



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**SOBREEXPRESIÓN DE RUBISCO ACTIVASA EN PLANTAS DE MAÍZ**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**Doctor en Ciencias**

**PRESENTA:**

**ERIKA VICTORIA ALMERAYA DEL VALLE**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dra. Estela Sánchez Quintanar**  
**Facultad de Química**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**Dra. Adriana Garay Arroyo**  
**Instituto de Ecología**  
**Dr. Luis Cárdenas Torres**  
**Instituto de Biotecnología**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

marzo 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

*Comienzo lejos de mí; porque nadie debiera describir su vida si no es suficientemente paciente para, antes de documentar su propia existencia, recordar al menos a la mitad de sus abuelos...*

Oskar en El tambor de hojalata. Günter Grass

*Este trabajo está dedicado  
para mi familia  
especialmente  
para mis padres,  
mis hermanos  
y para Eric.*

---

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT, con los fondos de proyectos científicos para atender problemas nacionales 2013 [PDCPN-2013/213872, 252001]; y con la beca otorgada para realizar estudios de doctorado: 229516.

La presentación de este trabajo en diferentes congresos fue posible gracias al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

# CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ANTECEDENTES</b> .....	3
• Mejoramiento genético de cultivos .....	3
• Ingeniería agronómica: Fitomejoramiento .....	3
• Ingeniería genética.....	4
• Plantas transgénicas.....	6
• Plantas cisgénicas, intragénicas e isogénicas.....	8
• Sobreexpresión de Rubisco activasa (Rca) y su relación con el mejoramiento del maíz .....	10
• Función de Rubisco activasa (Rca) .....	10
• Expresión de Rubisco activasa (Rca) en maíz .....	15
<b>HIPÓTESIS</b> .....	17
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	18
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	19
• Material biológico .....	19
• Sobreexpresión transgénica de Rca .....	19
○ <i>Diseño de construcción transgénica</i> .....	19
○ <i>Obtención de vector transgénico</i> .....	20
○ <i>Transformación de maíz con cassette transgénico</i> .....	23
○ <i>Identificación de plantas transgénicas de maíz</i> .....	24
○ <i>Análisis de la expresión de Rca en plantas transgénicas</i> .....	25
Proteína .....	25
○ <i>Análisis del fenotipo de plantas transgénicas</i> .....	25

• Sobreexpresión isogénica de Rca .....	26
○ <i>Diseño de construcción isogénica</i> .....	26
○ <i>Obtención de cassette isogénico</i> .....	27
○ <i>Transformación de maíz con cassette isogénico</i> .....	28
○ <i>Identificación de plantas isogénicas de maíz</i> .....	29
○ <i>Análisis de la expresión de Rca en plantas isogénicas</i> .....	30
Proteína .....	30
mRNA.....	30
○ <i>Determinación del número de copias del cassette isogénico</i> .....	31
○ <i>Validación externa del procedimiento de transformación isogénico</i> .....	33
• Sobreexpresión agronómica de Rca .....	33
○ <i>Cultivo de plantas sobreexpresantes de Rca obtenidas por métodos agronómicos</i> .....	33
○ <i>Análisis de la expresión de Rca en plantas mejoradas por método agronómico</i> .....	34
Proteína .....	34
mRNA.....	34
○ <i>Determinación del número de copias de Rca en plantas mejoradas por método agronómico</i> .....	35
• Protocolos generales.....	36
○ <i>Transformación de células químicamente competentes</i> .....	36
○ <i>Análisis de transformantes</i> .....	36
○ <i>Extracción de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep)</i> .....	37
○ <i>Extracción de DNA genómico a partir de hoja de maíz</i> .....	37
○ <i>Transformación de callos embriogénicos de maíz por biobalística</i> .....	38
<b>RESULTADOS</b> .....	40
• SOBREEXPRESIÓN TRANSGÉNICA DE Rca.....	40
○ <i>OBTENCIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN TRANSGÉNICA</i> .....	40
○ <i>TRANSFORMACIÓN DE MAÍZ CON pCambia 3301- Rca</i> .....	50
○ <i>IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS SOBREEXPRESANTES DE Rca</i> .....	52
○ <i>CUANTIFICACIÓN DE Rca EN PLANTAS TRANSGÉNICAS</i> .....	52
○ <i>ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE PLANTAS TRANSGÉNICAS</i> .....	53

• SOBREEXPRESIÓN ISOGÉNICA DE Rca .....	59
○ <i>OBTENCIÓN DE CASSETTE DE SOBREEXPRESIÓN ISOGÉNICO</i> .....	59
○ <i>TRANSFORMACIÓN DE MAÍZ CON CASSETTE ISOGÉNICO</i> .....	60
○ <i>IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS ISOGÉNICAS SOBREEXPRESANTES DE Rca</i> .....	62
○ <i>CUANTIFICACIÓN DE Rca EN PLANTAS ISOGÉNICAS</i> .....	65
○ <i>DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DEL CASSETTE ISOGÉNICO</i> .....	69
○ <i>VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE TRANSFORMACIÓN ISOGÉNICO</i> .....	73
• SOBREEXPRESIÓN AGRONÓMICA DE Rca .....	75
○ <i>CUANTIFICACIÓN DE Rca EN MAÍZ MEJORADO AGRONÓMICAMENTE</i> .....	75
○ <i>DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DE Rca EN MAÍZ MEJORADO AGRONÓMICAMENTE</i> .....	77
<b>DISCUSIÓN</b> .....	80
○ <i>Efecto de la sobreexpresión de Rca en maíz</i> .....	80
○ <i>Método isogénico vs Método transgénico</i> .....	81
○ <i>Similitudes entre el Método isogénico y el Método agronómico</i> .....	83
<b>CONCLUSIONES</b> .....	86
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	88
<b>ANEXOS</b> .....	95
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	98

---

# RESUMEN

El mejoramiento genético de las plantas ha sido un objetivo continuamente perseguido por el hombre, en un principio mediante el uso de técnicas agronómicas y más recientemente también a través de ingeniería genética; este último abordaje ofrece sin duda ventajas en cuanto a reducir el tiempo de mejoramiento de los cultivos. Sin embargo, la aplicación de esta metodología para el desarrollo de plantas transgénicas despertó gran inquietud y reticencia debido a la combinación de secuencias de DNA provenientes de diferentes especies. Aunque no se han comprobado efectos negativos para la salud humana y /o animal, la transgénesis aplicada a plantas comestibles continúa siendo controversial debido a la incertidumbre sobre los efectos que nuevas combinaciones de DNA puedan provocar sobre el ecosistema a largo plazo y porque existe una percepción pública negativa acerca de la inocuidad alimentaria de los cultivos transgénicos. Esta negativa se exagera en el caso de especies de polinización abierta como el maíz por la facilidad latente del flujo genético.

Los debates de índole ético, cultural y social que despertaron los cultivos transgénicos también propiciaron la búsqueda de alternativas de mejoramiento más aceptables. Tal es el caso del desarrollo de los cultivos cisgénicos y/o intragénicos, los cuales, a diferencia de los transgénicos sólo admiten la combinación de secuencias de DNA originarias de la misma especie y/o especies naturalmente compatibles. En consecuencia, la cisgénesis resulta comparable con las técnicas de mejoramiento agronómico tradicional, pues parte de la combinación del mismo conjunto de secuencias génicas que se utilizan en las técnicas agronómicas convencionales, haciendo uso de la ingeniería genética para dirigir y agilizar las nuevas combinaciones.

En este contexto, la presente tesis investiga acerca de la aplicación inédita de un método intragénico, aquí denominado isogénico, para mejorar el cultivo de maíz. Su desarrollo se fundamentó en investigaciones anteriores de este laboratorio con las cuales se demostró que el aumento del rendimiento de grano en plantas de maíz está asociado con el incremento de expresión de la proteína Rubisco activasa (Rca). De aquí que el objetivo central de este trabajo fue obtener plantas de maíz isogénicas sobreexpresantes de Rca.

La obtención del maíz isogénico se logró a partir de la transformación de callos embriogénicos, mediante la inserción por bombardeo de secuencias del DNA del maíz dirigidas para sobreexpresar Rca sin usar agentes de selección. Simultáneamente se obtuvieron plantas sobreexpresantes de Rca usando los métodos transgénicos ya conocidos. Ambos tipos de plantas obtenidos por ingeniería genética se compararon con plantas de maíz previamente seleccionadas durante 23 ciclos agrícolas convencionales para obtener mayor productividad. Los resultados demostraron que fue posible llevar a cabo la sobreexpresión isogénica de Rca brindando máximos beneficios en términos de mejoramiento, pues a diferencia de la sobreexpresión transgénica, la sobreexpresión

isogénica ofrece las mismas ventajas de bioseguridad que se obtienen con el mejoramiento agronómico tradicional con la viabilidad de lograrlo en un tiempo significativamente menor. De acuerdo a lo anterior, la presente tesis aporta evidencia experimental que señala al método isogénico como una herramienta útil para apoyar los procesos de mejoramiento tradicionalmente usados en el cultivo del maíz. Ésto además sienta las bases científicas para las iniciativas de regulación de este tipo de organismos en nuestro país, lo cual es de particular importancia para México pues al ser el centro de origen y diversificación de este cultivo, enfrenta retos de gran magnitud tales como preservar la riqueza de su germoplasma y a la vez, superar el desafío que supone obtener variedades que se adapten rápidamente a condiciones climáticas cambiantes con rendimientos suficientes para cubrir su creciente demanda.

---

# ANTECEDENTES

- Mejoramiento genético de cultivos

Actualmente, el mundo enfrenta retos complejos en cuanto a la producción, almacenaje y distribución de los alimentos. En los próximos años la demanda de productos vegetales incrementará no sólo como abastecimiento para la alimentación humana y animal, sino también como fuente de materias primas para productos no alimenticios. La transición de la economía mundial basada en recursos fósiles, a una economía basada en recursos biológicos principalmente sistemas vegetales, aumentará la demanda por tierras cultivables en un panorama de cambios climáticos inciertos y de prácticas agrícolas muchas veces inadecuadas (Mckersie 2015). Debido al aumento de la población mundial, el mejoramiento de los cultivos resulta primordial y los mecanismos usados para este fin dependerán del cultivo en cuestión y de la aceptación local de las mejorías. Así mismo la explotación, mantenimiento y aumento de las tierras cultivables determinará la seguridad alimentaria de cada país y como consecuencia el desarrollo de su economía en el futuro cercano (Bowles 2012). De aquí, la urgente necesidad de acelerar los procesos de mejoramiento de cultivos de interés agronómico con miras a enfrentar los desafíos que se presentan.

- Ingeniería agronómica: Fitomejoramiento

Los cultivos de interés agronómico han sido modificados desde diferentes aproximaciones, primero utilizando técnicas convencionales de cruza entre plantas con fenotipos deseados y después mediante técnicas biotecnológicas que buscan cambiar la expresión de genes específicos. El fitomejoramiento tradicional se ha empleado ancestralmente, su objetivo es mejorar cualidades específicas de un cultivo como son: obtener mayor rendimiento, mayor calidad de grano, mejor resistencia a plagas o enfermedades y mayor tolerancia a factores ambientales adversos como la sequía o el estrés térmico. En este método, los individuos sobresalientes se seleccionan en ciclos subsecuentes de cultivo hasta que después de numerosos eventos de cruza y retro-cruza se obtiene una generación portadora de la característica deseada que es reconocida como una nueva variedad (Márquez-Sánchez 2008; Vogel 2009). El fitomejoramiento ha brindado grandes beneficios al obtener semillas satisfactoriamente mejoradas respecto a las plantas predecesoras. Su realización requiere de mucho trabajo a lo largo de décadas de ciclos agrícolas durante los cuales se busca que alguna propiedad de interés agronómico sea perpetuada a través de las generaciones. Sin embargo, algunas características de menor importancia o aún más, algunas propiedades indeseables también subsisten debido a que ambas características: tanto deseadas como no deseadas -aunque expresadas en

diferentes regiones del genoma- son heredadas juntas y resulta muchas veces imposible separarlas. Este fenómeno es conocido como *linkage drag* o herencia ligada y es considerado como una desventaja inherente a los sistemas tradicionales de selección agrícola (Jacobsen y Schouten 2007). Los sistemas agrícolas enfrentan nuevos retos debido a que los recursos no renovables como fertilizantes químicos, agua y tierra cultivable son cada vez menos disponibles (Pretty y Bharucha 2014). Además, el pronóstico de cambio climático amenaza con interrumpir la cadena de producción agrícola requerida para proveer de alimentos y para abastecer de insumos a diferentes industrias. (McKersie 2015; Moshelion y Altman 2015). Frente a estas circunstancias, es necesario impulsar la investigación para entender la bioquímica de los cultivos básicos, con la finalidad de diseñar estrategias sustentables requeridas para satisfacer las demandas agrícolas actuales y futuras.

En el caso específico del cultivo de maíz, se sabe que este experimentó el proceso de domesticación desde hace 10000 años en México (Piperno *et al.* 2009). La domesticación a partir de su antecesor el teocintle, significó un cambio radical del fenotipo del maíz, transformándolo en una planta no ramificada sustancialmente distinta a su predecesor, con su semilla unida a la mazorca y dependiente del ser humano para su propagación (Strable y Scanlon 2009). Desde su domesticación, el maíz ha estado sujeto al mejoramiento continuo mediante prácticas agronómicas. Con ello se originó una gran cantidad de variedades autóctonas de maíz adaptadas a diversas condiciones ambientales y se generaron diversas líneas de híbridos de maíz (Márquez-Sánchez 2008; Acosta R. 2009; Vogel 2009). Sin embargo, debido a múltiples factores como el aumento de la población mundial, la disminución de tierras cultivables y los cambios globales del medio ambiente, ha surgido la necesidad de acelerar el tiempo de adaptación de este cultivo particularmente importante para México (Dalton 2009). Debido a su amplia capacidad de adaptación, el maíz también se ha convertido en uno de los cultivos más estudiados en el mundo (Gong *et al.* 2015). Es por ello que continuamente surgen nuevos proyectos de investigación, paralelos a las tecnologías emergentes, orientados al estudio y mejoramiento de este cultivo.

- Ingeniería genética

La ingeniería genética es una disciplina que comprende un conjunto de técnicas que al ser aplicadas a los sistemas vegetales, tiene como objetivo -similar al del fitomejoramiento- contribuir al mejoramiento de los cultivos de interés para el humano. El concepto básico es extremadamente simple: Introducir un fragmento de DNA en una célula y generar a partir de esa célula una planta completa que expresará una nueva característica bien definida y acorde con el DNA introducido. La nueva planta es exactamente igual a la planta del material de origen, con la única excepción de la inserción del DNA de interés (Stewart 2012). Aunque el concepto resulta fácil de entender, en la práctica, la ingeniería genética se logró recientemente gracias a numerosos y complejos avances científicos y

tecnológicos que permitieron manipular el DNA hasta el punto de identificar, aislar, recombinar y amplificar secuencias nucleotídicas específicas.

El producto de la ingeniería genética es lo que se conoce como organismo genéticamente modificado u OGM. De acuerdo con la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, Artículo 3, Fracciones XXI y VI respectivamente, un organismo genéticamente modificado (OGM) es “cualquier organismo vivo, con excepción de los seres humanos, que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna” Entendiéndose que Biotecnología moderna es “la aplicación de técnicas *in vitro* de ácido nucleico, incluidos el ácido desoxirribonucleico (ADN y ARN) recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u organelos, o la fusión de células más allá de la familia taxonómica, que supera las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o de la recombinación y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional” (LBOGM 2005). De acuerdo con la Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea (EFSA, European Food Safety Authority), organismo genéticamente modificado significa un organismo en el que el material genético ha sido alterado en una forma que no ocurre naturalmente a través de fertilización y / o recombinación natural (Artículo 2 de la Legislación de la Unión Europea (2001/18/EG). Comúnmente se usan indistintamente los términos OGM y transgénico como si se tratara del mismo concepto, sin embargo, ésto es erróneo. Un organismo transgénico, ciertamente es el producto de la inserción de un fragmento de DNA, pero con la particularidad de que dicho fragmento fue aislado de un genoma diferente al del receptor de la secuencia. En consecuencia, todos los organismos transgénicos son organismos genéticamente modificados, pero no todos los organismos genéticamente modificados son transgénicos. Por ejemplo, se pueden inducir mutaciones en el DNA de una planta mediante irradiación provocando combinaciones novedosas de su DNA, como resultado se origina un organismo genéticamente modificado que no podría ser considerado transgénico puesto que no porta ningún gen de otra especie biológica.

Los propósitos de la ingeniería genética al introducir un fragmento de DNA son variados, en algunos casos se busca que la inserción de DNA suprima o silencie la expresión de un gen, mientras que en otros casos se busca que dicha inserción aumente la expresión de algún gen ya existente en el organismo receptor. También puede ser que la inserción adicione un gen que mejore o que sume una característica dada. Independientemente del propósito, los medios para alcanzarlo son también variados y estas diferencias son las que finalmente darán la connotación exacta de qué tipo de organismo genéticamente modificado se produce. En términos generales, se puede decir que cada OGM posee particularidades en cuanto a su propósito, diseño y obtención que lo hacen completamente diferente a otro OGM, es por ello que existe la propuesta de que la aceptación y aplicación de cada OGM debe ser evaluada individualmente (Comité de Biotecnología 2011).

- Plantas transgénicas

En los sistemas de transformación genética de plantas más difundidos hasta ahora, normalmente se introduce un gen de selección que produce una nueva proteína en las células que adquirieron dicho gen, es decir, en las células que fueron transformadas. La nueva proteína realiza una reacción bioquímica específica que otorga una ventaja de supervivencia útil para reconocer y recuperar a las células transformadas. Generalmente se introducen genes de resistencia que funcionan como señal. Dichos genes codifican proteínas cuya función es eliminar una toxina o bien, producir una forma alterna de alguna enzima que crea insensibilidad de la planta hacia un agente tóxico como un antibiótico o un herbicida. La mezcla de células transformadas y no transformadas se expone entonces a los agentes selectivos a fin de que sólo las células que contienen el gen de resistencia puedan sobrevivir y crecer. Los genes de resistencia más usados provienen de organismos tan diferentes a las plantas como virus o bacterias, por ejemplo los genes que codifican a las proteínas neomicina fosfotransferasa e higromicina fosfotransferasa que otorgan resistencia a los antibióticos kanamicina e higromicina respectivamente. El gen de resistencia a herbicida que se usa más frecuentemente es el gen *bar* (a veces referido como gen *pat*) el cual codifica para la proteína fosfinotricina acetil transferasa (*phosphinothricin acetyl transferase*) cuya actividad inactiva al herbicida glufosinato de amonio (Manimaran *et al.* 2011). Las plantas resultantes siguiendo estos métodos de transformación contienen genes provenientes de diferentes genomas y se nombran plantas transgénicas. Este tipo de transformación definió a la primera generación de plantas obtenidas mediante ingeniería genética.

La selección de plantas por su crecimiento en presencia de agentes tóxicos ha sido la forma más común de selección y se denomina “selección negativa”. Sin embargo, las células también pueden ser seleccionadas de otra forma. La “selección positiva” se refiere a la habilidad de una célula para sobrevivir utilizando nutrientes que no están disponibles para las células no transformadas. Por ejemplo, la manosa no puede ser metabolizada por la mayoría de las células a menos que ésta sea convertida a fructosa usando un transgen que codifique a la fosfomanosa isomerasa (gen *PMI phosphomannose isomerase*). Las células que incorporan este gen pueden crecer en un medio de cultivo que use manitol como única fuente de carbono, mientras que las células no transformadas mueren por inanición (Stoykova y Stoeva-Popova 2011). Otro esquema de selección utiliza genes que permiten diferenciar las células transformadas para que éstas puedan ser físicamente separadas de las células no transformadas. La inserción de “genes reporteros” permite identificar las células transformadas mediante alguna característica como el desarrollo de color mediante inducción química o por la emisión de fluorescencia o fosforescencia. Dentro de este grupo de genes se encuentra el que codifica para la proteína verde fluorescente GFP (*green fluorescent protein*), la cual imparte un color verde fluorescente a las células de las plantas cuando éstas son observadas bajo luz ultravioleta (Stewart 2001).

Desde el punto de vista tecnológico, la capacidad para recombinar el DNA de una planta usando los sistemas de transformación transgénicos, brindó la oportunidad de analizar la expresión de genes foráneos en las plantas así como de enriquecer el conocimiento acerca de la función de segmentos específicos del DNA de las plantas. A partir de este razonamiento, se generaron gran cantidad y variedad de plantas transgénicas. Las más exitosas desde el punto de vista comercial, han sido las plantas que codifican a los genes que otorgan resistencia a herbicidas o insecticidas, pues -como se explicó anteriormente- la inserción de estos genes facilita la recuperación de las células transformadas y además la integración estable del gen de resistencia en las células vegetales permite la generación de plantas completas que portan la misma resistencia. De este modo, al asperjar el herbicida o insecticida que no daña a la planta debido al gen de resistencia que porta, se eliminan las malezas que compiten por los sustratos del suelo donde crece el cultivo de interés, o bien, se combaten las plagas que frecuentemente invaden determinado cultivo. Muchos agricultores han optado por el uso de este tipo de plantas transgénicas debido a los beneficios económicos y de reducción de trabajo que dicen obtener al disminuir el número de aplicaciones de herbicidas o insecticidas. En consecuencia, las plantas transgénicas resistentes a insecticidas y herbicidas, se popularizaron rápidamente desde 1998 e incrementaron su plantación hasta alcanzar los 170 millones de hectáreas en el mundo, principalmente algodón, soya, canola y maíz (Cressey 2013).

No obstante el cultivo de plantas transgénicas se ha extendido a 28 países entre ellos México (Nature News 2013), su siembra y consumo es altamente controversial debido a la mezcla de DNA proveniente de especies completamente distintas. Aunque hasta la fecha no existe evidencia científica que indique efectos adversos a la salud humana o animal (Achenbach J. 2016; Fahlgren *et al.* 2016), el uso de las plantas transgénicas sigue siendo cuestionado por la falta de bioseguridad durante su siembra a cielo abierto en especies de polinización abierta (Lucht 2015; Ryffel 2014; Yaqoob *et al.* 2016; Piñeyro-Nelson *et al.* 2009). Si bien estos organismos constituyeron la punta de lanza para estudiar propiedades genéticas de forma más precisa, también se abrió la oportunidad para expandir los agronegocios de grandes empresas transnacionales y con ello se aceleró la apropiación intelectual tanto de semillas como de formas y mecanismos genéticos de mejoramiento de plantas de interés alimentario. Consecuentemente, estos aspectos ajenos a los estudios científicos han obstaculizado el desarrollo de nuevos organismos genéticamente modificados con propiedades distintas a las ya existentes y que en gran medida, constituyen uno de los principales argumentos que se contraponen al uso masivo de los organismos transgénicos (Álvarez-Buylla 2013). Debido a la trascendencia del cultivo de maíz en México, todos los aspectos científicos, ambientales, culturales y económicos deben evaluarse como en cualquier otro desarrollo tecnológico aplicado en nuestro país. Por ello, en México como en otros países, se ha instrumentado una política precautoria y un marco de regulación perfectible para el uso de los organismos transgénicos (Comité de Biotecnología 2011).

En razón de lo expuesto anteriormente, los cultivos transgénicos no representan una solución completa para obtener masivamente las plantas mejoradas que demanda el futuro. Por ello, actualmente se buscan nuevos enfoques para modificar los cultivos en

menor tiempo de lo que el mejoramiento tradicional puede ofrecer, pero evitando la mezcla de DNA de diferentes especies especialmente para el caso de las plantas comestibles.

- Plantas cisgénicas, intragénicas e isogénicas

Como alternativa más conveniente para obtener las mejoras genéticas deseadas en las plantas han surgido diferentes aproximaciones usando nuevas metodologías que evitan introducir material genético heterólogo. El término cisgénico se aplica para describir al organismo genéticamente modificado con genes de su misma especie o con genes provenientes de especies sexualmente compatibles. El concepto originalmente fue acuñado por Schouten en 2006 indicando que para este proceso, los genes se usan con sus propias regiones regulatorias como son: promotor, terminador, intrones y secuencias flanqueantes, todos con la orientación o configuración naturalmente encontrada en el genoma de origen (Schouten *et al.* 2006). En consecuencia, el conjunto de genes usados por el método de cisgénesis es idéntico al acervo de genes disponibles para el mejoramiento tradicional y por lo tanto, los genes exógenos tales como genes marcadores de selección y componentes de vectores de transformación usados durante la modificación, deben estar ausentes o deben ser eliminados de la primera generación de transformantes cisgénicas o de su progenie. Desde su publicación, la tecnología cisgénica se limitó al uso de secuencias génicas completas, sin embargo, algunos desarrollos basados en el uso de secuencias propias de un organismo incluyeron el uso de fragmentos de distintos genes o de regiones regulatorias, que aunque son originarios de la misma especie o especies compatibles, no son genes completos tal como lo estableció la definición original de un organismo cisgénico. Por tal motivo se acuñó el término “intragénico.” Esta nueva categoría de organismo genéticamente modificado se basó en la distancia filogenética que existe entre el donador o fuente de DNA y el receptor. Por tanto, los cultivos intragénicos comparados con otros cultivos mejorados obtenidos mediante ingeniería genética poseen la distancia filogenética más corta entre la fuente y el receptor de DNA, porque la fuente de DNA proviene de la misma especie o especies sexualmente compatibles (Nielsen 2003). Por lo tanto, a diferencia del término cisgénesis, el concepto intragénico no se limitó al uso de secuencias génicas completas, esto es, que en los organismos intragénicos se permite el uso de combinaciones novedosas de secuencias así como de orientaciones diversas de las mismas siempre que provengan del mismo organismo o especies compatibles. Sin embargo, ambos conceptos coinciden en la importancia de obtener un organismo genéticamente modificado sin mezclas de DNA provenientes de especies naturalmente incompatibles. Por ello, la denotación “cisgénico” sigue usándose junto con el término intragénesis, aun cuando originalmente se definieron como conceptos distintos (Espinoza *et al.* 2013; Schouten y Jacobsen 2008). Otro término relacionado es “isogénico”. Según el Glosario de Biotecnología para la Agricultura y la Alimentación de la FAO, el vocablo isogénico se usa para describir a un grupo de individuos con la misma constitución cromosómica con independencia de su condición homocigótica o heterocigótica.

En este trabajo se usó el término isogénico para referirnos a las plantas logradas luego de sobreexpresar genes -naturalmente presentes en variedades de maíz mejoradas por técnicas agronómicas convencionales- sin usar agentes de selección durante el proceso. Esto es porque las líneas sobreexpresantes así obtenidas, son isogénicas respecto a las variedades de maíz que les dieron origen, pues contienen la misma composición genética que estas últimas. En consecuencia, la cisgénesis y/o intragénesis e isogénesis son aproximaciones que nos ofrecen lo mejor de dos técnicas de mejoramiento de cultivos, pues toman del mejoramiento convencional las características agronómicas deseadas y mediante ingeniería genética modifican la expresión de genes para obtener al final una planta mejorada sin DNA de otras especies. El mecanismo para lograr esta modificación depende de las características fisiológicas, de propagación y tiempo de crecimiento de la planta por mejorar. La mayoría de las plantas cisgénicas y /o intragénicas se han obtenido mediante el uso del plásmido de *Agrobacterium* para transferir la unidad deseada de DNA, clonada en la región T-DNA o en la llamada región P-DNA -variación de T-DNA construida con DNA compatible con la planta por modificar- (Rommens 2004). Sin embargo, en algunos de estos casos aún resulta controversial que pequeños fragmentos del DNA plasmídico son detectables por técnicas moleculares -como PCR o Southern – blot- en las nuevas plantas mejoradas, por lo cual éstas no son consideradas como verdaderas cisgénicas y / o intragénicas (Vanblaere *et al.* 2014; Holme *et al.* 2013). En otros casos la obtención de plantas cisgénicas y/o intragénicas se ha logrado bombardeando dos secuencias lineales de DNA, una con el gen deseado y otra con un gen marcador que puede ser de origen diferente a la planta, sólo para permitir el escrutinio de eventos exitosos de transferencia de DNA. Luego, por segregación dirigida de las plantas descendientes, se buscan aquellas nuevas plantas -ahora denominadas cisgénicas- que sólo heredaron al gen deseado sin el gen marcador (Romano *et al.* 2003; Yao *et al.* 2006). Esta estrategia sólo es convenientemente aplicable para plantas con ciclos cortos de propagación. En el caso del maíz, una aproximación de este tipo requeriría mucho tiempo para llevarse a cabo.

La nueva generación de plantas modificadas por los métodos cisgénicos, ha comenzado ya a producir una gran cantidad de solicitudes de patentes para diferentes universidades o compañías en cultivos de interés comercial con la finalidad de proteger su propiedad intelectual. Actualmente se desarrollan cultivos cisgénicos y / o intragénicos como alfalfa (Weeks *et al.* 2008), manzana (Chizzali *et al.* 2016; Joshi *et al.* 2011), plátano (Mlalazi *et al.* 2012), cebada (Holme *et al.* 2012), papa (Chawla *et al.* 2012; Rommens *et al.* 2008), fresa (Schaart *et al.* 2004) y trigo (Gadaleta *et al.* 2008) entre otros (Cardi 2016; Holme *et al.* 2013). Considerando la importancia que tiene el cultivo del maíz para nuestro país y con el ánimo de preservar la riqueza del germoplasma del maíz mexicano, resulta de suma importancia impulsar el desarrollo y la protección intelectual de procedimientos de modificación genética basados en estas tecnologías emergentes que se apoyan en los desarrollos agrícolas convencionales, al mismo tiempo que se benefician del uso de la ingeniería genética moderna.

- Sobreexpresión de Rubisco activasa (Rca) y su relación con el mejoramiento del maíz

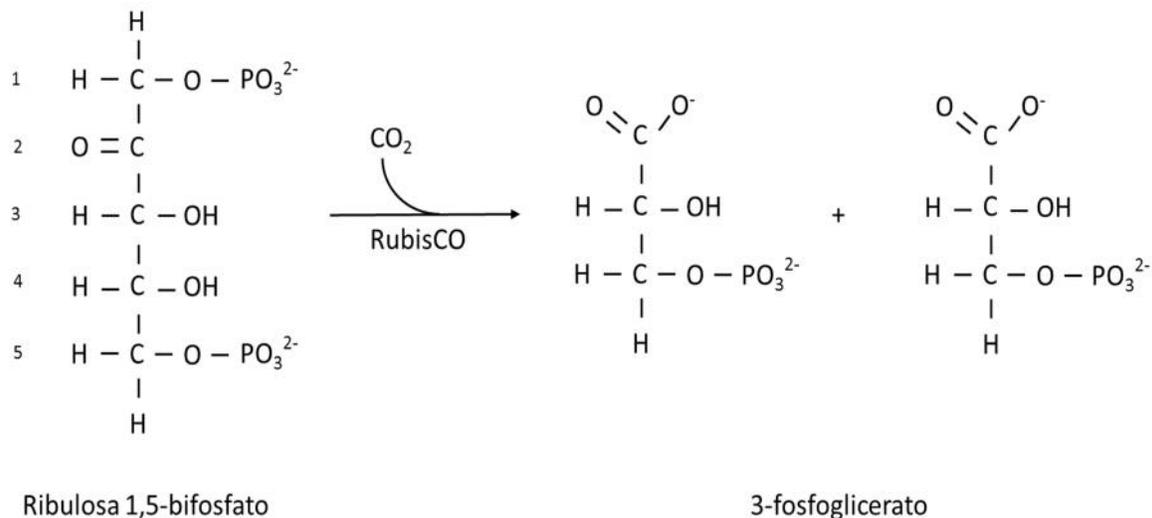
El mejoramiento de sistemas vegetales basado en la ingeniería genética requiere el conocimiento *a priori* de los genes que se busca modificar. Conocer los genes responsables de un fenotipo específico no es una tarea fácil, sin embargo, actualmente se conoce y dispone del genoma completo de muchas plantas y existe gran cantidad de información de experimentación biológica disponible en la literatura científica que puede agilizar enormemente la búsqueda. En el caso particular del maíz, México cuenta con un sin fin de variedades autóctonas desarrolladas a lo largo de muchos años de experimentación agrícola, las cuales están adaptadas a diferentes condiciones climáticas y/o de crecimiento. Esta riqueza de fenotipos de maíz ofrece sin duda un abanico de posibilidades para analizar cuales diferencias en la expresión genética de los fenotipos son responsables de sus muy características y peculiares formas de adaptación y/o crecimiento.

En 1999 la Facultad de Química en colaboración con el Colegio de Postgraduados (Montecillo, Edo. de México) inició una investigación que entre varios objetivos incluía la cuantificación de la proteína rubisco activasa (Rca) en cultivares de maíz variedad Zacatecas generados a lo largo de 23 ciclos de mejoramiento genético orientado a producir mayor rendimiento.  $Z_0$  fue el cultivo original de maíz y  $Z_{23}$  fue el cultivo obtenido luego de 23 ciclos de selección agrícola. Dichos cultivares se generaron a través del método “Selección Masal Visual Estratificada” que consiste en seleccionar por tamaño y apariencia las mazorcas de maíz, para después sembrar de forma organizada el 5% de los granos elegidos en cada ciclo agrícola (Molina 1983). Los resultados -al analizar 300 plantas por cada cultivar de entre un total de 2000 maíces sembrados bajo irrigación en un diseño experimental de bloques al azar- demostraron que la capacidad fotosintética y el rendimiento de las plantas de maíz  $Z_{23}$ , así como la actividad y la cantidad de Rca incrementaron con los ciclos de mejoramiento (Morales *et al.* 1999). Con dicho trabajo se confirmó la asociación que existe entre el incremento de la expresión de Rca y el aumento del rendimiento del maíz. Los resultados son congruentes con otras investigaciones que señalan a esta proteína como blanco para mejorar la capacidad fotosintética de las plantas (Thieulin-Pardo *et al.* 2015; Yamori *et al.* 2012).

- Función de Rubisco activasa (Rca)

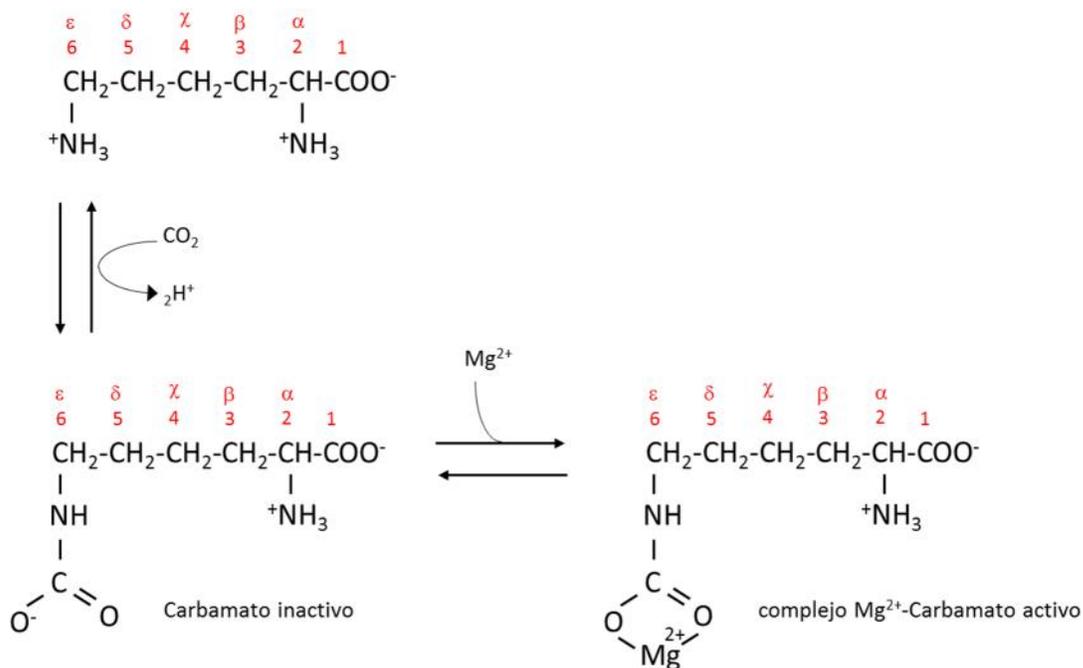
Se conoce que la fotosíntesis es el proceso a través del cual las plantas acumulan biomasa por la conversión de carbono inorgánico a carbohidratos usando energía luminosa. El proceso fotosintético completo está altamente regulado, sin embargo, el comienzo de la síntesis de carbohidratos determina en gran medida la capacidad fotosintética de una planta (Singh *et al.* 2014). La síntesis de los carbohidratos o fase oscura de la fotosíntesis se

conoce con distintos nombres, el más famoso es ciclo de Calvin (Benson 2002) . El comienzo del ciclo de Calvin es la fase de carboxilación (ver figura 1). Durante esta etapa la enzima Ribulosa 1,5-bisfosfato Carboxilasa / Oxigenasa, abreviada como RubisCO reacciona con el bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) para combinarlo con una molécula de ribulosa 1,5-bifosfato (RuBP) y generar 2 moléculas de 3-fosfoglicerato (Carmo-Silva *et al.* 2015). Esta fase es el punto limitante de la fijación fotosintética debido a que la enzima RubisCO opera de forma ineficiente, en gran parte, porque es bifuncional: tiene la capacidad tanto de carboxilar como de oxigenar a su sustrato ribulosa 1,5 bifosfato. Aunque la RubisCO reacciona más fácilmente con el bióxido de carbono que con el oxígeno, la velocidad de oxigenación es mayor debido a que en el aire la concentración del oxígeno es superior (21%) a la del bióxido de carbono (0.035%) (Stewart 2012). Por ello, la carboxilación mediada por RubisCO es tan lenta, que aún en condiciones saturantes de sustrato reaccionan sólo de 2 a 3 moléculas de CO<sub>2</sub> y ribulosa 1,5 bifosfato por segundo por sitio catalítico de RubisCO (Peterhansel y Offermann 2012). Estas características de la enzima RubisCO hacen que, bajo las condiciones atmosféricas actuales, la función carboxilasa opere a un nivel muy por debajo de su máximo potencial. Para subsanar este inconveniente, las plantas usan alrededor del 50% del nitrógeno de sus hojas tan sólo para llevar a cabo la síntesis de RubisCO, asegurando con ello que el incremento del contenido celular de RubisCO favorezca la posibilidad de que ocurra la carboxilación. El resultado es que esta proteína es la más abundante de los tejidos vegetales e inclusive hay quienes consideran que es la proteína más abundante de la tierra (Raven 2013).



**Figura 1.** Reacción de carboxilación mediada por la enzima RubisCO al inicio del ciclo de Calvin

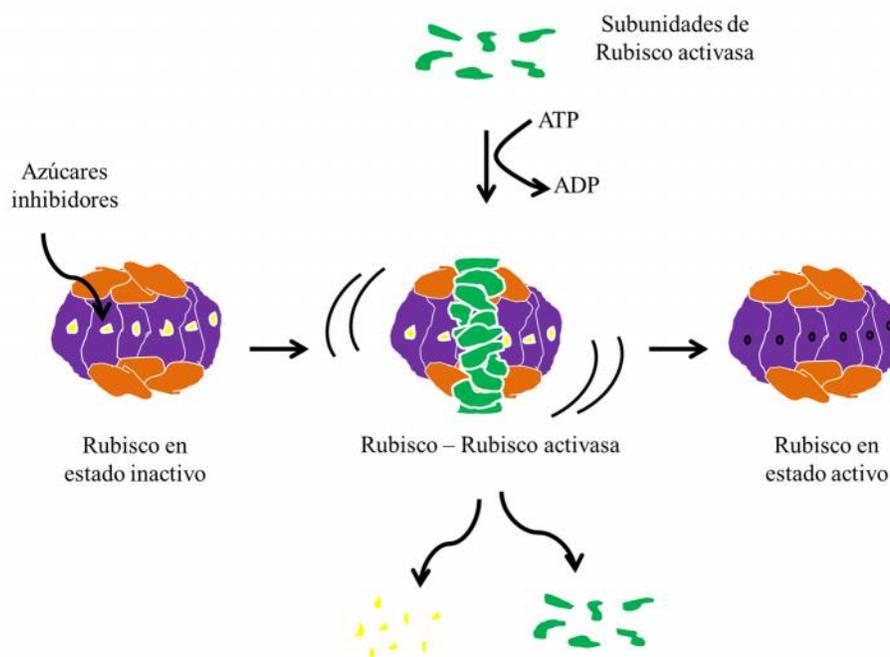
Sin embargo, aunque la concentración de RubisCO en los tejidos verdes es muy abundante, no todas las moléculas de RubisCO de una planta están funcionando (Sage y Khoshravesh 2016). La enzima RubisCO en las plantas superiores se compone de 16 subunidades, ocho copias de una proteína grande de alrededor de 55 KDa (*Large subunit, LS*) y ocho copias de una proteína pequeña de aproximadamente 15 KDa (*Small subunit SS*) (Berry *et al.* 2016). Todas las subunidades grandes contienen una lisina en su sitio activo cuyo grupo  $\epsilon$ -amino reacciona con una molécula de  $\text{CO}_2$  para formar un carbamato al cual se une un ión  $\text{Mg}^{2+}$  (ver figura 2). Dicha reacción de carbamilación es un pre-requisito indispensable para incorporar la molécula de  $\text{CO}_2$  que se integrará al ciclo de Calvin (Carmo-Silva *et al.* 2015). La forma inactiva de RubisCO puede unirse fuertemente al sustrato RuBP o a otros azúcares ocasionando el bloqueo de sus sitios activos y por lo tanto impidiendo su función. La reactivación de la configuración inactiva de RubisCO requiere ATP y la intervención de la proteína Rubisco activasa (Rca) para facilitar la liberación de las moléculas inhibitoras de los sitios activos de Rubisco haciéndola disponible para llevar a cabo su reacción catalítica (Portis *et al.* 2008; Portis 2003). Es importante aclarar que la molécula de  $\text{CO}_2$  que se une como carbamato es diferente a la molécula de  $\text{CO}_2$  que funciona como sustrato de la reacción de carboxilación de RubisCO.



**Figura 2.** La enzima RubisCO se activa por la carbamilación de un residuo de lisina

La función de Rca como promotora de la actividad de Rubisco mediante el incremento de los niveles de carbamilación fue conocida desde 1986 (revisado en Portis 2003). Sin embargo no fue sino hasta 1995 cuando se identificó que Rca no mostraba una cinética de enzima convencional y se postuló como chaperona molecular (Sánchez *et al.* 1995). Esto fue confirmado cuando se clasificó a Rca como integrante de la familia de proteínas llamadas AAA<sup>+</sup> (*ATPases associated with diverse cellular activities*), las cuales comparten la presencia de motivos y plegamientos tridimensionales específicos. Las proteínas AAA<sup>+</sup> actúan típicamente como disociadores de estructuras macromoleculares complejas y algunas como Rca exhiben una actividad de chaperonas previniendo la agregación de proteínas desnaturalizadas o en algunos casos reconstituyendo sus plegamientos funcionales (Portis 2003). Las chaperonas moleculares como su nombre lo indica, son acompañantes de otras moléculas y su presencia funcional asegura el plegamiento correcto entre las moléculas involucradas en la reacción.

Todas las plantas estudiadas hasta ahora contienen Rubisco activasa, su funcionamiento requiere la unión de dos subunidades independientes que requieren hidrolizar ATP para auto-asociarse (ver figura 3). Se sabe que varias subunidades de Rubisco activasa se agrupan formando una estructura de anillo que rodea a la enzima RubisCO con la finalidad de inducir el cambio de conformación tridimensional que requiere para activar sus sitios catalíticos (Hasse *et al.* 2015).



**Figura 3.** Mecanismo descrito para la activación de Rubisco por Rubisco activasa

La capacidad de Rca para promover el mejoramiento de la fijación de CO<sub>2</sub> ha sido documentada en diferentes trabajos y por ello se ha convertido en blanco de investigaciones encaminadas a mejorar la capacidad fotosintética de las plantas tanto para aumentar su rendimiento como para mejorar la adaptación de los sistemas vegetales en condiciones climáticas adversas (Thieulin-Pardo *et al.* 2015; Kurek *et al.* 2007; Sage *et al.* 2008; Salvucci *et al.* 2006). Recientemente se demostró en plantas transgénicas de arroz sobreexpresantes de Rca (Yamori *et al.* 2012), que el aumento de la cantidad de Rca brinda a la planta una capacidad de adaptación más rápida en condiciones cambiantes de luz y temperatura tal como las que ocurren normalmente en los cultivos sembrados fuera de un invernadero. Estos experimentos contribuyen a describir el papel de Rca durante la fotosíntesis en condiciones meteorológicas naturalmente cambiantes y abren una ventana de posibilidades para mejorar la adaptación de cultivos de interés comercial y alimentario en condiciones ambientales adversas. Otros trabajos de investigación en los que se utilizaron RNAs antisentido para disminuir los niveles de Rca en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, tabaco y *Flaveria bidentis* sometidas a estrés por calor (Salvucci *et al.* 2006; Mate *et al.* 1993; von Caemmerer *et al.* 2005) demostraron en cada caso que las plantas transgénicas con cantidades drásticamente menores de Rca tienen bajas velocidades de fotosíntesis aún a elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub>. También se ha proyectado que una proteína Rca termoestable puede mejorar la fotosíntesis bajo estrés térmico. Kurek y colaboradores en el año 2007 generaron diferentes variantes de *Arabidopsis thaliana* con la inclusión de una isoforma de Rca termoestablemente mejorada con la tecnología “gene shuffling” -consiste en seleccionar continuamente combinaciones azarosas de un conjunto de secuencias escogidas de DNA que dan como resultado la expresión mejorada de una proteína de interés-. Los resultados demostraron que la variante mejorada exhibió altas velocidades de fotosíntesis e incrementó la biomasa y el rendimiento de las semillas (Kurek *et al.* 2007). El maíz como planta C<sub>4</sub>, posee características fisiológicas que la adaptan a climas más calurosos por lo cual la termoestabilidad de Rca en maíz no es considerada como factor limitante de la actividad chaperona, inclusive se ha demostrado con ensayos en los que se midió la incorporación de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, que la incubación de RubisCO con Rca impulsa la recuperación de la actividad enzimática de RubisCO después de someterse a estrés por calor (Sánchez *et al.* 1995). La regeneración del sustrato de la enzima RubisCO es también uno de los factores determinantes de la eficiencia de la fotosíntesis, pero el mejoramiento de la actividad chaperona de Rca es sin duda el mecanismo más prometedor en cuanto al incremento en la fijación del CO<sub>2</sub> atmosférico por las plantas (Sage *et al.* 2008).

- Expresión de Rubisco activasa (Rca) en maíz

La caracterización de la expresión de Rca en diferentes plantas indica que Rca se expresa como isoformas  $\alpha$  y/o  $\beta$ . Dependiendo de la especie, existe variación en cuanto a la expresión de dichas isoformas así como en el número de genes que las codifican. Por ejemplo espinaca, arroz y *Arabidopsis* expresan las dos isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  a partir del splicing alternativo de un solo gen de Rca. Mientras que la cebada y el algodón expresan las dos isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ , pero codificadas a partir de diferentes genes (Carmo-Silva y Salvucci 2013). Las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  difieren principalmente en su extremo carboxilo. Comparada con  $\beta$ , la isoforma  $\alpha$  tiene una extensión en el extremo terminal carboxilo que contiene residuos de cisteína sensibles al estado redox. Ambas isoformas tienen la capacidad de activar independientemente a RubisCO pero con diferentes actividades máximas, siendo la isoforma  $\beta$  la que parece estar presente en todas las especies estudiadas, mientras que se cree que la isoforma  $\alpha$  está ausente en algunas especies de plantas (Portis 2003).

En maíz existen diferentes genes que codifican a Rubisco activasa. En un principio se caracterizaron los genes Zmrca 1 (1.4 kb) [GenBank AF084478] y Zmrca 2 (1.8 kb) [GenBank AF305876]. Ayala y colaboradores demostraron que ambos genes tienen idéntica secuencia de nucleótidos en la región codificante y la expresión de cada uno produce el polipéptido  $\beta$  de aproximadamente 381 aminoácidos y masa molecular de alrededor de 43 KDa de acuerdo a un análisis de similitud con otras secuencias de Rca descritas previamente (Ayala-Ochoa *et al.* 2004). La localización frecuente de una subunidad pequeña de 41 KDa en el maíz se explica en términos de un mecanismo de regulación post-traduccional en el que se ha implicado a una proteasa no identificada que corta al polipéptido de 43 KDa en su región N-amino terminal (Vargas-Suárez *et al.* 2004), aunque se desconoce la funcionalidad de dicho mecanismo. El hallazgo del gen que codifica la isoforma  $\beta$  se confirmó y se extendió en un estudio posterior mediante el escrutinio de bases de datos genómicos con el cual se reveló adicionalmente la existencia del gen que codifica la isoforma  $\alpha$  en el genoma del maíz. El análisis de electroforesis y MALDI TOF –técnica de ionización usada en espectrometría de masas- mostraron que los genes  $\alpha$  y  $\beta$  codifican a dos polipéptidos de 46 y 43 KDa respectivamente, aunque se desconocen más aspectos relacionados con la expresión de la isoforma  $\alpha$  en el maíz.

La caracterización de la expresión de los genes Zmrca 1 y Zmrca 2 Rca en maíz, demostró que el patrón de expresión de sus mRNAs sigue cambios específicos durante el ciclo día/noche mostrando mayor acumulación durante la mañana (Ayala-Ochoa *et al.* 2004), mientras que los niveles de la proteína Rca permanecen estables durante el día, pero aumentan durante la etapa de llenado de grano del maíz, mostrando una correlación positiva con el rendimiento del grano (Yin *et al.* 2014; Morales *et al.* 1999). Ayala y colaboradores reportaron que los genes Zmrca 1 y Zmrca 2 se distinguen entre sí por la longitud y la secuencia de su región 3' no traducible (3' UTR). En ésta se ha encontrado un diferente número de motivos llamados "DST like" (Ayala-Ochoa *et al.* 2004). Los elementos DST son secuencias características localizadas río abajo de la secuencia traducible de

algunos mRNAs -de ahí su nombre en inglés *downstream elements*-. Originalmente fueron analizados en un modelo de transcritos modificados de tabaco con el cual se comprobó que la multimerización e inserción de elementos DST confieren inestabilidad a los mensajes que los contienen, ocasionando disminución notable de su vida media. Los elementos DST constan de tres regiones características altamente conservadas clasificadas como subdominios I, II y III, separadas entre sí por dos regiones variables (Gil y Green 1996). Cada uno de los transcritos de Rca  $\beta$  en maíz, Zmrca 1 y Zmrca 2, poseen una copia de los subdominios DST like I y II, pero sólo el gen Zmrca 2 cuenta adicionalmente con dos subdominios DST like III (Ayala *et al.* 2004). La presencia de la señal de inestabilidad de los elementos DST like encontrados en los genes de Rca  $\beta$  del maíz, se relaciona con el patrón de cambios en la abundancia de sus transcritos durante el ciclo día/noche (Ayala-Ochoa *et al.* 2004).

---

## HIPÓTESIS

“Las plantas isogénicas de maíz, sobreexpresantes de Rca (isoforma  $\beta$ ), obtenidas por ingeniería genética, serán similares a aquellas plantas también sobreexpresantes de Rca, obtenidas a través de ciclos de mejoramiento agronómico tradicional tanto a nivel de expresión de Rca como en integridad de su DNA”

---

## OBJETIVO GENERAL

De acuerdo con los antecedentes anteriormente descritos, el objetivo de esta tesis es sobreexpresar a la proteína Rubisco activasa en plantas de maíz usando técnicas de DNA recombinante de un modo alternativo que resulte compatible con la conservación de la integridad del genoma del maíz, al tiempo que se busca impartir un rasgo de mejoramiento agronómico no transgénico.

Con la finalidad de diferenciar de otros desarrollos similares basados en la sobreexpresión de intragenes y con base en las diferencias técnicas durante el procedimiento de sobreexpresión. La propuesta de mejoramiento que aquí se describe se denomina método isogénico.

## Objetivos particulares

1. Obtener plantas isogénicas de maíz que sobreexpresen a la proteína Rca, usando secuencias provenientes del genoma del maíz.
2. Comparar la sobreexpresión isogénica de Rca con la sobreexpresión transgénica de Rca.
3. Cultivar y analizar plantas de maíz con alto contenido de Rca, generadas por un método convencional de mejoramiento agronómico con la finalidad de usarlas como control de comparación con el método isogénico aquí propuesto.
4. Comparar la expresión de Rca entre plantas: 1) isogénicas, 2) transgénicas, y 3) plantas obtenidas por mejoramiento agronómico.

---

# MATERIALES Y MÉTODOS

- Material biológico

Para obtener las plantas isogénicas y transgénicas sobreexpresantes de Rca se utilizaron callos embriogénicos formados a partir de embriones inmaduros de maíz, cosechados a los 15 a 18 días después del periodo de floración (Garrocho-Villegas *et al.* 2012). Éstos se obtuvieron del maíz raza Tuxpeño, variedad Costeño, proporcionado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP, campo experimental Zacatepec Morelos. Cuando se indique, debido a la falta de plantas sin transformar regeneradas a partir del sistema de callos embriogénicos, se utilizaron semillas de la misma variedad de maíz (raza Tuxpeño, variedad Costeño) para sembrar plantas que fueron analizadas como controles. Las plantas transgénicas de este ensayo estuvieron sembradas en instalaciones con la contención requerida por la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM 2005).

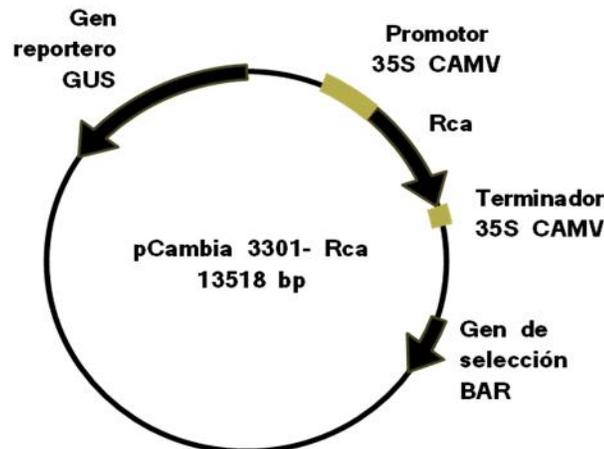
Por otra parte, las plantas de maíz con mayor contenido de Rca conseguidas por métodos de selección agronómica clásica se obtuvieron sembrando semillas de maíz Cónico Norteño, variedad Zacatecas 58, de los cultivares Z<sub>0</sub> y Z<sub>23</sub> que corresponden según el sufijo al número de ciclos empleados para el mejoramiento agrícola. Las semillas fueron amablemente proporcionadas por el Dr. José Molina Galán del Colegio de Postgraduados COLPOS, Campus Montecillo, Edo. de México.

- Sobreexpresión transgénica de Rca

- *Diseño de construcción transgénica*

La construcción transgénica empleada para sobreexpresar Rca consta de un vector circular binario de 13518 bp nombrado pCambia 3301-Rca. En la figura 4 se muestra el esquema de este vector con el cassette de expresión transgénico compuesto por: secuencia promotora del virus del mosaico de la coliflor CaMV (678 bp), secuencia codificante de Rca (isoforma  $\beta$ ) con su señal peptídica de entrada al cloroplasto (1302) y el terminador CaMV (226 bp). También contiene pares de bases que corresponden a sitios de corte con enzimas de restricción para facilitar su clonación. El vector completo contiene la secuencia del gen BAR proveniente de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* el cual codifica a la proteína

fosfinotricina acetil transferasa que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio en las plantas transformadas con este vector. También contiene al gen *gusA* que codifica para la proteína  $\beta$ -glucoronidasa en la bacteria *Escherichia coli*, así como al gen que codifica a la proteína aminoglucósido 3 fosfotransferasa de resistencia a kanamicina para la selección bacteriana del plásmido durante su replicación *In vitro*.



**Figura 4.** Representación esquemática del vector diseñado para la sobreexpresión transgénica de Rca en plantas de maíz.

#### ○ Obtención de vector transgénico

El cassette de sobreexpresión transgénico se subclonó en el vector circular binario llamado pCambia 3301. Para clonar el cassette de sobreexpresión se aislaron por separado cuatro secuencias: región codificante de Rca (isoforma  $\beta$ ) con sitios de clonación *EcoRI* – *BamHI* (1311 bp), promotor viral 35S CAMV con sitios *HindIII* – *EcoRI* (678 bp), terminador viral 35S CAMV con sitios *BamHI* – *Pst I* (226 bp) y vector pCambia 3301 vacío, linearizado *HindIII* – *Pst I* (11303 bp).

Para obtener la secuencia Rca, fue necesario clonarla previamente en el vector para productos de PCR: pTZ57R/T. Para lograrlo, se extrajo RNA total a partir de hojas de maíz siguiendo el protocolo que adjunta el fabricante del reactivo Trizol. El RNA obtenido se trató con DNasa Turbo Free (Ambion) para eliminar DNA contaminante mezclando: 10  $\mu$ g de RNA, 2 U de DNasa Turbo Free, 1  $\mu$ L del Buffer 10X que acompaña a la enzima y H<sub>2</sub>O c.b.p. 50  $\mu$ L. La mezcla se incubó 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 10000 X *g* / 1.5 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo para recuperar el RNA. Se diluyeron 2  $\mu$ L del RNA en 98  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O en una celda de cuarzo para medir espectrofotométricamente la concentración final de RNA. Posteriormente, a partir del RNA se amplificó la región codificante de Rca usando los oligonucleótidos descritos en la tabla 1. Las secuencias de los primers incluyen sitios de corte para diferentes enzimas de restricción. La reacción para

amplificar la región codificante de Rca se hizo por síntesis de cDNA con el kit SuperScript One-Step RT-PCR Platinum Taq, mezclando 25  $\mu$ L del buffer 2X Reaction Mix, 0.4  $\mu$ g de RNA, 2  $\mu$ L de la mezcla 10  $\mu$ M de primers, 1  $\mu$ L de la enzima RT-Platinum y H<sub>2</sub>O c.b.p. 50  $\mu$ L. Las condiciones de la reacción fueron: síntesis de cDNA a 55°C/30 min, pre-desnaturalización a 94°C/2 min, 35 ciclos de amplificación: 94°C/15s (desnaturalización), 60°C/30s (alineamiento), 72°C/1.5 min (extensión) y ciclo final de extensión a 72°C/10 min. Como controles se incluyeron reacción de RT-PCR sin RNA y con RNA sin tratamiento con DNAsa. Como control positivo se amplificó el factor traduccional eEF1 $\alpha$  y el gen ribosomal 18S (secuencia de los oligos 18S en tabla 4). El producto de la amplificación se clonó con el InstAclon PCR Cloning Kit Fermentas, siguiendo el protocolo de ligación que adjunta el fabricante. Células quimio-competentes de *E. Coli* cepa DH5 $\alpha$  fueron transformadas con el vector pTZ57R/T – Rca y seleccionadas por su resistencia a ampicilina, tal como se describe en el protocolo “Transformación de células químicamente competentes” y en “Análisis de transformantes”. Posteriormente, el plásmido se amplificó y se concentró siguiendo la metodología “Extracción de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep)”. Después, a partir del plásmido pTZ57R/T – Rca, la secuencia codificante de Rca se obtuvo cortando con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* para aislar un fragmento de 1311 bp.

Nombre de oligos	Gen Núm acceso GenBank	Amplicón (bp)	Secuencia	Localización
ORFRca	ZmRca1 AF305876.3	1331	Forward: 5'- CCGAGAATTCATGGCGGCCCTT CTCCT C -3'	Región codificante
			Reverse: 5'- CCG TAA GCT TGG ATC CTT ACT ACT TGA AGA AGG AGC CAG TCT T - 3'	
eEF1 $\alpha$	ZmEF1-A NM_001112117	243	Forward: 5'- CACATCAACATTGTGGTCATTGG - 3'	Región codificante
			Reverse: 5'- GCAGTAGTACTTGGTGGTCTC -3'	

**Tabla 1.** Oligonucleótidos usados para amplificar la región codificante del gen Rca. eEF1 $\alpha$  fue usado como control positivo.

Por otra parte, las secuencias del promotor y el terminador viral CAMV 35S se prepararon a partir del plásmido nombrado pUC35S-2X (3572 pb). Para ello, primero se concentró al plásmido pUC pss siguiendo el protocolo descrito en “Extracción de DNA plasmídico a

pequeña escala (miniprep)". Posteriormente, se hicieron reacciones de digestión enzimática para aislar las dos secuencias de interés. En el caso del promotor, éste se obtuvo cortando con las enzimas *HindIII* y *EcoRI* generando un fragmento de 678 bp, mientras que el terminador se obtuvo empleando las enzimas *BamHI* y *PstI*, generando un fragmento de 226 bp.

El plásmido pCambia 3301 fue amplificado y concentrado siguiendo el protocolo "Extracción de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep)" y después se digirió con las enzimas *HindIII* y *PstI* para obtener la secuencia lineal de 11303 bp. Todas las enzimas empleadas, tanto para el aislamiento de Rca a partir del plásmido pTZ57R/T – Rca como para la obtención del promotor y el terminador así como para linearizar el plásmido pCambia 3301 fueron de la marca Fermentas. En cada caso se consultó la carta de condiciones de reacción del proveedor para usar el buffer de reacción más adecuado y la cantidad de cada enzima para realizar digestiones dobles. Todas las reacciones de restricción se incubaron de 2 a 16 h a 37° C. El resultado de cada reacción se visualizó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y luego, a partir de los geles de agarosa se aisló cada secuencia de DNA empleando el kit Pure Link Hi Pure Plasmid de LG. En resumen después de extraer, a partir del gel de agarosa, cada uno de los cuatro fragmentos de DNA (Rca 1311 bp, promotor 678 bp, terminador 226 bp y vector 11303 bp) con los sitios de clonación indicados, se revisó el resultado de la extracción en un nuevo gel de agarosa, con la finalidad de asegurar que se contaba con cada uno de los fragmentos a clonar. Una vez que se observaron los cuatro fragmentos aislados se realizó la reacción de ligación, usando la enzima T4 DNA ligasa de Fermentas. Como resultado, se obtuvo el vector pCambia3301 – Rca (13518 bp), con el cual se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ , mismas que se analizaron tal como se describe en el apartado "Análisis de transformantes". Finalmente, con el objetivo de conocer si se clonó correctamente el cassette transgénico en el vector pCambia 3301 - Rca, se secuenció parte del mismo mediante la amplificación selectiva de diferentes partes del cassette. Para ello se diseñaron distintos pares de oligonucleótidos dispuestos a lo largo de la secuencia del cassette de sobreexpresión. La secuencia de los cebadores se describe en la tabla 2. Las reacciones de secuenciación capilar fueron realizadas en el Instituto de Fisiología de la UNAM y corroboradas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. El análisis de las secuencias se realizó por alineamientos de secuencias múltiples, usando como referencia la secuencia del cassette.

Nombre de oligos	Secuencia	Localización de la secuenciación
Fw 3SS	5'- GATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACG -3'	Promotor 35S CAMV - Región codificante Rca
Fw 1	5'-CACCATGGCGGCCGCCTTCTCCTC -3'	Región codificante Rca
Fw 2	5'- CACCCACGTCGCCGTGCTCAGCTC-3'	Región codificante Rca
Fw 3	5'-CAAGCTCATCAGGCAGCGCTACC -3'	Región codificante Rca
Fw 4	5'-GGACCGCATCGGCGTCTGCAAG -3'	Región codificante Rca – terminador 35S CAMV
Fw 5	5'-ACGTTCGAGCAGCCCAAGATAACG-3'	Región codificante Rca – terminador 35S CAMV

**Tabla 2.** Oligonucleótidos usados para secuenciar el cassette de sobreexpresión en la construcción transgénica pCambia 3301 - Rca.

○ *Transformación de maíz con cassette transgénico*

El procedimiento se realizó de acuerdo a los protocolos descritos más adelante en “Transformación de callos embriogénicos de maíz por biobalística”. La formulación de los medios de cultivo usados durante la transformación y la regeneración de las plantas de maíz se basó en los medios estándar descritos por Garrocho-Villegas *et al.*, 2012. Se emplearon 30 cajas Petri con medio N<sub>6</sub>P suplementado con 3.5 g/L de gellan (Sigma) y 0.3 g de callos embriogénicos en cada una de ellas. 20 cajas fueron bombardeadas con el vector pCambia3301 – Rca, 5 cajas con el vector pCambia 3301 vacío (sin el cassette de sobreexpresión de Rca) y 5 con las balas sin DNA. Veinticuatro horas después del bombardeo los callos fueron transferidos a medio N<sub>6</sub>P con la concentración regularmente usada de gellan [2.5 g/L] (Garrocho-Villegas *et al.* 2012). Los callos se mantuvieron durante una semana a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad para minimizar el efecto de estrés que ocasiona el proceso de biobalística en las células. A continuación del periodo de recuperación, los callos fueron subcultivados en tres ocasiones cada 15 a 20 días, en medio de cultivo N<sub>6</sub>P suplementado con glufosinato de amonio (reactivo Basta, Sigma, ingrediente activo: glufosinato de amonio) 3 mg/L y sin prolina para permitir la proliferación selectiva de los callos embriogénicos. La regeneración de las plantas se logró con 3 subcultivos más realizados cada 15 a 25 días en el medio de cultivo N<sub>6</sub>P suplementado con 3 mg /L del herbicida Basta con disminución gradual de las auxinas del medio - a 50%, 25% y 0%-. Después de este periodo, los explantes fueron transferidos a medio MS con el reactivo Basta disminuido a 1.5 mg/L. Las plantas regeneradas se mantuvieron en medio de cultivo MS enriquecido con 1 mg/L de ácido indol butírico para favorecer el enraizamiento

de las plantas. Durante esta etapa los subcultivos se realizaron cada 25 a 35 días en frascos de vidrio de diferentes alturas -dependiendo del crecimiento de las plantas- siempre buscando aislar el mayor número de plántulas. Finalmente, cuando las plantas desarrollaron alrededor de 7 cm de raíz primaria fueron sembradas en sustrato orgánico mezcla Sunshine No 3 dentro de envases de 0.5 a 1 L de capacidad. Cada envase se cubrió con una bolsa de plástico o con un vaso transparente con la finalidad de permitir el paso de la luz, al mismo tiempo que se mantenía un ambiente húmedo y cerrado. De esta forma, las plantas regeneradas se mantuvieron en el invernadero con temperaturas entre 25° a 35 ° C y con fotoperiodos de luz/oscuridad de 12 h. Posteriormente las plantas fueron revisadas diariamente y paulatinamente se fueron haciendo agujeros en las tapas que las cubrían hasta retirar por completo la cubierta.

o *Identificación de plantas transgénicas de maíz*

Las plantas transgénicas de maíz se identificaron mediante experimentos de PCR punto final diseñados para detectar al gen reportero del vector pCambia 3301: *gusA*. El resultado se visualizó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. En la tabla 3 se describen los oligonucleótidos usados para realizar las amplificaciones del transgen. Para realizar las reacciones de amplificación se aisló DNA genómico de diferentes plantas regeneradas, así como de plantas control sembradas a partir de semillas de la misma variedad de maíz con la que se generaron los callos embriogénicos. El protocolo de extracción de DNA se detalla en el apartado “Extracción de DNA genómico a partir de hoja de maíz”. La PCR se realizó mediante condiciones estándar de la enzima Taq polimerasa Kapa 3G. El gen del RNA ribosomal 18S se usó como control interno de la amplificación, (los oligos de este control se describen en la tabla 4).

	<b>Amplicón (bp)</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Localización</b>
<i>gusA</i>	1365	Forward: 5'- GCCGATGTCACGCCGTATGTTATTG -3' Reverse: 5'- GATCCCTTTCTTGTTACCGCCAACG -3'	<i>Región codificante de gusA en el vector pCambia 3301</i>

**Tabla 3.** Oligonucleótidos usados para identificar a las plantas transgénicas sobreexpresantes de Rca.

○ *Análisis de la expresión de Rca en plantas transgénicas*

Proteína

La cantidad de Rca en cada planta transgénica se determinó por triplicado con experimentos tipo Western blot usando el anticuerpo contra Rca de la marca Agrisera dilución 1:20000 y el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa, también en dilución 1:20000. Para ello se siguió el protocolo reportado por Yamori y von Caemmerer 2011. Se recolectaron muestras de 1 cm<sup>2</sup> de las hojas inmediatas superiores al fruto -tanto de las plantas transgénicas identificadas, como de las plantas control provenientes de la siembra de semillas- ambas durante la etapa de floración. Los extractos de proteína total se separaron en geles de poliacrilamida al 12% a 55 V durante los primeros 25 min y a 95 V durante el tiempo restante hasta lograr la separación óptima de las proteínas situadas en el intervalo de 30 a 50 kDa. Se realizaron geles con 5 µg de proteína total de cada planta transgénica obtenida, mientras que para los controles se usaron 5 µg y 10 µg de los extractos de proteína total. Como control de carga se verificó el contenido de la subunidad grande de Rubisco (≈ 55 KDa) mediante tinción (Azul de coomassie) de una réplica de cada gel. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas PVDF durante 1h a 100 V en un sistema de transferencia húmeda. La cuantificación relativa de la proteína Rca en las plantas transgénicas se estimó mediante la comparación de los valores de densitometría (unidades densitométricas / área) de la señal inmunoquímica con respecto a las plantas control.

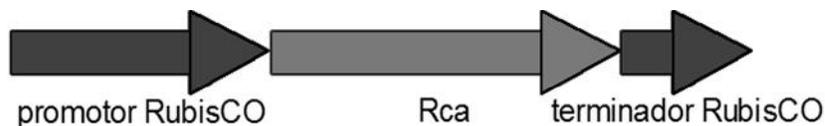
○ *Análisis del fenotipo de plantas transgénicas*

Se evaluó el efecto de la sobreexpresión de Rca en 9 plantas transgénicas de maíz registrando los datos de altura, diámetro basal y número de hojas durante su desarrollo. Para ello se midió la longitud alcanzada por cada planta desde su base hasta el nudo que marca la última hoja. El diámetro basal de los tallos se midió en el punto medio entre la base de la planta al primer nudo. También se midieron la longitud y el área de la hoja encontrada inmediatamente arriba del fruto tanto en las plantas transgénicas como en las plantas control cuando ambos tipos de plantas se encontraban en la etapa de polinización. Por otra parte, se determinó el peso, el rendimiento y el número de hileras de granos por mazorca. Adicionalmente, se midió el intercambio de CO<sub>2</sub> (µmol CO<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>s) en función de la temperatura en la misma hoja de tres plantas sobreexpresantes de Rca y de plantas control obtenidas a partir de callos embriogénicos bombardeados con el vector vacío. Para ello se usó un equipo IRGA (Infra Red Gas Analyzer), en un sistema abierto (concentración de CO<sub>2</sub> ambiental) con irradiación constante y con incrementos de temperatura. El equipo IRGA permite hacer mediciones de fotosíntesis basadas en la diferencia de CO<sub>2</sub> del aire que pasa a través de una hoja. El equipo IRGA fue amablemente prestado por el Dr. Elías Paredes y la M. en C. Josefina Vázquez, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Edo. de México. El análisis estadístico de los resultados se hizo mediante la prueba t de student para muestras independientes considerando P=0.05

- Sobreexpresión isogénica de Rca

- *Diseño de construcción isogénica*

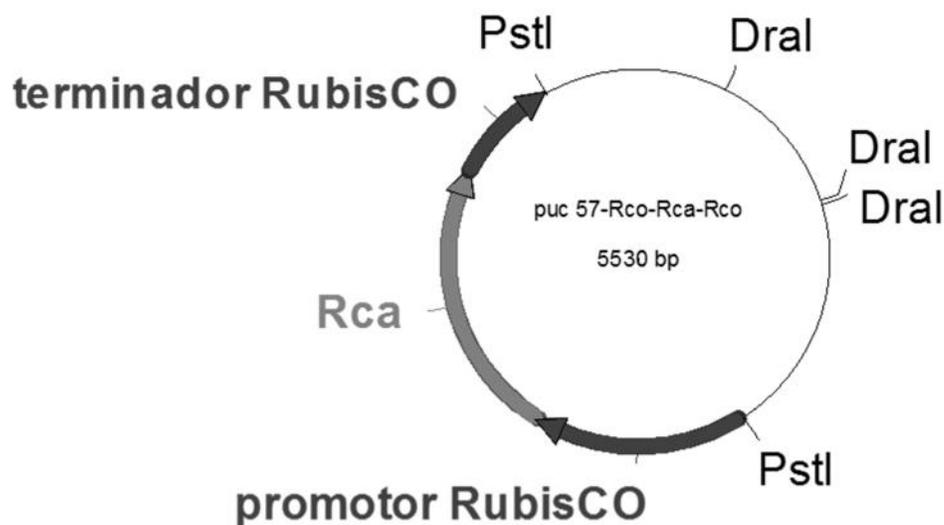
La construcción isogénica es un cassette lineal (2827 bp) de secuencias nucleotídicas del genoma del maíz que contiene: secuencia promotora del gen ZmRBSC-m3 que codifica a la subunidad pequeña de RubisCO (969 bp), secuencia codificante del gen de Rubisco activasa ZmRca (1302 bp) y terminador del gen ZmRBSC-m3 (488 bp), ver figura 5. El promotor del gen ZmRBSC-m3 se definió de acuerdo con los datos reportados por Schäffner y Viret, quienes lo describieron y estudiaron previamente. La secuencia utilizada contiene los elementos conservados para la expresión diferencial de RubisCO en las células del haz vascular durante los periodos de iluminación en maíz, así como los motivos mínimos necesarios para promover la unión y la actividad de la RNA polimerasa (Schäffner y Sheen 1991; Viret *et al.* 1994). La secuencia de Rubisco activasa empleada fue definida con base en la secuencia nucleotídica AF305876.3 reportada en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Contiene la región codificante completa, sin las regiones no traducibles (UTR) y optimizada para evitar los sitios de restricción enzimática inconvenientes para su clonación. La secuencia de nucleótidos usada codifica para la proteína Rubisco activasa de maíz, reportada en la base de datos del NCBI con el número de acceso AAG22094.3; esta secuencia contiene su propio péptido señal para la entrada al cloroplasto (Ayala O. *et al.*, 2004). El terminador del gen ZmRBSC-m3, que codifica a la subunidad pequeña de RubisCO en maíz se obtuvo de la secuencia gi|22464:1161-1648 del NCBI. Adicionalmente, el cassette isogénico posee 68 pares de bases que corresponden a sitios de restricción enzimática distribuidos entre los extremos de cada una de las tres secuencias, insertados para facilitar su clonación. La secuencia nucleotídica del cassette se describe en el capítulo “Anexos”.



**Figura 5.** Representación esquemática del cassette isogénico diseñado para sobreexpresar Rca en plantas de maíz.

○ *Obtención de cassette isogénico*

La secuencia del cassette isogénico fue sintetizada por GenScript USA (Piscataway, NJ). Dicha secuencia se clonó en el plásmido pUC57-Rco-Rca-Rco (5530 bp, PM = 3594500 g/mol) el cual fue amplificado en células de *E. coli* mediante el protocolo que se describe en “Transformación de células químicamente competentes”. La figura 6 esquematiza al plásmido pUC57-Rco-Rca-Rco. Se usó ampicilina para la selección y para el análisis de las transformantes. Posteriormente, el plásmido pUC57-Rco-Rca-Rco se extrajo (de las bacterias transformadas) con el kit PureLink HiPure Plasmid Maxiprep (Invitrogen) siguiendo el procedimiento adjunto al producto o bien, mediante la metodología “Extracción de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep)”. Luego, mediante reacciones de digestión se fragmentó al plásmido pUC57-Rco-Rca-Rco y mediante electroforesis en geles de agarosa se separó al cassette isogénico en cantidad suficiente para transformar las células de maíz. Para ello se realizaron cuatro reacciones de digestión con 20 µg del plásmido pUC57-Rco-Rca-Rco y las enzimas *Pst*I y *Dra*I durante 16 horas a 37° C. Se consultó la carta de condiciones de reacción del proveedor de enzimas para usar el buffer de reacción y la concentración de enzimas más adecuados durante la doble digestión. El resultado de cada reacción de digestión se visualizó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y se aisló el fragmento correspondiente al cassette isogénico empleando el kit Pure Link Hi Pure Plasmid LG, evitando la exposición prolongada del gel a la luz UV. Posteriormente, el producto de la extracción se cuantificó y se concentró mediante centrifugación al vacío a 4° C, durante el tiempo necesario para obtener 25 µL del cassette en una concentración final de 1µg/µL.



**Figura 6.** Representación esquemática del plásmido pUC57-Rco-Rca-Rco. Se señalan los sitios de corte de las enzimas *Pst*I y *Dra*I empleadas para aislar al cassette isogénico.

○ *Transformación de maíz con cassette isogénico*

La obtención del maíz isogénico que aquí se describe se basa en la introducción física aleatoria mediante bombardeo del cassette de sobreexpresión de Rca sobre callos embriogénicos de maíz. A diferencia de otras aproximaciones experimentales, el método aquí descrito no requiere el uso de vectores durante la transformación, por lo que no existe el riesgo de que persistan secuencias del mismo en las plantas transformadas y como consecuencia tampoco en su progenie. El procedimiento de la transformación por biobalística se describe detalladamente más adelante en la sección “Transformación de callos embriogénicos de maíz por biobalística”. La formulación de los medios de cultivo usados durante la transformación y la regeneración de las plantas de maíz se basó en los medios estándar, descritos por Garrocho-Villegas *et al.* 2012. Se emplearon 20 cajas Petri con medio N<sub>6</sub>P, suplementado con 3.5 g/L de gellan (Sigma) y 0.3 g de callos embriogénicos en cada una de ellas. Diez cajas fueron bombardeadas con el cassette de sobreexpresión isogénico y 10 con las balas sin DNA, como controles. Veinticuatro horas después del bombardeo, los callos fueron transferidos a medio N<sub>6</sub>P con la concentración regularmente usada de gellan [2.5 g /L] (Garrocho-Villegas *et al.* 2012) y se mantuvieron durante una semana a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad para minimizar el efecto de estrés que ocasiona el proceso de biobalística en las células. A continuación del periodo de recuperación, los callos fueron subcultivados en tres ocasiones cada 15 a 20 días en medio de cultivo N<sub>6</sub>P para permitir la proliferación de los callos embriogénicos. Posteriormente, la regeneración de las plantas se logró con subcultivos periódicos de 15 a 20 días, disminuyendo paulatinamente en tres ocasiones la concentración de las fitohormonas auxinas del medio N<sub>6</sub>P al 50%, 25% y 0% respectivamente. Todo esto sin adicionar ningún tipo de agente de selección. Las plantas regeneradas se mantuvieron en medio de cultivo MS enriquecido con 1 mg/L de ácido indol butírico para favorecer el proceso de enraizamiento. Durante esta etapa en medio MS los subcultivos se realizaron cada 25 a 35 días en frascos de vidrio de diferentes alturas, dependiendo del crecimiento de las plantas, siempre buscando aislar el mayor número de plántulas posible. Finalmente, cuando las plantas desarrollaron alrededor de 7 cm de raíz primaria, cada planta fue sembrada en sustrato orgánico mezcla Sunshine No 3 dentro de envases de 0.5 a 1 L de capacidad. Se cubrieron con una bolsa de plástico o con un vaso transparente con la finalidad de permitir el paso de la luz al mismo tiempo que se mantenía un ambiente húmedo y cerrado. De esta forma, se mantuvieron en el invernadero con temperaturas entre 25° a 35 °C y con fotoperiodos de luz/oscuridad de 12 h. Gradualmente, se fueron haciendo agujeros en las tapas que cubrían a las plantas hasta retirar por completo la cubierta.

○ *Identificación de plantas isogénicas de maíz*

Las plantas isogénicas de maíz se identificaron mediante experimentos de PCR punto final diseñados para detectar diferentes fragmentos del cassette de sobreexpresión. Para ello se aisló DNA genómico de diferentes plantas regeneradas, así como de plantas control sembradas a partir de semillas de la misma variedad de maíz con la que se generaron los callos embriogénicos. El protocolo de extracción de DNA se detalla en el apartado “Extracción de DNA genómico a partir de hoja de maíz”. En la tabla 4 se describen los pares de oligonucleótidos usados para realizar las amplificaciones. Cada PCR se realizó mediante condiciones estándar de la enzima Taq polimerasa Kapa 3G. Simultáneamente, el gen 18S del RNA ribosomal se usó como control de la amplificación. El resultado se visualizó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Debido a que los fragmentos que componen el cassette isogénico están naturalmente presentes en el DNA de una planta de maíz, los oligonucleótidos usados para identificar a las plantas isogénicas se diseñaron para amplificar la unión quimérica de dichos fragmentos. En el caso del par 1 y 3 los oligos forward se hibridan en diferentes partes del promotor de RubisCO, mientras que el oligo Reverse, se hibrida en el gen de Rubisco activasa. En el caso del par 2, el cebador forward es complementario a una secuencia del gen Rca, mientras que el oligo reverse se hibrida con el terminador de RubisCO (ver figura 28).

Nombre de oligos	Amplicón (bp)	Secuencia	Localización
Par 1	1316	Forward: 5'- CAAGAGGCGGAATTGCCATGAATTC -3'	<i>promotor RubisCO</i>
		Reverse: 5'- CGTTGATGAAGAGGCAGGACATCTT -3'	<i>Región codificante Rca</i>
Par 2	1302	Forward: 5'- GAACTTCATGACCCTCCCAACATC -3'	<i>Región codificante Rca</i>
		Reverse: 5'- CACGGTGTGTCGTATAGTATTAGTC -3'	<i>terminador RubisCO</i>
Par 3	1662	Forward: 5'- GTAAGCTTGAGCTCCCTTAATCTGG -3'	<i>promotor RubisCO</i>
		Reverse: 5'- CGTTGATGAAGAGGCAGGACATCTT -3'	<i>Región codificante Rca</i>
18S	210	Forward: 5'- GGAAACTTACCAGGTCCAGACATAG -3' Reverse: 5'- GTGGCCTAAACGGCCATAGTCCCTC -3'	<i>GenBank: AH001709.2</i>

**Tabla 4.** Oligonucleótidos usados para identificar a las plantas isogénicas sobreexpresantes de Rca. Los oligos de cada par son complementarios a secuencias localizadas en diferentes componentes del cassette. El gen rRNA 18S fue empleado como control positivo.

○ *Análisis de la expresión de Rca en plantas isogénicas*

Proteína

La cantidad de Rca en cada planta isogénica, se determinó por triplicado con experimentos tipo Western blot usando el anticuerpo contra Rca de la marca Agrisera dilución 1:20000 y el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa también en dilución 1:20000. Para ello se siguió el protocolo reportado por Yamori et al. 2011. Se recolectaron muestras de 1 cm<sup>2</sup> de las hojas inmediatas superiores al fruto -tanto de las plantas isogénicas identificadas, como de las plantas control provenientes de la siembra de semillas- ambas durante la etapa de floración. Los extractos de proteína total se separaron en geles de poliacrilamida al 12%, a 55 V durante los primeros 25 min y a 95 V durante el tiempo restante hasta lograr la separación óptima de las proteínas situadas en el intervalo de 30 a 50 kDa. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas PVDF durante 1 h a 100 V en un sistema de transferencia húmeda. Se realizaron geles con 2 µg, 9 µg y 11 µg de proteína total de cada planta analizada así como de los controles. La cantidad de proteína Rca en las plantas isogénicas se estimó mediante densitometría relativa (unidades densitométricas / área) con respecto a las plantas control.

mRNA

Se realizaron experimentos de RT-PCR tiempo real con el objetivo de cuantificar relativamente los niveles de expresión del RNA mensajero de Rca en las plantas isogénicas sobreexpresantes de maíz. Para ello se hicieron extracciones de RNA total a partir de 50 mg de las hojas inmediatas superiores al fruto -tanto de las plantas isogénicas identificadas, como de las plantas control provenientes de la siembra de semillas- ambas durante la etapa de floración. El RNA total de cada planta se aisló por duplicado con el paquete Quick -RNA MiniPrep de la marca Zymmo Research el cual incluye tratamiento con DNAsa para evitar amplificaciones inespecíficas por contaminación con DNA. Luego, a partir de 1 µg de RNA, se sintetizó cDNA con oligos dT en un volumen de reacción de 40 µL usando el set Thermo Scientific Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis. El cDNA sintetizado se cuantificó con un equipo NanoDrop 2000 Thermo Scientific. Posteriormente se realizó la reacción de PCR tiempo real con el kit SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal Life Sciences, en el equipo Applied Biosystems 7500. Para ello se usaron oligos específicos diseñados para amplificar un fragmento de la región codificante del gen Rca, por lo cual se amplifican los mRNAs endógeno e isógeno de Rca. La expresión del mRNA de Rca se normalizó respecto al gen de referencia Hmg (*High movility group*), este gen se usa como gen de referencia en los métodos validados por la Comisión Europea EURL (European Union Reference Laboratory) para la cuantificación de eventos de transformación, usando la técnica de PCR tiempo real. La secuencia de los oligos empleados se describe en la tabla 5. Dichos oligos fueron validados previamente mediante la realización de curvas de desnaturalización para

evaluar la ausencia de dímeros de oligos y para establecer la especificidad de la amplificación. La eficiencia de la reacción de qPCR se analizó mediante amplificaciones con diluciones seriadas del molde: 1200 ng, 600 ng, 300 ng y 75 ng. Con ello se obtuvo un valor de eficiencia entre el 90 y el 110%, lo que permitió emplear el método de doble delta de Ct para la cuantificación relativa del gen de interés (Pfaffl 2001) respecto a la expresión del gen constitutivo Hmg. Las reacciones para determinar el contenido del mRNA que codifica a Rca se hicieron con 10 µL de SuperMix Universal previamente mezclado con el colorante de referencia ROX (2 µL de ROX, por cada 1000 µL de SuperMix Universal), 600 ng de cDNA, 0.4 µL de oligos [10 µM] y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas c.b.p. 20 µL. Se usó el perfil térmico de 95°C / 5 min para la inactivación de la uracil DNA glicosilasa y 40 ciclos de 95°C / 15s y 60°C/1 min, más 30 min a 65°C para analizar la curva de disociación de los oligos. Cada reacción de qRT-PCR se determinó por triplicado. Para comprobar la especificidad de la reacción, las curvas de disociación de los dos pares de oligos se hicieron simultáneas a la detección del mRNA en las muestras.

Nombre de oligos	Gen Núm acceso GenBank	Amplicón (bp)	Secuencia	Localización
TRR	ZmRca1 AF305876.3	201	Forward: 5'- GATGAACATCGCCGACAACC -3'	Región codificante
			Reverse: 5'- CGGAAGATGCCCTTGCAGA -3'	
Hmg	HmgA AJ131373	79	Forward: 5'-TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA -3'	Región codificante
			Reverse: 5'- GCTACATAGGGAGCCTTGCCT-3'	

**Tabla 5.** Oligonucleótidos usados para cuantificar los niveles de expresión del mRNA de Rca en plantas de maíz. Hmg fue usado como gen de referencia.

○ *Determinación del número de copias del cassette isogénico*

Las veces de integración -del cassette isogénico en el DNA de las plantas transformadas- fueron determinadas mediante la técnica de PCR tiempo real. Para ello, se aisló DNA genómico de cada planta isogénica identificada así como de plantas control. Debido a la pérdida de plantas regeneradas a partir de callos embriogénicos bombardeados con los proyectiles sin DNA, se usaron como controles, plantas sembradas a partir de semillas de la misma variedad de maíz con la que se generaron los callos embriogénicos. El protocolo de

extracción de DNA se detalla más adelante en “Extracción de DNA genómico a partir de hoja de maíz”. Las amplificaciones se hicieron empleando SYBR GreenER, bajo condiciones de reacción estándar: 10 µL de SuperMix Universal previamente mezclado con el colorante de referencia ROX (2 µL de ROX por cada 1000 µL de SuperMix Universal), 50 ng de DNA, 0.4 µL de oligos [10 µM] y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas c.b.p. 20 µL. Se usó el perfil térmico 95°C/10 min para la inactivación de la uracil DNA glicosilasa y 40 ciclos de 95°C / 15s y 60°C / 1 min, más 30 min a 65° C para la curva de disociación de los oligos. Para este análisis se usaron dos diferentes pares de oligonucleótidos: primero se realizaron reacciones con los cebadores TRR descritos en la tabla 5 (diseñados para amplificar un fragmento de la región codificante de Rca) y posteriormente se emplearon oligonucleótidos específicos para identificar la unión quimérica del promotor de RubisCO con el gen de Rca. Las secuencias de estos últimos cebadores, nombrados CisFw se describen en la tabla 6. Cada reacción de qRT-PCR se determinó por triplicado, al mismo tiempo que se realizaron curvas de disociación tanto de los oligos TRR como de los oligos CisFw para comprobar la especificidad de la reacción. Simultáneamente, con cada réplica se realizó una curva patrón usando como molde diferentes cantidades del plásmido pUC57-Rco-Rca-Rco (1000 pg, 10 pg, 0.1 pg y 0.001 pg) y los oligos correspondientes. Luego, de acuerdo con el peso molecular del plásmido (PM = 3594500 g/mol) y considerando 2.4 Gb como el tamaño del genoma del maíz (maíz B73 RefGen\_v4, <http://www.gramene.org/>) así como un peso molecular promedio de 650 Da/base; se calculó el número de copias teórico del cassette en cada punto de la curva, asumiendo que el tamaño del genoma sea igual para las variedades de maíz aquí analizadas. Finalmente, con base en la curva patrón correspondiente se determinó el número de veces que la secuencia amplificada está presente en el genoma de las plantas, intrapolando el ciclo de amplificación de cada amplificación usando el DNA de las plantas isogénicas y sus controles.

Nombre de oligos	Amplición (bp)	Secuencia	Localización
CisFw	227	Forward: 5'- GTGTGGGGGAGCCTACTACA-3'	<i>Promotor RubisCO</i>
		Reverse: 5'- TGTTGCTGCTGGAACCTTTG -3'	<i>gen Rca</i>
TRR	201	Forward: 5'- GATGAACATCGCCGACAACC -3'	<i>Región codificante</i>
		Reverse: 5'- CGGAAGATGCCCTTGCAGA -3'	

**Tabla 6.** Oligonucleótidos usados para cuantificar la integración del cassette de sobreexpresión de Rca en plantas isogénicas de maíz.

- *Validación externa del procedimiento de transformación isogénico*

El procedimiento de transformación de células de maíz que aquí se describe prescinde del uso de genes de selección o de vectores para la introducción de la secuencia deseada. Se caracteriza principalmente porque la modificación realizada se hizo con una construcción compuesta con secuencias presentes en el genoma del maíz. Es por ello que simultáneamente a la identificación y caracterización molecular de las plantas isogénicas obtenidas, también se realizaron pruebas estándar para la detección de las secuencias más ampliamente usadas en la generación de plantas de maíz transgénico. Esto se realizó en el Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados CNRDOGM, del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria SENASICA y en el laboratorio del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, perteneciente a la Red Nacional de Laboratorios de Detección, Identificación y Cuantificación de Organismos Genéticamente Modificados (RNLD-OGM).

- **Sobreexpresión agronómica de Rca**

- *Cultivo de plantas sobreexpresantes de Rca obtenidas por métodos agronómicos*

Las semillas de los cultivares  $Z_0$  y  $Z_{23}$  de la variedad Zacatecas 58, raza Cónico Norteño fueron amablemente donadas por el Dr. José Molina Galán del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo Edo. de México. El cultivar  $Z_{23}$  fue el resultado de seleccionar maíz a partir del cultivar  $Z_0$ , durante 23 ciclos agrícolas dirigidos para obtener mayor rendimiento de grano, según el procedimiento Selección Masal Visual Estratificada (Molina-Galán 1983) De acuerdo con la caracterización bioquímica y fenotípica de  $Z_0$  y  $Z_{23}$  (Morales *et al.* 1999), se consideró a  $Z_{23}$  como el cultivo mejorado y a  $Z_0$  el cultivo original o cultivo control. Se sembraron 5 semillas de cada cultivar en macetas con capacidad para 12L, con sustrato orgánico mezcla No. 3 Sunshine. El crecimiento se realizó hasta la formación de semilla en invernadero con temperaturas entre 25° a 35 °C y con fotoperiodos de luz – oscuridad de 12 h. Es importante aclarar que el incremento del contenido de Rca en el cultivar  $Z_{23}$  fue un efecto derivado de la selección masal visual estratificada efectuada en el maíz con el propósito de aumentar su rendimiento. Sin embargo, para los fines de comparación entre diferentes métodos de mejoramiento agronómico, este sistema fue útil debido a que proporciona plantas de maíz con mayor contenido de Rca como resultado de la aplicación de un sistema agronómico convencional

- *Análisis de la expresión de Rca en plantas mejoradas por método agronómico*

#### Proteína

Para comparar los niveles de expresión de Rca en los cultivares Z<sub>0</sub> y Z<sub>23</sub> se determinó la cantidad de Rca en la mezcla de plantas de cada cultivar. Esto se realizó por triplicado con experimentos tipo Western blot usando el anticuerpo contra Rca de la marca Agrisera dilución 1:20000 y el segundo anticuerpo acoplado a la enzima peroxidasa, también en dilución 1:20000. Para ello y con el objetivo de extraer proteína total, se recolectaron durante la etapa de floración muestras de 1 cm<sup>2</sup> de las hojas inmediatas superiores al fruto de los dos cultivares (Yamori *et al.* 2011). Los extractos de proteína total de cada cultivar se separaron en geles de poliacrilamida al 12% a 55 V durante los primeros 25 min y a 95 V durante el tiempo restante, hasta lograr la separación óptima de las proteínas situadas en el intervalo de 30 a 50 KDa. Los geles contenían 2 µg, 9 µg y 11 µg de proteína total de cada cultivar. Como control de carga se verificó el contenido de la subunidad grande de RubisCO (≈ 55 KDa) mediante tinción (Azul de Coomassie) de la réplica de cada gel. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas PVDF durante 1 h a 100 V en un sistema de transferencia húmeda. La cuantificación relativa de la proteína Rca en el cultivar Z<sub>23</sub> se estimó mediante la comparación de los valores de densitometría (unidades densitométricas/área) de la señal inmunoquímica con respecto a las plantas control Z<sub>0</sub>.

#### mRNA

Con el objetivo de cuantificar relativamente los niveles de expresión del mRNA de Rca que existen entre los cultivares Z<sub>0</sub> y Z<sub>23</sub> se hicieron extracciones de RNA total a partir de 50 mg de las hojas inmediatas superiores al fruto durante la etapa de floración. El RNA total de hojas de cada cultivar se aisló por duplicado con el kit Quick – RNA MiniPrep de la marca Zymmo Research, el cual incluye, tratamiento con DNAsa para evitar amplificaciones inespecíficas por contaminación con DNA. Luego, a partir de 1 µg de RNA se sintetizó cDNA con oligos dT en un volumen de reacción de 40 µL usando el set Thermo Scientific Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis. El cDNA sintetizado se cuantificó con un equipo NanoDrop 2000 Thermo Scientific. Posteriormente se hicieron reacciones de PCR en tiempo real con el kit SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal Life Sciences, en el equipo Applied Biosystems 7500. La expresión del mRNA de Rca en los cultivares Z<sub>0</sub> y Z<sub>23</sub> se realizó con los oligos TRR descritos en la tabla 5, los cuales, están diseñados para amplificar un fragmento de la región codificante del gen Rca. También se normalizó respecto al gen de referencia

Hmg (*High movility group*), este gen se usa como gen de referencia en los métodos validados por la Comisión Europea EURL (European Union Reference Laboratory) para la cuantificación de eventos de transformación, usando la técnica de PCR tiempo real. Tal como se mencionó anteriormente, la secuencia de los oligos empleados se validó previamente, mediante la realización de curvas de desnaturalización y de eficiencia para evaluar la ausencia de dímeros de oligos y para establecer la especificidad de la amplificación. También se analizó la eficiencia de la reacción de qPCR bajo las condiciones experimentales usadas. Esto se realizó mediante amplificaciones hechas a partir de diluciones seriadas del molde, con lo cual se obtuvo un valor de eficiencia entre el 90 y el 110% lo que permitió emplear el método de doble delta de Ct para la cuantificación relativa del gen de interés respecto a la expresión del gen constitutivo Hmg. Las reacciones se hicieron con 10  $\mu$ L de SuperMix Universal previamente mezclado con el colorante de referencia ROX (2  $\mu$ L de ROX por cada 1000  $\mu$ L de SuperMix Universal), 600 ng de cDNA, 0.4  $\mu$ L de oligos [10  $\mu$ M] y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas c.b.p. 20  $\mu$ L. Se usó el perfil térmico de 95°C/10 min para la inactivación de la enzima uracil DNA glicosilasa y 40 ciclos de 95°C/15s y 60°C / 1 min, más 30 min a 65°C para evaluar la curva de disociación de los oligos. Cada reacción de qRT-PCR se determinó por triplicado.

o *Determinación del número de copias de Rca en plantas mejoradas por método agronómico*

Para determinar el número de copias de Rca que existen en los cultivares Z<sub>0</sub> y Z<sub>23</sub> se realizaron análisis con la técnica de PCR tiempo real. Para ello se aisló DNA genómico de la mezcla de hojas provenientes de cada cultivar. El protocolo de extracción de DNA se detalla más adelante en “Extracción de DNA genómico a partir de hoja de maíz”. Las amplificaciones se hicieron empleando SYBR GreenER, bajo condiciones de reacción estándar: 10  $\mu$ L de SuperMix Universal previamente mezclado con el colorante de referencia ROX (2  $\mu$ L de ROX por cada 1000  $\mu$ L de SuperMix Universal), 50 ng de DNA, 0.4  $\mu$ L de oligos [10  $\mu$ M] y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas c.b.p. 20  $\mu$ L. Se usó el perfil térmico de 95°C/10 min para la inactivación de la enzima uracil DNA glicosilasa y 40 ciclos de 95°C/15s y 60°C/1 min, más 30 min a 65°C para analizar la curva de disociación de los oligos. Se usaron los oligos TRR descritos en la tabla 6 (diseñados para amplificar un fragmento de la región codificante de Rca). Cada reacción de qRT-PCR se determinó por triplicado al mismo tiempo que se realizaron curvas de disociación de los oligos TRR para comprobar la especificidad de la reacción. Simultáneamente, con cada réplica se realizó una curva patrón usando como molde diferentes cantidades del plásmido pUC57-Rco-Rca-Rco (1000 pg, 10 pg, 0.1 pg y 0.001 pg). Luego, de acuerdo con el peso molecular del plásmido (PM = 3594500 g/mol) y considerando 2.4 Gb como el tamaño del genoma del maíz (<http://www.gramene.org/>) así como un peso molecular promedio de 650 Da/base, se calculó el número de copias del cassette en cada punto de la curva. De acuerdo con el análisis de la curva patrón se determinó el número de veces que Rca está presente en el DNA de Z<sub>0</sub> y Z<sub>23</sub>.

- Protocolos generales

- *Transformación de células químicamente competentes*

Se descongelaron en hielo 100  $\mu$ L de células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  contenidas en tubos eppendorf de 1500  $\mu$ L, se agregaron 10  $\mu$ L de la reacción de ligación (plásmido) para tener no menos del 10 % del vector recombinante con relación a las células por transformar. Se incubaron en hielo por 1 h. Transcurrido ese tiempo, se provocó un choque térmico calentando las células a 42°C/2.5 min. Posteriormente se incubaron en hielo durante 5 min, se agregó 1 mL de medio LB, se sellaron los tubos con parafilm y se incubaron a 37°C por 1 h con agitación constante. Posteriormente las células se empastillaron por centrifugación a 3 KRPM/3min. Se eliminó el sobrenadante hasta dejar sólo un volumen de 100  $\mu$ L. En ese volumen restante de medio LB se resuspendieron las células. Después, con ayuda de una varilla de vidrio -doblada 90 ° y esterilizada a la flama de un mechero- se dispersó completamente el contenido de cada tubo abarcando toda la superficie en cajas de Petri con medio sólido LB con y sin el antibiótico de selección. Las cajas se incubaron a 37° C toda la noche. Las colonias aisladas que crecieron fueron a su vez preinoculadas en medio líquido para analizar cuál de ellas se transformó exitosamente (ver protocolo: Análisis de transformantes).

- *Análisis de transformantes*

Para analizar el resultado de los procesos de transformación se aisló DNA plasmídico (miniprep) de diferentes colonias aisladas, preinoculando cada una de éstas en 3 mL de medio LB con el antibiótico de selección. Simultáneamente se sembró un duplicado de cada una de las colonias analizadas en medio LB sólido con antibiótico. Los plásmidos extraídos fueron analizados con diferentes enzimas de restricción y el resultado se visualizó en geles de agarosa, cuyo patrón de migración fue comparado con el patrón de fraccionamiento (mapa de restricción) teórico de cada construcción. Las transformantes que resultaron positivas a los patrones de restricción se conservaron usando los duplicados de cada una (previamente fueron sembrados en medio sólido). Para ello se esterilizaron con autoclave tubos eppendorf de 1500  $\mu$ L, glicerol puro y tubos de cultivo con 3 mL de medio líquido LB. A partir de los duplicados en medio sólido se inoculó la transformante escogida en los 3 mL de medio líquido LB (al momento de usar se añadió el antibiótico correspondiente) y se incubó a 37 °C por 16 h (una noche). Transcurrido ese tiempo se agregaron 0.2 mL de glicerol y 0.8 mL del cultivo inoculado a un tubo eppendorf previamente etiquetado de forma clara y precisa que permita identificar tanto al ecotipo de la bacteria como al plásmido que contiene. Se agitó para homogeneizar y se revisó que los tubos estuvieran perfectamente

cerrados. Se congelaron en N<sub>2</sub> líquido, -procurando mantenerlos verticalmente-inmediatamente después, se almacenaron a -70 °C. Estos reservorios permiten conservar a las células bacterianas transformadas con los plásmidos de interés y se pueden re-sembrar nuevamente cuando se requiera.

o *Extracción de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep)*

En condiciones de esterilidad se pre-inocularon 3 mL de medio LB líquido con la cepa bacteriana en cuestión, picándola con un palillo de madera (previamente esterilizado en autoclave) el cual fue sumergido después en el medio de cultivo con el antibiótico adecuado. Los tubos se incubaron a 37 °C toda la noche con agitación constante. Al día siguiente se empastillaron las células que crecieron en cada tubo vaciando repetidamente el contenido de éstos a un tubo eppendorf de 1.5 mL de capacidad, los cuales se centrifugaron por 3 min a 6 KRPM desechando el sobrenadante cada vez. Al final se retiró el sobrenadante aunque no en su totalidad para resuspender las células en lo que quedaba del medio (aprox 100 µL). Se agregaron 400 µL de la solución alcalina TENS (SDS 0.5 %, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaOH 100 mM) y se incubó por 15 min a T ambiente. Posteriormente se añadieron 200 µL de acetato de amonio 7.5 M esterilizado por filtración y se incubó en hielo por 7 min. Se centrifugó por 7 min a 12 KRPM y el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo conteniendo un volumen de isopropanol frío. Se incubó a -20 °C durante 40-60 min. Transcurrido ese tiempo se centrifugó por 10 min a 12 KRPM a 4 °C. La pastilla resultante se lavó con etanol al 70 %, se centrifugó por 5 min a 12 K RPM a 4 °C y se resuspendió en 30 – 50 µL de H<sub>2</sub>O destilada estéril. Los plásmidos extraídos fueron analizados haciendo diferentes cortes en la secuencia usando enzimas de restricción. Los fragmentos (patrón de restricción) que se obtuvieron de dichos cortes se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio [10 mg/mL]. Se escogió la clona que cumplió con el patrón de restricción previsto para cada plásmido.

o *Extracción de DNA genómico a partir de hoja de maíz*

El protocolo está basado en el procedimiento descrito por Schneerman *et al.* 2002 pero adaptado para hacer la extracción a partir de hojas. Se preparó buffer CTAB (NaCl 1.5 M, EDTA 20 mM, CTAB (*Bromuro de hexadeciltrimetilamonio*) 2%, Tris pH 8 100 mM) disolviendo a 35°C y con agitación constante el reactivo CTAB. El buffer se precalentó a 60° - 65° C antes de iniciar la extracción.

Debido a que el complejo CTAB-DNA se puede precipitar a temperaturas menores de 15°C, todo el procedimiento en presencia del CTAB se realizó a temperaturas iguales o superiores a la temperatura ambiente (25°C).

Se trituraron de 0.7 a 1 g de hojas congeladas de maíz usando N<sub>2</sub> líquido en un mortero con pistilo. La muestra triturada se agregó rápidamente a un tubo de teflón con tapa que contenía 9 mL del buffer CTAB precalentado, al cual, se adicionaron previamente 180 µL de β-mercaptoetanol (para tener una concentración final de 2%. Se agrega justo antes de usar) La mezcla se homogeneizó invirtiendo el tubo lentamente hasta que se mezcló todo el tejido

con el buffer CTAB. La mezcla se incubó durante 90 min a 65° C agitando de vez en cuando con suavidad. Posteriormente, se retiró el tubo de la incubadora y se esperó un momento hasta que la temperatura del tubo descendiera casi a temperatura ambiente y se agregaron suavemente 4.5 mL de la mezcla cloroformo/octanol 24:1 (vol/vol). La mezcla se agitó suavemente invirtiendo los tubos lentamente durante 5 min para formar una emulsión. Se centrifugó por 10 min a 12000 RPM a temperatura ambiente y se recuperó la fase acuosa (superior) en otro tubo cuidando de no recoger la interfase. Nuevamente se agregaron 4.5 mL de la mezcla cloroformo/octanol y se repitió la centrifugación por 10 min a 12000 RPM a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante en otro tubo y se agregaron 15 µL de RNAsa A libre de actividad DNAsa [10 mg/mL]. De esta forma se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 6 mL de isopropanol (o dos terceras partes del volumen recuperado) invirtiendo suavemente para mezclar y se centrifugó a 12000 RPM por 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y al tubo con el precipitado se le agregaron de 2 a 4 mL de la solución de lavado 1 (etanol absoluto 75%, NaOAc 0.2 M) con la finalidad de cubrir el precipitado. Se dejó en reposo durante 20 min a temperatura ambiente. Después se eliminó la solución de lavado 1 por decantación teniendo cuidado de no tirar el precipitado y se agregaron de 2 a 4 mL de solución de lavado 2 (etanol absoluto 75%, NH<sub>4</sub>OAc 10 mM) con la finalidad de cubrir el precipitado muy brevemente (aprox. 30 s). Posteriormente se decantó con cuidado la solución de lavado 2 y se eliminó el sobrenadante en su totalidad succionándolo con diferentes tamaños de puntas para micropipeta y/o esperando un breve momento para evaporar el sobrenadante -siempre cuidando de no secar completamente el precipitado-. Inmediatamente después se agregaron de 200 a 500 µL de H<sub>2</sub>O estéril libre de DNAsas. Sin agitar se dejó en reposo a 4°C, de ser necesario, durante toda una noche para disolver el DNA. Al siguiente día se transfirió el DNA disuelto a un tubo eppendorff de 1.5 mL con una punta estéril para micropipeta a la cual le fue cortada la punta para facilitar la succión del DNA disuelto. El DNA obtenido se cuantificó y se observó una alícuota en un gel de agarosa.

○ *Transformación de callos embriogénicos de maíz por biobalística*

*Establecimiento de embriones*

De acuerdo al protocolo publicado por Garrocho-Villegas *et al.* 2012, los cultivos de callos embriogénicos se establecieron a partir de embriones cigóticos inmaduros de maíz raza Tuxpeño, variedad Costeño, donado por el INIFAP Campus Zacatepec Morelos, los cuales fueron cosechados a los 15 a 18 días después de la polinización.

*Preparación de partículas para el bombardeo*

El siguiente procedimiento se usa para preparar 60 bombardeos de acuerdo al protocolo publicado por Sanford *et al.* 1993.

Se pesaron 30 mg de micropartículas de tungsteno de 0.4 µm en un tubo de 1500 µl, se agregó 1 mL de etanol al 70 % y se agitó en vórtex por 3 a 5 min incubando por 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12 kRPM durante 5 segundos o hasta que el

sobrenadante se observara translúcido para remover y descartar el sobrenadante. Posteriormente, se lavó 3 veces más con H<sub>2</sub>O estéril agitando y descartando el sobrenadante. Finalmente, se adicionaron 500 µl de glicerol estéril preparado al 50% para permitir una concentración final de 60 mg / mL. Esta solución se almacenó a – 20° C por dos semanas y hasta por un mes. Cada 50 µl de esta solución se usaron para realizar 6 disparos.

### *Bombardeo*

El bombardeo de partículas se realizó dentro de una campana de flujo laminar en la que previamente se limpió toda la superficie y material de trabajo incluyendo la cámara de biobalística de alta presión (Bio-Rad, Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System). Posteriormente se llevó a cabo el revestimiento de las micropartículas de tungsteno o microacarreadores con el DNA por introducir en las células de maíz. Para ello se agitaron las partículas previamente preparadas durante 5 minutos en un vórtex. Se separaron alícuotas de 50 µl en tubos de 1500 µl -para realizar 6 disparos con cada alícuota- agitando continuamente con el vórtex para maximizar la uniformidad del muestreo y se agregaron 5 µl de DNA [1 µg / µl], 50 µl de CaCl<sub>2</sub> [2.5 M] y 20 µl de espermidina [0.1 M]. La preparación anterior se homogeneizó mediante agitación suave para fijar la unión del DNA con las balas incubando por al menos 1 min o el tiempo necesario para realizar el primer disparo. Durante este tiempo se debe agitar suavemente tratando de mantener la uniformidad de la suspensión formada. Con el fin de prolongar el tiempo de incubación de la unión del DNA con las balas se lavó la preparación de balas justo antes del disparo siguiendo los siguientes pasos: Se centrifugó a máxima velocidad durante 2 segundos en una centrífuga de mesa para retirar y desechar el sobrenadante. Se añadieron 140 µl de etanol al 70% agitando muy suavemente hasta homogeneidad y se centrifugó nuevamente para desechar el sobrenadante. Posteriormente se añadieron 140 µl de etanol absoluto, se agitó muy suavemente hasta homogeneidad y se centrifugó para desechar el sobrenadante. La preparación se resuspendió en 48 µl de etanol absoluto. Inmediatamente después de este procedimiento de lavados se realizaron los disparos aplicando 6 µl de balas recubiertas con DNA sobre la membrana llamada macrocarrier. Se esperó de 10 a 15 minutos hasta la evaporación completa del etanol y se siguieron las instrucciones para ensamblar los dispositivos y consumibles del equipo para realizar cada disparo a 6 cm de distancia del material biológico. La introducción de las micropartículas se impulsó con una presión de Helio de 650 – 900 psi en una atmósfera de 20 mm Hg de vacío. Se bombardearon cajas Petri de 60 mm de diámetro conteniendo cada una de ellas 0.3 g de callos embriogénicos de maíz dispuestos en medio N<sub>6</sub>P enriquecido con 3.5 g/L de gellan (Sigma). Veinticuatro horas después del bombardeo, los callos se subcultivaron en medio N<sub>6</sub>P con la concentración regularmente usada de gellan [2.5 g / L] (Garrocho-Villegas *et al.* 2012). En cada ensayo de transformación se hicieron disparos con balas recubiertas de DNA (cassette isogénico o vector transgénico), así como disparos con balas que siguieron el mismo protocolo de preparación, pero usando H<sub>2</sub>O en lugar de DNA. Cada caja recibió dos disparos.

---

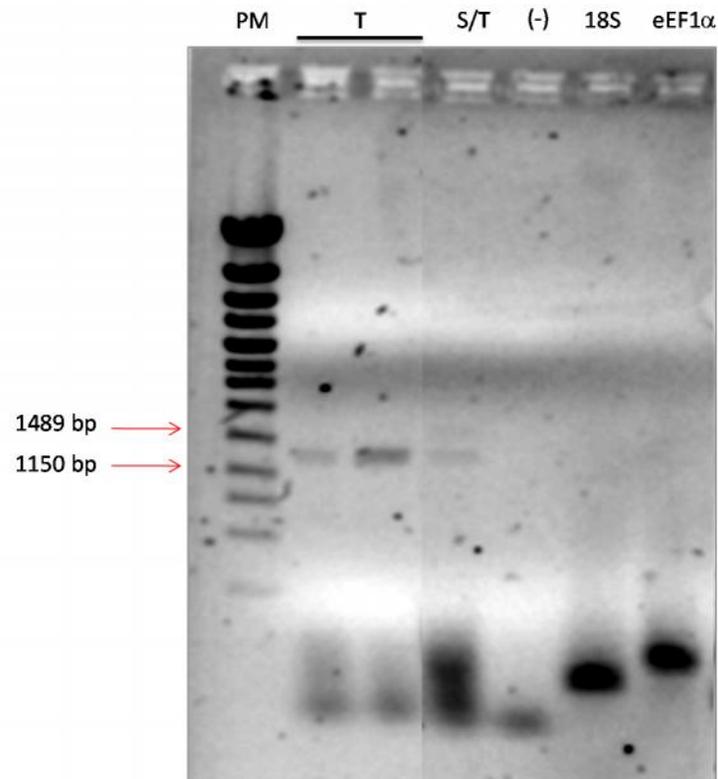
# RESULTADOS

- **SOBREEXPRESIÓN TRANSGÉNICA DE Rca**

Las modificaciones genéticas en los cultivos de interés comercial han sido comúnmente elaboradas mediante sistemas que introducen transgenes en el genoma de las plantas receptoras. Esto sin duda ha despertado gran inquietud en diferentes sectores de la población mundial. Por ello, actualmente se buscan nuevas aproximaciones experimentales para cambiar las técnicas de mejoramiento en los cultivos. Con todo, el desarrollo de cultivos transgénicos se ha practicado por más tiempo y en consecuencia las técnicas pueden ser reproducidas con relativa mayor facilidad. En razón de esto, la presente tesis se llevó a cabo para demostrar que el proceso de modificaciones isogénicas sí es viable en el maíz. Sin embargo, debido a que la sobreexpresión de la proteína Rca no se había practicado con anterioridad en esta planta, fue necesario en primer lugar, demostrar que es posible modificar la expresión de esta proteína siguiendo los pasos de una tecnología de ingeniería genética ya conocida. Es por eso que la estrategia experimental incluyó el desarrollo de plantas transgénicas sobreexpresantes de Rca.

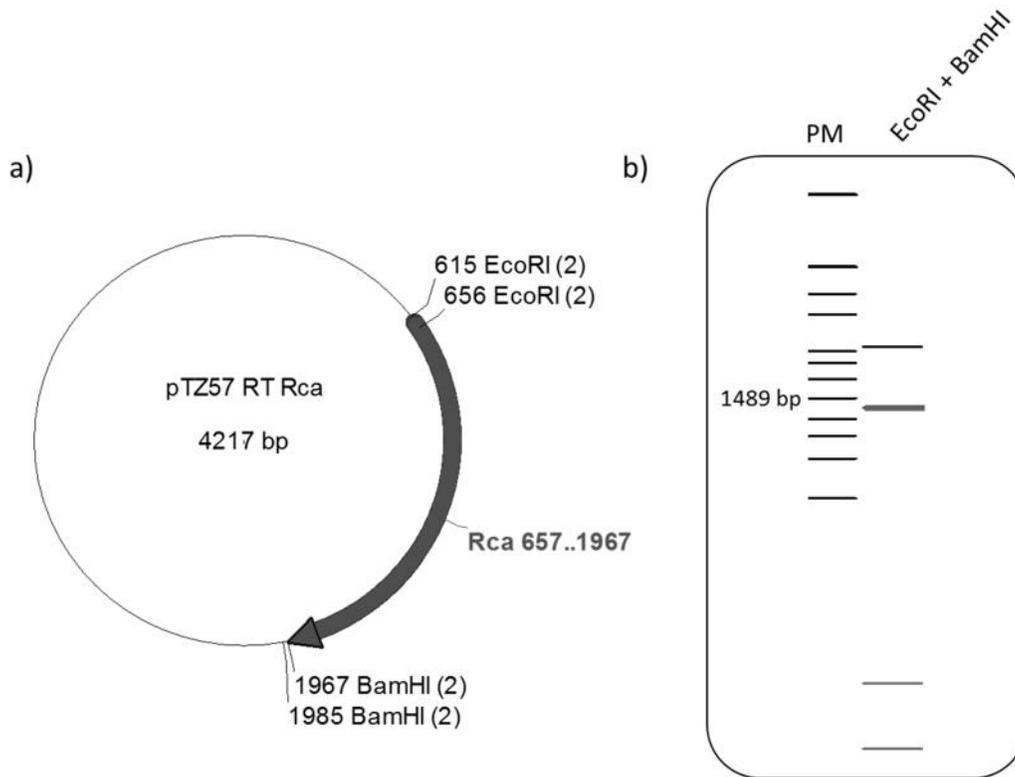
- *OBTENCIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN TRANSGÉNICA*

La construcción transgénica nombrada pCambia 3301 – Rca permite sobreexpresar Rca en las plantas de maíz mediante la introducción de un vector que porta otras secuencias que codifican proteínas no originarias del maíz, pero que confieren una nueva característica bioquímica que facilita la transformación vegetal. Para construir el vector pCambia 3301 – Rca se clonó la secuencia codificante de Rca a partir de RNA total usando el par de oligonucleótidos y la metodología que se describieron en el capítulo Materiales y Métodos (Tabla 1). El resultado se muestra en la figura 7, en ella se observan reacciones de RT-PCR con diferentes moldes y cebadores. En ella se muestra que al usar RNA sin tratamiento con DNAsa -como molde para la PCR- se obtienen dos productos de amplificación, mientras al usar RNA libre de DNA se obtiene sólo un amplicón. Es por ello que para evitar la clonación de intrones debido a la amplificación de Rca a partir de DNA genómico, se usó el producto de RT-PCR que se obtuvo a partir de RNA tratado con DNAsa.



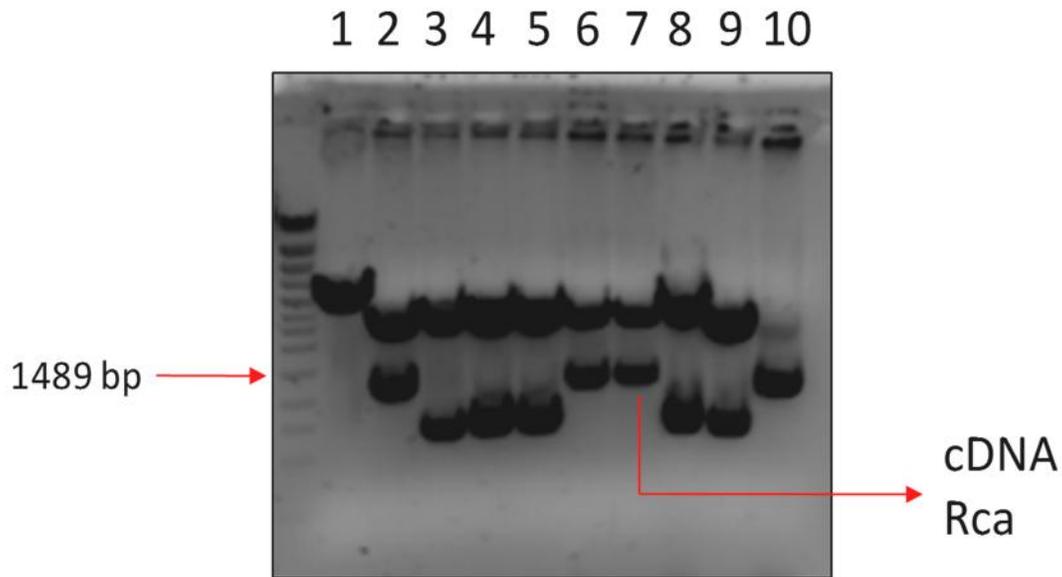
**Figura 7.** RT-PCR para amplificar secuencia codificante de Rubisco activasa de maíz (1331). De izquierda a derecha carril 1: marcador de tamaño molecular (PM), carriles 2 y 3: RT-PCR a partir de RNA tratado con DNAsa (T), carril 4: RT-PCR a partir de RNA sin tratamiento con DNAsa (S/T), carril 5: RT-PCR sin RNA (-), carriles 6 y 7: controles de amplificación Eef1 $\alpha$  y 18S.

Una vez que fue posible la amplificación del cDNA codificante para Rca, esta secuencia se clonó en el vector pTZ57R/T para facilitar la subclonación de Rca en el vector pCambia 3301. Para ello se transformaron células DH5 $\alpha$  con pTZ5R/T ligado a la secuencia Rca es decir, se construyó el plásmido pTZ57R/T-Rca (4217 bp), esquematizado en la figura 8 en la cual se muestran diferentes sitios de corte para diversas enzimas de restricción.



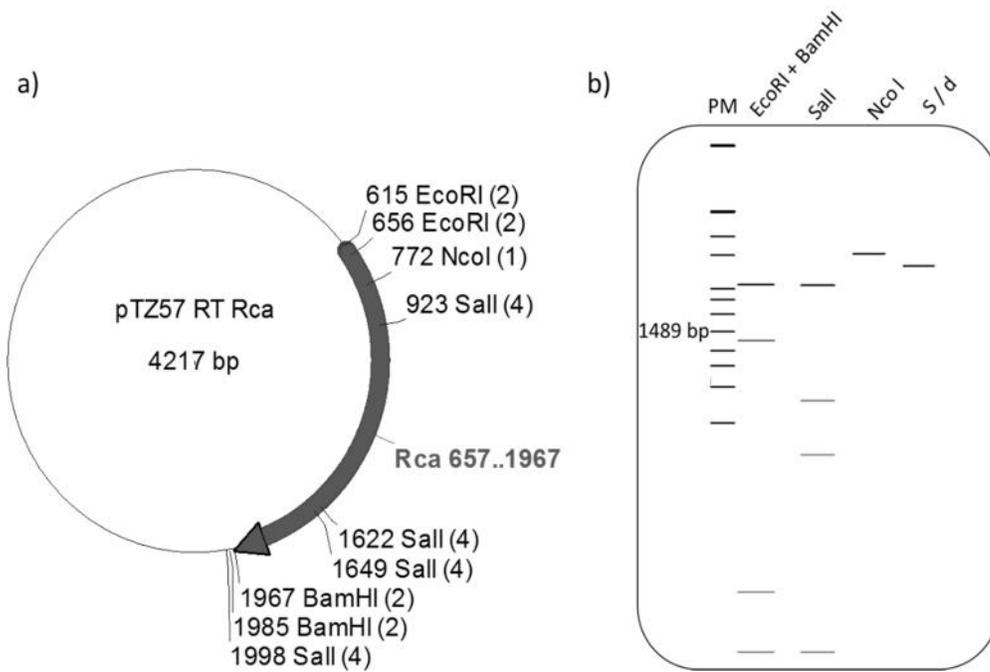
**Figura 8.** a) Esquema del plásmido pTZ57R/T – Rca, se muestran los sitios y el número de cortes de las enzimas usadas para identificarlo. b) Patrón de restricción esperado en un gel de agarosa, El fragmento Rca tiene 1311 bp

Las transformantes obtenidas se evaluaron mediante la reacción de doble digestión: *EcoRI*-*BamHI*. Según el mapa de restricción de la figura 8, al cortar el plásmido pTZ57R/T-Rca con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* se obtienen dos productos visibles, uno de 1311 bp y otro de 2847bp. En la figura 9 se observa la imagen del gel de agarosa que contiene la evaluación de 10 cepas transformantes que se obtuvieron luego de la digestión del plásmido con *EcoRI* y *BamHI*. Los resultados demostraron que fue posible la clonación de pTZ57R/T-Rca debido a que se liberó el fragmento de clonación esperado.

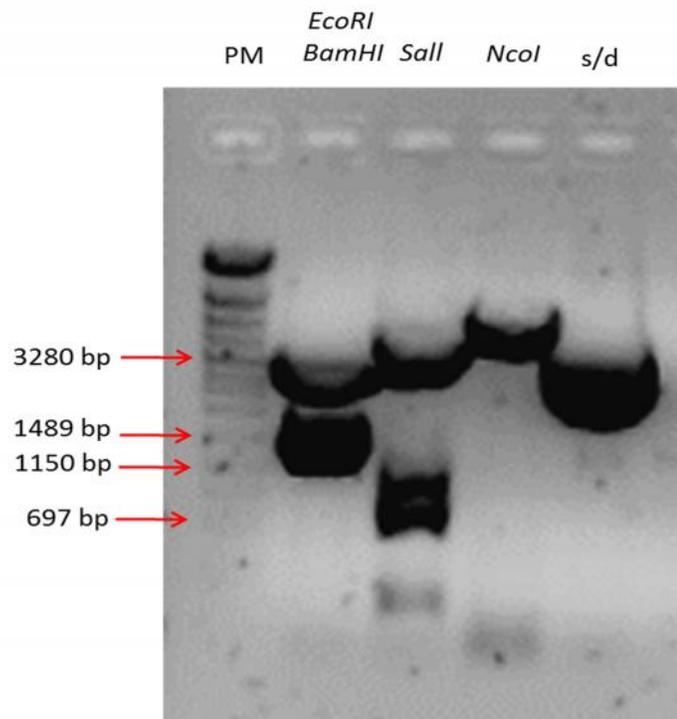


**Figura 9.** Escrutinio de transformantes pTZ57R/T-Rca. Extracción de plásmido a 10 transformantes. Cada plásmido se digirió con *EcoRI* y *BamHI* para evaluar cuales transformantes tienen el cDNA de Rca (1311 bp). Las cepas 2, 6 y 7 fueron positivas al análisis.

De acuerdo a lo anterior, se eligió arbitrariamente una de las transformantes exitosas, en este caso la número 7, para extraer el plásmido pTZ57R/T-Rca el cual a su vez se digirió con otras enzimas de restricción para comprobar una vez más que se clonó correctamente la secuencia Rca. En la figura 10 se muestra el resultado que se espera obtener con las reacciones de digestión del plásmido pTZ57R/T-Rca usando las enzimas *EcoRI*, *BamHI*, *Sall*, *NcoI*, y como control negativo el plásmido sin digerir (s/d). En la figura 11 se observa el resultado real del análisis donde se puede observar que de acuerdo al mapa de restricción de la figura 10, en todos los casos se obtuvieron los fragmentos del tamaño esperado.

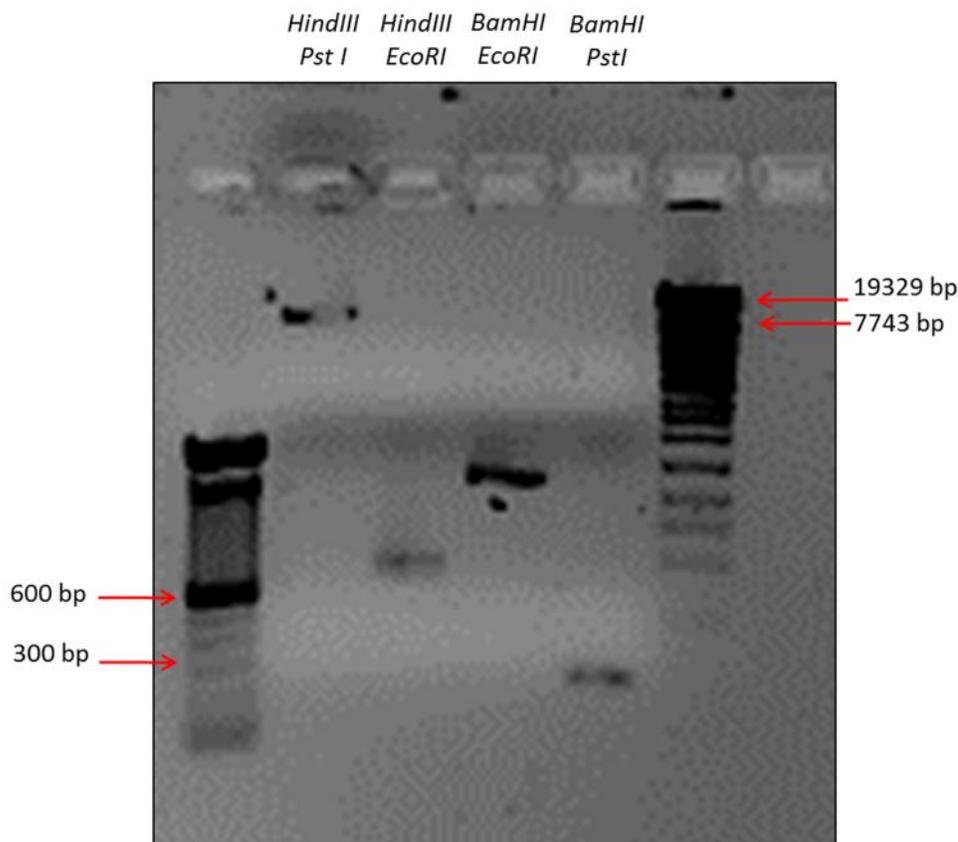


**Figura 10.** a) Esquema del plásmido pTZ57R/T – Rca. Se muestran los sitios y el número de cortes de diferentes enzimas usadas para identificarlo. b) Patrón de restricción esperado en un gel de agarosa. Plásmido sin digerir (s/d).



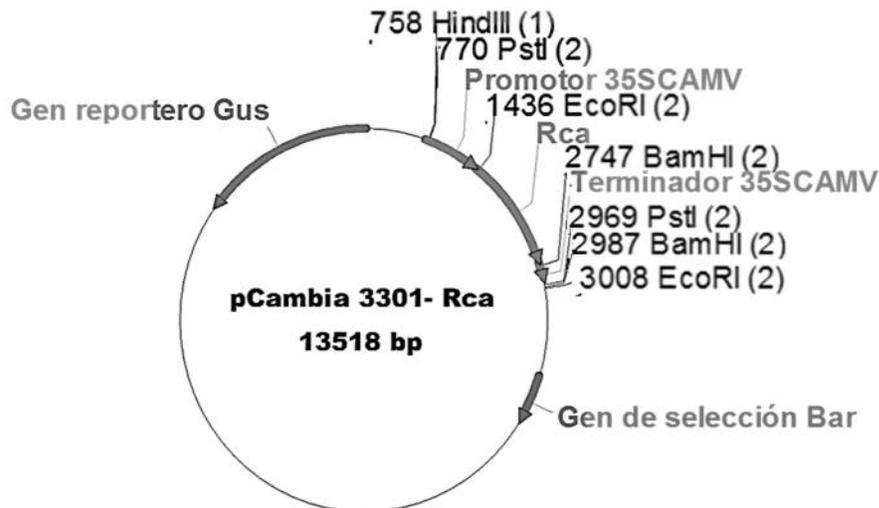
**Figura 11.** Digestión de plásmido pTZ57R/T – Rca. Gel de agarosa, en la parte superior se indican las enzimas que se usaron en cada reacción. Control negativo pTZ57R/T – Rca sin digerir (s/d).

Con la clonación de la secuencia Rca en el vector pTZ57R/T se construyó el plásmido pCambia 3301-Rca mediante la ligación de cuatro secuencias. Para ello se aislaron a partir del plásmido pUC35s-2X (3572 bp) las secuencias promotora (678 bp) y terminadora (226 bp) del virus del mosaico de la coliflor (CAMV 35S). Se usaron las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* para aislar al promotor y *BamHI* + *PstI* para obtener al terminador. Por otra parte, se digirió el vector pCambia 3301 vacío con las enzimas *HindIII* y *PstI*. Adicionalmente, se obtuvo la secuencia Rca (1311 bp) a partir del plásmido pTZ57R/T – Rca utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. Estos productos de restricción se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, tal como se observa en la figura 12, en ella se muestran los cuatro fragmentos obtenidos. A partir del gel agarosa se aislaron los fragmentos correspondientes a cada una de las cuatro secuencias de interés.



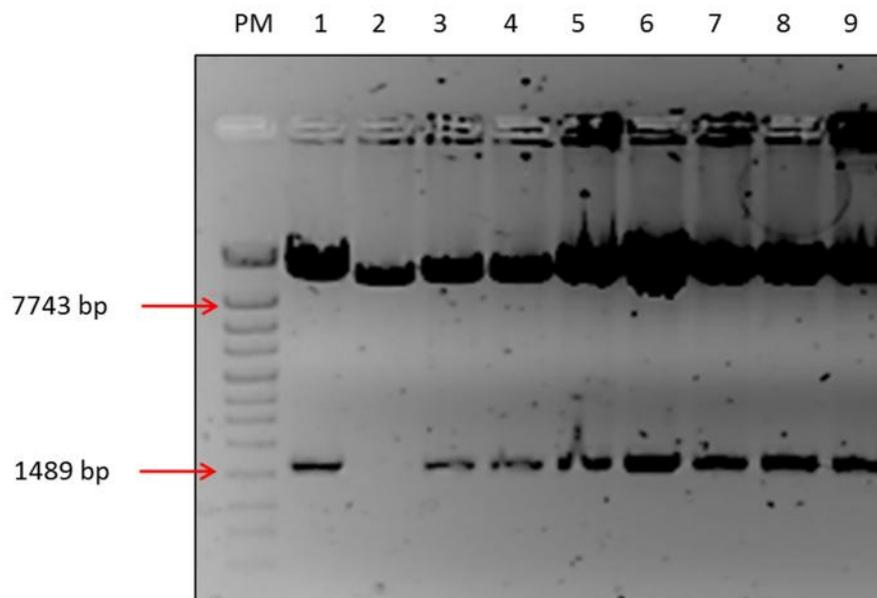
**Figura 12.** Secuencias necesarias para construir el vector pCambia 3301-Rca. De izquierda a derecha carriles 1 y 6: marcadores de tamaño molecular, carril 2: Vector pCambia 3301 vacío (11176 bp), carril 3: promotor CAMV 35S (666 bp), carril 4: secuencia codificante Rca (1302 bp), carril 5: terminador CAMV 35S (222 bp). Se muestran las enzimas de restricción empleadas para obtener cada fragmento

Posteriormente, se unieron los cuatro fragmentos mediante catálisis con la enzima T4 DNA ligasa. El plásmido obtenido: pCambia 3301 – Rca se esquematiza en la figura 13 donde también se detallan los sitios de corte de distintas enzimas de restricción.



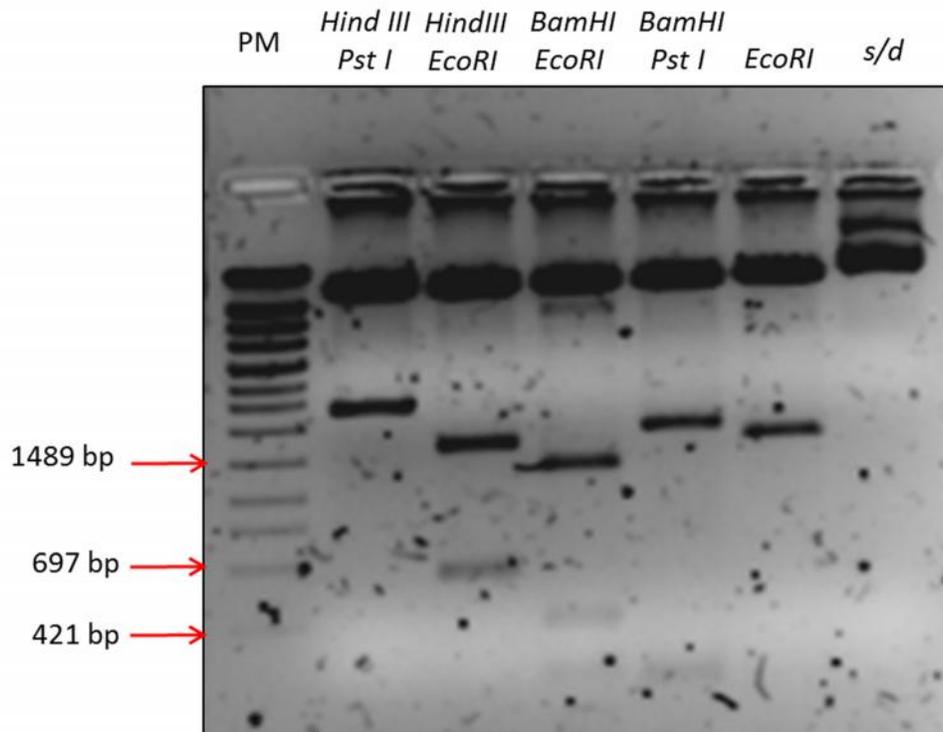
**Figura 13.** Mapa de restricción del vector pCambia 3301-Rca. Se señalan los sitios de corte de diferentes enzimas de restricción (número de cortes).

El plásmido pCambia-Rca se usó en la transformación por electroporación de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las transformantes obtenidas fueron analizadas haciendo extracción de plásmido de cada una de ellas y digiriéndolo con EcoRI para probar si alguna de ellas liberaba un fragmento de 1572 bp. La figura 14 muestra el resultado del escrutinio de las bacterias transformadas, en ella se observa que la electroporación fue exitosa en la mayoría de los casos pues de un total de nueve colonias analizadas sólo una de ellas no liberó el fragmento del tamaño esperado.



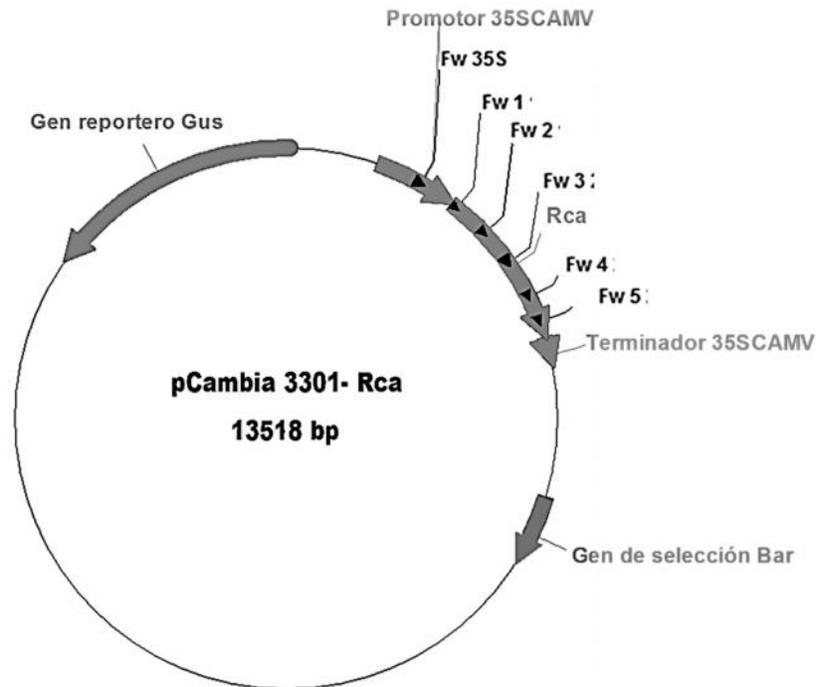
**Figura 14.** Análisis de 9 colonias de bacterias transformadas con la construcción pCambia 3301-Rca. Las transformantes se analizaron con EcoRI para liberar una secuencia de 1572 bp. Todas las transformantes excepto la número 2 mostraron la secuencia esperada.

Se eligió una de las cepas transformadas para realizar un análisis de restricción más minucioso con la finalidad de confirmar que se obtuvo una cepa bacteriana recombinante con la construcción pCambia 3301-Rca. En la imagen de la figura 15 se observa el gel de agarosa que muestra los productos de digestión del plásmido pCambia 3301-Rca usando diferentes enzimas de restricción. De acuerdo al esquema de la figura 13 los resultados obtenidos corresponden al patrón de restricción esperado con lo cual se concluyó que la clonación de la secuencia codificante de Rca bajo el dominio del promotor y terminador viral 35S CAMV fue satisfactoria.



**Figura 15.** Análisis de restricción de la construcción pCambia-35S-Rca usando diferentes combinaciones de enzimas de restricción, como control negativo, el plásmido sin digerir (s/d).

Adicionalmente a los análisis de restricción, se secuenciaron varios fragmentos del vector pCambia 3301-Rca empleando distintos cebadores. En la figura 16 se señalan los oligonucleótidos usados para analizar la clonación del cassette de expresión en fragmentos consecutivos, con la finalidad de descartar errores de secuenciación.



**Figura 16.** Oligonucleótidos (Fw) usados para secuenciar el cassette de sobreexpresión transgénico clonado en el vector pCambia 3301 - Rca

El análisis del alineamiento de las secuencias resultantes con el cDNA de Rca (Genebank AF084478.3) demostró que se clonó la secuencia Rca en su totalidad y sin intrones. Se detectaron seis cambios de bases presentes en al menos tres secuenciaciones independientes. Para evaluar el alcance de los seis cambios de bases detectados se tradujo *in silico* la secuencia resultante y ésta a su vez se comparó con la secuencia proteica de Rca reportada en la base de datos NCBI (AF084478). Este análisis se muestra en la figura 17, en la cual se observa que de los seis cambios, sólo uno de ellos modificó el aminoácido codificado mientras que el resto correspondió a codones sinónimos. El cambio de aminoácido fue alanina por valina, los cuales son similares en sus propiedades químicas, ambos son no polares y aunque están ubicados en una región conservada entre secuencias Rca de monocotiledóneas, esta región no forma parte de los dominios de unión al ATP ni se ha demostrado que ese aminoácido tenga en particular alguna relevancia para la regulación de RubisCO (Ayala-Ochoa *et al.* 2004).

Rca	-----MAAAFSSSTVVGAPASTPTRSSFLGKKLNKPQVSAAVTYHGKSSSSNSRFKAM	51
clon	AGSAAAPFTMAAAFSSSTVVGAPASTPTRSSFLGKKLNKPQVSAAVTYHGKSSSSNSRFKAM	60
	*****	
Rca	AAKEVDETKQTDDEDRWKGLAYDISDDQQDITRGKGLVDNLFQAPMGDGHVAVLSSYDYI	111
clon	AAKEVDETKQTDDEDRWKGLAYDISDDQQDITRGKGLVDNLFQAPMGDGHVAVLSSYDYI	120
	*****	
Rca	SQGQKSYNFDNMMDGFYIAKGFMDKLVVHLSKNFMTLPNIKVPLILGIWGGKQGKSFQC	171
clon	SQGQKSYNFDNMMDGFYIAKGFMDKLVVHLSKNFMTLPNIKVPLILGIWGGKQGKSFQC	180
	*****	
Rca	ELVFAKMGITPIMMSAGELESGNAGEPAKLIRQRYREASDLIKKGKMSCLFINDLDAGAG	231
clon	ELVFAKMGITPIMMSAGELESGNAGEPAKLIRQRYREASDLIKKGKMSCLFINDLDAGAG	240
	**** *	
Rca	RMGGTTQYTVNNQMVNATLMNIADNPTNVQLPGMYNKEDNRPVPIIVTGNDFSTLYAPLI	291
clon	RMGGTTQYTVNNQMVNATLMNIADNPTNVQLPGMYNKEDNRPVPIIVTGNDFSTLYAPLI	300
	*****	
Rca	RDGRMEKIFYWAPTREDRIGVCKGIFRTDGVDEEHVVQLVDTFPGQSIDFFGALRARVYDD	351
clon	RDGRMEKIFYWAPTREDRIGVCKGIFRTDGVDEEHVVQLVDTFPGQSIDFFGALRARVYDD	360
	*****	
Rca	EVRRWVSETGVENIARKLVNSKEGPPTFEQPKITIEKLLEYGHMLVAEQENVKRVQLADK	411
clon	EVRRWVSETGVENIARKLVNSKEGPPTFEQPKITIEKLLEYGHMLVAEQENVKRVQLADK	420
	*****	
Rca	YLNEAALGEANEDAMKTGSFFK-	433
clon	YLNEAALGEANEDAMKTGSFFK-	442
	*****	

**Figura 17.** Alineamiento de la traducción teórica de la secuencia Rca clonada en el vector pCambia3301-Rca con la secuencia protéica Rca en la base de datos NCBI (AF084478). Se observa un aminoácido diferente en la secuencia clonada.

Además de determinar la secuencia clonada de Rca, también se secuenció río arriba del sitio de inicio de la transcripción, ver figura 18. Esto es importante porque el sistema de sobreexpresión usando el promotor CAMV 35S depende de la presencia de la región mínima del promotor así como de sus potenciadores o enhancer (Benfey y Chua 1990). El alineamiento con la secuencia final Rca clonada en el vector permitió confirmar la presencia del extremo 5' de Rca así como identificar los componentes del promotor.

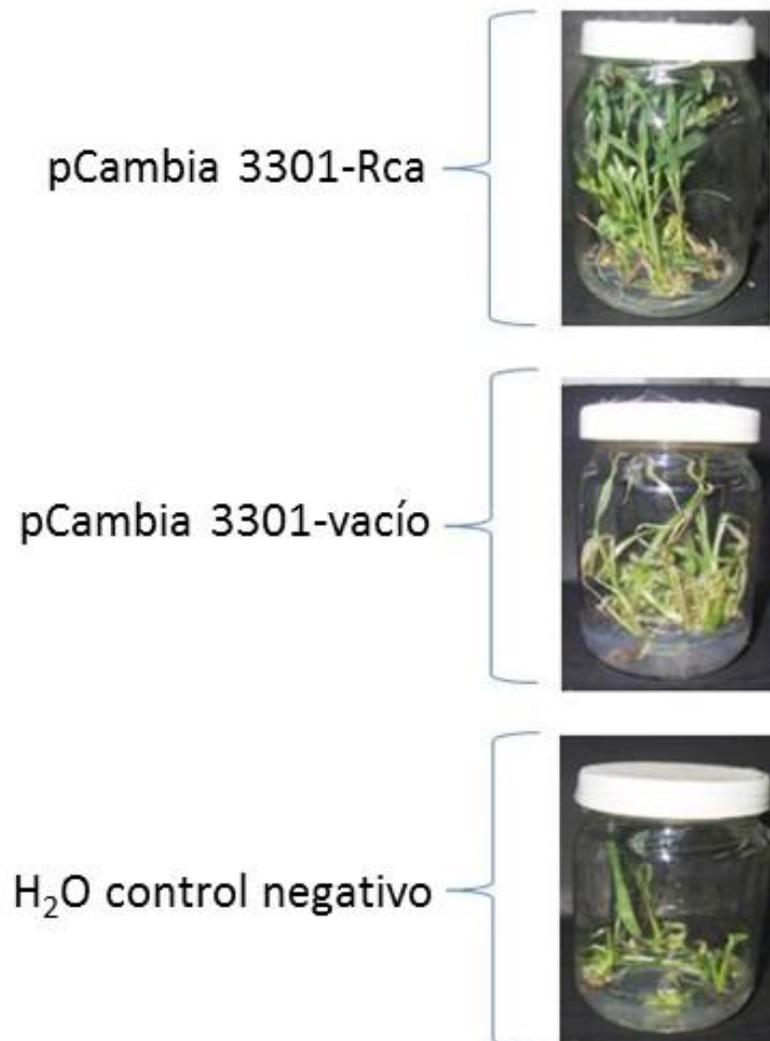
GGAAGGTAAGATTCCTCAACCTACAAATGTCAAGATCAGTCTCAGAAGACAAAGGGCTAT  
 TGAGACTTTTCAACAAAGGATAATTTCCGGAACCTCCTCGGATTCATTGCCAGCTAT  
 CTGTCACCTTCATCGAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATG  
 CGATAAAGGAAAGGCTATCATTCAGATCTCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAACACGGCCC  
 CCCACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACACGTCCTTCAAAGCAAGT  
 GGATTGATGTGACATCTCCACTGACGTAAGGGATGACCCACAATCCCACTATCCTTCCCA  
 AGACCCTTCCTCTATATAAGGAATTTCAATTCATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTATAAT  
 ATCTCTATTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACAATTACAATTACAT  
 TTACAATTACCATGGACTACAAAAGACAATGACGACAAAATCACAAGTTTGAACAAAAAAG  
 CAGGCTCCGCGGCCGCCCTTACCATGCGGCCCTTCTCTCCACCGTCGGAGCTC  
 CGGCCCTCACCCCGACCAGGACAGCTTCTCGGAAGAAGCTCAACAAGCCGACGGTGT  
 CCGCGGCCGTGACCTACCATGGCAAGAGCTCCAGCAGCAACAGCAGGTTCAAGGCGATGG.

**Enhancer**  
**Región mínima**  
**+1**

**Figura 18.** Secuenciación del enhancer y de la región mínima del promotor 35S CAMV en la construcción pCambia - Rca.

○ TRANSFORMACIÓN DE MAÍZ CON *pCambia 3301- Rca*

Tras confirmar que se clonó la región codificante de Rca en el vector de transformación transgénico, esta construcción se empleó para transformar callos embriogénicos de maíz. Para ello se empleó la técnica de biobalística tal como se describe en Materiales y Métodos. El objetivo fue transferir de forma directa el plásmido *pCambia3301 – Rca* a los callos embriogénicos de maíz. Como controles se hicieron bombardeos con el vector vacío *pCambia 3301* y con balas suspendidas en agua. El agente de selección (herbicida BASTA) se empleó durante todo el proceso *in vitro*. En la figura 19 se muestran fotografías de plántulas regeneradas con cada uno de los tratamientos a los 111 días del bombardeo que corresponde al momento en el que las plantas se transfirieron a medio MS con ácido indol butírico para permitir la formación de raíz durante el proceso de aclimatación.



**Figura 19.** Ejemplos de plántulas de maíz regeneradas a los 111 días después del bombardeo con el vector *pCambia 3301 – Rca*, vector *pCambia 3301* vacío y H<sub>2</sub>O. En todos los casos se usó el herbicida BASTA como agente de selección en medio de cultivo sólido.

La cantidad de plantas obtenidas a los 178 días del bombardeo en cada tratamiento se muestra en la tabla 7. Cabe señalar que a partir de ese momento se iniciaron los trasplantes a tierra. El proceso de regeneración de plantas se favoreció en el caso de los bombardeos realizados con el vector pCambia3301 tanto vacío, como ligado al cassette de sobreexpresión de Rca debido al gen de resistencia al herbicida BASTA que porta el vector. Aunque la cantidad inicial de callo embriogénico fue menor en el caso del vector vacío, la cantidad de plantas regeneradas se incrementó con el uso del vector comparado con la cantidad final de plántulas regeneradas en el sistema de bombardeo con agua.

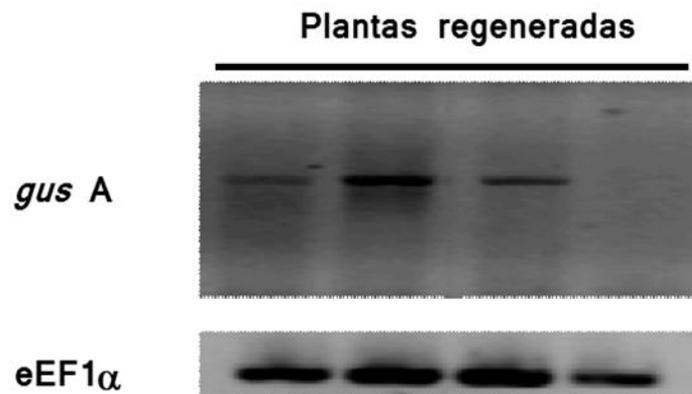
Partícula bombardeada	Masa inicial de callos (g)	*Plantas regeneradas	Plantas analizadas	Plantas con inserción de vector	Plantas sobrevivientes
<b>pCambia 3301 – Rca</b>	6	236	37	30	21
<b>pCambia 3301 – vacío</b>	1.5	31	18	15	0
<b>H<sub>2</sub>O (control negativo)</b>	1.5	3	-	-	0

Tabla 7. Resumen del ensayo de biobalística realizado para obtener plantas transgénicas sobreexpresantes de Rca. \*a 178 días del bombardeo. \*\*\*al final del ensayo

El proceso de aclimatación se refiere a la etapa en la que las plántulas regeneradas *in vitro* que han desarrollado suficientemente sus raíces, son cambiadas a envases con tierra para que continúen su desarrollo. Durante este proceso se registró un alto índice de pérdida de plántulas, razón por la cual se generaron plantas control sembradas a partir de semillas de maíz no transformado. Éstas fueron crecidas bajo las mismas condiciones de invernadero que las plantas regeneradas ya aclimatadas y son sin duda un buen control para analizar el aumento de Rca en plantas sobreexpresantes comparado con plantas no transformadas. Sin embargo, el control ideal para éste tipo de ensayos son las plantas regeneradas luego del bombardeo del vector vacío. El proceso de aclimatación es la etapa crítica para la regeneración de las plantas, es un periodo que demanda gran cantidad de insumos, espacio y experiencia para la separación de las plántulas. Para aumentar las posibilidades de éxito, se recomienda comenzar con no menos de la cantidad de callos embriogénicos usados para el bombardeo de interés. La resiembra de las plántulas al invernadero es otro paso determinante para la obtención de plantas completas hasta la formación del fruto. Cada trasplante entre distintos tamaños de macetas y hacia el sitio definitivo de siembra ocasiona estrés en las plantas, especialmente si además se requiere transportarlas a diferentes sitios. En este caso se recomienda reducir el número de trasplantes hacia el espacio definitivo de siembra con el fin de evitar la manipulación excesiva de las plantas.

○ IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS SOBREENPRESANTES DE *Rca*

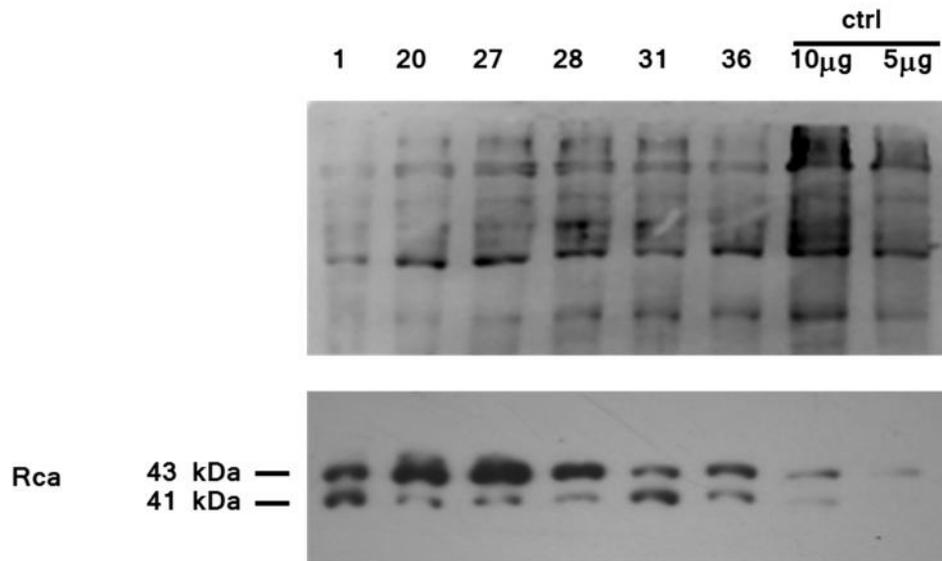
Las plantas de maíz obtenidas luego del proceso de regeneración y aclimatación fueron analizadas por PCR usando primers que amplifican al gen reportero *gus A* que confiere la resistencia al herbicida BASTA. En la figura 20 se muestra un ejemplo del análisis de cuatro plantas regeneradas de entre las cuales se encontró al gen reportero sólo en tres de ellas. Como control positivo de la reacción de PCR se amplificó un fragmento del gen del factor traduccional eEF1 $\alpha$  que está presente en todas las plantas. Durante este proceso se identificaron 30 plantas transgénicas de las cuales sobrevivieron 21 hasta la etapa de formación de semilla, lo cual, representa el 8.8 % de recuperación de eventos de transformación considerando el número de total de plantas regeneradas.



**Figura 20.** Análisis por PCR de diferentes plantas de maíz regeneradas. Las tres primeras plantas, de izquierda a derecha son transgénicas porque son positivas a la amplificación de *gus A*. Como control se muestra la amplificación de eEF1 $\alpha$  en todas las plantas.

○ CUANTIFICACIÓN DE *Rca* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS

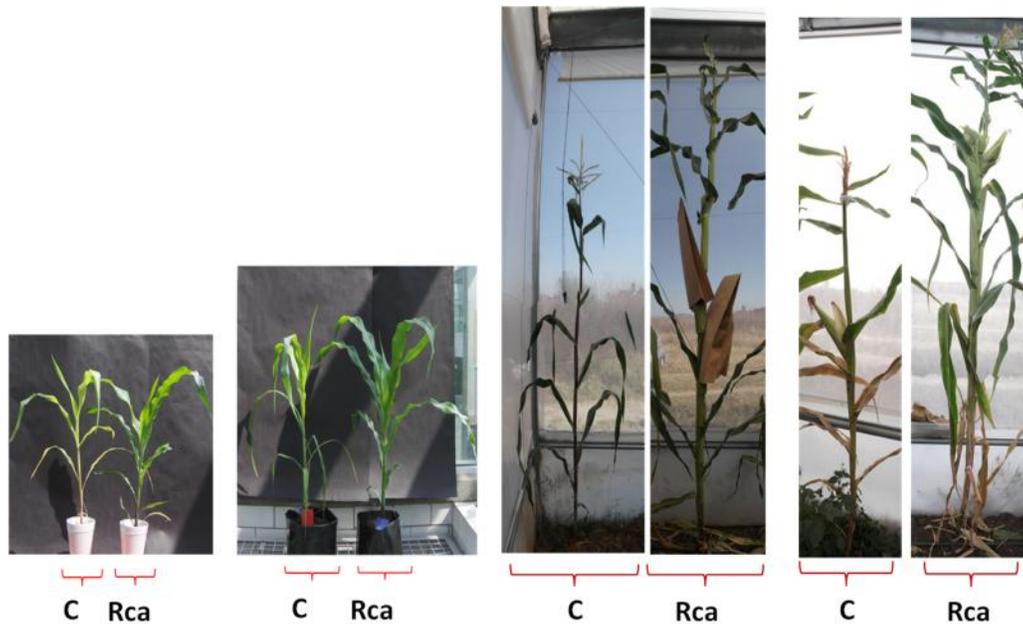
Las plantas de maíz que fueron positivas al análisis de la expresión del gen *gus A*, así como plantas control sembradas con semillas de maíz no transformado fueron analizadas durante la etapa de floración para comparar su contenido de *Rca* usando la técnica de Western blot. En la figura 21 se muestran los resultados del análisis y se observa que en extractos de proteína total, las plantas sobreexpresantes tienen mayor abundancia de la proteína *Rca* comparadas con plantas control.



**Figura 21.** Contenido de Rca en seis plantas transgénicas sobreexpresantes de Rca y en plantas control. En la parte superior se muestra como control de carga la tinción de la membrana usada para el inmunoanálisis.

#### ○ ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

Las plantas transgénicas sobreexpresantes de Rca fueron monitoreadas durante su desarrollo. La principal característica que se observó fue que las plantas sobreexpresantes mostraron mayor vigor durante todas las etapas de su crecimiento comparadas con las plantas control (ver figura 22). Ésto se verificó al analizar gráficamente las medidas de altura, diámetro basal y número de hojas. En la figura 23 se muestran las gráficas de estas mediciones.

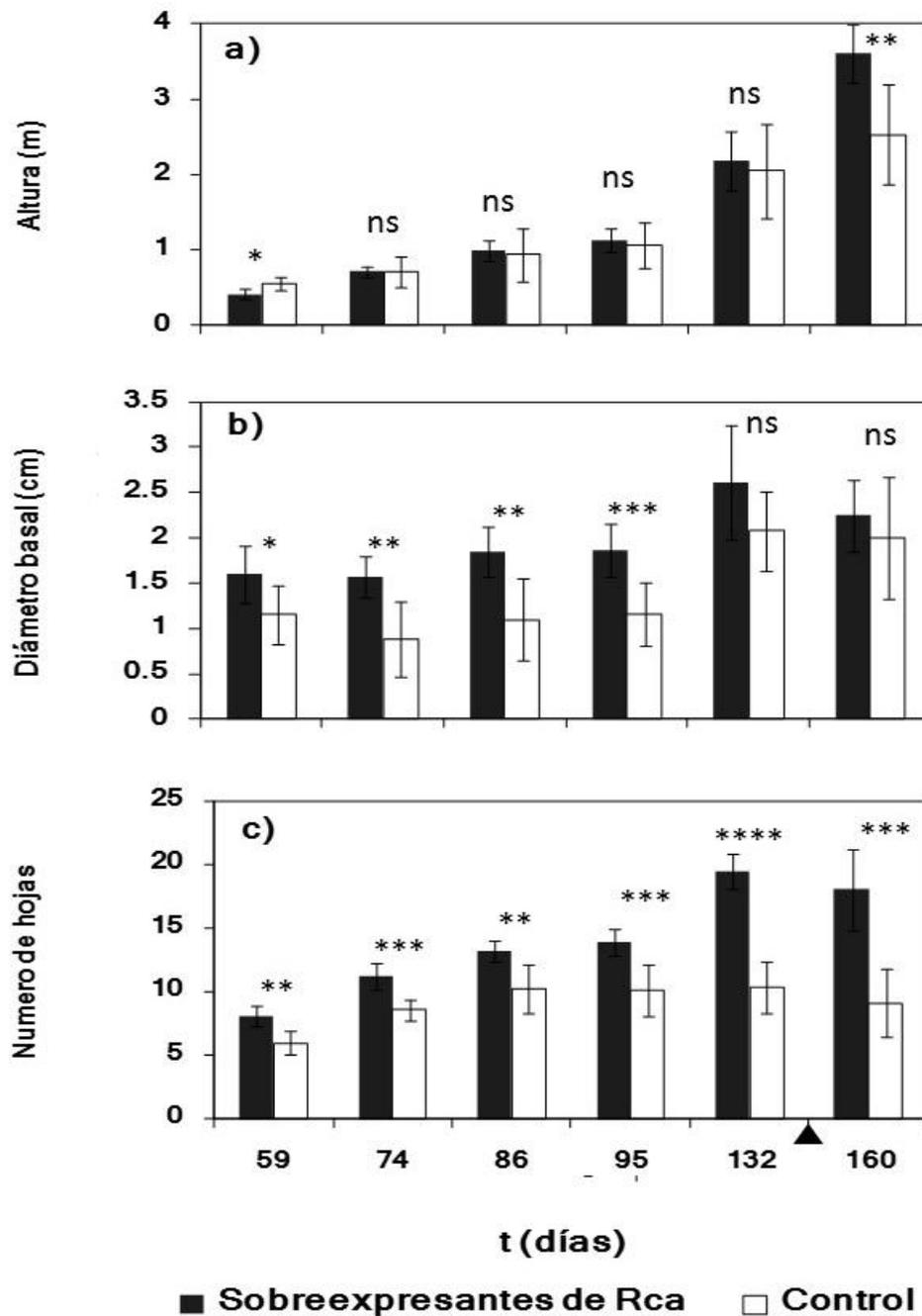


**Figura 22.** Plantas transgénicas sobreexpresantes de Rca (Rca), comparadas con plantas control (C), a lo largo de su desarrollo.

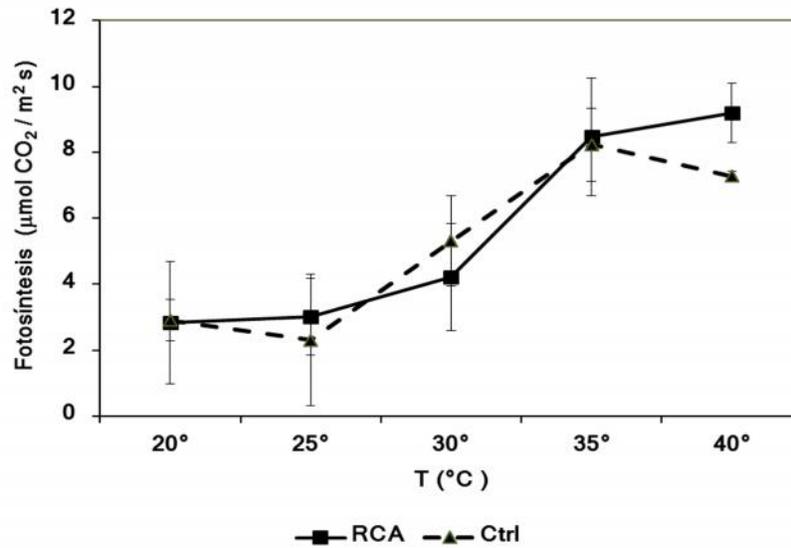
El rendimiento y la aclimatación de un cultivo dependen de varios factores relacionados con su propia fisiología por ejemplo, la cantidad y el tamaño de sus órganos, la arquitectura de la planta, la arquitectura de sus células, la velocidad de senescencia de las hojas, el desarrollo radicular, la captación de nutrientes y el vigor del crecimiento inicial. En consecuencia, cada cultivo responde de manera diferencial ante estímulos ambientales y/o cambios inducidos en su expresión genética. Por ejemplo, para el cultivo de arroz se demostró que la sobreexpresión de Rca favorece la velocidad de fijación del CO<sub>2</sub> atmosférico, sólo en condiciones oscilantes de luz y temperatura (Yamori *et al.* 2012), puesto que durante condiciones ambientales estacionarias no se observaron cambios ni en su capacidad fotosintética ni en su rendimiento (Fukayama *et al.* 2012).

Las plantas transgénicas sobreexpresantes de Rca de maíz mostraron mejorías significativas en parámetros relacionados con el rendimiento tal como el número de hojas que se incrementó durante prácticamente todo su desarrollo y la altura, la cual, aumentó durante la etapa de floración.

De acuerdo con las medidas del diámetro basal de los tallos entre plantas control y transgénicas, el vigor inicial de estas últimas se favoreció desarrollando tallos más gruesos durante las primeras etapas especialmente en el intervalo de los 74 a 95 días. Experimentalmente, esta característica fue útil porque las plantas inicialmente más fortalecidas continuaron con su desarrollo de forma exitosa. También se encontró que el intercambio de CO<sub>2</sub> a 40°C se incrementa en las hojas de plántulas sobreexpresantes comparadas con plantas control, ver figura 24.



**Figura 23.** Gráficos de a) altura, b) diámetro basal y c) número de hojas en plantas transgénicas sobreexpresantes de Rca comparadas con plantas control. ▲ marca la etapa de floración. En la parte superior de las barras: resultado del análisis t de student, n= 9. ns diferencia no significativa  $P < 0.05$ , \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* diferencias significativas  $P < 0.05$ ,  $< 0.005$ ,  $< 0.0005$  y  $< 0.00005$  respectivamente.



**Figura 24.** Fotosíntesis neta de plántulas transgénicas sobreexpresantes de Rca comparadas con plántulas control.

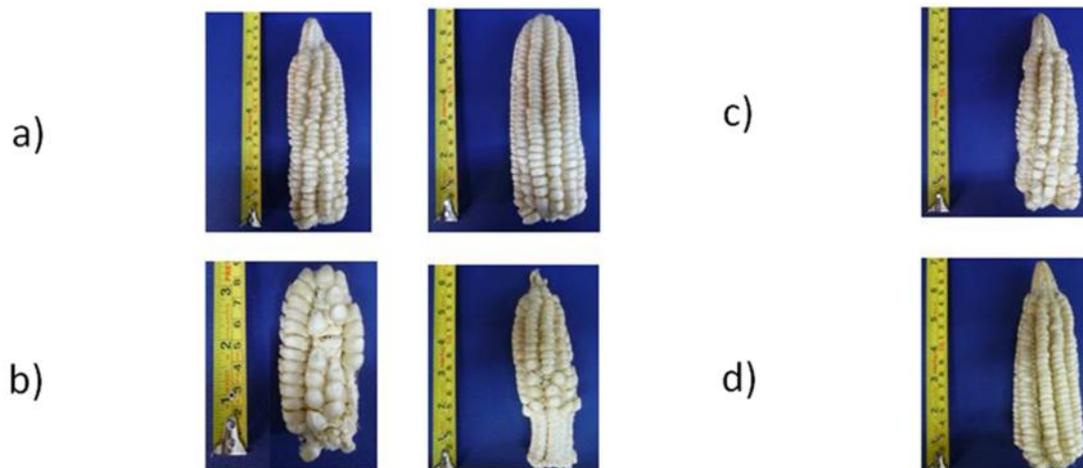
Si bien se encontraron diferencias significativas entre plantas sobreexpresantes y plantas control, cabe señalar que no toda la población de sobreexpresantes fue homogénea. Dentro de este grupo de plantas encontramos varianza en los parámetros que se midieron (ver valores de desviación estándar en las gráficas de la figura 23). Una de las variaciones detectadas fue la longitud de las hojas. Por ello y con el fin de establecer un punto de comparación, se escogió la hoja inmediata superior al fruto de cada planta cuando éstas alcanzaron su máximo de crecimiento (en el caso de plantas con dos mazorcas se eligió la hoja del fruto superior) y se tomaron medidas del área foliar. Los resultados mostrados en la figura 25 hacen evidente la variación observada en este grupo de plantas.

Finalmente, se recolectaron las mazorcas y se midieron diferentes parámetros relacionados con el rendimiento del maíz. En este punto del experimento sobrevivieron 21 plantas transgénicas sobreexpresantes de Rca que produjeron 25 mazorcas, de las cuales, el 58 % mostraron llenado completo de grano, es decir mazorcas repletas de semillas. Estas mazorcas (ver figura 26), son blancas, con una longitud que va desde 10 cm hasta 17 cm, con 10 hileras de grano, de 16 a 35 granos por hilera y con un promedio de peso de grano por mazorca de 101.7 g. En contraste, las plantas control no produjeron mazorcas completas debido probablemente al estrés causado por los transplantes entre maceta y suelo. Cabe destacar que las plantas transgénicas sobreexpresantes de Rca tuvieron el mismo tratamiento, lo cual refuerza la observación de que éstas fueron más vigorosas que las plantas control.



Tipo de maíz	Altura de planta (cm)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )
++Rca	361	782
Ctrl	253	206

**Figura 25.** Largo de hoja alcanzado en plantas transgénicas sobreexpresantes de Rca (++ Rca) y plantas control. En la tabla se muestran los valores promedio de altura y área foliar.



**Figura 26.** Ejemplo de mazorcas obtenidas de plantas transgénicas sobreexpresantes. Algunas de ellas (a) y (b) generaron dos mazorcas.

Si bien estas observaciones fenotípicas no son concluyentes debido a la baja cantidad de plantas analizadas, los datos recolectados señalan que la sobreexpresión de Rca brindó a las plantas beneficios en cuanto a su vigor inicial que se manifestó posteriormente en la oportuna producción de su fruto bajo las limitaciones experimentales de siembra y resiembra utilizadas. Por otra parte, los análisis del cultivo de maíz en ambientes enriquecidos de CO<sub>2</sub> han demostrado que, similar a otros cultivos C<sub>4</sub>, la fotosíntesis no está directamente estimulada por el aumento en la concentración del CO<sub>2</sub> ambiental, pues debido a su estructura y características celulares el carbono disponible está concentrado en las inmediaciones de las células del haz vascular y por tanto en ambientes enriquecidos de CO<sub>2</sub> el factor limitante es la actividad carboxilasa de RubisCO. Excepto cuando las plantas son sometidas a condiciones de sequía, el enriquecimiento de CO<sub>2</sub> en el ambiente, sí estimula al proceso fotosintético (Leakey *et al.* 2009). En éste sentido, las plantas sobreexpresantes de Rca demostraron indirectamente un incremento en la actividad de la enzima RubisCO, manifestada como un aumento en la generación de biomasa bajo condiciones atmosféricas de CO<sub>2</sub>. Esto señala a las plantas sobreexpresantes de Rca como un modelo valioso para evaluar la capacidad fotosintética máxima del maíz en ambientes enriquecidos con CO<sub>2</sub> y/o bajo condiciones de estrés por sequía.

## • SOBREENPRESIÓN ISOGÉNICA DE Rca

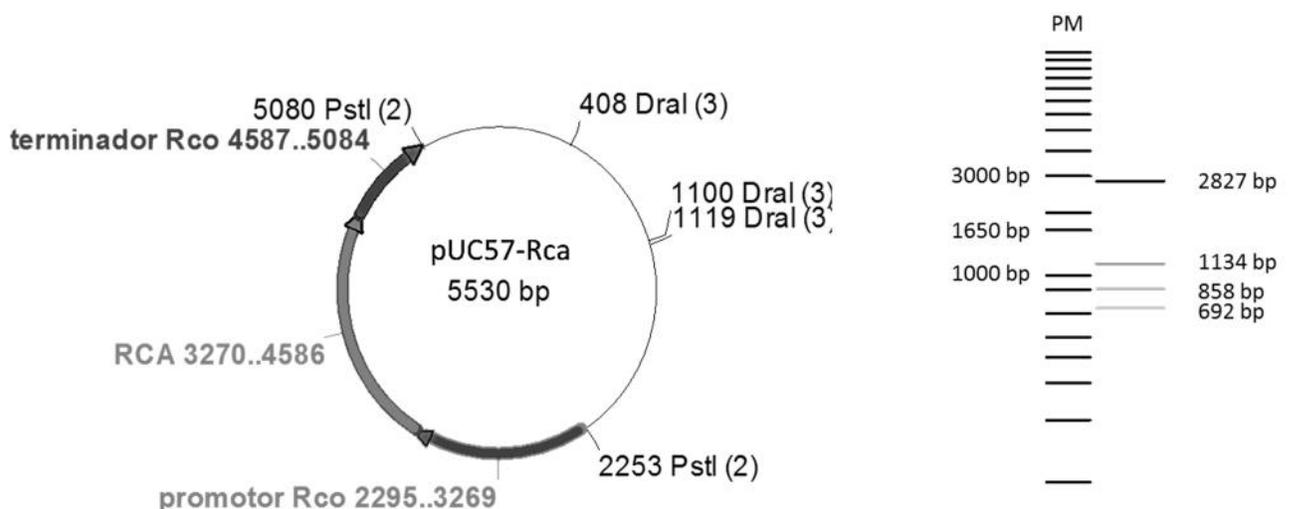
Los resultados de la sobreexpresión transgénica fueron útiles para evaluar la funcionalidad de la sobreexpresión de Rca en el maíz facilitando la detección de las plantas transformantes gracias al gen de selección. Sin embargo, la aplicación del método transgénico no es funcional para el cultivo del maíz debido a la persistencia indefinida de secuencias transgénicas en las plantas descendientes y por la incertidumbre acerca de los efectos a largo plazo que causa este procedimiento sobre el ecosistema. Es por ello que después de conocer los resultados de la sobreexpresión transgénica se inició la transformación isogénica con la finalidad de aumentar la concentración celular de la misma proteína, pero usando una secuencia lineal sin genes de selección.

### ○ OBTENCIÓN DE CASSETTE DE SOBREENPRESIÓN ISOGÉNICO

Para obtener el cassette isogénico Rco-Rca-Rco (en adelante llamado Rco-Rca), se aisló al plásmido nombrado pUC57-Rco-Rca-Rco, el cual contiene a la secuencia optimizada de la región codificante de Rca, unida al promotor y al terminador tejido específico de la subunidad pequeña de la enzima RubisCO.

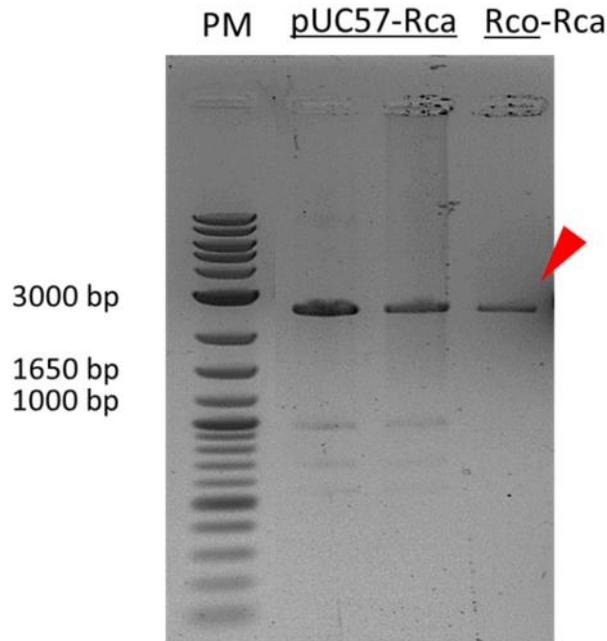
El plásmido pUC57-Rca fue fragmentado con las enzimas de restricción que se señalan en la figura 27.

Usando la enzima de restricción Dra I, fue posible cortar las fracciones del plásmido que no se requieren en la planta, al tiempo que se facilitó el aislamiento del cassette.



**Figura 27.** Patrón de restricción del plásmido pUC57-Rca, se señalan las posiciones de inicio y término de las tres secuencias del cassette de sobreexpresión Rco-Rca. También se indican los sitios y (número) de cortes de las enzimas usadas para su aislamiento. A la derecha se muestra la digestión teórica del plásmido usando las enzimas señaladas. El cassette Rco-Rca tiene 2827 bp

En la figura 28 se demuestra que sí fue posible el aislamiento del cassette de sobreexpresión isogénica Rco-Rca diseñado a partir de secuencias encontradas en el genoma del maíz. En la figura se observan la reacción de digestión del plásmido y la separación de los fragmentos obtenidos, tal como se esperaba, de acuerdo al patrón de restricción de la figura 27. A partir del gel de agarosa se aisló al fragmento de 2827 bp, que corresponde al cassette de expresión isogénica Rco-Rca.



**Figura 28.** Digestión del plásmido pUC7-Rca. Se muestran dos reacciones de digestión del plásmido pUC57-Rca. En el último carril a la derecha, se señala la extracción del fragmento que corresponde al cassette Rco-Rca (2827 bp).

#### ○ TRANSFORMACIÓN DE MAÍZ CON CASSETTE ISOGÉNICO

Para obtener el maíz isogénico sobreexpresante de la proteína Rca se empleó la técnica de biobalística para transferir de forma directa y aleatoria al cassette Rco-Rca en callos embriogénicos de maíz. Los callos sometidos a los disparos fueron subcultivados hasta inducir el proceso de regeneración de las plántulas, siempre usando medios de cultivo libres de agentes de selección. En la figura 29 se muestra un ejemplo del estado de regeneración de las plantas a los 111 días después del bombardeo. Como control negativo se hizo un bombardeo con balas suspendidas en agua, aunque no se obtuvieron plantas completas de este tratamiento. Debido a esto, se sembraron semillas del mismo tipo de maíz que se usó para generar los callos embriogénicos. Dichas plantas crecieron bajo las mismas condiciones de invernadero que las plantas regeneradas y aclimatadas previamente y se usaron como

controles de referencia para evaluar la expresión de Rca en las plantas isogénicas identificadas. Sin embargo, el control ideal son las plantas sin transformar obtenidas también del bombardeo de partículas suspendidas en agua, pues brindan información valiosa acerca del efecto del sistema *in vitro* sobre el fenotipo. Si bien durante este ensayo se mejoró la capacidad para regenerar plantas (ver sección “Transformación de maíz con pCambia 3301- Rca”) y se redujo el número de trasplantes, las posibilidades de obtener plantas control se redujo al limitar la cantidad de plantas regeneradas. En la tabla 8, se muestra la cuantificación de plántulas regeneradas a los 173 días después del bombardeo. En ella se puede observar que se obtuvieron más plantas a partir de los callos bombardeados con el cassette Rco-Rca. Debido a que no se usó ningún factor de selección en la construcción, el incremento de regenerantes se debió principalmente a que la disponibilidad de frascos y medios de cultivo fue limitada, por lo que en todo momento se favoreció la recuperación de las plantas a partir de los callos bombardeados con el cassette Rco-Rca y en consecuencia se regeneraron más plantas.

Cassette isogénico  
Rco - Rca



H<sub>2</sub>O, control  
(-)



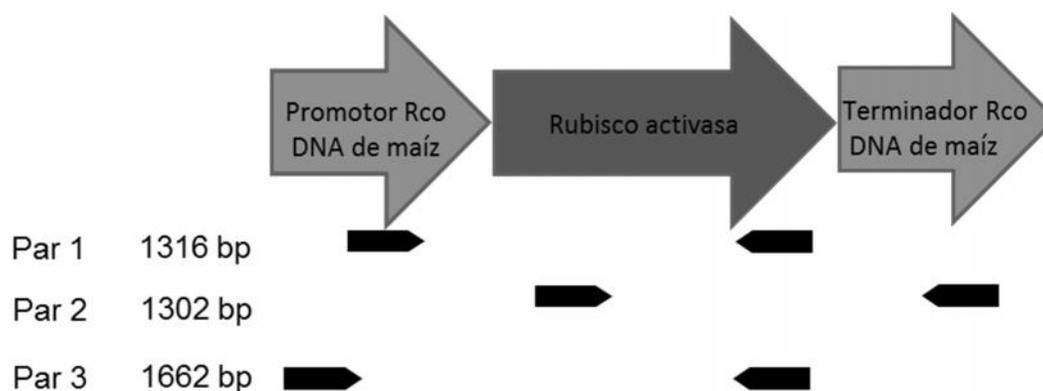
**Figura 29.** Ejemplos de plántulas de maíz regeneradas a partir de callos embriogénicos de maíz. Fotos tomadas a 111 días después del bombardeo con el cassette isogénico Rco-Rca y con balas suspendidas en H<sub>2</sub>O. No se usaron agentes de selección en los medios de cultivo.

Partícula bombardeada	Masa inicial de callos (g)	*Plantas regeneradas	Plantas analizadas	Plantas con inserción de cassette	***Plantas sobrevivientes
<b>Cassette Rco-Rca</b>	3	164	20	9	5
<b>H<sub>2</sub>O (control negativo)</b>	3	87	-	-	0

Tabla 8. Resumen del ensayo de biobalística realizado para obtener plantas isogénicas sobreexpresantes de Rca. \* a 173 días después del bombardeo. \*\*\*al final del ensayo

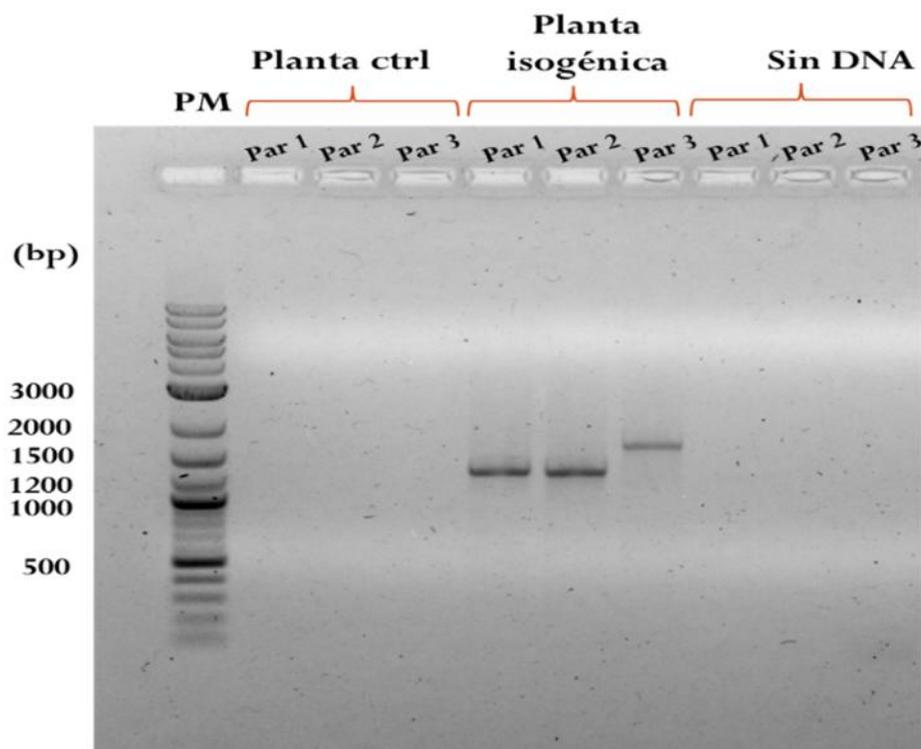
○ IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS ISOGÉNICAS SOBREENPRESANTES DE Rca

Las plantas de maíz obtenidas luego del proceso de regeneración y aclimatación, así como las plantas control generadas a partir de semillas de maíz no transformado, fueron analizadas por PCR usando muestras de hojas y oligonucleótidos que amplifican las uniones quiméricas de Rca con el promotor y/o el terminador de la enzima RubisCO. En la figura 30 se señalan los pares de oligonucleótidos usados para la identificación de las plantas que insertaron dicha construcción. Durante esta etapa se identificaron 9 plantas cisgénicas, pero sólo sobrevivieron 5 hasta la etapa de floración, es decir el 3 % de eventos recuperados, considerando la cantidad inicial de plantas regeneradas.

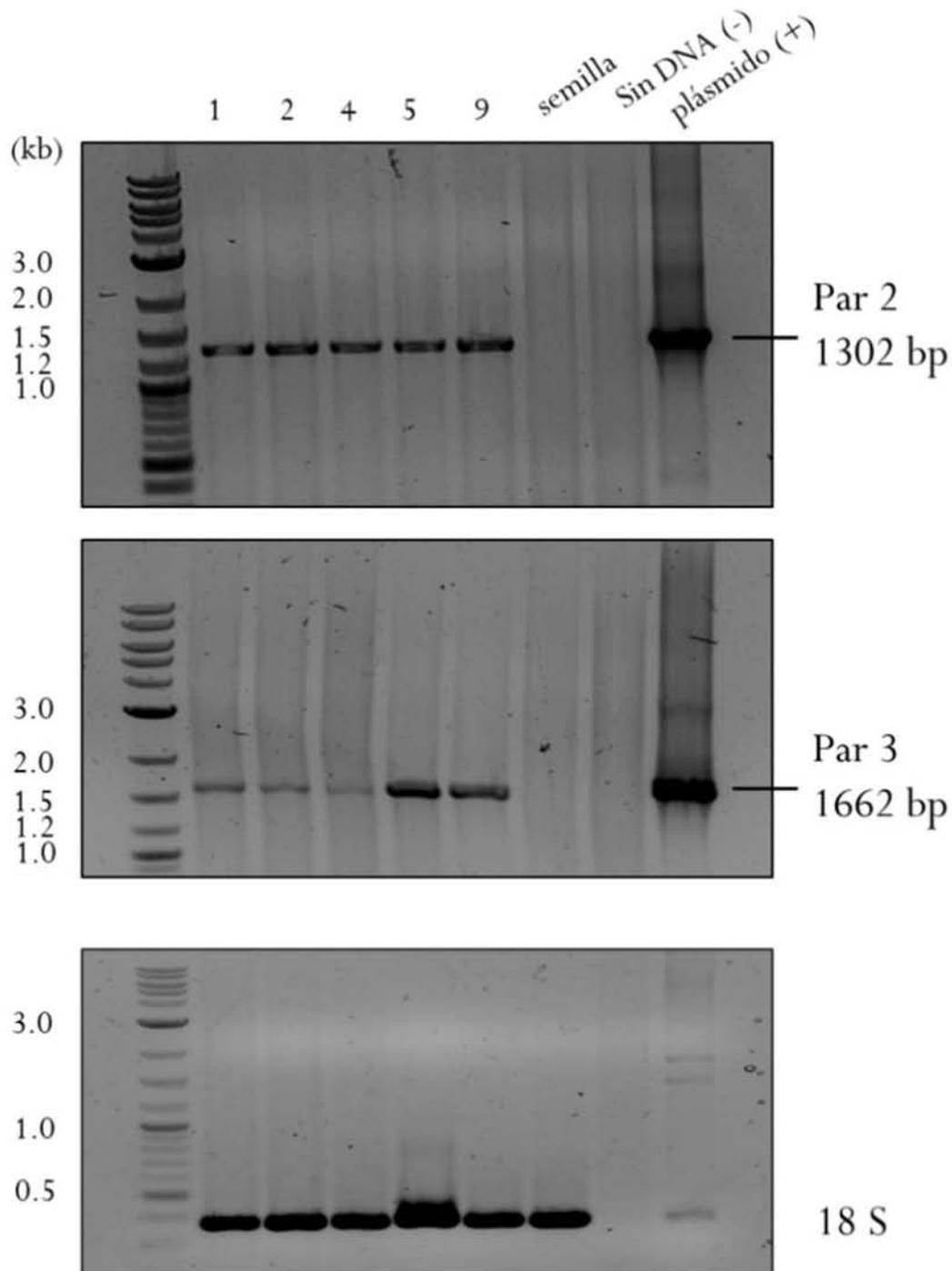


**Figura 30.** Oligonucleótidos usados para la identificación de las plantas que integraron el cassette isogénico Rco-Rca. Los oligos se diseñaron para amplificar las uniones quiméricas de las tres secuencias que componen al cassette Rco-Rca

En la figura 31 se muestra un ejemplo del análisis de identificación de una planta isogénica, comparada con una planta control. En la planta isogénica amplifican los tres pares de oligonucleótidos descritos en la figura 30. Como control negativo se muestran las reacciones de amplificación sin molde y las reacciones de amplificación cuando se usa el DNA de una planta sin transformar. La figura 32 muestra el resultado de la identificación de las 5 plantas isogénicas obtenidas, en ella se observa la presencia de los fragmentos amplificados por los pares de oligonucleótidos 2 y 3, los cuales en suma, indican la inserción del cassette Rco-Rca completo.



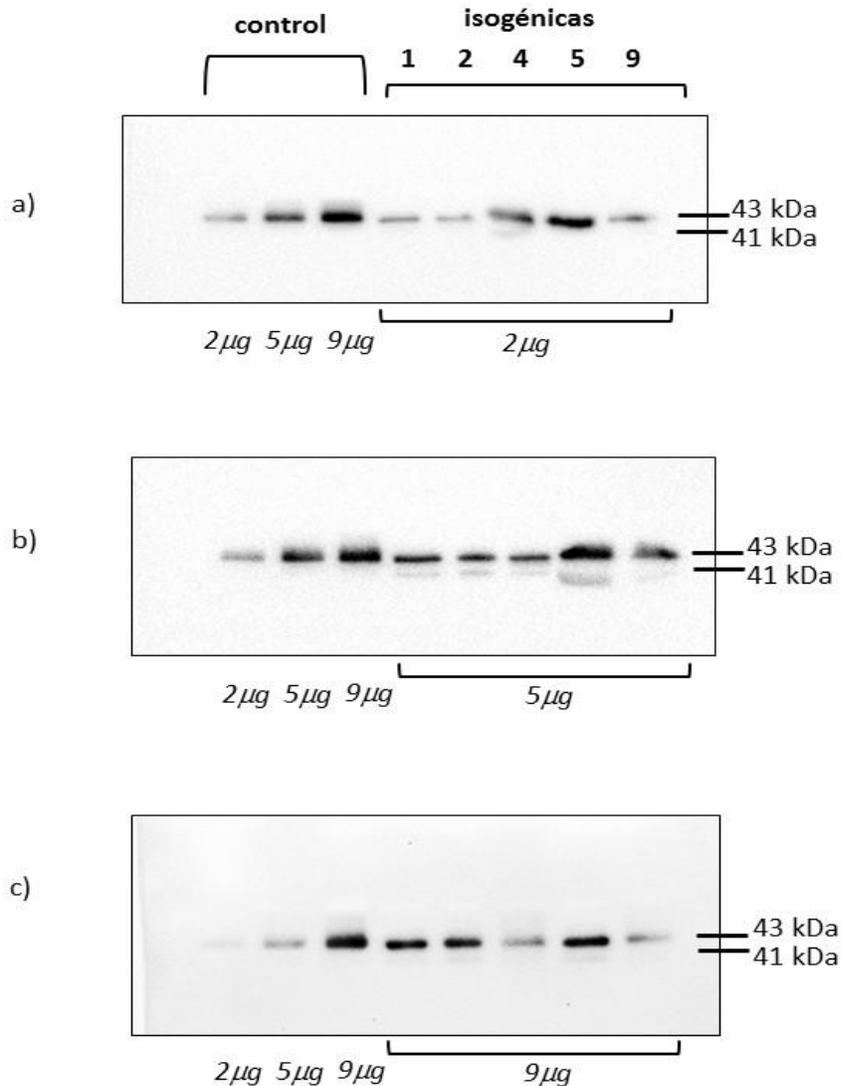
**Figura 31.** Identificación de planta isogénica. Se muestra la amplificación de tres diferentes fragmentos que indican la presencia del cassette Rco-Rca en el DNA de la planta.



**Figura 32.** Amplificación de dos fragmentos del cassette Rco-Rca en cinco plantas isogénicas. Se muestran como controles negativos las amplificaciones a partir de plantas sembradas con semilla de maíz sin transformar y PCR sin molde. Como controles positivos, la amplificación usando el plásmido pUC7-Rca y oligos para amplificar gen 18S

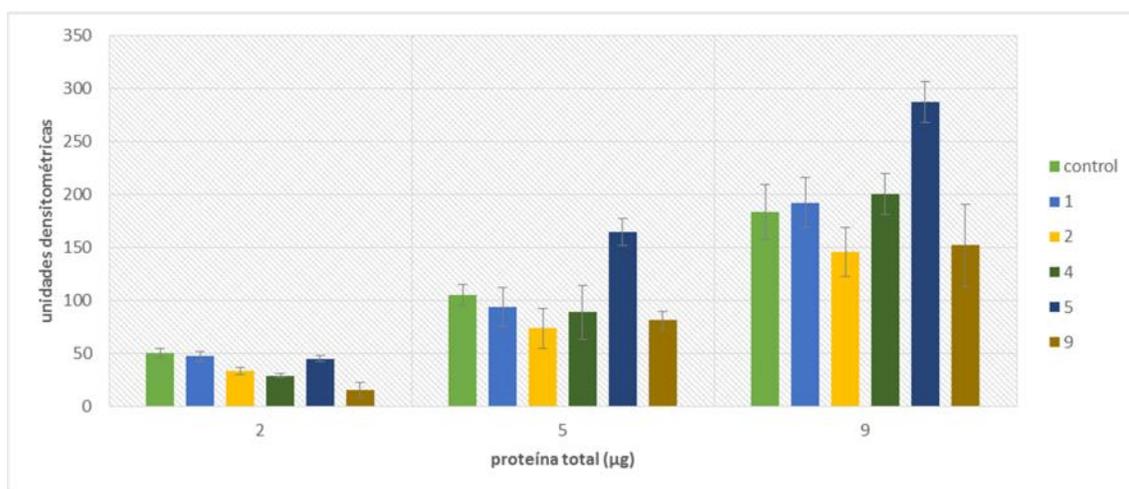
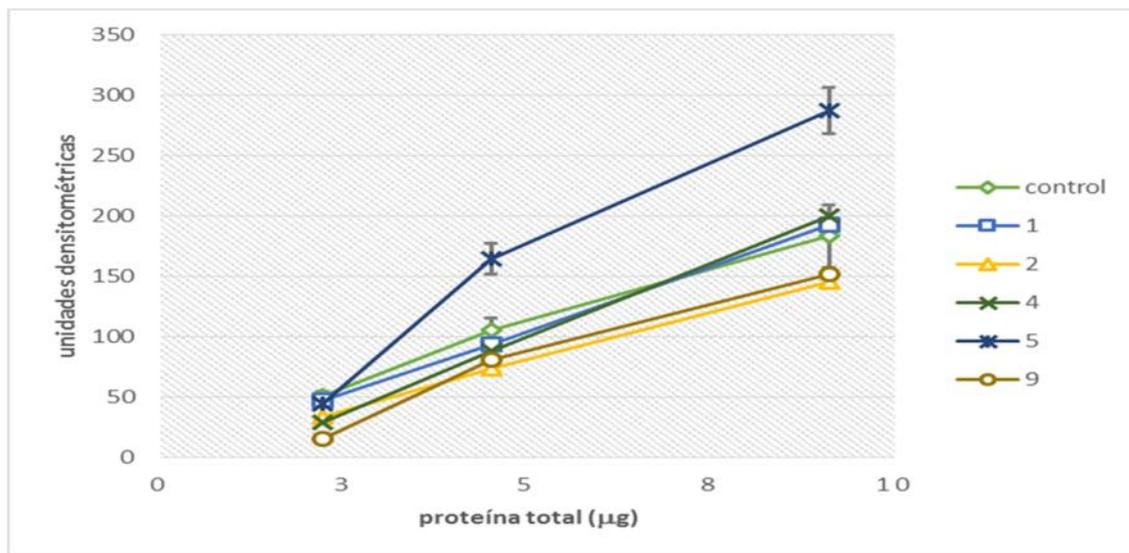
○ CUANTIFICACIÓN DE Rca EN PLANTAS ISOGÉNICAS

Las plantas de maíz que fueron positivas a la identificación de la inserción del cassette Rco-Rca, así como las plantas control sembradas con semillas de maíz no transformado, fueron analizadas durante la etapa de llenado de grano para comparar su contenido de Rca usando la técnica de Western blot. En la figura 33 se muestran los resultados del análisis y se observa que en extractos de proteína total de hojas durante la etapa de floración, la planta isogénica 5, expresa mayor contenido de Rca comparada con las plantas control.



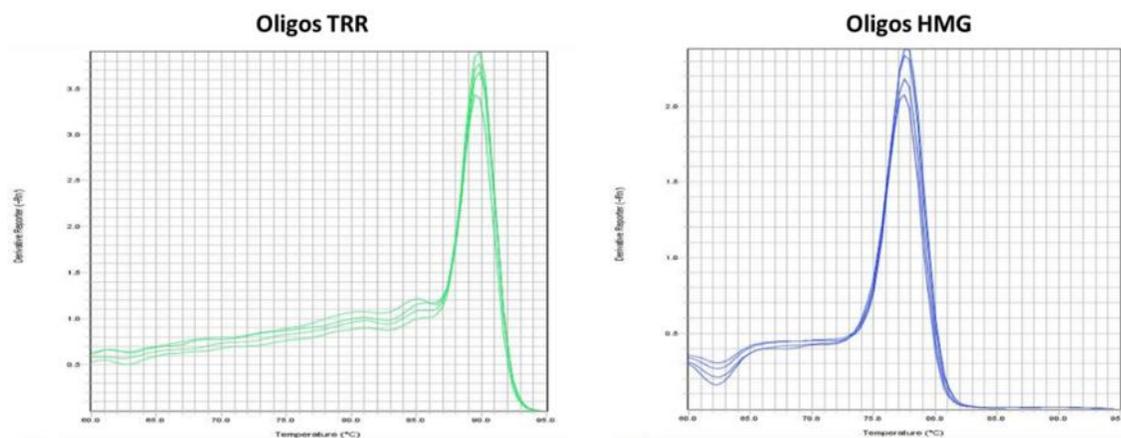
**Figura 33.** Inmunodetección de Rca (41 y 43 kDa) en extractos de proteína total de hojas de maíz en etapa de floración, tanto de plantas isogénicas, como de plantas control. En la parte superior de la figura se señala el nombre y tipo de planta. En la parte inferior de cada imagen se indica la cantidad de proteína total analizada en las plantas isogénicas: a) 2 µg, b) 5 µg, c) 9 µg. En cada análisis se incluyeron 2, 5 y 9 µg de proteína total de las plantas control para estandarizar el análisis por densitometría.

Los resultados mostrados en la figura 33, así como sus réplicas, fueron analizados por densitometría para determinar semi-cuantitativamente el contenido promedio de Rca de las plantas isogénicas comparadas con las plantas control. En la figura 34 se observan diferentes gráficas del análisis densitométrico realizado. En dichas gráficas, se confirmó que sólo la planta número 5 mostró un incremento de alrededor del 50 % respecto de las plantas control. En las gráficas también se puede apreciar que cuando se analizan 2  $\mu\text{g}$  de proteína total, la diferencia detectada en el contenido de Rca entre las plantas control y la planta 5 se minimiza. Esto se atribuye a que la cantidad de proteína total analizada es muy baja, lo cual, genera falsos negativos. Es por ello que el análisis se realizó con diferentes cantidades de extracto de proteína total.



**Figura 34.** Diferentes representaciones gráficas del mismo análisis densitométrico basado en la inmunodetección de Rca en las plantas isogénicas 1, 2, 4, 5 y 9, así como en plantas control.

Las plantas isogénicas identificadas también fueron analizadas para determinar la expresión de Rca en términos de su mRNA. Esto se realizó mediante qRT-PCR amplificando cDNA con los oligonucleótidos específicos llamados TRR. También se usaron los oligos Hmg para amplificar un fragmento del gen Hmg como control de normalización (descripción detallada en el capítulo Materiales y Métodos). Para ello, primero fue necesario demostrar que los oligos TRR y Hmg amplifican de manera única y específica a la secuencia en cuestión. En la figura 35 se muestran las curvas de disociación para cada par de oligonucleótidos usando diferentes cantidades de cDNA de plantas control como molde: 1200 ng, 600 ng, 300 ng y 75 ng. La detección de una sola señal de fluorescencia a la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) de los oligos indicó que sólo se amplificó un producto y en consecuencia estos cebadores son adecuados para el análisis qRT – PCR.



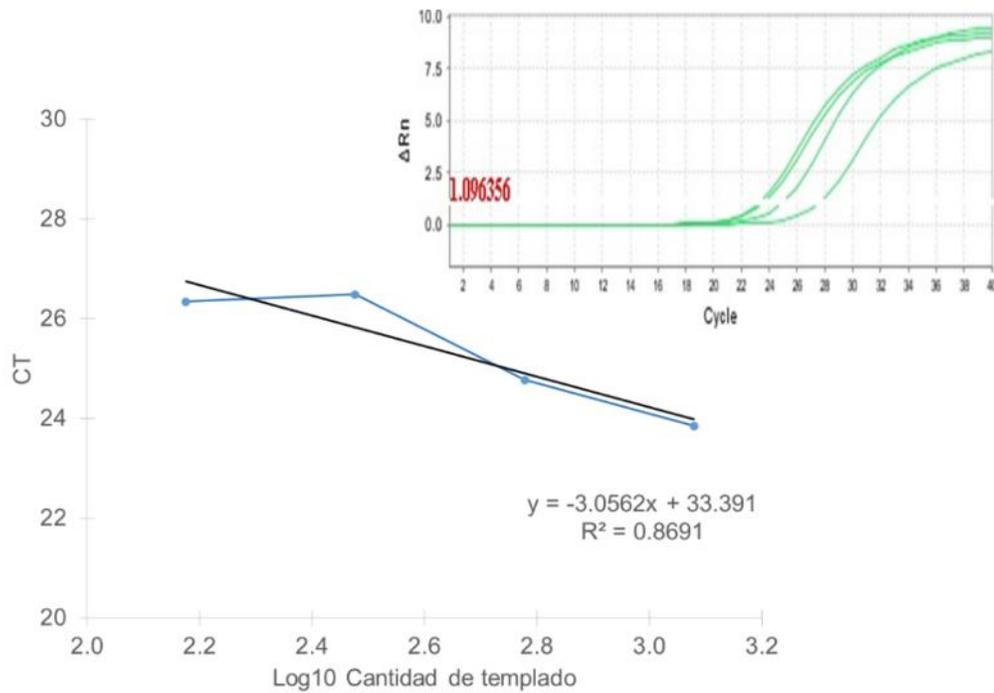
**Figura 35.** Curvas de disociación para los oligonucleótidos usados para el análisis de expresión del mRNA de Rca. Los oligos TRR son específicos para Rca. La amplificación de Hmg se usó como control de normalización.

Además de evaluar la disociación de los oligos, también se calculó la eficiencia de las reacciones de qRT –PCR. En las figuras 36 y 37 se observan las curvas de amplificación usando los oligonucleótidos TRR y Hmg con cantidades crecientes de cDNA. A partir de estas curvas se construyeron las gráficas para calcular el porcentaje de eficiencia de la amplificación con la siguiente ecuación:

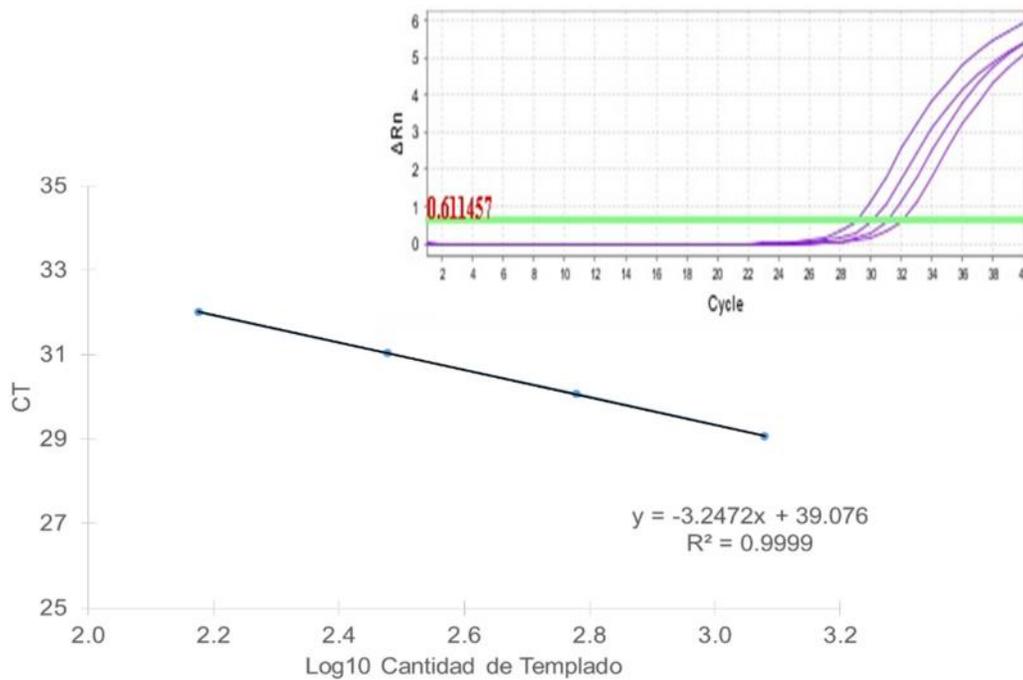
$$(10^{-1/m} - 1) * 100 \%$$

m = valor de la pendiente.

Este análisis se realizó por triplicado y los resultados demostraron que la eficiencia calculada fue de 110% para la amplificación de Rca y 103 % para la amplificación del gen Hmg. Comúnmente se esperan valores de eficiencia cercanos al 100 % para un análisis confiable de qRT – PCR (Pfaffl 2001).

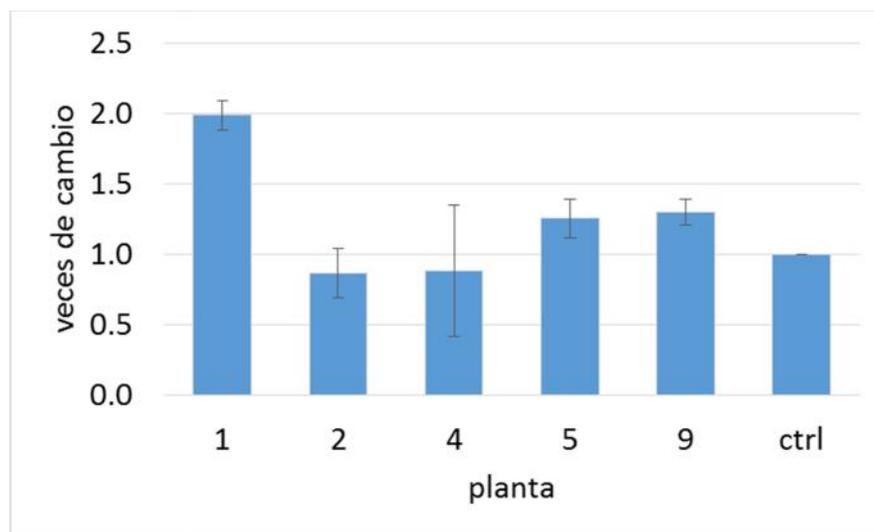


**Figura 36.** Curva de eficiencia obtenida a partir de cDNA y oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de la región codificante de Rca (oligos TRR).



**Figura 37.** Curva de eficiencia obtenida a partir de cDNA y oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento del gen para normalización, Hmg.

Una vez concluida la fase de estandarización de las condiciones de reacción para la qRT-PCR se analizó simultáneamente el cDNA de hojas de maíz isogénico y sus controles. La cuantificación del mRNA de Rca se detectó usando los oligos TRR y como control la abundancia relativa del mRNA del gen Hmg. Los resultados se observan en la figura 38, en la cual se puede apreciar que la cantidad del mRNA que codifica Rca es variable entre muestras isogénicas. Así la planta 1 registró hasta 2 veces más RNA que la planta control mientras que las plantas 5 y 9 observaron alrededor de 25% más RNA, aunque en el análisis de proteína (ver figura 34), sólo la planta número 5 mostró aumento significativo en la expresión de Rca.



**Figura 38.** Contenido relativo de mRNA de Rca en plantas isogénicas sobreexpresantes de Rca, respecto a plantas control durante la etapa de floración. El eje vertical señala las veces de cambio en abundancia del mRNA de Rca.

#### ○ DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DEL CASSETTE ISOGÉNICO

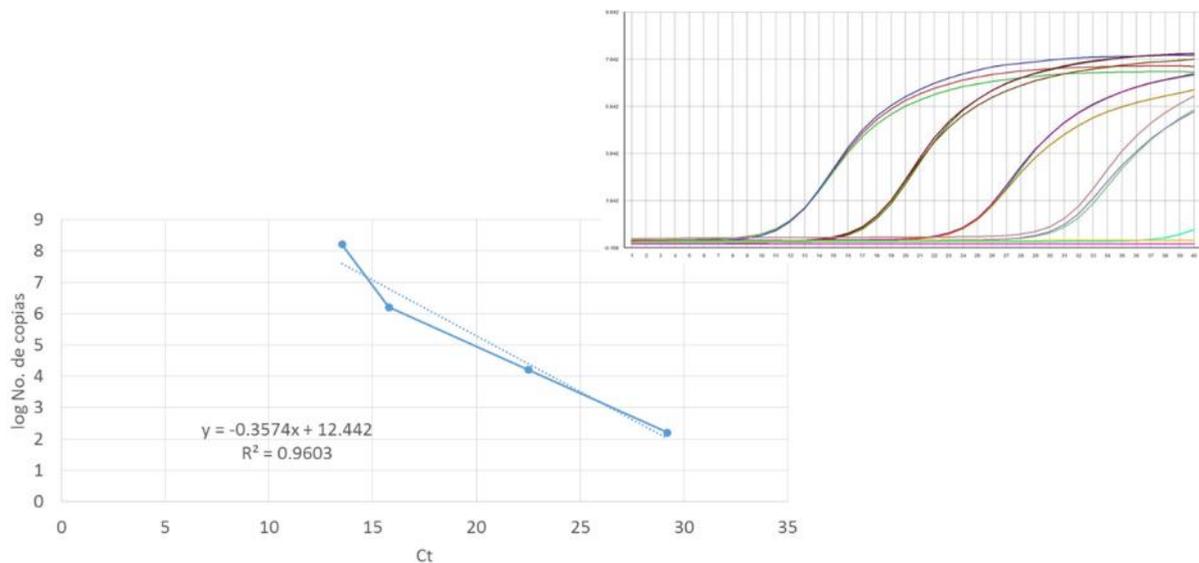
Por otra parte también se evaluó el número de copias del cassette Rco-Rca insertadas en el genoma de cada planta isogénica y se comparó con las plantas control no transformadas. Para ello se buscó la señal de amplificación de una región en la secuencia traducible de Rca (oligos TRR). Los resultados se intrapolaron en una curva estándar con diluciones seriales del plásmido pUC57-Rca, el cual contiene la región codificante de Rca. Debido a que se conoce el peso molecular del plásmido pUC57-Rca se puede calcular el número de copias que hay en cada punto de la curva estándar, dichos valores se muestran en la tabla 9 y en la figura 39 se observa su representación gráfica. Cabe señalar que la curva estándar se repitió cada vez que se analizaron las muestras de DNA genómico de las plantas isogénicas. Adicionalmente, la expresión del gen Hmg se usó para normalizar los resultados obtenidos en la cuantificación.

Cantidad de plásmido (pg)	1000	10	0.1	0.001
No. de copias del cassette	$1.6 \times 10^8$	$1.6 \times 10^6$	$1.6 \times 10^4$	$1.6 \times 10^2$

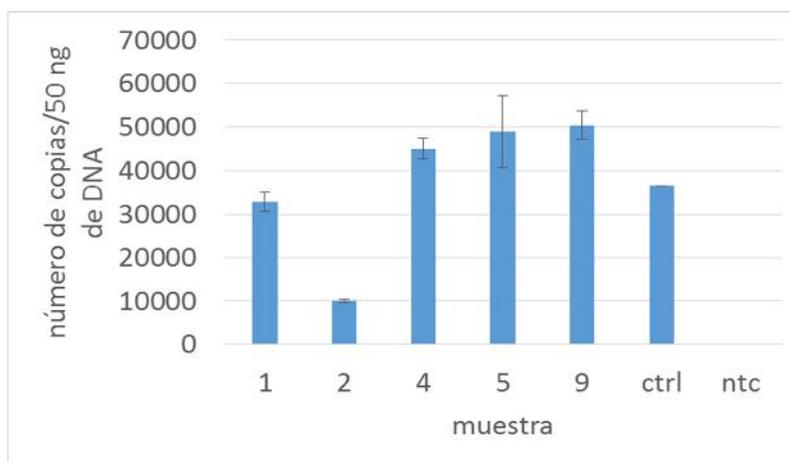
Tabla 9. Parámetros de curva estándar para cuantificar el cassette isogénico.

La figura 40 muestra la gráfica del análisis completo, en ésta se puede observar que en los 50 ng de DNA evaluado, las muestras 4, 5 y 9 registran de 10,000 a 20,000 copias más de Rca respecto al control, mientras que la planta 1 no muestra muchas más inserciones que el control. En la planta número 2 se encontró una cantidad menor de Rca comparada con el control. Este fenómeno es difícil de explicar porque no se espera que una planta contenga menor cantidad de copias de Rca que una planta no modificada. Lo más probable es que se trate de fallas experimentales en la detección de esta muestra en particular.

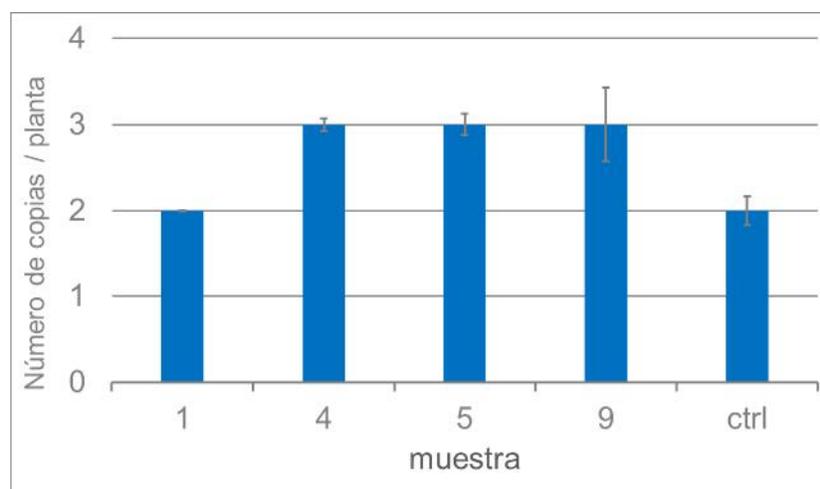
Por otra parte, considerando 2.4 Gb como tamaño promedio para el genoma del maíz (<http://www.gramene.org/>) se calculó el número de copias teórico de Rca presente en cada planta isogénica (Figura 41). Los resultados indican que las plantas 4, 5 y 9 contienen tres copias de Rca mientras que la planta 1 no registró diferencia con las copias de Rca detectadas en las plantas control. Sin embargo, en el análisis de la expresión de RNA (figura 38) fue precisamente la planta 1 la que mostró más mRNA codificante de Rca. Por lo tanto, este resultado indica que la expresión detectada no sólo depende del número de integraciones del cassette sino también de la localización del mismo, lo cual se espera sea diferente para cada planta isogénica.



**Figura 39.** Curva estándar con oligonucleótidos TRR, para la cuantificación de copias de Rca insertadas en el genoma de las plantas isogénicas.

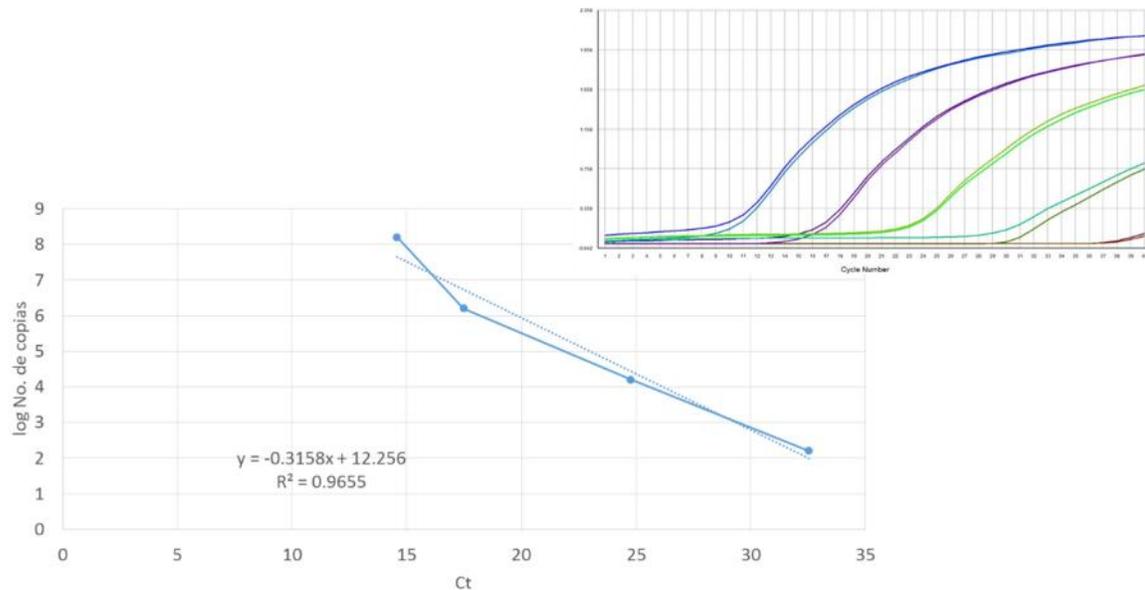


**Figura 40.** Copias de Rca insertadas en 50 ng de DNA de plantas isogénicas y plantas control. PCR cuantitativo realizado con oligonucleótidos específicos para la región codificante de Rca.



**Figura 41.** Copias de Rca por planta en las muestras isogénicas comparadas con las plantas control. PCR cuantitativo realizado con oligonucleótidos específicos para la región codificante de Rca.

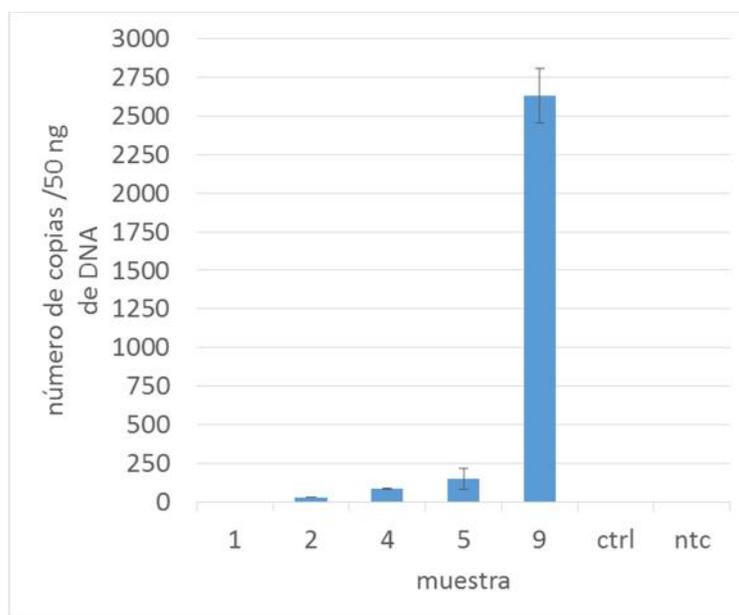
Adicionalmente, con la finalidad de diferenciar la presencia de Rca que proviene exclusivamente de la inserción del cassette de sobreexpresión isogénico y no de la expresión natural de la planta, se examinó la unión entre el promotor de RubisCO y la secuencia codificante de Rca. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos específicos (CisFw) y se realizaron diluciones seriales del plásmido pUC57-Rca para construir una curva de referencia. Los parámetros de la curva se describen en la tabla 9. En la figura 42 se observa un ejemplo de la curva estándar realizada para cuantificar las inserciones del cassette en las plantas isogénicas. Los resultados de las reacciones de PCR cuantitativo con 50 ng de DNA de cada planta se intrapolaron en la curva. En la figura 43 se observa la gráfica del análisis.



**Figura 42.** Ejemplo de curva estándar con oligonucleótidos CisFw, para la cuantificación del número de copias del cassette Rco-Rca insertadas en el genoma de las plantas isogénicas.

Los resultados mostraron que la planta 9 contiene el mayor número de copias del cassette Rco-Rca mientras que la planta 1 fue negativa a la cuantificación tal como ocurrió con la planta control y con las reacciones sin molde ntc (ntc, *non template control*).

De acuerdo con la figura 40, en 50 ng de DNA total de plantas control, hay alrededor de 30,000 copias del gen de Rca, mientras que en las isogénicas 4, 5 y 9 se detectaron alrededor de 50,000 copias, es decir, una diferencia de alrededor de 20,000 copias más de Rca en las plantas sobreexpresantes. Sin embargo, al analizar el número de inserciones del cassette amplificando la unión quimérica del promotor y el gen (figura 43), la planta con más inserciones mostró solamente alrededor de 2500 copias. Debido a que se trata del análisis de un sistema biológico no se espera obtener adiciones o sustracciones con valores numéricos exactos sino que se espera obtener aproximaciones. Según la figura 40 las muestras 4 y 5 registraron valores de contenido de Rca cercanos a la planta 9, sin embargo al analizar la presencia de Rca debida a la inserción del cassette en la figura 43, el patrón de acumulación es muy distinto entre las tres muestras. En el caso de la planta control el resultado observado en la figura 43 es predecible porque las plantas no transformadas carecen de la unión quimérica: promotor Rco-Rca. Sin embargo, para la planta 1, aunque se esperarí que contuviera menor cantidad de inserciones, en este caso resultó negativa a la detección del cassette. Es decir que la detección de la unión quimérica del cassette en las plantas isogénicas con los oligos CisFW se consideró detectable pero no cuantificable como copias de Rca por planta. Debido a que los dos pares de oligonucleótidos empleados (CisFW y TRR) hibridan en diferentes partes del cassette, la ausencia de señal fluorométrica durante la cuantificación de la unión quimérica sugiere que ocurrieron inserciones incompletas del cassette, que no permiten el alineamiento y la amplificación de la secuencia específica que se busca mediante PCR tiempo real. Esto explica la ausencia de detección de la unión quimérica en la planta 1 y la disminución en la señal de amplificación para las plantas 4 y 5.



**Figura 43.** Copias del cassette Rco - Rca presentes en 50 ng de DNA de plantas isogénicas

○ *VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE TRANSFORMACIÓN ISOGÉNICO*

Con la identificación de las plantas de maíz isogénicas se demostró que fue posible la producción de plantas que contienen una construcción basada exclusivamente en secuencias de DNA del maíz, prescindiendo de genes marcadores provenientes de otra especie. Es decir que la generación de plantas isogénicas de maíz permite que la planta obtenida mediante este proceso mantenga la integridad y pureza de su DNA respecto a la variedad parental, de forma similar a lo que sucede con los cultivos de maíz mejorados por técnicas agrícolas convencionales. Para comprobarlo, se analizaron muestras de DNA de plantas isogénicas en laboratorios nacionales de referencia para buscar las secuencias transgénicas más comúnmente usadas. En la siguiente página se anexa copia del resultado oficial (Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados, CNRDOGM del SENASICA, SAGARPA). La conclusión de los análisis comprueban que el desarrollo utilizado generó plantas mejoradas de maíz que no portan secuencias transgénicas. Estos resultados señalan que es operable la recuperación de plantas isogénicas con el método usado y por ello fue posible solicitar la patente de dicho método. Solicitud ante el Instituto Mexicano de la Propiedad industrial IMPI: MX/a/2014/015118 (ver anexo).

 		<b>INFORME DE RESULTADOS</b>	
<b>ANEXO P</b> No. de informe: IR-32/2014		<b>CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA EN DETECCIÓN DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS</b>	<b>SENASICA</b> 201301 18 Rev. 06



Número de acreditación N° SA-0338-005/11 Acreditado a partir de 2011-12-12  
 Ampliación de acreditación a partir de 2012-12-10 (dPCR)  
\*Acreditación otorgada bajo la norma NMX-EC-17025-MNRC-2006-ISO/IEC 17025:2005

El alcance de la acreditación únicamente comprende:

- Análisis de OGMs por la técnica de la PCR a partir del 2011-12-12.
- Análisis de OGMs por la técnica de la PCR digital a partir del 2012-12-10.

**Solicitante:** Universidad Nacional Autónoma de México

**Fecha de emisión de informe:** 14 de julio del 2014

**Atención:** Dra. Estela Sánchez, Investigadora Titular "A" Facultad de Química, UNAM

**No. de oficio de entrega:** Sin oficio

**Domicilio:** Laboratorio 103, Conjunto "E", Circuito de la Investigación Científica s/n Ciudad Universitaria, México D.F. 04510

**Fecha de recepción:** 07 de julio del 2014

**Condición de la muestra:** Se envió DNA Genómico en concentraciones de de 50 ng/μl y 100 ng/μl.

**Método de análisis utilizado:** Amplificación de secuencias de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) usando marcadores para la secuencia 35SCaMV, y evento específico, con un límite de detección (LD) al 0,025% y con un límite de cuantificación (LC) de 0,10%, cuando corresponda. El rango dinámico de cuantificación es de 0,10% a 100,00%. Para el caso de la cuantificación con dPCR el resultado podrá ser expresado en número de copias por cantidad de volumen de la secuencia GM de interés y podrá emitirse el valor en porcentaje cuando se haya determinado también la secuencia endógena de la especie analizada. La identificación de proteínas se realiza por el método cualitativo de tiras reactivas.

U: En cuantificaciones de 0,1 a 0,9% de OGM, la U es de ±50% y en cuantificaciones de 1 a 100% de OGM, la U es de ±30% con un factor k=2.

**Procedimiento de muestreo:** El muestreo fue realizado por el solicitante de acuerdo al manual de monitoreo y muestreo de organismos genéticamente modificados de origen vegetal del SENASICA.

**Resultados de PCR-TR:**

No.	Clave de la muestra	Tipo de muestra	Análisis solicitado	Fecha de análisis	Detección de 35SCaMV	Cuantificación de 35SCaMV	Detección de t-NOS	Identificación de E.E. ó G.E.	Cuantificación de E.E.
1.	2	Hoja de Maíz	Detección de secuencias 35SCaMV; t-NOS.	2014-07-08	Negativo	No aplica	Negativo	No aplica	No aplica
2	4	Hoja de Maíz	Detección de secuencias 35SCaMV; t-NOS.	2014-07-08	Negativo	No aplica	Negativo	No aplica	No aplica
3	11	Hoja de Maíz	Detección de secuencias 35SCaMV; t-NOS.	2014-07-08	Negativo	No aplica	Negativo	No aplica	No aplica

**Observaciones:** Se analizaron 3 muestras de ADN genómico de maíz, los resultados de los análisis mostraron que todas fueron negativas para el promotor 35SCaMV y terminador T-nos

\*La información presentada en este documento tiene el carácter de reservada y confidencial en términos de los artículos 14 fracción II, IV y VI; 18 fracción I y II; y 19 de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental.

\*\*Los resultados mostrados únicamente están relacionados con las muestras recibidas y analizadas por el CNRDOGM. El presente informe de resultados no debe reproducirse, excepto en su totalidad, sin la aprobación por escrito del CNRDOGM.

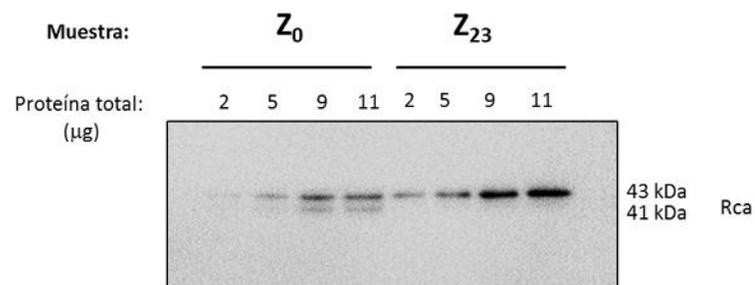
Página 1 de 3

Km. 37.5 de la Carretera México-Pachuca, Municipio de Tecámac de Felipe Villanueva, Col. Centro, Estado de México  
 CP. 55740 Tel. +52 (55) 5905 1000 Ext. 53037, 53039 y 53040  
<http://www.senasica.gob.mx/>

- SOBREEXPRESIÓN AGRONÓMICA DE Rca

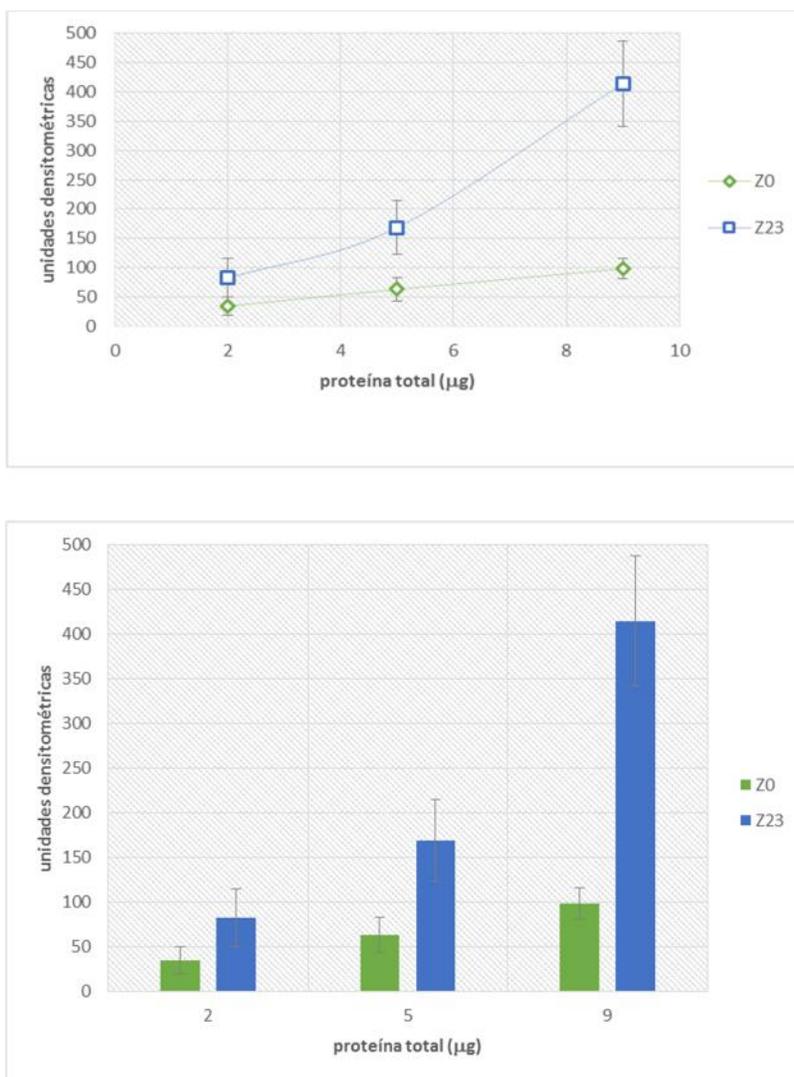
- CUANTIFICACIÓN DE Rca EN MAÍZ MEJORADO AGRONÓMICAMENTE

Tal como se describió detalladamente en el capítulo de antecedentes, en el Colegio de Posgraduados, Edo. de México se desarrollaron cultivares mejorados de maíz para mayor rendimiento de grano. Dicho mejoramiento se realizó durante 23 ciclos agrícolas en los que se seleccionó cualitativamente las mejores semillas de cada ciclo para sembrarlas en el siguiente. Los cultivares se nombraron  $Z_x$ , donde la Z denota la variedad de maíz llamada Zacatecas 58 y el subíndice x señala el número del ciclo de mejoramiento. El análisis de diferentes cultivares durante 23 ciclos demostró que paralelamente al mejoramiento del rendimiento en  $Z_{23}$  también se aumentó significativamente el contenido celular de la proteína Rca (Morales *et al.* 1999). Con la finalidad de comparar el mejoramiento agronómico de la variedad Zacatecas 58 con el método de mejoramiento isogénico aquí propuesto, los cultivares  $Z_{23}$  y el original  $Z_0$  fueron analizados de modo similar que las plantas isogénicas. La figura 44 muestra una imagen representativa de los análisis tipo Western-blot que se realizaron para determinar el contenido de Rca. Los resultados demuestran que  $Z_{23}$  contiene más Rca durante la etapa de llenado de grano comparada con  $Z_0$ , lo cual concuerda con los resultados publicados anteriormente por Morales *et al.* en 1999.



**Figura 44.** Inmunodetección de rubisco activasa en extractos de proteína total durante la etapa de llenado de grano de maíz en plantas mejoradas  $Z_{23}$  comparada con variedad sin mejorar  $Z_0$ .

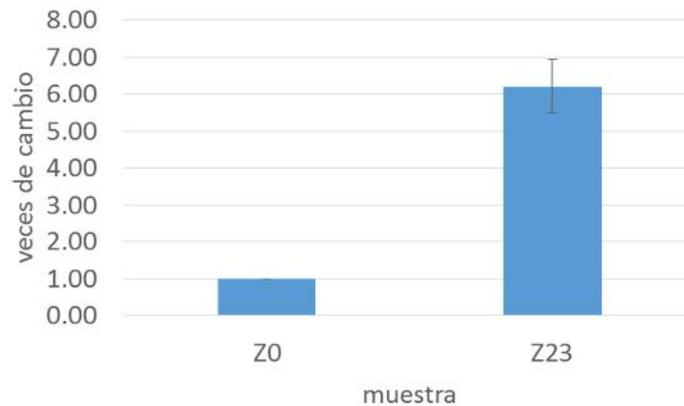
El análisis densitométrico de la inmunodetección de Rca se esquematiza en la figura 45. Similar al análisis realizado con las plantas isogénicas (ver figura 34), al evaluar 2 µg de proteína total se compromete la sensibilidad de la detección y en consecuencia la diferencia en el contenido de Rca no es apreciable entre los dos tipos de plantas. Sin embargo, al analizar 5 µg y 9 µg de proteína se observa que  $Z_{23}$  contiene de 2 a 4 veces más Rca por µg de proteína total comparado con  $Z_0$ . Con estos resultados se confirmó que las plantas  $Z_{23}$  superan significativamente el contenido de Rca detectado en las plantas  $Z_0$ .



**Figura 45.** Análisis densitométrico de la inmunodetección de rubisco activa en extractos de proteína total durante la etapa de llenado de grano de maíz en plantas mejoradas  $Z_{23}$ , comparada con variedad sin mejorar  $Z_0$ .

Para examinar el mecanismo que siguió el mejoramiento clásico agronómico se analizó la abundancia relativa del mRNA que codifica a Rca en las plantas  $Z_0$  y  $Z_{23}$ . Ésto se realizó mediante qRT-PCR amplificando cDNA con los oligonucleótidos específicos llamados TRR. También se amplificó un fragmento del gen Hmg como control de normalización, tal como se realizó con la caracterización de las plantas isogénicas. Los resultados se observan en la figura 46, en la cual se muestra que las plantas  $Z_{23}$  tienen alrededor de 5 veces más acumulación de mRNA de Rca que las plantas  $Z_0$ . Este resultado señala que la selección de

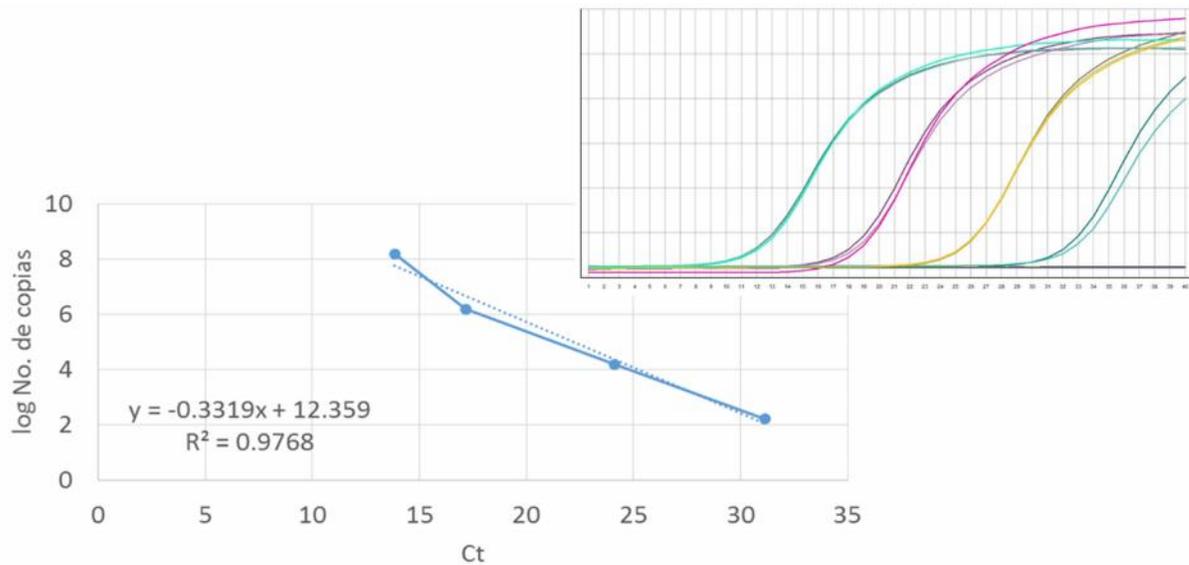
maíz para obtener mayor rendimiento en grano, condujo también a la selección de maíz modificado para mayor expresión de la proteína y del mRNA de Rubisco activasa.



**Figura 46.** Contenido relativo de mRNA de Rca en plantas sobreexpresantes de Rca obtenidas a través del mejoramiento clásico agronómico. Z<sub>23</sub> se obtuvo después de 23 ciclos de mejoramiento agrícola a partir de Z<sub>0</sub>. El eje vertical señala las veces de cambio de abundancia del mRNA entre muestras.

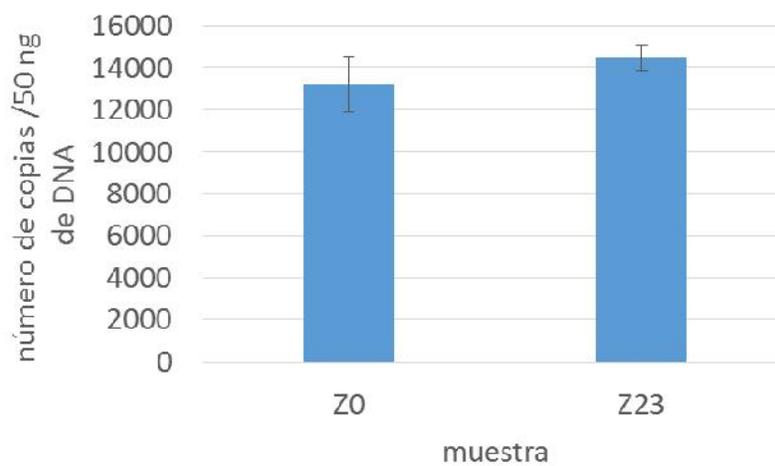
#### ○ DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DE *Rca* EN MAÍZ MEJORADO AGRONÓMICAMENTE

Después de analizar la abundancia relativa del mRNA codificante de Rca en plantas Z<sub>0</sub> y Z<sub>23</sub> se realizaron análisis de PCR tiempo real para determinar cuántas copias de una región específica del DNA codificante de Rca existen en una muestra de DNA genómico por cada cultivar. A diferencia de las plantas isogénicas, en las cuales se buscó el número de copias del cassette usando dos pares de oligos para amplificar tanto la unión quimérica, como una parte de la secuencia codificante, en el caso de las plantas mejoradas agronómicamente sólo se buscó la señal de amplificación para la región codificante de Rca. Para ello también se realizó una curva estándar con diluciones seriales del plásmido pUC57-Rca el cual contiene la región codificante de Rca. Similar al análisis de las plantas isogénicas se calculó el número de copias que hay en cada punto de la curva estándar (ver tabla 9). En la figura 47 se muestra un ejemplo de la curva estándar con 1000 a 0.001 pg del plásmido pUC57-Rca. La curva se repitió cada vez que se analizaron las muestras de 50 ng de DNA genómico de las plantas Z<sub>0</sub> y Z<sub>23</sub>.

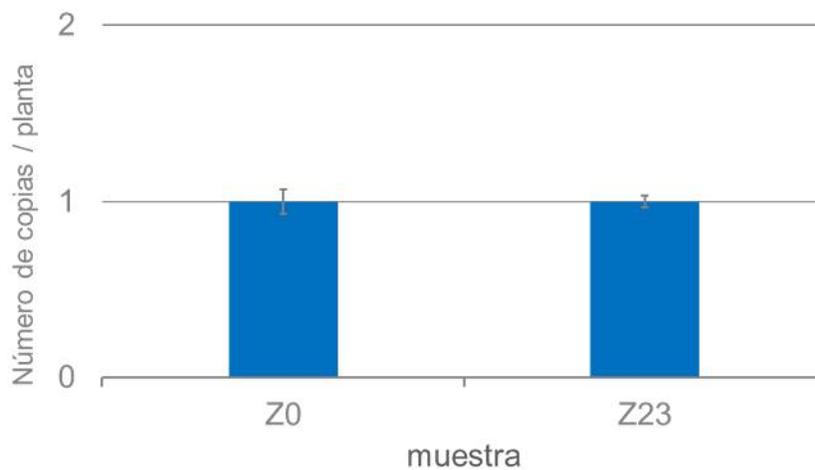


**Figura 47.** Curva estándar para la cuantificación del número de copias de Rca presentes en el genoma de las plantas  $Z_0$  y  $Z_{23}$ .

En las figuras 48 y 49 se observan las gráficas de cuantificación de Rca en el genoma de las plantas  $Z_0$  y  $Z_{23}$ . En ellas se muestra que no existe una diferencia significativa en la cantidad de copias de Rca entre un cultivar y otro. Estos datos fueron normalizados respecto a la amplificación del gen Hmg. Si bien no existe una diferencia clara en el contenido de copias de Rca en el DNA, la expresión del RNA y de la proteína sí es completamente distinta entre las plantas  $Z_0$  y  $Z_{23}$ . Aquí, igual que sucedió con algunas plantas isogénicas no se detectaron cambios en la cantidad de copias de Rca pero sí en la expresión de las mismas. Por ejemplo, en el caso de la planta isogénica 1 no se encontraron más copias de Rca respecto al control (ver figura 40) pero sí mostró mayor acumulación de su mRNA (ver figura 38). Por otra parte, la planta isogénica 5 registró la mayor cantidad de proteína aún sin incrementar la expresión de su mRNA. Aunque en esta planta se detectó una integración más del cassette. La técnica experimental usada en este trabajo no brinda mayor información respecto a los cambios en la ubicación de la integración del gen y esta diferencia podría explicar las variaciones observadas en la expresión de Rca entre las plantas isogénicas. Sin lugar a dudas los mecanismos de cambios en la expresión genética son complejos y los sistemas de mejoramiento basados en ingeniería genética dan luz sobre éstos. Con estos resultados se demuestra que es posible emular los cambios de expresión que suceden de forma habitual en el mejoramiento agrícola de las plantas sin recurrir al uso de genes extraños al genoma propio de las plantas. En consecuencia, los resultados de este trabajo indican que el mecanismo isogénico es apropiado para mejorar la expresión genética de forma similar que sucedió durante el mejoramiento de la expresión del gen de Rubisco activasa en las plantas  $Z_{23}$ .



**Figura 48.** Copias de la región codificante de Rca presentes en 50 ng de DNA de plantas mejoradas agronómicamente  $Z_0$  y  $Z_{23}$



**Figura 49.** Copias de la región codificante de Rca por planta de los cultivares mejorados agronómicamente  $Z_0$  y  $Z_{23}$

---

## DISCUSIÓN

### ○ *Efecto de la sobreexpresión de Rca en maíz*

Los resultados de esta tesis demostraron que fue posible sobreexpresar a la proteína Rubisco activasa en plantas de maíz utilizando dos técnicas diferentes de biología molecular, transgénesis e isogénesis. La expresión de Rca promueve el aumento en el rendimiento del maíz debido a que esta proteína es importante para incrementar la fijación del carbono especialmente durante la etapa de formación del grano (Yin *et al.* 2014; Morales *et al.* 1999). Si bien al transformar plantas de maíz para incrementar la expresión de Rca se busca mejorar aspectos agronómicos relacionados al aumento del rendimiento, sólo la sobreexpresión isogénica ofrece ventajas reales para su aplicación debido a que dista de los cuestionamientos sobre la inocuidad alimentaria de los desarrollos transgénicos en plantas comestibles (Bawa y Anilakumar 2013; Gilbert 2013). Aunque el modelo transgénico no es aplicable como método de mejoramiento para el maíz, los resultados de la sobreexpresión transgénica en este caso arrojaron resultados positivos en cuanto al efecto del aumento de Rca en la planta. Dichos resultados señalaron que la sobreexpresión de Rca favoreció el incremento de la altura en las plantas al mismo tiempo que se benefició la captación de carbono a 40° C y se obtuvieron algunas plantas con dos mazorcas, lo cual podría ser significativo en el incremento del rendimiento del grano.

Por otra parte, la aplicación del modelo isogénico permitió realizar la primer caracterización molecular de este tipo de plantas e indicó que usando este método se pueden incrementar las concentraciones de la proteína y del RNA mensajero de Rca. Aunque la sobreexpresión transgénica de Rca ya se había probado con anterioridad (Fukayama *et al.* 2012), no existen precedentes de la sobreexpresión isogénica de esta proteína, con lo cual, los datos del ensayo isogénico aquí presentados constituyen el primer experimento de este tipo en plantas de maíz. Sin embargo, las características favorables del fenotipo obtenido son preliminares ya que se necesita evaluar un mayor número de plantas a fin de establecer sin lugar a dudas las ventajas de la sobreexpresión isogénica, en este caso de Rca. Al respecto, es importante señalar que la depuración del fondo genético es un factor importante que se debe considerar para la caracterización precisa del fenotipo. Durante estos ensayos se analizaron, como controles de comparación, a diferentes plantas no transformadas sembradas a partir de semillas de la misma variedad del maíz transformado. Sin embargo, el control ideal debe incluir también el análisis de plantas que experimentaron el procedimiento *in vitro* aún sin experimentar el proceso de transformación, ello con la finalidad de conocer la respuesta al tratamiento *in vitro* asociada al genotipo utilizado.

Respecto a la regulación del estudio y generación de plantas modificadas genéticamente, en el caso particular de México, la Ley de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados regula la realización de este tipo de estudios sin diferenciar si se trata de modificaciones transgénicas, cisgénicas, intragénicas o isogénicas, ya que todas ellas caen en la clasificación de métodos de biotecnología moderna (LBOGM 2005). Por ello resulta urgente enriquecer la investigación de los sistemas emergentes de modificación de plantas a fin de lograr una clasificación diferencial confiable que permita sentar los precedentes de futuras evaluaciones de riesgo para este tipo de desarrollos y con ello avanzar hacia el objetivo del mejoramiento del maíz. En este sentido, los procedimientos para el mejoramiento de cultivos asistidos por ingeniería genética están evolucionado rápidamente y por eso en otras partes del mundo la discusión sobre las discrepancias y aplicaciones que existen entre las nuevas tecnologías de mejoramiento agronómico también están evolucionado (Hartung y Schiemann 2014). Este trabajo de tesis alienta a avanzar la discusión en el mismo sentido. Los resultados expuestos contribuyen a la comparación entre diferentes procedimientos de mejoramiento a fin de caracterizar y establecer la valía del mejoramiento isogénico en particular.

○ *Método isogénico vs Método transgénico*

Cualquier tipo de transformación de plantas requiere contar con sistemas de tecnología *in vitro* previamente establecidos. Al respecto, actualmente existen pocos trabajos de transformación en líneas de maíz tropical (Assem 2015). No obstante, en nuestro grupo de investigación se ha avanzado en probar la capacidad de proliferación y regeneración de callos embriogénicos tipo II provenientes de plantas de maíz Raza Tuxpeño, variedad Costeño. Esto representa una enorme ventaja para probar distintos métodos de transformación en maíz (Garrocho-Villegas *et al.* 2012).

Como se describió anteriormente, los resultados de este trabajo demostraron que fue posible obtener plantas sobreexpresantes de Rca por los métodos transgénico e isogénico. Ambos métodos requieren el uso de técnicas moleculares para modificar el DNA de la planta del maíz, sin embargo, existe una diferencia sustancial entre ambas técnicas y es que el método transgénico propicia el uso de genes de diferentes organismos mientras que el método isogénico se fundamenta en los desarrollos cisgénicos que únicamente permiten la combinación de DNA de la misma especie o entre especies relacionadas (Ryffel 2014). Sin duda alguna el método transgénico es el procedimiento más ampliamente usado por la ingeniería genética (Yadav *et al.* 2015) pero aunque se ha aplicado en diversos sistemas vegetales no representa la mejor opción de mejoramiento para alimentos. Especialmente en México, el caso del maíz transgénico ha despertado un sin número de discusiones de índole social y cultural que se contraponen fuertemente a las iniciativas de mejoradores que pretenden hacer uso de esta técnica para modificar el maíz (Álvarez-Buylla y Pyñeiro-Nelson 2013; Dalton 2009). Este ensayo no trata de ahondar en dichos debates. La presente tesis propone el uso de la técnica isogénica como un método viable para modificar convenientemente la expresión de genes en el maíz. Inicialmente se probó el sistema de transformación transgénico porque se conoce más acerca de este procedimiento y en

consecuencia resulta relativamente más fácil seguir los lineamientos técnicos. Por su parte, la transformación isogénica requirió probar la regeneración de plantas transformadas prescindiendo de los genes de selección química. Los resultados fueron positivos pues se demostró la posibilidad de recuperar plantas transformadas. La ausencia de secuencias transgénicas en las plantas isogénicas quedó demostrada por la ausencia de su detección durante los análisis realizados por el laboratorio Nacional de referencia SENASICA (Ver Validación externa en capítulo Materiales y Métodos). La integración del cassette isogénico en el genoma de la planta es aleatoria, lo cual puede ser motivo de discusión debido a que se podrían interrumpir las secuencias de otros genes importantes para el óptimo desarrollo de la planta. Sin embargo, el criterio de selección basado en las características fenotípicas deseadas (incremento del vigor durante las primeras etapas de desarrollo), soslaya en gran medida éste efecto pues se descartan a aquellas plantas que como resultado de la transformación generan patrones de expresión genética indeseables.

Por otra parte, aunque las cantidades de callo embriogénico usadas para cada ensayo fueron diferentes, los resultados demostraron que ambos procedimientos son comparables en cuanto a la eficiencia de regeneración. Para realizar el método transgénico se utilizaron 6g de callo embriogénico mientras que para el ensayo isogénico se partió de 3g. Como resultado se obtuvieron 236 plantas de la transformación transgénica y 164 de la transformación isogénica. Proporcionalmente, por cada gramo de callo embriogénico inicial se regeneraron 39 plantas posiblemente transgénicas y 54 plantas potencialmente isogénicas. La recuperación de plantas en el ensayo isogénico se favoreció debido a que las plantas no son sometidas al estrés que causa el agente químico de selección. Sin embargo, independientemente del método de transformación usado, durante el periodo de aclimatación se registró una gran pérdida de plantas regeneradas y por ello el número de plantas transformadas recuperadas no refleja la eficiencia real de la transformación. No obstante, Debido a que la modificación isogénica no requiere una etapa de selección, se puede optimizar la recuperación de plantas al disminuir el número de trasplantes *in vitro* buscando promover la individualización y el establecimiento de raíces en etapas más tempranas del desarrollo de las plántulas. Ésto también representa una ventaja para disminuir el tiempo que se requiere para llevar a cabo el procedimiento de transformación completo. Al respecto, en nuestro grupo de investigación se han probado diferentes esquemas para disminuir el tiempo de recuperación de eventos isogénicos así como para optimizar la etapa de aclimatación con resultados positivos (Garrocho-Villegas *et al.* 2016). En resumen, los datos reportados señalan que el método isogénico representa varias ventajas sobre el método transgénico. Primero, porque al prescindir del uso de genes extraños al genoma del maíz esta tecnología proporciona un producto que mantiene la integridad de la constitución de su DNA y segundo, porque la eficiencia del método propuesto es comparable a los métodos de transformación clásica. Si bien éste constituye un trabajo que puede ser perfectible, la aproximación es positiva y demuestra que es posible usar la técnica isogénica para recuperar plantas transformadas usando ingeniería genética sin comprometer la integridad del DNA de la planta de maíz.

o *Similitudes entre el Método isogénico y el Método agronómico*

Los avances en el campo de la tecnología del DNA recombinante, así como en la disponibilidad de bases de datos con genomas completos han abierto un abanico de posibilidades para la optimización de los cultivos de interés agronómico. En este trabajo se compararon los métodos de mejoramiento transgénico, isogénico y agronómico. Mientras que las plantas transgénicas cambian la composición de su DNA, las plantas isogénicas y las plantas mejoradas por técnicas agrícolas convencionales mantienen la integridad del mismo al prescindir de DNA heterólogo para lograr el mejoramiento. El análisis de la expresión de Rca señaló que el procedimiento isogénico generó plantas que son comparables con las plantas producidas por el mejoramiento agronómico. A este respecto los resultados demostraron que las plantas mejoradas convencionalmente, luego de 23 ciclos de selección agrícola, aumentaron 2 veces la expresión de la proteína Rca mientras que la acumulación del mRNA codificante de Rca incrementó hasta 5 veces más en relación a sus predecesoras. Proporcionalmente, ésto significa que la expresión de la proteína y del mRNA de Rca aumentaron 10 a 20% por cada ciclo agrícola transcurrido. Por su parte, en esta primera generación de plantas isogénicas se obtuvo 50% más contenido de proteína y hasta dos veces más la expresión de su mRNA. Potencialmente, ésto significa que un aumento sostenido de tal magnitud en la expresión de Rca, generaría los mismos resultados que el mejoramiento agronómico pero en menor tiempo.

Por otra parte, el análisis del DNA reveló que después de los ciclos de mejoramiento las plantas obtenidas por métodos convencionales no mostraron diferencias en el contenido del número de copias del gen Rca respecto a sus predecesoras, mientras que las plantas isogénicas evidenciaron diferentes patrones en la integración de la secuencia codificante de Rca, desde una cantidad indetectable con la técnica de cuantificación usada, hasta 1 copia más en tres plantas isogénicas analizadas. Aunque la curva estándar es un parámetro de referencia para calcular las inserciones teóricas que experimentó cada planta (ver Materiales y Métodos), este método sigue siendo relativo a la cantidad de copias detectadas en las otras plantas (plantas control) porque existen otros factores que pueden alterar la interpretación de los resultados, como son, la integridad y la fuente del DNA o inclusive el peso molecular del genoma. Ésto es que en los 50 ng de DNA analizados se desconoce la proporción de DNA nuclear, cloroplástico y mitocondrial. Es por ello que si bien ésta es una forma para estimar el número de inserciones teóricas, se sugiere complementar los resultados de PCR con un análisis más detallado usando la técnica Southern-blot para conocer el número de inserciones exactas. Por otra parte, el re-arreglo resultante del DNA después de experimentar el proceso de transformación isogénico se asemeja a muchos de los cambios ya descritos que han sucedido en la evolución forzada del maíz. A este respecto, se conoce que durante la domesticación y mejoramiento de este cultivo han ocurrido re-arreglos del DNA, supresiones de secuencias o aumento de las mismas (Shi y Lai 2015). Desde hace más de 10000 años el maíz ha estado sujeto a un proceso de evolución dirigida por los humanos, desde el mayor proceso de mejoramiento ocurrido durante su domesticación en tierras Mexicanas, hasta el producto diversificado que conocemos y aceptamos hoy como una planta de maíz (Piperno *et al.* 2009). Los estudios evolutivos que se han llevado a cabo en este cultivo han señalado que los cambios

del DNA del maíz han sido principalmente en las secuencias regulatorias (Wang *et al.* 1999). Gracias al aumento de secuenciaciones de genomas completos en variedades silvestres y sus cultivares mejorados, así como a los adelantos en la capacidad de análisis de estos datos, se ha encontrado que durante la domesticación de los cultivos se tiende a disminuir la diversidad genética especialmente para los genes seleccionados durante los procesos de domesticación, diversificación y / o mejoramiento, lo cual se conoce como cuello de botella genético. Sin embargo, hay estudios en maíz y en soya, que han demostrado la existencia de un proceso de expansión génica que introduce alelos adicionales durante los métodos de mejoramiento y adaptación de los cultivos (Jiao *et al.* 2012; Lam *et al.* 2010). En estos estudios, los autores han detectado exceso de alelos en los cultivares mejorados respecto a sus ancestros silvestres. El aumento de secuencias no ha sido únicamente bajo la base de alelos preexistentes, también se han formado nuevas combinaciones que persisten y que se han incrementado durante los procesos de domesticación y mejoramiento. Esto se ha probado en estudios en los que se han detectado polimorfismos en los genomas de las variedades mejoradas (Jiao *et al.* 2012; Tian *et al.* 2010). Los cambios en las secuencias nucleotídicas del genoma no han sido las únicas causas responsables de la diversificación del maíz, se piensa que los cambios en la expresión genética, así como diferentes procesos epigenéticos también podrían jugar un papel importante durante la domesticación y diversificación del maíz (Shi y Lai 2015). En este contexto, los resultados de este trabajo señalan que durante el proceso de mejoramiento convencional ocurrieron principalmente cambios en la regulación de la expresión genética de Rca. Es decir que se observaron cambios en su expresión aún sin evidenciar un aumento en el número de copias del gen. Los procesos moleculares involucrados para la manifestación de este fenómeno tendrían que estar relacionados con el proceso de selección agronómica *per se*. En otras palabras, la selección del maíz para obtener mayor rendimiento condujo a la prevalencia de secuencias genómicas responsables de ese fenotipo en particular. Además del aumento en la expresión de Rca debieron favorecerse otras configuraciones del DNA. Esto es, cambios en la expresión de otras secuencias como por ejemplo factores que favorecieron la traducción de Rca o bien que incrementaron la estabilidad de su RNA mensajero. Los procesos involucrados que dieron lugar al efecto de la sobreexpresión de Rca en las plantas mejoradas podrían ser muchos y su caracterización se sale de los objetivos de éste trabajo, sin embargo, ésta observación por si misma plantea otra serie de interesantes preguntas relacionadas con el mejoramiento del maíz. Por su parte, durante el proceso de transformación isogénico también se observaron cambios en la expresión de Rca directamente relacionados con los cambios del contexto genético en donde se insertó el cassette de expresión, más que con el número de inserciones. Es decir, cada planta isogénica obtenida posee características únicas en cuanto al número y lugar de integraciones del cassette. Derivado de dichas características se observaron diferentes patrones de expresión de Rca en cada evento de transformación. La influencia de los cambios del contexto genético quedó demostrada con la observación de que la planta isogénica con mayor contenido de proteína Rca no fue la misma que expresó más mRNA pues la diferencia entre éstas es precisamente el sitio de integración del cassette, derivado de la naturaleza del proceso de transformación por biobalística (integración aleatoria). En este sentido, aunque la técnica de PCR cuantitativa no brinda información acerca del lugar

de integración del cassette isogénico, existen estudios donde se describe que la expresión exitosa de genes introducidos por biobalística depende del DNA que fue transformado: nuclear, mitocondrial o cloroplástico, así como del locus de integración (Finer *et al.* 1999). Al respecto, actualmente existen estudios que proponen la edición precisa del DNA para controlar el sitio de inserción. Sin embargo, dichos estudios se encuentran en desarrollo e incluyen la inserción de transgenes, por lo cual, aún no es aplicable para un enfoque realmente cisgénico (Jia y Nian 2014). En el caso del método isogénico la inserción azarosa no representa un problema de contaminación génica, por lo cual, la experimentación con este sistema de transformación se puede llevar a cabo sin riesgos ecológicos.

Los cultivos modificados con enfoques cisgénicos han demostrado poseer las características necesarias para ser aceptados ampliamente como productos similares a los obtenidos por técnicas agrícolas convencionales. Así lo señalan las encuestas públicas realizadas para analizar el nivel de aceptación de los organismos cisgénicos en Europa e India (Shew *et al.* 2016; Delwaide *et al.* 2015), es por ello que los productos cisgénicos han comenzado a generar un creciente número de patentes para diferentes cultivos, lo cual señala la urgencia de desarrollar este tipo de estudios en México (Holme *et al.* 2013). En razón de lo expuesto anteriormente y ante el panorama de demanda por maíz adaptado y/o mejorado, consideramos que el enfoque isogénico es un proceso valioso para asistir al mejoramiento agronómico convencional pues además de la reducción potencial del tiempo de mejoramiento, también abre la posibilidad de extender su uso para diferentes genes con probadas características de mejoramiento.

---

## CONCLUSIONES

Este trabajo de investigación constituye el primer ensayo de una modificación intragénica practicada en plantas de maíz. Los resultados demostraron la posibilidad de sobreexpresar una proteína del maíz empleando secuencias cisgénicas, es decir secuencias propias del genoma del maíz. La estrategia usada permitió recuperar plantas intragénicas que se denominaron isogénicas, debido a que se obtuvieron mediante un proceso de transformación que no requirió el uso de marcadores de selección.

La transformación isogénica propuesta se comparó con el sistema de modificación transgénico así como con un método de mejoramiento agronómico tradicional conocido como “selección masal visual estratificada”. El balance de los resultados señaló al método isogénico como una herramienta útil para asistir a los métodos de mejoramiento agrícola tradicionales, debido a la reducción del tiempo, tierras de cultivo y trabajo de campo necesarios.

Debido a que el procedimiento isogénico prescindió de marcadores o secuencias transgénicas habitualmente usados en la ingeniería genética vegetal, las plantas obtenidas por este medio no enfrentan los mismos cuestionamientos de bioseguridad que enfrentan los organismos transgénicos.

El enfoque isogénico desarrollado durante esta investigación puede extenderse a diferentes cultivos con propósitos de mejoramiento. Si bien aquí se demuestra la posibilidad de realizar sobreexpresión genética, la versatilidad de combinaciones con secuencias cisgénicas de maíz, combinadas con la introducción física de DNA sin secuencias exógenas, indica la posibilidad de usar el método isogénico para diferentes aplicaciones.

Con los resultados generados a partir de esta tesis doctoral se publicó un artículo científico original en una revista arbitrada internacional, se contribuyó en la redacción de un capítulo en un libro y se solicitó una patente ante el Instituto Mexicano de la Propiedad industrial IMPI. Así mismo, las bases teóricas de este trabajo formaron parte de un artículo de divulgación científica en la revista editada por la Academia Mexicana de Ciencias.

**Solicitud de patente:**

Proceso para generar derivados isogénicos de maíz con propiedades mejoradas mediante la sobreexpresión genética. Número de registro: MX/a/2014/015118.

Se anexa copia de la solicitud

**Artículo científico original:**

Almeraya, E., Sánchez-de-Jiménez E., 2016. Intragenic modificación of maize. *Journal of biotechnology*, 238, pp 35-41.

**Capítulo de libro:**

Garrocho-Villegas, V., Almeraya, E.V., Sánchez-de-Jiménez, E.S., 2016. Maize Somatic Embryogenesis: Agronomic Features for Improving Crop Productivity. en: Loyola-Vargas, V.M, and Ochoa-Alejo, N. (Ed.), *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, pp. 201–211. doi:10.1007/978-3-319-33705-0

**Artículo de divulgación científica:**

Almeraya, V.E.V., Sánchez, Q.E., 2015. Adaptaciones fotosintéticas en las plantas para mejorar la captación del carbono. *Ciencia*, 66, pp 72-79.

---

# BIBLIOGRAFÍA

(Para citas bibliográficas con cuatro o más autores sólo se muestra el nombre del primer autor y la leyenda *et al.*)

Achenbach J., 2016. 107 Nobel laureates sign letter blasting Greenpeace over GMOs. The Washington Post. Available at: [supportprecisionagriculture.org](http://supportprecisionagriculture.org).

Acosta R., 2009. El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba. Cultivos Tropicales, 30, pp.113–120.

Álvarez-Buylla, E. Piñeyro, N., 2013. El maíz en peligro ante los transgénicos: un análisis integral sobre el caso de México Primera ed., Publicaciones UCCS.

Assem, S.K., 2015. Maize, Tropical (*Zea mays* L.). In *Agrobacterium Protocols: Volume 1, Methods in Molecular Biology*, vol. 1223.

Ayala-Ochoa, A. *et al.*, 2004. In maize, two distinct ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase transcripts have different day/night patterns of expression. *Biochimie*, 86, pp.439–449.

Bawa, A.S., Anilakumar, K.R., 2013. Genetically modified foods: Safety, risks and public concerns - A review. *Journal of Food Science and Technology*, 50, pp.1035–1046.

Benfey P.N, Chua N., 1990. The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. *Science*, 250, pp.959–966.

Benson, A.A., 2002. Following the path of carbon in photosynthesis: A personal story. *Photosynthesis Research*, 73(1-3), pp.29–49.

Berry, J.O., Mure, C.M., Yerramsetty, P., 2016. Regulation of Rubisco gene expression in C4 plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 31, pp.23–28.

Bowles, D., 2012. Towards increased crop productivity and quality. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, pp.202–203.

von Caemmerer, S. *et al.*, 2005. Reductions of Rubisco activase by antisense RNA in the C4 plant *Flaveria bidentis* reduces Rubisco carbamylation and leaf photosynthesis. *Plant Physiology*, 137, pp.747–755.

Cardi, T., 2016. Cisgenesis and genome editing: Combining concepts and efforts for a smarter use of genetic resources in crop breeding. *Plant Breeding*, 135, pp.139–147.

- Carmo-Silva, A.E., Salvucci, M.E., 2013. The Regulatory Properties of Rubisco Activase Differ among Species and Affect Photosynthetic Induction during Light Transitions. *Plant Physiology*, 161, pp.1645–1655.
- Carmo-Silva, E. *et al.*, 2015. Optimizing Rubisco and its regulation for greater resource use efficiency. *Plant, Cell and Environment*, 38, pp.1817–1832.
- 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.
- Chizzali, C. *et al.*, 2016. Cisgenic Rvi6 scab-resistant apple lines show no differences in Rvi6 transcription when compared with conventionally bred cultivars. *Planta*, 243, pp.635–644.
- Comité de Biotecnología, coordinador Francisco Bolivar Zapata 2011. Por un uso responsable de los organismos genéticamente modificados. Academia Mexicana de Ciencias.
- Cressey, D., 2013. Transgenics: A new breed. *Nature News*, 497, pp.27–29.
- Dalton, R., 2009. Mexico 's transgenic maize under fire. *Nature*, 462, pp.2009–2009.
- Delwaide, A.C. *et al.*, 2015. Revisiting GMOs: Are there differences in European consumers' acceptance and valuation for cisgenically vs transgenically bred rice? *PLoS ONE*, 10, pp.1–16.
- Espinoza, C. *et al.*, 2013. Cisgenesis and intragenesis: New tools for improving crops. *Biological Research*, 46, pp.323–331.
- Fahlgren, N., Bart, R., Rellán-Álvarez, R., 2016. Plant scientists: GM technology is safe. *Science*, 351, pp.824–826.
- Finer, J, Finer, K, Ponappa, T., 1999. Particle bombardment mediated transformation. In V. Hammond, J, McGarvey, P, Yusibov, ed. *Current topics in microbiology and immunology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 60–76.
- Fukayama, H. *et al.*, 2012. Overexpression of rubisco activase decreases the photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation rate by reducing rubisco content in rice leaves. *Plant Cell Physiology*, 53, pp.976–986.
- Gadaleta, A. *et al.*, 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-Olivera M.T., Sánchez, Q.E., 2012. Maize Somatic Embryogenesis: Recent Features to Improve Plant Regeneration. In Loyola-Vargas V.M., Ochoa-Alejo, N., ed. *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*. pp. 173–182.
- Garrocho-Villegas, V, Almeraya, E, Sánchez, J, E., 2016. Maize Somatic Embryogenesis: Agronomic Features for Improving Crop Productivity. In Loyola-Vargas V.M., Ochoa-Alejo, N., ed. *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. pp. 201–211.
- Gil, P., Green, P.J., 1996. Multiple regions of the Arabidopsis SAUR-AC1 gene control transcript abundance: the 3' untranslated region functions as an mRNA instability determinant. *Embo J*, 15, pp.1678–1686.
- Gilbert, N., 2013. A Hard Look on GM crops. *Nature*, 497, pp.24–26.
- Gong, F. *et al.*, 2015. Making better maize plants for sustainable grain production in a changing climate. *Frontiers in plant science*, 6, p.835.
- Hartung, F., Schiemann, J., 2014. Precise plant breeding using new genome editing techniques: Opportunities, safety and regulation in the EU. *Plant Journal*, 78, pp.742–752.
- Hasse, D., Larsson, A.M., Andersson, I., 2015. Structure of Arabidopsis thaliana Rubisco activase. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71, pp.800–808.
- Holme, I.B. *et al.*, 2012. Cisgenic barley with improved phytase activity. *Plant Biotechnology Journal*, 10, pp.237–247.
- Holme, I.B., Wendt, T., Holm, P.B., 2013. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnology Journal*, 11, pp.395–407.
- Jacobsen, E., Schouten, H.J., 2007. Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. *Trends in Biotechnology*, 25, pp.219–223.
- Jia, H., Nian, W., 2014. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS ONE*, 9.
- Jiao, Y. *et al.*, 2012. Genome-wide genetic changes during modern breeding of maize. *Nature Genetics*, 44, pp.812–815.
- Joshi, S.G. *et al.*, 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.
- Kurek, I. *et al.*, 2007. Enhanced Thermostability of Arabidopsis Rubisco activase improves photosynthesis and growth rates under moderate heat stress. *The Plant cell*, 19, pp.3230–3241.

- Lam, H.-M. *et al.*, 2010. Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection. *Nature Genetics*, 42, pp.1053–1059.
- LBOGM, 2005. Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, México.
- Leakey, A.D.B. *et al.*, 2009. Elevated CO<sub>2</sub> effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: Six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany*, 60, pp.2859–2876.
- Lucht, J.M., 2015. Public acceptance of plant biotechnology and GM crops. *Viruses*, 7, pp.4254–4281.
- Manimaran, P. *et al.*, 2011. Suitability of non-lethal marker and marker-free systems for development of transgenic crop plants: Present status and future prospects. *Biotechnology Advances*, 29, pp.703–714.
- Márquez-Sánchez, 2008. De las variedades criollas de maíz (*Zea mays* L.) a los híbridos transgénicos. I: Recolección de germoplasma y variedades mejoradas. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 5, pp.151–166.
- Mate, C.J. *et al.*, 1993. Reduction of ribulose biphosphate carboxylase activase levels in tobacco (*Nicotiana tabacum*) by antisense RNA reduces ribulose biphosphate carboxylase carbamylation and impairs photosynthesis. *Plant physiology*, 102, pp.1119–28.
- McKersie, B., 2015. Planning for food security in a changing climate. *Journal of Experimental Botany*, 66, pp.3435–3450.
- Mlalazi, B. *et al.*, 2012. Isolation and functional characterisation of banana phytoene synthase genes as potential cisgenes. *Planta*, 236, pp.1585–1598.
- Molina Galán J, 1983a. Selección masal visual estratificada en maíz. *Boletín del Colegio de Postgraduados, Montecillo México*.
- Morales, A. *et al.*, 1999. Importance of Rubisco activase in maize productivity based on mass selection procedure. *Journal of Experimental Botany*, 50, pp.823–829.
- Moshelion, M., Altman, A., 2015. Current challenges and future perspectives of plant and agricultural biotechnology. *Trends in Biotechnology*, pp.1–6.
- Nature News, 2013. GM Crops a story in numbers. *Nature*, 497, pp.22–23.
- Nielsen, K.M., 2003. Transgenic organisms--time for conceptual diversification? *Nature biotechnology*, 21, pp.227–8.
- Peterhansel, C., Offermann, S., 2012. Re-engineering of carbon fixation in plants - challenges for plant biotechnology to improve yields in a high-CO<sub>2</sub> world. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, pp.204–208.

- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, pp.2002–2007.
- Piñeyro-Nelson, A. *et al.*, 2009. Resolution of the Mexican transgene detection controversy: Error sources and scientific practice in commercial and ecological contexts. *Molecular Ecology*, 18, pp.4145–4150.
- Piperno, D.R. *et al.*, 2009. Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106.
- Portis, A.R. *et al.*, 2008. Regulation of Rubisco activase and its interaction with Rubisco. *Journal of Experimental Botany*, 59, pp.1597–1604.
- Portis, A.R., 2003. Rubisco activase-Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynthesis Research*, 75, pp.11–27.
- Pretty, J., Bharucha, Z.P., 2014. Sustainable intensification in agricultural systems. *Annals of Botany*, 114, pp.1571–96.
- Raven, J.A., 2013. Rubisco: Still the most abundant protein of Earth? *New Phytologist*, 198, pp.1–3.
- Romano, A. *et al.*, 2003. Transgene organization in potato after particle bombardment-mediated (co-)transformation using plasmids and gene cassettes. *Transgenic Research*, 12, pp.461–473.
- Rommens, C.M., 2004. All-native DNA transformation: A new approach to plant genetic engineering. *Trends in Plant Science*, 9, pp.457–464.
- Rommens, C.M. *et al.*, 2008. Low-acrylamide French fries and potato chips. *Plant Biotechnology Journal*, 6, pp.843–853.
- Ryffel, G.U., 2014. Transgene flow: facts, speculations and possible countermeasures. *GM crops & food*, 5, pp.249–58.
- Sage, R.F., Khoshravesh, R., 2016. Passive CO<sub>2</sub> concentration in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 31, pp.58–65.
- Sage, R.F., Way, D.A., Kubien, D.S., 2008. Rubisco, Rubisco activase, and global climate change. *Journal of Experimental Botany*, 59, pp.1581–1595.
- Salvucci, M.E., DeRidder, B.P., Portis, A.R., 2006. Effect of activase level and isoform on the thermotolerance of photosynthesis in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 57, pp.3793–3799.
- Sánchez, J.E., Medrano, L., Martínez-Barajas, E., 1995. Rubisco activase, a possible new member of the molecular chaperone family. *Biochemistry*, 34, pp.2826–2831.

- 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.
- Schaart, J.G. *et al.*, 2004. Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene. *Plant Biotechnology Journal*, 2, pp.233–240.
- Schäffner, A.R., Sheen, J., 1991. Maize *rbcS* promoter activity depends on sequence elements not found in dicot *rbcS* promoters. *The Plant cell*, 3, pp.997–1012.
- Schneerman, M.C. *et al.*, 2002. The Dried Corncob as a Source of DNA for PCR Analysis. *International Society for Plant Molecular Biology*, 20, pp.59–65.
- Schouten, H.J., Jacobsen, E., 2008. Cisgenesis and intragenesis, sisters in innovative plant breeding. *Trends in Plant Science*, 13, pp.260–261.
- Schouten, H.J., Krens, F.A., Jacobsen, E., 2006. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: international regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis. *EMBO reports*, 7, pp.750–3.
- Shew, A.M. *et al.*, 2016. Are all GMOs the same? Consumer acceptance of cisgenic rice in India. *Plant Biotechnology Journal*, 14, pp.4–7.
- Shi, J., Lai, J., 2015. Patterns of genomic changes with crop domestication and breeding. *Current Opinion in Plant Biology*, 24, pp.47–53.
- Singh, J. *et al.*, 2014. Enhancing C3 photosynthesis: An outlook on feasible interventions for crop improvement. *Plant Biotechnology Journal*, 12, pp.1217–1230.
- Stewart, C.N., 2012. *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques and Applications* First edit. J. J. C. Neal Stewart, ed., John Wiley & Sons.
- Stewart, C.N., 2001. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 20, pp.376–382.
- Stoykova, P., Stoeva-Popova, P., 2011. PMI (*manA*) as a nonantibiotic selectable marker gene in plant biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105, pp.141–148.
- Strable, J., Scanlon, M.J., 2009. Maize (*Zea mays*): A Model Organism for Basic and Applied Research in Plant Biology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4, pp.1–9.
- Thieulin-Pardo, G. *et al.*, 2015. Fairy “tails”: flexibility and function of intrinsically disordered extensions in the photosynthetic world. *Frontiers in molecular biosciences*, 2, p.23.
- Tian, Z.X. *et al.*, 2010. Artificial selection for determinate growth habit in soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, pp.8563–8568.

- Vanblaere, T. *et al.*, 2014. Molecular characterization of cisgenic lines of apple “Gala” carrying the Rvi6 scab resistance gene. *Plant Biotechnology Journal*, 12, pp.2–9.
- Vargas-Suárez, M. *et al.*, 2004. Rubisco activase chaperone activity is regulated by a post-translational mechanism in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*, 55, pp.2533–2539.
- Viret, J., Mabrouk, Y., Bogorad, L., 1994. Transcriptional photoregulation of cell-type-preferred expression of maize *rbcS-m3*: 3' and 5' sequences are involved. *Proceedings of the*, 91, pp.8577–8581.
- Vogel, K.E., 2009. Backcross breeding. *Methods in Molecular Biology: Transgenic Maize*, 526, pp.161–169.
- Wang, R.L. *et al.*, 1999. The limits of selection during maize domestication. *Nature*, 398, pp.236–239.
- Weeks, J.T., Ye, J., Rommens, C.M., 2008. Development of an in planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Research*, 17, pp.587–597.
- Yadav, U.P., Ayre, B.G., Bush, D.R., 2015. Transgenic approaches to altering carbon and nitrogen partitioning in whole plants: assessing the potential to improve crop yields and nutritional quality. *Frontiers in plant science*, 6, p.275.
- 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*, vol. 684. pp. 383–391.
- Yamori, W. *et al.*, 2012. Rubisco activase is a key regulator of non-steady-state photosynthesis at any leaf temperature and, to a lesser extent, of steady-state photosynthesis at high temperature. *Plant Journal*, 71, pp.871–880.
- Yao, Q. *et al.*, 2006. Low copy number gene transfer and stable expression in a commercial wheat cultivar via particle bombardment. *Journal of Experimental Botany*, 57, pp.3737–3746.
- Yaqoob, A. *et al.*, 2016. Risk assessment of Bt crops on the non-target plant associated insects and soil organisms. *Journal of the science of food and agriculture*.
- Yin, Z. *et al.*, 2014. Characterization of Rubisco activase genes in maize: an  $\alpha$ -isoform gene functions alongside a  $\beta$ -isoform gene. *Plant physiology*, 164, pp.2096–106.

---

## ANEXOS

Secuencia nucleotídica del cassette isogénico (2827 bp). Las letras minúsculas señalan los 68 sitios extra, cada renglón contiene 60 bases. (ver la sección Diseño de construcción isogénica).

```
tgcagtcgacgggcccgggatccgatgacccaatgaacgtaagcttGAGCTCCCTTTAAT
CTGGCGCTAGATCTGCATCCGCGGCTTGCAAAGATAAATGGCACATTTAGTGTGTTATTT
TGCAATACCTTTTCATAGTAGATATCCTTAAATGCAGTTTTAGGCATGTTGGGTAATTA
TAACATTTTITAGGAGGAGTTTTAGATTTACCTTTCTTTTCGTGATGACTGATACAGACGTG
GGGAATTCAAATGCAACTCTAGCGAAAGTTCATATATTTTTCATAAATAGCTGAGGCTGG
GGTAATTATTTTTGTAGAAAAATAGAAATAGGTGGAATGGTTTGGGGAAGGCGTAGGCGC
TCGTGGACGACGCCCGATAAAAGACAAGAGGCGGAATTGCCATGAATTCGAGGTAGCTAA
GTAAGGCGCATGCATATATATGCCAAAAATTTCTACTGTCACTTTCCAATTTCAATGCGCT
GCCAAACAAGCCATCCTGGAAACTGACTTGAATTCAGCCCAATTTCTGTAGATCCAAACAG
GGCCGGCGTCAGTGCCTCAGGTGAGAGAGCAGCAGACGATGCAAAGAGCCAAAAGTGGA
GCAGACGCAGCCGAAGCCGAAGCCCAAGCCCAAAACTGTTTTGTCTTTGCCCAGAACC
GACGAGCCTAAACTGCCGCTTCTCCTATCTACAAGTCCCTGGCACATCACGCATAGTCC
AACCATGGCGCGCAGGCGATAAGGCGCGCCACGGGGACGCGACATGTGGTGGCGGACGCG
ATCAGGATAGGGCCAGGCTGGCCGGGCGCGGCCACGGGAGAACGGTGGCCACTCGTCCCA
CATCCGCTTCGTCTGTCTGTACTGCGTCTTGCCCCAACGAGAGCCGGAGCCGGCCAT
CCCGTTCGCACACTCTCCCCCTCTATATATGCCGTTCGGTGTGGGGGAGCCTACTACAGGAC
GACCCAAGCAAGCAAGCAAGCAGCGAGTACATACATACTAGGCAGCCAGGCAGCCgaatt
ctccaccATGGCTGCCGCTTCTCCTCCACCGTTCGGAGCGCCGGCCTCCACCCCGACCAG
GAGCAGCTTCTCGGAAGAAGCTCAACAAGCCGCAGGTGTCCGCGGCCGTGACCTACCA
CGGCAAAAGTTCCAGCAGCAACAGCAGGTTCAAGGCGATGGCTGCGAAGGAGGTGGACGA
GACGAAGCAGACCCGACGAGGACAGGTGGAAGGGCCTGGCCTACGACATCTCGGACGACCA
GCAGGACATCACCCAGGGGCAAGGGCCTCGTTCGATAAACCCTTCCAGGCGCCTATGGGGGA
CGGCACCCACGTGCGCGTGCTCAGCTCTACGACTACATCAGCCAGGGCCAAAAGTCTTA
CAACTTCGACAACATGATGGATGGCTTCTACATAGCCAAAGGCTTCATGGACAAGCTCGT
CGTCCACCTCTCCAAGAACTTCATGACCCTCCCAAACATCAAGGTTCCCTCATCCTGGG
TATCTGGGGAGGCAAAGGCCAGGGAAAATCGTTCCAATGCGAGCTGGTCTTCGCCAAGAT
GGGCATCACCCCATCATGATGAGCGCCGGCGAGCTGGAGAGCGGCAACGCCGGAGAGCC
CGCCAAGCTCATCAGGCAGCGCTACCGTGAGGCCTCCGACCTCATCAAGAAGGGCAAGAT
GTCTGCCTCTTCATCAACGACCTCGACGCCGGCGCGGGTTCGCATGGGCGGCACCACCCA
GTACACGGTGAACAACCAGATGGTGAACGCCACCCTGATGAACATCGCCGACAACCCAC
CAACGTGCAGCTGCCGGGGATGTACAACAAGGAGGACAACCCCGCGTGCCCATCATCGT
CACCGGCAACGACTTCTCCACGCTCTACGCGCCGCTCATCCGCGACGGCCGCATGGAGAA
GTTCTACTGGGCGCCACCCGCGAGGACCGCATCGGCGTGTGCAAGGGCATCTTCCGCAC
CGACGGCGTCGATGAGGAGCACGTCGTCAGCTGGTGGACACCTTCCCTGGCCAGTCCAT
CGACTTCTTCGGCGCGCTGCGTGCCAGGGTCTACGACGACGAGGTCCGACGGTGGGTGAG
CGAGACCGGCGTCGAGAACATCGCCAGGAAGCTCGTCAATTCCAAAGAGGGGCCGCCAC
GTTTCGAGCAGCCCAAGATAACGATCGAGAAGCTCTTGAGTACGGACACATGCTGGTGGC
```

GGAGCAGGAGAACGTCAAGCGTGTGCAGCTTGCTGACAAGTACCTCAACGAGGCTGCTCT  
TGGTGAAGCCAACGAGGACGCCATGAAGACTGGCTCCTTCTTCAAGTAGtaaggatccTA  
GACCGCGCCCGCCGGCCGCCCCCGCCGGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGTCTGCGTGAG  
CTAGTAGCTAGTGCCATGCGTCTCTGTCGTTTCGGTTTTGCTTCGGGTCACCGTACCC  
TTTGCTTGCTTGGTTTTCTTCTTTTCCTTTTTTTCCTTTTTTTTTTTCTTCTTTTCCCCGGCCA  
TGGTTCCCTTTGCTTTCCAGCAGTTCTCTGCTGGATGTGATGTATCCATTGTTGCAAGCAT  
GCATGGCCTTGCATTGGCTACCTCTATACCTGCTACAAACTACTGCAACGCCTATATAT  
ACTTGGGGTGAGGAACATGTGAATGCAAGCTCCGGCTATCATATACATGTAATATGGATA  
CAAATATATATATAAATCCGCCGAGGCGCCGACTAATACTATACGACGACACCGTGTTA  
AGTTAATATATAACTGGTGCTTTTTATTATATATCTGTCTCATCATATATATATGCTAA  
TTAATGc



---

# AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a la Dra. Estela Sánchez Quintanar de quien siempre recibí apoyo incondicional. Su invariable ejemplo de trabajo, disciplina, paciencia e inteligencia sobrehumana me motivó cada día a seguir adelante. ¡Gracias infinitas Dra.! Sin usted ésto no habría sido posible.

Al equipo de trabajo de la Dra. Estela: la Dra. Verónica Garrocho Villegas, Dra. Lilia Bernal, M. en C. Raúl Aguilar les agradezco su tiempo y solidaridad. Han sido excelentes guías y valoro mucho todo su apoyo.

Agradezco la ayuda desinteresada de la M. en C. Josefina Vázquez, del Dr. José Molina, el Dr. Ricardo Lobato, la M. en C. Ma. de Teresa Jesús Olvera, la Dra. Amanda Gálvez y la Dra. Carolina Peña.

Personas realmente comprometidas con la vida académica, dispuestos a ayudar en todo lo posible. ¡Muchas gracias!

Agradezco también a los integrantes del comité tutor: Dra. Adriana Garay Arroyo y Dr. Luis Cárdenas Torres por sus acertadas críticas y sugerencias durante el desarrollo de éste trabajo.

A los integrantes del comité evaluador: Dra. Amanda Gálvez Mariscal, Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, Dr. Eleazar Martínez Barajas, Dra. Herminia Loza Tavera y Dr. Manuel Jiménez Estrada les agradezco enormemente sus atinadas observaciones para enriquecer y mejorar la presentación de éste documento.

