



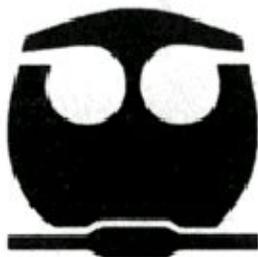
# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTABLECIMIENTO DEL SISTEMA DE  
RNA INTERFERENTE PARA EL SILENCIAMIENTO  
DEL GEN QUE CODIFICA AL FACTOR DE  
INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN  
EIFiso4E EN MAÍZ

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
P R E S E N T A:  
SUSANA DE LA TORRE DÍAZ



MÉXICO, D.F.

2007

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

### **PROFESORES**

Presidente	Alicia Beatriz Cervantes Peredo
Vocal	Eleazar Martínez Barajas
Secretario	Tzvetanka Dimitrova Dinkova
1er. Suplente	Elpidio García Ramírez
2do. Suplente	Felipe Cruz García

### **SITIO DONDE SE DESARROLLO EN TEMA:**

Laboratorio 103 del Departamento de Bioquímica, Conjunto "E",  
Facultad de Química, UNAM.

### **ASESOR**

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

### **SUSTENTANTE**

Susana De la Torre Díaz

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 103 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova y con apoyo de los proyectos:

- CONACyT: 46339 Q
- PAPIIT: IN208006

Agradezco la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), IdAP 10392, para la realización de esta tesis.

## AGRADECIMIENTOS

A mi papá, a mi mamá, por apoyarme, por siempre creer en mi, por estar ahí siempre que los necesito. Gracias a ustedes tengo alas para volar.

A mi hermana, Mari, gracias por todo, por tu paciencia, por escucharme, por apoyarme, por ser mas que mi hermana, mi amiga.

A la Mta Carmen, Rosario y Rodrigo, son parte de mi familia, hemos estado juntos en las buenas y en las malas.

A la Dra. Dimitrova, Cesy, mil gracias por creer en mi, por darme la oportunidad de trabajar contigo y hacer algo que me llena de satisfacción, gracias por tu apoyo, tu comprensión y tu dedicación para conmigo.

Al Dr. Felipe Cruz, gracias por ser el primero en enseñarme no solo las técnicas necesarias sino el amor por esto. Gracias por escucharme y darme consejos en momentos difíciles, gracias por ser mi maestro.

A todos mis compañeros del 103: Valeria, Carlos, Alan, Pedro, Edson, Norma, Hector, Augusto, Kathy, Erica, Cesar, Sara y el Mto. Raul. Gracias por los buenos ratos, por enseñarme, por apoyarme, sobretodo gracias por ser tan buenos compañeros conmigo.

A la Mta. Mayte y a Mari, gracias por su paciencia, sus enseñanzas. Sin su ayuda gran parte este trabajo no hubiera sido posible.

A todos mis amigos que me acompañaron durante la carrera, fueron y son un gran apoyo, hemos pasado excelentes tiempos.

A todos los maestros de la facultad, que de alguna u otra manera formaron parte de mi historia. Gracias a la UNAM por darme tanto.

# ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Mecanismos del inicio de la traducción.....	2
2.1.1 Iniciación de la traducción en procariontes.....	2
2.1.2 Iniciación de la traducción en eucariontes .....	4
2.1.2.1 El factor eIF4E.....	6
2.1.2.2 Iniciación de la traducción en plantas.....	7
2.1.2.3 El factor eIF4E en plantas.....	9
2.1.3 La germinación del maíz como modelo para el estudio de la regulación mediada por eIF4E.....	11
2.1.3.1 Generalidades del maíz .....	11
2.1.3.2 La germinación.....	12
2.1.3.3 El control traduccional en la germinación.....	14
2.2. Silenciamiento por RNA de interferencia.....	15
2.2.1 Historia del silenciamiento en plantas.....	15
2.2.2 Mecanismos de silenciamiento en plantas .....	16
2.2.2.1 Mecanismo de silenciamiento por RNA de interferencia.....	16
2.2.3 Metodologías para el silenciamiento por RNAi.....	22
2.3 Transformación del maíz.....	25
3. HIPÓTESIS.....	27
4. OBJETIVOS.....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1 Material biológico.....	29
5.1.1 Obtención de ejes embrionarios de maíz.....	29
5.1.2 Obtención de callos embriogénicos de maíz.....	29
5.2 Diseño de cebadores.....	30
5.2.1 Cebadores para <i>eIFiso4E</i> .....	30
5.3 Obtención de ácidos nucleicos.....	31
5.3.1 Extracción de RNA total.....	31
5.3.2 Extracción de DNA genómico.....	32
5.3.3 Purificación de DNA plasmídico.....	33
5.3.4 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa.....	33
5.3.5 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	33
5.4 Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa.....	35
5.4.1 Amplificación de <i>eIFiso4E</i> mediante RT-PCR con gradiente de temperatura .....	35
5.4.2 Re-amplificación de <i>eIFiso4E</i> mediante PCR.....	36

5.5 Digestión de DNA con enzimas de restricción.....	37
5.6 Clonación de DNA.....	37
5.6.1 Clonación del inserto de <i>eIFiso4E</i> en el vector pGEM-T.....	37
5.6.2 Clonación del inserto <i>eIFiso4E</i> en el vector pMCG161.....	39
5.7 Bombardeo de callos embriogénicos de maíz .....	41
5.7.1 Preparación de las partículas de tungsteno .....	41
5.7.2 Adsorción del DNA plasmídico a las micropartículas .....	41
5.7.3 Bombardeo de callos embriogénicos de maíz con pistola de baja presión.....	42
5.7.4 Selección positiva de callos transformados con glufosinato de amonio.....	42
5.7.5. Regeneración de plantas de maíz a partir de callos embriogénicos transformados.....	43
5.8 Inmunodetección del factor <i>eIFiso4E</i> .....	43
5.8.1 Extracción de proteína total.....	43
5.8.2 Cuantificación de proteína total.....	44
5.8.3 SDS-PAGE.....	44
5.8.4 Inmunodetección.....	44
6. RESULTADOS.....	46
6.1 Amplificación de una secuencia de <i>eIFiso4E</i> de maíz.....	46
6.2 Clonación en sentido y anti-sentido del gen <i>eIFiso4E</i> de maíz en el vector pMCG161 .....	50
6.3 Transformación de callos embriogénicos de maíz por bombardeo con el vector de silenciamiento pMCG161-iso4E-as.....	55
6.4 Análisis molecular de los callos transformados.....	59
6.5 Regeneración de plantas a partir de callo transformado .....	62
7. DISCUSIÓN.....	65
8. CONCLUSIONES.....	70
9. BIBLIOGRAFÍA.....	71
APÉNDICE 1. Reactivos y Soluciones.....	76
APENDICE 2. Tabla de cebadores.....	79
APENDICE 3. Medios para cultivo de tejido <i>in vitro</i> .....	80

## 1. RESUMEN

El DNA es una molécula que contiene la información genética de los organismos. Para la expresión de esta información es necesaria la transcripción de estos genes a moléculas de RNA mensajero (mRNA) y su posterior traducción a moléculas de polipéptidos. Tanto la traducción como la transcripción son procesos fuertemente regulados, ya que de ambos depende el desarrollo y la sobrevivencia de los organismos, así como su capacidad de respuesta a la condiciones externas.

El paso más complejo de la traducción es la fase de iniciación y está mediado por factores de iniciación, eIF. Uno de los primeros pasos en el proceso de traducción y de los más regulados es la interacción del factor eIF4E con el CAP del mRNA. Las plantas tienen una segunda forma (isoforma) del eIF4E, llamada eIFiso4E. Se ha encontrado que las isoformas eIF4E y eIFiso4E se expresan diferencialmente durante la germinación. En los ejes de semillas quiescentes, la isoforma eIFiso4E es mucho más abundante que eIF4E y mantiene así sus niveles durante toda la germinación. Mediante ensayos de traducción *in vitro* de los mensajes almacenados de maíz se demostró que los patrones de proteínas sintetizadas son diferentes dependiendo de la presencia de eIF4E o eIFiso4E en el sistema. Esto sugiere que las isoformas de eIF4E juegan un papel fundamental para definir el patrón de proteínas sintetizadas durante la germinación del maíz. Sin embargo, ha sido difícil estudiar la función de eIFiso4E o eIF4E durante este proceso, ya que no se cuenta con mutantes para los genes correspondientes a estas proteínas en maíz. Una alternativa a la mutación, que ha resultado muy útil, para estudiar la función de genes en una amplia gama de organismos es el silenciamiento por RNA interferente (RNAi).

De esta manera, el proyecto tuvo como objetivo obtener callos de maíz transformados con un vector hpRNA para eIFiso4E que permita silenciar la expresión del gen que codifica para la proteína correspondiente. Para cubrir el objetivo se clonó en sentido y anti-sentido del gen *eIFiso4E* de *Zea mays* L. en el vector pMCG161. Se transformaron callos embriogénicos de maíz por bombardeo con el vector generado y se evaluó el silenciamiento del factor eIFiso4E en callo transformado.

Se concluyó que se logró la transformación de callo embriogénico de maíz tipo II variedad costeño con el vector pMCG161-iso4E-as. Mediante la amplificación del gen *bar* en callos de maíz transformado resistente a glufosinato de amonio, se concluyó que dicho tejido contenía células transformantes, no obstante a nivel de callo embriogénico transformado no se pudo detectar el silenciamiento del factor eIFiso4E.

## 2. ANTECEDENTES

Una de las áreas de mayor importancia para comprender el funcionamiento de los seres vivos es la regulación de la expresión de sus genes. El DNA es la molécula que contiene la información genética en los organismos y su expresión implica la transcripción de esta información a moléculas de RNA mensajero (mRNA). Posteriormente, esta información es decodificada a moléculas de polipéptidos, las cuales llevan cabo la función del gen correspondiente.

La traducción de mRNA a proteína se puede dividir en tres distintas fases; iniciación, elongación y terminación. El paso más complejo es la fase de iniciación e involucra un gran número de factores reguladores. Asimismo, aunque este evento debe ocurrir tanto en procariontes como en eucariontes, existen variaciones importantes en el mecanismo dadas por la separación espacial-temporal de la transcripción y la traducción en los eucariontes.

### **2. 1. Mecanismos de Inicio de la traducción**

#### **2.1.1 Iniciación de la traducción en procariontes**

El proceso de inicio de la traducción fue elucidado durante los años 1960 y 1970 mediante estudios bioquímicos que utilizaban aminoácidos marcados radioactivamente y lisados fraccionados derivados de células de bacterias y de mamíferos.

En procariontes, la transcripción está acoplada temporalmente y espacialmente a la traducción, permitiendo el inicio de la síntesis de proteínas en mRNA que aún están siendo transcritos. Estos mRNA son usualmente policistrónicos, poseyendo múltiples señales de iniciación y terminación de la síntesis de proteínas. El reconocimiento del mRNA por el ribosoma ocurre mediante la secuencia Shine-Dalgarno ubicada 10 bases río arriba del codón de inicio, la cual es complementaria a una secuencia en el extremo 3' del RNA ribosomal 16S, que forma parte de la subunidad pequeña 30S del ribosoma. El inicio de la

traducción en procariontes requiere de tres factores de inicio de la traducción; IF1, IF2 e IF3 (Hinnebusch *et al*, 2000).

El mecanismo de inicio de la traducción en procariontes comienza con la disociación de la subunidad 70S, la cual está formada por las subunidades 30S y 50S en un equilibrio dinámico. El factor IF3 se une establemente a la subunidad ribosomal 30S y previene su re-asociación con la subunidad 50S. La subunidad 30S unida a IF3 se une subsecuentemente a IF1 y a IF2-GTP (Hinnebusch *et al*, 2000).

Posterior a esto, tanto fMet-tRNA como el mRNA se unen a la subunidad 30S para formar un complejo relativamente estable que se unirá a otro de estos complejos. El complejo ternario que se forma sufre un cambio conformacional que genera un complejo de iniciación 30S más estable. A pesar de que no existe un orden en la unión del complejo, ciertos mRNA prefieren un mecanismo de ensamblaje sobre otro. La unión de fMet-tRNA es promovida y acelerada por IF2 e IF3. El IF2 detecta el único grupo formilmetionil del tRNA iniciador, de esta manera sólo se une a fMet-tRNA y no a los tRNA aminoacilados implicados en la elongación. El complejo de iniciación 30S se une a la subunidad 50S para formar el complejo 70S que contiene mRNA, fMet-tRNA e IF2-GTP. El ribosoma 70S cataliza la reacción de una GTPasa que resulta en una rápida liberación de IF2-GDP. El complejo de iniciación 70S resultante es competente para entrar a la fase de elongación (Hinnebusch *et al*, 2000).

Cerca de 90% de los mRNA bacterianos inician la síntesis de proteínas en el codón AUG; otros en los codones GUG (8%) y UUG (1%). Estos tres codones son llamados canónicos, basándose en la no discriminación de ellos por IF3. Otros codones como AUU son llamados no canónicos, ya que los discrimina IF3 y son utilizados mucho menos frecuentemente. Una vez reconocido el codón de inicio se da paso a la elongación y terminación de la síntesis de proteínas (Hinnebusch *et al*, 2000).

### 2.1.2 Iniciación de la traducción en eucariontes

A diferencia de los procariontes, el mRNA de eucariontes debe sufrir procesamientos post-transcripcionales como son la adición del capuchón en el extremo 5': CAP (m<sup>7</sup>GpppX, donde X es cualquier nucleótido); la adición de una cola de poliadeninas en el extremo 3': poly(A); y la remoción de secuencias intrónicas. El mRNA maduro es monocistrónico, pero contiene dos regiones importantes que no son traducibles (UTR) y que están en cada extremo de la molécula: 5'UTR y 3'UTR, flanqueando la región codificadora del mRNA (ORF). Todos los mRNA eucarióticos (excepto aquéllos presentes en organelos) tienen en su extremo 5' el CAP y no contienen una secuencia Shine-Dalgarno. En la mayoría de los eucariontes (pero no en plantas y hongos) la penúltima base (X) es también metilada en la posición 2'hidroxilo de la ribosa y la estructura de CAP resultante es llamada CAP 1; cuando la posición no está metilada se llama CAP 0. El CAP facilita la traducción del mRNA y también es importante para otros procesos, incluyendo la remoción de intrones y la estabilidad del propio mRNA. La cola de poly(A) en el extremo 3', varía en longitud desde 50 bases de largo en levaduras a más de 200 bases de largo en eucariontes superiores. Este elemento juega un papel importante en la estabilidad del mRNA y en la eficiencia de la traducción (Gingras *et al*, 1999). El inicio de la síntesis de proteínas en todos los organismos empieza con las subunidades ribosomales separadas (Figura 1). Durante la etapa de iniciación de la traducción en eucariontes, el reclutamiento de un mRNA hacia el ribosoma es mediado por al menos 10 factores de iniciación (eIF). Este grado de complejidad refleja los múltiples pasos en el proceso y los elaborados mecanismos para su regulación (Merrick *et al*, 1996). El mRNA, por lo general, es reconocido por la maquinaria de traducción mediante el factor eIF4E que se une a la región 5' CAP. El eIF4E, mediante su interacción con el factor eIF4G, una molécula de anclaje, forma el complejo eIF4F. Posteriormente, eIF4G es capaz de reclutar al eIF3, que se encuentra unido a la subunidad ribosomal pequeña 40S, a eIF4A y eIF4B, helicasas capaces de desenrollar estructuras secundarias presentes en la región 5'UTR del mRNA, mediante su actividad de ATPasa. El tRNA iniciador aminoacilado forma un complejo ternario con el factor eIF2 y GTP que se une a la subunidad 40S (Gingras *et al*, 1999).

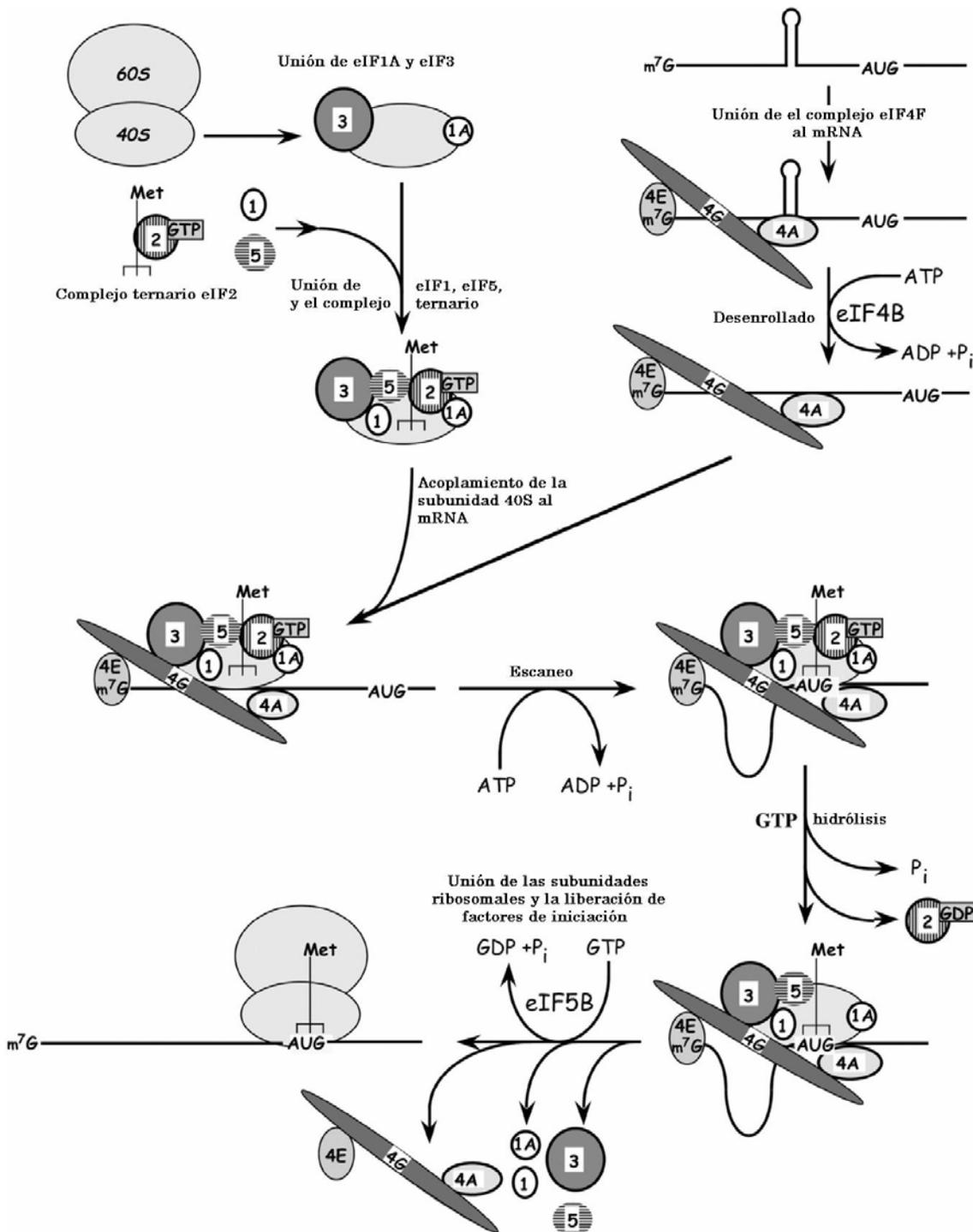


Figura 1. Esquema general del inicio de la traducción en eucariotes. El factor eIF4E reconoce la estructura 5'Cap y mediante su interacción con el factor eIF4G forma el complejo eIF4F posibilitando el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S. El tRNA de iniciación forma, un complejo ternario con el eIF2 y GTP. El factor eIF3 forma un complejo multimérico con el eIF4G, eIF1A, eIF2-tRNA<sup>met</sup> y eIF5 para el escaneo de la región 5'UTR del mRNA hasta encontrar un codón de inicio AUG. La interacción de eIF4G con la proteína de unión a PolyA (PABP) garantiza la circularización del mRNA. Una vez encontrado el codón de inicio de la traducción AUG, el complejo de iniciación activado permite la interacción del factor eIF5 con el factor eIF2 y se activa la hidrólisis de GTP unido a este factor. La hidrólisis de GTP promueve la liberación de algunos factores de iniciación y permite la unión de la subunidad 60S para formar el ribosoma 80S.

La presencia otros eIF como eIF1 y eIF5 facilitan la unión del tRNA iniciador al sitio P y es excluido del sitio A ribosomal. Además, el tRNA iniciador tiene una secuencia y estructura única que no se encuentra en los tRNA de elongación, éstas propiedades permiten que interaccione con el factor eIF2. Finalmente, la interacción del mRNA con el complejo eIF4F también contribuye a su estabilidad, a través de la interacción entre eIF4G y la proteína de unión a poly(A) (PABP), garantizando la circulación del mRNA e incrementando su eficiencia de traducción. (Figura 2; Robaglia *et al*, 2006).

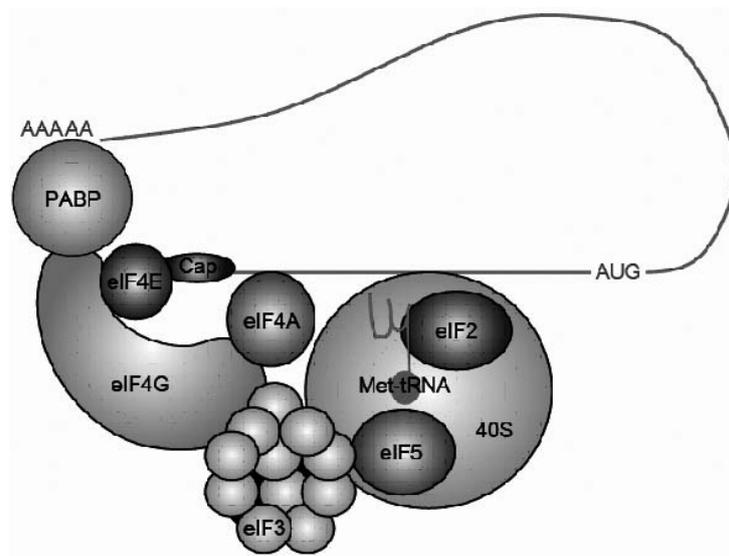


Figura 2. Esquema del inicio de la traducción en plantas. Se reclutan los factores de inicio de la traducción gracias al factor eIF4G que sirve como molécula de anclaje para la proteína PABP y de eIF4E, presentando circularización del mRNA, incrementando la eficiencia de la traducción. Este mismo factor sirve de anclaje para el complejo eIF3, de tal forma que se reclutan todos los factores de inicio de la traducción y así poder iniciar la síntesis de proteínas. Modificado de Robaglia *et al*, 2006)

### 2.1.2.1 El Factor eIF4E

El factor eIF4F es un complejo de unión al CAP que consiste de eIF4E, eIF4G y eIF4A. De todos los factores, el CAP es reconocido únicamente por eIF4E. La gran mayoría de los organismos eucariontes, a excepción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, tienen múltiples isoformas de este factor que están altamente conservadas: existen tres en mamíferos, llamadas eIF4E-1, 4EHP y eIF4E-3; tres en plantas, eIF4E, eIFiso4E, nCBP; cinco en *C. elegans*; dos en *Danio rerio*; dos en *Xenopus*; dos en *Schizosaccharomyces pombe*; dos en

*Leishmania* y ocho en *Drosophila* (Joshi. *et al*, 2005). Algunas isoformas de eIF4E están restringidas a ciertos grupos filogenéticos, por ejemplo eIFiso4E que sólo se encuentra en plantas (Browning *et al*, 1992; Browning 1996). De todos los organismos que presentan varias proteínas eIF4E, sólo una isoforma es expresada constitutivamente y parece ser la responsable del papel general dentro de la traducción. Esta isoforma es representada como eIF4E-1 en *Drosophila*, eIF4E-1 en mamíferos, eIF4E en plantas, IFE-3 en *C. elegans* (Hernández *et al*, 2005). Se ha propuesto que las otras isoformas de eIF4E son activas en tejidos particulares o que unen ciertos mRNA. Esto les conferiría una considerable versatilidad en su actividad o una función completamente diferente, como se ha demostrado para eIF4E-8/d4EHP en *Drosophila* (Cho *et al*, 2005).

Una forma de regulación que se ha observado para eIF4E es la fosforilación. Se propone que esta modificación estabiliza la interacción entre eIF4E y eIF4G y también su unión al mRNA (Pestova *et al*, 2000; Gingras *et al*, 1999).

En organismos eucariontes diferentes a las plantas, además de eIF4G, existen otras proteínas que interactúan con eIF4E y regulan su actividad. Entre éstas, se encuentra el factor 4E-BP (proteína de unión a 4E). La interacción del 4E-BP con eIF4E ocurre en el mismo sitio donde lo hace eIF4G. Por lo tanto, eIF4E es secuestrado por 4E-BP afectando la formación de complejos de iniciación y por ende la traducción. Cuando la célula requiere elevar los niveles de traducción, como por ejemplo durante el crecimiento y división celular, 4E-BP es fosforilada por una vía de traducción de señales que responde a insulina y a factores de crecimiento. La proteína fosforilada pierde afinidad por eIF4E, liberándolo para el inicio de la traducción (Gingras *et al.*, 1999)

### **2.1.2.2 Iniciación de la traducción en plantas**

El proceso de iniciación de la traducción es similar en todos los eucariontes; no obstante existen diferencias en los factores de iniciación entre mamíferos, plantas y levaduras. Las diferencias más notables entre plantas y otros eucariontes se dan a nivel de los factores de iniciación eIF4E, eIF4G, eIF3, eIF4B y eIF2.

El factor eIF3 es el más complejo de los factores de iniciación. Se han encontrado dos subunidades que son únicas para eIF3 de plantas y que no tienen proteínas ortólogas en el complejo de mamíferos. Aún no se conoce el papel de éstas dos subunidades pero se cree que probablemente son un blanco para la regulación (Burks *et al*, 2001).

Cada uno de los factores de iniciación, excepto el eIF4B, muestra un alto grado de conservación entre eucariontes. El eIF4B es una proteína de unión a RNA que estimula la actividad del complejo eIF4F. Los distintos mRNA muestran diferentes preferencias hacia eIF4F o eIFiso4F en presencia de diferentes formas de eIF4B (Browning, 2004). Se sabe que los eIF4B de plantas y mamíferos están altamente fosforilados, sugiriendo que esta fosforilación juega un papel regulatorio en la iniciación de la traducción (Le *et al*, 2000).

El factor eIF2 de plantas no difiere mucho en composición, ni en secuencia de aminoácidos del de otros eucariontes. Este factor está formado por tres subunidades; la fosforilación de la subunidad eIF2 $\alpha$  en mamíferos y levaduras por un grupo de cinasas, activa una vía de señalización que previene el recambio de eIF2-GDP por eIF2-GTP realizado con ayuda del factor eIF2B (Hinnebusch *et al*, 2000). De esta manera, la célula puede apagar la síntesis de proteínas en condiciones adversas. En plantas se ha reportado la existencia de una cinasa con actividad similar, PKR (proteína cinasa dependiente de RNA de doble cadena) la cual fosforila eIF2 y parece tener un rol en patogenicidad viral (Bilgin *et al*, 2003)

El factor eIFiso4F tiene actividad *in vitro* similar al complejo eIF4F. Sin embargo, las subunidades eIF4G y eIFiso4G son sustancialmente diferentes en masa molecular, 180 kDa contra 86 kDa (Browning, 1996) La subunidad eIFiso4G carece de una porción considerable en el dominio N-terminal cuando se le compara con eIF4G. Esto sugiere que su papel en la regulación de la traducción es muy diferente (Gallie *et al*, 2001).

### 2.1.2.3 El Factor eIF4E en plantas

El complejo eIF4F en plantas consiste en una subunidad eIF4E de 26 kDa y una subunidad eIF4G de aproximadamente 220 kDa. El segundo complejo llamado eIFiso4F contiene una subunidad eIFiso4E de 28 kDa y otra subunidad de eIFiso4G de 86 kDa (Browning *et al*, 1992). A pesar de que eIF4F y eIFiso4F tienen la misma actividad durante la traducción *in vitro*, un gran número de estudios sugieren que los dos complejos podrían tener diferente función *in vivo*. Primero, eIFiso4F tiene menor afinidad por análogos de CAP monometilados que por los análogos dimetilados, mientras que la preferencia de afinidad para eIF4F es el recíproco (Revisado en Carberry y Goss, 1991).

Segundo, eIFiso4F tiene una preferencia de unión a RNA con estructura lineal cerca del CAP, mientras que la unión por eIF4F es sensible a la posición y secuencia de estructuras tipo tallo-asa cerca del CAP. Tercero, eIFiso4F tiene un estrecho pH óptimo (7.6) de unión a m<sup>7</sup>GpppG, mientras que eIF4F no tiene diferencia en el rango fisiológico de pH (6.8-7.6) (Carberry *et al*, 1991). Cuarto, se ha observado que eIFiso4F traduce preferencialmente mRNA con colas 5'Cap-3'poly(A) que no tienen en el extremo 5' una región UTR larga y estructurada (Kawaguchi *et al*, 2002) Por último, los factores eIF4E y eIFiso4E de diferentes especies de plantas son expresados diferencialmente en tejidos y/o en diferente estado del desarrollo (Tabla 1), lo que sugiere un grado de diversidad funcional.

Tabla 1. Localización y patrón de expresión de los factores de inicio de la traducción eIFiso4E y eIF4E de distintas plantas.

Especie	Proteína	Localización y patrón de expresión	Fuente
<i>A. thaliana</i>	At eIF4E	mRNA expresado en todos los tejidos, excepto en algunas células de raíz	Rodríguez <i>et al</i> , 1998
<i>A. thaliana</i>	At eIFiso4E	mRNA enriquecido en flores y tejidos jóvenes	Rodríguez <i>et al</i> , 1998
<i>T. aestivum</i> (Trigo)	Ta eIF4E	Proteína constitutivamente expresada durante desarrollo de semilla, con baja expresión durante las primeras etapas. Después de 5-7 días post-germinación su nivel decrece en hojas pero se mantiene en escutelo y raíz.	Gallie <i>et al</i> , 1998
<i>T. aestivum</i> (Trigo)	Ta eIFiso4E	Expresión de la proteína constante durante el desarrollo medio y alto de la semilla. Después de 5-7 días post-germinación su nivel decrece en hojas pero se mantiene en escutelo y raíz.	Gallie <i>et al</i> , 1998
<i>Z. mays</i> (maíz)	Zm eIF4E	mRNA expresado altamente en células con altas tasas de división celular, como hojas inmaduras y endospermo.	Manjunath <i>et al</i> , 1999.
<i>Z. mays</i> (maíz)	Zm eIFiso4E	mRNA altamente expresado en células con altas tasas de división celular, como raíz, hojas inmaduras y endospermo.	Manjunath <i>et al</i> , 1999.

Ruud *et al* (1998) describieron una nueva proteína de unión a CAP en plantas (nCBP), la cual también presenta afinidad diferente por estructuras CAP metiladas. Esta proteína tiene ortólogos en animales y está altamente conservada (Ruud *et al*, 1998)..

La presencia de diferentes proteínas de tipo eIF4E está ampliamente distribuida entre los organismos eucariontes, a excepción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Desde hace tiempo se ha planteado que las diferentes isoformas podrían participar en mecanismos de regulación específicos de traducción en dependencia del momento de desarrollo, tipo de tejido, o respuesta a un estímulo externo del organismo. Algunos estudios recientes han abierto nuevas perspectivas sobre esta hipótesis al encontrar funciones particulares para algunas de las isoformas de eIF4E en la regulación

de la traducción de algunos mRNA específicos (Dinkova *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2005).

### **2.1.3. La germinación de maíz como modelo para el estudio de la regulación mediada por eIF4E.**

#### **2.1.3.1 Generalidades del maíz**

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta monocotiledónea, anual, herbácea y monoica, cuyas células poseen 2n cromosomas; con un gran desarrollo vegetativo que puede alcanzar hasta los 5 m de altura (el promedio es de 2 a 2.5 m). Es muy robusta, de tallo nudoso y macizo, con 15 a 30 hojas alargadas y abrasadoras (4 a 10 cm de ancho por 35 a 50 cm de largo), de borde áspero, finamente ciliado y algo ondulado. Posee un sistema radicular fasciculado bastante extenso formado por tres tipos de raíces: primarias, secundarias o principales y aéreas o adventicias (Castañeda, 1990).

El maíz posee flores masculinas y femeninas. Las flores masculinas se agrupan en una panícula (penachos o pendones) terminal y las femeninas se reúnen en varias espigas (panojas) que nacen de las axilas de las hojas del tercio medio de la planta (Castañeda, 1990). El fruto del maíz (grano) lo describe Reyes (1980) como una cariósida formada por la cubierta o pericarpio (6% del peso del grano), el endospermo (80%) y el embrión (14%). Tiene de 50-70% de carbohidratos en la semilla secada al aire contra 5% de lípidos. El porcentaje restante es de proteínas divididos en 31% de proteína total de gluteína, 14% de albumina y 48% de prolamina (Moreno, 2003)

Un estudio a gran escala ha revelado que el genoma de maíz contiene aproximadamente 56 000 genes, el 7.5% del genoma. Mas de la mitad del genoma (58%) está compuesto de todo tipo de elementos repetidos, principalmente retroelementos y transposones de DNA. Existen secuencias desconocidas que ocupan el espacio entre estos elementos repetidos y regiones codificantes identificables, el restante 34.5%. A pesar de que un tercio de los genes del maíz están organizados en tándem, menos de la mitad están

presentes como dos copias ortólogas, indicando una gran pérdida de genes duplicados durante el proceso de diploidización seguido de la hibridación de dos progenitores (Yu *et al*, 2006; Messing *et al*, 2006).

En México, la gran diversidad de ambientes ha traído como consecuencia la diversidad de tipos, razas y variedades de maíz adaptados prácticamente a todas las condiciones que se pueden presentar en el país. Debido a esto, se puede encontrar maíz cultivado desde las costas de ambos océanos hasta más de 3000 metros sobre el nivel del mar, con las temperaturas medias mensuales, durante su ciclo vegetativo, de 28° C en las zonas más cálidas y de 12° C o menos en las zonas más frías.

### **2.1.3.2 La germinación en maíz**

La germinación de las semillas puede definirse como la serie de cambios morfológicos y bioquímicos que conllevan a la transformación de un embrión en plántula. Algunas semillas son capaces de germinar inmediatamente después de haber completado su desarrollo, inclusive antes del tiempo normal de cosecha. Sin embargo, luego de que el crecimiento del embrión se detiene y el contenido de humedad disminuye, las semillas de muchas especies habitualmente atraviesan por un período de inactividad o latencia. Durante esta etapa, el embrión mantiene una mínima respiración y es cuando está mejor capacitado para resistir las condiciones desfavorables del medio. El proceso de germinación es esencialmente la reiniciación del crecimiento del embrión una vez superado el período de latencia y cuando las condiciones de temperatura, luz, disponibilidad de oxígeno y agua son las adecuadas (Moreno, 2003).

Independientemente del tiempo entre la madurez de la semilla y la reactivación del crecimiento, la germinación se puede caracterizar por su patrón trifásico. La fase I de imbibición, es un proceso físico cuya fuerza directriz está determinada por la diferencia de potencial agua entre la semilla y el sustrato que la rodea. Es independiente de la actividad metabólica de la semilla. Una vez incorporada una cierta cantidad de agua, que varía según la especie, comienza la fase II de activación metabólica. Durante esta fase en la que predominan los procesos

catabólicos, se activan las enzimas para el desdoblamiento y movilización de las reservas (almacenadas ya sea en el embrión, endospermo o perispermo) hacia el eje embrionario donde el tejido quiescente se vuelve metabólicamente activo. La fase III de crecimiento o germinación propiamente dicha se inicia al producirse elongación celular y división celular. El primer signo de que la germinación se ha completado es la evidencia de la emergencia de la radícula que ha atravesado el tejido que la rodea (Moreno, 2003)

En una etapa temprana de la germinación, inmediata a la imbibición, se detecta la síntesis de proteínas. Este es uno de los eventos más importantes y de ocurrencia temprana durante la germinación de las semillas. En los embriones de semillas maduras se encuentran todos los componentes requeridos para el proceso de síntesis de proteínas incluyendo un grupo de mRNA específicos, almacenados en el eje embrionario en estado quiescente. Sin embargo, no hay polisomas formados. La traducción de estos mensajes ocurre de manera diferencial, ya que algunos de ellos son traducidos en etapas muy tempranas de la germinación, mientras que otros se traducen en etapas más tardías a pesar de estar presentes desde el inicio del proceso. Esta traducción diferencial sugiere la regulación de este proceso. La transcripción de genes, se observa en una etapa posterior a la del inicio de la traducción. Se considera que a medida que avanza el proceso germinativo, la síntesis de proteínas se hace más dependiente de la transcripción de mRNA *de novo*. Algunos de estos nuevos mensajeros codifican para proteínas codificadas en los mensajeros almacenados, pero muchos codifican para productos diferentes, probablemente esenciales para la división celular y el crecimiento posterior de la plántula. En las semillas de maíz la síntesis replicativa de DNA inicia alrededor de las 15 horas de germinación, y precede a la protrusión de la radícula. Sin embargo, la germinación no es producto de la división celular, sino de la elongación celular de la radícula, la cual causa la ruptura de la testa. Finalmente la división celular es el evento más tardío de la germinación. El reinicio de la proliferación celular se presenta únicamente en las zonas meristemáticas del embrión, y constituye un evento tardío que ocurre normalmente en maíz alrededor de 24 – 36 horas de germinación (Moreno, 2003).

Debido a la traducción diferencial de mRNA durante la germinación de maíz, este proceso es utilizado como modelo de estudio a nivel de control traduccional.

### 2.1.3.3 El control traduccional en la germinación

En maíz el gen *eIF4E*, de 922 pb, codifica para un marco de lectura abierto de 218 aminoácidos (21.9 kDa). El gen *eIFiso4E*, de 1166 pb, codifica para un marco abierto de lectura de 216 aminoácidos (21.7 kDa). Entre las secuencias de aminoácidos de *eIFiso4E*, conocidas en plantas, los rangos de identidad varían entre 62 y 78%. La identidad entre *eIFiso4E* y *eIF4E* en maíz es de 45-50% (Manjunath *et al.*, 1999). Se ha encontrado que las isoformas *eIF4E* y *eIFiso4E* se expresan diferencialmente durante la germinación. En los ejes de semillas quiescentes, la isoforma *eIFiso4E* es mucho más abundante que *eIF4E* y mantiene así sus niveles durante toda la germinación (Dinkova *et al.*, 2000). En cambio, la isoforma *eIF4E* incrementa su concentración (tanto de proteína como del mensajero) hacia el final de la germinación. Mediante ensayos de traducción *in vitro* de los mensajes almacenados de maíz, se demostró que los patrones de proteínas sintetizadas son diferentes dependiendo de la presencia de *eIF4E* o *eIFiso4E* en el sistema (Dinkova *et al.*, 2003). Esto sugiere que las isoformas de *eIF4E* juegan un papel importante para definir el patrón de proteínas sintetizadas durante la germinación del maíz. Sin embargo, ha sido difícil estudiar la función de *eIFiso4E* o *eIF4E* *in vivo* durante la germinación de maíz, ya que no se cuenta con mutantes para éstas isoformas.

Una aproximación para la determinación de funciones tanto de genes como de sus respectivas proteínas es el reducir o silenciar la expresión de un gen de tal manera que esto induce un fenotipo mutante que es indicativo de la función de dicho gen. La mutagénesis insercional es una poderosa herramienta para este tipo de estudios y está basada en transposones/inserciones de T-DNA. Sin embargo, este método es limitado por el tiempo requerido para saturar el genoma, por fenotipos letales y está restringido a pocas especies de plantas. Además, es complicado debido a la redundancia genética causada por familias

multigénicas y poliploidía Una alternativa a la mutagénesis insercional que ha sido ampliamente utilizada es el silenciamiento por RNA interferente (RNAi) (Travella *et al.*, 2006).

## **2.2. Silenciamiento por RNA de interferencia**

### **2.2.1 Historia del silenciamiento en plantas**

El silenciamiento por RNA de interferencia es el proceso por el cual se inhibe de manera específica la expresión de un gen, a través de la degradación del RNA mensajero de ese gen, evitando así la síntesis de proteína. Dado que el flujo de información genética se interrumpe a nivel de síntesis de proteína, éste es un mecanismo de silenciamiento génico a nivel post-transcripcional.

El fenómeno de interferencia por RNA, descubierto en 1998 en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, está relacionado mecanísticamente a los fenómenos de silenciamiento génico reportados inicialmente en plantas en 1990, conocidos como “co-supresión”, “silenciamiento génico postranscripcional” o “silenciamiento postranscripcional inducido por virus”. El que este mecanismo se encuentre en diversos organismos eucariontes, desde protistas y hongos, hasta plantas, invertebrados y mamíferos, indica que es un mecanismo ancestral conservado evolutivamente. Una de las creencias originales sobre la función de este mecanismo es el de defensa viral, sin embargo, ahora se sabe que este mecanismo no sólo defiende a las plantas en contra de virus sino también protege al genoma de transposones, regula la expresión genética (Baulcombe, 2004) y juega un papel en el remodelado de cromatina (Qi *et al.*, 2005)

## 2.2.2 Mecanismos de silenciamiento en plantas

En plantas existen 3 mecanismos de silenciamiento por RNA. El primero comprende el silenciamiento post-transcripcional (PTGS) de genes mediado por pequeños RNA de interferencia (siRNA) de aproximadamente 21 pb que son procesados de RNA de doble cadena (dsRNA). En el segundo mecanismo intervienen una clase de pequeños RNA endógenos, microRNA (miRNA) de 21-24 pb de longitud. Tanto los miRNA como los siRNA regulan negativamente la expresión genica a través del apareamiento de las bases con mRNA blanco, dando una degradación de mRNA o la inhibición de la traducción o ambos.

El tercer mecanismo de silenciamiento es el silenciamiento transcripcional de genes (TGS) que está asociado a las modificaciones de la cromatina dirigidas por siRNA incluyendo la metilación del DNA y las modificaciones de histonas (Qi *et al.*, 2005; Baulcombe, 2004).

### 2.2.2.1 Mecanismo de silenciamiento por RNA de interferencia

El silenciamiento por RNA de interferencia (RNAi) está basado en la degradación secuencia-específica de RNA, debida a la formación de moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA) homólogas en secuencia al gen blanco. Este método de RNAi permite silenciar uno, varios o todos los miembros de una familia multigénica o copias de genes homólogos en poliploides, mediante secuencias blanco que son únicas o compartidas por diversos genes (Travella *et al.*, 2006).

Este tipo de silenciamiento persiste durante la división celular y es heredado a las siguientes generaciones, además, se ha demostrado un alto grado de eficiencia en la interferencia de expresión de genes en diferentes sistemas de plantas, como: *Petunia hybrida*, *Arabidopsis thaliana*, *Papaver somniferum*, , *Coffea arabica*, *Oryza sativa*, *Tricum aestivum* y *Torenia hybrida* (Jorgesen *et al.*, 1996; Chuang *et al.*, 2000; Wesley *et al.*, 2001; Stoutjesdijk *et al.*, 2002; Allen *et al.*, 2004; Fukusaki *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Ogita *et al.*, 2004; Miki *et al.*, 2005; Travella *et al.*, 2006)

El mecanismo por el cual un gen se silencia por RNA de interferencia es utilizando la maquinaria de defensa viral de la planta (Fusaro *et al.*, 2006). Comienza con la transcripción de un gen por una RNA polimerasa II (Xie *et al.*, 2004) que dará como resultado un RNA precursor con una estructura secundaria en forma de tallo-asa. Los precursores son reconocidos y procesados a pequeños RNA interferentes de doble cadena (siRNA) por enzimas tipo dicer (DCLs).

Las proteínas DCL forman parte de la familia de RNasas clase III. En *Arabidopsis thaliana* se han descrito cuatro DCL; DCL1-4. Éstas actúan en mecanismos distintos y producen siRNA o miRNA de diferentes longitudes (Tabla 2).

Tabla 2. Características de las proteínas DCL presentes en plantas.

Proteína	Dominios y motivos	Mecanismo	siRNA	Función
DCL1	RNasa III Unión a dsRNA DEAD-box helicasa PAZ	miRNA nat-siRNA	21 pb	RNasa III (Park <i>et al.</i> , 2002)
DCL2	RNasa III Unión a dsRNA PAZ	nat-siRNA Silenciamiento por RNAi	22 pb	RNasa III (Xie <i>et al.</i> , 2004)
DCL3	RNasa III DEAD-box helicasa PAZ	Remodelaje de cromatina, mediante metilación de DNA y modificación de histonas por RNA.	24 pb	RNasa III (Xie <i>et al.</i> , 2004)
DCL4	RNasa III Unión a dsRNA DEAD-box helicasa PAZ	ta-siRNA Silenciamiento por RNAi	21 pb	RNasa III (Dunoyer <i>et al.</i> , 2005)

En el silenciamiento por RNA de interferencia mayoritariamente se producen fragmentos de 21 pb, aunque también de 22 y 24 pb (Fusaro *et al.*, 2006). Fusaro demostró que los únicos fragmentos que son responsables de este tipo de silenciamiento, son los de 21 y 22 pb, producidos por DCL4 y DCL2 respectivamente (Fusaro *et al.*, 2006).

Las enzimas DCL realizan el corte en el dsRNA en compañía de una proteína de unión a dsRNA, R2D2 (Figura 3). Como resultado se liberan dúplex

asimétricos de RNA, dejando 2 pb desapareados en el extremo 3' de cada hebra. Dependiendo de la fuerza del apareamiento que queda en cada extremo del dsRNA, decir se posiciona en el extremo menos estable y R2D2 en el otro (Vaucheret, 2006). Estos dúplex de siRNA son metilados por la enzima hua enhancer 1 (HEN 1) (Li *et al.*, 2005). HEN 1 es una S-adenosil metionina metil transferasa que metila en el extremo 2' hidroxilo de los dúplex de siRNA, una reacción aparentemente específica del reino vegetal (Brodersen y Voinnet, 2006). Las enzimas DCL y HEN 1 están en núcleo, una vez que los dúplex de siRNA son metilados, éstos son exportados a citoplasma por HASTY, un ortólogo de exportina 5, EXP5, en mamíferos (Park *et al.*, 2005). Se ha sugerido que estos siRNA no sólo se exportan a citoplasma por HASTY sino también por otras vías como la asociación con AGO1 (Vaucheret, 2006).

Una vez en el citoplasma los siRNA son llevados a un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), donde una de las proteínas efectoras es argonauta (AGO1) (Figura 3). Las proteínas, AGO, también llamadas PPD por sus dominios canónicos PAZ y PIWI, están altamente conservados entre diferentes reinos y actúan en la mayoría de las vías de los pequeños RNA. RISC es un complejo efector que guía hacia una degradación del mRNA blanco o a la inhibición de la traducción. El dúplex de siRNA contiene una hebra guía y otra pasajera, para que la proteína AGO tome la hebra guía depende del dominio PAZ que se une a los 2 pb sobresalientes en el extremo 3' del siRNA. El extremo 5' de la hebra se estabiliza por un catión divalente que esta localizado en el dominio PIWI (Vaucheret, 2006).

Antes de que el mRNA blanco y la hebra guía se hibriden en RISC, la hebra pasajera del siRNA es degradada entre los nucleótidos 10 y 11 de la hebra guía. La actividad de cortador de la proteína AGO, que degrada tanto la hebra pasajera como el mRNA blanco, resulta de un dominio RNasa H que lleva a cabo un ataque nucleolítico (Vázquez, 2006).

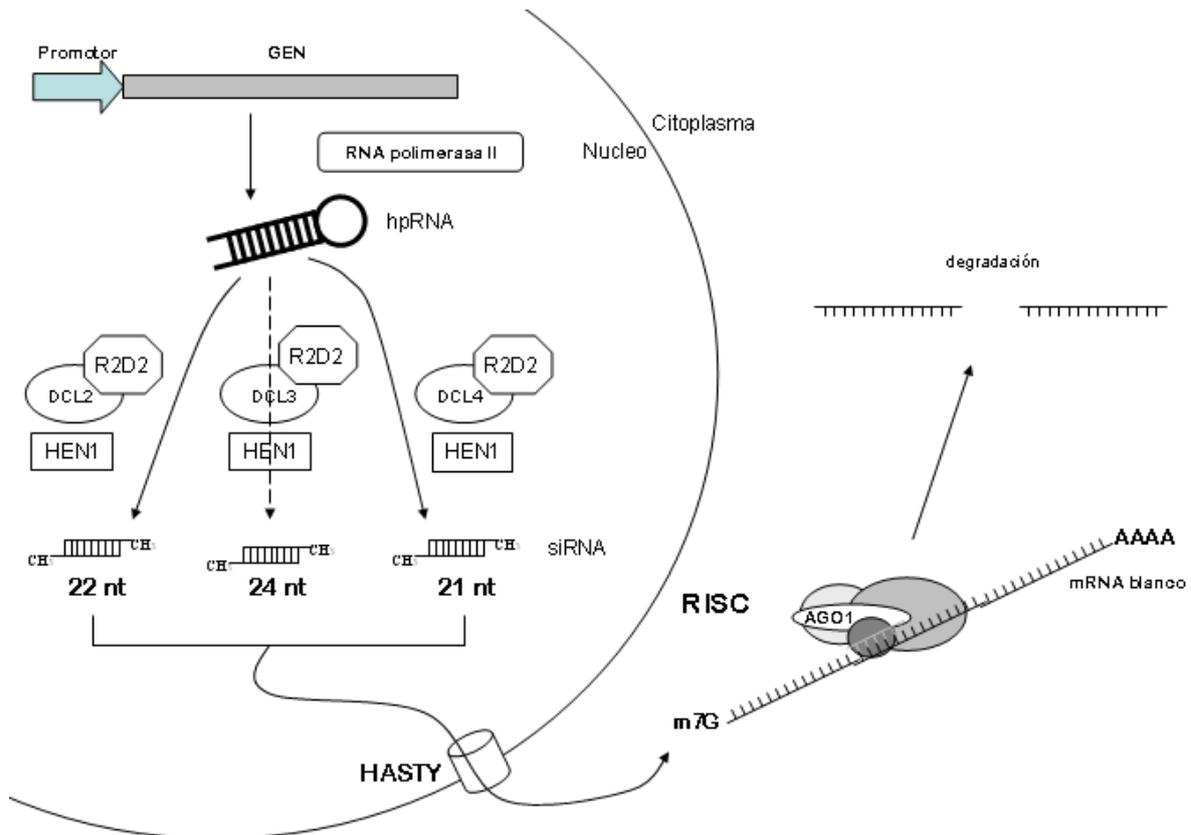


Figura 3. **Mecanismo de silenciamiento por RNA de interferencia en plantas.** La RNA polimerasa II transcribe un gen que forma un RNA de doble cadena (dsRNA) en forma de tallo, el cual es reconocido y procesado por RNasa de clase III; DCL2, DCL3, DCL4. Estas enzimas producen fragmentos de dsRNA de 22, 24 y 21 pb, respectivamente. Estos fragmentos son metilados por la enzima HEN1 y son transportados a citoplasma por el transportador HASTY. Una vez en citoplasma son procesados en RISC, por la enzima AGO1; la cual elige la hebra guía que se hibridará al mRNA blanco, una vez hibridada AGO1 degrada al mRNA, por ende se inhibe la traducción de ese gen.

En *Arabidopsis thaliana* se han descrito 10 proteínas de la familia ARGONAUTA. AGO 1 tiene la actividad de endonucleasa cortador que degrada el mRNA hibridado al siRNA. La evidencia sugiere que AGO1 y AGO10 (la más relacionada con AGO1) tienen funciones redundantes, no obstante AGO2, AGO3, AGO5 y AGO7 tienen los residuos funcionales para la actividad de cortador (Baumberger *et al.*, 2005).

Una vez degradado el mRNA blanco, en algunos organismos el silenciamiento es amplificado. En plantas y *C. elegans* este fenómeno es conocido como "transitivity", el cual incrementa la cantidad inicial de siRNA mediante la producción de nuevos siRNA correspondientes a las secuencias localizadas en el exterior de las regiones blanco primarias de un transcrito. En *C. elegans* y en

*Arabidopsis*, este fenómeno requiere de la acción de RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRp). La ocurrencia de este fenómeno en plantas, parece depender del transcrito: algunos mRNA emplean este proceso, otros no. La razón por la cual existe esta disparidad aun se desconoce, pero podría estar relacionada con la accesibilidad del transcrito y su localización subcelular (Himber *et al*, 2003).

El silenciamiento por RNA autónomo está muy documentado en plantas, donde la activación del silenciamiento causa degradación secuencia-especifica del transcrito blanco en tejidos localizados en el exterior de la zona de inicio. Evidencia indirecta indica que el silenciamiento por RNA se mueve a través de grandes distancias, se disemina de célula a célula a través del plasmodesmo (poros membranales que conectan células adyacentes) se disemina en un número constante de 10-15 células adyacentes (Wassenegger *et al*, 2006). Este movimiento extensivo está asociado con la síntesis *de novo* de siRNA secundarios producidos por “transitivity” (Himber *et al*, 2003). Este mecanismo está basado en la amplificación del dsRNA por la RNA polimerasa RDR6 generando así siRNA secundarios, exclusivamente de 21 nt. Otra molécula que contribuye a la extensión del silenciamiento, aunque no al grado de RDR6, es la RNA helicasa SDE3 (Voinnet, 2005).

El modelo planteado por Himber (Himber *et al*, 2003) para el movimiento de célula a célula del silenciamiento por RNA en plantas (Figura 4) propone que la iniciación local del silenciamiento produce siRNA primarios de 21 y 24 nt. Estos siRNA se pueden mover a 10-15 células adyacentes, independientemente de la presencia del transcrito homólogo en esas células. La ola inicial de movimiento tiene dos posibles resultados. Uno es la síntesis de siRNA secundarios de 21 nt mediante la acción de RDR6, SDE3 y DCL4 usando el transcrito homólogo como base, los cuales a su vez se pueden mover a 10-15 células adyacentes para iniciar el mismo proceso nuevamente, derivando en un movimiento extensivo. El segundo resultado posible es el que el silenciamiento no se moviera debido a la falta de transcritos homólogos que funcionen como base para RDR6, SDE3 y DCL4. Esto no permitiría la nueva producción de siRNA de 21 nt y el movimiento pararía (Himber *et al*, 2003).

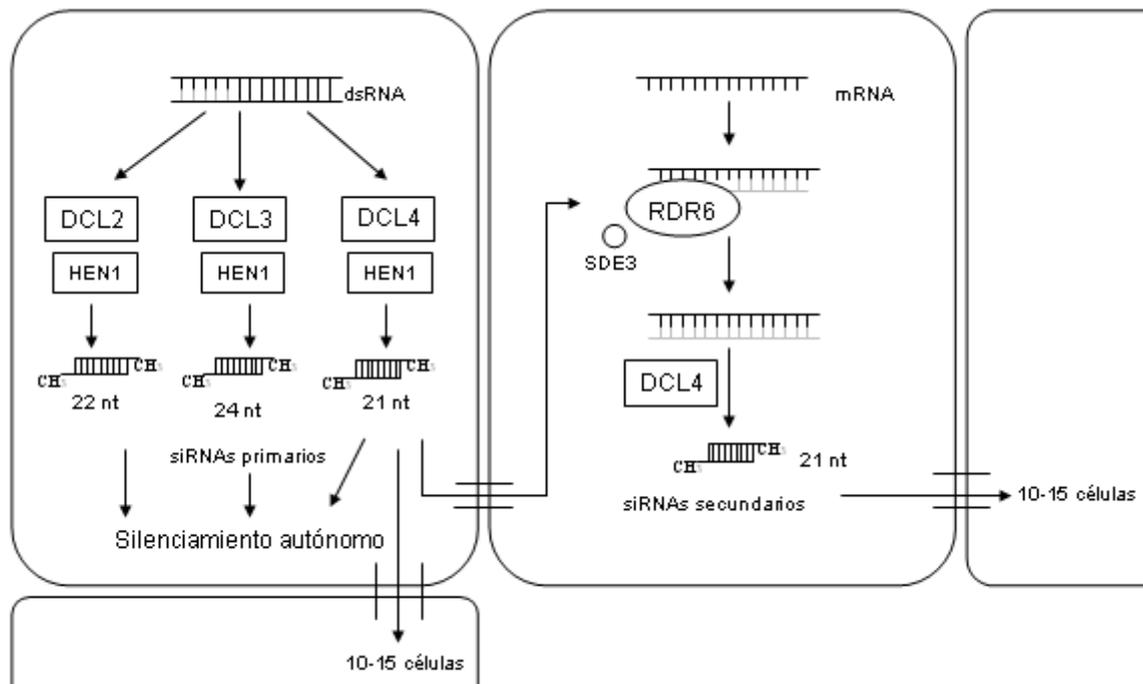


Figura 4. **Modelo reiterativo del movimiento célula-célula del silenciamiento por RNA.** El movimiento de corto alcance puede ser iniciado de una sola célula y se disemina de 10-15 células. Es independiente de transcritos homólogos en la célula receptora, no requiere de la actividad de RDR6 ni de SDE3 ni de la acumulación de siRNA de 24 pb en el sitio de activación del silenciamiento. El movimiento célula-célula de largo alcance es dependiente de RDR6 y SDE3, quienes usan transcritos homólogos como base para producir nuevos dsRNA, esta molécula es procesada en siRNA secundarios que son exclusivamente de 21 pb.

Dado que el fenómeno de interferencia por RNA resulta en el silenciamiento eficiente y específico de la expresión de un gen dado, recientemente se ha implementado su uso en una amplia gama de especies para reducir la expresión de genes de interés, y definir así su función. Con base en la secuencia de DNA de un gen, se puede sintetizar un RNA de doble cadena que bloquee de manera potente y específica la expresión de un gen. En plantas, varios grupos de investigación se han dado a la tarea de desarrollar vectores de expresión que produzcan cantidades elevadas y constantes de RNA interferente, con el fin de mantener activa la respuesta de interferencia por RNA. Así se puede inhibir de manera estable la expresión de genes. La estructura de los precursores de miRNA sirvió de base para diseñar RNA en horquilla, que se transcribe a partir de vectores de expresión, el cual tiene estructura de tallo-asa que es reconocida y procesada por la maquinaria de

RNAi. De esta manera se ha podido silenciar de manera potente y estable la expresión de genes (Watson *et al*, 2005).

### 2.2.3 Metodologías para el silenciamiento por RNAi

En la actualidad existen tres métodos de inserción para el RNAi: por infección viral, por bombardeo de partículas, y por infección con *Agrobacterium tumefaciens*. Cuando se bombardean tejidos de plantas con partículas de oro o tungsteno forradas de dsRNA o siRNA, se puede producir el silenciamiento transitorio del gen blanco. Igualmente, este tipo de construcciones al ser introducidas al T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* y al ser inyectadas a los espacios intracelulares de hojas, producen silenciamiento del gen blanco. Ambos métodos generan silenciamiento transitorio que usualmente dura no más de varios días. Por otra parte, las secuencias exógenas pueden ser insertadas en ciertos espacios del genoma de un virus sin destruir su capacidad infectiva. Éstas secuencias insertadas por infección, serán blanco de la maquinaria de RNAi de la planta. Esta habilidad de los virus de cargar e inducir RNAi en contra de secuencias exógenas se ha utilizado como una herramienta llamada VIGS (Silenciamiento génico inducido por virus).

Las primeras construcciones que se utilizaron para generar RNAi fueron las construcciones que sobre-expresaban secuencias en sentido y antisentido del gen blanco y eran insertados establemente en las plantas. Actualmente, el RNAi puede ser inducido más eficientemente utilizando transgenes que expresen tanto el sentido como el antisentido en una estructura de tallo-asa que asemeja al precursor de siRNA (hpRNA). Usualmente el transgen está bajo el control de un promotor constitutivo por lo que la amplificación del RNA será expresada en la mayoría de las células de plantas, donde se replicará y producirá siRNA. La simplicidad de los transgenes de tipo hpRNA ha hecho que esta última herramienta sea la más utilizada (Tabla 3).

El transgen hpRNA está compuesto simplemente de un promotor de plantas y un terminador; en medio de éstos existe una secuencia inversamente repetida del gen de interés con un espaciador entre ellas. El RNA transcrito de dicha

construcción se hibrida con ella misma y forma una estructura secundaria en forma de tallo-asa (hpRNA). El espaciador es necesario para la estabilidad del hpRNA y no está envuelto en la producción de RNAi. Se utilizan secuencias de intrones, especialmente porque se ha reportado que aumentan la eficacia del silenciamiento (Smith *et al.*, 2000)

Tabla 3. **Ejemplos de genes silenciados por transformación con transgenes hpRNAs.**

Gen	Proteína	Especie	Tamaño del gen blanco (pb)	Fenotipo	Ref.
PPO	Polifenol oxidasa	Tabaco	572	Oxidación reducida	Wesley <i>et al.</i> , 2001
CHS	Chalcone sintetasa	Arabidopsis	741	Reducción de pigmentación	Wesley <i>et al.</i> , 2001
FLC1	Represor de la floración	Arabidopsis	400	Floración temprana	Wesley <i>et al.</i> , 2001
SAD1	Esteroil-ACP	Algodón	514	Alteración de la composición del aceite de semilla	Wesley <i>et al.</i> , 2001
CBL	Cistationina liasa	Arabidopsis	1146	Biosíntesis alterada	Levin <i>et al.</i> , 2000

La mayoría de las construcciones hpRNA se han utilizado en plantas dicotiledóneas y están expresadas bajo el promotor fuerte y constitutivo CaMV 35S (promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor). No obstante, se han utilizado promotores específicos de semilla, como el promotor de lectina y han demostrado ser altamente eficientes en genes expresados en semillas. La mayoría de los fragmentos de genes insertados al vector hpRNA han sido de entre 300 y 800 pb, aunque fragmentos pequeños de 98 pb, también han sido exitosos (Watson *et al.*, 2005; Helliwell *et al.*, 2005 )

Los vectores hpRNA ofrecen ventajas sobre otros métodos (Tabla 4), debido a ello la herramienta que se utilizó para este trabajo fue la de hpRNA.

En la actualidad existen diversos vectores de expresión que permiten silenciar un gen de interés, tanto para sistemas hpRNA como para VIGS ( Figura 5). Los vectores hpRNA de manera general contienen en su secuencia genes de selección, promotores fuertes y regiones de clonación múltiples que permiten insertar la secuencia del gen de interés en sentido y antisentido, teniendo entre ambos un intrón. Usualmente se utiliza el promotor CaMV 35S como promotor fuerte en vectores para transformar plantas desde 1986 (Pietrzak *et al.*, 1986).

Tabla 4. **Ventajas y desventajas de métodos de expresión utilizados en el silenciamiento por RNAi.**

Método de expresión	Transformación	Ventajas	Desventajas
Transitoria	Bombardeo	Rápido; amplia gama de especies	Limitado a las células de la superficie; el silenciamiento no persiste.
	Infiltración por <i>Agrobacterium</i>	Rápido; fácil de aplicar; bajo costo	No probado en la mayoría de las especies.
	Inducción de silenciamiento por virus (VIGS)	Rápido; fácil de usar; se puede aplicar a plantas adultas	Limitación del rango del hospedero; depende de la habilidad de infección de la clona, puede haber síntomas de la infección.
Estable	Amplicones	Amplia variedad de huéspedes; selección de tejidos; sin síntomas virales; especificidad de tejido controlada por promotores.	Puede tener restricciones del tamaño del fragmento del inserto; necesita de un sistema eficiente de transformación.
	Transgenes hpRNA	No restringida por la variedad de huéspedes; heredable; selección de tejidos; rango de silenciamiento	Necesita de un sistema eficiente de transformación

En la actualidad existen diversos vectores de expresión que permiten silenciar un gen de interés, tanto para sistemas hpRNA como para VIGS (Figura 5). Los vectores hpRNA de manera general contienen en su secuencia genes de selección, promotores fuertes y regiones de clonación múltiples que permiten insertar la secuencia del gen de interés en sentido y antisentido, teniendo entre ambos un intrón. Usualmente se utiliza el promotor CaMV 35S como promotor fuerte en vectores para transformar plantas desde 1986 (Pietrzak *et al.*, 1986).

El promotor CaMV 35S se ha utilizado en unión con intrones, ya que se ha demostrado que cuando un intrón se localiza en una región a transcribirse, produce un aumento en la expresión a partir del promotor y otras regiones codificantes (Callis *et al.*, 1987). Posterior al promotor o promotor-intrón se localiza un sitio múltiple de clonación el cual permite insertar el fragmento de secuencia del gen a silenciar en sentido (de 5' a 3'), continua un intrón que al transcribirse formara el asa del hpRNA, y después se localiza otro sitio múltiple de clonación que permitirá insertar el fragmento de secuencia del gen a silenciar en antisentido (de 3' a 5'). Como genes de selección se utilizan genes que codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos, como kanamicina, o a herbicidas, como glufosinato de amonio.

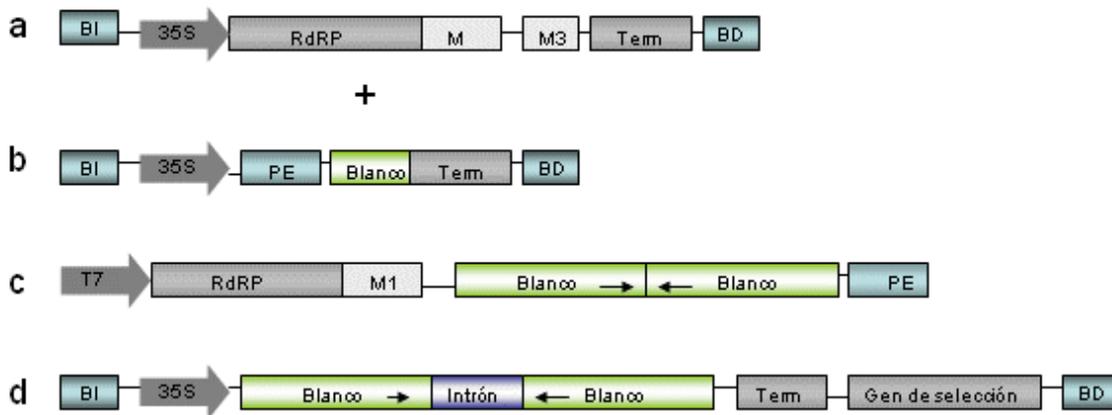


Figura 5. **Ejemplo de construcciones de DNA para el silenciamiento de genes por RNA.** (a,b) Sistema de silenciamiento inducido por virus (VIGS). Dos plásmidos T-DNA que contienen una parte del genoma del virus de tabaco, TRV, el segundo contiene la secuencia blanco del gen a silenciar. Ambos son propagados en *Agrobacterium* y son infectados en tejido de plantas. Cuando una planta es inoculada con *Agrobacterium* que contiene este plásmido, el DNA entre el borde izquierdo (BI) y el borde derecho (BD) es transferido a las células de la planta y es transcrito bajo el control del promotor 35S. La RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) viral es traducida del transcrito que en su tiempo replicará el transcrito a RNA viral infeccioso. (c) Sistema VIGS del virus del mosaico del tabaco (TMV) con la secuencia del gen a silenciar en sentido y antisentido. Con este sistema, el DNA plasmídico es propagado en *E.coli* y transcritos *in vitro* utilizando la T7 polimerasa para generar RNA infeccioso. El RNA o el virus armado con la proteína de envoltura (PE) es inoculado directamente a las plantas. (d) Un plásmido T-DNA típico para la expresión de hpRNAs en plantas. El plásmido puede ser introducido a las células de plantas por bombardeo o por transformación mediada por *Agrobacterium*. Este vector se puede utilizar para generar transformantes estables gracias al gen de selección.

### 2.3. Transformación de maíz

Los cereales no son rutinariamente susceptibles para la transferencia de genes usando bacterias del género *Agrobacterium*, debido a que éstos sintetizan un grupo de metabolitos tóxicos; el DIBOA y DIMBOA, que son benzoxazinoides, a los cuales se les ha implicado en la inmunidad contra insectos y bacterias. Estos metabolitos se encuentran en las células unidos a glucosa; cuando la planta sufre daño tisular estos glucósidos reaccionan con la enzima beta glucoronidasa liberando los dos compuestos tóxicos para ciertas cepas de *Agrobacterium* que son muy utilizadas como herramientas biotecnológicas para la transformación de plantas. Debido a esto se ha dificultado el uso de esta herramienta para transformar cereales como el maíz (Anaya *et al.*, 2006).

Varias tecnologías se han usado para la introducción de DNA exógeno en especies monocotiledóneas con el fin de obtener plantas transformadas y regeneradas; la micro-inyección, electroporación, *Agrobacterium tumefaciens*. Estos métodos presentaron desventajas que los hicieron poco prácticos. De la necesidad de tener un método óptimo de transformación es que surge la biobalística (Klein *et al.*, 1993).

La tecnología de bombardeo fue concebida por John Sanford en 1984, para la introducción de DNA al interior de las células vegetales intactas. Esto involucra la aceleración de micropartículas cubiertas de DNA (tungsteno u oro) por un mecanismo de explosión (pistola de presión) o por estallido de gas (dióxido de carbono, nitrógeno o helio) dando la suficiente aceleración para penetrar la pared celular; esto constituye el fundamento esencial de la biobalística o bombardeo con micropartículas como también se le conoce (Klein *et al.*, 1988)

En la técnica de bombardeo a células de maíz, es muy utilizado el callo de maíz, el cual ha probado tener grandes capacidades regenerativas y gran facilidad de transformación. Se trata de un tejido desdiferenciado a partir de embriones somáticos durante la desdiferenciación se obtienen varios tipos de callo: Callo tipo I, callo tipo II y callo rizogénico. El callo de maíz tipo II es friable, embriogénico, de crecimiento rápido con la presencia de numerosos embriones somáticos globulares (cuyo desarrollo es muy similar al cigótico) adheridos al callo por medio del suspensor; de color blanco amarillento, como fue observado por Green *et al.*, 1975. Este tipo de callo mantiene su capacidad tanto embriogénica como regenerativa por periodos largos; aproximadamente de un año (Green *et al.*, 1975) y es el material idóneo para realizar la transformación por bombardeo.

### 3. HIPÓTESIS

Si se utiliza la transformación por bombardeo en callos embriogénicos de maíz se podrá establecer el sistema de RNA interferente para el factor eIFiso4E de maíz mediante la expresión estable de un vector que contenga una secuencia del gen en sentido y antisentido.

#### 4. OBJETIVO GENERAL

Transformar callos de maíz con un vector hpRNA para elFiso4E que permita silenciar su expresión.

#### OBJETIVOS PARTICULARES

- Clonar en sentido y anti-sentido un fragmento del gen elFiso4E de *Zea mays* L. en el vector pMCG161
- Transformar callos embriogénicos de maíz por bombardeo con el vector de silenciamiento pMCG161-iso4E-as.
- Evaluar el silenciamiento del factor elFiso4E en callo embriogénico de maíz transformado.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Material Biológico

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron semillas de maíz de dos variedades diferentes. Para la obtención de RNA y amplificación del fragmento de *elFiso4E* a clonar en el vector de silenciamiento se utilizaron ejes embrionarios de semillas de la variedad Chalqueño. Para la obtención de callos embriogénicos tipo II de maíz que se utilizaron en la transformación por bombardeo se empleó la variedad Costeño. Los callos embriogénicos fueron proporcionados por el laboratorio de cultivo de tejidos del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM.

#### 5.1.1 Obtención de ejes embrionarios de maíz

Se germinan las semillas de maíz colocándolas entre dos algodones húmedos, con el eje embrionario hacia arriba. Se incuban en una cámara de incubación a 28-30°C. Después de 24 horas se extrae el eje embrionario con una navaja teniendo cuidado de no romper el eje embrionario (Figura 6).

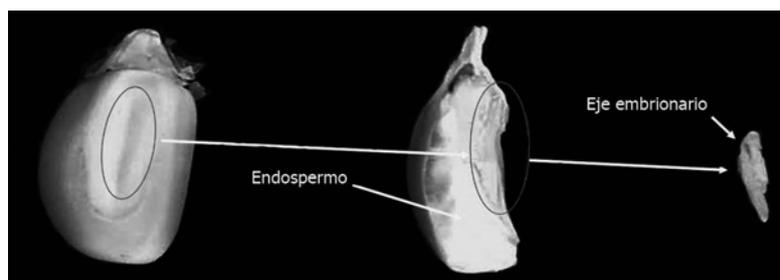


Figura 6. Fotografía de una semilla de maíz señalando el eje embrionario.

#### 5.1.2 Obtención de callos embriogénicos de maíz

Se utilizaron embriones inmaduros de maíz (*Zea mays* L. variedad Costeño) de 15 a 18 días después de la polinización. Las mazorcas se dividieron en fragmentos de 6 a 8 cm eliminando los extremos tanto superior como inferior.

Los fragmentos se colocaron en etanol al 70% durante 1 minuto. Transcurrido ese tiempo se enjuagaron 4 veces con agua desionizada estéril y se colocaron en una mezcla desinfectante que consistió en hipoclorito de sodio al 50% más cinco gotas de un detergente suave (Tween-20) más 15 gotas de una solución coloidal de plata (Microdín®) por cada 250 mL. Los fragmentos se mantuvieron en dicha mezcla durante 15 minutos en agitación constante. Finalmente, se realizaron 4 enjuagues de 4 minutos cada uno con agua desionizada estéril.

A partir de los fragmentos de la mazorca desinfectados se disectaron los embriones inmaduros inoculando frascos con 30 mL de medio nutritivo N<sub>6</sub>-inducción (Ver Apéndice 3). Los embriones se colocaron con el eje embrionario en contacto con el medio y se mantuvieron dos semanas en un cuarto de incubación con ambiente controlado en condiciones de oscuridad a una temperatura de 25± 2 °C. Los callos se proliferaron en medio de cultivo N<sub>6</sub>-p. En el primer subcultivo se eliminó tanto el tejido madre como el oxidado y en los posteriores se eliminó el tejido oxidado.

## 5.2 Diseño de cebadores

Para el presente trabajo se diseñaron cebadores específicos de maíz para amplificar distintos genes o regiones del genoma del maíz o del vector pMCG161-iso4E-as (Ver Apéndice 2).

### 5.2.1 Cebadores para *eIFiso4E*

Se diseñaron cebadores para amplificar una región de aproximadamente 650 pb a partir del cDNA del gen que codifica para la proteína *eIFiso4E* en maíz haciendo un alineamiento entre la secuencia del gen de *eIFiso4E* y *eIF4E*, ambos de maíz. Lo anterior con el fin de que solo se amplifique específicamente la isoforma *eIFiso4E* y además que este fragmento tenga la menor homología a *eIF4E* para que el silenciamiento sea específico para el factor *eIFiso4E*. Además, estos cebadores contienen en sus extremos sitios que son identificados por enzimas de restricción. En el extremo 5' del cebador sentido (Forward; FW) se añadieron los sitios correspondientes a *SpeI* y *AscI*,

mientras que en el cebador en antisentido (Reverse; RV) se añadieron los sitios correspondientes a *AvrII* y *SgfI* (Figura 7). Estos sitios son necesarios para clonar el fragmento de *eIFiso4E* en sentido y antisentido dentro del vector de silenciamiento pMCG161 (Figura 9).



Figura 7. Diagrama del diseño del inserto *eIFiso4E* flanqueado por las enzimas de restricción *SpeI*, *AscI*, *AvrII* y *SgfI*. *Zmiso4E-A* y *Zmiso4E-B* son los cebadores diseñados para amplificar el inserto.

### 5.3 Obtención de ácidos nucleicos

#### 5.3.1 Extracción de RNA TOTAL

La extracción de RNA total se realizó a partir de ejes embrionarios de maíz germinados por 24 horas. Se siguió la técnica recomendada por el fabricante para el reactivo de Trizol (Invitrogen Carlsbad CA, USA). A continuación se describe la técnica. Se pesaron 100 mg de tejido de eje embrionario de maíz y se pulverizaron en un mortero, previamente lavado, esterilizado y enfriado a -20 °C; el tejido se pulverizó adicionando nitrógeno líquido. Una vez pulverizado hasta lograr un polvo muy fino, se colocó el tejido en un tubo eppendorff de 1.5 mL y se le agregaron 1 mL de Trizol (reactivo monofásico de fenol e isotiocianato de guanidina). La mezcla se agitó con vórtex hasta la total resuspensión. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12 000 x g durante 10 minutos a 4 °C, se colectó la fase acuosa cuidando de no tomar la capa superior que contenía restos lipídicos. Se adicionó 0.2 mL de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 segundos, posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 2 o 3 minutos. Se centrifugó a 12 000 x g por 15 minutos a 4°C, la fase acuosa (incolora y en la parte superior que contiene el RNA) se transfirió a un tubo nuevo. Esta extracción con cloroformo se llevó a cabo para eliminar proteínas y DNA. Se precipitó el RNA adicionando

0.5 mL de alcohol isopropílico, y se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.

Se centrifugó a 12 000 x g durante 10 minutos a 4°C, el RNA forma un precipitado gelatinoso. Se removió el sobrenadante y se lavó el precipitado una vez con 1 mL de etanol al 75%. Se centrifugó a 7 500 x g durante 5 minutos a 4°C, se decantó y se dejó secar al aire. Se resuspendió el RNA en agua con DEPC (Dietil pirocarbonato).

Finalmente se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM) con bromuro de etidio, para observar la integridad y pureza del RNA. El RNA se almacenó a -70 °C hasta su uso.

### 5.3.2 Extracción de DNA genómico

Para el aislamiento de DNA genómico se utilizó la técnica de CTAB (Ausubel *et al*, 2000). Antes de comenzar el procedimiento, se añadieron 2-mercaptoetanol a la solución de extracción CTAB (Ver apéndice 1) para una concentración final de 2% (v/v). Se calentó esta solución y la de CTAB/NaCl a 65°C. Se requieren 400 µL de solución de extracción y 50 µL de CTAB/NaCl para 100 mg de tejido fresco. Se homogeneizó con N2 líquido y se colocó en un tubo resistente a solventes. Se añadieron la solución de extracción y la de CTAB/NaCl caliente al tejido pulverizado y se agitó fuertemente. Se incubó por 60 minutos a 64°C con agitación ocasional. Se extrajo con un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) mezclando bien por inversión. Se centrifugó 5 minutos a 7500 g a 4°C y se recuperó la fase superior. Se añadieron 1/10 de volumen de la solución CTAB/NaCl a 65 °C a la fase superior y se mezcló bien por inversión. Nuevamente se extrajo con un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó a 7500g por 5 minutos.

A la fase superior se le añadieron 1 volumen de la solución de precipitación CTAB, se mezcló bien por inversión. Se centrifugó a 500 g a 4°C por cinco minutos. Se colectó el sobrenadante y se precipitó el ácido nucleico añadiendo

300  $\mu$ L de isopropanol frío; se mezcló bien y se dejó incubar 2 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posterior a esta incubación se centrifugó la muestra a 7500 g por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se lavó el precipitado con etanol al 70%, centrifugando a 7500 g por 15 minutos, y se dejó secar al aire. Una vez completamente seco se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua desionizada estéril.

### **5.3.3 Purificación de DNA plasmídico**

Se dejó crecer cada una de las clonas seleccionadas en cajas con antibiótico en 5 mL de medio LB con el antibiótico de selección durante toda la noche en agitación. Se puso la solución III (Ver Apéndice 1) en hielo, se preparó la solución II y se preparó fenol-cloroformo-isoamílico (24:24:1). Se centrifugó la suspensión celular a 3000 g durante 5 minutos. Se resuspendió el precipitado en 100  $\mu$ L de la solución I (con vórtex hasta su total resuspensión) y se transfirió a un tubo eppendorff. Se agregaron 200  $\mu$ L de la solución II fresca, se mezcló perfectamente por inversión y se dejó reposar 5 minutos en hielo. Se agregaron 150  $\mu$ L de la solución III fría, se mezcló por inversión y se dejó 10 minutos en hielo. Se centrifugó a 14 000 g 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se agregaron 40  $\mu$ L de Tris-HCl 1M (pH 8.0) y 400  $\mu$ L de fenol-cloroformo-isoamílico, se agitó en vórtex por 15 segundos.

Se centrifugó a 14 000 g por 2 minutos y se recuperó la fase superior. Se agregaron 1 mL de etanol al 100% frío, se mezcló por inversión y se incubó 1 hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; en este paso se precipita el DNA. Se centrifugó a 14 000 g a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, se decantó y se lavó con 400  $\mu$ L de etanol al 70%. Se decantó el etanol y se dejó secar el precipitado por aproximadamente una hora y se resuspendió en 30  $\mu$ L de agua desionizada.

### **5.3.4 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa**

La extracción de DNA a partir del gel de agarosa se realizó siguiendo la metodología recomendada para el sistema QIAquick Gel Extraction (QUIAGEN USA) que se describe a continuación. Se extrajo el fragmento de DNA visualizado por tinción con bromuro de etidio del gel con una navaja limpia, se

colocó en un tubo eppendorff y se pesó (el peso no debe ser mayor de 400 mg por columna) Se agregaron 300 uL de de Amortiguador QG por cada 100 mg de gel y se incubó a 50°C por aproximadamente 10 min o hasta que estuviera perfectamente disuelto el gel, agitando de vez en cuando para homogenizar la suspensión. Una vez que se disolvió completamente se agregaron 100 uL de iospropanol por cada 100 mg de gel, se mezcló perfectamente y se colocó en una columna previamente insertada al tubo colector. Se centrifugó a 12 000 *g* durante 1 minuto y se descartó el eluato. Se colocó la columna en el tubo colector y se lavó adicionando 0.75 mL de Amortiguador PE y se centrifugó por 1 minuto a 12 000 *g*.

Se colocó la columna en un tubo nuevo y se eluyó el DNA en 100 uL de agua estéril, dejando reposar 5 minutos antes de centrifugar 2 minutos a 12000 *g*.

Para concentrar el DNA se colocó en el tubo en el concentrador a vacío marca SpeedVac y se dejó secar. Posterior a esto se resuspendió en 25-30 µL de agua estéril.

### **5.3.5 Cuantificación de ácidos nucleicos**

Para cuantificar RNA o DNA se tomaron 1 µL de la suspensión que contiene el ácido nucleico y se diluyó en 99 µL de agua estéril. Se colocaron los 100 µL finales en una celda de cuarzo y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 y 280 nm. A 260 nm el DNA o RNA presente en la muestra absorbe, mientras que a 280 nm absorben las proteínas, por lo cual la relación 260/280 es un indicativo de la pureza de la muestra (1.9-2.0 es una relación de pureza aceptable). El cálculo de la concentración se realiza a partir de la relación 1 de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg/mL de DNA o 40 µg/mL de RNA.

## 5.4 Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa

### 5.4.1 Amplificación de elFiso4E mediante RT-PCR con gradiente de temperatura

Para la transcripción-reversa del RNA (RT) y la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se siguió el protocolo de un paso con el sistema “Superscript One.Step RT-PCR with Platinum *Taq*” de Invitrogen Carlsbad CA, USA utilizando un termociclador marca Eppendorff, modelo Master Cycler, el cual permite realizar la amplificación con un gradiente de temperatura para el paso de alineamiento de los cebadores. La ventaja de este gradiente es establecer cuál es la temperatura óptima para el alineamiento de ciertos cebadores durante el PCR. El equipo provee de un archivo que contiene una hoja de cálculo para obtener la temperatura exacta de cada columna de la placa de calentamiento, el gradiente necesario para ello y así poder realizar un gradiente de temperatura de alineamiento. Se obtuvo de la secuencia de los cebadores la temperatura de alineamiento probable, la cual sería de 60.5°C a 65.5°C y con ayuda de esa hoja de cálculo se obtuvo el gradiente necesario para obtener 5 diferentes temperaturas: 53.5°C, 56.1°C, 58.8°C, 61.5°C y 64.0°C.

Una vez obtenido el gradiente se fijaron las condiciones en el termociclador para llevar a cabo el RT-PCR:

A: Síntesis de cDNA y pre-desnaturalización	B: Amplificación por PCR	C: Extensión final
1 ciclo de: 50°C por 30 minutos 94°C por 2 minutos	36 ciclos de: Desnaturalización, 94°C por 15 segundos Alineamiento, Temp: 58 Grad:10 Extensión, 72°C por 1 minuto	1 ciclo de: 72°C por 10 minutos

Se prepararon 5 tubos de PCR y se añadieron a cada tubo, colocado sobre hielo, los siguientes componentes de reacción que se mezclaron suavemente y se colocaron en el termociclador para que iniciara el procedimiento de RT-PCR:

<u>Componente</u>	<u>Volumen/ 25µL</u>
2X Mezcla de Reacción	12.5 µL
MgSO <sub>4</sub> (50mM)	0.4µL
RNA (200ng/µL)	1.0 µL
Mezcla de cebadores (10µM)	0.5µL
Mezcla RT/ Platinum Taq	0.5µL
Agua + DEPC	10.1µL

Finalmente se analizó el producto de RT-PCR realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X con bromuro de etidio, para observar a que temperatura se obtiene la mayor cantidad de fragmento y si éste es del peso esperado, lo que indicaría que se trata del inserto deseado.

#### 5.4.2 Reamplificación de *eIFiso4E* mediante PCR

Una vez obtenida la mejor temperatura de alineamiento para amplificar el inserto *eIFiso4E* (61.5°C) se realizó un PCR del producto de RT-PCR obtenido. El PCR se realizó de la siguiente manera ajustando las condiciones en el termociclador:

1 ciclo de:	42°C por 3 minutos
30 ciclos de:	94°C por 15 segundos 61.5°C por 1 minuto 72°C por 1 minuto
1 ciclo de:	72°C por 10 minutos
Almacenaje	4°C

Se prepararon 2 tubos de PCR y se añadieron a cada tubo, colocado sobre hielo, los siguientes componentes de reacción, se mezclaron suavemente y se colocaron en el termociclador para que iniciara el procedimiento de PCR

<u>Componente</u>	<u>Volumen/ 100µL</u>
10X Amortiguador de reacción	10.0 µL
MgSO <sub>4</sub> (50mM)	6.0 µL
dNTP's (10mM)	8.0 µL
DNA (200ng/µL)	5.0 µL
Mezcla de cebadores (10µM)	2.0 µL
Taq Polimerasa Invitrogen	2.5µL
Agua	66.5µL

Finalmente se analizó el producto de PCR realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X con bromuro de etidio, para observar si el fragmento obtenido es del peso esperado, lo que indicaría que se trata del inserto deseado.

### 5.5 Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las digestiones de DNA plasmídico se realizaron en 20 µl de volumen final utilizando 5-10 µg de DNA plasmídico. A un tubo eppendorff se agregaron los siguientes reactivos:

Componente	Cantidad
DNA plasmídico	5-10 µg
10X amortiguador de reacción	1X
Agua estéril c.b.p.	20 µL
Enzima de restricción	0.13 unidades
Volumen total	20 µL

El orden de adición es el siguiente: agua estéril, amortiguador de reacción, DNA y por ultimo se adicionó la enzima de restricción. Todo esto se adicionó en frío y una vez adicionada la enzima de restricción se incubó al menos 16 hrs a 37°C. Una vez transcurrido ese tiempo se corrió una muestra del DNA digerido en un gel de agarosa para comprobar la digestión.

### 5.6 Clonación de DNA

#### 5.6.1 Clonación del inserto de *eIFiso4E* en el vector pGEM-T.

La clonación del inserto *eIFiso4E* obtenido por PCR se realizó de manera directa en el vector pGEM-T (Promega) (Figura 8).

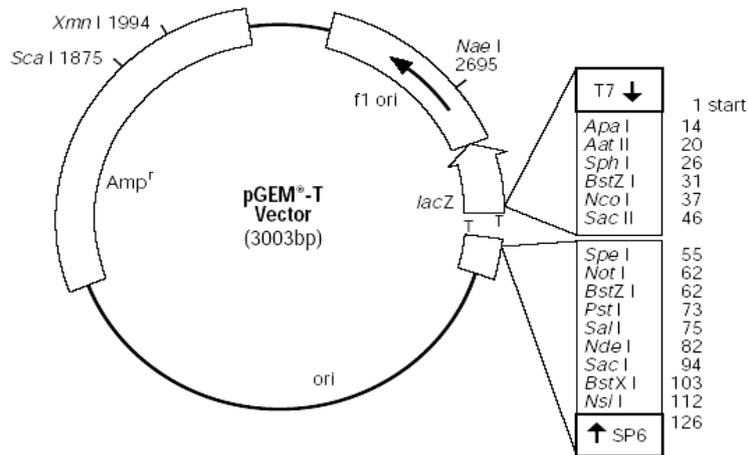


Figura 8. Vector pGEM-T (Promega). Se muestra el sitio múltiple de clonación y la cola de timinas que permitirá que se inserte el fragmento *eIFiso4E*. Se muestra la región codificante para los dos marcadores de selección; ampicilina y el gen *lacZ*.

Para esto se agregaron colas de adenina en ambos extremos del inserto *eIFiso4E* purificado a partir del gel de agarosa mediante el procedimiento descrito para el sistema pGEM-T Vector de Promega, el cual se describe a continuación. Una vez purificado el inserto, se tomaron 2  $\mu\text{L}$  de éste y se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de Amortiguador de reacción 10 X para Taq DNA Polimerasa junto con 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM y 5 unidades de la enzima Taq DNA polimerasa. Se agregaron agua desionizada hasta un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . Se incubó a 70°C por 30 minutos. Posteriormente se procedió a la ligación recomendada para el sistema pGEM-T Vector (Promega) preparando la siguiente reacción:

	Reacción de ligación
Amortiguador de ligación rápida 2X	5 $\mu\text{L}$
pGEM-T vector (50 ng)	1 $\mu\text{L}$
Inserto <i>eIFiso4E</i>	2 $\mu\text{L}$
T4 DNA ligasa (3 unidades/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$
Agua desionizada c.b.p.	10 $\mu\text{L}$

Se mezclaron los componentes de reacción y se incubó dos horas a temperatura ambiente. Con la reacción se transformaron células de *E.coli* (DH5 $\alpha$ ) mediante el procedimiento descrito para el sistema pGEM-T (Promega). Para ello se prepararon placas con medio LB/ampicilina/IPTG/ X-Gal (Apéndice). Se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de la reacción de ligación a un tubo eppendorff estéril de 1.5 mL en hielo. Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de células competentes, se mezcló suavemente y se colocaron en hielo por 20 minutos.

Posterior a esto, se colocaron en un baño de agua a 42°C por 50 segundos e inmediatamente se colocaron en hielo por dos minutos. Se adicionó 950 mL de medio LB a los tubos y se dejaron incubar a 37°C en agitación por 1.5 hrs. Se centrifugó la suspensión celular a 3000 g por dos minutos y se resuspendió el botón en 100 µL. Se sembraron los 100 µL en una caja con medio LB/ampicilina/IPTG/ X-Gal y se dejaron incubar por 24 horas. Las colonias que crecieron fueron las transformadas. Las que contenían el vector con el inserto fueron blancas, mientras que las que no lo contenían fueron azules.

### 5.6.2 Clonación del inserto *elFiso4E* en el vector pMCG161

El vector de silenciamiento que se utilizó es el pMCG161 debido a que es específico para silenciar por RNAi en maíz (Figura 9). Este vector contiene el promotor CaMV 35S (Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor) unido a un intrón *Adh1*, intrón del gen que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa de maíz. Posterior a este intrón se localizan dos sitios de corte para las enzimas de restricción *AscI* y *AvrII*, ambos permiten insertar la secuencia del gen a silenciar en sentido (5' a 3'). Continúa un intrón de arroz, *waxy-a*, y después se localizan otros dos sitios de corte para las enzimas de restricción *SgfI* y *SpeI*, ambos permiten insertar la secuencia del gen a silenciar en antisentido (3' a 5').

Este vector contiene el gen de selección *bar* con un promotor UBI-1, promotor y primer intrón del gen que codifica para la ubiquitina del maíz. El gen *bar* confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio (PPT) producido por *Streptomyces hygroscopicus*. El PPT es herbicida de contacto de amplio espectro, con baja toxicidad y poca permanencia en suelo. Este herbicida es un potente inhibidor de la glutamina sintetasa (GS), única enzima en plantas que puede detoxificar el amonio liberado por la reducción de nitrato, la degradación de aminoácidos y la fotorespiración. La inhibición de la GS por PPT causa acumulación rápida de amonio que lleva a necrosis y muerte celular. El PPT es sintetizado químicamente y comercialmente con el nombre de BASTA. El gen *bar* fue clonado de *S. hygroscopicus* y codifica a una

fosfinocitrin acetiltransferasa (PAT) que acetila el grupo NH<sub>2</sub> libre de el PPT haciéndolo inactivo.

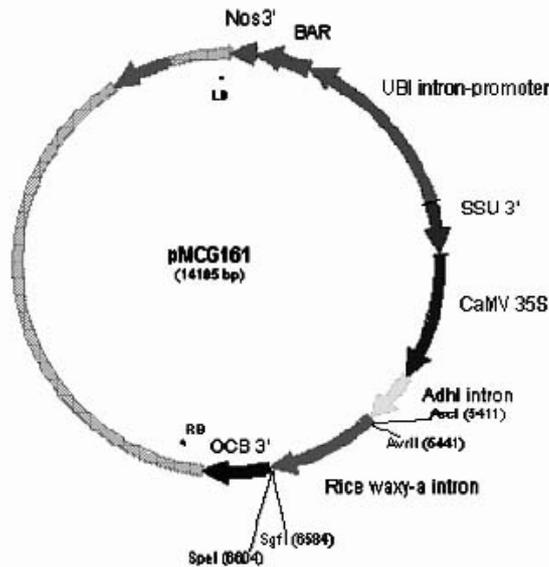


Figura 9. Esquema del vector pMCG161.

Se clonó el inserto *eIFiso4E* en sentido y antisentido en el vector pMCG161 de la siguiente manera: Se obtuvo DNA del inserto purificado de la digestión con las enzimas de restricción *AvrII* y *Ascl* a partir del vector pGEM-T que contiene el inserto y también se obtuvo DNA plasmídico del vector pMCG161 digerido con las mismas enzimas de restricción. Se llevó a cabo la reacción de ligación en la cual se agregaron los siguientes reactivos:

	Reacción de ligación
Amortiguador de ligación	10 µL
DNA vector (50 ng)	6 µL
DNA Inserto <i>eIFiso4E</i>	0.5 µL
T4 DNA ligasa (3 unidades/µL)	1µL
Agua desionizada c.b.p.	20 µL

Se dejó incubar esta mezcla a temperatura ambiente por 2 horas y se hizo la transformación de igual manera que la descrita para la clonación en el vector pGEM-T. Para la clonación en antisentido se utilizó el inserto obtenido de la digestión con las enzimas *SpeI* y *SgfI* del vector pGEM-T que contiene el inserto y también se obtuvo DNA plasmídico digerido con las mismas enzimas de una clona positiva de la clonación anterior la cual contenía el vector

pMCG161 con el inserto en sentido. La reacción de ligación y la transformación se hizo de igual forma que la clonación en sentido.

## **5.7 Bombardeo de callos embriogénicos de maíz**

### **5.7.1 Preparación de las partículas de tungsteno (Guerrero-Andrade,1998)**

Se pesaron 60 mg de partículas de tungsteno de 0.4  $\mu\text{m}$  de diámetro (M5) colocándose en un tubo de centrifuga de 15 mL. Después se añadieron 2 mL de ácido nítrico 0.1 M y se sonicó en hielo durante 20 min. Posteriormente se eliminó el ácido nítrico agregándose 1 mL de agua desionizada estéril; la muestra se transfirió a un tubo de 2 mL de capacidad y se sonicó brevemente. Las micropartículas se centrifugaron de 10 a 30 segundos a una velocidad de 10 000  $g$ . Se eliminó el agua y se agregaron 1 mL de etanol absoluto y se sonicó brevemente. Se centrifugaron las micropartículas de 10 a 30 segundos a 10 000  $g$ . El etanol se eliminó, se agregaron 1 mL de agua desionizada estéril y se sonicó brevemente. Se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de la suspensión en un tubo eppendorff. Después se añadieron 750  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril a cada tubo, finalmente se almacenaron los tubos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **5.7.2 Adsorción del DNA plasmídico a las micropartículas (Klein *et al.*, 1988)**

En tubos eppendorff se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de micropartículas de tungsteno, después se adicionaron los siguientes reactivos uno a uno, agitando bien la suspensión entre cada reactivo. Se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de DNA ( $1 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ ), 50  $\mu\text{L}$  de cloruro de calcio 2.5 M, 20  $\mu\text{L}$  de espermidina 0.1 M, esta mezcla se agitó con vórtex durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugó de 5 a 10 segundos, se eliminaron 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y se resuspendieron las micropartículas en el volumen restante.

### **5.7.3 Bombardeo de callos embriogénicos de maíz con pistola de baja presión.**

Se tomaron callos embriogénicos de 12 días después del subcultivo, los cuales fueron colocados un día antes en cajas petri de 50 mm x 17 mm con 10 mL de medio N<sub>6</sub>-p gelificados con 3.0 mg L<sup>-1</sup> de Gellan® (Ver Apéndice ). Se colocó una porción extendida de aproximadamente 1 g de callo embriogénico de 1 cm de diámetro en el centro de la caja petri. Se tomaron 5 µL de la solución de micropartículas cubiertas con el DNA plasmídico y se colocaron en el centro del filtro de bombardeo. El bombardeo se llevó a cabo con una presión de helio de 8 bar a una distancia de 13 cm entre el filtro y el tejido blanco, en un vacío de -21 pulgadas de Hg. Una vez bombardeados los callos se sellaron las cajas petri y se mantuvieron en incubación a temperatura controlada de 25 ± 1 °C y fotoperiodo de 16 hrs luz (29 µem/s<sup>2</sup>) y 8 hrs oscuridad.

### **5.7.4 Selección positiva de callos transformados con glufosinato de amonio (Basta®)**

Los callos bombardeados permanecieron en el medio N<sub>6</sub>-p gelificado con 3.0 mg de Gellan® durante una semana (Periodo de recuperación). Una vez transcurrido este periodo , fueron colocados en medio de selección, el cual consistió en medio N<sub>6</sub>-p + 3 mg L<sup>-1</sup> de Basta® para la selección de las células transformadas.

Los callos se subcultivaron cada dos semanas, quitando en cada subcultivo las zonas necrosadas del tejido, y se mantuvieron en incubación a temperatura controlada de 25 ± 1 °C y fotoperiodo de 16 hrs luz (29 µem/s<sup>2</sup>) y 8 hrs oscuridad. Los callos permanecieron en selección en las condiciones antes descritas, durante tres meses.

### **5.7.5. Regeneración de plantas de maíz a partir de callos embriogénicos transformados**

Una vez terminada la selección de callos transformados con glufosinato de amonio por tres meses, los callos se subcultivan dos veces en medio N<sub>6</sub>-p más 3 mg/L de Basta® pero con la concentración de auxina sintética 2,4-D y la citocinina cinetina a la mitad. Las condiciones de fotoperíodo y temperatura permanecieron igual.

En el caso del tercer subcultivo, se omitió por completo ambos reguladores de crecimiento manteniendo la misma concentración del agente de selección. De esta etapa en adelante se realizó la separación de las plantas con medidas de 4-6 cm del resto del callo. Para el cuarto subcultivo, se utilizó el medio MS (Ver Apéndice), el cual contiene menos cantidad de carbohidratos y mayor fuente de nitrógeno, se omitieron los reguladores de crecimiento y la concentración del agente de selección Basta® se disminuyó a la mitad, es decir, 1.5 mg/L. En el quinto subcultivo se utilizó el medio MS sin reguladores de crecimiento y sin el agente de selección. Se procedió a individualizar las plantas con el objeto de permitir el desarrollo de raíces.

## **5.8 Inmunodetección del factor elFiso4E**

### **5.8.1. Extracción de proteína total**

En la extracción de proteína total se utilizaron 100 mg de callo embriogénico de maíz fresco, que se coloca en un tubo eppendorf . El tejido se maceró en N<sub>2</sub> líquido con la ayuda de un pistilo. Una vez pulverizado se agregaron 20 µL de amortiguador de extracción ( 100 mM KCl, 20 mM HEPES pH 7.6, 0.2 nM EDTA, 10% glicerol) y se maceró en este amortiguador. Se centrifugó a 14 000 g por 10 minutos a 4°C. Se recuperó en sobrenadante y se tomaron una alícuota de 1 µL para la cuantificación de proteína total.

### **5.8.2 Cuantificación de proteína total**

La cuantificación se llevó a cabo utilizando el kit Bio-Rad protein assay (Bio-Rad), brevemente, preparar estándares para la curva de calibración de Albúmina (0.2-1 mg/mL). En celdas de plástico para espectrofotómetro adicionar 25 µL de estándar de Albúmina y agregar 125 µL de reactivo A y agitar vigorosamente. Adicionar 1 mL de reactivo B y agitar inmediatamente. Esperar 15 minutos a que la reacción se lleve a cabo por completo y leer en un espectrofotómetro a 750 nm. La reacción es estable por una hora.

### **5.8.3 SDS-PAGE**

La separación de las proteínas se realizó por SDS-PAGE. Se prepararon geles al 12.5% (Ver apéndice 1). Se tomó una alícuota equivalente a 40 µg de proteína total, se le agregaron 10 µL de amortiguador de carga (Ver apéndice 2) y se dejó hervir durante 5 minutos. Se dejó enfriar y se cargó en el gel, el cual se corrió a 100 V hasta que el frente de corrida se salió del gel.

Una vez realizado esto, el gel se puede teñir con Azul de Coomassie o bien transferirlo a una membrana para después realizar la inmunodetección.

### **5.8.4 Inmunodetección**

Para realizar la inmunodetección se utilizó un anticuerpo policlonal producido en conejo dirigido contra el complejo eIFiso4F purificado de trigo. Una vez obtenido el gel de SDS-PAGE se transfiere a una membrana PVDF Immobilon-P (Millipore) en cámara húmeda utilizando amortiguador de transferencia y corriéndolo a 100 V durante una hora en frío.

Una vez realizada la transferencia se dejó secar la membrana a temperatura ambiente Se lavó durante 15 minutos en agitación con PBS 1X (Ver apéndice). Después se dejó bloquear la membrana una hora o toda la noche con una solución de leche descremada Svelty® al 5% preparada en PBS 1X + Tween 20 0.1%. Se decantó la solución de bloqueo y se añadieron el primer anticuerpo, anti-eIFiso4F, a una dilución 1:4000 preparado en leche desnatada

al 5% preparada en PBS 1X + Tween 20 0.1%. Se dejó incubar durante una hora a temperatura ambiente. Una vez cumplido este tiempo se lavó la membrana por 15 minutos con PBS 1X, después 15 minutos con PBS 1X + 1M NaCl, y por último 15 minutos con PBS 1X.

Se agregaron en segundo anticuerpo, anti-IgG de conejo acoplado a HRP, a una dilución 1:5000 preparado en leche descremada Svelty® al 5% preparada en PBS 1X + Tween 20 0.1%. Se dejó incubar durante una hora a temperatura ambiente.

Una vez cumplido este tiempo se lavó la membrana por 15 minutos con PBS 1X, después 15 minutos con PBS 1X + 1M NaCl, después 15 minutos con PBS 1X. Se reveló utilizando el kit de inmunodetección Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, el cual contiene reactivo de luminol y el sustrato de la peroxidasa, los cuales al estar en contacto con la HPR conjugado al anticuerpo secundario oxidará el luminol y dará una señal de luz visible la cual revelará una película.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Amplificación de una secuencia de *eIFiso4E* de maíz.

En maíz existen 3 miembros de la familia eIF4E: eIF4E, eIFiso4E, y nCBP. Entre estos, nCBP es el miembro que más difiere en secuencia (32 % de identidad con eIF4E), por lo que se realizó el análisis entre *eIF4E* y *eIFiso4E* para seleccionar la secuencia que se utilizará en el apagado de eIFiso4E. (Figura 10). Acorde al alineamiento se identificaron los sitios homólogos entre ambas secuencias y se seleccionó un fragmento con la menor homología posible, de tal manera que este fragmento al ser procesado por la maquinaria del RNAi fuese específico para el silenciamiento de la isoforma eIFiso4E.

Una vez seleccionado el fragmento se diseñaron los cebadores específicos para amplificar dicho fragmento. Ambos cebadores contienen las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción necesarias para la posterior clonación en el vector pMCG161. Los cebadores que se diseñaron se muestran en la figura 11.

	<i>SpeI</i>	<i>AscI</i>	<i>Zmiso4E-FW</i>
Zmiso4E-A	ACT AGT	GGC GCG CC	A AGC TTC ACC GGC AGT
Zmiso4E-B	GCG ATC	GCC CTA GG	G AAA GTC GGC GAC GAT
	<i>SgfI</i>	<i>AvrII</i>	<i>Zmiso4E-RV</i>

Figura 11. Cebadores diseñados para amplificar *eIFiso4E*. Ambos cebadores contienen sitios de corte para enzimas de restricción. El cebador en sentido (*Zmiso4E-FW*) contiene los sitios de corte para *SpeI* y *AscI* y el cebador en antisentido (*Zmiso4E-RV*) contiene los sitios de corte para *SgfI* y *AvrII*.

Los cebadores se utilizaron para amplificar el fragmento de *eIFiso4E* mediante un RT-PCR a partir de RNA total de ejes embrionarios de maíz con 24 horas de germinación.

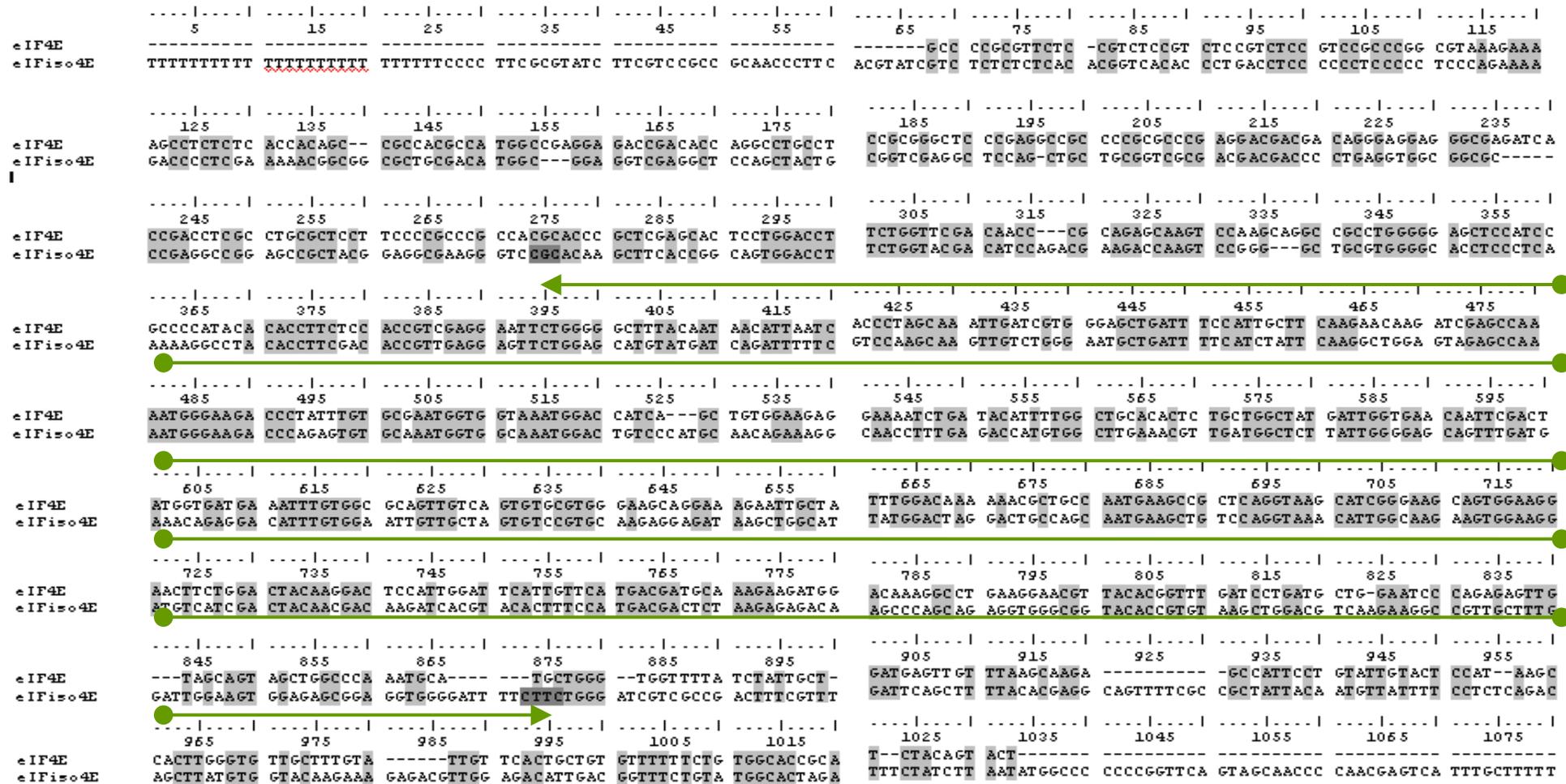


Figura 10. Alineamiento de las secuencias *eIF4E* y *eIFiso4E* de maíz. Los nucleótidos sombreados en gris claro indican secuencias homólogas para ambos genes. Los nucleótidos sombreados en gris oscuro indican el inicio y el fin del inserto que se seleccionó para su amplificación. Las flechas indican el fragmento, aproximadamente de 650 pb, que se seleccionó para amplificar

El RT-PCR se realizó con gradiente de temperatura de alineamiento. Este ensayo permitió saber a qué temperatura de alineamiento estos cebadores se unen con mayor eficiencia al DNA blanco y por lo tanto al haber mayor cantidad unida mayor será la amplificación del fragmento. Se probaron cinco temperaturas: 53.5°C, 56.1°C, 58.8°C, 61.5°C y 64.0°C. Una vez realizado el RT-PCR se corrió en un gel de agarosa con los productos de la reacción. Como se puede observar en la figura 12, en las cinco temperaturas se observó la banda a la altura de ~ 650 pb lo que nos indica la amplificación del fragmento *eIFiso4E* que se deseaba. A partir de estos resultados se eligió la temperatura de alineamiento para posteriores PCR; que sería de 61.5°C.

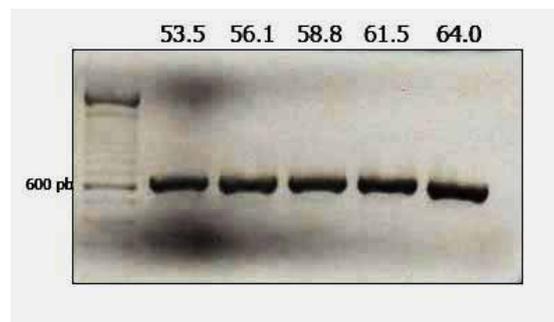


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR indicando las diferentes temperaturas de alineamiento. Se utilizó una escalera de 100 pb (Invitrogen) como marcador de peso molecular que permite diferenciar la banda con peso de 600 pb.

Una vez obtenida la suficiente cantidad del fragmento *eIFiso4E* mediante reamplificación y adhesión de adeninas (ver Métodos) se clonó en el vector pGEM-T vector®, esto con el fin de evitar la continua reamplificación del fragmento mediante PCR ya que una vez obtenida una clona de *E.coli* que contiene el vector con el fragmento se puede obtener gran cantidad del mismo. Además de esta ventaja, al clonarlo en este vector se puede mandar a secuenciar antes de clonarlo en el vector de silenciamiento pMCG161. Se siguió el protocolo de ligación y transformación dado por el fabricante y se obtuvieron clonas de *E.coli* transformadas, lo cual se verificó extrayendo DNA plasmídico de cada una y haciendo un PCR para amplificar el fragmento *eIFiso4E*. Las clonas que se transformaron correctamente y contienen el vector pGEM-T-iso4E con el fragmento amplificaron una banda de 650 pb, lo que

indica la presencia del fragmento *eIFiso4E*. Como se observa en la figura 13 las tres clonas seleccionadas contienen el vector pGEM-T –iso4E con el fragmento *eIFiso4E*.



Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del fragmento *eIFiso4E* mediante PCR de las clonas obtenidas en la transformación con el vector pGEM-T-iso4E. El control negativo (C-) es el vector pGEM-T. C1, C2, C3 son las tres clonas obtenidas donde se puede observar la amplificación del fragmento *eIFiso4E* de aproximadamente 650 pb.

Además de verificar la transformación por PCR se realizaron digestiones del DNA plasmídico de cada una de las clonas con las cuatro enzimas de restricción que flanquean al fragmento *eIFiso4E*, mismas que se ocuparon para la clonación en el vector pMCG161. Se digirió el DNA con dos mezclas de enzimas de restricción, la primera con *AscI* y *AvrII* y la segunda con *SpeI* y *SgfI*. Una vez digerido el DNA se corrió un gel de agarosa para visualizar si al digerir con ambas mezclas de enzimas se liberaba el fragmento *eIFiso4E*. Como se observa en la figura 14 los DNA plasmídicos de las clonas 1 y 2 liberaron el fragmento al ser digeridos con ambas mezclas de enzimas, mientras que el DNA de la clona 3 no liberó el fragmento al ser digerido por la mezcla de enzimas de *SpeI* y *SgfI*. Debido a lo anterior se eligió la clona 1 para obtener el fragmento *eIFiso4E* digerido con las enzimas apropiadas para su clonación en pMCG161.

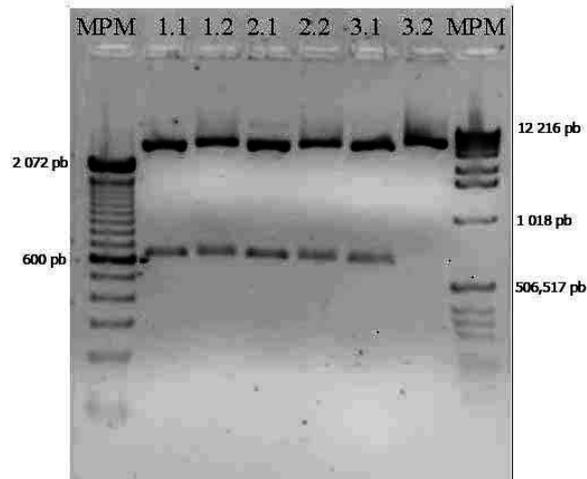


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión del DNA plasmídico obtenido a partir de las clonas transformadas con pGEM-T-iso4E. 1.1 y 1.2 corresponden a DNA de la clona 1 digerido con *AvrII-Ascl* y *SpeI-SgfI* respectivamente. 2.1 y 2.2 corresponden a DNA de la clona 2 digerido con *AvrII-Ascl* y *SpeI-SgfI* respectivamente. 3.1 y 3.2 corresponden a DNA de la clona 3 digerido con *AvrII-Ascl* y *SpeI-SgfI* respectivamente. Se seleccionó la clona 1 para el trabajo posterior.

Una vez clonado el fragmento *eIFiso4E* en el vector pGEM-T® se mandó secuenciar el fragmento verificando que la región clonada corresponde a el gen *eIFiso4E* de maíz (Figura 15), se comparó con la secuencia reportada del gen *eIFiso4E* de maíz (No. De acceso AF076955) y se obtuvo una identidad de 98%. No se obtuvo una identidad del 100% debido posiblemente a que el gen amplificado sea una de las múltiples copias de ese gen en el genoma de maíz y esta sea la secuencia original para este gen, además de que partimos del genoma de maíz variedad chalqueño y no del repostado en las bases de datos de maíz.

## 6.2 Clonación en sentido y anti-sentido del gen *eIFiso4E* de *Zea mays* L. en el vector pMCG161 .

Para la clonación en sentido lo primero que se realizó fue crecer la clona de *E.coli* que contiene el vector pMCG161 en presencia de cloranfenicol, ya que este vector le confiere resistencia a este antibiótico. De este cultivo se extrajo DNA plasmídico, el cual se digirió con las enzimas *AvrII* y *Ascl*. El fragmento digerido se purificó del gel de agarosa, al igual que el DNA plasmídico de la clona 1 de *E.coli* que contiene el vector pGEM-T-iso4E digerido con las mismas enzimas para realizar la ligación y la posterior transformación.

```

eIFiso4E 61 CAAGCTTCACCGGCAGTGGACCTTCTGGTACGACATCCAGACGAAGACCAAGTCCGGGGC 120
AF076955 269 CAAGCTTCACCGGCAGTGGACCTTCTGGTACGACATCCAGACGAAGACCAAGTCCGGGGC 328
eIFiso4E 121 TGGCGTGGGGCACCTCCCTCAAAAAGGCCTACACCTTCGACACCGTTGAGGAGTTCTGGAG 180
AF076955 329 TGGCGTGGGGCACCTCCCTCAAAAAGGCCTACACCTTCGACACCGTTGAGGAGTTCTGGAG 388
eIFiso4E 181 CATGTATGATCAGATTTTTCGTCCAAGCAAGCTGTCTGGGAGTGCTGATTTTCATCTATT 240
AF076955 389 CATGTATGATCAGATTTTTCGTCCAAGCAAGTTGTCTGGGAATGCTGATTTTCATCTATT 448
eIFiso4E 241 CAAGGCTGGAGTAGAGCCAAAATGGGAAGACCCAGAGTGTGCAAATGGTGGCAAATGGAC 300
AF076955 449 CAAGGCTGGAGTAGAGCCAAAATGGGAAGACCCAGAGTGTGCAAATGGTGGCAAATGGAC 508
eIFiso4E 301 TGTCCCATGCAACAGAAAGGCAACCTTTGAGACCATGTGGCTTGAACGTTGATGGCTCT 360
AF076955 509 TGTCCCATGCAACAGAAAGGCAACCTTTGAGACCATGTGGCTTGAACGTTGATGGCTCT 568
eIFiso4E 361 TATTGGGGAGCAGTTCGATGAAACAGGGGACATTTGTGGAATTGTTGCTAGTGTCCGTGC 420
AF076955 569 TATTGGGGAGCAGTTCGATGAAACAGAGGACATTTGTGGAATTGTTGCTAGTGTCCGTGC 628
eIFiso4E 421 AAGAGGAGATAAGCTGGCATTATGGACTAGGACTGCCAGCAATGAAGCTGTCCAGGTAAA 480
AF076955 629 AAGAGGAGATAAGCTGGCATTATGGACTAGGACTGCCAGCAATGAAGCTGTCCAGGTAAA 688
eIFiso4E 481 CATTGGCAAGAAGTGGAAGGATGTGATCGACTACAACGACAAGATCACGTACACTTTCCA 540
AF076955 689 CATTGGCAAGAAGTGGAAGGATGTGATCGACTACAACGACAAGATCACGTACACTTTCCA 748
eIFiso4E 541 TGACGACTCTAAGAGAGACAAGCCCAGCAGAGGTGGGCGGTACACCGCTAAGCTGGACG 600
AF076955 749 TGACGACTCTAAGAGAGACAAGCCCAGCAGAGGTGGGCGGTACACCGCTAAGCTGGACG 808
eIFiso4E 601 TCAAAAAGGCCGTTGCTTTGGATTGGAATTGGAGAGCGGGAGGT-GGGATTTTCTTCTGG 659
AF076955 809 TCAAGAAGGCCGTTGCTTTGGATTGGAAGTGGAGAGC-GGAGGTGGGGATTTTCTTCTGG 867
eIFiso4E660 GATCGTCGCCGACTTTC 676
AF076955868 GATCGTCGCCGACTTTC 884

Score = 1128 bits (569), Expect = 0.0
Identities = 607/617 (98%), Gaps = 2/617 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

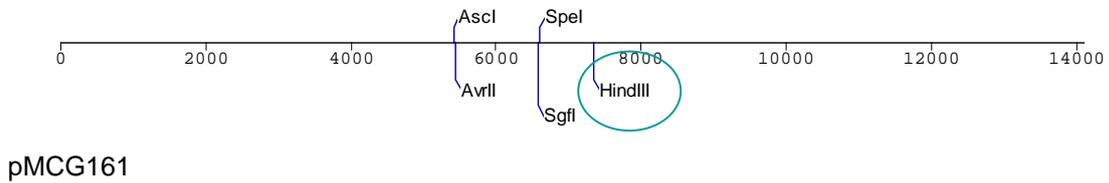
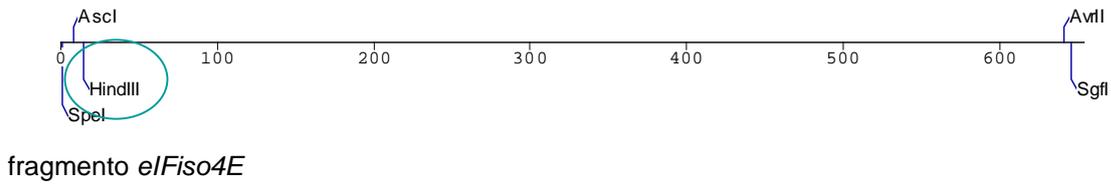
Figura 15. Alineamiento de la secuencia del fragmento *eIFiso4E* clonado en el vector pGEM-T y la secuencia reportada para el factor *eIFiso4E* de maíz (AF076955). Tienen un 98% de identidad.

La selección se realizó en medio LB con cloranfenicol, obteniéndose 12 clonas que posiblemente tenían el plásmido pMCG161 con el fragmento *eIFiso4E* en sentido (pMCG161-s).

Para evaluar si las clonas contenían el vector recombinante y para discernir si el fragmento se encuentra en sentido y/o antisentido se analizó la secuencia tanto del fragmento *eIFiso4E* como del vector pMCG161, buscando los sitios de corte adecuados para enzimas de restricción. El análisis arrojó que ambas secuencias tenían un solo sitio de corte para la enzima de restricción *HindIII* (Figura 16a), lo cual nos permitió discernir si en el vector presente en las clonas

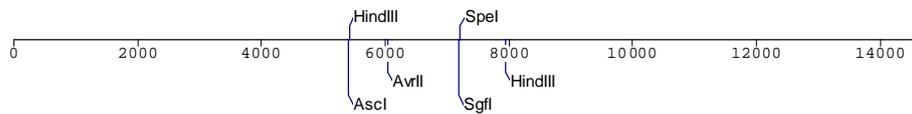
estaba insertado el fragmento en sentido y/o antisentido. Utilizando el programa Chromas Pro se pudo predecir el número y el tamaño de la bandas esperadas (Figura 16b).

(a)



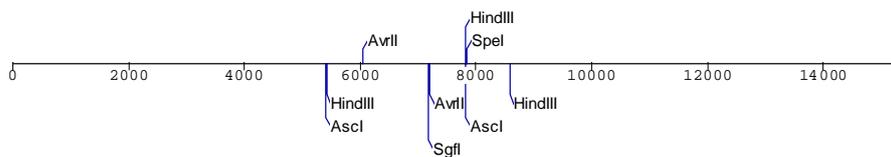
(b)

pMCG161-s



Fragmentos esperados 2529 *HindIII - HindIII*  
12179

pMCG161-iso4E-as



Fragmentos esperados 754 *HindIII - HindIII*  
2403 *HindIII - HindIII*  
12179

Figura 16. Predicción de secuencia del vector pMCG161-s y pMCG161-iso4E-as y fragmentos esperados al digerir éstos con la enzima *HindIII*. (a) Esquemas de secuencias del fragmento *elFiso4E* y el vector pMCG161 mostrando sitios de corte para las enzimas de restricción *Ascl*, *AvrII*, *SpeI*, *SgfI* y *HindIII*. (b) Predicción de secuencia de los vectores pMCG161-s y pMCG161-iso4E-as mostrando que al digerirse con la enzima *HindIII* el vector pMCG161-s tendrá 2 fragmentos y el vector pMCG161-iso4E-as tendrá tres fragmentos.

Después de este análisis se obtuvo DNA plasmídico de las 12 clonas obtenidas en la clonación en sentido. Se digirió este DNA con la enzima *HindIII* y se corrió un gel de agarosa con el producto de la digestión. Como se puede observar en la figura 17, 11 de las 12 clonas obtenidas presentan dos fragmentos, uno de 12 179 pb y otro de 2 529 pb, lo que nos indica que esas 11 clonas tienen el vector pMCG161-s. También se puede observar un control donde el vector pMCG161 es digerido y éste sólo presenta un banda de 12 179, que indica que solo se linearizó el vector y que no contiene el fragmento *eIFiso4E*.

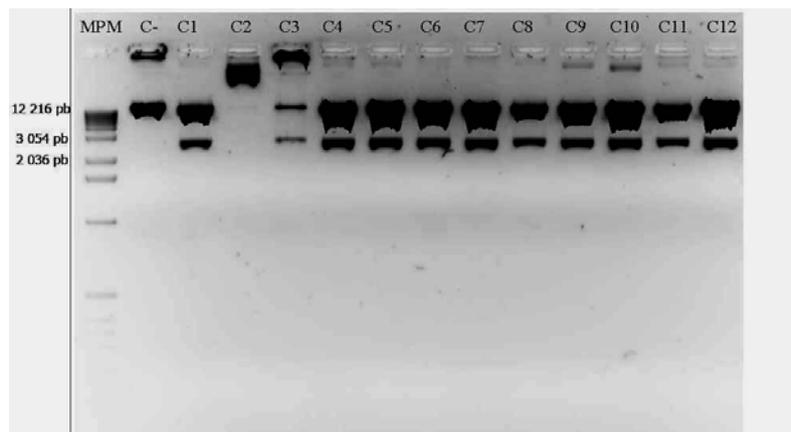


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de las clonas generadas en la transformación con el vector pMCG161-s con la enzima de restricción *HindIII*. El control negativo (C-) es la digestión del vector pMCG161. C1-12 son las digestiones de las clonas generadas.

Para verificar este resultado se seleccionaron tres clonas positivas, la clona 1, 4 y 5, y se digirieron con las dos enzimas de restricción que permitieron su inserción al vector pMCG161, *AvrII* y *AscI*. Esto permitió comprobar si se encontraba el fragmento *eIFiso4E* en el DNA plasmídico extraído de cada clona. En la figura 18 se puede observar que el DNA plasmídico de las tres clonas seleccionadas al ser digerido con ambas enzimas de restricción libera un fragmento del tamaño del *eIFiso4E*.

Al ver este resultado se seleccionó la clona 4 para la clonación en antisentido. Para ello se digirió el DNA plasmídico de pMCG161-iso4E-s con las enzimas *SpeI* y *SgfI*, linearizando el vector. y pGEM-T-iso4E con las mismas enzimas de restricción, purificando ambos fragmentos del gel de agarosa y procediendo a la ligación y transformación

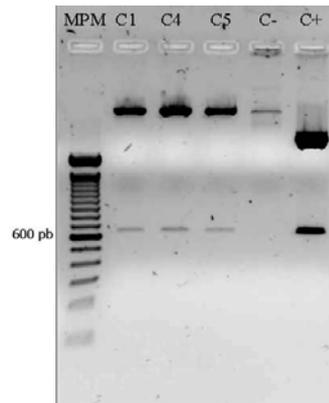


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de las digestiones con *AvrII* y *AscI* de las clonas C1, C4 y C5 obtenidas en la transformación con el vector pMCG161-iso4E-s. El control negativo es el vector pMCG161. El control positivo es el vector pGEM-T-iso4E.

La selección se realizó en presencia de cloranfenicol obteniéndose 3 clonas que posiblemente contenían el plásmido pMCG161 tanto en “sentido”, como en “anti-sentido”(pMCG161-iso4E-as). La figura 19 muestra el DNA plasmídico extraído de cada clona y digerido con *HindIII*. Las digestiones presentaron tres fragmentos, uno de 12 179 pb, otro de 2 403 pb y otro de 754 pb lo que nos indica que las 3 clonas contienen el vector pMCG161-iso4E-as.

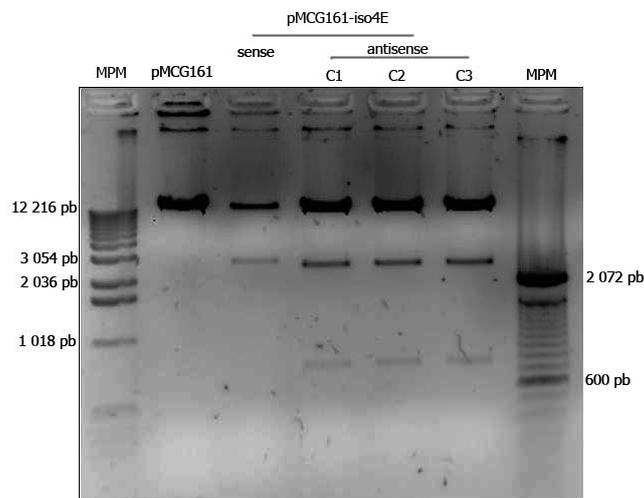


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa de las digestiones con *HindIII* de las clonas obtenidas en la transformación con el vector pMCG161-iso4E-as. El vector pMCG161 presenta una banda en 12 179 pb. El vector pMCG161-s presenta dos bandas: 12 179 pb y 2 529 pb. Las clonas C1-3 presentan tres bandas: 754, 2403 y 12179 pb.

Para verificar este resultado se seleccionó la clona 2 y se digirió con las dos enzimas de restricción que permitieron su inserción al vector pMCG161-s, *SpeI* y *SgfI*. Esto permitió comprobar si se encontraba el fragmento *eIFiso4E* en

antisentido en el DNA plasmídico extraído de la clona. En la figura 20 se puede observar que el DNA plasmídico de la clona 2 al ser digerido con ambas enzimas de restricción libera el fragmento *eIFiso4E*.

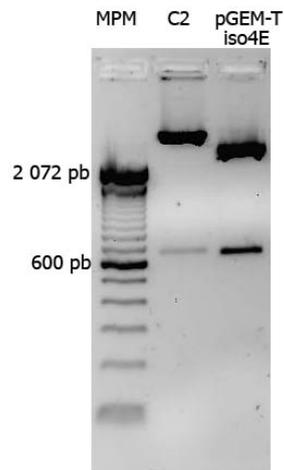


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa de las digestiones con *SpeI* y *SgfI* de la clona 2 obtenida en la transformación con el vector pMCG161-iso4E-as. El control positivo es el vector pGEM-T-iso4E. Ambas digestiones liberan el fragmento *eIFiso4E* de 650 pb.

### 6.3 Transformación de callos embriogénicos de maíz con el vector de silenciamiento pMCG161-iso4E-as.

Una vez que se verificó que esta clona contenía el vector pMCG161-iso4E-as, es decir que contiene el fragmento *eIFiso4E* en sentido y en antisentido se mandó secuenciar con cebadores específicos para secuenciar el fragmento *eIFiso4E* en sentido (pMCG161-S) y en antisentido (pMCG161-AS; Ver Apéndice. Tabla de cebadores) Una vez verificadas las secuencias en ambos sentidos se creció en un volumen grande de medio LB más cloranfenicol y se extrajo el DNA plasmídico, de igual manera se creció el vector pMCG161. Se midió su concentración y se ajustó a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Debido a las dificultades que aún presentan los protocolos para transformar maíz con *Agrobacterium* se decidió emplear la biobalística para lograr el objetivo de introducir el vector pMCG161-iso4E-as empleando el protocolo de bombardeo establecido por Guerrero-Andrade (1998).

Se bombardearon 80 cajas petri con callo embriogénico de maíz (Figura 21), 40 cajas con el vector pMCG161-iso4E-as (**KO**) y 40 cajas con el vector pMCG161

(**MOCK**). Se bombardearon callos con el vector pMCG161 con el fin de poder evaluar cambios debidos al procedimiento y/o inherentes a la presencia de vector y no al silenciamiento de elFiso4E. Una vez que se bombardearon los callos embriogénicos de maíz se dejaron en recuperación por una semana en condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo

Después se colocó el callo de dos cajas petri en un frasco con medio que contenía agente selectivo (glufosinato de amonio) a una concentración de 3 mg/L. Además de tener en cultivo el callo transformado con el vector pMCG161-iso4E-as y pMCG161, se colocaron 5 frascos con callo embriogénico de maíz no transformado en medio de selección (**CS**), esto con el fin de observar la muerte del callo no transformado en medio de selección. Este control nos indicaría la actividad del agente selectivo, glufosinato de amonio. Además de este control se colocaron 2 frascos con callo embriogénico de maíz no transformado en medio sin agente selectivo (**WT**), con el fin de evaluar la calidad del medio, las condiciones de crecimiento y el manejo adecuado de los callos.

Los subcultivos se realizaron cada dos semanas. Al finalizar las primeras dos semanas en selección , se observaron zonas necrosadas de color café presentando oxidación, lo que indica que en esas células hay muerte celular ya que no expresaron el gen de selección *bar* . En contraste, en el mismo callo se apreciaron zonas de color blanco amarillento y zonas conformadas por embriones que presentaron un color verde, lo que indicó la viabilidad del callo señalando que dichas células si lograron incorporar el gen de selección *bar* (Figura 22).

En cada subcultivo se eliminaban las zonas de necrosis y/o oxidadas y se colocaba el callo viable en medio con agente selectivo, disgregándolo lo más posible, para que con ello hubiera una mayor superficie de contacto entre el callo y el agente selectivo.

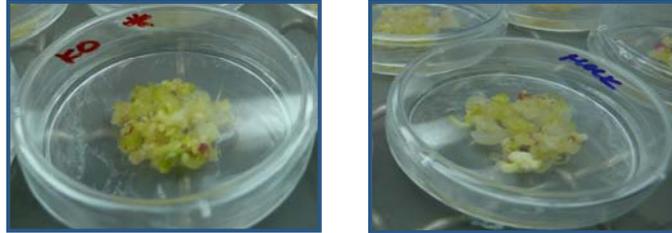


Figura 21. Callos embriogénicos de maíz bombardeados con el vector pMCG161-iso4E-as (KO) y el vector pMCG161 (MOCK)

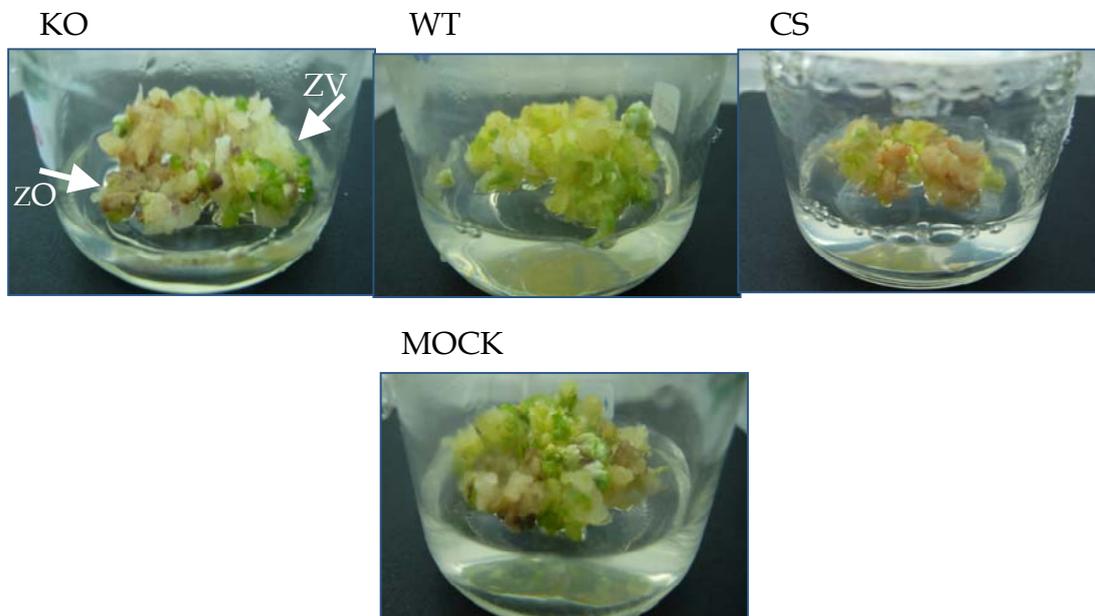


Figura 22. Callo embriogénico de 16 días en selección con 3 mg/L de glufosinato de amonio. ZO indica zonas oxidadas y/o necrosadas y ZV indica zonas viables

La selección se mantuvo durante tres meses, se observaba que los callos MOCK y KO tenían cada vez menos zonas de necrosis y/o oxidadas lo que indicó que se estaba haciendo una selección adecuada y que el callo transformado que había integrado el vector a su genoma tenía la capacidad de crecer en presencia del agente selectivo glufosinato de amonio. No sucedió así en el control CS, el cual, al ser callo no transformado cultivado en medio con agente selectivo, no crecía y en cada subcultivo se eliminaba gran parte del tejido que presentaba necrosis y oxidación. También se observó que el control

WT tenía una gran tasa de crecimiento y no tenía zonas de necrosis o muerte celular (Figura 23).

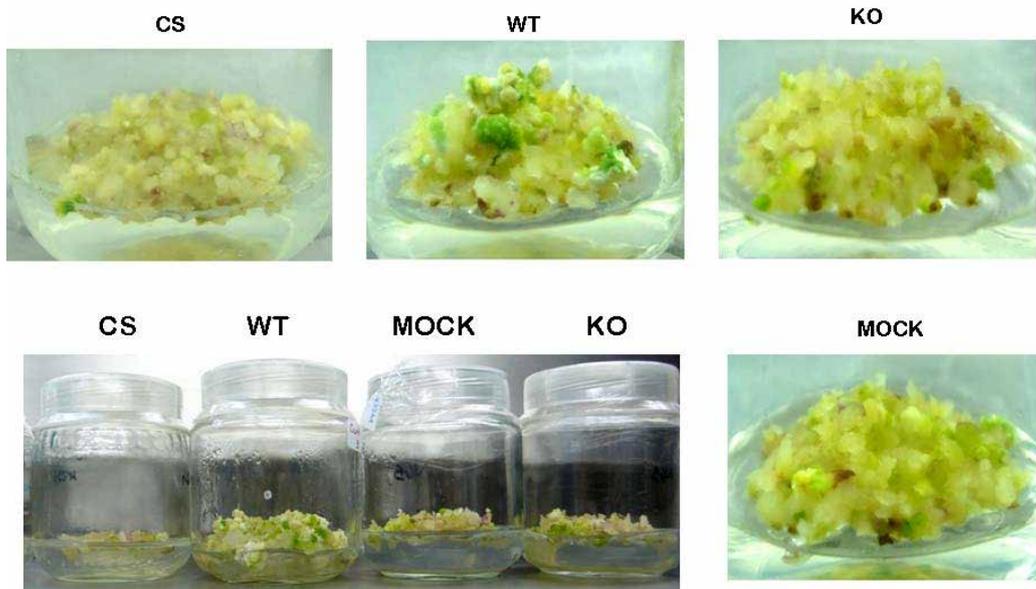
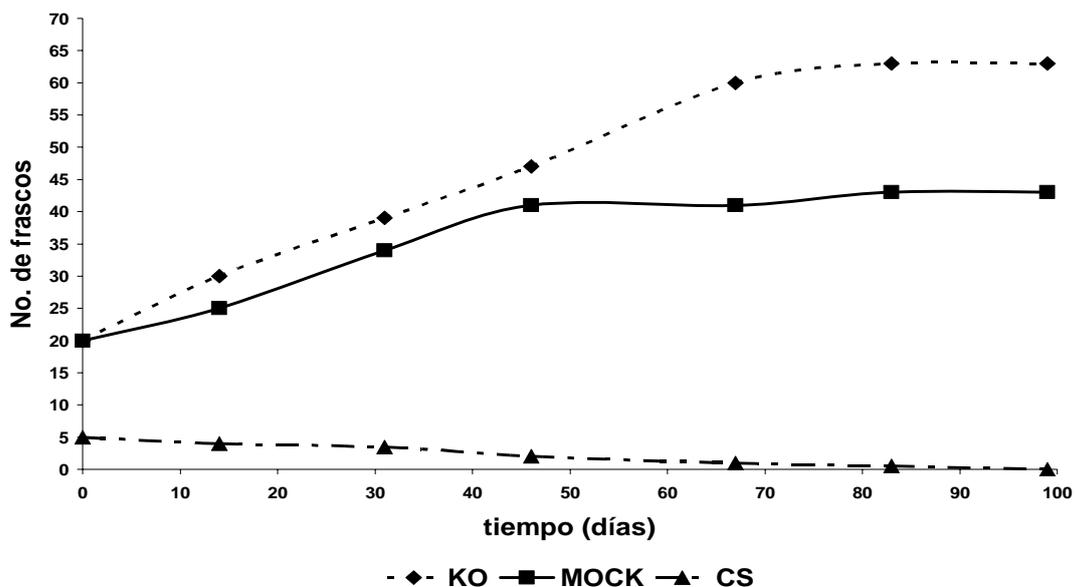


Fig. 23. Selección de callo transformado al día 67.. Se observa un enriquecimiento de callo viable tanto en el callo KO como en el MOCK. El CS se observa tejido necrosado con pérdida de morfología normal. Se observa el crecimiento de los callos transformados a una menor tasa que el control WT y se observa un nulo crecimiento del control CS.

Durante el proceso de selección en cada subcultivo se contó el número de frascos que se mantenían en cultivo, mostrando así la tasa de crecimiento o muerte, según el caso (Grafica 1).



Grafica 1. Selección positiva de callos transformados. Número de frascos en cultivo en cada uno de los subcultivos realizados.

#### 6.4 Análisis molecular de los callos transformados

Una vez transcurrido el periodo de selección en callo se analizó si éste tenía insertado al genoma el vector pMCG161-iso4E-as o el vector pMCG161, según fuese el caso. El hecho de que el callo transformado seleccionado en presencia de un agente selectivo mostrara crecimiento y proliferación daba evidencia fisiológica de que el callo transformante contenía el vector pMCG161-iso4E-as o pMCG161 integrado a su genoma, no obstante se corroboró este hecho con evidencia molecular de la integración de este vector al genoma de dicho callo. Para comprobar la inserción se realizó un RT-PCR para detectar la expresión del RNA mensajero del gen *bar* en callos transformados a los 90 días en selección utilizando el mRNA de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenada (*GA3PDH*) como control de carga (Figura 24). Se puede observar que los callos transformados tanto con la construcción pMCG181-iso4E-as (KO) y los callos transformados con el vector pMCG161 (MOCK) expresaron el mRNA del gen *bar*, lo que indicaba la presencia del vector integrado a su genoma.

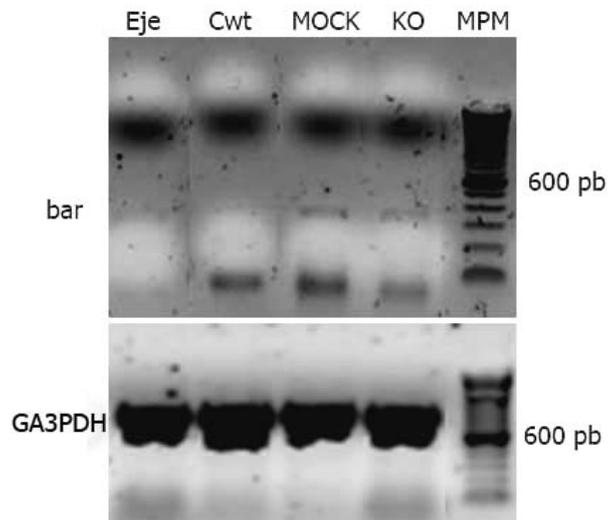


Fig. 24. Inserción del vector pMCG161-iso4E-as al genoma del callo transformado. RT-PCR del gen *bar* (banda de peso aprox. 300 pb) para RNA total de callo WT, de callo transformado MOCK, de callo transformado KO y RNA total de eje de maíz con 24 horas de germinación. Como control de carga se utilizó *GA3PDH*.

Teniendo evidencia molecular de la integración del vector al genoma del callo transformado se evaluó el silenciamiento del factor eIFiso4E producido por

dicho vector. Para ello se realizó una inmunodetección del factor eIFiso4E utilizando un anticuerpo anti-eIFiso4F de trigo. Como primer paso se comprobó si dichos anticuerpos podrían reconocer el factor en una muestra de proteína total de callo embriogénico de maíz, ya que se sabía que podían reconocer el factor en proteína total de eje de maíz (Dinkova *et al*, 2000). Como se observa en la figura 25, se puede detectar el factor eIFiso4E en proteína total de callo de maíz, el cual pesa aproximadamente 28 kDa.

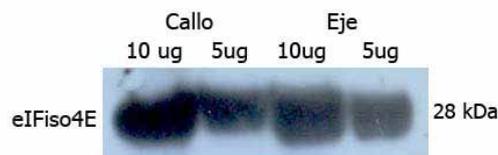


Figura 25. Inmunodetección del factor eIFiso4E en callo embriogénico de maíz. Se utilizó proteína total de eje de maíz y de callo embriogénico de maíz. Se detectó con el anticuerpo anti-eIFiso4F.

Ya que se probó que el anticuerpo podía detectar el factor eIFiso4E en callo, se realizó una inmunodetección del factor en callo de maíz transformado (Fig. 26). Utilizando como controles negativos del silenciamiento proteína total de eje de maíz, proteína total de callo WT y proteína total de callo MOCK. Se observó la misma intensidad de señal tanto para los controles negativos como para el callo KO, lo que indicaría la presencia en igual cantidad o una disminución no detectable del factor eIFiso4E en el callo transformado con la construcción pMCG161-iso4E-as.

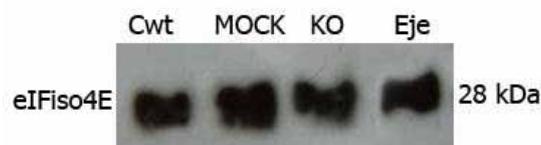


Figura 26. Inmunodetección del factor eIFiso4E en callo transformado. Se utilizaron 40  $\mu$ g de proteína total de eje de maíz, de callo WT (Cwt), de eje de maíz (Eje), de callo MOCK y de callo KO. Se detectó con anticuerpo anti-eIFiso4F.

Dado que las condiciones de este método no podrían detectar mínimos grados de silenciamiento se evaluó el decaimiento del mRNA de *eIFiso4E* mediante un RT-PCR semicuantitativo. Se extrajo RNA total de callo transformado MOCK y

KO de 45 días en medio de selección, con el fin de realizar el RT-PCR semicuantitativo( Figura 27).

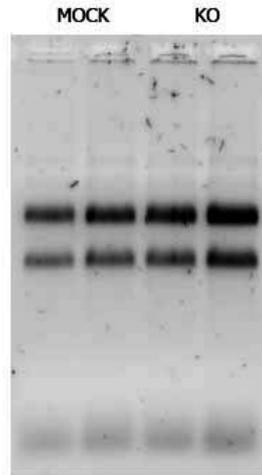
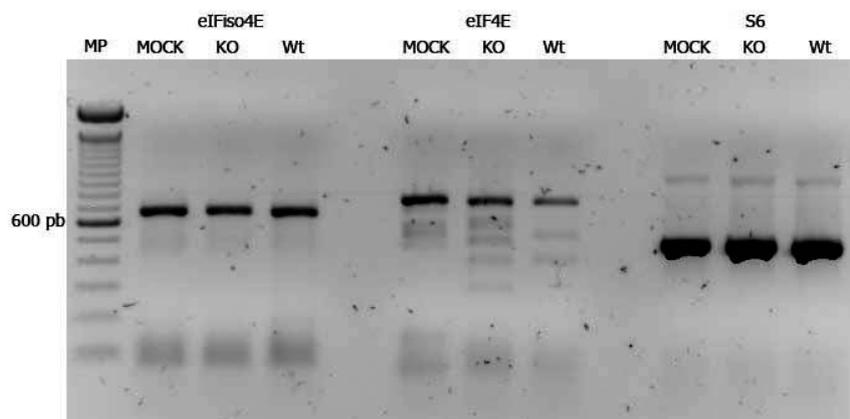


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa de RNA total de callo MOCK y KO. Se muestran 4 extracciones de RNA total para observar la integridad de los RNAs 25S y 18S.

En la figura 28a se muestra el RT-PCR semicuantitativo donde se evalúa la cantidad de RNA mensajero para *eIFiso4E* y *eIF4E*, así como para la proteína ribosomal S6 como control de carga. Se observó que para ambos factores existe la misma cantidad de mensajero tanto en callo transformado KO, como en el control negativo MOCK, lo que indica que a nivel de callo no se observa un silenciamiento de *eIFiso4E*. Para comprobar este resultado se realizó otro RT-PCR semicuantitativo (Figura 28b) disminuyendo el numero de ciclos y utilizando el mRNA de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa como control de carga (*GA3PDH*). Sin embargo, al igual que en el caso anterior no se detecto disminución en el mRNA de *eIFiso4E*

(a)



(b)

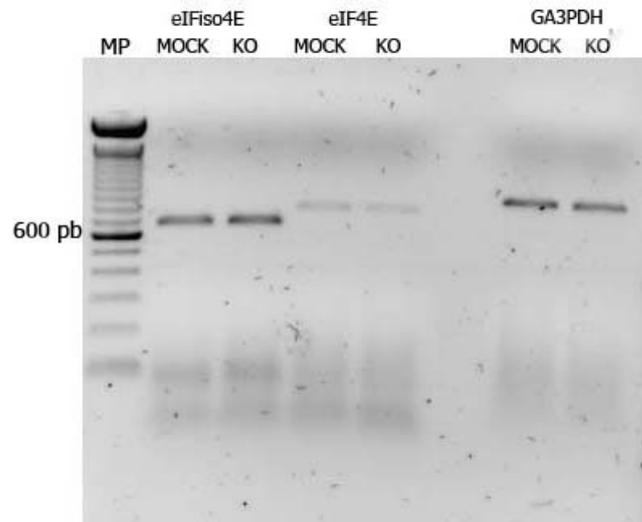
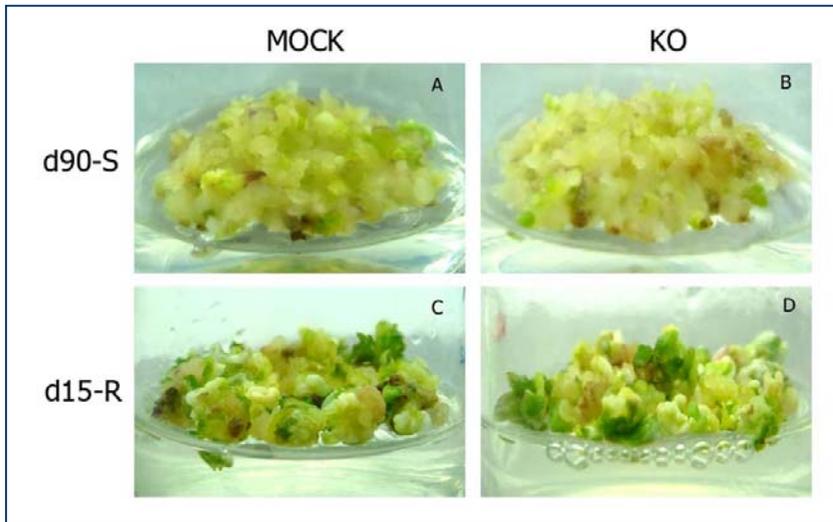


Figura 28. Evaluación del decaimiento del mensajero del factor *eIFiso4E*. (a) RT-PCR semicuantitativo evaluando al factor *eIFiso4E* y *eIF4E* de RNA total de callo WT, MOCK y KO. En ambos casos no se observa un decaimiento del mRNA en el callo KO comparado con el control negativo MOCK. El control de carga fue la proteína ribosomal S6. (b) RT-PCR semicuantitativo evaluando al factor *eIFiso4E* y *eIF4E* de RNA total de callo WT, MOCK y KO. En ambos casos no se observa un decaimiento del mRNA en el callo KO comparado con el control negativo MOCK. El control de carga fue la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GA3PDH).

### 6.5 Regeneración de plantas a partir del callo de maíz transformado

A partir de la resistencia sostenida de los callos transformados, así como de la expresión del RNA mensajero correspondiente a *bar*, se infiere una integración estable del vector pMCG161-as (KO) y pMCG161 (MOCK). Por lo cual se prosiguió a regenerar plantas de maíz de estos callos. Como se observa en la figura 29 el callo embriogénico pasó de un tejido indiferenciado a uno diferenciado mostrando cambios morfológicos evidentes como presencia de tejido verde oscuro, apicalidad y generación de sistema radicular (29a). A medida que estas plántulas crecían se regeneraban por completo. No se observaron cambios fenotípicos evidentes en la morfología de las plantas KO regeneradas.

(a)



(b)

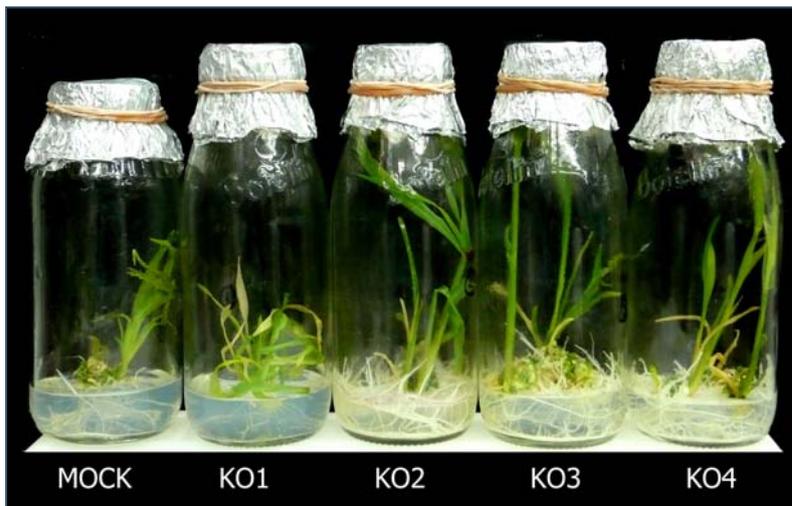
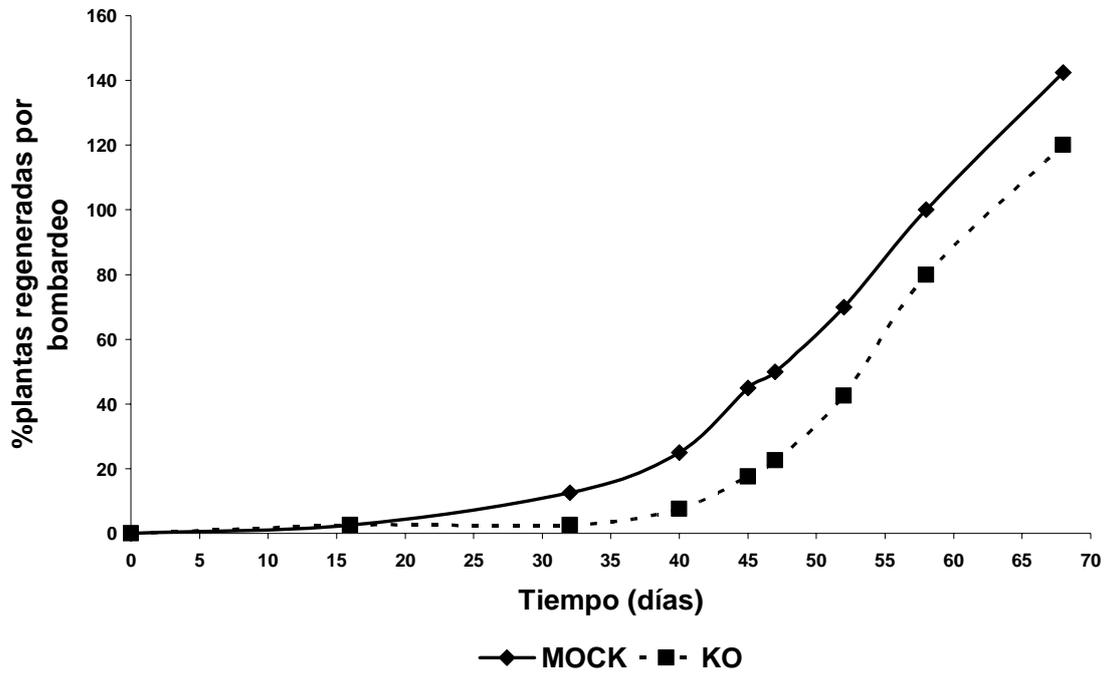


Figura 29. Regeneración de plántulas a partir de callo transformante. (a) callo transformante de 90 días en selección (d90-S) comparado con el callo de 15 días en medio de regeneración (d15-R). (b) Fotografía de plántulas regeneradas de callo MOCK y KO.

En este periodo de regeneración el callo estaba en medio con agente selectivo y se evaluó este proceso contando el número de embriones germinados por bombardeo de cada uno de los callos transformados (MOCK y KO), estos resultados se presentan en la grafica 2. Se observa un menor número de embriones germinados del callo transformado KO en comparación con el callo transformado MOCK.



Grafica 2. Regeneración de plántulas transformadas. Número de embriones germinados por bombardeo.

## 7. DISCUSIÓN

El inicio de la traducción es un proceso complejo y altamente regulado ya que de él depende el desarrollo y la sobrevivencia de los organismos, así como su capacidad de respuesta a las condiciones externas (Gingras *et al.*, 1999). El factor de inicio de la traducción eIFiso4E, exclusivo de plantas, es un elemento esencial en este proceso debido a su unión con el CAP de los mRNA a traducirse, uno de los primeros pasos del inicio de la traducción al igual que de los más regulados (Browning, 1996). Aunado a esto, este factor se expresa diferencialmente al inicio de la germinación en ejes de maíz, etapa donde hay síntesis de proteínas a partir de mensajeros almacenados en la semilla quiescente. Estudios *in vitro* sugieren que este factor tiene una unión selectiva al CAP de ciertos mRNA, lo que origina una traducción diferencial de proteínas en presencia de este factor, lo cual conlleva a pensar que eIFiso4E regula la traducción seleccionando los mensajeros a traducir en ciertas condiciones y etapas del desarrollo de la planta (Dinkova *et al.*, 2000).

Una de las opciones metodológicas para estudiar la función de proteínas *in vivo* es aquella donde se generan organismos mutantes que no expresan dicha proteína o donde se disminuye en un gran porcentaje su expresión, es decir, el silenciamiento de la proteína.

En este trabajo se eligió utilizar RNA de interferencia debido a que es un método ampliamente utilizado en plantas, relativamente rápido y se han reportado silenciamientos en maíz de hasta 80% para genes específicos. Se utilizó un vector diseñado para inducir silenciamiento por este método, el vector pMCG161, particularmente utilizado en maíz (McGinnis *et al.*, 2005)

Para llevar a cabo el silenciamiento del factor eIFiso4E de manera específica y no de otra isoforma se realizó un análisis comparativo entre la secuencia de nucleótidos del factor *eIFiso4E* y *eIF4E* (el factor *nCBP* tiene solo un 32% de identidad con eIFiso4E debido a ello no se tomó en cuenta para el análisis) y se eligió una región de 650 pb donde la homología entre los dos factores fuera la

menor posible (Figura 10). A pesar de esto en la región seleccionada hay porciones altamente homólogas entre las dos isoformas. Por ello se realizó el ensayo de generar fragmentos de 21-24 nt desde los extremos del fragmento, de manera similar a lo que se produciría a partir de la acción de la enzima Dicer en el mecanismo de RNA interferente endógeno de la planta, observándose una muy baja probabilidad de generar fragmentos que induzcan silenciamiento de eIF4E.

Se logró con éxito la clonación del fragmento del gen *eIFiso4E* en el vector de silenciamiento pMCG161 (Figura 24) corroborando esto mediante secuenciación. Una vez obtenido el vector pMCG161-iso4E-as se transformó con esta construcción callo embriogénico de maíz tipo II. Se transformó este tejido debido a que en todas las transformaciones para generar plantas de maíz mutantes se utiliza callo embriogénico de tal forma que al regenerar este callo transformado dará origen a una planta con todas sus células transformantes (Green, 2007; McGinnis *et al.*, 2005). Además, el callo embriogénico de maíz tipo II tiene una alta tasa de regeneración y presenta una mayor eficiencia de transformación (Callis *et al.*, 1987). En este trabajo se utiliza callo embriogénico de maíz generado a partir de una variedad 100% mexicana (Costeño), no existen reportes donde se utilice este callo para la generación de plantas mutantes que contengan silenciado un gen.

Se transformó este tejido utilizando la técnica de bombardeo de partículas de tungsteno forradas con DNA plasmídico. Esta técnica es la más utilizada para transformar maíz y otros cereales debido a que el callo de maíz es un tejido recalcitrante y la técnica de bombardeo ha permitido transformar con éxito este tipo de tejidos (Klein y Fitzpatrick-McElligott, 1993; May *et al.*, 2003; Till *et al.*, 2004). Una desventaja de esta técnica es que se transforman mayoritariamente las células superficiales que se bombardean y la selección por el herbicida glufosinato de amonio no es muy contundente ya que es un herbicida de contacto y el callo no se puede disgregar lo suficiente para formar una monocapa que esté en contacto directo con el agente de selección, dando como resultado escapes durante la selección. Por esta razón, el tiempo de selección para los callos transformantes es bastante prolongado.

Esta metodología permite insertar aleatoriamente el vector al genoma de maíz en más de una ocasión, teniendo multicopias en el genoma. Existen reportes donde un tercio de las plantas de maíz transformantes, generadas por bombardeo, contienen una sola copia del vector insertada al genoma, mientras los dos tercios restantes tienen multicopias (McGinnis *et al.*, 2007). Se ha observado en *A. thaliana* que es más eficiente el silenciamiento cuando solo existe una copia del vector insertado al genoma, no obstante no se ha comprobado esto en maíz (Kerschen *et al.*, 2004). En el callo de maíz transformado no se pudo evaluar el número de copias insertadas debido a que es un tejido heterogéneo, donde existen células transformadas con diferentes número de copias del vector, esto no nos permitiría evaluar el numero de copias presentes en cada una de ellas.

Una vez que se bombardeó el callo embriogénico de maíz con el vector pMCG161-iso4E-as y con el vector pMCG161 se realizó la selección en presencia del agente selectivo glufosinato de amonio, como se observa en la grafica 1, el control de selección murió casi al terminar los 90 días de selección, por lo tanto se podría presumir que el callo sobreviviente a ese mismo tiempo de selección era callo que contenía en su totalidad células transformadas o un gran porcentaje de ellas lo era.

En ningún reporte previo se han descrito estudios o análisis molecular a nivel de callos transformadas, todos los estudios reportados han realizado el escrutinio de transformantes a nivel de plantas regeneradas, evaluando diferentes generaciones de ellas. También el silenciamiento mediante RNAi utilizando vectores del tipo pMCG161, se ha evaluado a nivel de planta y no de callo, dada la heterogeneidad del sistema (Klein y Fitzpatrick-McElligott, 1993; May *et al.*, 2003; Till *et al.*, 2004). No obstante, se decidió probar si este callo transformado tenía silenciado el factor elFiso4E.

Lo primero que se evaluó fue la presencia del vector en el genoma del callo transformado mediante un RT-PCR del gen *bar*, el cual confiere la resistencia al agente selectivo glufosinato de amonio. Se demostró que tanto el callo

transformado con la construcción pMCG161-iso4E-as como con pMCG161 tenían insertados dichos vectores al genoma (Figura 24). Una vez evaluada la inserción se decidió evaluar el silenciamiento mediante la inmunodetección del factor eIFiso4E. Para ello se utilizó un anticuerpo policlonal contra el complejo eIFiso4F extraído de trigo. La inmunodetección (Figura 26) no muestra evidencia del silenciamiento de este factor en el callo transformado con la construcción pMCG161-iso4E-as. Esto se puede deber a que éste es un anticuerpo policlonal contra un complejo, y que tanto eIF4E como eIFiso4E pueden compartir epítopes que reconozca el mismo anticuerpo, dando así falsos positivos. Unido a esto, estos dos factores tienen una diferencia de peso de solo 3 kDa, diferencia difícil de separar en un gel de SDS-PAGE. Debido a esto, no se descartó la posibilidad que el callo transformado tuviera silenciado el factor eIFiso4E.

Otra manera de evaluar el silenciamiento de una proteína es medir el nivel de decaimiento del mRNA blanco debido a la maquinaria de RNAi. Para ello se realizó un RT-PCR semicuantitativo, de callo en 45 días en selección, a fin de evaluar la cantidad de mRNA de *eIFiso4E* y de *eIF4E* debido a que este último sería un blanco secundario del silenciamiento dada su homología con *eIFiso4E*.

Los callos transformados con el vector de silenciamiento pMCG161-iso4E-as no mostraron decaimiento del mensajero de eIFiso4E o de eIF4E respecto al control, transformado con el vector pMCG161 vacío (Figura 28). Esto puede deberse a que un porcentaje del callo transformado no sean o fueran células transformadas, lo que enmascararía el efecto de silenciamiento de las células que sí lo son.

El análisis realizado a nivel de callo no es concluyente respecto al silenciamiento de eIFiso4E mediante la técnica de RNAi. Dada la resistencia al herbicida y la expresión del gen *bar* a partir del mismo vector en los transformantes, la transformación fue positiva y existe una alta probabilidad de que el transgene se haya insertado en el genoma de las células transformantes. Debido a esto se decidió continuar con la regeneración.

En la etapa de regeneración se observó una disminución en el número de embriones germinados del callo transformado con la construcción pMCG161-iso4E-as en comparación con el callo transformado con el vector pMCG161 (Grafica 2). El inicio de la etapa de regeneración en cultivo *in vitro* es la etapa que más se asemeja a la germinación de la semilla, el que existan diferencias en la tasa de regeneración del callo transformado, sugiere que pueda ser debido al silenciamiento del factor eIFiso4E en las células transformadas donde esta comprometida la germinación. Esto concuerda con estudios hechos a nivel de germinación, donde se ha observado que este factor se expresa diferencialmente en las primeras etapas de la germinación, indicando su importancia y quizás su dependencia en esta etapa (Dinkova *et al*, 2000)

Existen varias posibilidades acorde a los resultados obtenidos hasta este momento con los callos transformados. Una, que ya hemos mencionado es que el silenciamiento no se ha podido evidenciar por la heterogeneidad del tejido analizado. Otra, que a pesar de que el transgen se haya insertado establemente al genoma, una baja expresión del siRNA, a pesar de su promotor constitutivo, impida un silenciamiento efectivo. Estudios recientes en materia del silenciamiento por RNAi en maíz han indicado que ciertos genes son susceptibles a un silenciamiento por RNAi experimental muy efectivo, mientras que otros son refractarios (McGinnis *et al*, 2007). No se ha encontrado una correlación para este fenómeno pero es probable que sea algo inherente a cada secuencia. Una tercera posibilidad es que los callos transformados con un silenciamiento efectivo presenten baja tasa de regeneración, lo cual es sugerido por el Grafico 2.

Las perspectivas de este proyecto son identificar las plantas transgénicas mediante su resistencia al herbicida glufosinato de amonio y corroborarlo mediante un PCR del gen *bar*. Una vez identificadas las plantas transformadas, se evaluará el grado de silenciamiento del factor blanco primario, eIFiso4E, y del blanco secundario, eIF4E. Evaluando posibles cambios fenotípicos durante su desarrollo hasta la obtención de semillas. Estas semillas se podrán utilizar en experimentos para elucidar mejor el papel de este factor en el inicio de la traducción.

## 8. CONCLUSIONES

- Se logró la transformación de callo embriogénico de maíz tipo II variedad Costeño con el vector pMCG161-iso4E-as.
- Mediante la amplificación del gen *bar* en callos de maíz transformado resistente a glufosinato de amonio se concluyó que dicho tejido contenía células transformadas.
- A nivel de callo embriogénico transformado no se puede detectar el silenciamiento del factor elFiso4E.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Allen,ML, Metz,AM, Timmer,RT, Rhoads,RE y Browning,KS. (1992)."Isolation and sequence of the cDNAs encoding the subunits of the isozyme form of wheat protein synthesis initiation factor 4F." *J.Biol.Chem.* 267.32: 23232-23236.

Allen,RS, Millgate,AG, Chitty,JA, Thisleton,J, Miller,JA, Fist,AJ, Gerlach,WL y Larkin,PJ. (2004)."RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy." *Nat.Biotechnol.* 22.12: 1559-1566.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, (2000). *Current Protocols in Molecular Biology*: 1-4. John Wiley and Son

Baulcombe, D. (2004)."RNA silencing in plants." *Nature* : 356-363.

Baumberger, N y Baulcombe DC. (2005)."Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102.33: 11928-11933.

Brodersen, P y Voinnet O (2006)."The diversity of RNA silencing pathways in plants." *Trends Genet.* 22.5: 268-280.

Browning, KS (2004)."Plant translation initiation factors: it is not easy to be green." *Biochem.Soc.Trans.* 32.: 589-591.

Browning,KS (1996)."The plant translational apparatus." *Plant Mol.Biol.* 32.1-2: 107-144.

Browning,KS, Webster,C, Roberts,JK, Ravel,JM, (1992)."Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants." *J.Biol.Chem.* 267.14: 10096-10100.

Callis, J, Fromm M y Walbot V. (1987)."Introns increase gene expression in cultured maize cells." *Genes Dev.* 1.10: 1183-1200.

Carberry, SE, Darzynkiewicz E, y Goss DJ. (1991)."A comparison of the binding of methylated cap analogues to wheat germ protein synthesis initiation factors 4F and (iso)4F." *Biochemistry* 30.6: 1624-1627.

Carberry, SE y Goss DJ. (1991). "Wheat germ initiation factors 4F and (iso)4F interact differently with oligoribonucleotide analogues of rabbit alpha-globin mRNA." *Biochemistry* 30.18: 4542-4545.

Cho,PF, Poulin,F, Cho-Park,YA, Cho-Park,IB, Chicoine,JD, Lasko,P y Sonenberg,N. (2005)."A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP." *Cell* 121.3: 411-423.

Chuang, CF y Meyerowitz EM. (2000)."Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97.9: 4985-4990.

Dinkova, TD, Aguilar R, y Sanchez de Jimenez E. (2000)."Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level." *Biochem.J.* 351: 825-831.

Dinkova,TD, Keiper,BD, Korneeva,NL, Aamodt,EJ y Rhoads,RE. (2005)."Translation of a small subset of *Caenorhabditis elegans* mRNAs is dependent on a specific eukaryotic translation initiation factor 4E isoform." *Mol.Cell Biol.* : 100-113.

Dunoyer, P y Voinnet O. (2005)."The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways." *Curr.Opin.Plant Biol.* : 415-423.

Duprat,A., Caranta,C, Revers,F, Menand,B, Browning,KS y Robaglia,C. (2002)."The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses." *Plant J.* 32.6: 927-934.

Fukusaki,E, Kawasaki,K, Kajiyama,S, An,CI, Suzuki,K, Tanaka,Y y Kobayashi,A. (2004)."Flower color modulations of *Torenia hybrida* by downregulation of chalcone synthase genes with RNA interference." *J.Biotechnol.* 111.3: 229-240.

Fusaro,AF, Matthew,L, Smith,NA, Curtin,SJ, dic-Hagan,J, Ellacott,GA, Watson,JM, Wang,MB, Brosnan,C, Carroll,BJ y Waterhouse,PM. (2006)."RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway." *EMBO Rep.* 7.11: 1168-1175.

Gallie,DR. (1998)."A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation." *Gene* 216.1: 1-11.

Gingras,AC, Raught B y Sonenberg N. (1999)."eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation." *Annu.Rev.Biochem.* 68: 913-963.

Green, CE. (2007)."Plant regeneration from tissue cultures of maize". *Crop Sci*, 417-421. 1975.

Helliwell, CA y Waterhouse PM. (2005)."Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants." *Methods Enzymol.* 392: 24-35.

Hernandez, G y Vazquez-Pianzola P. (2005)."Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families." *Mech.Dev.* 122.7-8: 865-76.

Hinnebusch, AG (2000)"in *Translational Control of Gene Expression*" (Sonenberg, N, Hershey,JWB and Mathews,MB, eds.), pp. 185–244, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY

Himber,C, Dunoyer,P, Moissiard,G, Ritzenthaler,C y Voinnet,O. (2003)."Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing." *EMBO J.* 22.17: 4523-4533.

Jorgensen,RA, Cluster,PD, English,J, Que,Q, Napoli,CA, (1996)."Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences." *Plant Mol.Biol.* 31.5: 957-973.

Kawaguchi, R y Bailey-Serres J. (2002)."Regulation of translational initiation in plants." *Curr.Opin.Plant Biol.* : 460-465.

Kerschen A, Napoli CA, Jorgensen RA y Muller AE (2004)."Effectiveness of RNA interference in transgenic plants". *FEBS Lett* 566: 223-228

Klein,TM y Fitzpatrick-McElligott S. (1993)."Particle bombardment: a universal approach for gene transfer to cells and tissues." *Curr.Opin.Biotechnol.* 4.5: 583-590.

Klein,TM, Harper,EC, Svab,Z, Sanford,JC, Fromm,ME y Maliga,P. (1988)."Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85.22: 8502-8505.

Lee,S, Kim,J, Han,JJ, Han,MJ. y An,G. (2004)."Functional analyses of the flowering time gene *OsMADS50*, the putative SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1/AGAMOUS-LIKE 20 (*SOC1/AGL20*) ortholog in rice." *Plant J.* 38.5: 754-764.

Levin,JZ, de Framond,AJ, Tuttle,A, Bauer,MW, Heifetz,PB. (2000)."Methods of double-stranded RNA-mediated gene inactivation in *Arabidopsis* and their use to define an essential gene in methionine biosynthesis." *Plant Mol.Biol.* 44.6: 759-775.

Li,J, Yang,Z, Yu,B, Liu,J, y Chen,X. (2005)."Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*." *Curr.Biol.* 15.16: 1501-1507.

Manjunath, S, Williams, AJ y Bailey-Serres J. (1999)."Oxygen deprivation stimulates Ca<sup>2+</sup>-mediated phosphorylation of mRNA cap-binding protein eIF4E in maize roots." *Plant J.* 19.1: 21-30.

May BP, Liu H, Vollbrecht E, Senior L. (2005)."Maize-targeted mutagenesis:a knockout resource for maize". *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11541-11546.

McGinnis K, Chandler B, Cone K, (2005)."Transgene induced RNA interference es a tool for plant functional genomics". *Methods Enzymol* 392:1-24

McGinnis K, Murphy N, Alvar R (2007)."Assesing the efficiency of RNA interference for maize functional genomics". *Plant Physiol* 143: 1441-1451.

Messing, J y Dooner HK. (2006)."Organization and variability of the maize genome." *Curr.Opin.Plant Biol.* 9.2: 157-163.

Metz, AM, Timmer RT y Browning KS. (1992)."Isolation and sequence of a cDNA encoding the cap binding protein of wheat eukaryotic protein synthesis initiation factor 4F." *Nucleic Acids Res.* 20.15: 4096.

Miki, D, Itoh R y Shimamoto K. (2005)."RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice." *Plant Physiol* 138.4: 1903-1913.

- Moreno, P (2003). "Vida y obra de granos y semillas" pp 27-41, Fondo de cultura económica La ciencia para todos, México, DF.
- Ogita,S, Uefuji,H, Morimoto,M. y Sano,H. (2004). "Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties." *Plant Mol.Biol.* 54.6: 931-941.
- Park,MY, Wu,G, Gonzalez-Sulser,A, Vaucheret,H y Poethig,RS. (2005). "Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102.10: 3691-3696.
- Park,W, Li,J, Song,R, Messing,J y Chen,X. (2002). "CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana." *Curr.Biol.* 12.17: 1484-1495.
- Pestova, TV y Hellen CU. (2000). "The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis." *Cell Mol.Life Sci.* 57.4: 651-674.
- Pietrzak,M, Shillito,RD, Hohn,T, Potrykus,I. (1986). "Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector." *Nucleic Acids Res.* 14.14: 5857-5868.
- Qi, Y y Hannon GJ. (2005). "Uncovering RNAi mechanisms in plants: biochemistry enters the foray." *FEBS Lett.* : 5899-5903.
- Robaglia, C y Caranta C. (2006). "Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection." *Trends Plant Sci.* : 40-45.
- Rodriguez,CM, Freire,MA, Camilleri,C y Robaglia,C. (1998). "The Arabidopsis thaliana cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development." *Plant J.* 13.4: 465-473.
- Ruud,K.A, Kuhlow,C, Goss,D.J y Browning,K.S. (1998). "Identification and characterization of a novel cap-binding protein from Arabidopsis thaliana." *J.Biol.Chem.* 273.17: 10325-10330.
- Smith,NA, Singh,SP, Wang,MB, Stoutjesdijk,PA, Green,A.G, Waterhouse,PM, (2000). "Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs." *Nature* 407.6802: 319-320.
- Stoutjesdijk,PA, Singh,SP, Liu,Q, Hurlstone,C.J, Waterhouse,PA, Green,AG. (2002). "hpRNA-mediated targeting of the Arabidopsis FAD2 gene gives highly efficient and stable silencing." *Plant Physiol* 129.4: 1723-1731.
- Till BJ y Reynolds SH (2004). "Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING". *MBC plant Biol* 4:12-20
- Travella, S, Klimm TE y Keller B. (2006). "RNA interference-based gene silencing as an efficient tool for functional genomics in hexaploid bread wheat." *Plant Physiol* 142.1: 6-20.

Vaucheret, H. (2006). "Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations." *Genes Dev.* 20.7: 759-771.

Vazquez, F. (2006). "Arabidopsis endogenous small RNAs: highways and byways." *Trends Plant Sci.* 11.9: 460-468.

Voinnet, O. (2005). "Non-cell autonomous RNA silencing." *FEBS Lett.* 579.26: 5858-5871.

Wassenegger, M y Krczal G. (2006). "Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases." *Trends Plant Sci.* 11.3: 142-151.

Watson, JM, Fusaro, AF, Wang, M y Waterhouse, PM. (2005). "RNA silencing platforms in plants." *FEBS Lett.* : 5982-5987.

Wesley, SV, Helliwell, CA, Smith, NA, Wang, MB, Rouse, DT, Liu, Q, Gooding, PS, Singh, SP, Abbott, D, Stoutjesdijk, PA, Robinson, SP, Gleave, AP, Green, AG y Waterhouse, PM. (2001). "Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants." *Plant J.* 27.6: 581-590.

Xie, Z, Johansen, LK, Gustafson, AM, Kasschau, KD, Lellis, AD, Zilberman, D, Jacobsen, SE y Carrington, JC. (2004). "Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants." *PLoS Biol.* 2.5: 642-652.

Yu, J y Buckler ES. (2006). "Genetic association mapping and genome organization of maize." *Curr Opin Biotechnol.* 17.2: 155-160.

## APÉNDICE 1

### REACTIVOS Y SOLUCIONES

#### REACTIVOS UTILIZADOS EN LA TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS *E.coli* COMPETENTES

1. IPTG solución sol. de almacenamiento

1.2 gr de IPTG disueltos en un volumen final de 50 mL, filtrar para esterilizar y guardar a 4°C

2. X-Gal ( 5-Bromo-4-Cloro- 3- indolil-β-D-galactósido)

Disolver 100 mg en 2 mL de N,N'-dimetil-formamida. Cubrir con aluminio y guardar a -20°C

3. Medio LB (1L)

10 g de Bacto-triptona  
5 g de extracto de levadura  
5 g de NaCl

4. Placas de LB/ampicilina/IPTG/X-Gal

Agregar 15 g de agar a un litro de medio LB, esterilizar en autoclave. Dejar que el medio se enfríe a 50 °C y añadir ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL, suplementar con 0.5 mM de IPTG y 80 µg/mL de X-Gal. Mezclar bien y vaciar en placas petri estériles.

#### REACTIVOS EMPLEADOS PARA LA OBTENCIÓN DE DNA PLASMIDICO (MINIPREPS)

Solución I

glucosa 50 mM  
Tris-HCl 25 mM, pH 8.0  
EDTA 10 mM, pH 8.0  
Esterilizar con autoclave

Solución II

NaOH 0.2 N  
SDS 1%  
Preparar al momento de utilizarla

Solución III

Acetato de potasio 5 M	60 mL
Acido acético glacial	11.5 mL
Agua	28.5 mL

SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA POR CTAB

Solución de extracción CTAB

CTAB 2%  
 Tris-HCl 100 mM, pH 8  
 EDTA 20 mM, pH8  
 NaCl 1.4 M

Solución de precipitación CTAB

CTAB 1%  
 Tris-HCl 50 mM, pH 8  
 EDTA 10 mM, pH8

CTAB/NaCl

CTAB 10%  
 NaCl 0.7M  
 Agitar fuertemente y calentarlo a 65°C hasta su completa disolución.

SOLUCIONES PARA INMUNODETECCIÓN

Soluciones para SDS-PAGE

Solución I. Solución de monómeros al 30%

Acrilamida 30g  
 Bis acrilamida 0.8 g  
 Aforar a 100 mL con agua bidestilada y filtrar

Solución II. Amortiguador separador.

Tris HCl 0.76 M  
 SDS 0.2 %

Solución III. Amortiguador apilador

Tris HCl 0.25 M  
 SDS 0.2 %

GEL SEPARADOR		
No. De geles	1	2
Agua (mL)	1.375	2.75
Sol. II (mL)	1	2
Sol. I (mL)	1.625	3.25
PSA 20% (µL)	25	50
TEMED (µL)	2.5	5

GEL APILADOR		
No. De geles	1	2
Agua (mL)	1	2
Sol. III (mL)	0.444	0.888
Sol. I (mL)	0.3	0.6
PSA 20% (µL)	20	30
TEMED (µL)	5	5

Amortiguador de carga

Sol III	1.25 mL
SDS 10%	2 mL
Glicerol	1 mL
Beta-mercapto	0.5 mL
Azul de bromofenol	0.25 mL
Aforar a 100 mL	

Amortiguador de corrida 1X

Tris HCl	3g
Glicina	14.4 g
SDS	1g
Aforar a 1L	

Amortiguador de transferencia

Amortiguador de corrida 1X + 20 % de metanol

APÉNDICE 2  
TABLA DE CEBADORES

1	Zmiso4E-A	ACTAGTGGCGCGCCAAGCTTCACCGGCAGT
2	Zmiso4E-B	GCGATCGCCCTAGGGAAAGTCGGCGACGAT
3	PMCG161S	GCTTTCCTGGACCCGTGCAGC
4	PMCG161AS	ACCGAAACCGGCGGTAAGGA
5	Bar-A	ACAGCGACCACGCTCTTGAA
6	Bar-B	TGCACCATCGTCAACCACTA
7	GA3PDH-A	CCTTGACCGCAGCCTTGATCCTACATC
8	GA3PDH-B	ACCCATCCTCGTTTCCTCCGTCTAG
9	S6-A	TGATGCTCTGGGTGAGGAGTTAAA
10	S6-B	TTCCTTCAGCCTCTGGGCAAGAAG

## APÉNDICE 3

MEDIOS PARA CULTIVO DE TEJIDO *IN VITRO*

MEDIO DE CULTIVO N6-p MODIFICADO (Chue et al., 1975)

a) Soluciones de macro y micronutrientes

*Solución I: Nitratos*

COMPUESTO		SOL. DE ALMACENAMIENTO 100X (g/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Nitrato de amonio	46.3
$\text{KNO}_3$	Nitrato de potasio	283

*Solución II: Sulfatos*

COMPUESTO		SOL. DE ALMACENAMIENTO 100X (g/L)
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sulfato de manganeso	0.334
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio	18.5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de zinc	0.15

*Solución III: Halógenos*

COMPUESTO		SOL. DE ALMACENAMIENTO 100X (g/L)
KI	Yoduro de potasio	0.08
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de calcio	16.6

*Solución 4: Fosfato, ácido bórico*

COMPUESTO		SOL. DE ALMACENAMIENTO 100X (g/L)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fosfato de potasio	40
$\text{H}_3\text{BO}_3$	Acido bórico	0.16

*Solución 5: Quelantes*

COMPUESTO		SOL. DE ALMACENAMIENTO 100X (g/L)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato ferroso	2.78
$\text{C}_{14}\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Na}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	EDTA	3.75

Todas las soluciones deben ser diluidas a una concentración 10X

b) Fuente de carbono

COMPUESTO	g/L
C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> (sacarosa)	30

c) Reguladores de crecimiento

REGULADOR	SOL. DE ALMACENAMIENTO (mg/ 100 mL)	Tomar para 1 L de medio
2,4-D (ácido diclofenoxiacético)	10	20 mL
Cinetina	10	1 mL

d) Aminoácidos

COMPUESTO	SOL. DE ALMACENAMIENTO (mg/100 mL)	Tomar para 1 L de medio
Adenina	100	10 mL
Caseína	-----	200 mg
Prolina	-----	2 g

e) Vitaminas

COMPUESTO	Tomar para 1 L de medio
cóctel 20 (patente en trámite)	10 mL

## MEDIO MS

a) Soluciones de macro y micronutrientes

*Solución I: Nitratos*

COMPUESTO		SOL. DE ALMACENAMIENTO 100X (g/L)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Nitrato de amonio	46.3
KNO <sub>3</sub>	Nitrato de potasio	283

*Solución II: Sulfatos*

COMPUESTO		SOL. DE ALMACENAMIENTO 100X (g/L)
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	Sulfato de manganeso	0.334
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio	18.5
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Sulfato de zinc	0.15

Solución III: Halógenos

COMPUESTO		SOL. DE ALMACENAMIENTO 100X (g/L)
KI	Yoduro de potasio	0.08
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Cloruro de calcio	16.6

Solución 4: Fosfato, ácido bórico

COMPUESTO		SOL. DE ALMACENAMIENTO 100X (g/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potasio	40
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Acido bórico	0.16

Solución 5: Quelantes

COMPUESTO		SOL. DE ALMACENAMIENTO 100X (g/L)
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Sulfato ferroso	2.78
C <sub>14</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> Na <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	EDTA	3.75

Todas las soluciones deben ser diluidas a una concentración 10X

b) Fuente de carbono

COMPUESTO	g/L
C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> (sacarosa)	30

d) Aminoácidos

COMPUESTO	SOL. DE ALMACENAMIENTO (mg/100 mL)	Tomar para 1 L de medio
Glicina	100	10 mL

e) Vitaminas

COMPUESTO	Tomar para 1 L de medio
Vit R2	10 mL