir la muestra a un tubo de 2 ml y sonicar brevemente.
4. Centrifugar las micropartículas de 10-30 segundos a 10 000 rpm.
5. Eliminar el agua, agregar 1ml de etanol absoluto (100%) y sonicar brevemente.
6. Centrifugar las micropartículas 10-30 segundos a 10 000 rpm.
7. Eliminar el etanol, agregar 1 ml de agua desionizada estéril y sonicar brevemente.
8. Colocar 200 μl de la suspensión en tubos eppendorf.
9. Agregar 750 μl de agua desionizada estéril a cada tubo.
10. Almacenar los tubos a -20°C .

6.0. Precipitación del DNA (Klein et al., 1988).

1. En un tubo eppendorff se colocan 50 μl de la suspensión de micropartículas de tungsteno, agregar los siguientes reactivos uno a uno y agitar bien la suspensión entre adiciones.

2. 5 μl de DNA [$1\mu\text{g},\mu\text{l}^{-1}$]. Procurando que el DNA no se mezcle con las partículas hasta el siguiente paso.
3. 50 μl de Cloruro de Calcio 2.5 M.
4. 20 μl de Espermidina 0.1 M.
5. Agitar la mezcla durante 5 minutos.
6. Centrifugar durante 5-10 segundos.
7. Eliminar 100 μl del sobrenadante.
8. Resuspender las partículas en el líquido remanente.
9. Aplicar 2.5 μl de las micropartículas cubiertas con el DNA en el centro del filtro del bombardeador.

7.0 Bombardeo con microproyectiles de tungsteno con pistola de baja presión (Bond et al., 1992).

La transformación fue llevada a cabo con el DNA del plásmido pBI426 (Datla *et al.*, 1990) el cual fue proporcionado por la Dra. Georgina Hernández Delgado del Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales y Transformación Genética del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM. Este plásmido contiene el gen del marcador selectivo de la kanamicina (*nptII*) y el gen reportero de *gus* (*uid A*) ambos bajo control del promotor 35S del CaMV. (Figura No. 1).

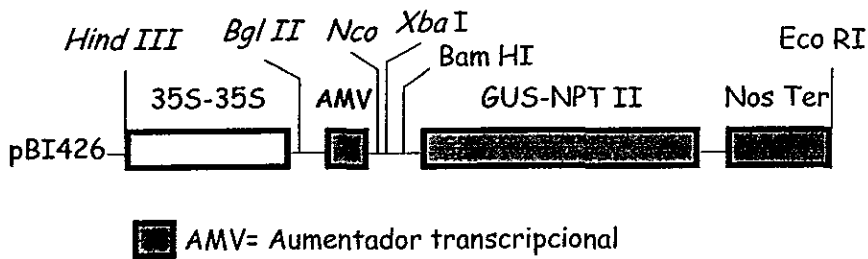


Figura No. 1. Construcción del plásmido pBI426 utilizado en la transformación de células de maíz.

Se tomaron 2.5 μ l de la solución de partículas cubiertas con el DNA plasmídico y se colocaron en el centro del filtro del bombardeador; la transformación se llevó a cabo con una presión de helio de 120 psi a una distancia de 8.0, 10.5 y 15.5 cm entre el filtro y el tejido blanco, en un vacío de 20-22 in Hg. Una vez elegida la distancia óptima, los bombardeos posteriores se realizaron a 13 cm de distancia en las mismas condiciones.

Se probaron callos embriogénicos obtenidos de los medios N6¹ y N6³ de 10 a 14 días después del subcultivo, los cuales fueron colocados una noche anterior al bombardeo en cajas de Petrie de 60X15 mm con 15 ml de medio de igual composición, pero gelificados con 3.0 g.l⁻¹ de Phytigel. Se colocó una porción extendida de callo embriogénico de 1 cm de diámetro (una capa delgada de aproximadamente 3 mm de espesor) en el centro de la caja. Una vez bombardeados los callos, se sellaron las cajas y se mantuvieron en incubación a 25 \pm 2°C con fotoperíodo de 16 hr luz/8 hr oscuridad.

Dos días después del bombardeo se eligieron al azar unos cuantos callos para medir la expresión transitoria de *gus* y los demás fueron colocados en el medio de proliferación del cual provenían y en medio de cultivo adicionado con kanamicina, para la selección de las células transformadas hasta por seis

semanas.

8.0 Determinación de la actividad de β -gluc por el método histoquímico (Jefferson, 1987).

La prueba de expresión transitoria se realizó de la siguiente manera:

1. Se colocan los callos bombardeados en la solución de X-gluc* y se incuban a 37°C por un período de 12 a 16 horas.
2. Se desecha esta solución y se lavan los callos dos veces con buffer "Z" pH 7.4.
3. Después se lavan con etanol al 70% cuatro veces.
4. La clorofila se elimina con una mezcla de acetona-metanol (1:3), lavando con esta solución los tejidos el tiempo necesario, haciendo varios cambios de la mezcla.
5. Después observar el color azul producto de la reacción, el tejido se lava cuatro veces con buffer "Z".
6. Finalmente para conservar los tejidos se cubren con glicerol al 50% y se almacenan a 4°C.

*Ver anexo 2.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.0 Establecimiento y caracterización de la cinética de crecimiento de los cultivos de callos embriogénicos de maíz.

Con la finalidad de encontrar un medio que favoreciera la formación de embriones somáticos y proporcionara una buena proliferación celular se probaron cuatro composiciones de los medios de cultivo, éstos consistieron de las sales inorgánicas del N6 adicionadas con 30 g.l⁻¹ de sacarosa como fuente de carbono, hidrolizado de caseína y L-prolina. Como reguladores de crecimiento se utilizaron Cinetina y una de las siguientes auxinas: Dicamba, MCPP y 2,4-D. De los componentes orgánicos también se probaron las vitaminas del MS, así como una mezcla de aminoácidos y vitaminas denominada cocktail 20.

Todos los medios de cultivo probados indujeron la misma respuesta, esto es que los cultivos de callos obtenidos a partir de los embriones cigóticos inmaduros de maíz y resembrados en cada uno de los medios ensayados, fueron embriogénicos. Estos callos tuvieron una consistencia friable, textura granular, de color blanquecino a amarillento y principalmente presentaron una alta tasa de crecimiento (Figura 2a); esta descripción corresponde con las observaciones previas hechas por varios autores (Green & Rhodes, 1982; Morrish, 1987; Vasil, 1988) en los cultivos de callos embriogénicos de maíz clasificados como tipo II.

En maíz se han descrito dos tipos diferentes de callos embriogénicos, los cuales difieren uno del otro en su morfología y las condiciones requeridas para su mantenimiento. Los callos embriogénicos tipo I son compactos, nodulares y

organizados; este tipo de callos han sido observados en una amplia variedad de híbridos y líneas mejoradas de maíz (Lu *et al.*, 1982; Tomes & Smith, 1985) y son similares a los callos embriogénicos descritos en otras gramíneas (Vasil, 1985 citado por Morrish, 1987). Mientras que los callos tipo I de otras especies pueden ser mantenidos durante largos períodos (Chandler & Vasil, 1984 citados por Morrish, 1987), en maíz este tipo de callos son difíciles de mantener más allá de unos cuantos subcultivos (Lu *et al.*, 1982). En contraste, los callos tipo II son suaves, friables, crecen rápidamente y pueden mantener su capacidad embriogénica durante largos períodos (Green, 1982; Tomes & Smith, 1985; Vasil & Vasil, 1986 citados por Morrish, 1987). Los callos tipo II consisten de agregados de células indiferenciadas algunas veces entremezcladas con células vasculares y grupos de pequeñas células meristemáticas isodiamétricas en la superficie de los agregados (Emons & Kieft, 1991). Las células embriogénicas son pequeñas, se encuentran densamente empacadas, son de paredes delgadas, citoplasma abundante y basofílico que contiene muchas vacuolas pequeñas, gotas de lípidos y granos de almidón (Fransz & Schel, 1991b; 1994). Esos grupos de células son comparables a las masas proembriogénicas de la embriogénesis somática de zanahoria y al estado globular de la embriogénesis cigótica (Emons & Kieft, 1995).

En lo referente a la cinética de crecimiento evaluada a través del peso seco, todos los medios fueron significativamente diferentes ($P=0.05$, anova de una vía), el máximo incremento fue de 202% en el medio N6³, seguido del N6¹ con 198%, el N6² con 122% y por último el N6⁰ con 112%. Cabe aclarar que el peso seco inicial fue el registrado a los tres días después del subcultivo y dichos incrementos representan la ganancia de peso seco a los 24 días posteriores al subcultivo (Gráfica no. 1). Con respecto al peso fresco, todos

los tratamientos resultaron significativamente diferentes ($P=0.05$; anova de una vía), el mayor aumento correspondió al medio $N6^1$ con 361%, en segundo lugar se ubicó el $N6^3$ con 243% seguido del $N6^2$ con 211% y finalmente el $N6^0$ con 200%. Tales incrementos se dieron en relación al peso fresco que presentaban los callos el día de la inoculación y representan también la ganancia a los 24 días después del subcultivo (Gráfica no. 2).

Con base en los resultados obtenidos de las curvas de peso seco y peso fresco, se determinó que los mejores callos a bombardear con microproyectiles cubiertos con DNA fueron los obtenidos de los medios de cultivo denominados como $N6^1$ (2.0 mg.l^{-1} de MCPP) y $N6^3$ (2.0 mg.l^{-1} de 2,4-D) ya que tuvieron las mayores tasas de crecimiento (Figura 2b).

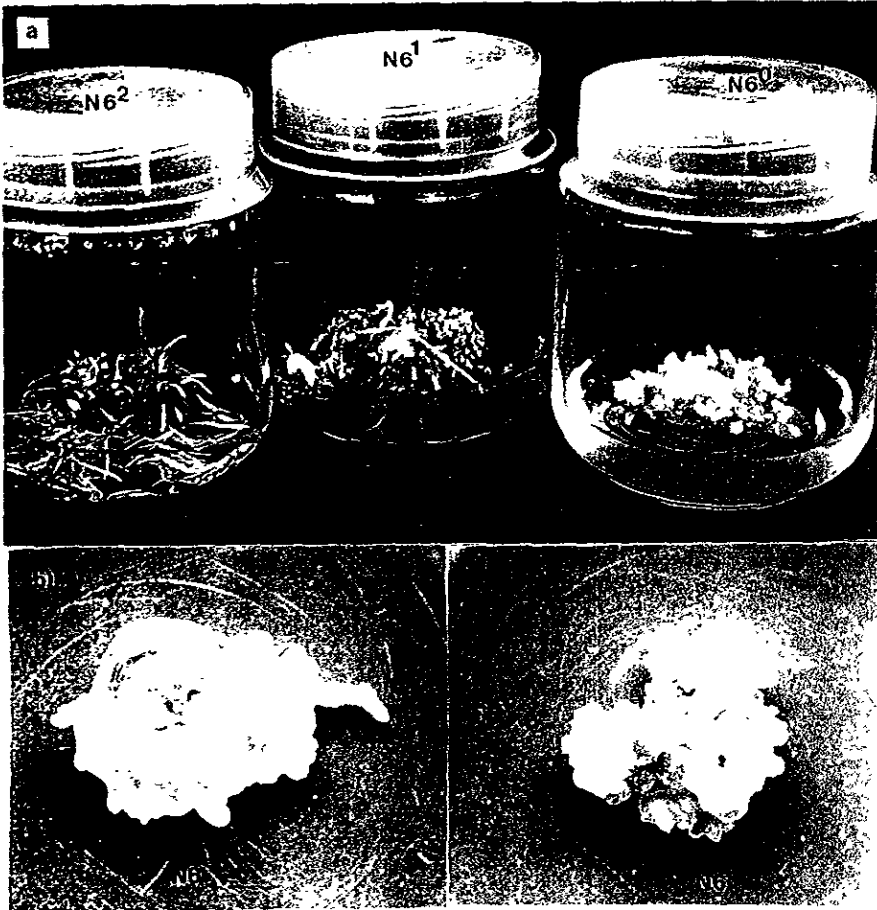
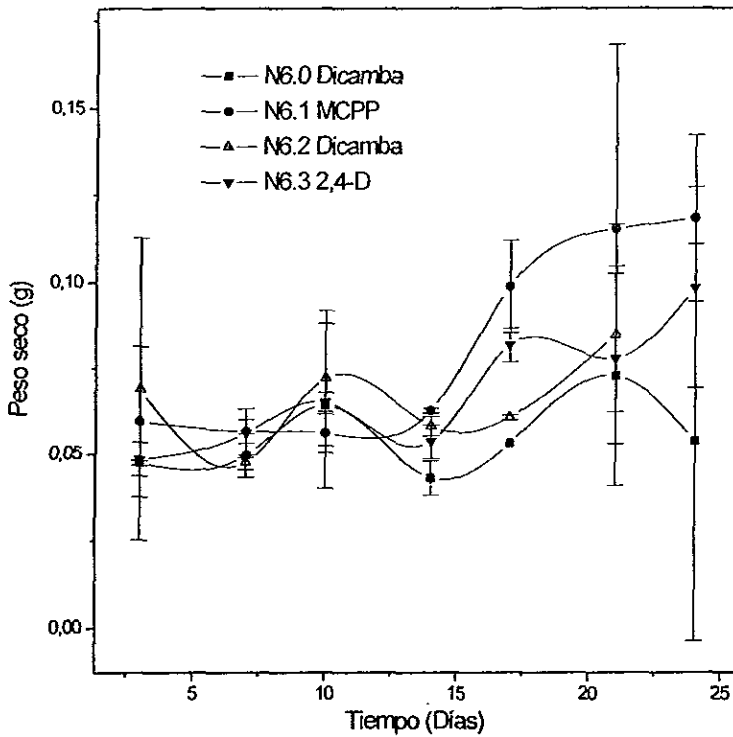
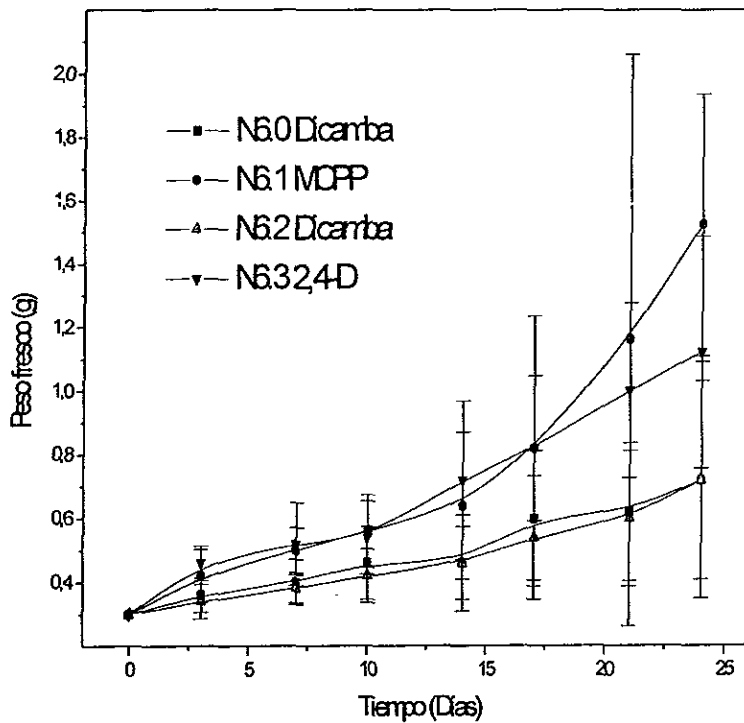


Figura 2. a) Cultivos de callos embriogénicos de maíz obtenidos de la inducción de embriones cigóticos inmaduros y resebrados en los medios de cultivo $N6^0$, $N6^1$ y $N6^2$; b) Callos embriogénicos de maíz de los medios $N6^1$ y $N6^3$ utilizados para la transformación por medio del bombardeo con microproyectiles cubiertos con el DNA del plásmido pBI426.



Gráfica 1. Cinética de crecimiento con base en el peso seco de los cultivos de callos embriogénicos de maíz en relación con la composición del medio de cultivo N6.



Gráfica 2. Cinética de crecimiento con base en el peso fresco de los cultivos de callos embriogénicos de maíz en relación con la composición del medio de cultivo N6.

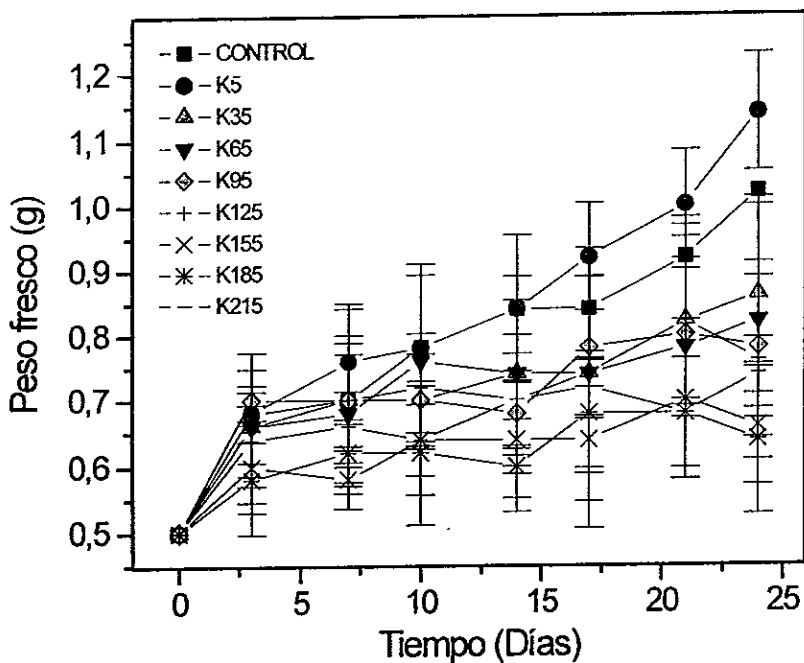
2.0 Curva de tolerancia de callos embriogénicos del medio N6¹ a la kanamicina.

El plásmido pBI426 además de codificar para la β -*gus* que permite observar la expresión del gen *gus*, lleva incorporada la secuencia del gen de la neomicina fosfotransferasa II. Esta enzima confiere resistencia vía la detoxificación del antibiótico kanamicina. De esta forma, al integrarse esta secuencia al recipiente genómico de las células vegetales bombardeadas, la resistencia a kanamicina se convierte en un agente que permite seleccionar metabólicamente las células transformadas de las que no lo han sido.

Se analizó la tolerancia a kanamicina haciendo las curvas correspondientes con callos embriogénicos obtenidos del medio N6¹ (2.0 mg.l⁻¹ de MCPP), adicionando al medio de proliferación concentraciones crecientes de kanamicina sulfatada que iban desde 0 hasta 215 mg.l⁻¹ (Gráfica no. 3).

Es importante aclarar que se eligieron los cultivos de callos del medio N6¹ para realizar la curva de tolerancia a kanamicina, porque estos presentaron la mayor tasa de crecimiento en la cinética de peso fresco y además se disponía de la cantidad suficiente para realizar la prueba.

Como se observa en la gráfica número tres, el crecimiento de los callos se ve reducido de manera significativa ($P=0.05$; anova de una vía) desde los 35 hasta los 215 mg.l⁻¹ de kanamicina sulfatada, también se puede notar que existe una gran tolerancia intrínseca de los callos de maíz al agente selectivo, ya que aún a altas concentraciones estos pueden seguir creciendo. Debido a estas razones se decidió que para no provocar demasiado daño a las células, la selección de las células bombardeadas se llevaría a cabo añadiendo al medio de proliferación 155 mg.l⁻¹ de kanamicina.



Gráfica 3. Cinética de crecimiento de callos embriogénicos de maíz obtenidos del medio N6¹ adicionado con 0-215 mg.l⁻¹ de kanamicina. La denominación de cada medio indica la concentración de kanamicina añadida a cada tratamiento.

3.0 Purificación del DNA plasmídico.

El bombardeo de partículas con microproyectiles requiere que el DNA utilizado para la transformación de las células vegetales tenga un alto grado de pureza. En este trabajo la purificación del plásmido pBI426 (Datla *et al.*, 1990) se llevó a cabo por medio de una maxi-preparación (Brown, 1991), la cual permitió obtener un buen rendimiento y pureza.

Una vez purificado el DNA plasmídico fue resuspendido en agua desionizada estéril y posteriormente se leyó la absorbancia de una alícuota de esta solución a 260 y 280 nm, del coeficiente de D_{260}/D_{280} se obtuvo un índice de pureza de 1.72 que indicó que el DNA plasmídico recuperado por medio de la maxi-preparación tenía un grado de pureza aceptable; el valor máximo de este coeficiente es de 1.8 a 2.0. También se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para ver el estado del DNA y un análisis con las endonucleasas de restricción Eco RI y Hind III para verificar la presencia del inserto en la solución del DNA purificado. Finalmente esta solución fue llevada a una concentración de 1 μg de DNA por μl de agua desionizada estéril, sellada y almacenada a 4°C hasta el momento de ser utilizada.

En la figura 3 se observa en el primer carril, como marcador de peso molecular el DNA del fago λ digerido durante toda la noche a 37°C con la enzima Hind III, las tres bandas menores corresponden a tamaños moleculares de 4.3, 2.2 y 2.0 Kb respectivamente, en el segundo carril se puso la solución del DNA plasmídico purificado sin haber sido digerido, el tercer carril corresponde a la misma solución, la cual fue digerida durante toda la noche a 37°C con las endonucleasas de restricción Eco RI y Hind III; se pueden notar

dos bandas, la de mayor peso corresponde al inserto de aproximadamente 3.6 Kb y la menor es equivalente al peso del vector pUC 19.

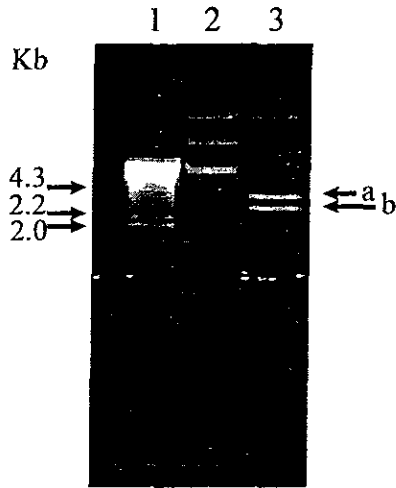


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% y análisis con las enzimas de restricción Eco RI y Hind III del DNA del plásmido pBI426 purificado y utilizado en el bombardeo de células embriogénicas de maíz; a) fusión *gus-nptII* de aproximadamente 3.6 Kb y b) vector pUC 19 de 2.68 Kb.

4.0 Bombardeo de los callos embriogénicos de maíz con pistola de baja presión.

Se bombardearon los callos embriogénicos de maíz obtenidos de la proliferación sobre los medios de cultivo N6¹ y N6³ con el objetivo de transformar las células embriogénicas presentes en este tipo de callos y de esta manera incrementar la probabilidad de recuperar plantas o cualquier otra estructura totalmente transformadas provenientes de la regeneración de estas células.

Del análisis de la cinética de crecimiento que presentaron estos callos se decidió que el mejor momento para bombardearlos era en el período comprendido entre los 10 y 14 días después del subcultivo, momento en el cual se observa el comienzo de la etapa logarítmica del crecimiento celular (gráfica 2) en esta etapa se puede presentar la síntesis de DNA y por lo tanto son mayores las probabilidades de que el DNA plasmídico se integre al DNA genómico de las células de maíz. Ya que, es de aceptación general, que la integración del DNA transformante a las células vegetales requiere de la replicación activa del DNA. Los mejores tejidos utilizados como blanco para el bombardeo cuentan con una población numerosa de células con división activa, los cultivos embriogénicos son buenos blancos para la transformación ya que tienen una alta tasa de división celular, gran capacidad regenerativa y crecen en pequeños paquetes, esto último incrementa la posibilidad de recuperación de transformantes por selección metabólica (Morris *et al.*, 1993).

Como meta para el establecimiento de condiciones que no provocaran demasiado daño en las células bombardeadas, se utilizaron para el bombardeo microproyectiles de tungsteno de 0.4 μm de diámetro (M5), ya que sólo se necesita penetrar las capas celulares superficiales de los cultivos de callos embriogénicos, sitio en el cual se encuentran las células meristemáticas o embriogénicas y por lo tanto no se requiere de la transformación de capas celulares profundas; además estas células presentan una talla pequeña con un promedio de 10-13 μm de diámetro (Kausch *et al.*, 1995). Otras observaciones hechas por este último autor resaltaron que los microproyectiles de tungsteno de 1 μm de diámetro no logran traspasar las capas superficiales de los paquetes celulares embriogénicos de los cultivos en suspensión de maíz; por otra parte se ha notado que, incrementando la penetración de las capas

celulares del tejido blanco, se incrementa la mortandad de las células superficiales penetradas (Christou *et al.*, 1991; Taylor & Vasil, 1991). Por consecuencia, la biología y el desarrollo posterior de las capas celulares superficiales pueden ser un factor importante para el éxito de la transformación; aunado a esto, el crecimiento de las células de maíz puede verse afectado por las células cercanas heridas y muertas, todo lo arriba mencionado limita la extensión de la penetración de las partículas.

4.1 Primer bombardeo.

Con el objetivo de determinar la distancia óptima para la transformación de los callos embriogénicos de maíz obtenidos de la proliferación en los medios N6¹ y N6³, se bombardearon los mismos a tres distancias: 8.0, 10.5 y 15.5 cm, con una presión de helio de 120 psi y un vacío de 20-22 in Hg, con microproyectiles de tungsteno de 0.4 μm de diámetro (M5), los cuales estaban cubiertos con el DNA del plásmido pBI426.

Se bombardearon 10 callos de cada uno de los medios a las distancias de 15.5 y 10.5 cm, en la distancia de 8.0 cm sólo se bombardeo un callo proveniente de cada medio de cultivo. En este primer ensayo se determino la actividad de β -*gus* 48 horas después del bombardeo, esto para comparar la eficiencia en la transferencia del DNA. Los resultados permitieron diferenciar entre los niveles de la expresión transitoria de *gus*, la procedencia de los cultivos de callos y la distancia a la que se realizó el bombardeo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Expresión transitoria de *gus* y frecuencias de transformación en los callos embriogénicos de maíz bombardeados a diferentes distancias.

Frecuencia-no. de callos positivos a la actividad de β -glucoronidasa			
no. de callos ensayados para expresión transitoria de <i>gus</i>			
Medio de Cultivo	Distancia (cm)		
	8.0	10.5	15.5
N6 ¹	1/1	0/2	0/2
	++	-	-
N6 ³	0/0	1/2	2/2
	*	+	+

•• Buena expresión, azul oscuro.

• Regular expresión, azul claro.

- Nula expresión, sin color.

* La prueba de expresión transitoria no se llevó a cabo porque se contaminó el único callo bombardeado.

Como se puede observar en el cuadro número dos, los callos embriogénicos provenientes del medio N6³ presentaron mayor proporción de transformantes en las distancias más lejanas al filtro del bombardeador (10.5 y 15.5 cm), aunque el nivel de expresión transitoria mostrado por estos mismos callos, es sólo regular (Figura 4a), mientras que el nivel de expresión del callo del medio N6¹ bombardeado a 8.0 cm de distancia fue bueno (Figura 4b), sin embargo en las otras distancias no se obtuvieron callos transformados de este mismo medio.

Es importante señalar que los callos utilizados para el bombardeo fueron obtenidos de la inducción y proliferación sobre dos medios que varían principalmente en la auxina utilizada; en el medio N6¹ se añadieron 2.0 mg.l⁻¹ de MCPP para la inducción, mientras que para el medio N6³ se agregaron 2.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D, este último, una de las auxinas sintéticas más fuertes que se conocen. Como es sabido las auxinas y otros reguladores del crecimiento relacionados, promueven el alargamiento de los órganos vegetales,

incrementando la habilidad de las paredes celulares para disminuir la tensión longitudinal a través de la relajación de las mismas (Hohl & Schopfer, 1992).

El añadir MCPP o 2,4-D al medio de cultivo, podría provocar diferentes estados de relajación de las paredes celulares en las células embriogénicas de los cultivos de callos del medio N6¹ y los del N6³. Asimismo, esta diferencia puede verse reflejada en la eficiencia de transferencia del DNA plasmídico a las células embriogénicas de maíz, la cual, fue de cero en los callos del medio N6¹ bombardeados a 15.5 y 10.5 cm, mientras que en los callos del medio N6³ bombardeados a las mismas distancias la eficiencia es del 75%.

Otro fenómeno que podría afectar la eficiencia de la transferencia del DNA entre los dos cultivos, puede deberse en parte a que aún cuando se toman los callos provenientes de los dos medios para bombardearlos entre los diez y catorce días después del subcultivo (momento en el cual comienza la etapa de crecimiento logarítmico), los callos del medio N6³ presentan una tasa de división celular más alta que los del medio N6¹, en ese mismo período, estos últimos alcanzan un período de crecimiento más rápido a partir de los 14 días después del subcultivo. Esto puede explicarse debido al efecto del 2,4-D, el cual provoca que los callos del medio N6³ alcancen en tiempos más cortos una tasa de división celular mayor. De esta manera a pesar de que los dos cultivos de callos comienzan la etapa del crecimiento logarítmico al mismo tiempo, se observa que los callos del medio N6³ pueden ser bombardeados de diez a catorce días después del subcultivo y los callos del medio N6¹ probablemente deberían haber sido bombardeados entre los 14 y 21 días después del subcultivo para aumentar la eficiencia en la transferencia del DNA plasmídico.

Por otra parte, la recuperación de plantas transformadas depende de varios factores relacionados con el tejido blanco. Los más críticos son la división de

las células transformadas, el crecimiento sobre medio selectivo y el mantenimiento de la capacidad regenerativa. Puesto que la viabilidad celular es esencial para la recuperación de las células transformadas, es importante disminuir el impacto del bombardeo sobre ésta, tanto como sea posible.

Observaciones hechas por Koprek *et al.*, 1996 al transformar varios cultivares de cebada demostraron que, aunque si bien es aceptado que condiciones severas de transformación dan como resultado, altos niveles de expresión transitoria de *gus*, la capacidad regenerativa puede ser reducida de manera considerable. Por el contrario, condiciones menos severas, reducen el daño celular y no afectan significativamente la capacidad de regeneración, ni reducen considerablemente la expresión transitoria de *gus*. Además como ha sido sugerido por Russel-Kikkert, 1993 y Stiff *et al.*, 1995 (Citados por Koprek *et al.*, 1996), condiciones menos agresivas en el bombardeo pueden incrementar la frecuencia de transformación estable.

De esta manera, aunque la transformación de células de maíz se ha llevado a cabo generalmente con microproyectiles de tungsteno de 1.0 μm de diámetro; las frecuencias de transformación estable en las plantas regeneradas (R_0) pueden variar desde el 0 hasta el 100% (Fromm *et al.*, 1990; Gordon-Kamm *et al.*, 1990 y Spencer *et al.*, 1992); debido a estas razones se decidió utilizar partículas de tungsteno de 0.4 μm de diámetro, así como buscar la distancia óptima para el bombardeo de las células embriogénicas de maíz, entre las distancias más lejanas al filtro del bombardeador (entre 10.5 y 15.5 cm) para reducir el daño provocado a las células embriogénicas.



Figura 4. a) Nivel de expresión transitoria de *gus* calificado como regular en un callo del medio $N6^3$ bombardeado a 15.5 cm de distancia. b) Se observa el nivel de expresión transitoria de *gus* calificado como bueno en el callo del medio $N6^1$ bombardeado a 8.0 cm.

4.2 Segundo bombardeo.

Con base en los resultados del primer experimento se decidió bombardear nuevamente los callos embriogénicos de los medios N6¹ y N6³ en las mismas condiciones del primer bombardeo, pero en esta ocasión a una distancia de 13 cm para verificar las observaciones hechas en el primer ensayo y tratar de aumentar los niveles de expresión transitoria de *gus* mostrados por los callos del medio N6³ en las mayores distancias, esperando alcanzar el nivel de expresión transitoria mostrado por el callo del medio N6¹ bombardeado a 8.0 cm de distancia (como en la Figura 4b).

Se bombardearon 30 callos por cada uno de los medios en las condiciones ya mencionadas, 48 horas después se realizó la prueba de actividad de β -*gus*. De cinco callos del medio N6¹ que fueron probados, sólo dos tuvieron una expresión transitoria regular, mientras que de los cinco callos del medio N6³ ensayados, todos, presentaron una expresión transitoria de *gus* regular. En esta segunda sesión de bombardeo se observó nuevamente que los callos del medio N6³ presentaron mayor proporción de transformantes (5/5) que los del medio N6¹ (2/5) y de esta forma se confirmó la facilidad para la transformación que presentaron los callos del medio N6³ en el primer bombardeo.

Es importante aclarar que no se observó ningún incremento entre el nivel de expresión transitoria de *gus* mostrado por los callos del medio N6³ bombardeados a 10.5 y 15.5 cm de distancia en el primer experimento y los bombardeados a 13 cm del segundo ensayo, ya que se tuvieron dos problemas que pudieron provocar que esto no sucediera; 1)previo a este ensayo se purificó nuevamente DNA plasmídico, el cual, fue resuspendido en agua desionizada

estéril y cuantificado espectrofotométricamente sin hacer la electroforesis para verificar la concentración, la cual posiblemente era menor a 1 μg de DNA por μl de agua desionizada estéril; 2) durante el acoplamiento de las partículas de tungsteno con el DNA plasmídico, se preparo la cantidad requerida para bombardear los 60 callos, esto pudo haber provocado que desde que se comenzó el bombardeo de los callos hasta que se termino, el DNA sufriera una degradación al estar en contacto por bastante tiempo con el tungsteno. Estos dos factores pudieron haberse combinado y provocaron posiblemente que no se diera ningún incremento en el nivel de la expresión transitoria de *gus* que, como ya fue mencionado se esperaba alcanzar un buen nivel de expresión (como en la Figura 4b).

Los demás callos (25 por cada uno de los medios) fueron divididos en dos grupos; el primer grupo se mantuvo en el medio de proliferación del cual provenían, N6^1 (12 callos) y N6^3 (12 callos), durante nueve semanas; el segundo grupo se mantuvo durante seis semanas en el medio de proliferación del cual provenían, N6^1 y N6^3 , respectivamente (13 callos de cada uno), pero se le adicionaron 155 mg.l^{-1} de kanamicina sulfatada para permitir únicamente el crecimiento de las células transformadas.

La regeneración se realizó paralelamente en los dos grupos de callos reduciendo en cada subcultivo los niveles del hidrolizado de caseína, la L-prolina, la cinetina, el MCPP y el 2,4-D del N6^1 y N6^3 respectivamente. Estos componentes se disminuyeron en un 50% de la concentración original en el medio de proliferación, de manera que bastaban dos subcultivos (seis semanas) para ser eliminados por completo del medio. De estos callos se regeneraron una gran cantidad de raíces, tanto en los callos mantenidos en el medio de proliferación (medio normal) como los mantenidos en el medio de selección

(medio de proliferación con kanamicina); cabe señalar que estas raíces presentaron actividad de β -*gus* con un nivel de expresión regular, aún después de nueve semanas posteriores al bombardeo, tiempo en el cual se llevo a cabo la regeneración de estas estructuras.

Debe señalarse también, que los callos utilizados para esta segunda sesión de bombardeo contaban aproximadamente con una edad de 16 semanas posteriores al período de inducción y que la germinación de los embriones somáticos había sido ya observada entre las nueve y doce semanas después de la inducción; además la regeneración se llevo a cabo de la manera ya mencionada de acuerdo con la literatura (Emons y Kieft., 1995), pero la reducción drástica de los reguladores de crecimiento y los otros compuestos provocaron un notorio decaimiento en el crecimiento del callo y posiblemente un cambio en el patrón morfogénético. Cuando se disminuye la concentración de 2,4-D, se puede observar un tercer tipo de callo en monocotiledóneas, éste es el callo rizogénico el cual forma sólo raíces. La más importante diferencia entre los callos embriogénicos y los rizogénicos, es que los meristemas en los callos embriogénicos son formados exógenamente desde una capa celular de la protodermis en la superficie del tejido, mientras que en los callos rizogénicos los meristemas se forman endógenamente a partir de tejido parenquimatoso en el interior del mismo (Emons *et al.*, 1993).

Después de los dos primeros ensayos de bombardeo se determinó utilizar para experimentos posteriores callos embriogénicos obtenidos de la inducción y proliferación sobre el medio de cultivo N6³, también se eligió la distancia de 13 cm para bombardearlos, ya que a dicha distancia la eficiencia en la transferencia del DNA plasmídico es del 100% y las condiciones no son tan drásticas para la sobrevivencia de los callos bombardeados.

4.3 Tercer bombardeo.

En esta ocasión se bombardearon 50 callos provenientes de la proliferación sobre el medio N6³, los cuales contaban con tan sólo un subcultivo (tres semanas) después del período de inducción. La distancia entre el filtro del bombardeador y el tejido blanco fue de 13 cm, las demás condiciones fueron las ya mencionadas en el primero y segundo bombardeos.

De los 50 callos bombardeados se tomaron al azar seis de ellos 48 horas después del mismo para verificar la expresión transitoria de *gus*, se pudo observar que todos resultaron positivos presentando niveles de expresión que iban desde buenos hasta regulares (Figura 5).

Los 44 callos restantes se dividieron en dos grupos iguales; manteniendo la mitad de ellos en el medio N6³ de proliferación y los restantes fueron mantenidos durante tres semanas en el mismo medio de proliferación pero se le adicionaron 155 mg.l⁻¹ de kanamicina sulfatada para recuperar las células transformadas. La regeneración se realizó paralelamente en los dos grupos de callos, reduciendo un 25% de la concentración del hidrolizado de caseína, la L-prolina, la cinetina y el 2,4-D subcultivo tras subcultivo de manera que después de cuatro subcultivos (12 semanas) estos compuestos fueron eliminados por completo del medio de cultivo.

Durante los subcultivos de los dos grupos de callos se monitoreó la actividad de β -*gus* cuatro semanas después del bombardeo. Se encontró que los callos que se mantuvieron en el medio de proliferación presentaban un nivel de expresión de *gus* bueno, y aunque los callos a los que se mantuvo con el agente selectivo tuvieron el mismo nivel de expresión, más tarde se vieron afectados en su crecimiento, tornándose cafés debido a la oxidación. A pesar

de que estos callos no murieron, su crecimiento fue muy lento y asimismo, la regeneración ya no se llevó a cabo en forma adecuada, ya que sólo se pudo notar la incipiente presencia de brotes los cuales no se desarrollaron (Figuras 6 y 7).

Del primer grupo de callos (medio sin agente selectivo) se obtuvieron los mejores resultados, ya que se logró regenerar seis plantas completas. En estos mismos callos se obtuvo una gran formación de hojas en las que no se observó una raíz principal, dichas estructuras no fueron tomadas en cuenta, aunque sí se pudo notar que algunas presentaban actividad de β -*gus*, solo se seleccionaron aquellos brotes que presentaron una polaridad bien definida, es decir, tanto la parte aérea como la raíz desarrolladas en forma evidente. Asimismo, se hizo la prueba para determinar la actividad de β -*gus* en una de las plantas regeneradas, los resultados mostraron que dicha expresión no sigue un patrón de tipo mosaico, sino que es de forma regular en todos los tejidos de la planta y el nivel de expresión de *gus* mostrado fue bueno (Figura 8).

Los hechos anteriores confirmaron parcialmente que las plantas regeneradas a partir de los callos bombardeados fueron el resultado de la germinación de embriones somáticos. De las seis plantas regeneradas, las cinco restantes fueron transplantadas a suelo y mantenidas en condiciones de invernadero. De estas últimas sólo se logró la sobrevivencia de dos plantas, las cuales pudieron ser mantenidas durante cuatro semanas más sin poderse probar la expresión estable, pues a pesar de los cuidados prodigados las plantas finalmente murieron.

En esta ocasión el pase a suelo se hizo colocando las plantas regeneradas únicamente en tierra negra estéril, esto posiblemente provocó que con el riego,

la tierra se apretara y no permitiera el paso del aire, lo que aunado a la debilidad del sistema radicular pudo haber provocado la muerte de las plantas.

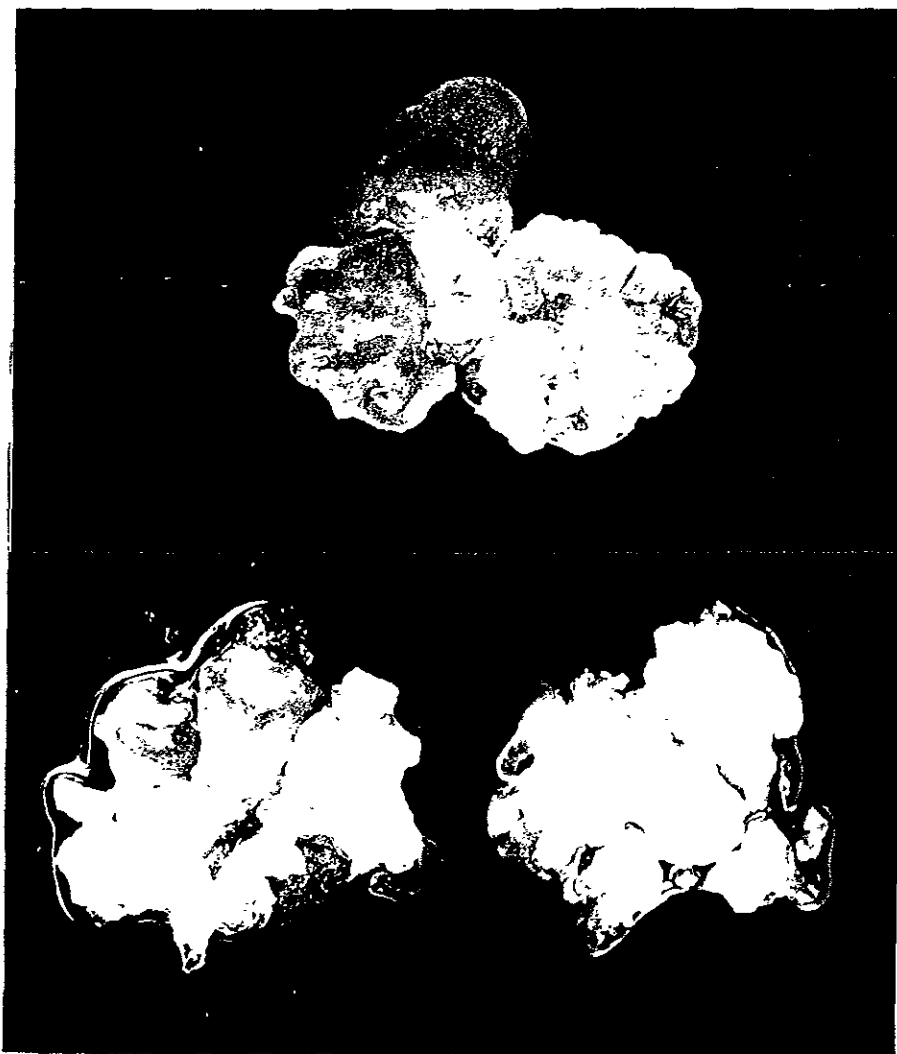


Figura 5. Resultados de la prueba de expresión transitoria de *gus* en los callos embriogénicos de maíz del medio N6³ bombardeados a 13 cm de distancia entre el filtro del bombardeador y la muestra.

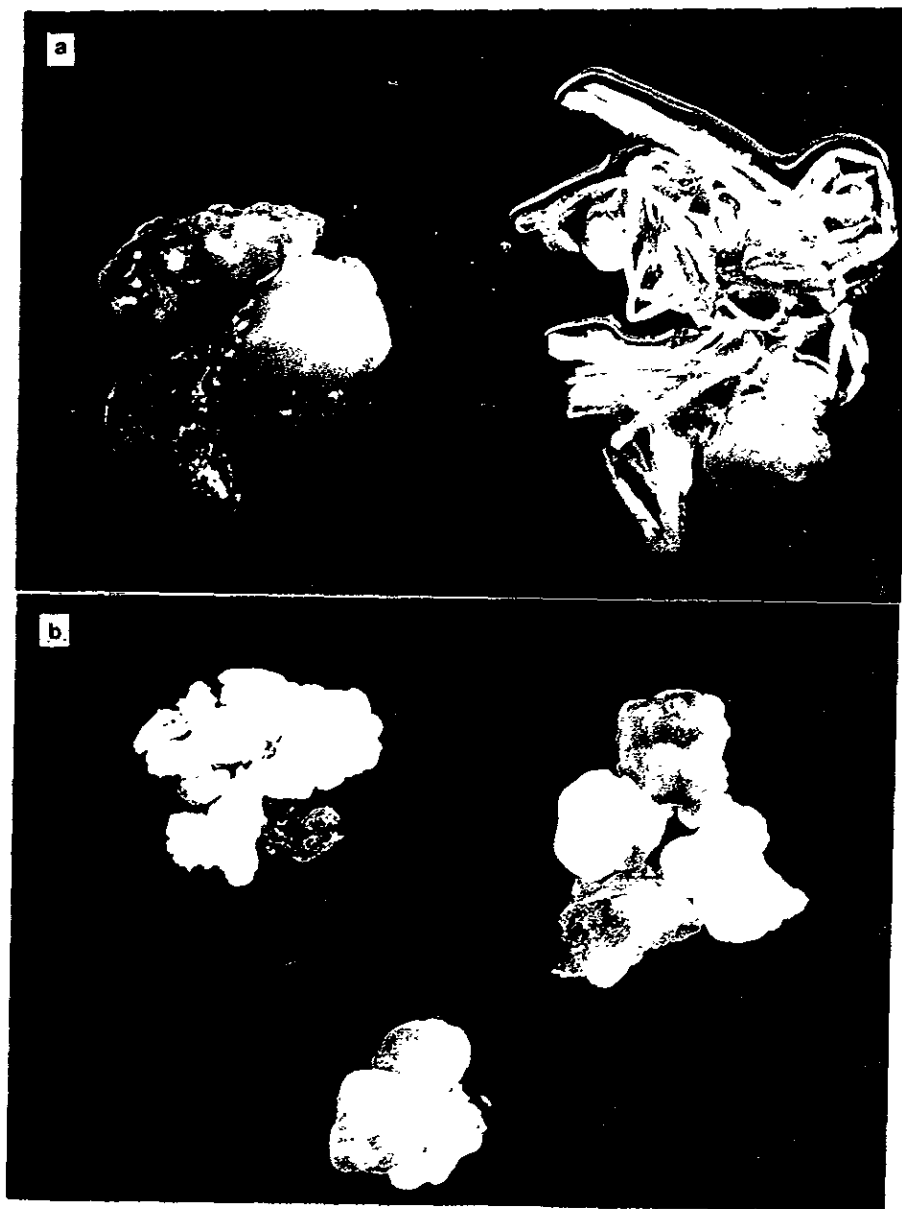


Figura 6. Monitoreo de la expresión transitoria de *gus* en los callos de maíz cuatro semanas después del bombardeo a 13 cm de distancia. a) callos mantenidos en medio de proliferación $N6^3$ y b) callos mantenidos en medio de proliferación $N6^3$ adicionado con 155 mg.l^{-1} de Kanamicina sulfatada.



Figura 7. Efectos de la selección de las células transformadas de las no transformadas en los cultivos de callos del medio N6³ bombardeados a 13 cm de distancia entre el filtro del bombardeador y la muestra. a) medio de proliferación en el cual se observa la regeneración y b) medio de proliferación con el agente selectivo en el cual se puede notar la oxidación de los callos y la escasa presencia de puntos regenerativos.

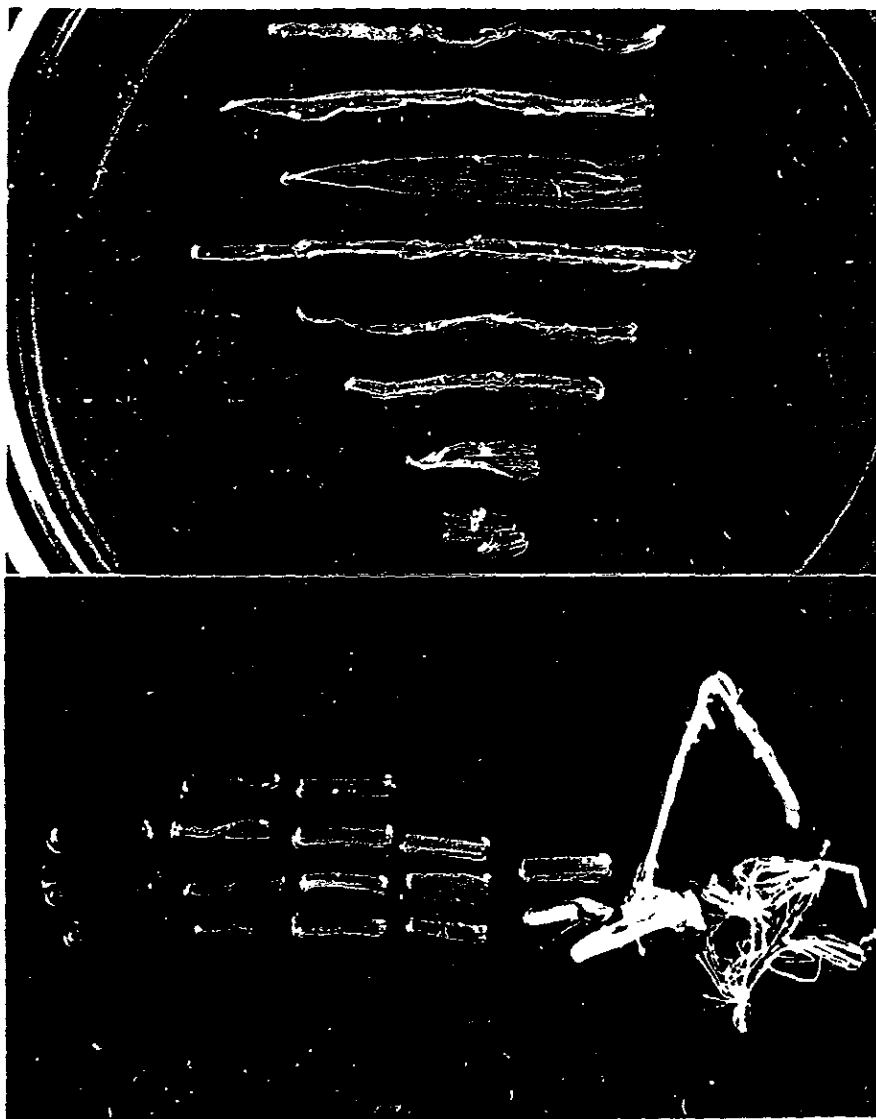


Figura 8. Expresión estable de *gus* en una de las plantas regeneradas después del bombardeo de los callos embriogénicos de maíz, con microproyectiles cubiertos con el DNA del plásmido pBI426 a una distancia 13 cm entre el filtro del bombardeador y el blanco. Arriba partes apicales, abajo partes basales; las porciones sin color son tejido senescente.

4.4 Cuarto bombardeo.

Con el objetivo de obtener una mayor cantidad de plantas regeneradas y poder confirmar la transformación de las mismas, se bombardearon 40 callos del medio N6³ en las mismas condiciones del tercer bombardeo, en esta ocasión se añadió como control un grupo de 15 callos, los cuales se bombardearon en idénticas condiciones, pero con los microproyectiles desprovistos del DNA plasmídico. Los callos utilizados en este cuarto ensayo solamente habían pasado el período de inducción y 12 días en el medio de proliferación.

Es importante señalar que la curva de tolerancia a kanamicina de callos del medio N6³ nunca se llevó a cabo por la insuficiencia de callos de este medio; por lo que desde el segundo bombardeo se decidió extrapolar de manera arbitraria las observaciones hechas en los cultivos de callos del medio N6¹ a los del N6³, pero como se pudo observar en el tercer bombardeo, la adición de kanamicina al medio de cultivo redujo notablemente el crecimiento de los callos y limitó totalmente la regeneración de las plantas. Por estas razones se decidió no usar la kanamicina para seleccionar las células transformadas en este cuarto bombardeo. La regeneración de las plantas se realizó de igual manera que en el bombardeo previo.

Una vez realizado el bombardeo, 48 horas después se hizo la prueba de expresión transitoria de *gus* en cuatro de los callos bombardeados, todos resultaron positivos, tres con un nivel de expresión bueno y el cuarto con un nivel regular. Del grupo testigo se probaron dos callos, mismos que resultaron negativos a la actividad de β -*gus* (Figura 9).

Del grupo control se logró la regeneración de dos plantas completas 13 semanas después del bombardeo; en este mismo período, de los callos bombardeados con el DNA del plásmido pBI426 se pudieron regenerar 21 plantas completas, de las cuales se monitorearon para actividad de β -*gus* catorce de ellas de la siguiente forma: se tomó la parte basal y segmentos de hoja de dos plantas, se pudo observar que la expresión estable tuvo un buen nivel y fue de forma regular en todo el tejido probado; se tomaron también dos plantas completas, en las cuales se observó un nivel de expresión de *gus* regular de manera uniforme en toda la planta. (Figura 10); a otras diez plantas les fue cortada la hoja más cercana a la parte basal, de estas, seis dieron positivo a la actividad de β -*gus* con un nivel de expresión regular en toda la hoja. Esto significa que de catorce plantas que se monitorearon para la actividad de β -*gus* (expresión estable) diez dieron positivo con diferentes niveles de expresión de *gus*. En el grupo control se tomó también la hoja más cercana a la parte basal en una de las plantas regeneradas para determinar la actividad de β -*gus*, observándose que presentó un tenue color azul, el cual puede deberse a la actividad de fondo presentada por las células de maíz, pero en ningún momento alcanza los niveles mostrados por las plantas regeneradas de los callos bombardeados con el plásmido pBI426 (Figura 11).

Es importante resaltar que conforme se llevaron a cabo los ensayos de bombardeo; se pudo alcanzar progresivamente el 100% de eficiencia en la transferencia del DNA plasmídico a las células embriogénicas de maíz, ya desde el tercer bombardeo gracias a la elección de los callos del medio N6³ todos los callos probados presentaron actividad de β -*gus*. También se observó un incremento en los niveles de expresión de *gus*. En el primer bombardeo sólo un 20% de los callos probados presentaban un nivel de expresión bueno, un

60% presentaba un nivel de expresión regular y el 20% restante no tuvieron expresión de *gus*, para el cuarto bombardeo esta situación fue revertida ya que un 75% de los callos probados para actividad de β -*gus* dieron positivo con un nivel de expresión bueno y solo un 25% presenta un nivel regular.

Walters et al., 1992 señalaron que la eficiencia de transformación está influenciada por la eficiencia con la cual las transformantes son recuperadas durante el proceso de selección. En este trabajo la eficiencia de transformación no puede ser medida de forma directa, tan sólo en el tercer bombardeo ésta es de cero, ya que como se recordará, de todos los callos colocados en el medio de selección no se logró recuperar ningún transformante, pero de manera indirecta, el número de plantas regeneradas con actividad de β -*gus*, pueden ser un indicador de la eficiencia de transformación.

En este trabajo se observó que un 71% de las plantas regeneradas en un medio sin selección y probadas para actividad de β -*gus* dieron positivo presentando varios niveles de expresión de *gus*, este es un buen porcentaje si tomamos en cuenta que aparentemente existe una proliferación preferencial de células transformadas y no transformadas. Al parecer la regeneración es mayor en células no transformadas en los tejidos embriogénicos quiméricos. Esta preferencia fue demostrada por Fromm et al. en 1990 cuando regeneraron 150 plantas no transgénicas de callos de maíz bombardeados con *bar-gus*, estos últimos habían mostrado ser positivos a la actividad de β -*gus* en al menos 50% de sus células. Estos eventos de regeneración se dieron en callos que no pasaron por un período de selección previo a la regeneración. Se pudo demostrar que la selección de las células transformadas durante el proceso de regeneración permite recuperar plantas transgénicas, mientras que

la no selección de esas células lleva a la producción de plantas no transformadas.

Es importante destacar, que probablemente, debido a las condiciones de bombardeo utilizadas en este trabajo, la proliferación preferencial entre células transformadas y no transformadas no se presenta; pues se pudo observar que los sectores transgénicos de los callos bombardeados aumentan en tamaño, aunque también existe crecimiento de los sectores no transgénicos. Estas observaciones sugieren que las condiciones establecidas provocan daños mínimos a las células que reciben las partículas cubiertas con el DNA; de esta forma, tanto las células transformadas, como las que no lo han sido, se encuentran en condiciones semejantes para iniciar su proliferación.

Aunque resulta lógico que, para mejorar la eficiencia de transformación se debe de implementar el protocolo de selección para los callos del medio N6³, ya que este permitiría eliminar la formación de plantas no transformadas. También se podría prescindir del mismo, pues como ya se mencionó, el porcentaje de plantas regeneradas que presentan expresión estable es alto.

Es de esta manera, que en este trabajo se han establecido las condiciones adecuadas para la transformación de células embriogénicas de maíz (*Zea mays* raza tuxpeño) obtenidas de la inducción y proliferación sobre el medio N6³. No se descarta de ningún modo, el uso de los callos embriogénicos obtenidos en el medio N6¹, ya que probablemente de bombardearlos entre los 14 y 21 días después del subcultivo o a una distancia entre los 8.0 y 10.5 cm podrían dar resultados similares a los obtenidos con los callos del medio N6³. Se mencionó también que los callos utilizados en los dos últimos bombardeos se encontraban entre las tres y seis semanas de edad, esto es que a lo máximo presentaban dos subcultivos, ya que después del tercer o cuarto subcultivo se comienza a

observar la germinación de los embriones somáticos y una vez llevada a cabo la regeneración se pierde rápidamente la capacidad regenerativa de estos callos. Esta pérdida temprana de la capacidad regenerativa de los cultivos de callos embriogénicos friables utilizados en este trabajo puede interpretarse como una ventaja, ya que las células embriogénicas se ven expuestas por menos tiempo al 2,4-D y de esta forma se puede disminuir la variabilidad dada por el tiempo de cultivo, evitando una prolongada exposición a los reguladores de crecimiento. Esto también permite que el período que va desde la inducción de los callos, el bombardeo de los mismos y la regeneración de las plantas se lleve a cabo en un período de 18 a 21 semanas.

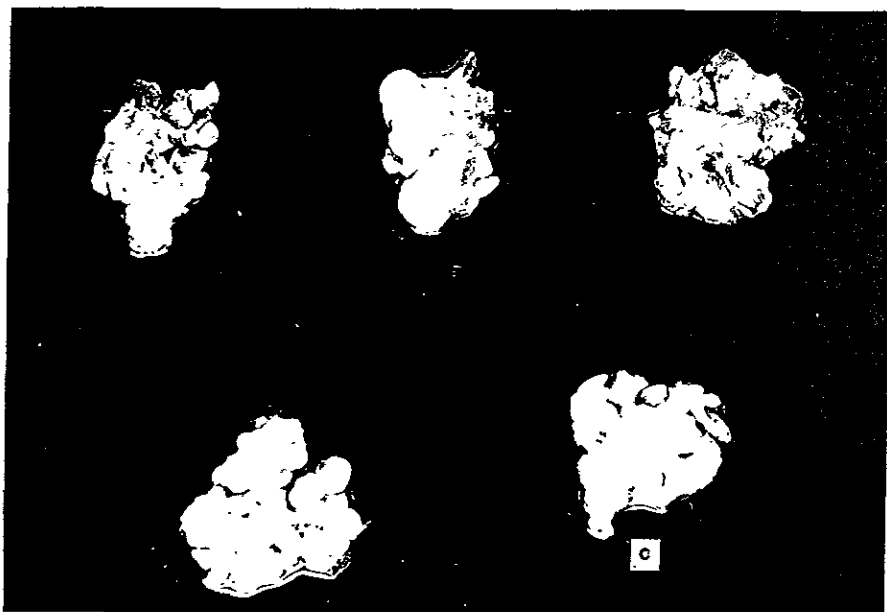


Figura 9. Expresión transitoria de *gus* obtenida en el cuarto bombardeo de callos embriogénicos de maíz. El callo sin color representa al grupo control (abajo), los callos con porciones azules fueron bombardeados a 13 cm de distancia con partículas de tungsteno de 0.4 μm de diámetro (M5) cubiertas con DNA plasmídico.

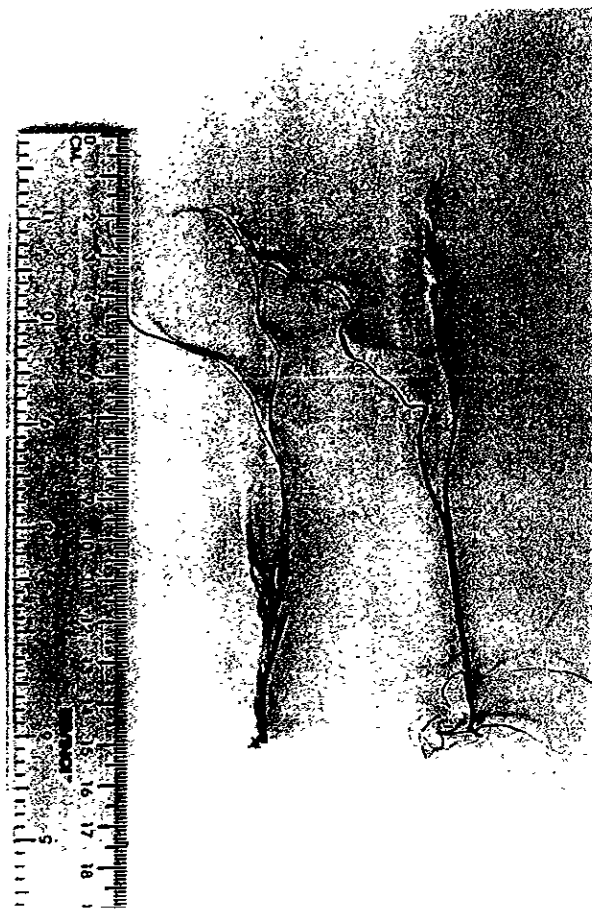


Figura 10. Confirmación de la expresión estable en plantas obtenidas de callos embriogénicos del medio N6³ bombardeados a 13 cm de distancia y puestos a regenerar en un medio sin agente selectivo. Los niveles de expresión de *gus* observados fueron regulares en ambas plantas; los sectores sin color corresponden a tejidos senescentes.



Figura 11. Expresión estable de *gus*, nivel regular, en segmentos de hojas de plantas regeneradas a partir de callos embriogénicos friables, bombardeados a 13 cm de distancia, con microproyectiles de tungsteno de 0.4 μm de diámetro (M5) cubiertos con el DNA del plásmido pBI426. La hoja de la izquierda representa al control y las hojas de la derecha a los callos bombardeados con el DNA plasmídico.

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluye lo siguiente:

1. Se establecieron las condiciones menos agresivas para la transformación de callos embriogénicos friables de maíz por medio del bombardeo de partículas con pistola de baja presión.
2. Se demostró la transformación de células embriogénicas de maíz (*Zea mays* raza tuxpeño) mediante la expresión estable de *gus* en los callos bombardeados y las plantas regeneradas a partir de los mismos.

Las mejores condiciones para llevar a cabo la transformación de las células embriogénicas de maíz son las siguientes:

- Los microproyectiles de tungsteno de 0.4 μm de diámetro son efectivos para la transformación de células embriogénicas de maíz, pues estas son de tamaño pequeño y sólo se requiere transformar las capas superficiales del tejido calloso, lugar en donde se originan dichas células.
- Los callos deben situarse a una distancia de 13 cm del filtro del bombardeador.
- Los mejores blancos para ser bombardeados, son los callos obtenidos de la inducción y proliferación sobre el medio de cultivo N6³, estos deben ser bombardeados entre el primer y segundo subcultivo (antes de que se presente la germinación de los embriones somáticos) y deben tomarse entre los 10 y 14 días después del subcultivo, momento en el cual comienza la etapa de crecimiento logarítmico.

- Probablemente los callos provenientes del medio N6¹ son también viables para la transformación por este mismo método, pero es necesario buscar las condiciones óptimas para lograr un bombardeo eficaz.
- La presión de helio utilizada para el bombardeo (120 psi), así como el nivel de vacío en la cámara al momento de bombardear (20-22 in Hg), habían sido ya establecidas (Suárez, R.R., comunicación personal) y pueden manejarse como condiciones generales junto con la cantidad de partículas y la concentración del DNA.
- La regeneración puede llevarse a cabo después del bombardeo reduciendo en el medio de cultivo un 25% de la concentración del hidrolizado de caseína, la L-prolina, la cinetina y el 2,4-D, subcultivo tras subcultivo, hasta eliminarlas completamente del medio 12 semanas después.
- Debido al alto porcentaje de regeneración de plantas transformadas podría prescindirse del protocolo de selección con kanamicina o implementar uno que no dañe las células bombardeadas y que a su vez impida la regeneración de plantas no transformadas; pues como se observó, este es un paso crítico para la obtención de plantas transgénicas.

VII. PERSPECTIVAS

Posteriormente se pretende establecer un programa de mejoramiento genético de razas criollas de maíz por medio del bombardeo de partículas con genes que incrementen la productividad, la calidad alimenticia, la tolerancia a factores ambientales adversos, que confieran resistencia a virus, bacterias o insectos, o la transferencia de cualquier otra característica agronómica deseable.

- Probablemente los callos provenientes del medio N6¹ son también viables para la transformación por este mismo método, pero es necesario buscar las condiciones óptimas para lograr un bombardeo eficaz.
- La presión de helio utilizada para el bombardeo (120 psi), así como el nivel de vacío en la cámara al momento de bombardear (20-22 in Hg), habían sido ya establecidas (Suárez, R.R., comunicación personal) y pueden manejarse como condiciones generales junto con la cantidad de partículas y la concentración del DNA.
- La regeneración puede llevarse a cabo después del bombardeo reduciendo en el medio de cultivo un 25% de la concentración del hidrolizado de caseína, la L-prolina, la cinetina y el 2,4-D, subcultivo tras subcultivo, hasta eliminarlas completamente del medio 12 semanas después.
- Debido al alto porcentaje de regeneración de plantas transformadas podría prescindirse del protocolo de selección con kanamicina o implementar uno que no dañe las células bombardeadas y que a su vez impida la regeneración de plantas no transformadas; pues como se observó, este es un paso crítico para la obtención de plantas transgénicas.

VII. PERSPECTIVAS

Posteriormente se pretende establecer un programa de mejoramiento genético de razas criollas de maíz por medio del bombardeo de partículas con genes que incrementen la productividad, la calidad alimenticia, la tolerancia a factores ambientales adversos, que confieran resistencia a virus, bacterias o insectos, o la transferencia de cualquier otra característica agronómica deseable.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Ammirato, P.V. (1983). Embryogenesis. In: Handbook of Plant Cell Culture, Vol. I. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Amirato & Y. Yamada (eds). MacMillan, New York; USA. pp. 82-123.

Ammirato, P.V. (1987). Organization Events During Somatic Embryogenesis. In: Plant Tissue and Cell Culture. C.E. Green, D.A. Somers, W.P. Hackett & D.D. Biesboer (eds). Alan R. Liss, Inc., New York, USA. pp. 57-81.

Armstrong, C.L. & E.C. Green (1985). Establishment and Maintenance of Friable Embryogenic Maize Callus and the Involvement of L-Proline. *Planta* 164:207-214.

Brown, C., F.J. Brooks, D. Pearson & R.J. Mathias (1989). Control of Embryogenesis and Organogenesis in Immature Wheath Embryo Callus Using Increased Medium Osmolarity and Abscisic acid. *J. Plant Physiol.* 133:727-733.

Brown, T.A. (1991). Essential Molecular Biology a Practical Approach. Vol. I. Oxford University Press. New York, USA 229 p.

Carman, J.G. (1990). Embryogenic Cells in Plant Tissue Cultures: Occurrence y Behavior. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26:746-753.

Casas, A.M., A.K. Kononowicz, U.B. Zher, D.T. Tomes, J.D. Axtell, L.G. Buttler, R.A. Bressan & P.M. Hasegawa (1993). Transgenic *Shorgum* via Microprojectile Bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:11212-11216.

Castillo, A.M., V. Vasil & I.K. Vasil (1994). Rapid Production of Fertile Transgenic Plants of Rye (*Secale cereale* L.). *Biotec.* 12:1366-1371.

Chang, Y.F. (1983). Plant Regeneration *in vitro* from Leaf Tissues Derived from Cultured Immature Embryos of *Zea mays* L. *Plant Cell Rep.* 2:183-185.

Christou, P., D.E. McCabe & W.S. Swain (1988). Stable Transformation of Soybean Callus by DNA-Coated Gold Particles. *Plant Physiol.* 87:671-674.

Christou, P., T.L. Ford & M. Kofron (1991). Production of Transgenic Rice (*Oriza sativa* L.) Plants from Agronomically Important Indica and Japonica Varieties via Electric Discharge Particle Acceleration of Exogenous DNA into Inmature Zygotic Embryos. *Biotec.* 9:957-962.

Christou, P. (1995). Particle Bombardment. *Methods Cell Biol.* 50:375-382.

Chu, C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu. K.C. Yin, C.Y. Chu & F.Y. Bi (1975). Establishment of an Efficient Medium for Anther Culture of Rice Through Comparative Experiments on the Nitrogen Sources. *Sci. Sin.* 18:659-668.

Close, K.R. & L.A. Ludeman (1987). The Effect of Auxin-like Plant Growth Regulators and Osmotic Regulation on Induction of Somatic Embryogenesis from Elite Maize Inbreds. *Plant Science* 52:81-89.

Datla, R.S.S., J.K. Hammerlindl, L.E. Pelcher, G. Selvaraj & W.L. Crosby (1990). A Bifunctional Gene Fusion between Neomycin-Phosphotransferase and β -glucuronidase: A Broad Spectrum Genetic Marker for Plants. UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology. *J. Cell. Biochem.* 14:279.

Dougal, D.K. & D.C. Verma (1978). Growth and Embryo Formation in Wild Carrot Suspension Culture with Ammonium Ion as a Sole Nitron Source. *In vitro* 14:180-182.

Duncan, D.R., M.E. Williams, B.E. Zehr & J.M. Widholm (1985). The production of Callus Capable of Plant Regeneration from Inmature Embryos of Numerous *Zea mays* Genotypes. *Planta* 165:322-331.

Emons, A.M.C. & H. Kieft (1991). Histological Comparison of Single Somatic Embryos of Maize from Suspension Culture with Somatic Embryos Attached to Callus Cells. *Plant Cell Rep.* 10:485-488.

Emons, A.M.C., A. Samallo-Droppers & C. Van der Toorn (1993). The Influence of Sucrose, Manitol, L-Proline, Abscisic Acid and Giberellic Acid on the Maturation of Somatic Embryos of *Zea mays* L. from Suspension Cultures. *J. Plant Physiol.* 142:597-604.

Emons, A.M.C. & H. Kieft (1995). Somatic Embryogenesis in Maize (*Zea mays* L.) In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Vol. 31, Somatic Embryogenesis and Synthetic Seeds II. Y.P.S. Bajaj (ed.) Springer-Verlag, Berlin, Alemania p.p. 24-39.

Fransz, P.F. & J.H.N. Schel (1991)a. An Ultrastructural Study on the Early Development of *Zea mays* Somatic Embryos. *Can. J. Bot.* 69:858-865.

Fransz, P.F. & J.H.N. Schel (1991)b. Cytodifferentiation During the Development of Friable Embryogenic Callus of Maize (*Zea mays* L.). *Can. J. Bot.* 69:26-33.

Fransz, P.F. & J.H.N. Schel (1994). Ultrastructural Studies on Callus Development and Somatic Embryogenesis in *Zea mays* L. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Vol. 25. Maize. Y.P.S. Bajaj (ed.). Springer-Verlag; Berlin, Alemania p.p. 50-65.

Fromm, M.E., F. Morrish, C. Armstrong, R. Williams, J. Thomas & T.M. Klein (1990). Inheritance and Expression of Chimeric Genes in the Progeny of Transgenic Maize Plants. *Biotec.* 8:833-839.

Fujimoto, H., K. Hoh, M. Yamamoto, J. Kyozuka & K. Shimamoto (1993). Insect Resistant Rice Generated by Introduction of a Modified δ -Endotoxin Gene of *Bacillus thuringiensis*. *Biotec.* 8:833-839.

Gambley, R.L., R. Ford & G.R. Smith (1993). Microprojectile Transformation of Sugarcane Meristems and Regeneration of Shoots Expressing β -glucuronidase. *Plant Cell Rep.* 12:343-346.

Garcia, C.F., M. Vargas-Suaréz, J. Márquez-Guzman, N.E. Bohorova & E. Sánchez de Jiménez (1998). Influence of the Physiological State of Initial Explant on Maize Embryogenic Callus Formation and Plant Regeneration. Sin publicar.

Geri, C., A. Turrini, I. Giorgetti, E. Nicoletti & V.N. Ronchi (1994). Early Events Showing Genome Plasticity During the Acquisition of Embryogenic Competence. VIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Cultures, Firenze, Italia. p.194.

Gordon-Kamm, W.J., T.M. Spencer, M.L. Mangano, T.R. Adams, R.J. Daines, W.G. Start, J.V. O'Brien, S.A. Chambers, W.R. Adams Jr., N.G. Willets, T.B. Rice, C.J. Mackey, R.W. Krueger, A.P. Kausch & P.G. Lemaux (1990). Transformation of Maize Cells and Regeneration of Fertile Transgenic Plants. *Plant Cell* 2:603-618.

Green, C.E. & R.L. Phillips (1975). Plant Regeneration from Tissue Cultures of Maize. *Crop Sci.* 15:417-421.

Green, C.E. & C.A. Rhodes (1982). Plant Regeneration in Tissue Cultures of Maize. In: Maize for Biological Researchs, Plant Molecular Biology Association. W.F. Sheridan (ed.). Virginia, USA. p.p. 367-372.

Hayakawa, T., Y. Zhu, K. Itoh, Y. Kimura, T. Izawa, K. Shimamoto & S. Toriyama (1992). Genetically Engineered Rice Resistant to Rice Stripe Virus an Insect-Transmitted Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:9865-9869.

Hohl, M. & P. Schopfer (1992). Physical Extensibility of Maize Coleoptile Cells Walls: Apparent Plastic Extensibility is due to Elastic Hysteresis. *Planta* 187:498-504.

Horn, M.E., R.D. Shillito, B.V. Conger & C.T. Harms (1988). Transgenic Plants of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Plant Cell Rep.* 7:469-472.

J. de Jong, A., E.D.L. Schmidt & S.C. de Vries (1993). Early Events in Higher-Plant Embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 22:367-377.

Jefferson, R.A. (1987). Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405.

Kamo, K.K., M.R. Becwar & T.K. Hodges (1985). Regeneration of *Zea mays* L. from Embryogenic Callus. *Bot. Gaz.* 146:327-334.

Kamo, K.K., K.L. Chang, M.E. Lynn & T.K. Hodges (1987). Embryogenic Callus Formation from Maize Protoplasts. *Planta* 172:245-251.

Kausch, A.P., T.R. Adams, M. Mangano, S.J. Zachwieja, W. Gordon-Kamm, R. Daines, N.G. Willets, S.A. Chambers, W. Adams Jr., A. Anderson, G. Williams & G. Haines (1995). Effects of Microprojectile Bombardment on Embryogenic Suspension Cell Cultures of Maize (*Zea mays* L.) Used for Genetic Transformation. *Planta* 196:501-509.

Kemper, E.L., M.J. Da Silva & P. Arruda (1996). Effect of Microprojectile Bombardment Parameters and Osmotic Treatment on Particle Penetration and Tissue Damage in Transiently Transformed Cultures Inmature Embryos of Maize (*Zea mays* L.). *Piani Science* 121:85-93.

Klein, M.T., E.D. Wolf, R. Wu & J.C. Sanford (1987). High-velocity Microprojectiles for delivering Nucleic Acids into living Cells. *Nature* 327:70-73.

Klein, M.T., T. Gradziel, M.E. Fromm & J.C. Sanford (1988). Factors Influencing Gene Delivery into *Zea mays* Cells by High-Velocity Microprojectiles. *Biotec.* 6:559-563.

Klein, M.T. & S. Fitzpatrick-McElligot (1993). Particle Bombardment: A Universal Approach for Gene Transfer to Cells and Tissues. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:583-590.

Koprek, T., R. Hänsch, A. Nerlich, R.R. Mendel & J. Schulze (1996). Fertile Transgenic Barley of Different Cultivars Obtained by Adjustment of Bombardment Conditions to Tissue Response. *Plant Science* 119:79-91.

Koziel, M.G., G.L. Beland, C. Bowman, N.B. Carozzi, R. Crenshaw, L. Crossland, J. Dawson, N. Desai, M. Hill, S. Kadwell, K. Launis, K. Lewis, D. Maddox, K. MacPherson, M.R. Meghji, E. Merlin, R. Rhodes, G.W. Warren, M. Wright & S.V. Evola (1993). Field performance of Elite Transgenic Maize Plants Expressing an Insecticidal Protein Derived from *Bacillus thuringiensis*. *Biotec.* 11:194-200.

Lowe, K., D.B. Taylor, P. Ryan & K.E. Paterson (1985). Plant Regeneration Via Organogenesis and Embryogenesis in the Maize Inbred line B73. *Plant Science* 41:125-132.

Lowe, K., B. Bowen, G. Hoerster, M. Ross, D. Bond, D. Pierce & B. Gordon-Kamm (1995). Germline Transformation of Maize Following Manipulation of Chimeric Shoots Meristems. *Biotec.* 13:677-681.

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

McCabe, D.E., W.F. Swain, B.J. Martinell & P. Christou (1988). Stable Transformation of Soybean (*Glicine max*) by Particle Acceleration. *Biotec.* 6:923-926.

McCabe, D.E. & B.J. Martinell (1993). Transformation of Elite Cotton Cultivars by Particle Bombardment of Meristems. *Biotec.* 11:596-598.

Morrish, F., V. Vasil & I.K. Vasil (1987). Developmental Morphogenesis and Genetic Manipulation in Tissue and Cell Cultures of the Gramineae. *Adv. Genet.* 24:431-439.

Morrish, F., D.D. Songstad, C.L. Armstrong & M. Fromm (1993). Microprojectile Bombardment: A Method for the Production of Transgenic Cereals Crop Plants and the Functional Analysis of Genes. In: *Transgenic Plants*. A. Hiatt (ed.). Marcel Dekker Inc., New York; USA. pp. 255-281.

Murashige, T. & F. Skoog (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.

Murry, L.E., L.G. Elliot, S.A. Capitant, J.A. West, K.K. Hanson, L. Scarafia, S. Johnston, C. Deluca-Flaherty, S. Nichols, D. Cunanan, P.S. Dietrich, I.J. Mettler, S. Dewalb, D.A. Warnick, C. Rhodes, R.M. Sinibaldi & K.J. Brunke (1993). Transgenic Corn Plants Expressing MDMV Strain B Coat Protein are Resistant to Mixed Infection of Maize Dwarf Mosaic Virus and Maize Chlorotic Mottle Virus. *Biotec.* 11:1559-1564.

Novak, F.J., S. Daskalov, H. Brunner, M. Nesticky, R. Afza, M. Dolezelova, A. Herichova & T. Hermelin (1987). Somatic Embryogenesis in Maize and Comparison of Genetic Variability Induced by Gamma Radiation and Tissue Culture Techniques. *Plant Breeding* 101:66-79.

Raghavan, V. (1978) *Experimental Embryogenesis in Vascular Plants*. Academic Press, New York; USA. pp. 10-51.

Register III, J.C., D.J. Peterson, P.J. Bell, W.P. Bullock, I.J. Evans, B. Frame, A.J. Greenland, N.S. Higgs, Y. Jepson, S. Jiao, C.J. Lewnau, J.M. Sillick & H.M. Wilson (1994). Structure and Function of Selectable and Non-Selectable Transgenes in Maize After Introduction by Particle Bombardment. *Plant Mol. Biol.* 25:951-961.

Rhodes, C.A., D.A. Pierce, I.J. Mettler, D. Mascarenhas & J.J. Detmer (1988). Genetically Transformed Maize Plants from Protoplasts. *Science* 240: 204-207.

Sanford, J.C., T.M. Klein, E.D. Wolf & N. Allen (1987). Delivery of Substances into Cells and Tissues, Using a Particle Bombardment Process. *J. Particulate Sci. Technol.* 5:27-37.

Sanford, J.V., F.D. Smith & J.A. Russell (1993). Optimising the Biolistic Process for Different Biological Applications. *Methods Enzymol.* 217:483-509.

Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor. New York; USA.

Sánchez de Jiménez, E. & M. Albores (1979). Auxinas Sintéticas en la Inducción de los Callos de Maíz (*Zea mays* L.). *Agrociencia* 37:151-160.

Santos, M.A., J.M. Torné & J.L. Blanco (1984). Methods of Obtaining Maize Totipotent Tissues. I. Seedlings Segments Culture. *Plant Sci. Lett.* 33:309-315.

Sharp, W.R., M.R. Sondahl, S.L. Caldas & B.S. Maraffa (1980). The Physiology of *in vitro* Asexual Embryogenesis. *Hort Rev.* 2: 268-310.

Songstad, D.D., W.L. Petersen & C. L. Armstrong (1992). Establishment of Friable Embryogenic (Tipe II) Callus from Immature Tassels of *Zea mays* (Poaceae). *Amer. J. Bot.* 79:761-764.

Southgate, E.M., M.R. Davey, J.B. Power & R. Marchant (1995). Factors Affecting the Genetic Engineering of Plants by Microprojectile Bombardment. *Biotech. Advanc.* 13:631-651.

Spencer, T.M., J.V. O'Brien, W.G. Start, T.R. Adams, W.J. Gordon-Kamm & P.G. Lemaux (1992). Segregation of Transgenes in Maize. *Plant Mol. Biol.* 18:210-210.

Taylor, M.G. & I.K. Vasil (1991) Histology of, and Physical Factors Affecting Transient GUS Expression in Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) Embryos Following Microprojectile Bombardment. *Plant Cell Rep.* 10:120-125.

Tomes, D.T. & O.S. Smith (1985) The Effect of Parental Genotype on Initiation of Embryogenic Callus from Elite Maize (*Zea mays* L.) Germplasm. *Theor. Applied Genet.* 70:505-509.

Torné, J.M., M.A. Santos, A. Pons & M. Blanco (1980). Regeneration of Plants from Mesocotyl Tissue Cultures of Immature Embryos of *Zea mays* L. *Plant Sci. Lett.* 17:339-344.

Torné, J.M., M.A. Santos & J.L. Blanco (1984). Methods of Obtaining Maize Totipotent Tissues. II. Atrophic Tissue Culture. *Plant Sci. Lett.* 33:317-325.

Vain, P., M.D. MacMullen & J.J. Finer (1993). Osmotic Treatment Enhances Particle Bombardment-Mediated Transient and Stable Transformation of Maize. *Plant Cell Rep.* 12:84-88.

Vain, P., J. De Buyser, V. Buitrang, R. Haicour & Y. Henri (1995). Foreign Gene Delivery into Monocotyledoneus. *Biotech. Advanc.* 13:653-671.

Vasil, V., C.Y. Lu & I.K. Vasil (1983). Proliferation and Plant Regeneration from the Nodal Region of *Zea mays* L. (Maize, Gramineae) Embryos. *Amer. J. Bot.* 70:951-954.

Vasil, I.K. (1988) Progress in the Regeneration and Genetic Manipulation of Cereal Crops. *Biotech.* 6:397-402.

Vasil, V., A.M. Castillo, M.E. Fromm & I.K. Vasil (1992). Herbicide Resistant Fertile Transgenic Wheat Plants Obtained by Micropojectile Bombardment of Regenerable Embryogenic Callus. *Biotec.* 10:667-674.

Vasil, I.K. (1994) Molecular Improvement of Cereals. *Plant Mol. Biol.* 25:925-937.

Walters, D.A., C.S. Vetsch, D.E. Potts & R.C. Lundquist (1992). Transformation and Inheritance of a Hygromycin Phosphotransferase Gene in Maize Plants. *Theor. Appl. Genet.* 76:835-840.

Wan, Y. & P.G. Lemaux (1994) Generation of Large Numbers of Independently Transformed Fertile Barley Plants. *Plant Physiol.* 104:37-48.

Wan, Y., J.M. Widholm & P.G. Lemaux (1995). Tipe I Callus as a Bombardment Target for Generating Fertile Transgenic Maize (*Zea mays* L.). *Planta* 196:7-14.

Wang, A.S. (1987). Callus Induction and Plant Regeneration from Maize Mature Embryos. *Plant Cell Rep.* 6:360-362.

Wilkinson, T.C. & S.A. Thompson (1987). Genotype, Medium, and GenotypeXMedium Effects on the Stablistment of Regenerable Maize Callus. *Maydica* 32:89-105.

Zhang, W. & R. Wu (1988). Efficient Regeneration of Transgenic Plants from Rice Protoplast and Correctly Regulated Expression of the Foreing Gene in the Plants. *Theor. Appl. Genet.* 76:835-840.

Zhong, H., C. Srinivasan & M.B. Sticklen (1992). *In vitro* Morphogenesis of Corn (*Zea mays* L.). I. Differentiation of Multiple Shoots Clumps and Somatic Embryos from Shoots Tips. *Planta* 187:483-489.

Zhong, H. B. Sun, D. Warkentin, S. Zhang, R. Wu, T. Wu & M.B. Sticklen (1996). The Competence of Maize Shoots Meristems for Integrative Transformation and Inherited Expression of Transgenes. *Plant Physiol.* 110:1097-1107.

Zimny, J., D. Becker, R. Brettschneider & H. Lörz (1994). First Transgenic Plants of Triticale (X Triticosecale wittmack). In: Abstracts of the International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze, June 12-17, 1994. M. Terzi, R. Cella & A. Falavigna (Eds.). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. p. 138.

Anexo 1. Composición de medios de cultivo y suplementos.

Medio de cultivo N6 modificado (Chu et al., 1975).

a) Soluciones de macro y micronutrientes.

Solución I.

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK 10X mM.l ⁻¹
		mg.l ⁻¹	mM.l ⁻¹	
KNO ₃	101.10	2830	28.00	280.0
CaCl ₂ .2H 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 l de medio se toman 100 ml de esta solución.

Solución II.

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK 100X μM.l ⁻¹
		mg.l ⁻¹	μM.l ⁻¹	
MnSO ₄ .H ₂ O	169.01	5.97	35.32	3532
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.54	1.50	5.21	521
H ₃ BO ₃	61.83	1.60	25.87	2587
KI	166.01	0.80	4.82	482

Solución III.

FeSO ₄ .7H ₂ O	278.03	27.80	100.00	10 000
C ₁₄ H ₄ N ₂ O ₁₀ Na ₂ .2H ₂ O	372.30	37.30	100.00	10 000

Para 1 l de medio tomar 10 ml de cada una de las soluciones II y III.

b) Fuente de carbono.

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACION	
		g.l ⁻¹	mM.l ⁻¹
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ (sacarosa)	342.31	30	87.63

c) Reguladores de crecimiento.

	PM (g)	CONCENTRACION		STOCK 10X
		mg.l ⁻¹	μM.l ⁻¹	μM.l ⁻¹
2,4-D	221.04	1.0	4.52	45.2
MCP	214.50	1.0	4.66	46.6
Dicamba	221.00	1.0	4.52	45.2
Cinetina	215.21	1.0	4.64	46.4

Para agregar 2 mg del regulador correspondiente a 1 l de medio se toman 20 ml de la solución stock correspondiente, para 1 mg se toman 10 ml.

d) Aminoácidos y otros

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACION		STOCK 10X
		mg.l ⁻¹	μM.l ⁻¹	μM.l ⁻¹
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	184.20	10.0	54.30	543.0

Para añadir 1.0 mg de glicina o 10 mg de adenina al medio de cultivo correspondiente se toman 10 ml de la solución stock por litro de medio.

e) Mezcla de aminoácidos y vitaminas denominada cocktail 20.

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACION		STOCK 100X
		mg.l ⁻¹	μM.l ⁻¹	mM.l ⁻¹
L-asparagina	150.10	10.0	66.62	6.66
L-arginina	174.20	10.0	57.40	5.74
L-ác. aspártico	133.10	7.5	56.35	5.63
Glicina	75.07	23.0	306.38	30.64
Glutamina	146.10	60.0	410.67	41.06
Ac. glutámico*	147.10	7.5	51.00	5.10
Biotina (Vit. B ₈)*	244.30	1.0	4.10	0.41
Ac. fólico (B ₉)*	441.40	1.0	2.26	0.23
Ac. nicotínico (B ₃)	123.10	1.5	12.18	1.22
Piridoxina (B ₆)	205.60	1.5	7.30	0.73
Riboflavina (B ₂)	376.40	0.1	0.26	0.03
Tiamina (B ₁)	337.30	3.0	8.90	0.89
Myo-inositol	180.16	145.0	804.84	80.48
Urea	60.06	45.0	749.25	74.92

Para preparar 1 l de medio se toman 10 ml del cocktail.

*Disolver con 3 gotas de NaOH 1 N.

Medio MS (Murashige & Skoog, 1962)

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK 100X
		mg.l ⁻¹	mM.l ⁻¹	mM.l ⁻¹
Solución I				
NH ₄ NO ₃	80.040	1650	20.6	2060
KNO ₃	101.108	1900	18.8	1880

Solución II				
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.480	370.0	1.5	150
MnSO ₄ .H ₂ O	169.010	16.9	1X10 ⁻²	1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.540	8.6	3X10 ⁻²	3
CuSO ₄ .5H ₂ O	249.680	2.5X10 ⁻²	1X10 ⁻⁴	1X10 ⁻²

Solución III				
CaCl ₂ .2H ₂ O	147.020	440.00	3.0	300
KI	166.010	0.83	5X10 ⁻³	5X10 ⁻¹
CoCl ₂	237.930	2.5X10 ⁻²	1X10 ⁻⁴	1X10 ⁻²

Solución IV				
KH ₂ PO ₄	136.090	170.00	1.25	125
H ₃ BO ₃	61.860	6.20	1X10 ⁻¹	10
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.950	2.5X10 ⁻¹	1X10 ⁻³	1X10 ⁻¹

Solución V				
FeSO ₄ .7H ₂ O	278.028	27.80	1X10 ⁻¹	10
EDTA.2H ₂ O	372.300	37.30	1X10 ⁻¹	10

Fuente de carbono				
Sacarosa	342.310	30.00	87.63	

Vitaminas

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK 100X $\mu\text{M.l}^{-1}$
		mg.l^{-1}	$\mu\text{M.l}^{-1}$	
Tiamina	337.270	2.0	5.93	593
Piridoxina	205.640	1.0	4.90	490
Ac. nicotínico	123.110	1.0	8.12	812
Myo-inositol	180.160	100.0	555.00	5.5×10^{-4}
Glicina	75.070	2.0	26.64	2664

Para preparar 1 l de medio se toman 10 ml de cada una de las soluciones arriba mencionadas.

Anexo 2. Soluciones para preparar X-Gluc (10X) y medir la expresión transitoria de *gus* (Jefferson et al., 1987).

1)Amortiguador de fosfato de sodio*

	Pesar	Volumen	Concentración	Stock
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.38 g	50 ml dH_2O	200 mM	39 ml
				+
Na_2HPO_4	2.84 g	100 ml dH_2O	200 mM	<u>61 ml</u>
				100 ml 1 M

2)Ferrocianuro de potasio**

	Pesar	Volumen	Stock
$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.211 g	100 ml dH_2O	5 mM

3)Ferricianuro de potasio**

	Pesar	Volumen	Stock
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	0.164 g	100 ml dH_2O	5 mM

4)EDTA*

	Pesar	Volumen	Stock
$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.72 g	100 ml dH_2O	100 mM

5)Tritón X-100*

	Stock
1 ml de Tritón X-100 en 99 de dH_2O	1%

*Esterilizar en autoclave durante 18 minutos a $1.3 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ ó $18 \text{ lb} \cdot \text{pulg}^{-2}$.

**Esterilizar por filtración en membrana millipore™ de $0.22 \mu\text{m}$ de diámetro.

Preparar solución de X-Gluc de la siguiente manera en condiciones de esterilidad:

	Concentración (mM)	Stock 10X	Para 25 ml (ml)
Amortiguador de Fosfato de sodio pH 7.0	100.0	1 M	2.5
EDTA	10.0	100 mM	2.5
Ferricianuro de Potasio	0.5	5 mM	2.5
Ferrocianuro de Potasio	0.5	5 mM	2.5
Tritón X-100	0.5	5 mM	2.5
X-Gluc en DMSO	1.0 mg.ml ⁻¹		25 mg/150 µl de DMSO

Aforar a 25 ml con agua desionizada estéril.

Una vez preparada esta solución se almacena a -20°C y se descongela lentamente al momento de utilizarla.

Soluciones para medir expresión transitoria de gus.

a) Buffer "Z" pH 7.4*

	CONCENTRACION (mM)	Pesar/500 ml (g)
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	40	2.76
Na ₂ HPO ₄	60	4.26
KCl	10	0.37
MgSO ₄ .7H ₂ O	1	0.12

b) Etanol al 70%

350 ml de etanol absoluto + 150 ml de agua desionizada estéril.

c) Acetona-Metanol (1:3)

166 ml de acetona + 333 ml de metanol.

d) Glicerol al 50%*

250 ml de glicerol absoluto + 250 ml de agua desionizada

*Esterilizar en autoclave 18 minutos a 1.3 kg.cm⁻² ó 18 lb.pulg⁻².