



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**SOBRE-EXPRESIÓN DE RUBISCO ACTIVASA Y DE DEHIDRINA DHN1
EN PLANTAS DE MAÍZ POR EL MÉTODO INTRAGÉNICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

RAYMUNDO BELMONT VALADEZ



CD. MX.

AÑO 2018



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:

PRESIDENTE: Profesor: EUCLIDES ÁVILA CHÁVEZ

VOCAL: Profesora: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

SECRETARIO: Profesora: VERÓNICA GARROCHO VILLEGAS

1er. SUPLENTE: Profesora: VERÓNICA DOMÍNGUEZ VALDEZ

2° SUPLENTE: Profesora: FRANCISCA MORAYNA GUTIÉRREZ LUNA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 103 Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. VERÓNICA GARROCHO VILLEGAS

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. LILIA ANGÉLICA BERNAL GRACIDA

SUSTENTANTE:

RAYMUNDO BELMONT VALADEZ

AGRADECIMIENTOS

FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO CONACYT PN-2016 /3855 “FORMACIÓN DE
MAÍCES IDEALES QUE CONJUNTEN CARACTERÍSTICAS DESEABLES PARA LA
PRODUCCIÓN BAJO CONDICIONES ADVERSAS”

ÍNDICE

1 RESUMEN	6
2 ANTECEDENTES	7
2.1 El maíz cómo cultivo con centro de origen en México	7
2.2 Métodos de mejoramiento de cultivos	7
2.2.1 Mejoramiento agronómico tradicional	7
2.2.2 Ingeniería genética y la controversia de la producción de GMO transgénicos	8
2.2.3 Intragénesis y Cisgénesis cómo una alternativa en la mejora de especies	9
2.3 El maíz y la sensibilidad al estrés por sequía	11
2.4 Proteínas de interés para el mejoramiento genético del maíz	12
2.4.1 Las dehidrinas	12
2.4.2 Rubisco activasa (Rca)	13
3 JUSTIFICACIÓN	15
4 HIPÓTESIS	15
5 OBJETIVO GENERAL	15
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	15
6 DISEÑO EXPERIMENTAL	16
7 MATERIALES Y MÉTODOS	17
8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
9 CONCLUSIONES	41
10 PERSPECTIVAS	41
11 ENSAYOS DE WB (ANEXO I)	42
12 REFERENCIAS	48

LISTA DE ABREVIATURAS

C.B.V. Control de balas vacías

C.S.B. Control sin bombardear

DHN1. Dehidrina o Rab 17 de *Zea mays*

DTT. Ditioneitol

EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético

GMO. Organismos genéticamente modificados

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

Rca. Rubisco activasa

SDS-PAGE. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

WB. Western Blot

1. RESUMEN

El maíz es un cultivo importante en todo el mundo, por lo que de forma continua se ha buscado su mejoramiento, principalmente en su productividad y tolerancia ante diferentes factores ambientales como la sequía, la cual es un fenómeno que afecta procesos biológicos como la fotosíntesis, el metabolismo de los carbohidratos y el metabolismo energético. La selección agronómica clásica es un método de mejoramiento que se ha empleado durante mucho tiempo, sin embargo, este proceso involucra resultados a largo plazo.

Por otro lado, la ingeniería genética ha permitido desarrollar plantas con características agronómicas mejoradas que les confieren ventajas en su desarrollo y con rendimientos estables, tal es el caso de los organismos genéticamente modificados (GMO) conocidos como transgénicos. Sin embargo, existe gran controversia sobre su bioseguridad y su impacto al medio ambiente, por la mezcla de materiales genéticos entre diferentes especies que no son sexualmente compatibles. Como alternativa se han desarrollado otras técnicas de producción de GMO, la cisgénesis e intragénesis; metodologías que implican que las plantas sólo deben ser transformadas con material genético derivado de la propia especie o de especies estrechamente relacionadas.

Actualmente se han reportado modificaciones intragénicas en diferentes cultivos. Aunado a esto, una investigación reciente ha reportado la transformación intragénica de maíz mediante la sobre-expresión de la proteína Rubisco activasa (Rca) de maíz, que se encuentra involucrada en la fotosíntesis.

Otro de los genes de interés que se ha tomado en cuenta para la mejora de esta especie, es la dehidrina DHN1 o Rab 17. Estas proteínas son altamente hidrofílicas y se consideran responsables de las reacciones que confieren tolerancia ante factores de estrés, entre ellos la deshidratación. En este trabajo se buscó estandarizar la técnica de intragénesis para la modificación de la expresión de genes, obteniendo un total de 8 plantas de maíz transformadas que son capaces de sobre-expresar de manera inducible a la DHN1 y un total de 4 plantas de maíz transformadas que sobre-expresan a la Rca de manera constitutiva. Los resultados de este trabajo son una importante aportación, que podrían representar en un futuro la reducción de tiempo y trabajo en el mejoramiento del cultivo de maíz, en países donde los GMO que utilizan transgenes son poco aceptados, como es el caso de México.

2. ANTECEDENTES

2.1 El maíz como cultivo con centro de origen en México

El Maíz, originalmente de la palabra taína *maisí* o *majji*, es una planta de grano grande que tiene cómo ancestro a un pasto alto conocido como teocinte. *Zea mays* tiene cuatro subespecies, *huehuetenangensis*, *parviglumis*, *mays* y *mexicana*, siendo esta última endémica del altiplano central y norte de México. Nuestro país es considerado centro de origen y domesticación del maíz, con evidencia de su introducción en Sudamérica (Regiones Andinas), hace aproximadamente 2,200 a 1,900 años y su dispersión en Norte América aproximadamente hace 2,100 años. La evidencia biológica y arqueológica muestra que la evolución del maíz dependió no solo de un proceso de selección natural, sino de un proceso complejo donde se combinaron la presión biológica y cultural, teniendo a los humanos como los responsables de la selección de las mejores semillas de acuerdo a sus necesidades, con la finalidad de tener una mayor productividad o para un mejor crecimiento en condiciones específicas (Domínguez *et al.*, 2017).

2.2 Métodos de mejoramiento de cultivos

2.2.1 Mejoramiento agronómico tradicional

La selección agronómica clásica, es un método empleado durante décadas para el mejoramiento de los cultivos. En esta técnica se seleccionan individuos con características fenotípicas deseadas, tales como: altura de planta, ancho de hoja, número de granos por mazorca, o tolerancia a la sequía, entre otros. Posteriormente, dichos individuos se reproducen realizando cruza y seleccionando nuevamente a los individuos a través varios ciclos agronómicos, con la finalidad de generar una variedad con una o varias características que le provean ventajas agronómicas a la planta.

En el mercado existen diferentes tipos de maíces mejorados, de manera general se clasifican en variedades de polinización libre e híbridos de polinización cerrada; las primeras tienen un mejor aprovechamiento en áreas con potencial productivo de medio a marginal, mientras que los híbridos, en áreas con buen potencial productivo. Las variedades mejoradas se caracterizan por tener una población variable en su altura, tamaño de la mazorca, color y tamaño de la hoja. También muestran variabilidad en jilote y espiga, además de la precocidad. Adicionalmente es posible sembrar la

semilla de la cosecha sin degradarse, lo que tiene un costo de 30 a 40 por ciento menor que la de cualquier híbrido (Gómez *et al.*, 2006).

Otro ejemplo de mejoramiento es la investigación realizada en el Colegio de Postgraduados (COLPOS) campus Montecillo, en el Estado de México, en colaboración con la Facultad de Química, UNAM; se cuantificó la proteína Rubisco activasa (Rca) en cultivos de maíz de la variedad Zacatecas, mejoradas después de 23 ciclos de cultivo agrícola (Z_0 a Z_{23}), por medio de “selección masal visual estratificada”. Como resultado se obtuvo que en las plantas del ciclo Z_{23} se incrementa la actividad y la cantidad de Rca en comparación con la Z_0 , teniendo como consecuencia una mayor capacidad fotosintética y un mayor rendimiento en estos cultivos. En esta institución también se han desarrollado, por este método, líneas de maíz tolerantes a la sequía tales como la L14 y L16. Sin embargo, el tiempo empleado para obtener resultados fue extenso y dependió de las condiciones climáticas con las que se llevó a cabo, teniendo la gran desventaja de que en algún ciclo agronómico la semilla producida no sea suficiente para continuar con la técnica (Molina, 1988; Morales *et al.*, 1999; Zarco-Perello *et al.*, 2005).

2.2.2 Ingeniería genética y la controversia de la producción de organismos genéticamente modificados (GMO) transgénicos

Los nuevos avances en la ingeniería genética aplicada a mejoramiento de cultivos han demostrado que es posible el desarrollo de variedades genéticamente mejoradas con mayor rendimiento agronómico, calidad nutricional y tolerancia ante estrés biótico y abiótico. Como evidencia de la mejora nutricional, existen reportes donde en cultivos de papa se induce la expresión de la albúmina de amaranto 1 (AmA1), como consecuencia se observa un aumento de la actividad fotosintética, teniendo un crecimiento en su biomasa y con ello un aumento moderado en el rendimiento del tubérculo (Chakraborty *et al.*, 2010). En el caso del maíz, hay estudios exitosos donde se logra el mejoramiento de la composición de aminoácidos esenciales, como el de la lisina (O’Quinn, 2000). Por otro lado, la introducción de genes de resistencia, es un ejemplo de mejoramiento genético que provee ventajas para la supervivencia de los cultivos y que, al mismo tiempo, fungen como marcadores para la selección, ya sea positiva o negativa; esto se debe a que éstos genes codifican para la producción de alguna enzima que le confiere resistencia a la planta frente algún agente tóxico, como los plaguicidas o herbicidas, mismos que se emplean para eliminar a las plagas típicas que afectan a los cultivos (Que *et al.*, 2014). Como ejemplo de lo anterior está la introducción del gen *HPT*, higromicina fosfotransferasa, en plantas de maíz que desarrollan

tolerancia a la higromicina B, antibiótico aminoglicósido que inhibe la síntesis de proteínas en bacterias y hongos (Walters *et al.*, 1992). También se ha introducido el gen *EPSPS* (sintasa del 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato) de *Agrobacterium spp.* que le otorga al maíz tolerancia al herbicida Glifosato (Heck *et al.*, 2005). Lo anterior demuestra que GMO como los transgénicos, pueden ser una buena alternativa para hacer frente a la gran demanda mundial de alimentos de alta calidad. A pesar de los evidentes beneficios nutricionales y del creciente cultivo de variedades transgénicas en todo el mundo, se ha generado gran controversia en cuanto a su bioseguridad y la introducción de genes de diferentes especies, especialmente en países que se consideran centro de origen, como es el caso del maíz en México, en donde la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, publicada el 18 de marzo de 2005 en el Diario Oficial de la Nación, limita la siembra de GMO en territorio nacional. Entendiendo por organismo genéticamente modificado cualquier organismo vivo, con excepción de los seres humanos, que ha adquirido una combinación genética generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna, superando las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o de la recombinación y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional. Es por ello que no solo los transgénicos son regulados por esta ley, sino que también se consideran a los organismos transformados por otros métodos biotecnológicos de edición del material genético.

2.2.3 Intragénesis y Cisgénesis como una alternativa en la mejora de especies

Frente a la controversia de la producción de transgénicos en cultivos de consumo humano, se han desarrollado nuevas metodologías de mejoramiento genético, de las que se desprenden la cisgénesis e intragénesis; ambos conceptos implican que las plantas sólo deben ser transformadas con material genético derivado de la propia especie, o de especies estrechamente relacionadas capaces de reproducción sexual (Bæksted-Holme *et al.*, 2013). La cisgénesis, selecciona la secuencia completa de un gen, desde el promotor hasta el terminador, siendo ésta la que se introduce con la finalidad de expresar el producto que codifique la secuencia; en cambio, en la intragénesis, es posible seleccionar partes de varios genes de todo el repertorio genético de la especie modificada, haciendo posible realizar construcciones quiméricas que sirvan para la sobreexpresión, o incluso, para el silenciamiento de cierto producto en la transcripción (Figura 1).

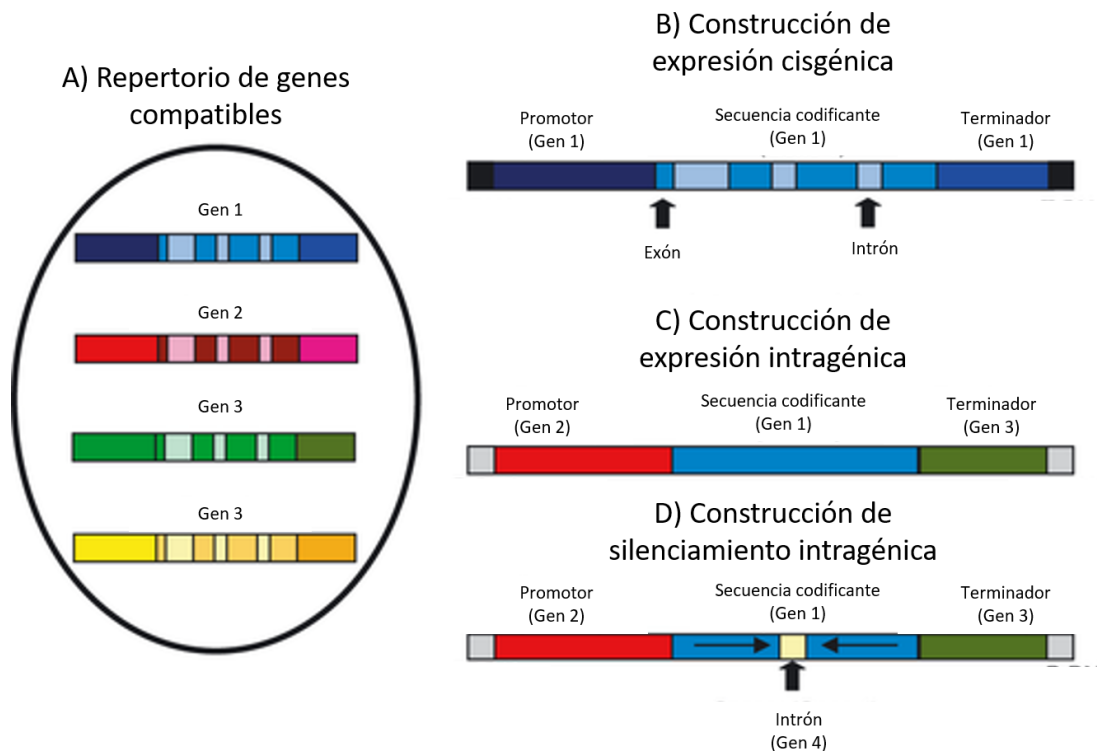


Figura 1. Representación esquemática de los componentes de construcciones intragénicas y cisgénicas. A) Repertorio de genes compatibles B) Figura representativa de una construcción de expresión cisgénica. C) Figura representativa de una construcción de expresión intragénica. D) Figura representativa de una construcción de silenciamiento intragénica. Imagen tomada de Bæksted-Holme *et al.*, 2013.

Actualmente se han reportado modificaciones intragénicas en cultivos como papa (Chawla *et al.*, 2012; Rommens *et al.*, 2008) y trigo (Gadaleta *et al.*, 2008) y frutales como manzana (Joshi *et al.*, 2011; Vanblaere *et al.*, 2011) entre otros. Aunado a esto, en una investigación reciente realizada en la Facultad de Química, se reportó la transformación intragénica de maíz mediante la sobre-expresión de la proteína Rubisco activasa de maíz (Rca), proteína que se encuentra involucrada en la eficiencia de la fotosíntesis, esta construcción se compone del promotor de la subunidad pequeña de Rco, la región codificante de la Rca y el terminador de la subunidad pequeña de la Rco. (Almeraya *et al.*, 2016). La sobre-expresión de Rca mediante este método, se comparó con resultados obtenidos para la misma proteína con el mejoramiento tradicional a través de 23 ciclos agronómicos (Morales *et al.*, 1999); concluyendo, que el método de intragénesis puede lograr resultados semejantes al mejoramiento agronómico tradicional en menor tiempo. Estas técnicas constituyen alternativas para el desarrollo y la comercialización de plantas genéticamente modificadas, incluso en países donde este tipo de cultivos son poco aceptados.

2.3 El maíz y la sensibilidad al estrés por sequía

La sequía representa un problema para los cultivos a nivel mundial, debido al cambio climático y la escasez de agua dulce asociada con el crecimiento poblacional (Hu *et al.*, 2014; Lobell *et al.*, 2014). El maíz es un cultivo importante en nuestro país ya que es la base de la alimentación y es sensible a la sequía, dado que, la mayor parte de su cultivo se realiza en temporal, con las lluvias. Bajo condiciones de poca disponibilidad de agua, principalmente en la floración, hay procesos biológicos que son afectados, tales como la fotosíntesis, el metabolismo de los carbohidratos y el metabolismo energético, reduciéndose la productividad de grano, lo que se atribuye principalmente al acortamiento de la longitud de la mazorca (Zarco-Perello *et al.*, 2005).

A pesar de que las variedades nacionales son capaces de adaptarse a diferentes ambientes, creciendo tanto en climas con temperaturas altas y con poco riego, como en regiones con temperaturas bajas, se estima que los cambios climáticos extremos ocurrirán en un futuro cercano, lo cual podría comprometer a la gran mayoría de los cultivos a nivel mundial, afectando entre ellos al cultivo de maíz (Bellon *et al.*, 2011).

No está totalmente esclarecido cómo la transcripción de genes responde al estrés por sequía. Existen estudios de perfiles transcriptómicos en líneas de maíz tolerantes (RIL 70), sometidas al estrés hídrico, que demuestran una respuesta temprana en los eventos de señalización asociados con la homeostasis de la turgencia, establecidos por la regulación de la biosíntesis de la pared celular (Min *et al.*, 2016). Lo anterior hace interesante el estudio de proteínas que participan en estos procesos de tolerancia a la sequía y entre las que se han reportado se encuentran las dehidrinas.

2.4 Proteínas de interés para el mejoramiento genético del maíz

2.4.1 Las dehidrinas

Las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), son una familia de proteínas que tienen diversas funciones en las plantas, ya que además de estar presentes durante las etapas tardías del desarrollo de la semilla, participan en las respuestas que confieren tolerancia a varios tipos de estrés abiótico (Liu *et al.*, 2017). Las dehidrinas forman parte del grupo II de las LEA, éstas se inducen en tejidos vegetativos por diferentes factores que pueden causar deshidratación celular (sequía, salinidad, frío, etc.) (Close *et al.*, 1996). Estas proteínas son altamente hidrofílicas ya que contienen una alta proporción de aminoácidos polares y una baja proporción de aminoácidos hidrofóbicos, además de la ausencia de residuos de triptófano y cisteína. Las dehidrinas se clasifican con base en sus secuencias conservadas conocidas como segmentos Y-, S- y K, y se dividen en cinco subgrupos estructurales: YnKn, YnSKn, KnS, SKn y Kn (Koag *et al.*, 2009) (Figura 2).

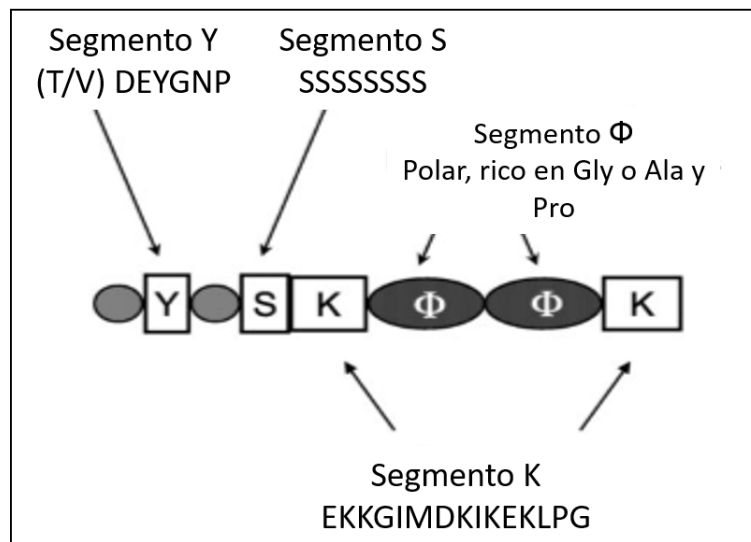


Figura 2. Orden de los dominios estructurales de DHN1 de *Zea mays*, que pertenece al subgrupo estructural Y₁SK₂, ya que tiene un solo Segmento Y, uno S y dos segmentos K.

Imagen tomada de Koag *et al.*, 2009.

Las dehidrinas también se conocen como RAB (responsive to ABA) y COR (cold-regulate proteins), ya que se ha observado su participación como proteínas protectoras en el tratamiento con ácido abscísico y la tolerancia al frío (Tripepi *et al.*, 2011; Rorat *et al.*, 2006).

En líneas transgénicas de *Arabidopsis*, transformadas con el gen de la Dehidrina *OesDHN*, se ha demostrado que se puede inducir la sobre-expresión de esta proteína, mediante el sometimiento de la planta a estrés hídrico (Chiappetta *et al.*, 2015). Por otro lado, en el estudio realizado por Hernández en 2015, se analizó el perfil de dehidrinas en una variedad comercial (Tuxpeño V-535) y dos líneas de maíz (L13 y L14, desarrolladas en el COLPOS) con diferente tolerancia a la sequía. Los resultados obtenidos demostraron que la L14 (línea tolerante a la sequía) en condiciones de estrés expresa una dehidrina en particular, la DHN1 también conocida como RAB 17; es importante mencionar que en la variedad Tuxpeño V-535 también se observó dicha expresión, pero en menor proporción, haciendo de este gen un buen candidato para el mejoramiento por intragénesis en maíz.

2.4.2 Rubisco activasa (Rca)

La fotosíntesis, es el principal proceso fisiológico que impulsa el crecimiento de las plantas. El ciclo de Calvin-Benson, también conocido como fase oscura de la fotosíntesis, es donde ocurre la síntesis de carbohidratos. La parte inicial de este proceso, se le conoce como carboxilación, en ésta, la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RubisCO), interactúa con la RuBP (ribulosa 1,5-bisfosfato) y con el CO₂ del medio ambiente, fija al CO₂ y genera dos moléculas de 3-fosfoglicerato, que se pueden fosforilar para la producción de 1,3-bisfosfoglicerato y así continuar con el ciclo (Figura 3); o para utilizarse como sustrato en otras vías metabólicas (Carmo-Silva *et al.*, 2015). A pesar de que la RubisCO es una enzima muy abundante, no es eficiente ya que puede inhibirse por azúcares que bloquean sus sitios activos, en esta situación la chaperona molecular Rubisco activasa (Rca) facilita la disociación de los fosfatos de los azúcares inhibidores del sitio activo de RubisCO de una manera dependiente de ATP (Spreitzer *et al.*, 2002), así la RubisCO toma su conformación activa y continua con el proceso de fijación de CO₂.

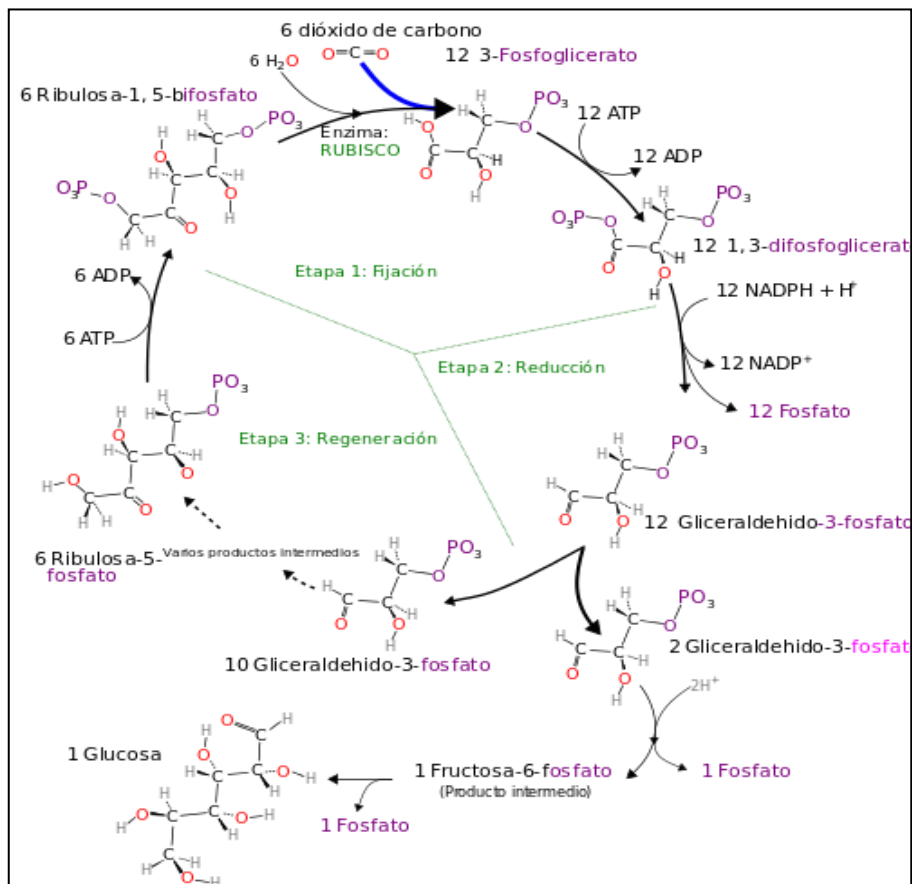


Figura 3. Ciclo de Calvin-Benson que se compone de tres etapas: Fijación, reducción y regeneración, en la primera es donde ocurre la fijación de CO_2 . Imagen tomada de (Buchanan *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que la fotosíntesis es muy sensible a la sequía y al estrés calórico (Chaves *et al.*, 2009). Las limitaciones metabólicas se han asociado con la síntesis de ATP (Flexas *et al.*, 2006), la menor disponibilidad de ATP, a su vez, afecta la regeneración de RuBP, lo que limita la fijación de CO_2 . Adicionalmente se ha demostrado que las altas temperaturas perjudican la activación de la Rca, que se convierte en la causa principal de la disminución de la fotosíntesis en respuesta a la temperatura elevada.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la sequía es un fenómeno que afecta el desarrollo y la productividad de cultivos como el maíz, la Rca y la DHN1 pueden ser consideradas como proteínas de interés para el mejoramiento genético de éste. Por ello resulta plausible el diseño de construcciones intragénicas para inducir la sobre-expresión de estas proteínas, así como la transformación de plantas de maíz, esto con la finalidad de obtener variedades mejoradas que puedan ser tolerantes al estrés por sequía y que, potencialmente presenten mejores rendimientos a nivel de productividad en grano, brindando una alternativa de mejoramiento genético utilizando herramientas biotecnológicas.

4. HIPÓTESIS

La sobre-expresión constitutiva de Rca y la sobre-expresión inducible de DHN1 por el método intragénico, ocasionarán cambios fenotípicos relacionados al crecimiento de las plantas.

5. OBJETIVO GENERAL

Transformar y caracterizar plantas de maíz que sobre-expresen a las proteínas Rca y/o DHN1 utilizando construcciones intragénicas.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

5.1.1 Transformar callos embriogénicos de maíz mediante biobalística, con las construcciones intragénicas diseñadas para la sobre-expresión constitutiva de la proteína Rca y la sobre-expresión inducible de la proteína DHN1.

5.1.2 Regenerar plántulas de maíz a partir de los callos embriogénicos bombardeados.

5.1.3 Aclimatar a los individuos regenerados, a las condiciones del invernadero.

5.1.4 Someter a estrés hídrico a las plantas que pudieron integrar la construcción de DHN1.

5.1.5 Identificar a los individuos que integran la construcción intragénica, por medio de PCR.

5.1.6 Identificar a aquellos individuos que sobre-expresen Rca y/o DHN1 por medio de inmunodetección.

5.1.7 Evaluar las características fenotípicas de las plantas transformadas.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

En la Figura 4 se describe, de manera breve, cada etapa del diseño experimental que se siguió para cumplir con los objetivos planteados.

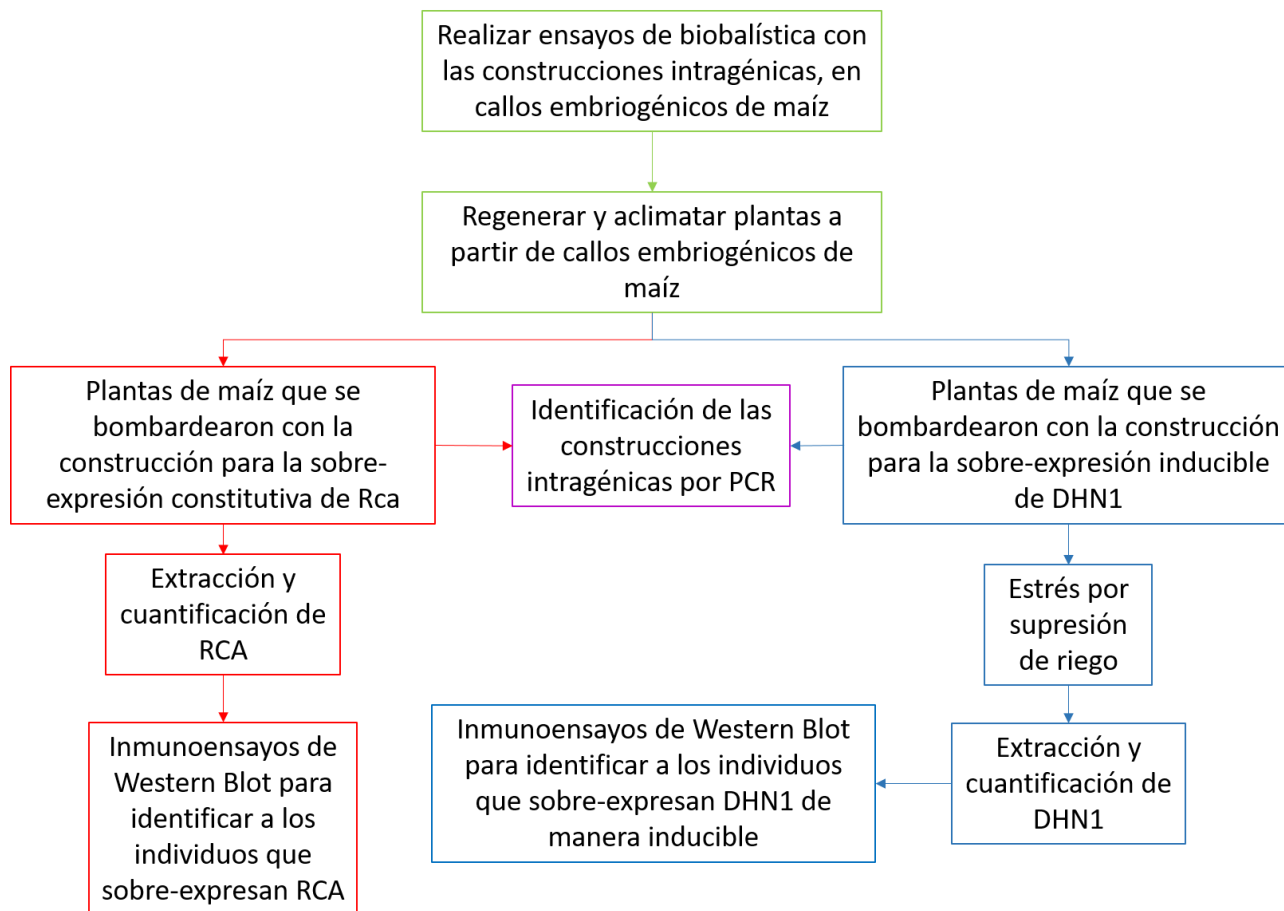


Figura 4. Diseño experimental.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

Para realizar los ensayos de biobalística, se emplearon callos embriogénicos de maíz de la variedad Tuxpeño VS-535, los cuales fueron proporcionados por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM.

La variedad VS-535 es una variedad comercial que se destaca por tener una altura de la planta mayor o igual a 3 m y tamaño de la mazorca mayor a 20 cm, por lo que es atractiva para la cosecha de elote; su grano es blanco dentado cristalino, con buena calidad para la molienda tradicional. Se ha mostrado muy buena adaptación en regiones cálidas y semisecas, tales como Tierra Caliente, Norte, Centro y Montaña. Su floración es de 53 a 55 días y alcanza su madurez fisiológica a los 120 días (Gómez *et al.*, 2006).

7.2 Bombardeo y regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz

7.2.1 Construcciones intragénicas

Se trabajó con dos construcciones intragénicas previamente diseñadas por el grupo de investigación (Figura 5), una para la sobre-expresión inducible de DHN1 y la otra para la sobre-expresión constitutiva de Rca (Almeraya *et al.*, 2016); la construcción de la DHN1 está compuesta por un promotor de DHN1, la región codificante de la DHN1 y el terminador de la subunidad pequeña de la Rubisco (Rco). Es importante destacar que el promotor presenta elementos de respuesta a ácido abscísico lo cual la hace inducible ante el estímulo de estrés por sequía. Por otro lado, la construcción intragénica de Rca se compone del promotor de la subunidad pequeña de Rco, la región codificante de la Rca y el terminador de la subunidad pequeña de la Rco. Esta construcción fue diseñada por Almeraya (2016) en su tesis de doctorado.

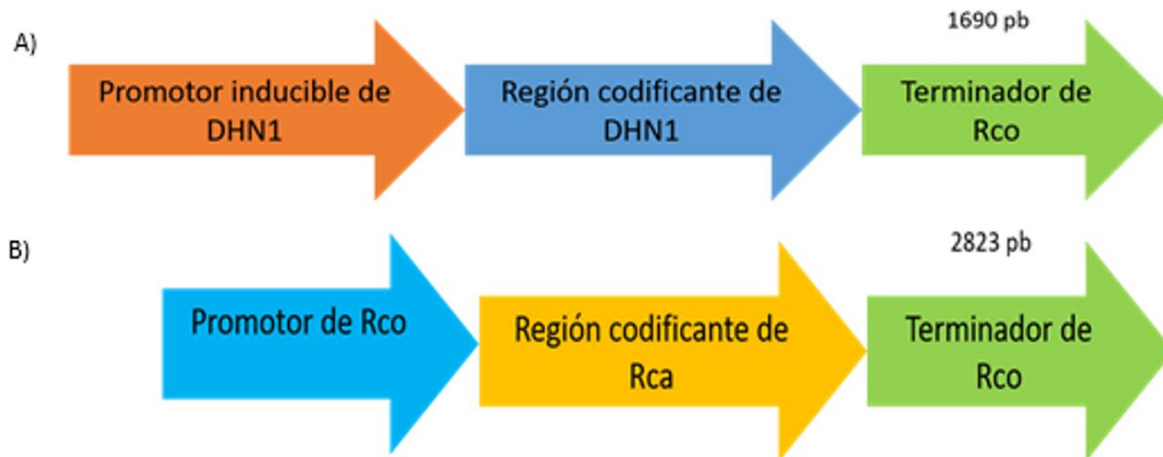


Figura 5. Diagramas de las construcciones intragénicas. A) Construcción intragénica para la sobre-expresión inducible de DHN1. La construcción se compone por el promotor de la DHN1, la secuencia codificante de la DHN1 y el terminador de Rco.

B) Construcción intragénica para la sobre-expresión de Rca. La construcción se compone del promotor de la Rco, la secuencia codificante de la Rca y el terminador de Rco.

7.2.2 Medios de cultivo

Se utilizó medio N6P en la etapa de proliferación y medio MS sin hormonas en la etapa de regeneración. El medio N6P se compone por sales N6 y vitaminas del cóctel 20 2 mg/L, kinetina 0.1 mg/L, adenina 10 mg/L, prolina 2.76 g/L, hidrolizado de caseína 200 mg/L, sacarosa 30 g/L, gelrita 3.3 g/L, pH 5.7. El medio MS se compone de sales y vitaminas MS, sacarosa 30 g/L, gelrita 3.3 g/L, pH 5.7 (Garrocho-Villegas *et al.*, 2012).

7.2.3 Condiciones de bombardeo

Para cada bombardeo se emplearon 0.3 g de callos embriogénicos, situados en el centro de una caja Petri con medio de cultivo N6P y se realizaron dos disparos con partículas de tungsteno (0.5 mg) revestidas con 0.8 µg de DNA de cada construcción intragénica, en porciones de callos separados y en un mismo lote de callos para tratar de incorporar las dos construcciones en un mismo individuo (Sanford *et al.*, 1993; Garrocho-Villegas *et al.*, 2012; Almeraya *et al.*, 2016), de tal manera que se generaron cuatro grupos de callos bombardeados con las siguientes combinaciones: Rca, DHN1 (A), Rca + A y controles, ya sea sin bombardear (C.S.B) o controles de balas vacías (C.B.V).

7.2.4 Etapa de proliferación

Una vez realizado el bombardeo, las cajas Petri con los callos se incubaron por 24 horas en obscuridad y a temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Pasado ese tiempo, se realizó una resiembra a medio N6P fresco y se incubó en las mismas condiciones por aproximadamente tres semanas, haciendo una resiembra cada vez que se requirió, la cual consistió en quitar las partes oxidadas (oscuras) del cultivo; y en dividir los callos en frascos con medio de cultivo fresco, cuando su proliferación fuera tal que ya no hubiese espacio en el contenedor. Este proceso se realizó durante tres meses para tener suficiente biomasa para realizar el proceso de regeneración.

7.2.5 Etapa de regeneración

En esta etapa se realizaron resiembras a medio MS sin hormonas, cada tres semanas; estos cultivos se incubaron a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ y luz blanca artificial con fotoperiodos de 16 horas de luz por 8 horas de oscuridad, tiempo en el que los callos empezaron a presentar zonas de color verde. Una vez que se tenían plántulas con tallo y raíz, éstas se pasaron a contenedores individuales con medio MS. Se utilizaron frascos más grandes cuando la planta regenerada requirió más espacio para desarrollarse.

7.2.6 Etapa de aclimatación

Finalmente, las plantas regeneradas que presentaron raíz y tallo fuerte se transfirieron a bolsas de plástico negro con el sustrato orgánico Sunshine No. 3 y se cubrieron con bolsas de plástico transparente para que los individuos se fueran aclimatando a las condiciones de humedad relativa y temperatura del invernadero (Figura 6). Es importante mencionar que las plantas regeneradas corresponden a cuatro ensayos de bombardeo en diferentes fechas.

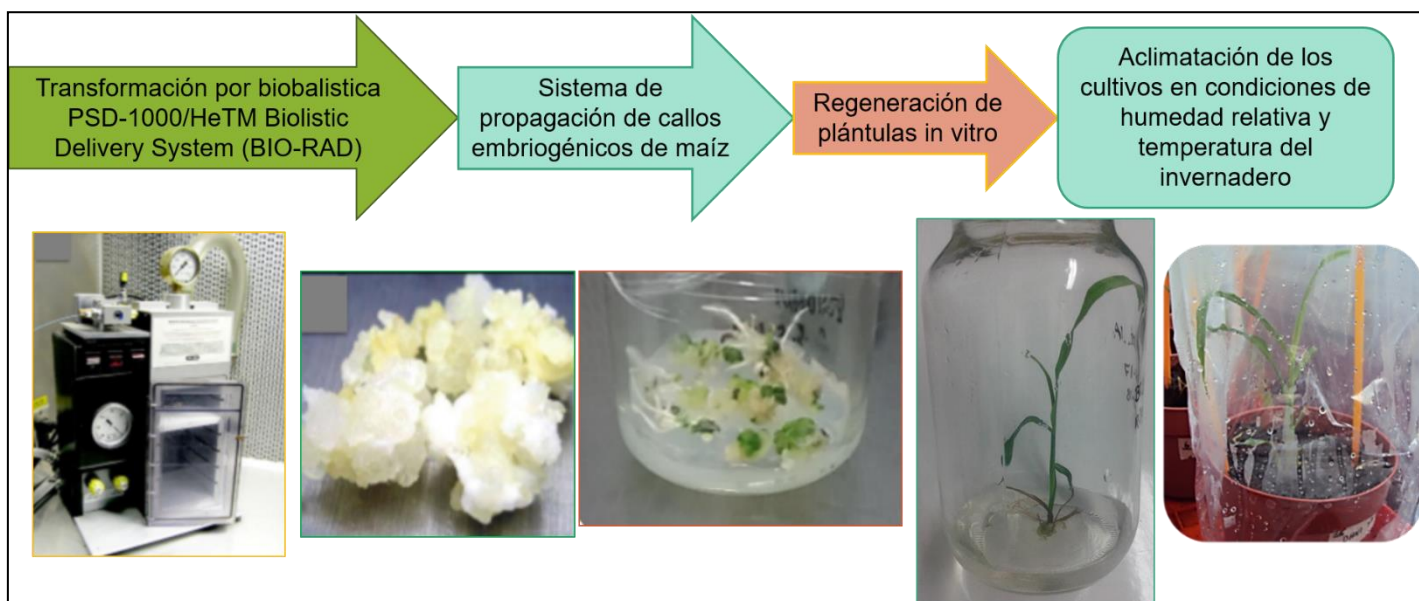


Figura 6. Proceso de transformación y regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz. Los medios utilizados fueron N6P para la etapa de proliferación y el medio MS (sin hormonas) para la etapa de regeneración.

7.3 Estrés por supresión de riego

Para esta prueba se utilizaron plantas de maíz regeneradas a partir de callos embriogénicos que fueron bombardeadas con la construcción inducible para la sobre-expresión de DHN1; así como plantas controles que fueron bombardeadas con balas vacías (C.B.V), e individuos regenerados a partir de callos embriogénicos, pero que no fueron parte de los ensayos de biobalística, nombrados como callo sin bombardear (C.S.B). Estos individuos se aclimataron a las condiciones de temperatura y humedad relativa del invernadero. Un día antes de iniciar la prueba de estrés, las plantas se regaron con suficiente agua hasta que todo el sustrato estuviera completamente húmedo; posteriormente se colocó papel aluminio sobre la boca de bolsa para cubrir el sustrato, esto con la finalidad de que el agua que se evapore sea por la transpiración de la planta y no por su evaporación desde el sustrato; después, se les suprimió el riego hasta por 13 días, pesando la bolsa con la planta y sustrato hasta que se observó peso constante, en ese momento se finalizó el experimento. Se tomaron muestras de hojas (2 cm²) de la parte central de la última hoja extendida, se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron hasta su procesamiento. Estas muestras se utilizaron para extraer proteína y así caracterizar si las plantas son capaces de sobre-expresar de forma inducible a la DHN1 por el estrés por sequía.

7.4 Extracción de DNA e identificación de la construcción intragénica

Para identificar la presencia de las construcciones intragénicas en los individuos transformados con Rca y DHN1, se necesitó, en primer lugar, realizar la extracción de DNA a partir de hojas frescas y posteriormente llevar a cabo un ensayo de PCR de punto final. Para este propósito se siguió el procedimiento descrito en el kit Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR. Para la extracción de DNA semipuro, se colectaron muestras de hojas de 1 a 2 mm², este tejido se homogenizó en 20 µL de la solución amortiguadora de dilución que forma parte del kit. Para optimizar la extracción, se utilizó un pistilo de vidrio que ayuda a triturar la hoja hasta que la solución presenta una coloración verde. De este extracto se tomó 1 µL para realizar los ensayos de PCR.

Dado que parte de las construcciones intragénicas están presentes en el genoma de la planta, se diseñaron oligonucleótidos que amplificaran segmentos que representan las zonas entre el promotor y la región codificante, o entre la región codificante y el terminador (Tabla 1, Figura 7). Para el diseño se utilizó la herramienta Primer-BLAST del NCBI, teniendo como referencia para la especificidad de los oligonucleótidos, la secuencias representativas del genoma de *Zea mays*. La síntesis de los oligonucleótidos se solicitó a SIGMA-ALDRICH. Los resultados se observaron por electroforesis de geles de agarosa al 1%, utilizando TAE 1X como amortiguador de corrida.

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la identificación de las construcciones intragénicas

Oligonucleótidos	Nombre	Secuencia 5' → 3'	Región que amplifica	Tamaño del producto
Par unión 1 DHN1	Fw PIA-RCDHN1	GACTTTTCTCGTGCGCCTAC	Promotor/Región codificante DHN1(A)	723 pb
	Rv PIA-RCDHN1	GATTCCTTCTTCCTCCTTCC		
Par unión 2 DHN1	Fw RCDHN1-TRco	TCGACCAGTACGGCAACCTA	Región codificante/ terminador DHN1 (A)	600 pb
	Rv RCDHN1-TRco	AAGCAAGCAAAGGGTACGGT		
Par unión 1 Rca	Fw PRco-RCRca	ATGCAGTTTTAGGCATGTTGG	Promotor/Región codificante RCA	998 pb
	Rv PRco-RCRca	ACTTTTGCCGTGGTAGGTCA		
Par unión 2 Rca	Fw RCRca-TRco	CGAGCAGCCCAAGATAAC	Región codificante/ terminador RCA	387 pb
	Rv RCRca-TRco	GCAGAGAACTGCTGGAAAG		

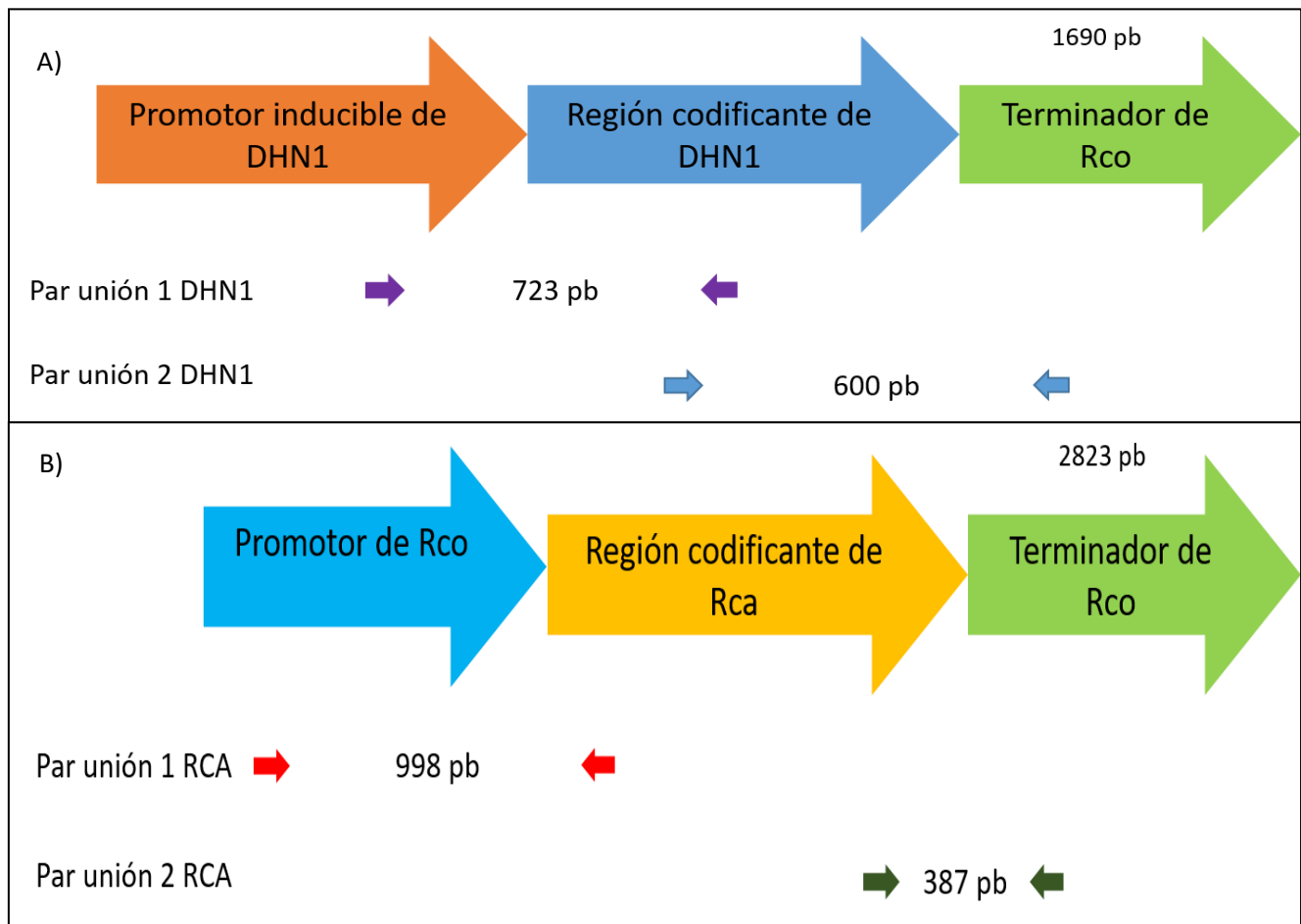


Figura 7. Diagrama de las construcciones intragénicas y localización de los oligonucleótidos. A) Construcción intragénica para la sobre-expresión inducible de DHN1. La construcción se compone por el promotor de la DHN1, la secuencia codificante de la DHN1 y el terminador de Rco. También se muestran los oligonucleótidos utilizados para la identificación de los fragmentos. B) Construcción intragénica para la sobre-expresión de Rca. La construcción se compone del promotor de la Rco, la secuencia codificante de la Rca y el terminador de Rco. Se muestran los oligonucleótidos utilizados para la identificación de los fragmentos.

7.5 Análisis de la expresión de las proteínas Rca y DHN1

Para evaluar la expresión de las proteínas Rca y DHN1 se realizaron ensayos de Western Blot con anticuerpos específicos. Con este propósito se siguieron los protocolos de extracción de Yamori *et al.* (2011) para Rca y el descrito por Hernández (2015) para DHN1. La proteína total en cada extracto se cuantificó por el método de Bradford (Sánchez *et al.*, 2012).

7.5.1 Extracción de proteínas para la inmunodetección de la proteína Rca

Se pesaron alrededor de 100 mg de hoja y se molió utilizando nitrógeno líquido, posteriormente se le adicionaron 800 μ L de solución amortiguadora de extracción [Hepes-KOH 50 mM (pH 7.8), $MgCl_2$ 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM, Triton X100 1% v/v] y se mezcló con agitación en vortex. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 16,000 x g por un minuto a 4°C. Enseguida se tomaron 230 μ L del sobrenadante, y estos se colocaron en un microtubo. El producto obtenido fue el extracto que se utilizó para medir la concentración de proteína total por el método de Bradford (Sánchez *et al.*, 2012). Posteriormente se agregaron 70 μ L de SDS al 10%, y la muestra se calentó a 65°C por 10 min.

7.5.2 Extracción de proteínas para la inmunodetección de la proteína DHN1

Se pesaron 100 mg de hoja y el material se molió en mortero con nitrógeno líquido. El material molido se mezcló con la solución amortiguadora de extracción [Tris-HCl 120 mM (pH 8), NaCl 400 mM, EDTA 4 mM, DTT 1 mM] en proporción 1:3 peso/volumen. La muestra se incubó por una hora con agitación constante a 4°C. Después, se les agregó SDS al 3% y Tritón X-100 al 1% y se mezcló en vortex para homogenizar. Se centrifugó a 14,000 x g por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se calentó a 100°C por 5 minutos, luego se incubó en hielo por 30 minutos. Se centrifugó nuevamente a 15000 x g por 10 minutos y se cuantificó la concentración de proteína del sobrenadante por el método de Bradford (Sánchez *et al.*, 2012).

La electroforesis se llevó a cabo en geles de SDS-PAGE al 16%, se cargaron 15 µg de proteína total de cada muestra para la evaluación de la DHN1. En el caso de la evaluación de Rca, se cargaron 5 µg de proteína total de cada muestra, como lo reportó Almeraya *et al.*, 2016. La inmunodetección se realizó con el anticuerpo primario anti-Rca dilución 1:20000 (Cat. No. AS10 700, Agrisera, SWE) y en el caso de la DHN1 se utilizó anti-Dehidrina (Cat. No. AS07 206, Agrisera, SWE) dilución 1:5000 según correspondiera; seguido del anticuerpo secundario anti-inmunoglobulinas G de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Cat. No. Sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, E.E.U.U.) dilución 1:20000 y 1:10000 respectivamente; finalmente se utilizó el sustrato Luminata Crescendo Western HRP (Cat. No.WBLUR0100, Milipore, E.E.U.U.), y la señal de las proteínas se visualizó en el fotodocumentador Chemidoc (BIORAD).

Ya que la proteína Rca es constitutiva, para conocer si las plantas que se bombardearon con la construcción de Rca sobre-expresaban esta proteína, se hizo una normalización, utilizando como control de carga a los geles SDS-PAGE. Se calculó el promedio de la intensidad relativa de los controles (C.S.B y C.B.V) en once membranas de WB y este valor representó el 100% de expresión, de esa manera se calculó el porcentaje de expresión de todas las muestras probadas. Para este análisis se empleó el software Image Lab (BIORAD).

7.6 Parámetros para observar el efecto de la transformación sobre el fenotipo de la planta

Para definir el efecto de la transformación sobre el fenotipo de las plantas, se midió la altura de la planta, el ancho de las hojas y el perímetro de los tallos de plantas en etapa reproductiva. Para realizar lo anterior, se decidió tomar como referencia a la hoja 8 por debajo la espiga, ya que es la que se encuentra aproximadamente a la mitad de la altura total de la planta.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Capacidad regenerativa de los callos embriogénicos

Con el propósito de conocer la capacidad regenerativa de los callos embriogénicos, se hizo una prueba que consistió en determinar cuántos individuos diferenciados se obtuvieron a partir de una cantidad conocida de callo embriogénico. Para este propósito se utilizaron callos embriogénicos que no se sometieron a bombardeo, éstos se dividieron en cuatro lotes diferentes y se pesaron para registrar su masa inicial. Posteriormente se llevó a cabo el proceso de regeneración, registrando la cantidad de individuos diferenciados por lote, obteniendo un promedio de 25 individuos diferenciados al final del experimento, lo que se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Capacidad regenerativa de los callos embriogénicos de maíz

No. de lote	Individuos diferenciados por gramo de callo
1	28
2	15
3	30
4	28
\bar{x}	25

Con esta prueba se determinó que en promedio se diferenciaron 25 individuos por gramo de callo embriogénico de la variedad Tuxpeño V5-535. Sin embargo, esto no significa que estos individuos logren sobrevivir en la etapa de aclimatación en el invernadero ya que esto depende de la manipulación y el vigor de los individuos.

8.2 Plantas regeneradas después de los bombardeos

Se realizaron tres eventos de transformación de los callos embriogénicos de maíz por biobalística en diferentes fechas. El número de individuos que se regeneraron en cada evento se presenta en la Tabla 3, donde se observa que el bombardeo con ambas construcciones intragénicas tuvo mayor cantidad de plantas regeneradas con un total de 101.

Tabla 3. Individuos regenerados por evento de transformación de callos embriogénicos de maíz por biobalística

Construcción(es) bombardeada(s)	Fecha de bombardeo	Total de individuos Regenerados
DHN1 (A)	23-06-2017	50
RCA	09-11-2017	58
RCA+A	13-12-2017	101
Controles (C.S.B y C.B.V)	Provenientes de las tres fechas de bombardeo	16

No todas las plantas se lograron aclimatar a las condiciones del invernadero, esto es debido a diferentes factores, entre ellos está la manipulación del material durante las resiembras, pues aún cuando se logró la diferenciación del tejido en plántulas, algunas veces los medios se contaminaban con hongos y levaduras, lo que comprometía su supervivencia. Por otro lado, el desarrollo de las plántulas en el invernadero se vio afectada por un plaga de ácaros que se estableció en la cámara del invernadero, infestando a la mayoría de las plantas de maíz, generando daños que originaron la pérdida de más de la mitad del material (Figura 8).

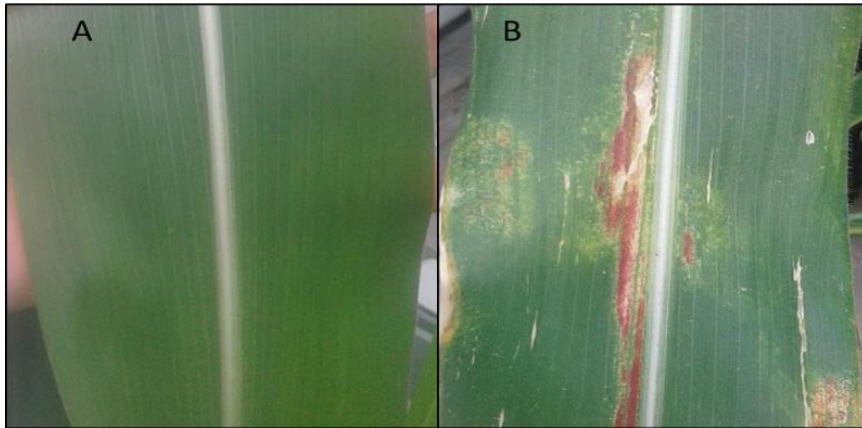


Figura 8. Lesiones ocasionadas por la plaga *Tetranychus urticae*. La infección con éste ácaro ocasionó la pérdida de gran parte de los individuos aclimatados en el invernadero. A) hoja sana, B) hoja infectada.

8.3 Identificación de las plantas que incorporaron las construcciones intragénicas

Para identificar que plantas incorporaron las construcciones intragénicas de Rca y DHN1, se realizaron ensayos de PCR punto final. De los oligonucleótidos diseñados, se observó que los pares de oligos con el nombre de “Par unión 1A” y “Par unión 2 RCA” resultaron inespecíficos, pues amplificaron un fragmento con tamaño similar al amplicón esperado, en plantas control, por lo que no se utilizaron para la identificación de las plantas. Para identificar la construcción de Rca se utilizó el “Par unión 1 RCA” y para identificar la construcción intragénica DHN1 se empleó el “Par unión 2 DHN1”. El control positivo que se utilizó fue el plásmido en el que se clonó cada construcción intragénica, PUC 57-RCA y PUC 57-DHN1-A. Se lograron identificar 26 plantas con la construcción de Rca, y 9 con la construcción de DHN1. Los resultados obtenidos de los ensayos de PCR se muestran en las Figuras 9 y 10.

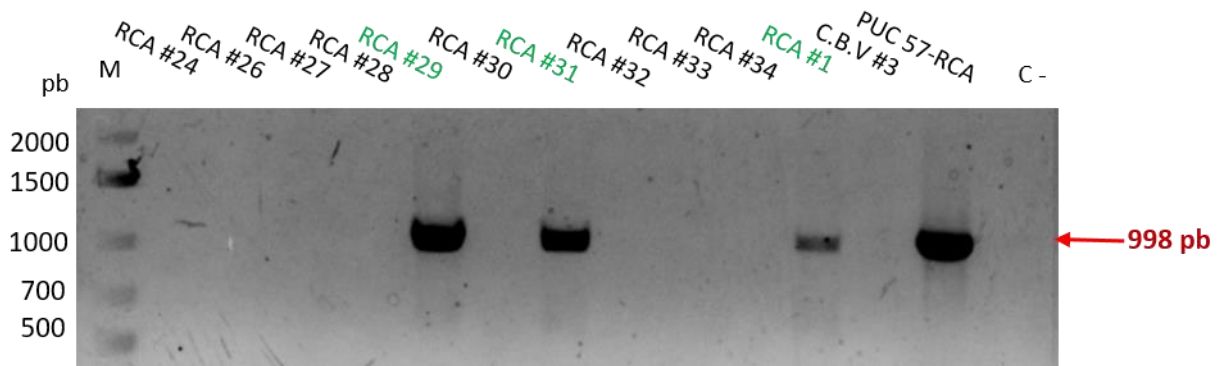


Figura 9. Identificación de los individuos transformados con la construcción intragénica de Rca. Se utilizó el Par unión 1 RCA que amplifica un fragmento de 998 pb que va del promotor de Rco a la región codificante de Rca. Se incluye un C.B.V para comprobar que los oligonucleótidos son específicos para el intragén. Como control positivo, se utiliza el plásmido PUC 57-RCA. M, marcador de peso molecular 1 kb plus (Thermo Scientific). C-, control negativo que no contiene DNA en la mezcla de reacción.

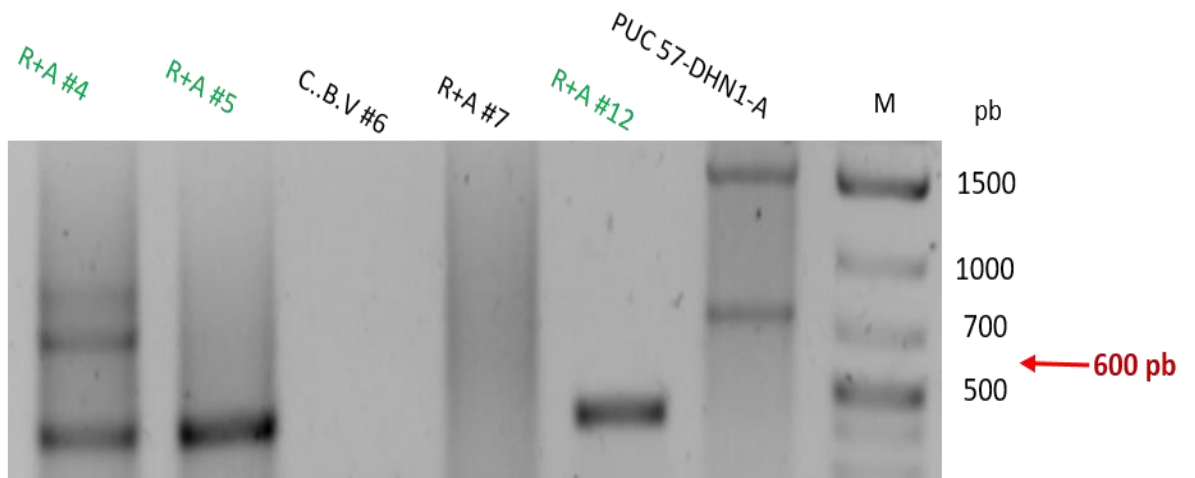


Figura 10. Identificación de los individuos transformados con la construcción intragénica de DHN1. Se utilizó el Par unión 2 DHN1 que amplifica un fragmento de 600 pb que va de la región codificante de DHN1 al terminador de Rco. Se incluye un C.B.V para comprobar que los oligonucleótidos son específicos para el intragén. Cómo control positivo, se utiliza el plásmido PUC 57-DHN1-A. M, marcador de peso molecular 12 kb plus (Thermo Scientific). C-, control negativo que no contiene DNA en la mezcla de reacción.

8.4 Evaluación de la sobre-expresión inducible de DHN1

Los anticuerpos utilizados resultaron eficientes para la detección de la DHN1. Sin embargo, debido a la aclimatación y la plaga que atacó a las plantas, se perdió un número considerable de individuos que potencialmente podrían haber integrado la construcción inducible de DHN1, aun con esto, se analizaron 53 individuos que se sometieron a estrés hídrico mediante la supresión de riego y se estudió la sobre-expresión de la proteína DHN1 realizando ensayos de Western Blot. En la Tabla 4 se presentan los resultados de este análisis.

Tabla 4. Evaluación de la expresión de DHN1

Construcción(es) bombardeada(s)	Total de individuos regenerados	Total de individuos aclimatados/evaluados	Plantas que sobre-expresan DHN1
DHN1 (A)	50	7	5
RCA + A	101	41	3
Controles	16	5	0

En la Figura 11 se muestra un ejemplo de los ensayos de inmunodetección para la proteína DHN1 en plantas con estrés hídrico.

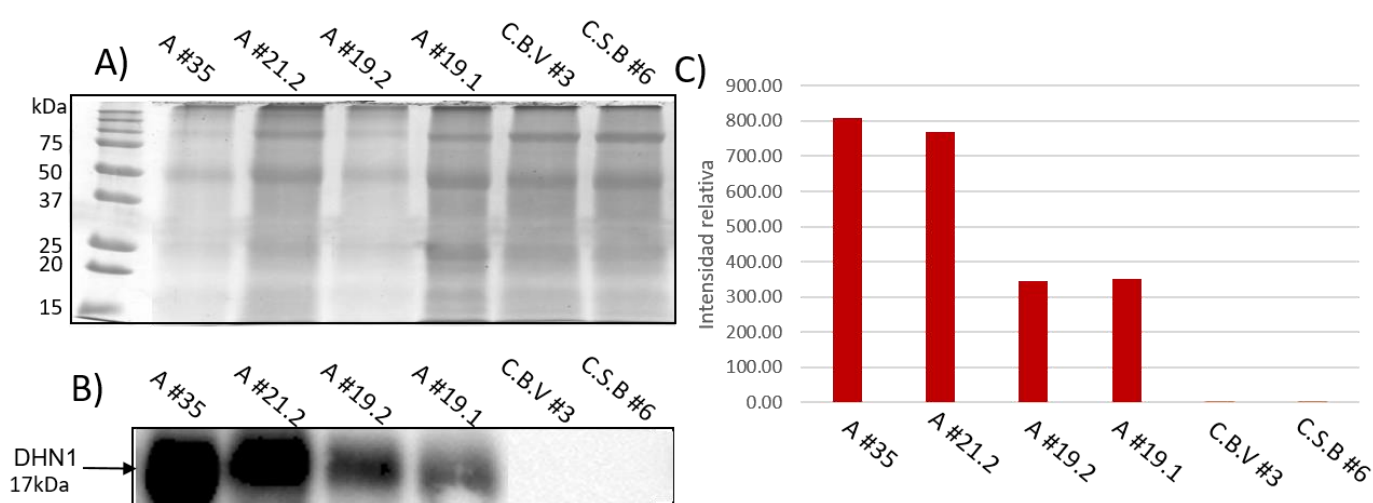


Figura 11. Detección de la proteína DHN1 en plantas que se sometieron a estrés hídrico. A) Gel SDS-PAGE al 16%, teñido con azul de Coomassie. B) Inmunodetección de la proteína DHN1. Se cargaron 15 µg de proteína por carril. C) Intensidad relativa de la señal. C.B.V, control de balas vacías; C.S.B, control sin bombardear.

Se observa que las plantas transformadas tienen una intensidad relativa de la señal superior a las plantas controles, mismas que se sometieron al estrés hídrico, lo que sugiere que hay un incremento en la expresión de la proteína DHN1 en plantas transformadas con la construcción intragénica de DHN1, con respecto a los controles.

Por otro lado, se determinó que las plantas transformadas sobre-expresan la proteína DHN1 de manera inducible (Figura 12), lo cual coincide con los reportes anteriores, en donde se observa que la intensidad relativa de la señal es de niveles casi indetectables cuando la planta se encuentra en condiciones normales de riego, sin estrés (Hernández, 2015).

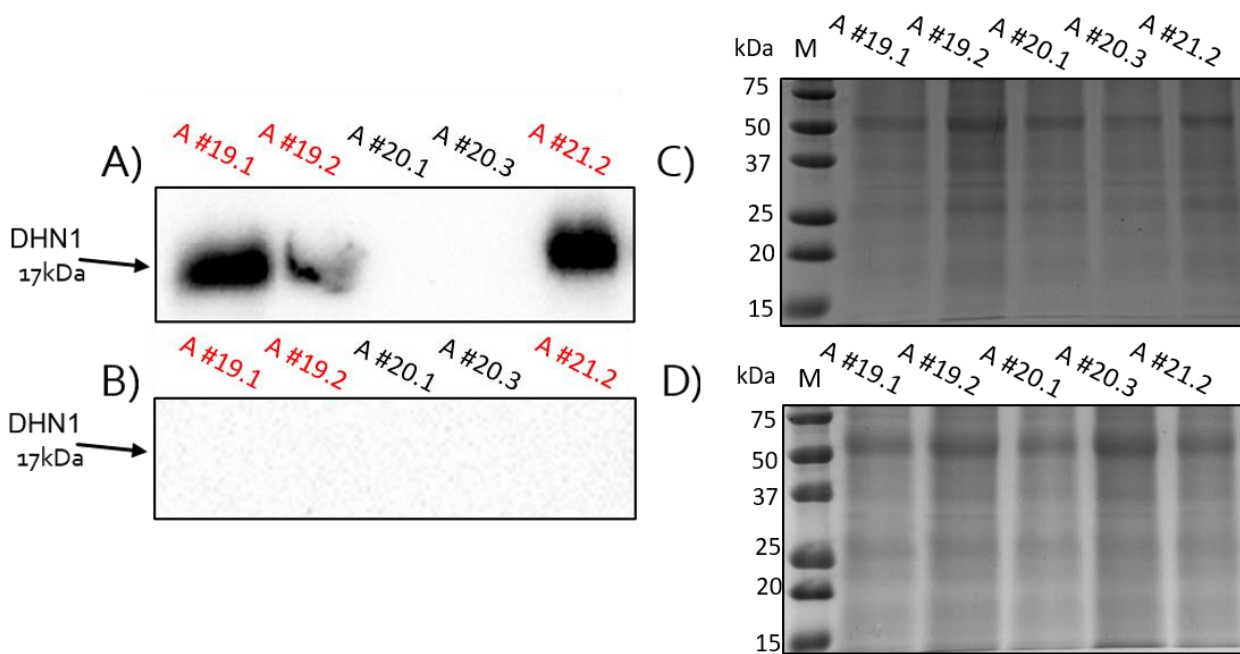


Figura 12. Inducción de la expresión de DHN1 en plantas de maíz transformadas. A) Detección de la proteína DHN1 en plantas estresadas por supresión de riego. B) Detección de la proteína DHN1 en plantas sin estrés. Estas muestras se tomaron previo al estrés, cuando las plantas estaban hidratadas. C) y D) Geles SDS-PAGE, teñidos con azul de Coomassie, correspondientes a ambas membranas. Las muestras A #20.1 y A #20.3 corresponden a individuos en los que no se identificó la construcción intragénica de DHN1 por PCR, por lo tanto no sobre-expresan la proteína con y sin estrés, es por ello que se pudieron considerar como plantas no transformadas.

8.5 Sobre-expresión constitutiva de Rca

En los ensayos de transformación que se realizaron para la sobre-expresión de la proteína Rca, se regeneraron un total de 159 individuos que potencialmente pudieron integrar la construcción constitutiva de Rca, sin embargo, debido a las pérdidas por aclimatación, solo se analizaron 74 plantas por Western Blot para detectar la proteína e identificar aquellas plantas que la sobre-expresan. En la Tabla 5 se muestran los resultados de la evaluación de la expresión de Rca, donde se observa que de los 28 individuos aclimatados/evaluados bombardeados con las construcción de Rca, solo 5 sobre-expresaron la proteína, mientras que de los 41 individuos aclimatados/evaluados bombardeados con ambas construcciones (RCA+A), solo 8 sobre-expresaron la proteína.

Tabla 5. Evaluación de la expresión de Rca

Construcción(es) bombardeada(s)	Total de individuos regenerados	Total de individuos aclimatados/evaluados	Plantas que sobre-expresan Rca
RCA	58	28	5
RCA + A	101	41	8
Controles	16	5	0

En la Figura 13 se observa que las plantas identificadas como RCA # 4 y RCA #5 sobre-expresan a la proteína, mientras que RCA #1, RCA# 9 y RCA#10 presentan niveles de expresión similares o más bajos que el promedio de los controles. En el Anexo I se encuentra el análisis de todas las muestras que se evaluaron.

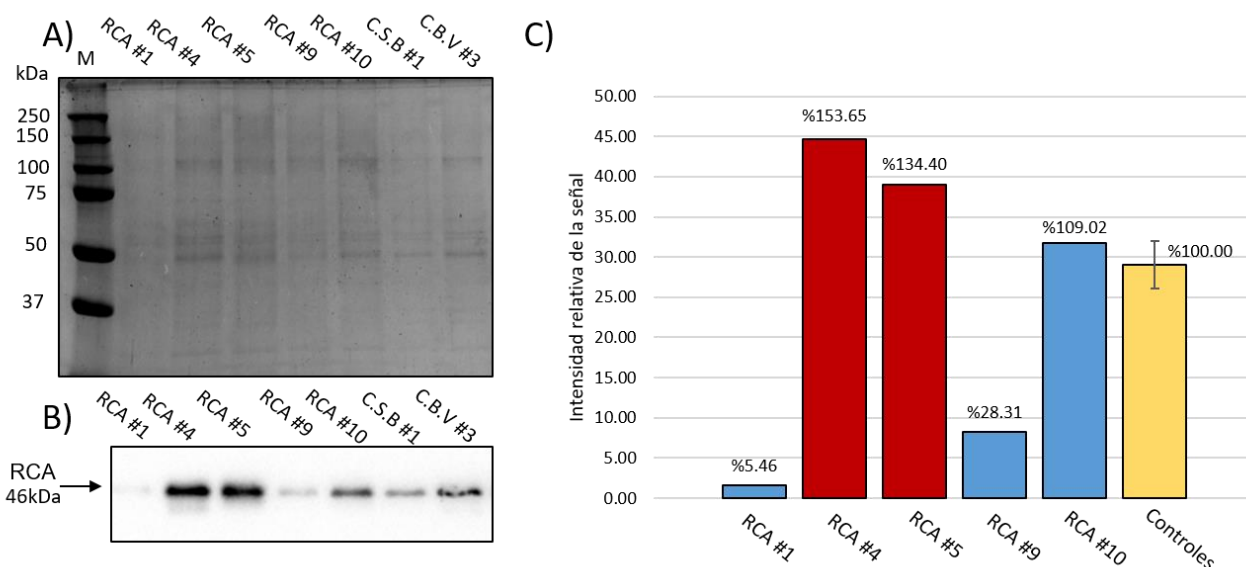


Figura 13. Inmunodetección de la proteína Rca. A) Gel SDS-PAGE al 16%, teñido con azul de Coomassie. B) Inmunodetección de Rca. C) Intensidad relativa de la señal. Las barras rojas representan a las plantas que muestran sobre-expresión de la Rca; mientras que las barras azules representan aquellas que no; la barra de color amarillo es el promedio de la intensidad relativa de la señal de los controles C.S.B y C.B.V. que se representa como el 100% de expresión. El porcentaje de expresión de cada muestra respecto de los controles, se encuentra arriba de cada una de las barras.

El análisis de los resultados de los ensayos de PCR y Western Blot indicó, que entre los individuos identificados había algunos que integraron la construcción intragénica de Rca o DHN1, pero que no sobre-expresaron a las proteínas, esto sugiere que la planta posiblemente no integró el intragén completo, lo que no permitió su expresión. Por otro lado se encontraron plantas con una expresión de Rca, mayor a la de los controles, aun cuando no fue posible identificar el intragén por PCR, lo que indica que la variedad Tuxpeño V-535 puede tener una alta variabilidad en la expresión de esta proteína.

En la Tabla 6 se concentraron los resultados obtenidos del análisis de las plantas transformadas por biobalística. Se incluye la identificación de las construcciones bombardeadas y el resultado de la evaluación de la sobre-expresión de las proteínas. Todos los individuos caracterizados, se dividieron en cuatro grupos con el siguiente código de colores: Verde, son los individuos en los que se identificó la construcción intragénica por PCR y se sobre-expresó la proteína; Azul, son las plantas en donde se identificó la construcción intragénica por PCR, pero no se identificó una sobre-expresión de la proteína; Amarillo, son plantas donde no se identificó la construcción intragénica

por PCR, pero hubo una alta expresión de la proteína; Rojo, son individuos en donde no se identificó la construcción intragénica y que además, no se observa sobre-expresión de la proteína evaluada.

Tabla 6. Resumen de los resultados de la identificación de la construcción intragénica por PCR y del análisis de la sobre-expresión de las proteínas por inmunodetección.

Construcción(es) bombardeada(s)	Proteína evaluada	Número de individuos donde se identificó la construcción intragénica y se sobre-expresó la proteína	Número de individuos donde se identificó la construcción intragénica, pero no se sobre-expresó la proteína	Individuos donde no se identificó la construcción intragénica, pero hubo una alta expresión de la proteína	Número de individuos donde no se identificó la construcción intragénica y no se sobre-expresó la proteína	Total de plantas evaluadas
DHN1-A	DHN1-A	5	0	0	2	7
RCA	RCA	4	4	1	19	28
RCA + DHN1-A	DHN1-A	3	15	0	23	41
RCA + DHN1-A	RCA	0	4	8	29	41

Tomando en cuenta solo a los individuos transformados que integraron las construcciones intragénicas y que sobre-expresaron las proteínas, se calculó el porcentaje de la eficiencia de la transformación tanto para DHN1 como para Rca, tomando como 100% al total de individuos evaluados. No obstante, hay que aclarar que esto solo es una estimación que no puede tomarse como un rendimiento, ya que no se pudo evaluar a todos los individuos (Tabla 7).

Tabla 7. Eficiencia de la transformación por evento de transformación.

Construcción(es) bombardeada(s)	Fecha de bombardeo	Individuos regenerados	Individuos aclimatados /evaluados	Individuos transformados		Eficiencia de la transformación (%)	
				DHN1	Rca	DHN1	Rca
DHN1 (A)	23/06/2017	50	7	5	NA*	71.43	N/A*
RCA	09/11/2017	58	28	NA*	4	N/A*	14.29
RCA + DHN1 (A)	13/12/2017	101	41	3	0	7.32	0.00

***NA (no aplica). Estos individuos fueron bombardeados solo con una construcción intragénica, por lo que en estos casos no aplica la evaluación de ambas proteínas.**

Se puede observar que cuando ambas construcciones se combinan en un mismo bombardeo, las plantas integraron solo la construcción intragénica para la sobre-expresión inducible de DHN1. Sin embargo, es importante considerar a todos los individuos que se perdieron durante la aclimatación, ya que éstos pudieron marcar una diferencia, de tal manera que resulta necesario resolver el problema de las plagas y las condiciones de aclimatación en el invernadero.

8.6 Observaciones fenotípicas de los individuos transformados

De las 81 plantas aclimatadas y evaluadas tanto para DHN1 como para Rca, solo un total de 26 individuos lograron sobrevivir y llegar a su etapa reproductiva, después de aproximadamente 5 meses de desarrollo en el invernadero. En esta etapa se observó un desfase en la floración de todas las plantas, ya que primero ocurrió la exposición de la espiga y posteriormente la de los estigmas. Es por ello que actualmente se sigue esperando la producción de mazorca, para así conocer el rendimiento de la producción de grano.

En las Figuras 14 a 18 se comparan cada uno de los parámetros caracterizados para definir el efecto de la transformación sobre el fenotipo de las plantas clasificadas en cada grupo descrito en la Tabla 6. Las gráficas son el resultado del promedio de todas las plantas clasificadas en estos cuatro grupos, utilizando el mismo código de colores (Tabla 8); para fines prácticos, en las fotografías solo se muestra un individuo de cada grupo.

Tabla 8. Código de colores para la diferenciación de las plantas caracterizadas por la presencia de las construcciones intragénicas y/o la sobre-expresión de las proteínas Rca y/o DHN1.

Individuos donde se identificó la construcción intragénica y se sobre-expresó la proteína	Individuos donde se identificó la construcción intragénica, pero no se sobre-expresó la proteína	Individuos donde no se identificó la construcción intragénica, pero hubo una alta expresión de la proteína	Individuos donde no se identificó la construcción intragénica y no se sobre-expresó la proteína
---	--	--	---

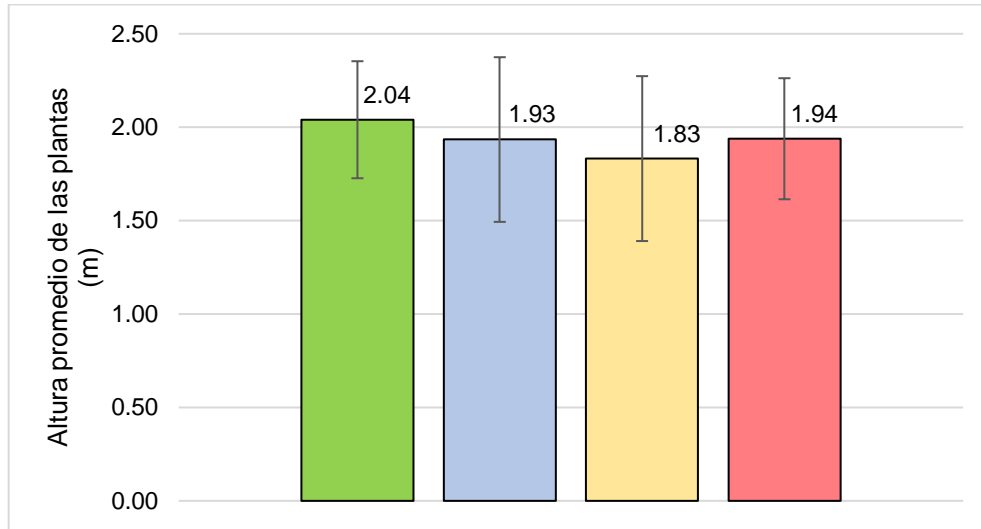


Figura 14. Altura promedio de los individuos caracterizados con la construcción intragénica de Rca y/o con la sobre-expresión de Rca. Se obtuvo el promedio de la altura de todas las plantas caracterizadas en los cuatro grupos.

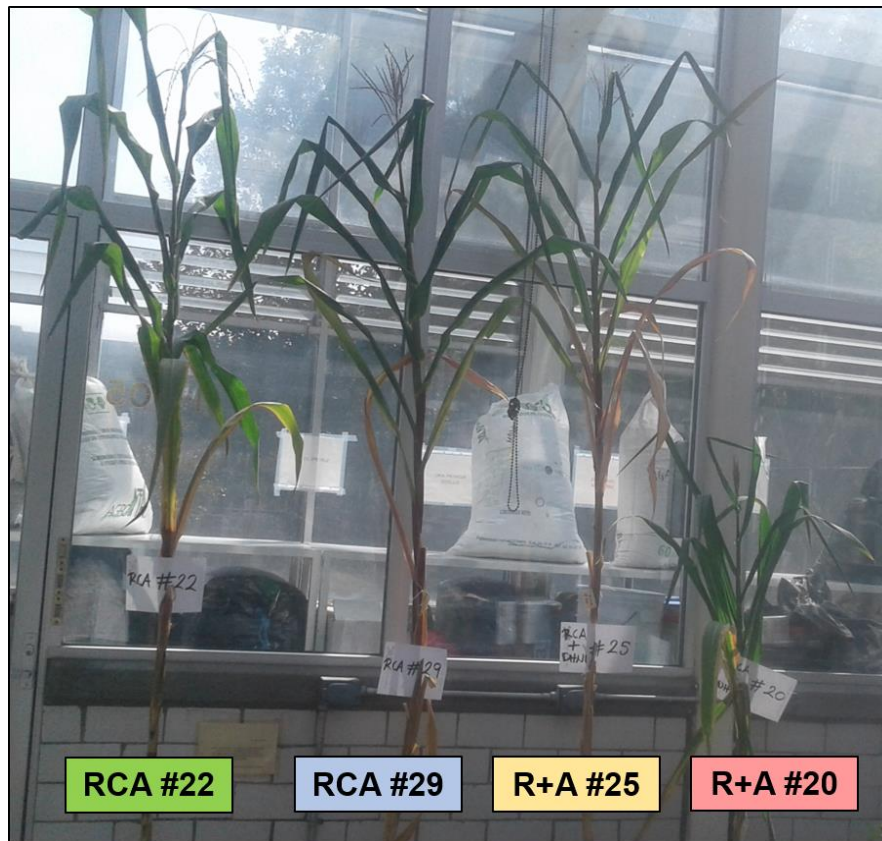


Figura 15. Comparación en la altura de individuos caracterizados para la construcción intragénica de Rca. Las plantas en la imagen se encuentran en etapa reproductiva y representan una parte del total de individuos que se caracterizaron como transformados y/o sobre-expresantes de RCA. **RCA #22 (2.19 m); RCA #29 (2.14 m); R+A #25 (2.31 m); R+A #20 (1.20 m).**

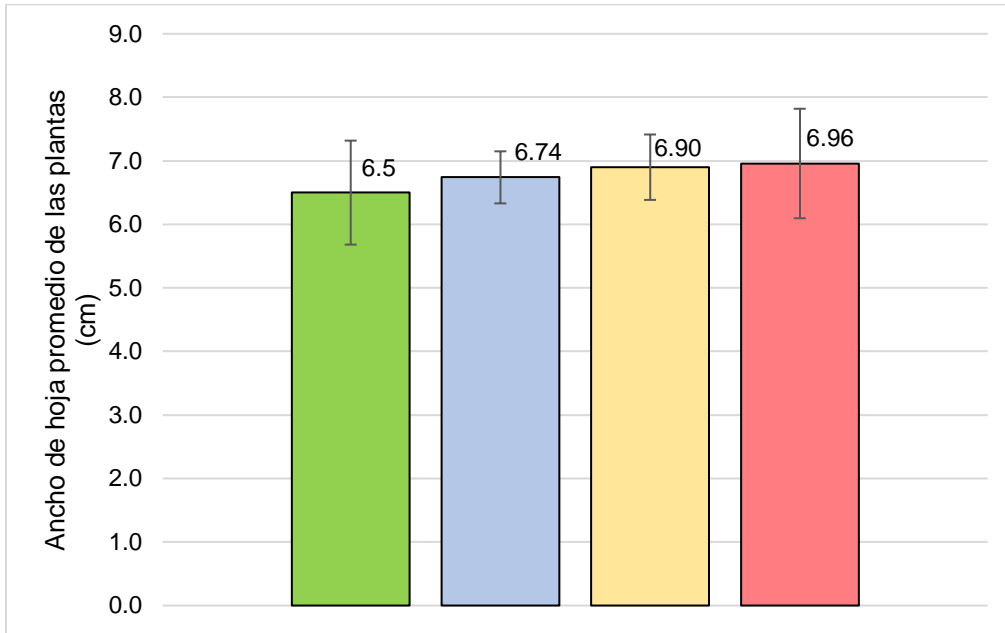


Figura 16. Promedio del ancho de las hojas de los individuos caracterizados con la construcción intragénica de Rca y/o con la sobre-expresión de Rca. Se obtuvo el promedio del ancho de todas las plantas caracterizadas en los cuatro grupos. La medida se realizó justo a la mitad de la hoja.

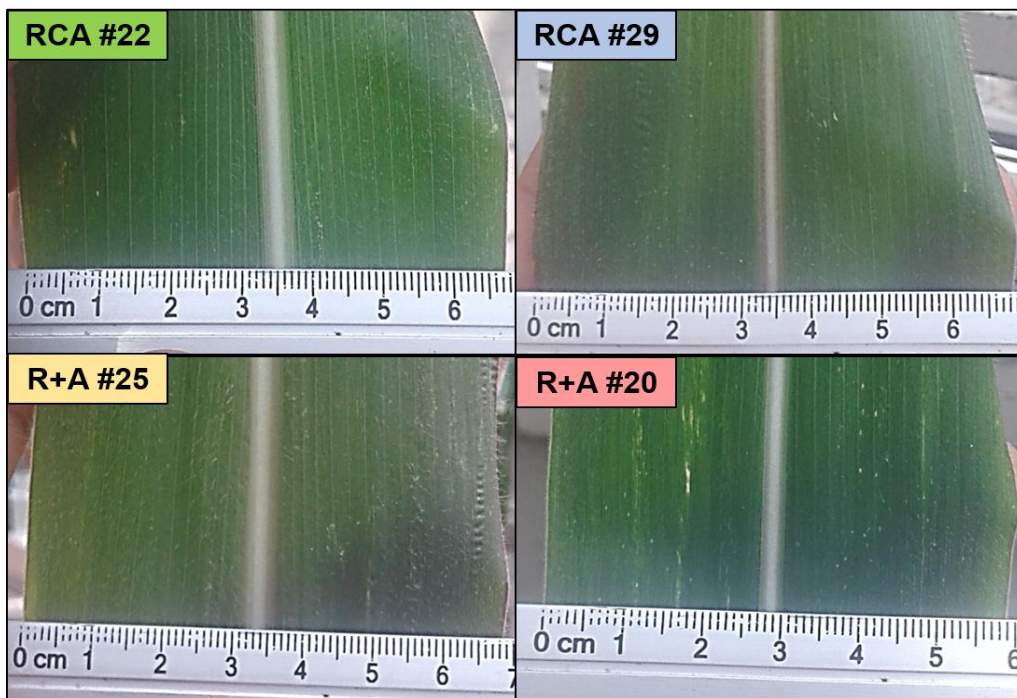


Figura 17. Comparación del ancho de las hojas de individuos caracterizados para la construcción intragénica de Rca. Se midió la hoja número 8 por debajo la espiga, ya que es la que se encuentra aproximadamente a la mitad de la altura total de la planta. **RCA #22 (6.7 cm); RCA #29 (6.8 cm); R+A #25 (6.8 cm); R+A #20 (5.9 cm).**

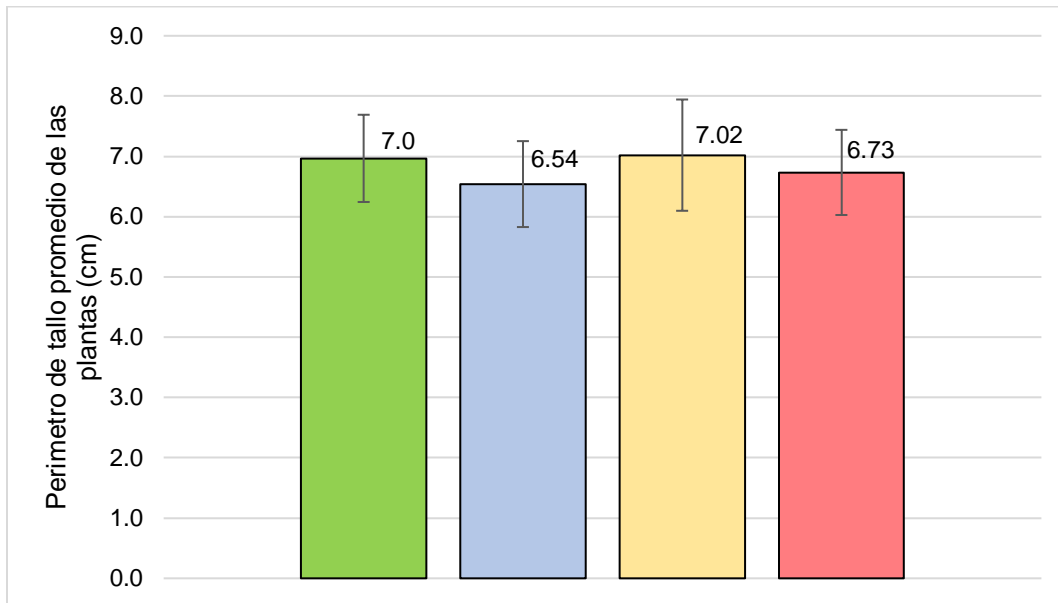


Figura 18. Perímetro de tallo promedio de los individuos caracterizados con la construcción intragénica de Rca y/o con la sobre-expresión de Rca. Se obtuvo el promedio del perímetro de los tallos de todas las plantas caracterizadas en los cuatro grupos. El tallo se midió por debajo de la hoja 8.

Con los resultados obtenidos se pudo observar que no hubo diferencia significativa en altura de las plantas, ancho de la hoja o perímetro del tallo entre los cuatro grupos evaluados. No obstante, hay que considerar que solo el 32% de las plantas llegaron a la etapa reproductiva debido al daño que sufrieron por el desarrollo de ácaros y hongos. Probablemente la respuesta sería diferente si se hubiera logrado el desarrollo de un número mayor de plantas. También hay que considerar cada planta es un evento de transformación diferente, por lo que el promedio de cada parámetro solo muestra la tendencia que pueden seguir los individuos transformados con la construcción intragénica para la sobre-expresión constitutiva de Rca.

9. CONCLUSIONES

- 9.1 Se lograron transformar plantas de maíz por el método intragénico, que sobre-expresen a la dehidrina DHN1 (Rab 17) de manera inducible bajo estrés hídrico y que sobre-expresen Rca de manera constitutiva, sin embargo no se logró la incorporación de ambas construcciones en un mismo individuo.
- 9.2 La variedad V-535, tiene variabilidad en la expresión de la Rca.
- 9.3 Las plantas transformadas que sobre-expresan a la proteína Rca, no tienden a mostrar un cambio significativo en el tamaño de la planta, ancho de la hoja y perímetro del tallo en relación a las plantas no transformadas y los controles.

10. PERSPECTIVAS

Cómo perspectivas se plantea la realización de ensayos de Southern Blot para determinar el número de copias del intragén en aquellas plantas que se identificaron cómo transformadas y sobre-expresantes de alguna de las dos proteínas. Adicionalmente se podría determinar el sitio de inserción de los intragenes. También es importante determinar la herencia de la construcción, por lo que para este propósito se requiere la producción de grano. Finalmente se plantea la posibilidad de transformar plantas de maíz, con estas mismas construcciones, con nuevas herramientas biotecnológicas de edición, como es el caso de CRISP/CAS9.

ANEXO I

En las Figuras de la 19 a la 29, se presentan los ensayos de Western Blot realizados para la inmunodetección de la proteína Rca. Para cada membrana se calculó el promedio de la intensidad relativa de los controles (C.S.B y C.B.V), este valor se representó como el 100% de expresión, de esa manera se calculó el porcentaje de expresión de todas las muestras evaluadas, utilizando el valor de la intensidad relativa obtenida en la normalización.

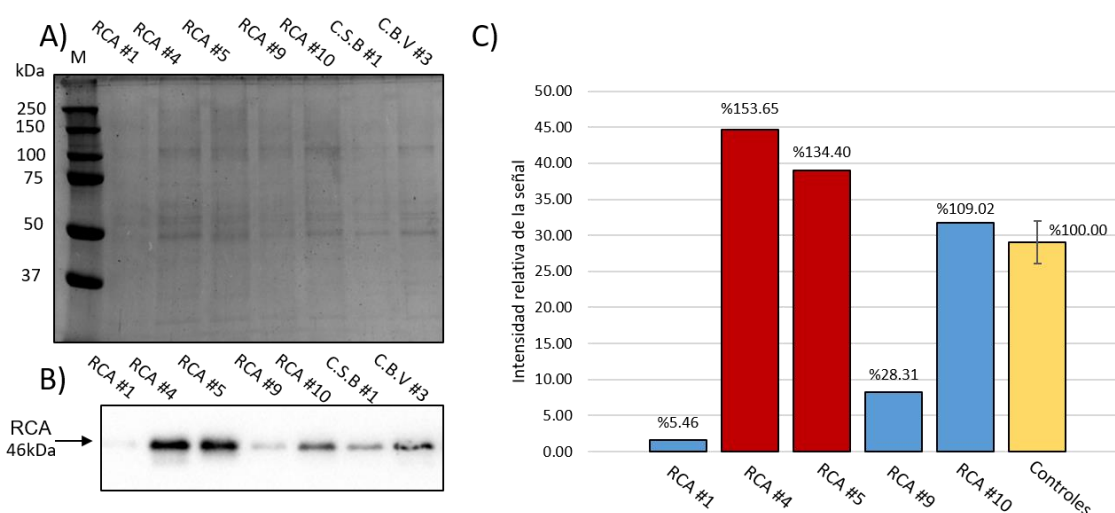


Figura 19. Inmunodetección de la proteína Rca (muestras RCA #1 a RCA #10). A) Gel SDS-PAGE al 16%, teñido con azul de Coomassie. B) Inmunodetección de Rca. C) Intensidad relativa de la señal. Las barras rojas representan a las plantas que muestran sobre-expresión de la Rca; mientras que las barras azules representan aquellas que no; la barra de color amarillo es el promedio de la intensidad relativa de la señal de los controles C.S.B y C.B.V. El porcentaje de expresión para cada muestra, se encuentra arriba de cada una de las barras.

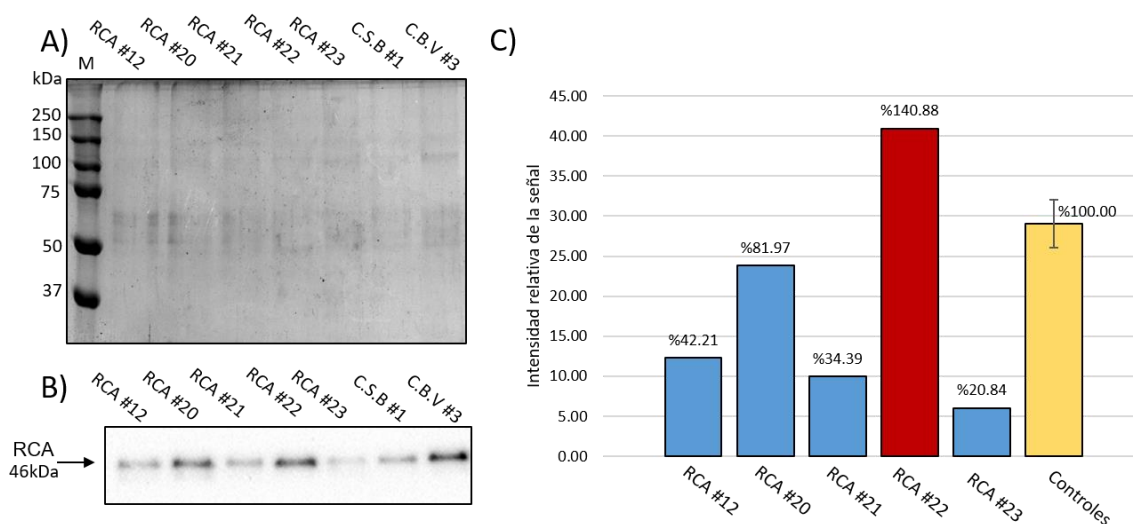


Figura 20. Inmunodetección de la proteína Rca (muestras RCA #12 a RCA #23). A) Gel SDS-PAGE al 16%, teñido con azul de Coomassie. B) Inmunodetección de Rca. C) Intensidad relativa de la señal. Las barras rojas representan a las plantas que muestran sobre-expresión de la Rca; mientras que las barras azules representan aquellas que no; la barra de color amarillo es el promedio de la intensidad relativa de la señal de los controles C.S.B y C.B.V. El porcentaje de expresión para cada muestra, se encuentra arriba de cada una de las barras.

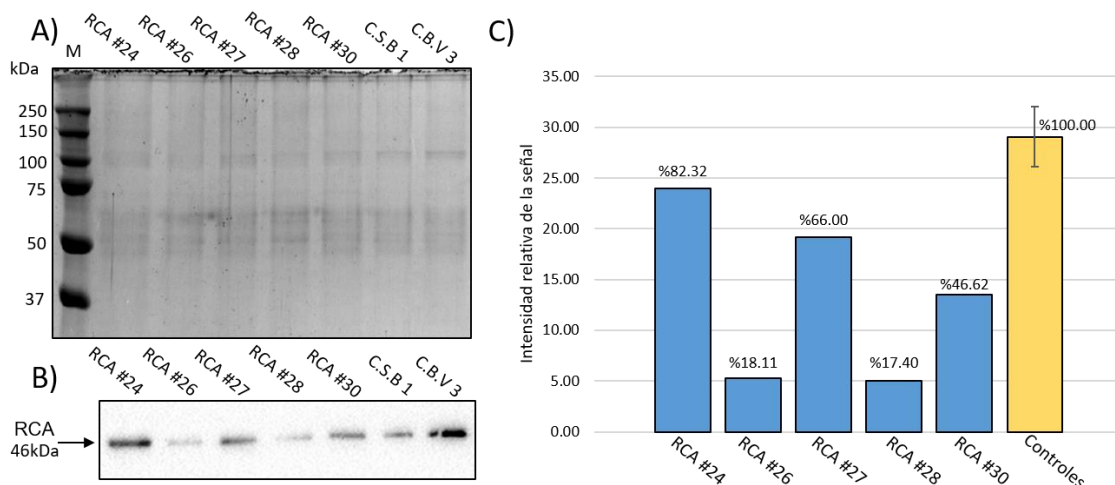


Figura 21. Inmunodetección de la proteína Rca (muestras RCA #24 a RCA #30). A) Gel SDS-PAGE al 16%, teñido con azul de Coomassie. B) Inmunodetección de Rca. C) Intensidad relativa de la señal. Las barras azules representan aquellas plantas que no muestran una expresión de Rca mayor que el promedio de los controles; la barra de color amarillo es el promedio de la intensidad relativa de la señal de los controles C.S.B y C.B.V. El porcentaje de expresión para cada muestra, se encuentra arriba de cada una de las barras.

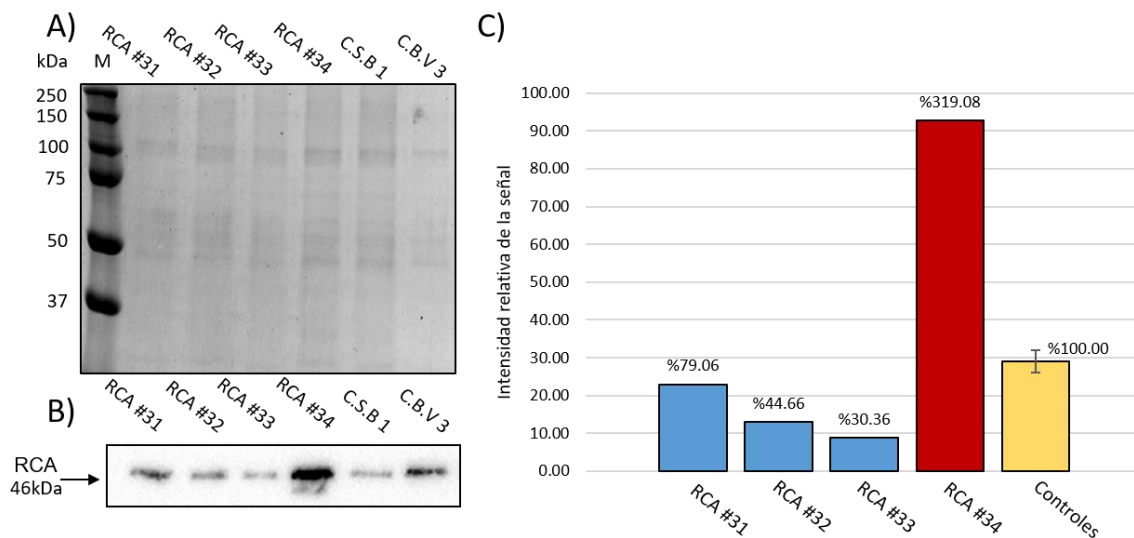


Figura 22. Inmunodetección de la proteína Rca (muestras RCA #31 a RCA #34). A) Gel SDS-PAGE al 16%, teñido con azul de Coomassie. B) Inmunodetección de Rca. C) Intensidad relativa de la señal. Las barras rojas representan a las plantas que muestran sobre-expresión de la Rca; mientras que las barras azules representan aquellas que no; la barra de color amarillo es el promedio de la intensidad relativa de la señal de los controles C.S.B y C.B.V. El porcentaje de expresión para cada muestra, se encuentra arriba de cada una de las barras.

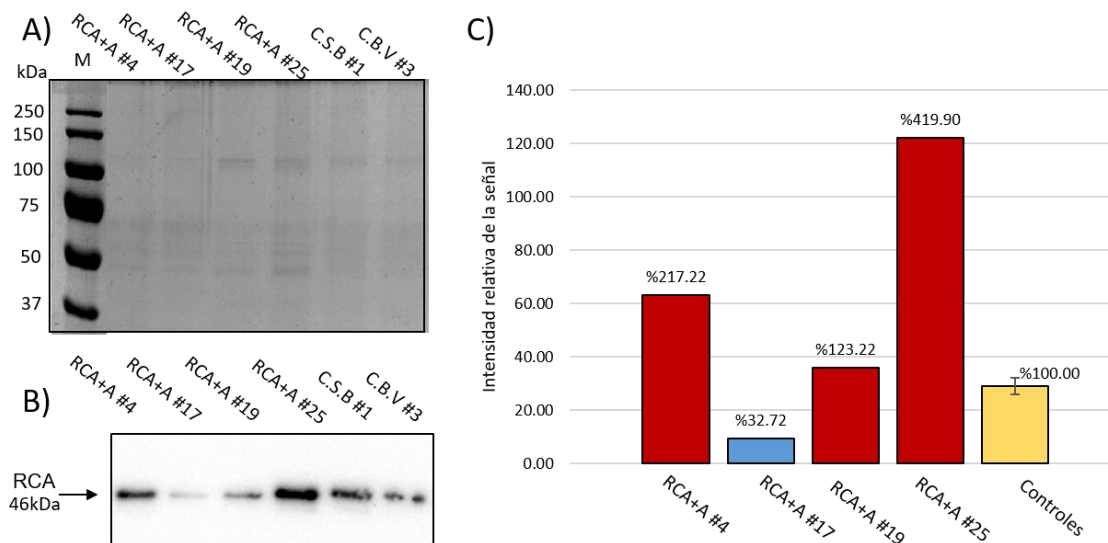


Figura 23. Inmunodetección de la proteína Rca (muestras RCA+A #4 a RCA+A #25). A) Gel SDS-PAGE al 16%, teñido con azul de Coomassie. B) Inmunodetección de Rca. C) Intensidad relativa de la señal. Las barras rojas representan a las plantas que muestran sobre-expresión de la Rca; mientras que las barras azules representan aquellas que no; la barra de color amarillo es el promedio de la intensidad relativa de la señal de los controles C.S.B y C.B.V. El porcentaje de expresión para cada muestra, se encuentra arriba de cada una de las barras.

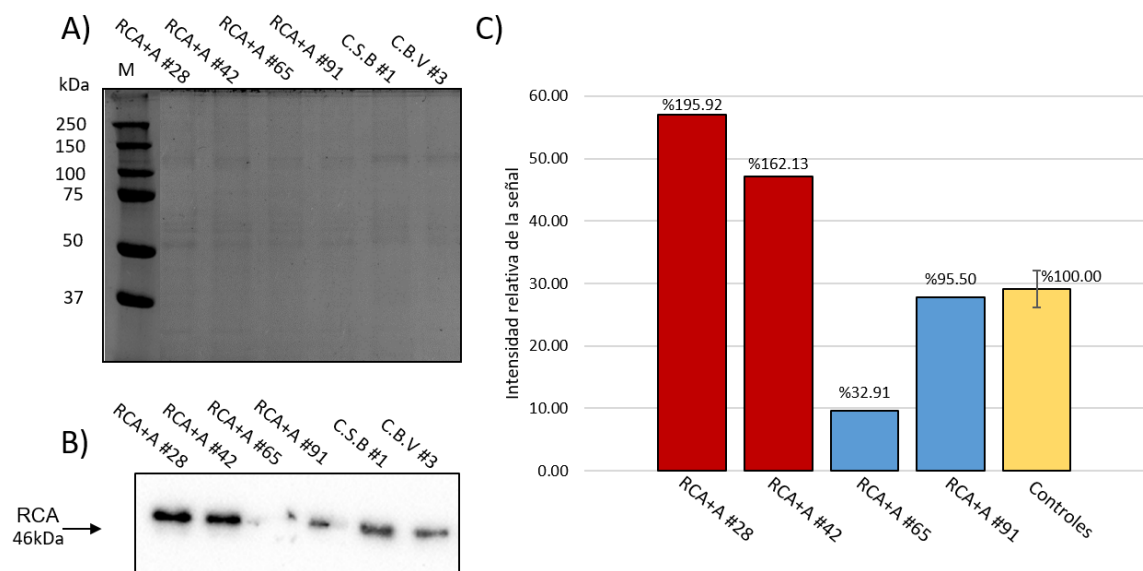


Figura 24. Inmunodetección de la proteína Rca (muestras RCA+A #28 a RCA+A #91). A) Gel SDS-PAGE al 16%, teñido con azul de Coomassie. B) Inmunodetección de Rca. C) Intensidad relativa de la señal. Las barras rojas representan a las plantas que muestran sobre-expresión de la Rca; mientras que las barras azules representan aquellas que no; la barra de color amarillo es el promedio de la intensidad relativa de la señal de los controles C.S.B y C.B.V. El porcentaje de expresión para cada muestra, se encuentra arriba de cada una de las barras.

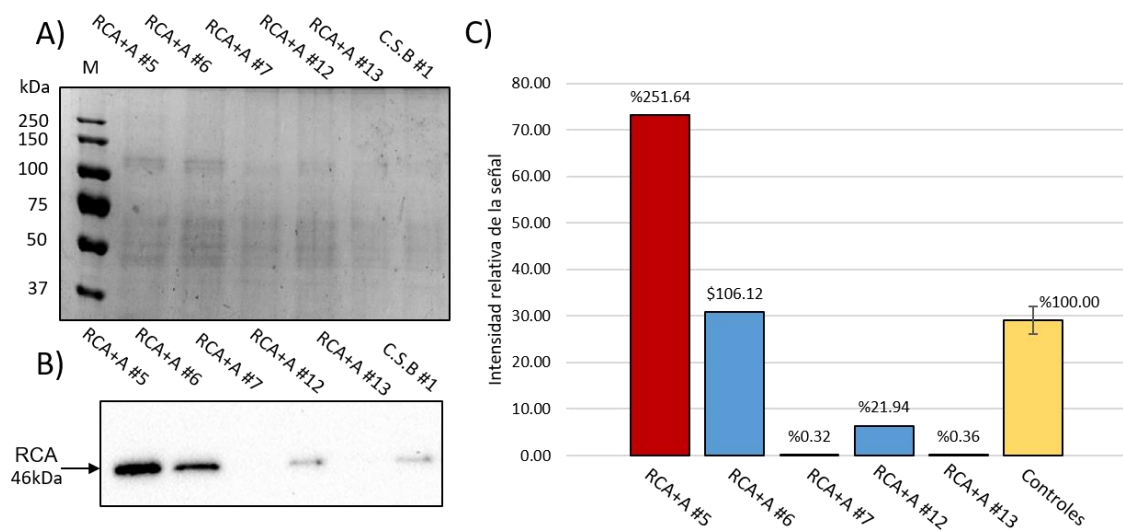


Figura 25. Inmunodetección de la proteína Rca (muestras RCA+A #5 a RCA+A #13). A) Gel SDS-PAGE al 16%, teñido con azul de Coomassie. B) Inmunodetección de Rca. C) Intensidad relativa de la señal. Las barras rojas representan a las plantas que muestran sobre-expresión de la Rca; mientras que las barras azules representan aquellas que no; la barra de color amarillo es el promedio de la intensidad relativa de la señal de los controles C.S.B y C.B.V. El porcentaje de expresión para cada muestra, se encuentra arriba de cada una de las barras.

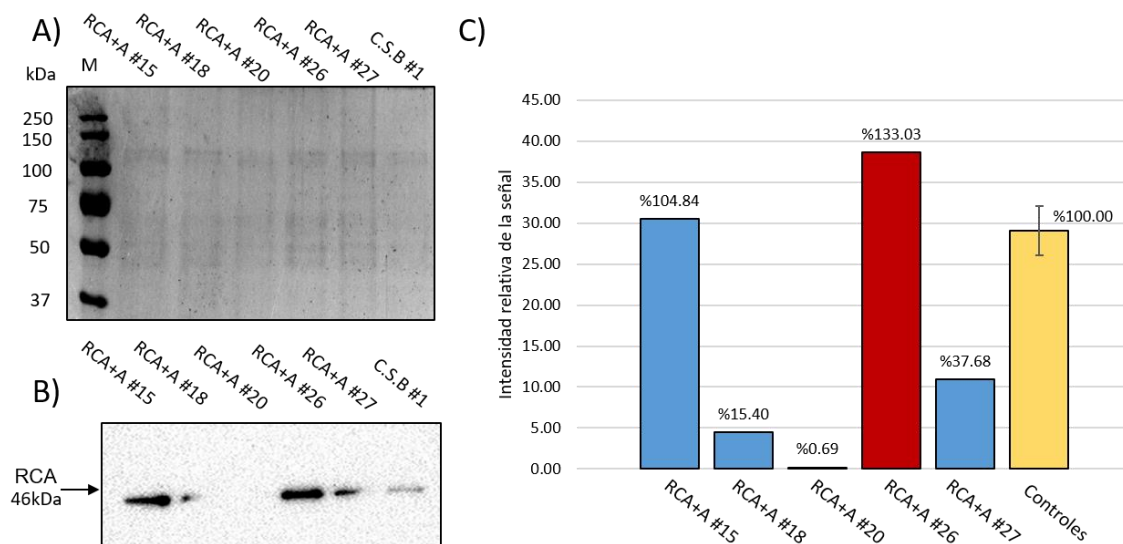


Figura 26. Inmunodetección de la proteína Rca (muestras RCA+A #15 a RCA+A #27). A) Gel SDS-PAGE al 16%, teñido con azul de Coomassie. B) Inmunodetección de Rca. C) Intensidad relativa de la señal. Las barras rojas representan a las plantas que muestran sobre-expresión de la Rca; mientras que las barras azules representan aquellas que no; la barra de color amarillo es el promedio de la intensidad relativa de la señal de los controles C.S.B y C.B.V. El porcentaje de expresión para cada muestra, se encuentra arriba de cada una de las barras.

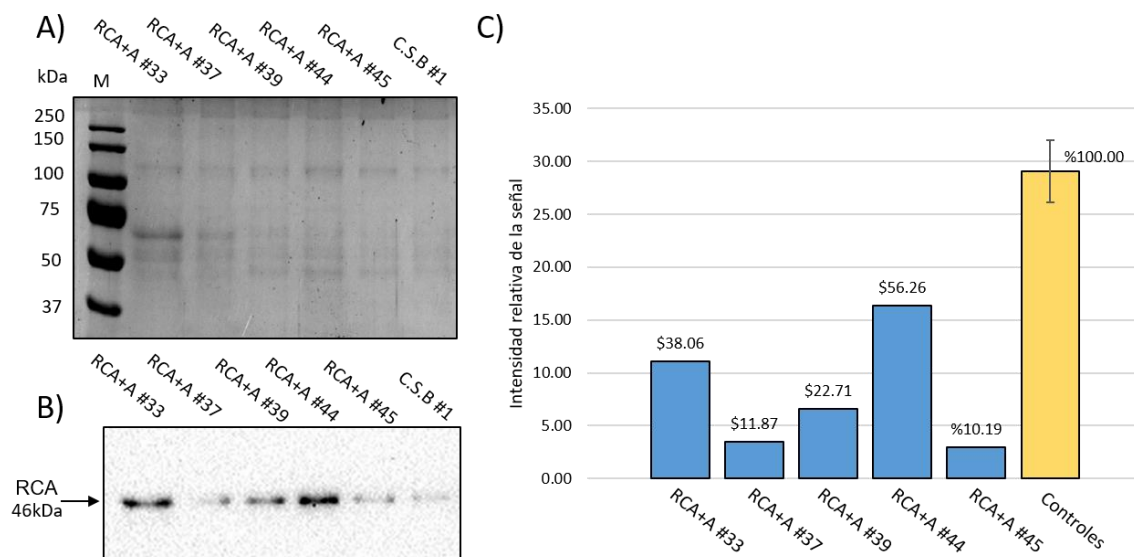


Figura 27. Inmunodetección de la proteína Rca (muestras RCA+A #33 a RCA+A #45). A) Gel SDS-PAGE al 16%, teñido con azul de Coomassie. B) Inmunodetección de Rca. C) Intensidad relativa de la señal. Las barras azules representan aquellas plantas que no muestran una expresión de Rca mayor que el promedio de los controles; la barra de color amarillo es el promedio de la intensidad relativa de la señal de los controles C.S.B y C.B.V. El porcentaje de expresión para cada muestra, se encuentra arriba de cada una de las barras.

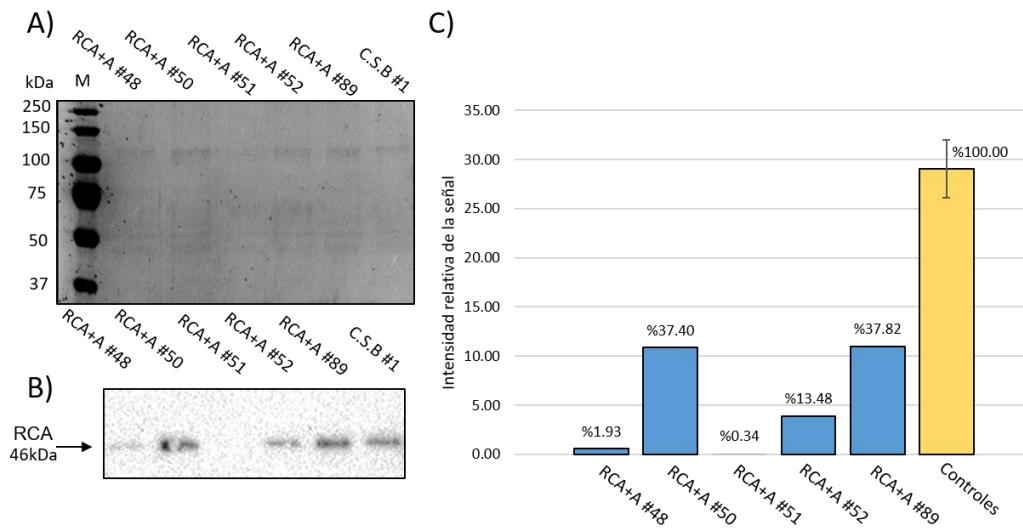


Figura 28. Inmunodetección de la proteína Rca (muestras RCA+A #48 a RCA+A #89). A) Gel SDS-PAGE al 16%, teñido con azul de Coomassie. B) Inmunodetección de Rca. C) Intensidad relativa de la señal. Las barras azules representan aquellas plantas que no muestran una expresión de Rca mayor que el promedio de los controles; la barra de color amarillo es el promedio de la intensidad relativa de la señal de los controles C.S.B y C.B.V. El porcentaje de expresión para cada muestra, se encuentra arriba de cada una de las barras.

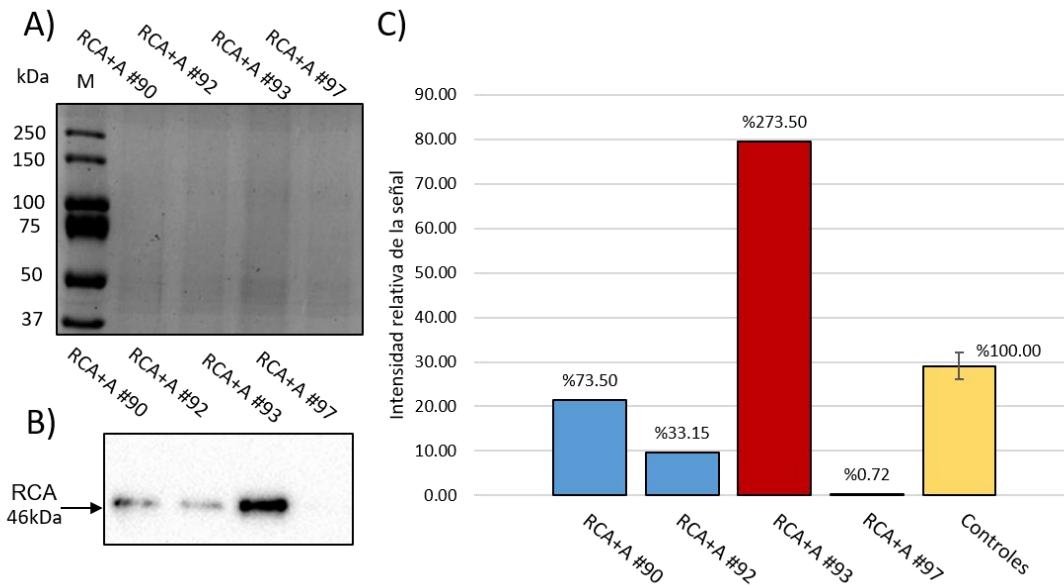


Figura 29. Inmunodetección de la proteína Rca (muestras RCA+A #90 a RCA+A #97). A) Gel SDS-PAGE al 16%, teñido con azul de Coomassie. B) Inmunodetección de Rca. C) Intensidad relativa de la señal. Las barras rojas representan a las plantas que muestran sobre-expresión de la Rca; mientras que las barras azules representan aquellas que no; la barra de color amarillo es el promedio de la intensidad relativa de la señal de los controles C.S.B y C.B.V. El porcentaje de expresión para cada muestra, se encuentra arriba de cada una de las barras.

11. REFERENCIAS

- Almeraya, E.V., de Jiménez, E.S. (2016). Intragenic modification of maize. *Journal of Biotechnology*. 238, pp. 35-41.
- Bæksted-Holme, I., Wendt, T., Bach-Holm, P. (2013). Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnology Journal*. 11, pp. 395–407.
- Bellon, MR., Hodson, D., Hellin, J. (2011). Assessing the vulnerability of traditional maize seed systems in Mexico to a climate change. *Proceedings of the National Academy Sciences. USA*. 108, pp. 13432-13437.
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, RL. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists Rockville, Maryland. 1° Ed. pp. 568-628.
- Carmo-Silva, E. (2015). Optimizing Rubisco and its regulation for greater resource use efficiency. *Plant, Cell and Environment*. 38, pp. 1817-1832.
- Chakraborty S., Chakraborty N., Agrawal L., Ghosh S., Narula K., Shekhar S., Prakash Naik S., Pande PC., Chakraborti SK., Datta A. (2010). Next generation protein rich potato by expressing a seed protein gene Am A1 as a result of proteome rebalancing in transgenic tuber. *Proceedings of the National Academy Sciences. USA*. 41, pp. 17533–17538.
- Chaves, M., Flexas, J., Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*. 103, pp. 551–560.
- Chawla, R., Shakya, R., Rommens, C.M. (2012) Tuber-specific silencing of asparagine synthetase-1 reduces the acrylamide-forming potential of potatoes grown in the field without affecting tuber shape and yield. *Plant Biotechnology Journal*. 10, pp. 913–924.
- Chiappetta, A., Muto, A., Bruno, L., Woloszynska, M., Lijsebettens, M. V., Bitonti, M. B. (2015). A dehydrin gene isolated from feral olive enhances drought tolerance in *Arabidopsis* transgenic plants. *Frontiers in Plant Science*. 6, 392.

Close, T. J. (1996). Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*. 97, pp. 795–803.

Domínguez-Ramírez, L.L., Díaz-Ruiz, G., Wachter, C. (2017) Chapter 9. Maize (*Zea mays* L. subsp. *mays*) Fermentation. In: *Fermented Foods, Part II: Technological Interventions*. Ramesh C. Ray & Didier Montet (eds.) CRC Press, FL, USA. pp. 177-215.

Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Bota, J., Galmés, J., Henkle, M., Martínez-Cañellas, S. (2006). Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytologist*. 172, pp. 73–82.

Gadaleta, A., Giancaspro, A., Blechl, A.E., Blanco, A. (2008). A transgenic durum wheat line that is free of marker genes and expresses 1DY10. *Journal of Cereal Science*. 48, pp. 439–445.

Garrocho-Villegas, V., Jesús Olvera, M.T., de Jiménez, E.S. (2012). Maize Somatic Embryogenesis: Recent Features to Improve Plant Regeneration, in: *Methods in Molecular Biology*. pp. 173-182.

Gómez, N., Murillo, P., González, M., Manjarrez, M. (2006). Variedades e híbridos de maíz del INIFAP para el estado de Guerrero. Folleto de divulgación. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur Campo Experimental Iguala. SAGARPA, México.

Heck, G. R., Armstrong, C. L., Astwood, J. D., Behr, C. F., Bookout, J. T., Brown, S. M. (2005). Development and characterization of a CP4 EPSPS-based, glyphosate-tolerant corn event. *Crop Science*. 44, pp. 329–339.

Hernández, A. (2015). Análisis comparativo del perfil global de Dehidrinas en plantas de maíz con respuesta a estrés hídrico. Tesis para obtener el título de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.

Hu, H., Xiong, L. (2014). Genetic engineering and breeding of drought resistant crops. *Annual Review of Plant Biology*. 65, pp. 715–741.

Joshi, S.G., Schaart, J.G., Groenwold, R., Jacobsen, E., Schouten, H.J., Krens, F.A. (2011). Functional analysis and expression profiling of HcrVf1 and HcrVf2 for development of scab resistant cisgenic and intragenic apples. *Plant Molecular Biology*. 75, pp. 579–591.

Koag, M.C., Wilkens, S., Fenton, R.D., Resnik, J., Vo, E., Close, T.J. (2009). The K-Segment of Maize DHN1 Mediates Binding to Anionic Phospholipid Vesicles and Concomitant Structural Changes. *Plant Physiology*. 150(3), pp. 1503-14.

Liu, Y., Song, Q., Li, D., Yang, X., Li, D. (2017). Multifunctional Roles of Plant Dehydrins in Response to Environmental Stresses. *Frontiers in Plant Science*. 8, 1018.

Lobell, D. B., Roberts, M. J., Schlenker, W., Braun, N., Little, B. B., Rejesus, R. M. (2014). Greater sensitivity to drought accompanies maize yield increase in the U.S. Midwest. *Science*. 344, pp. 516–519.

Min, H., Chen, C., Wei, S., Shang, X., Sun, M., Xia, R., Xie, Q. (2016). Identification of Drought Tolerant Mechanisms in Maize Seedlings Based on Transcriptome Analysis of Recombination Inbred Lines. *Frontiers in Plant Science*. 7, 1080.

Molina-Galán, J. (1983). Selección masal visual estratificada en maíz. *Boletín del Colegio de Postgraduados, Montecillo México*.

Morales, A. (1999). Importance of Rubisco activase in maize productivity based on mass selection procedure. *Journal of Experimental Botany*. 50, pp. 823-829.

O'Quinn, PR., Nelssen, JL., Goodband, RD., Knabe, DA., Woodworth, JC., Tokach, MD., Lohrmann, TT. (2000). Nutritional value of a genetically improved high-lysine, high-oil corn for young pigs. *Journal of Animal Science*. 78, pp. 2144–2148.

Que, Q., Elumalai, S., Li, X., Zhong, H., Nalapalli, S., Schweiner, M., Fei, X., Nuccio, M., Kelliher, T., Gu, W., Chen, Z., Chilton, M. (2014). Maize transformation technology development for commercial event generation. *Frontiers in Plant Science*. 5, pp. 1-19.

Rommens, C.M., Yan, H., Swords, K., Richael, C. and Ye, J. (2008). Low acrylamide French fries and potato chips. *Plant Biotechnology Journal*. 6, pp. 843–853.

Rorat, T., Szabala, B. M., Grygorowicz, W. J., Wojtowicz, B., Yin, Z., Rey, P. (2006). Expression of SK3-type dehydrin in transporting organs is associated with cold acclimation in *Solanum* species. *Planta*. 224, pp. 205–221.

Sánchez-Nieto, S., Greaves-Fernández, N. (2012). Material de apoyo para los estudiantes del curso Bioquímica experimental (0141). Facultad de Química UNAM, pp. 1-44. Disponible en http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/MATERIALAPOYOANTECEDENTES_22427.pdf

- Sanford, J.C., Smith, F.D., Russell, J.A. (1993). Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology*. 217, pp. 483-509.
- Spreitzer R. J., Salvucci M. E. (2002). Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology*. 53, pp. 449–475.
- Tripepi, M., Pöhlschroder, M., and Bitonti, M. B. (2011). Diversity of dehydrins in *Olea europaea* plants exposed to stress. *The Open Plant Science Journal*. 5, pp. 9–13.
- Vanblaere, T., Szankowski, I., Schaart, J., Schouten, H., Flachowsky, H., Brogini, G.A.L. Gessler, C. (2011). The development of a cisgenic apple plant. *Journal of Biotechnology*. 154, pp. 304–311.
- Walters, D., Vetsch, C., Potts, D., and Lundquist, R. (1992). Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants. *Plant Molecular Biology*. 18, pp.189–200.
- Yamori, W., Von C.S., (2011). Quantification of Rubisco Activase Content in Leaf Extracts. In R. Carpentier, ed. *Photosynthesis Research Protocols, Methods in Molecular Biology*. 684, pp. 383-391.
- Zarco-Perelló., E., V.A. González H., M.C. López P. y Y. Salinas M. (2005). Marcadores fisiológicos de la tolerancia a sequía en maíz (*Zea mays* L.). *Agrociencia*. 39, pp. 517-528.