



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**REGENERACIÓN *IN VITRO* Y ENSAYOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA A
PARTIR DE EMBRIONES INMADUROS DE LÍNEAS DE MAÍZ DE VALLES
ALTOS DE MÉXICO.**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

PRESENTA

ESBEYDI MARTÍNEZ CRUZ



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Chapingo, Texcoco, Estado de México Octubre de 2009

**REGENERACIÓN *IN VITRO* Y ENSAYOS DE TRANSFORMACIÓN
GENÉTICA A PARTIR DE EMBRIONES INMADUROS DE LÍNEAS DE MAÍZ
DE VALLES ALTOS DE MÉXICO.**

Tesis realizada por **Esbeydi Martínez Cruz** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR:



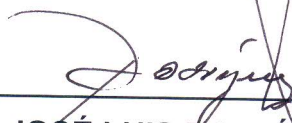
DR. JOSÉ OSCAR MASCORRO GALLARDO

ASESOR:



DR. JOSÉ DE JESÚS LÓPEZ REYNOSO

ASESOR:



DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O

Chapingo, Texcoco, Estado de México Octubre 2009

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a todos los que contribuyeron de manera directa o indirecta en la realización de esta tesis.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Postgrado de Biotecnología Agrícola por darme la oportunidad de emprender y concluir mi Postgrado.

Al Dr. J. Oscar Mascorro Gallardo, por la dirección, la interminable paciencia durante el desarrollo de esta tesis, las valiosísimas sugerencias para su culminación y en especial por la disponibilidad de compartir sus conocimientos.

Al Dr, José de Jesús López Reynoso por la disponibilidad de los materiales necesarios para la elaboración de este trabajo así como su tiempo y dedicación en la revisión y redacción de la tesis.

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O por su invaluable disposición en la revisión y las valiosas contribuciones que ayudaron al mejoramiento de este trabajo.

A Javier García y Rosa María Brito quienes contribuyeron en la realización de este trabajo y compartieron sus experiencias y conocimientos conmigo.

A todos los catedráticos del Postgrado en Biotecnología Agrícola que influyeron en mi formación.

A mis amigos y compañeros de Postgrado por su amistad y apoyo.

A la Sria. Celia García Cadena por su disposición y apoyo.

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de realizar uno más de mis sueños.

A mi hijo Ulises, por todo su amor, paciencia y comprensión, pero sobre todo por el tiempo que no le pude dar mientras alcanzaba esta meta. Eres el motor de mi vida.

A mi esposo Bonifacio por su incondicional apoyo y amor pero sobretodo por caminar juntos a través de la vida. Te amo.

A mis padres Elvia y Bernabé por fijar los cimientos de mi vida e impulsar mi superación. Los amo.

A mis hermanas por su cariño y apoyo, en especial a Yuri (por recordarme que el universo entero confabula para lograr lo que se desea), siempre las llevo en mi corazón.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor nació en Santa María Asunción Tlaxiaco, Oaxaca, el 23 de abril de 1979. Cursó sus estudios de primaria y secundaria en la misma ciudad. En 1994 ingresó a la Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, donde estudió también su licenciatura en el Departamento de Fitotecnia, obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo, Especialista en Fitotecnia en el año 2002.

En el periodo de enero de 2005 a enero de 2006 trabajó en el municipio de San Pedro y San Pablo Teposcolula, Oaxaca, en la elaboración y realización de proyectos productivos.

En enero de 2007 a diciembre de 2008, cursó los créditos de la Maestría en Biotecnología Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo.

CONTENIDO

	Pag.
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN Y ABSTRACT	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos generales	3
1.2 Objetivos específicos	3
1.3 Hipótesis	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Totipotencia celular	4
2.2 Regeneración de maíz bajo cultivo <i>in vitro</i>	5
2.2.1 Embriogénesis somática	6
2.2.1.1 Embriogénesis somática en maíz a partir de embriones inmaduros	7
2.2.1.2 Embriogénesis somática en maíz a partir de embriones maduros	8
2.3 Transformación genética de maíz	9
2.3.1 Transformación utilizando el método de agroinfección	9
2.3.2 Transformación utilizando el método de biobalística	10
2.4 Aplicaciones de la ingeniería genética para el mejoramiento de maíz	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1 Regeneración por embriogénesis somática	14
3.1.1 Material vegetal	14
3.1.2 Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	15
3.1.2.1 Esterilización del material vegetal	15
3.1.2.2 Explantes	16
3.1.3 Inducción de callo embriogénico	16

3.1.3.1 Medios de cultivo	16
3.1.3.2 Condiciones de cultivo	18
3.1.3.3 Caracteres evaluados	18
3.1.4 Inducción de brotación	19
3.1.4.1 Medios de cultivo	19
3.1.4.2 Condiciones de cultivo	19
3.1.4.3 Caracteres evaluados	19
3.1.5 Inducción de raíz	20
3.1.5.1 Medio de cultivo	20
3.1.5.2 Condiciones de cultivo	20
3.1.6 Adaptación ex-vitro	21
3.1.6.1 Condiciones de cultivo	21
3.1.6.2 Caracteres evaluados	21
3.2 Protocolo de regeneración	21
3.3 Transformación genética por el método de agroinfección	23
3.3.1 Material vegetal	23
3.3.2 Iniciación y mantenimiento de callos	24
3.3.3 Genes quiméricos	24
3.3.4 Iniciación del cultivo de <i>Agrobacterium</i>	25
3.3.5 Agroinfección	25
3.3.5.1 Inoculación	25
3.3.5.2 Cocultivo	26
3.3.5.3 Maduración	27
3.3.5.4 Selección	27
3.3.5.5 Regeneración	27
3.3.5.6 Adaptación ex-vitro	28
3.3.5.7 Caracteres evaluados	28
3.3.6 Caracterización molecular por PCR de las plantas transformadas	28

3.3.6.1 Extracción de ADN genómico	28
3.3.6.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	30
3.3.6.2.1 Iniciadores	30
3.3.6.2.2 Mezcla de reacción	31
3.3.6.2.3 Programa de amplificación	32
3.3.7 Protocolo de transformación genética por el método de agroinfección	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1 Porcentaje de Callo Embriogénico (PCE)	34
4.1.2 Características físicas de los callos en las líneas de maíz azul	37
4.1.2.1 Callo Tipo I	37
4.1.2.2 Callo Tipo II	38
4.1.3 Características físicas de los callos en las líneas de maíz blanco	40
4.2 Evaluación de la regeneración	41
4.2.1 Regeneración obtenida en las líneas de maíz azul	41
4.2.1 Regeneración obtenida en las líneas de maíz blanco	43
4.3 Supervivencia de plantas aclimatadas y variación morfológica	44
4.4 Agroinfección	47
4.4.1 Formación de callo	47
4.4.2 Resistencia a PPT y kanamicina	50
4.4.3 Evaluación de regeneración	51
4.5 Caracterización molecular por PCR de las plantas transformadas	53
V. CONCLUSIONES	56
VI. BIBLIOGRAFÍA	57
VII. ANEXOS.	65

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Líneas de maíz blanco y azul de la UACH evaluadas en su capacidad de regeneración por embriogénesis somática.	14
Cuadro 2. Líneas de maíz desarrolladas en la UACH y utilizadas para intentar la transformación por el método de agroinfección.	23
Cuadro 3. Medios de cultivo utilizados para el desarrollo de callos embriogénicos, modificados de Vega <i>et al.</i> (2008).	26
Cuadro 4. Mezcla de reacción utilizada en el PCR para amplificar los genes NPTII, ScTPSP y α -zeína.	31
Cuadro 5. Porcentaje de callo embriogénico y características físicas de los callos embriogénicos formados en las líneas de maíz azul.	35
Cuadro 6. Porcentaje de callo embriogénico y características físicas de los callos embriogénicos formados en las líneas de maíz blanco.	36
Cuadro 7. Regeneración obtenida en las líneas de maíz azul inducidas en los medios N6C1SN y MSE3, a las 8 semanas después de la inducción de los explantes.	42
Cuadro 8. Regeneración obtenida en las líneas de maíz blanco inducidas en el medio de cultivo N6C1SN, a las 10 semanas después de la inducción de los explantes.	43
Cuadro 9. Plantas regeneradas a través de embriogénesis somática y porcentaje de supervivencia de líneas de maíz azul, después de 12 semanas de inducción	44

de los explantes.

Cuadro 10.	Plantas regeneradas a través de embriogénesis somática y porcentaje de supervivencia de líneas de maíz blanco, después de 14 semanas de inducción de los explantes.	45
Cuadro 11.	Número de explantes utilizados en la transformación genética por el método de agroinfección por línea y construcción utilizada.	49
Cuadro 12.	Brotación y enraizamiento de plantas obtenidas en los experimentos de agroinfección.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de embriones inmaduros de maíz.	15
Figura 2. Representación esquemática de micropropagación por embriogénesis somática de maíz, adaptada de Bronsema <i>et al.</i> , (1997).	17
Figura 3. Protocolo de regeneración por embriogénesis somática de maíz.	22
Figura 4. Protocolo de transformación genética por el método de agroinfección.	33
Figura 5. Tipo de callo embriogénico formado en las líneas de maíz azul.	39
Figura 6. Tipo de callo embriogénico formado en las líneas de maíz blanco.	41
Figura 7. Regeneración y obtención de plantas a través de cultivo <i>in vitro</i> en líneas de maíz blancos y azules.	46
Figura 8. Protocolo de transformación.	48
Figura 9. Características físicas de los callos obtenidos en las líneas de maíz agroinfectadas.	50
Figura 10. Selección y regeneración de brotes embriogénicos posiblemente transformados.	52
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para detectar el gen GUS en plantas de maíz transformadas por agroinfección.	53
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para detectar el gen <i>ScTPSP</i> en plantas de maíz transformadas por agroinfección.	54

REGENERACIÓN *IN VITRO* Y ENSAYOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA A PARTIR DE EMBRIONES INMADUROS DE LÍNEAS DE MAÍZ DE VALLES ALTOS DE MÉXICO.

REGENERATION *IN VITRO* AND ASSAYS OF GENETIC TRANSFORMATION OUT OF IMMATURE EMBRYOS OF MAIZE INBREDS OF HIGH VALLEYS OF MÉXICO.

Martínez-Cruz, E.¹⁾, Mascorro-Gallardo, J.O.²⁾.

RESUMEN

Un requisito indispensable para la aplicación de las técnicas de transformación genética, es la disponibilidad de un procedimiento de regeneración *in vitro* eficiente y reproducible. El objetivo de la presente investigación fue determinar dichos protocolos en 10 líneas de maíz azul y 20 líneas de maíz blanco provenientes del Programa de Mejoramiento Genético de Maíz del Departamento de fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, en términos de capacidad de regeneración por embriogénesis somática de embriones inmaduros y eficiencia de transformación. Para ello se probaron dos medios de cultivo para la inducción de embriogénesis el N6C1SN y el MSE3, y la inducción de brotes se hizo en medio MS suplementado con AIA (0.5 mg.L⁻¹) y BAP (1 mg.L⁻¹). Adicionalmente fueron hechos algunos ensayos de transformación por el método de agroinfección. Los componentes del medio no influyeron en la formación de callo embriogénico, en las características físicas de los callos ni en la regeneración de plantas. Se identificaron dos líneas de maíz (ChAzE5 y ChBl103) que dieron resultados aceptables de regeneración aunque no tuvo asociación con la producción de callo embriogénico. No hubo éxito en la obtención transformantes verdaderos bajo selección con fosfonitricina y kanamicina comprobado mediante PCR. El potencial de formación de callo embriogénico y la regeneración *in vitro* tuvo una respuesta favorable y diferencial dependiendo de los genotipos evaluados. Es necesario determinar la presión de selección con el agente selectivo y aumentar la eficiencia de la agroinfección usando el gen reportero GUSint antes de llevar a cabo nuevos ensayos para obtener transformantes estables verdaderos.

Palabras clave: Embriogénesis, regeneración, maíz, transformación.

¹Tesista ²Director de tesis

ABSTRACT

An indispensable requisite for applying genetic transformation techniques is the availability of an efficient and reproducible regeneration procedure. The objective of this investigation was to determine these protocols in 10 blue grain inbreds and 20 white grain inbreds from the Program for Genetic Improvement of Maize of the Department of Fitotecnia, Autonomous University of Chapingo, in terms of capacity of regeneration by somatic embryogenesis from immature embryos and efficiency of transformation. Two media for induction of somatic embryogenic calli were evaluated, N6C1SN and MSE3; after that, the induction of shoots was made in MS media supplemented with AIA (0.5 mg.L⁻¹) and BAP (1 mg.L⁻¹). Some transformation assays by agroinfection method were also performed. Media composition did not influence the formation of embryogenic calli, physical characteristics of the calli and shoot production. Two inbreds of maize (ChAzE5 y ChBl103) were identified, that gave acceptable results in shoot production, although this variable did not associated with the production of embryogenic calli. There was no success in obtaining true transformants under phosphonitricin and kanamicin selection, since results with PCR were negative. The potential of formation of embryogenic calli and the *in vitro* regeneration had a favorable and differential response depending of the evaluated genotypes. It is necessary to determine the selection pressure with the selective agent, and to increase the agroinfection efficiency by using the GUSint reporter gene before performing new assays to obtain stable true transformants.

Key words: Embryogenesis, regeneration, maize, transformation.

I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día la ingeniería genética, definida como la manipulación en laboratorio de la información genética de un organismo utilizando las técnicas de la biología molecular, se presenta como una poderosa alternativa para obtener cultivares transgénicos que superen en su productividad y calidad a sus contrapartes obtenidas por métodos tradicionales (Herrera y Martínez, 2007), pero sin dejar de lado las metodologías convencionales de mejoramiento, es decir, que los nuevos conocimientos y la tecnología del ADN deben ser combinados con el trabajo práctico de campo y llegar a mayores y mas rápidas ganancias en la productividad del maíz (Paliwal *et al.*, 2001).

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los principales cultivos en el mundo no sólo por usarse en la alimentación humana sino también por otros usos como; un recurso de ingresos, alimento para animales, abono, usos industriales y para estudios de genética, genómica y biología molecular. Por lo cual ha sido estudiado desde hace muchos años, como en el trabajo de Green y Phillips (1975) donde se reporta regeneración por cultivo de tejidos, y gracias a esa y muchas otras investigaciones realizadas hasta la fecha se han logrado avances sobre los tipos de explantes, medios de cultivo y reguladores de crecimiento a utilizar; ya que este valioso recurso genético será mejor utilizado si se cuenta con un sistema de transformación genética rápida, eficiente y reproducible (Vega *et al.*, 2008).

El primer método de transformación utilizado en maíz fue el de biobalística pero actualmente se ha reportado en varios trabajos que la transformación de esta especie puede llevarse a cabo utilizando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Ishida *et al.*, 1996, Frame *et al.*, 2002, Frame *et al.*, 2006, Sidorov *et al.*, 2006, Ishida *et al.*, 2007, Valdez *et al.*, 2007 y Vega *et al.*, 2008). Este método ofrece ventajas adicionales como, la posibilidad de transferir grandes segmentos de ADN dentro de las células, la regeneración de un número alto de eventos transgénicos, estables con bajo número de copias y correctamente expresados, lo cual produce

menos rearreglos del transgen (Frame *et.al.*, 2002 y 2006, Vega *et al.*, 2008). Además de ser una tecnología bastante económica (Valdez-Ortíz *et al.*, 2007).

Tanto los estudios de inducción y mantenimiento de callo embriogénico como los de transformación se ha realizado principalmente utilizando los genotipos A188, B73, HII (A188 x B73) y líneas tropicales. Para que la ingeniería genética pueda aplicarse a variedades e híbridos cuya adaptación ha sido previamente demostrada en cada país o región, debe de contarse con protocolos eficientes de regeneración y de transformación genética que permitan integrar la ingeniería genética a los esquemas de mejoramiento clásico. En México, poco se ha logrado en este aspecto, dejando todo en manos del mejoramiento clásico, por lo cual es necesario empezar a evaluar los materiales que ya están adaptados a cada región de nuestro país para que en investigaciones posteriores sean utilizadas en estudios de mejoramiento genético, genómica, biología molecular, etc.

1.1 Objetivos generales

1. Determinar el protocolo de regeneración que permita identificar líneas de maíz de Valles Altos de México obtenidas por la Universidad Autónoma Chapingo con la mayor capacidad de regeneración por embriogénesis somática usando como explantes embriones inmaduros para que puedan ser utilizadas en trabajos de ingeniería genética.
2. Evaluar la eficiencia de transformación con el gen *ScTPS1-TPS2* por el método de agroinfección (*Agrobacterium tumefaciens*) en líneas de Valles Altos de México y dos líneas subtropicales del CIMMyT, para tratar de aumentar su resistencia a sequías.

1.2 Objetivos específicos

1. Identificar el medio de cultivo y los reguladores en los cuales se obtiene la mayor capacidad embriogénica.
2. Regenerar plántulas de las líneas embriogénicas y crecerlas para analizar su comportamiento fenotípico.
3. Trasformar embriones cigóticos inmaduros por el método de Agroinfección tanto de las líneas de Valles Altos como de dos líneas subtropicales del CIMMyT.

1.3 Hipótesis

1. La regeneración obtenida en las líneas de maíz dependerá del genotipo así como del medio de cultivo utilizado.
2. Las líneas desarrolladas y adaptadas a Valles Altos de México pueden ser transformadas por agroinfección.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Totipotencia celular

Haberlandt (1902) propuso que todas las células vegetales pueden volver a una condición meristemática y desarrollar un nuevo punto de crecimiento, lo cual se logra después de que el órgano o célula ha sido extraído y colocado en medio de cultivo. Esta re-programación del desarrollo implica los siguientes eventos consecutivos (Altman, 1998):

- 1) Des-diferenciación de los tejidos u órganos; éste resulta en la activación de mecanismos fisiológicos que dirigen la división celular, bajo condiciones endógenas y exógenas apropiadas.
- 2) Activa división celular en toda la superficie del corte, o actividad meristemática localizada en regiones específicas de el explante, o ambos; esto resulta a menudo, pero no siempre, en proliferación de tejido de calloso.
- 3) Organización de meristemos definidos; esto ocurre en las zonas de división celular activa y resulta en formación de brotes o meristemos de raíz, o ambos.
- 4) Morfogénesis *in vitro*: Respuestas morfogénicas *in vitro* que implican la *organogénesis* (formación de nuevas yemas de brotes o nuevas raíces), o

embriogénesis somática (la diferenciación bipolar de embriones somáticos). La organogénesis y embriogénesis somática pueden ser directas, es decir que provienen del explante y no implica la formación de callo, o indirectas, de un tejido calloso.

Totipotencia es la capacidad de una célula de regenerar el fenotipo de un organismo completo y diferenciado del cual provino (Matell *et al.*, 1985).

2.2 Regeneración de maíz bajo cultivo *in vitro*.

Sharp y Evans (1984), mencionan que el cultivo de tejidos en maíz comenzó probablemente en 1947 con los trabajos de La Rue con endospermo de maíz. Pero la regeneración de plantas se reportó en 1975 por Green y Phillips mediante la vía de embriogénesis somática a partir de embriones inmaduros (Furini and Jewell, 1994 y Bronsema *et al.*, 1997).

Las condiciones de cultivo han sido mejoradas usando principalmente como medio de cultivo al MS (Murashige y Skoog, 1962) y el N6 (Chu *et al.*, 1975) en combinación con auxinas promotoras de embriogénesis somática como el 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4- D), Dicamba (2-metoxi-3,6-ácido diclorobenzoico) y 4-ácido diclorofenoxiacético (CPA) obteniendo con ellos embriogénesis somática (Bhaskaran y Smith, 1990).

En monocotiledóneas, explantes que contienen células meristemáticas inmaduras, desarrollan callos que son competentes para expresar totipotencia. Los meristemos de brotes, bases de hojas jóvenes, inflorescencias inmaduras, embriones inmaduros, tejido nodal, anteras, embriones maduros y en raras ocasiones puntas de raíz producen callo regenerable en especies de cereales. Pero los embriones inmaduros son los más ampliamente usados en maíz (Bhaskaran y Smith, 1990).

2.2.1 Embriogénesis somática

Las técnicas de embriogénesis somática fueron originalmente desarrolladas para satisfacer dos metas principales: micropropagación masiva y el desarrollo de herramientas celulares para el mejoramiento genético (ejemplo: transformación genética y fusión de protoplastos). Éstas técnicas se apoyan en el uso de reguladores sintéticos de crecimiento (auxinas) para inducir la des-diferenciación de los tejidos y la formación de tejido embriogénico (callos) (Strosse *et al.*, 2003).

La embriogénesis somática se define como el proceso dónde los cultivos de callos, suspensión o protoplastos desarrollan embriones completos, similares a los embriones cigóticos producidos en las semillas (Green, 1983). El embrión somático es una estructura bipolar independiente y no esta físicamente unida al tejido original. Dichos embriones posteriormente desarrollan raíces, ápice y sus órganos cotiledonares, por lo que son capaces de germinar en plántulas de la misma manera como sucede con los embriones cigóticos (Ammirato, 1983).

El éxito del cultivo tejidos de maíz es frecuentemente dependiente del tejido donador elegido para la iniciación del cultivo, el cual depende del genotipo de las plantas y también de los estados fisiológicos y de desarrollo apropiados (Green, 1983). Ya que de estos y de las condiciones de cultivo dependerá la regeneración y especialmente la embriogénesis somática.

Cuando los embriones inmaduros son colocados en el medio de cultivo, las células del escutelum se vuelven activas, el número de organelos incrementa y la morfología vacuolar y nucleolar cambia. Esta reacción es llamada respuesta de shock. Una segunda respuesta es la inducción de callo, llamada respuesta de crecimiento y depende de la presencia de reguladores de crecimiento y es caracterizada por actividad mitótica en las células que son sensitivas a estos. En el escutelum se da la aparición de una amplia zona meristemática escutelar y se

observa una segunda región meristemática alrededor de la coleoriza (Bronsema *et al.*, 1997).

Armstrong y Green (1984) y Armstrong y Phillips (1988) proponen que al menos dos tipos diferentes de callo en el cultivo de tejido de maíz regenerable puede ser iniciado de algunos genotipos. Callo Tipo-I (organogénico) es caracterizado por un alto grado de asociación celular y diferenciación. Aunque embriones somáticos bien desarrollados son ocasionalmente observados en callos Tipo-I, el modo de origen de regenerar brotes no es obvio, ya que observaciones histológicas a este tipo de cultivo generaron evidencia de que la regeneración de plantas puede ocurrir tanto por organogénesis como por embriogénesis somática. En contraste, el callo Tipo-II (friable, embriogénico) es friable e indiferenciado, excepto por la presencia de numerosos embriones somáticos en estado globular a través del anillo coleoptilar. Observaciones histológicas de callos de maíz Tipo-II han verificado que la regeneración de plantas ocurre por medio de embriogénesis somática. La regeneración de plantas de callo embriogénico Tipo- II derivado de embriones inmaduros ha sido el sistema más reproducible de regeneración y/o transformación descrito para maíz (O'Connor-Sánchez *et al.*, 2002). Frame *et al.* (2000) describen tres distintas histologías de callo tipo II (pre-embriogénico, embriogénico temprano y embriogénico tardío) y proponen que los callos pre-embriogénicos pueden ser particularmente dóciles en transformación por biobalística debido que poseen 1-2 capas gruesas de unidades embriogénicas que caracterizan la morfología de su superficie y que sirven como blanco del bombardeo.

2.2.1.1 Embriogénesis somática en maíz a partir de embriones inmaduros

Para todas las especies de cereales el tejido escutelar de embriones inmaduros es un explante adecuado, del cual, pueden ser regeneradas plantas fértiles en altas frecuencias vía embriogénesis somática (Brettschneider, *et al.* 1997).

Según los resultados de Bohovora *et al.* (1995) son cuatro los factores que afectan el desarrollo de callo embriogénico en maíz: 1) El tamaño de los embriones inmaduros (longitud óptima de 1.0-1.5 mm), 2) El genotipo, 3) El medio de cultivo de callos y 4) El ambiente donde crecieron las plantas iniciales.

De acuerdo a la clasificación de Armstrong y Phillips (1988) de los callos embriogénicos (Tipo-I y Tipo-II) en maíz, Carvalho *et al.* (1997) y Frame *et al.* (2000) mencionan que el callo Tipo I es fácilmente obtenido de embriones inmaduros de maíz, mientras que el callo Tipo II tiende a ser iniciado en menor frecuencia en este mismo tipo de explantes y es obtenido de pocos genotipos, sin embargo este es el más preferido ya que debido a su naturaleza friable permite el establecimiento de suspensiones celulares, cultivo de protoplastos y algunos tipos de manipulación *in vitro*, así como a mantener la habilidad de regenerar plantas por más tiempo. La regeneración de plantas de callo embriogénico Tipo- II derivado de embriones inmaduros ha sido el sistema más reproducible de regeneración y/o transformación descrito para maíz (O'Connor-Sánchez *et al.*, 2002).

2.2.1.2 Embriogénesis somática en maíz a partir de embriones maduros

Desde 1992, Zhong *et al.* demostraron que los meristemas de maíz obtenidos de semillas maduras son morfológicamente elásticos y pueden ser manipulados para producir múltiples brotes y embriones somáticos en maneras relativamente independientes del genotipo por simple variación de las condiciones de cultivo *in vitro*.

O'Connor-Sánchez *et al.* (2002), modificaron el protocolo de Zhong y encontraron que, bajo condiciones de luz primero obtuvieron callos organogénicos; subsecuentemente, en oscuridad, algunas regiones de los callos generaron estructuras parecidas a las embriogénicas; las cuales cambiándolas a la luz produjeron callo organogénico. Con esto probaron que la interconversión de callo

organogénico a callo embriogénico es posible en maíz. Además de que los callos obtenidos mostraron una alta capacidad de regenerar plantas.

Por su parte Sidorov *et al.* (2006) utilizó como explantes secciones nodales de plántulas de maíz, que fueron cortadas longitudinalmente en dos piezas, observando la iniciación directa de cultivo embriogénico de callo Tipo- I, el cual fue similar al que se genera utilizando embriones inmaduros.

Los resultados de Zhong *et al.* (1996) y Sidorov *et al.* (2006) fueron confirmados por Martínez (2008) quien utilizó tanto meristemos como secciones nodales de plántulas generadas de semillas inmaduras.

2.3 Transformación genética del maíz

La producción de organismos transgénicos implica la alteración de la composición genética de los organismos (Desmond, 1994), por otros medios que no son la fusión de gametos u otras células, implicando la integración de genes en el genoma nuclear de la planta (Birch, 1997). Esta tecnología hace posible introducir en plantas, genes provenientes no sólo de otras especies vegetales evolutivamente distantes, sino incluso de hongos, virus, bacterias y animales (Herrera y Martínez, 2007).

2.3.1 Transformación utilizando el método de agroinfección

El primer método diseñado para la transformación de células vegetales surgió del estudio detallado del mecanismo de infección de la bacteria fitopatógena *Agrobacterium tumefaciens*. En el año de 1983 se reportó el primer caso exitoso de la expresión de un transgen en células vegetales, al siguiente año se obtuvo la primera planta de tabaco transgénica (Herrera y Martínez, 2007). Éste método tiene ventajas como el de transferir segmentos relativamente largos de ADN con

pocos rearreglos y la integración de pocos números de copias dentro del cromosoma de la planta (Ishida *et al.*, 1996).

Se pensaba que el método de transferencia de genes por el método de Agroinfección era limitado sólo a plantas dicotiledóneas ya que las monocotiledóneas no son hospedantes naturales de *Agrobacterium tumefaciens* (Ishida *et al.*, 1996), pero uno de los primeros trabajos sobre transformación de maíz con *Agrobacterium* fue el realizado por Gould *et al.* (1990) quien utilizó ápices como explantes y la cepa EHA1 de *Agrobacterium* con el plásmido pGUS3, obteniendo pocas plantas transgénicas. Con el tiempo se logró la transformación utilizando embriones inmaduros de la línea A188, utilizando vectores súper-binarios, con lo cual se reportaron frecuencias de transformación de entre 5 y 30% (Ishida *et al.*, 1996). También se mejoró la técnica usando vectores binarios estándar, los cuales tienen la ventaja de no utilizar plásmidos muy grandes y genes de virulencia adicionales, y usando 400 mg L⁻¹ de L-cisteína durante la cocultivación de embriones inmaduros de maíz Hi II se logró una eficiencia de transformación de 5.5% (Framme *et al.*, 2002). En otro trabajo donde se utilizó callos embriogénicos Tipo I como explantes derivados de secciones nodales de plántulas, se observó que al utilizar 2.2 mg L⁻¹ de picloram y 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D en el medio de inducción la frecuencia de transformación varió de 2 a 11% (Sidorov *et al.* 2006). Otra mejora al método de Agroinfección fue la de utilizar medios bajos en sales y el uso de la combinación de antioxidantes L-cisteína y dithiothreitol (DTT) durante el estado de infección de *Agrobacterium* en embriones inmaduros, obteniendo así frecuencias de transformación del 12 a 18% (Vega *et al.*, 2008).

2.3.2 Transformación utilizando el método de biobalística

La biobalística (balística biológica) consiste en la introducción directa por métodos físicos de ácidos nucleicos a células vegetales. El método físico por el cual se introduce el ADN consiste en el bombardeo de tejidos con micropartículas

cubiertas con el ADN o con cualquier otra biomolécula que se pretenda introducir a las células vegetales (Herrera y Martínez, 2007).

Klein *et al.* (1989, 1988), demostró expresión transitoria y estable, con gen *GUS* (β -glucoronidasa) y el gen de resistencia a kanamicina respectivamente, bombardeando embriones inmaduros y células en suspensión de maíz. Parámetros tales como la cantidad de partículas de oro usadas por bombardeo, velocidad de las partículas, tiempo de precultivo del escutelum antes del bombardeo y tratamientos osmóticos del tejido blanco antes y después del bombardeo fueron analizados en líneas H99, A188 y Pa91 y las cruzas de A188 x H99 y Pa91 x H99 de las cuales se obtuvieron plantas transgénicas tolerantes al herbicida Basta (Fosfinitricina PPT) (Brettschneider, 1997); por su parte Gordon-Kamm *et al.* (1990) lograron plantas de maíz transgénicas resistentes al mismo herbicida, bombardeando cultivos en suspensión de las líneas A188 x B73 y A188 x B84. Y se han desarrollado y caracterizado eventos tolerantes a Glifosato (N-fosfonomethyl-gicina) (Heck *et al.* 2005). También se ha reportado la transformación genética de maíz usando bombardeo de partículas de callos organogénicos-embriogénicos derivados de ápices de brotes. (O'Connor-Sánchez *et al.*, 2002)

2.4 Aplicaciones de la ingeniería genética para el mejoramiento del maíz

Al igual que el fitomejoramiento tradicional, la biotecnología se ha enfocado principalmente en la búsqueda de incrementos en la producción y protección de los cultivos agrícolas contra plagas y enfermedades. Sin embargo se pueden llegar a beneficiar la industria, el ambiente y la salud humana y animal, produciendo no solo variedades tolerantes a plagas, enfermedades y condiciones adversas, sino plantas capaces de producir insumos de alto valor económico y ambiental.

Un ejemplo claro de lo anterior, es el interés mostrado en genes provenientes de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, que codifican para proteínas cristalinas con propiedades insecticidas conocidas como δ -endotoxinas; las cuales cuando son ingeridas por los insectos ejercen su toxicidad mediante la unión a células intestinales del tracto digestivo ocasionando una lisis osmótica. De éstas las proteínas llamadas CryI son activas contra lepidópteros (Herrera y Martínez, 2007), y han sido usadas para incrementar el nivel de resistencia a plagas de insectos como el gusano de la mazorca de maíz, gusano soldado de otoño, el barrenador de maíz y barrenador de caña de azúcar. Bohorova *et al.* (1999 y 2001) confirmaron la resistencia a estas plagas así como la inducción del gen y su expresión estable en líneas de maíz tropical. Primero usando los genes *Cry1Ab* y *Cry1Ac* y posteriormente con el gen *Cry1Ab* y la fusión traduccional del gen *Cry1B-Cry1Ab*. Por otra parte, al realizar una fusión (BtRB) de la δ -endotoxina *Cry1Ac* (Bt) con el dominio de unión a galactosa de la cadena-B de ricina no tóxica (RB), provee a la toxina con adicionales dominios de unión, lo cual incrementa el número potencial de interacciones a nivel molecular en los insectos. Plantas de maíz y arroz transformadas con este gen fueron significativamente más tóxicas que aquellas que contenían únicamente el gen Bt (Mehlo *et al.*, 2005).

En otro trabajo se transformaron líneas élite de maíz con un gen que codifica una lectina, GNA: *Galanthus nivalis* L. aglutinina, el cual tiene efectos detrimentales significativos en áfidos y otros insectos homópteros, bajo el control de un promotor específico de floema por el método de agroinfección. Se observó que algunas plantas analizadas sintetizaban el gen GNA a niveles de 0.22% de la proteína total soluble e incrementaron la resistencia al áfido *Rhopalosiphum maidis* y la producción de ninfas fue reducida en 46.9% (Wang *et al.* 2005).

En cuanto a trabajos sobre la mejora de la calidad en la alimentación humana en maíz, una promisorio estrategia es la introducción, a través de la ingeniería genética, de genes que codifican proteínas con alto valor nutricional dentro de cultivos con importancia agronómica. Por esta razón Rascón-Cruz *et al.* (2004)

introdujeron un gen que codifica para la proteína Amarantina que es una globulina 11S de ADNc de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) en maíz, confirmando con análisis moleculares su integración así como su procesamiento y estable acumulación dentro del endospermo en maíz.

Las proteínas reguladoras CFB son factores de transcripción que trabajan como switches que activan múltiples genes de aclimatación a frío y respuestas a estrés por sequía, y se han encontrado en *Arabidopsis*. El gen DREB1A/CBF3 se introdujo en maíz, por el método de biobalística y utilizando como explantes semillas cortadas de maíz, y fue detectado en 18 líneas transgénicas además de que las plantas de estas líneas tuvieron significativa tolerancia a frío, sequía y salinidad comparadas con las no transformadas (Al-Abed *et al.*, 2007).

La trehalosa (α -D-glucopiranosil α -D-glucopiranosido) juega un importante papel fisiológico como un protector de estrés abiótico en un gran número de organismos; causando un efecto protector sobre las enzimas y membranas celulares, evitando su desnaturalización, durante la presencia de sequías extremas (Mascorro *et al.*, 2005). Por ingeniería genética, se hizo la fusión traduccional de un gen que codifica trehalosa-6-fosfato sintasa /fosfatasa (TPSP) que incluye regiones de codificación de *Escherichia coli* *otsA* y del *otsB* (codificando para TPS y TPP respectivamente), con lo cual en un solo evento de transformación se obtienen plantas que sobre producen trehalosa con una gran eficiencia catalítica. Con esta construcción se obtuvieron plantas transgénicas de arroz las cuales acumularon trehalosa en cantidades de hasta 1 mg/g de peso fresco, lo que les confirió tolerancia a sequía, salinidad y frío, sin alteraciones negativas en la morfología y el desarrollo (Garg *et al.*, 2002). Miranda *et al.* (2007) construyeron la fusión traduccional quimérica trehalosa-6-fosfato sintasa /fosfatasa (TPS-TPP) pero de levadura y la sobreexpresaron en *Arabidopsis thaliana*, obteniendo líneas con un incremento significativo de tolerancia a sequía, heladas, salinidad y calor. Este gen puede ser usado en maíz y otros cultivos importantes para conferir dichas ventajas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Regeneración por embriogénesis somática

3.1.1 Material vegetal

Se evaluó la capacidad de regeneración por embriogénesis somática en 10 líneas de maíz azul (establecidas en el laboratorio del 25-septiembre-07 al 11-enero-08) y 20 líneas de maíz blanco (establecidas en el laboratorio del 29-septiembre-08 al 10-febrero-09) (Cuadro 1), a cargo del Dr. José de Jesús López Reynoso en Programa de Mejoramiento Genético de Maíz del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), las cuales han sido sometidas a selección en años anteriores por sus características físicas y alto rendimiento. La investigación se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Genética del Departamento de Fitotecnia de la UACH en Chapingo.

Cuadro 1. Líneas de maíz blanco y azul de la UACH evaluadas en su capacidad de regeneración por embriogénesis somática.

Líneas de Maíz Azul	Líneas de maíz Blanco	
ChAzE1	ChBI101	ChBI301
ChAzE2	ChBI102	ChBI303
ChAzE3	ChBI103	ChBI305
ChAzE4	ChBI201	ChBI306
ChAzE5	ChBI202	ChBI307
ChAzE6	ChBI203	ChBI308
ChAzE7	ChBI204	ChBI309
ChAzE8	ChBI205	ChBI310
ChAzE9	ChBI206	ChBI401
ChAzE10	ChBI208	ChBI402

3.1.2 Establecimiento del cultivo *in vitro*

3.1.2.1 Esterilización del material vegetal

Previo al establecimiento *in vitro* se llevó a cabo la desinfestación, la cual consistió en que a cada mazorca se le quitaron las brácteas que la cubren así como los estigmas (Figura 1-A), para hacer una esterilización superficial sumergiéndolas primeramente en etanol al 70% por 3 minutos y después en hipoclorito de sodio (Clorox^R) al 50% mas Tween 80 por 30 minutos (Figura 1-B). Después las mazorcas fueron enjuagadas tres veces con agua desionizada estéril, esto dentro de la campana de flujo laminar.

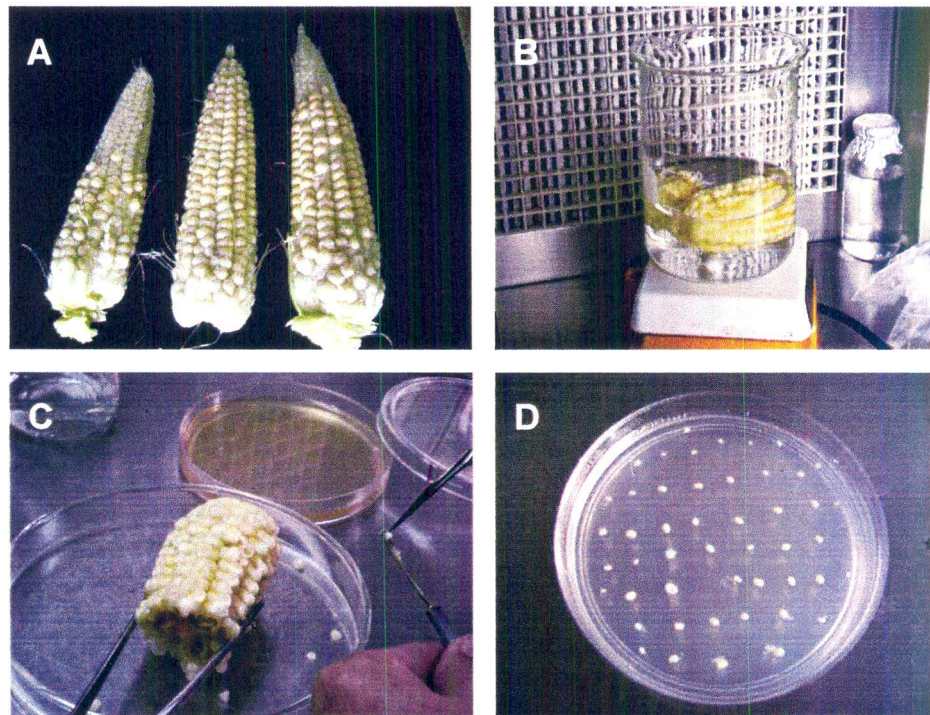


Figura 1. Establecimiento del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de maíz. **A)** Elotes de maíz listos para esterilizar y extraer embriones. **B)** Esterilización. **C)** Extracción de embriones **D)** Colocación de los embriones en medio de cultivo.

3.1.2.2 Explantes

Se utilizaron como explantes embriones inmaduros (Figura 2), de 20 a 26 días después de la polinización y de un tamaño que varió de 1.0 a 1.5 mm, los embriones inmaduros fueron asépticamente removidos de los granos de la mazorca haciendo un corte con el bisturí y extrayéndolos con la ayuda de una espátula (Figura 1-C) para posteriormente colocar 15 embriones con la cara plana hacia abajo (Figura 1-D y Figura 2) en cajas de Petri estériles de 100x15 mm (25ml).

3.1.3 Inducción de callo embriogénico

3.1.3.1 Medios de cultivo

Las líneas de maíz azul se probaron en dos medios de cultivo:

- Medio N6C1SN (Bohorova, 1995) el cual consiste de medio basal N6 (sales N6 y vitaminas N6: tiamina HCL 1mg/L, piridoxina HCl 0.5 mg.L⁻¹, ácido nicotínico 0.5 mg.L⁻¹ y glicina 2.0 mg.L⁻¹) más caseína hidrolizada 200 mg.L⁻¹, L-prolina 2.302 mg.L⁻¹, sacarosa 30 g.L⁻¹, ácido 3,6-dicloro-O-anísico (Dicamba) 2 mg.L⁻¹ y nitrato de plata 15.3 mg.L⁻¹.
- Medio MSE3, el cual se compone de sales Murashige y Skoog (1962) suplementado con Vitaminas MS, myo-inositol 100 mg.L⁻¹, piridoxina-HCL 1.0 mg.L⁻¹, tiamina HCL 10 mg.L⁻¹ más L-asparagina 150 mg.L⁻¹, sacarosa 60 g.L⁻¹ y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 2.5 mg.L⁻¹.

El pH de ambos medios fue ajustado con NaOH a 5.7 en un potenciómetro (pH 211 HANNA instruments), y se adicionaron 8 g.L⁻¹ de agar (bacto agar, Merck) antes de la esterilización.

Mientras que las líneas de maíz blanco sólo fueron evaluadas en el medio N6C1SN.

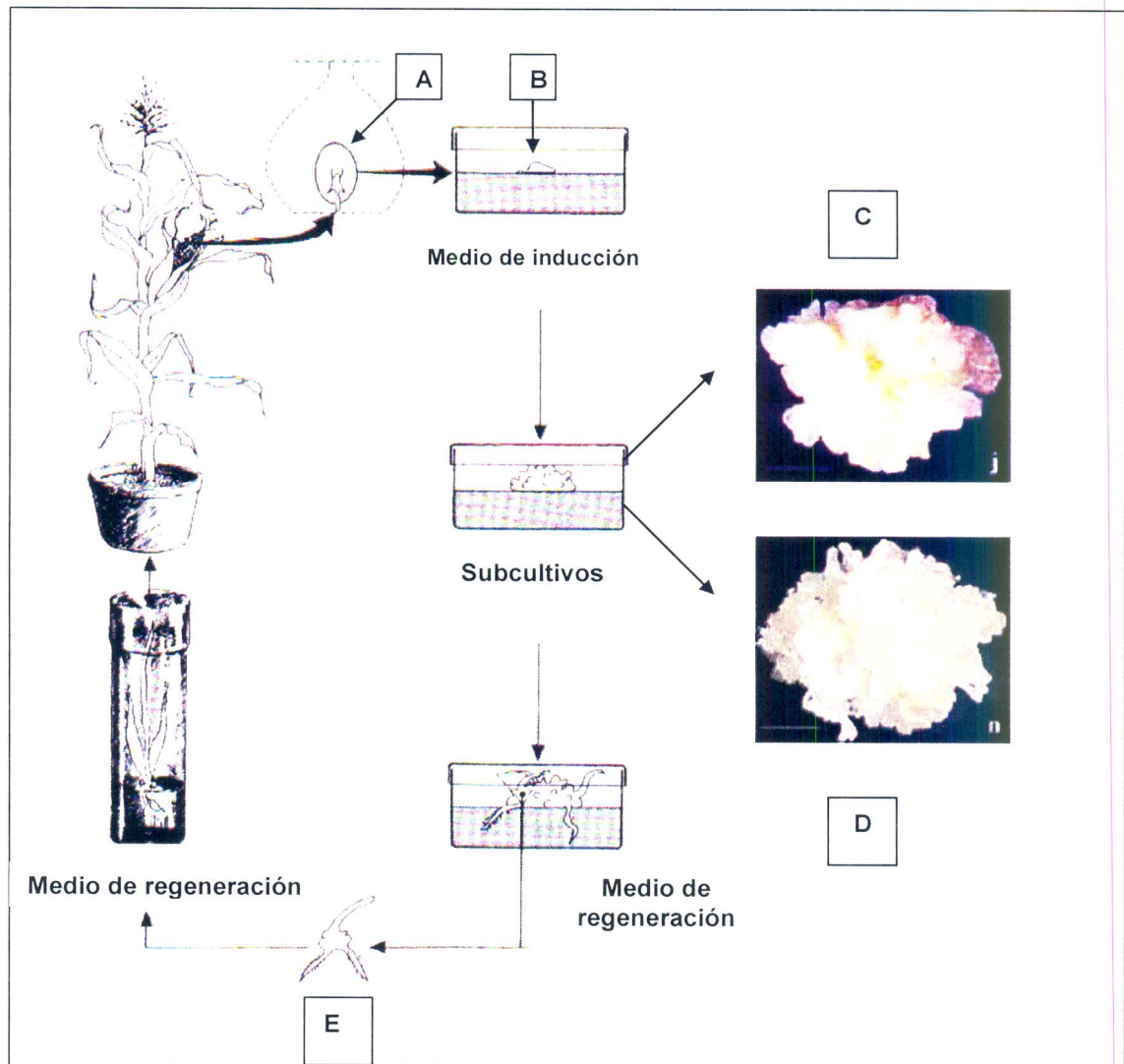


Figura 2. Representación esquemática de micropropagación por embriogénesis somática de maíz, adaptada de Bronsema *et al.*, (1997). **A)** Embrión cigótico inmaduro. **B)** Embrión cigótico inmaduro colocado en el medio de cultivo con el escutelum hacia arriba. **C)** Callo tipo-I. **D)** Callo tipo-II. **E)** Brote embriogénico.

Una vez preparado el medio se vació 500 ml en botellas de vidrio (Pyrex) de un litro, para esterilizar en una autoclave (Electric Pressure Steam Sterilizer Modelo No. 25X) durante 25 min. Después de esterilizado, se dejó enfriar a una temperatura de aproximadamente 50 a 60 °C para poder incorporarlo en cajas de Petri.

3.1.3.2 Condiciones de cultivo

Los embriones fueron incubados en oscuridad a 26 °C por 4 a 6 semanas en una cámara de incubación (VWR brand Modelo 1510E). Haciendo cuando menos 1 o dos sub cultivos en el mismo medio antes de transferir los callos al medio de regeneración.

3.1.3.3 Caracteres evaluados

Al terminar el periodo de inducción de callo embriogénico se contabilizó el porcentaje de callos embriogénicos (PCE) con base en el número de explantes que formaron callos embriogénicos. De igual manera en cada línea se evaluó el tipo de callo que proliferó del escutelum en los explantes, tipo I, relativamente duro y con callos embriogénicos u organogénicos compactos (Figura 2-C) y tipo II, blando, friable, de color blanco cremoso y con numerosos embriones somáticos en estado globular (Figura 2-D).

El diseño estadístico fue completamente al azar usando como tratamiento cada línea con los embriones usados como explantes, el número dependió del material disponible. Se realizó una comparación múltiple de medias de rangos en cada una de las variables (PCE, PCTI y PCTII) con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con un $\alpha=0.05$ en el paquete estadístico SAS 9.0 (2002).

3.1.4 Inducción de brotación

3.1.4.1 Medios de cultivo

La obtención de brotes germinados a partir de embriones somáticos (Figura 2-E), se hizo transfiriendo los callos embriogénicos a frascos gerber y cajas magenta con medio de regeneración MS que consta de sales Murashige y Skoog (1962) 100% suplementado con vitaminas MS, myo-inositol 100 mg.L^{-1} , piridoxina-HCL 1.0 mg.L^{-1} , tiamina HCL 10 mg.L^{-1} mas L-asparagina 150 mg.L^{-1} , 20 g.L^{-1} de sacarosa, 0.5 mg.L^{-1} AIA y 1 mg.L^{-1} de BAP. El pH fue ajustado con NaOH a 5.7, y se adicionaron 8 g.L^{-1} de agar antes de la esterilización. El medio se esterilizó en las mismas condiciones que los medios anteriores (inciso 3.1.3.1) y se incorporó en frascos de vidrio o cajas magenta.

3.1.4.2 Condiciones de cultivo

Los callos fueron incubados en cuartos de crecimiento a 26°C bajo fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, proporcionada por lámparas de luz blanca fría fluorescente de una intensidad lumínica de $68 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

3.1.4.3 Caracteres evaluados

Se evaluó la regeneración de los callos embriogénicos de dos maneras 1) Contabilizando el número de callos que presentaron formación de brotes (Figura 2-C) para después transformarlo a porcentaje en base al total de callos evaluados, tomando como brotes aquellos con un tamaño mayor o igual a 1 cm, y se asignó a ésta variable el nombre de: Porcentaje de Regeneración (PR); 2) Contabilizando el número de brotes germinados por explante con respuesta de regeneración y por cada línea de maíz evaluada, Brotes por Explante (BE). Éstas variables se midieron a las 2 semanas después de colocar los callos en medio de regeneración en las líneas de maíz azul y a las 4 semanas en las líneas de maíz blanco.

El diseño estadístico fue completamente al azar usando como tratamiento cada línea y como repetición cada explante. Y se realizó una comparación múltiple de medias de rangos para las variables respuesta PR y NB con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con un $\alpha=0.05$ en el paquete estadístico SAS 9.0 (2002), para determinar si existían diferencias significativas entre líneas. Además para determinar el efecto de los medios de cultivo utilizados sobre las variables respuesta PR y NB se realizó una comparación de proporciones binomiales.

3.1.5 Inducción de raíz

3.1.5.1 Medio de cultivo

Los brotes germinados obtenidos que alcanzaron una altura de 5 cm aproximadamente en los callos embriogénicos se cortaron con ayuda del bisturí y se transfirieron a medio de enraizamiento en tubos de ensaye o cajas magenta, conteniendo Sales MS Murashige y Skoog (1962) 100 %, vitaminas MS, myo-inositol 100 mg.L⁻¹, sacarosa 20 g.L⁻¹ y 1 mg.L⁻¹ ANA. El pH fue ajustado con NaOH a 5.7, y se adicionaron 8 mg.L⁻¹ de agar antes de la esterilización.

3.1.5.2 Condiciones de cultivo

De igual forma fueron incubados en cámaras de crecimiento a 26° C por 4 semanas bajo fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad con una intensidad lumínica de 68 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada por lámparas blancas fluorescentes.

3.1.6 Adaptación ex-vitro

3.1.6.1 Condiciones de cultivo

Para realizar la transferencia a suelo a las plantas se les eliminó el agar lavando las raíces con agua destilada, a continuación se transfirieron a vasos de unicel de 300ml utilizados como maceta, con una mezcla de peatmoss 50% y agrolita 50% como sustrato, cada maceta fue cubierta con una bolsa de plástico por 2 semanas para una mayor adaptación, y se mantuvieron en la cámara de crecimiento, una vez transcurrido este tiempo se trasladaron a un invernadero para observar la sobrevivencia y las posibles variaciones morfológicas surgidas en las plantas.

3.1.6.2 Caracteres evaluados

Después de 4 semanas se evaluó el porcentaje de supervivencia (PS) de cada una de las líneas que se transfirieron al invernadero. Además se tomaron al azar algunas de estas plantas y se crecieron hasta la obtención de semilla en las líneas azules, mientras que para las líneas blancas solo se pudo hacer estas observaciones hasta el estado de plántula.

3.2 Protocolo de regeneración

En la figura 3 se señalan los pasos seguidos en el protocolo de regeneración por embriogénesis somática de las líneas de maíz evaluadas (Cuadro 1) en la presente investigación.

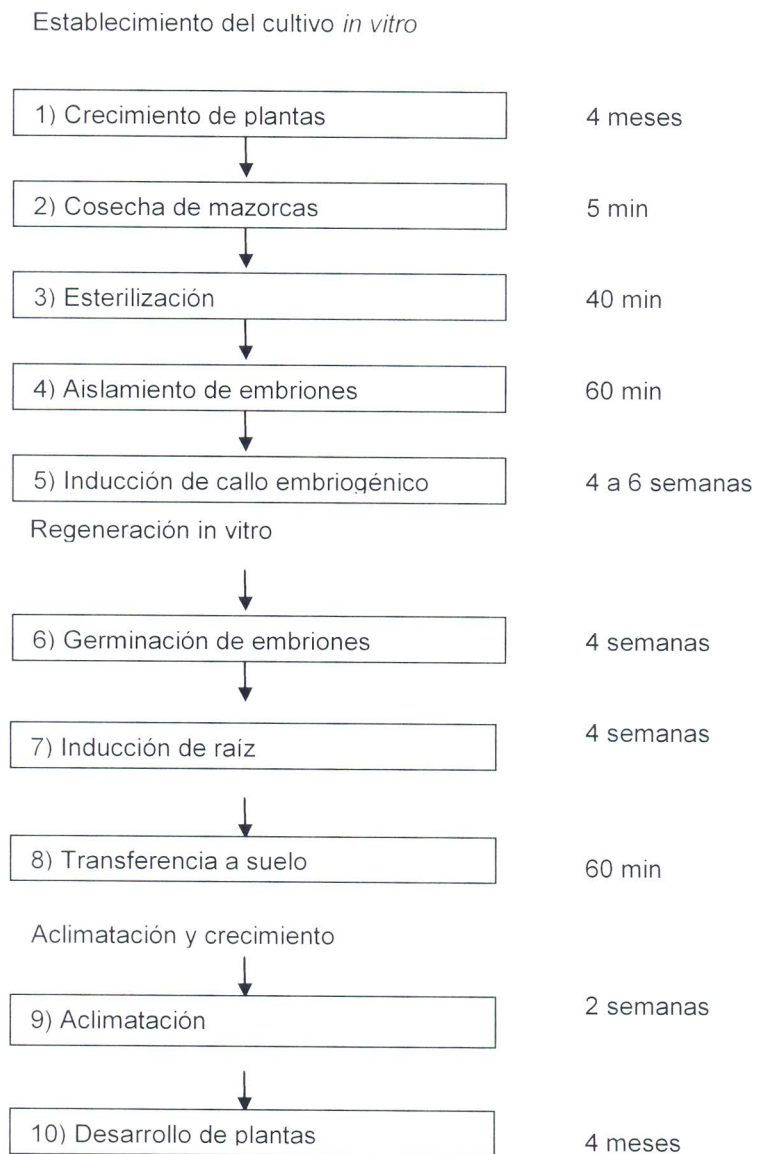


Figura 3. Protocolo de regeneración por embriogénesis somática de maíz.

3.3 Transformación genética por el método de agroinfección

3.3.1 Material vegetal

Se utilizaron dos líneas provenientes del Centro Internacional de Mejoramiento Genético de Maíz y Trigo (CIMMYT), la línea tropical CML72 (amarilla) y la línea subtropical CML216 (blanca), las cuales fueron utilizadas en trabajos anteriores expresando un alto porcentaje de regeneración (Bohorova *et al.*, 1995), así como 10 líneas de maíz blanco y 11 líneas de maíz azul donadas por el Programa de Mejoramiento Genético de Maíz del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Líneas de maíz desarrolladas en la UACH y utilizadas para intentar la transformación por el método de agroinfección.

Líneas de maíz azul	Líneas de maíz blanco
ChAzE11	ChBI102
ChAzE12	ChBI204
ChAzE15	ChBI206
ChAzE16	ChBI301
ChAzE17	ChBI304
ChAzE18	ChBI306
ChAzE19	ChBI307
ChAzE20	ChBI310
ChAz 218	ChBI308
ChAz 548	CML219372
ChAz 717	

Las líneas CML72 y CML216 fueron cultivadas en macetas durante los meses de febrero a junio y de marzo a julio de 2008, mientras que las líneas de maíz blanco y azul fueron sembradas en el mes de mayo y cosechadas a finales del mes de

agosto y principios del mes de septiembre de 2008 en los campos experimentales de la UACH.

Se utilizaron como explantes embriones inmaduros extraídos de 21 a 30 días después de la polinización en las líneas de CIMMyT y de 18 a 28 días después de la polinización en las líneas de la UACH.

3.3.2 Iniciación y mantenimiento de callos

La desinfestación, extracción de explantes e iniciación del cultivo para llevar a cabo la agroinfección se realizó de la misma manera que en la regeneración por embriogénesis somática (incisos 3.1.2.1 y 3.1.2.2).

Una vez extraídos los embriones cigóticos fueron colocados con la cara plana hacia abajo en cajas petri de 100 x 15 mm que contenía el medio de iniciación N6C1SN (Bohorova, 1995) el cual fue preparado en las mismas condiciones como se indica en el inciso 3.1.3.1.

Los embriones se incubaron en éste medio, en oscuridad y a 26° C por un periodo de 1 a 19 días antes de realizar la agroinfección.

3.3.3 Genes quiméricos

Para realizar la transformación de las líneas de maíz se construyeron tres genes quiméricos: *35S::ScTPS1TPS2::NOS* (Figura 1 del Anéxo 1), *Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS* (Figura 2 del Anéxo 1) en el vector *pGreen0229* (Hellens *et al.*, 2000) y el gen reportero *35S::GUSint* (Vancanneyt *et al.*, 1990). Con el promotor *35SCaMV* del virus mosaico de la coliflor se espera obtener expresión constitutiva fuerte y de distribución ectópica, con el promotor *Rd29A* de *Arabidopsis thaliana*, la expresión del transgén estará regulada por el estrés abiótico (sequía, salinidad, frío o calor). La

cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* se empleó para transferir las construcciones a los explantes de maíz.

3.3.4 Iniciación del cultivo de *Agrobacterium*

Las tres cepas de *Agrobacterium* se tomaron directamente de los viales que se encontraban en glicerol a -20° C. Las bacterias se incubaron por 3 días a 28° C en medio LB (Sigma L-3152) solidificado con 8.0 g L⁻¹ de bacto- agar (Difco) y fueron seleccionadas con rifampicina 100 mg L⁻¹ y kanamicina 50 mg L⁻¹ hasta que se formaron colonias aisladas. Las colonias de *Agrobacterium* se tomaron a partir de este cultivo y se hizo una re-inoculación en 5.0 ml de medio líquido LB en tubos de centrifuga de 15 ml de capacidad. Los cultivos se crecieron hasta una densidad óptica D.O₅₅₀= 0.6 a 0.8 para la mayoría de los cultivos.

3.3.5 Agroinfección

El protocolo para realizar la agroinfección fue modificado del presentado por Vega *et. al.* (2008) las modificaciones hechas en los medios de cultivo pueden observarse en el cuadro 3. La preparación de éstos medios siguió las mismas especificaciones que se mencionan en el inciso 3.1.3.1.

3.3.5.1 Inoculación

Los embriones que habían sido aislados y sembrados en medio N6CS1, fueron removidos de éste medio y colocados en cajas de Petri de 100x15 mm sin medio donde se les aplicó 1 ml de medio A (Cuadro 3) haciendo 3 lavados con él, después de los lavados se les adicionó 1 ml de la suspensión de *Agrobacterium* dejando que se inoculara por 10 min aproximadamente.

Cuadro 3. Medios de cultivo utilizados para el desarrollo de callos embriogénicos, modificados de Vega *et al.* (2008).

Composición del medio	Unidad por litro	Concentraciones						
		A	B	C	D1	D2	E	F
Sales N6	g	2.0	2.0	4.0	4.0	4.0	-	-
Sales MS	g	-	-	-	-	-	4.3	2.9
Sacarosa	g	68.5	30	30	30	30	60	30
Glucosa	g	36.0	-	-	-	-	-	-
L- prolina	g	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	-	-
MES	g	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-
2,4-D	mg	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	-	-
Vitaminas N6, 1000X	ml	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	-	-
Vitaminas MS, 1000X	ml	-	-	-	-	-	1.0	1.0
Glycina	mg	-	-	-	-	-	2.0	2.0
Nitrato de plata	mg	0.85	0.85	0.85	-	-	-	-
L-cisteina	g	-	0.4	-	-	-	-	-
DTT	g	-	0.15	-	-	-	-	-
Acetociringona	μM	-	100	-	-	-	-	-
pH		5.2	5.8	5.8	5.8	5.8	5.6	5.6
Agar	g	-	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
Ticarcilina	mg	-	-	250	250	250	250	-
PPT	mg	-	-	-	1.5	3.0	3.0	-
Kanamicina	mg	-	-	-	50	50	50	-

3.3.5.2 Cocultivo

Una vez transcurrido los 10 min de inoculación se retiró el excedente de bacteria y los embriones fueron transferidos a cajas de Petri de 100x15 mm que contenían el medio B (Cuadro 3). Las cajas con los embriones se mantuvieron en cocultivación por 2 a 6 días en oscuridad y a 26 °C.

3.3.5.3 Maduración

Los embriones fueron transferidos a cajas petri 100 x15 mm con medio C (Cuadro 3) por 5 a 12 días, el cual no contenía herbicida pero sí el antibiótico ticarcilina para eliminar la bacteria, durante este tiempo los embriones se subcultivaron en el mismo medio 1 ó 2 veces para evitar la proliferación abundante de la bacteria así como para mantenerlos en estado de reposo y que iniciaran el desarrollo de callo embriogénico.

3.3.5.4 Selección

La selección para *GUSint* se llevó a cabo con 50 mg L⁻¹ de kanamicina y para los genes con la construcción bifuncional *ScTPS1-TPS2* en el vector pGreen0229, se llevó a cabo en dos fases: la primera selección se realizó en el medio D1 (Cuadro 3) el cual contenía 1.5 mg l⁻¹ de herbicida PPT: 2-Amino-(Metilfosfinil) ácido butanoico (fosfonitricina, Duchefa) y se realizó por 1 o 2 semanas. Posteriormente se realizó una segunda selección adicionando 3.0 mg L⁻¹ de PPT al medio D2 (Cuadro 3) donde el callo se mantuvo de 2 a 5 semanas. Las cajas Petri se mantuvieron en la cámara de incubación en oscuridad y a una temperatura de 26°C.

3.3.5.5 Regeneración

Con el fin de propiciar la germinación de los embriones somáticos formados en los callos embriogénicos, se transfirieron a medio de regeneración E (Cuadro 3), en el cual se siguió manteniendo la selección con 3.0 mg L⁻¹ de PPT, y los callos mayores a 1 cm fueron divididos en piezas más pequeñas así como los que tenían partes opacas o no resistentes al herbicida fueron quitadas del callo. Las cajas de Petri fueron incubadas en cuartos de crecimiento a 26° C bajo fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, proporcionada por lámparas de luz blanca fría fluorescente con una intensidad lumínica de 68 μmol. m⁻² s⁻¹.

Una vez que los brotes embriogénicos crecieron se transfirieron a cajas magenta con medio de enraizamiento F (Cuadro 3) y fueron mantenidos en las mismas cámaras de crecimiento bajo las mismas condiciones, hasta que tuvieran suficientes raíces para poder transferirlos a suelo.

3.3.5.6 Adaptación *ex-vitro*

Las especificaciones de la realización de éste paso se pueden observar en el inciso 3.1.6. Una vez realizado la adaptación las plántulas se trasladaron a un invernadero para observar la sobrevivencia y realizar los análisis moleculares.

3.3.5.7 Caracteres evaluados

Se determinó el número de brotes germinados de los callos embriogénicos y el número de plantas obtenidas por línea y por construcción.

3.3.6 Caracterización molecular por PCR de las plantas transformadas

A las plantas obtenidas en la regeneración se les realizaron análisis moleculares, para lo cual primeramente se extrajo el ADN de las plantas, posteriormente se amplificaron las secuencias del gen *GUSint* (β -glucuronidasa) por medio de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y por medio de PCR multiplex para amplificar dos loci: el *ScTPS1*, así como un control interno del genoma del maíz, que en este caso fue parte del gen de α -zeína.

3.3.6.1 Extracción de ADN genómico

A cada planta se le cortaron 200 mg de tejido de hojas jóvenes, que no tuvieran ningún daño o áreas necróticas y se colocaron en bolsas de plástico para ser transportadas al laboratorio.

El método de extracción utilizado fue adaptado del empleado por Dellaporta *et al.*, (1983) y consistió de los siguientes pasos:

- 1) Se tomaron aproximadamente 200 mg de tejido vegetal y se molieron minuciosamente en nitrógeno líquido en un mortero preenfriado.
- 2) El tejido vegetal ya molido se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml, donde se adicionaron 750 µl de buffer de extracción (Anexo 2). Se mezcló suavemente y se calentó a 65°C en un termoblok (VWR Scientific Product Modelo No. 8292) por 10 minutos invirtiendo los tubos ocasionalmente.
- 3) Pasado este tiempo se añadió 200 µl de una solución 5M de acetato de potasio, se mezcló por inversión y se mantuvo los tubos en hielo por 30 minutos.
- 4) Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos.
- 5) El sobrenadante (450 µl por tubo) se transfirió a dos tubos eppendorf nuevos con 500 µl de isopropanol (del congelador) cada uno. Y se dejó incubar por 30 minutos a -20°C.
- 6) El ADN flotante se recuperó dando un pulso en la microcentrífuga (Eppendorf Modelo 54156), se decantó el sobrenadante y el pellet se disolvió (Anexo 2) con 200 µl TE juntando el ADN a un solo tubo.
- 7) Se añadió 2 µl de una solución de ARNasa y se dejó incubar por una hora a 37°C.
- 8) Transcurrido este tiempo se añadió 20 µl de acetato de sodio 3M y 200 µl de isopropanol frío (del congelador) y se incubó por 40 min a -20°C.
- 9) Posteriormente se dio otro pulso en la centrífuga y el pellet se lavó con etanol al 70%, dos veces.
- 10) El pellet se secó en el termoblok y se resuspendió en 20 µl de TE y se almacenó a 4°C.

3.3.6.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

3.3.6.2.1 Iniciadores

Se utilizaron tres pares de iniciadores:

a) Iniciadores para el gen *NPTII* (agroinfección con *GUSint*).

NPTII-5' 5'-AGA TGG ATT GCA CGC AGG TTC -3'

NPTII-3' 5'-GAA GAA CTC GTC AAG AAG GCG -3'

Amplifica un fragmento de 780 pares de bases

b) Iniciadores para el gen *ScTPS1* (agroinfección con el gen quimérico *35S::ScTPS1TPS2::NOS* y con *Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS*).

TPS1-5': 5'-CCGCTCGAAGGGTACTCACATACAGAC-3'

TPS1-3': 5'-CGGGGTACCGCATCGGGTTCATCAG-3'

Amplifica 1.59 kb del gen *ScTPS1* y tiene secuencias para enzimas de restricción. XhoI en *TPS1*-5' y KpnI en *TPS1*-3'.

c) Iniciadores para el gen α -zeína, como control positivo interno (Se utilizó sólo para la reacción descrita en b), en PCR múltiplex, buscando amplificar ambos loci (*ScTPS1* y α -zeína).

MT6: 5'-TGC TTG CAT TGT TCG CTC TCC TAG-3'

MT7: 5'-GTC GCA GTG ACA TTG TGG CAT-3'

Amplifican un fragmento de 329 pb.

3.3.6.2.2 Mezcla de reacción

Para poder amplificar los genes se utilizó la mezcla señalada en el Cuadro 4:

Cuadro 4. Mezcla de reacción utilizada en el PCR para amplificar los genes *NPTII*, *ScTPSP* y α -zeína.

Componentes	Volumen (μ l) <i>NPTII</i>	Volumen (μ l) <i>ScTPS1-TPS2</i> + α -zeína
Buffer PCR 10X –con Mg	5	5
MgCl ₂	0	0
Mezcla dNTPs	2	2
Primer 1 (forward) (MT6)	-	2
Primer 2 (reverse) (MT7)	-	2
Primer 1 (forward) (<i>TPS1</i> -5')	-	2
Primer 2 (reverse) (<i>TPS1</i> -3')	-	2
Primer 1 (forward) (<i>NPTII</i> -5')	2	-
Primer 2 (reverse) (<i>NPTII</i> -3')	2	-
ADN templado	1	2
Taq polimerasa (5 u/ μ l)	0.2	0.2
Agua desionizada estéril	38	33
Volumen final	50	50

Concentración de componentes: dNTPs, 0.2 mM; primers, 10 μ M; ADN, 50-100 ng. μ l⁻¹

La mezcla de reacción se preparó para ambas muestras, sin añadir el ADN templado; la secuencia que se siguió para la mezcla fue: agua, buffer, dNTPs, iniciadores y Taq polimerasa. El coctel fue separado por alícuotas y el ADN de las distintas muestras se añadió en una concentración de 1 y 2 μ l.

3.3.6.2.3 Programa de amplificación

Se siguió el siguiente programa de amplificación en un termociclador (Termo Hybaid):

1. Temperatura de inicio:	94°C por 3 min
2. Temperatura de desnaturalización	94°C por 1 min
3. Temperatura de alineamiento	48°C-60°C por 1 min
4. Temperatura de extensión	72°C por 1 min
5. Temperatura de salida	72°C por 10 min
Tiempo total	3 horas

Del programa principal (2, 3 y 4) se aplicaron 40 ciclos de amplificación. Al finalizar el programa de amplificación, las muestras se analizaron electroforéticamente en un gel de agarosa (1.5%) y a 120 volts. El gel fue teñido con bromuro de etidio y documentado con una cámara (Kodak EDAS 290).

3.3.7 Protocolo de transformación genética por el método de agroinfección

En la figura 3 se señalan los pasos seguidos en el protocolo de agroinfección de las líneas de maíz evaluadas (Cuadro 2) en la presente investigación.

Iniciación y mantenimiento de callos

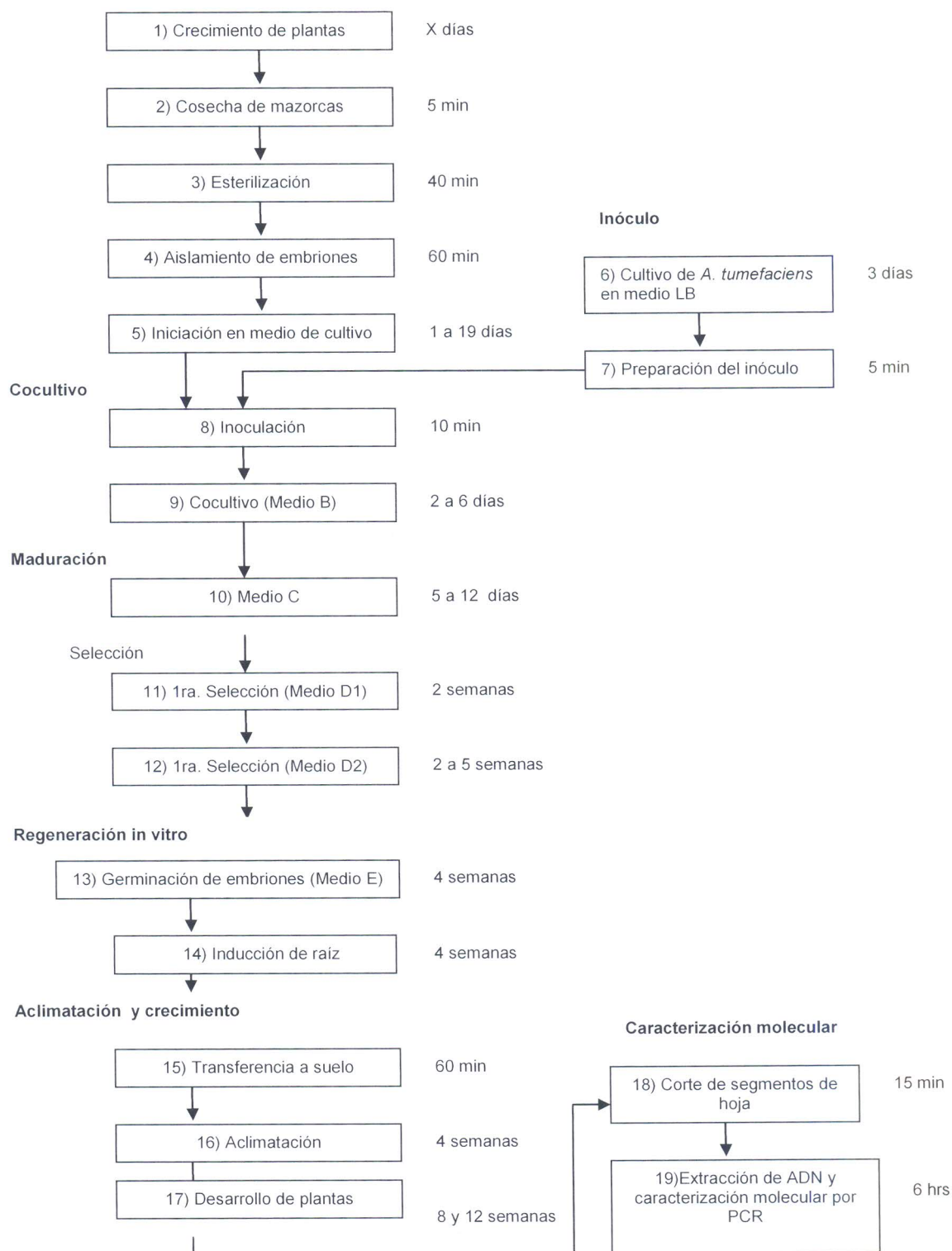


Figura 4. Protocolo de transformación genética por el método de agroinfección.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Porcentaje de Callo Embriogénico (PCE)

Las 30 líneas probadas produjeron callo embriogénico, 10 de maíz azul (en ambos medios N6C1SN y MSE3) y 20 de maíz blanco (en el medio N6C1SN), (Cuadros 5 y 6). Sin embargo la comparación de proporciones binomiales determinó que el medio N6C1SN (71.48%) fue igual ($\alpha=0.05$) al medio MSE3 (66.46%) en la formación de callo embriogénico en las líneas de maíz azul.

Numéricamente los resultados obtenidos coinciden con los encontrados por Bohovora *et al.* (1995) quienes encontraron que al utilizar el medio N6C1SN, 79% de las líneas probadas produjeron callo embriogénico mientras que con el medio MSE3, solo 58%. Por el contrario en otra investigación se encontró que la respuesta promedio en la Frecuencia de Inducción de Callo Embriogénico post-infección fue más grande (65%) en medio MS que usando el medio N6 (45%) (Frame *et al.* 2006).

En cuanto a la respuesta del PCE dentro de las líneas de maíz azul (Cuadro 5), de aquellas que fueron inducidas en el medio N6C1SN la línea ChAzE9 obtuvo el más alto porcentaje (100%) y a su vez fue estadísticamente superior ($\alpha=0.05$) al resto de las líneas probadas, lo cual indica que fue la mejor línea en este medio. Por otra parte de las que fueron inducidas en el medio MSE3 las líneas ChAzE10, ChAzE9 y ChAzE2 obtuvieron los más altos PCE (96.67, 90 y 88.33%) y fueron estadísticamente iguales y superiores ($\alpha=0.05$) al resto. También podemos observar en el cuadro 5 que esas mismas líneas tienen un alto porcentaje de formación de callo embriogénico en ambos tipos de medio, por lo cual podrían ser tomadas en cuenta para realizar investigaciones futuras. Mientras que las líneas ChAzE1, ChAzE3 y ChAzE6 produjeron callo embriogénico en un solo tipo de medio, en el medio N6C1SN en las dos primeras y el medio MSE3 en la tercera, y

fueron estadísticamente inferiores por lo cual no sería recomendable se usarán en futuras investigaciones.

Cuadro 5. Porcentaje de callo embriogénico y características físicas de los callos embriogénicos formados en las líneas de maíz azul.

LINEA	MEDIO DE CULTIVO N6CS1			MEDIO DE CULTIVO MSE3		
	PCE (%)	PCTI (%)	PCTII (%)	PCE (%)	PCTI (%)	PCTII (%)
ChAzE1	50.0 ab*	0.0 c	50.0 ab	0.0 c	0.0 c	0.0 c
ChAzE2	60.0 ab	30.0 b	30.0 ab	88.33 a	25.0 b	63.33 a
ChAzE3	50.0 ab	0.0 c	50.0 ab	0.0 c	0.0 c	0.0 c
ChAzE4	66.67 ab	0.0 c	66.67 ab	26.67 bc	26.67 b	0.0 c
ChAzE5	83.33 ab	83.33 a	0.0 b	50.0 abc	0.0 c	50.0 ab
ChAzE6	0.0 b	0.0 c	0.0 b	60.0 ab	60.0 ab	0.0 c
ChAzE7	76.67 ab	76.67 a	0.0 b	50.0 abc	0.0 c	50.0 a
ChAzE8	93.33 ab	93.33 a	0.0 b	70.0 ab	46.67 ab	23.33 bc
ChAzE9	100 a	0.0 c	100 a	90.0 a	90.0 a	0.0 c
ChAzE10	63.33 ab	0.0 c	63.33 ab	96.67 a	96.67 a	0.0 c
Promedio [†]	71.48	70.83	60.0	66.46	57.50	46.67
Desv. Est. [†]	18.03	28.83	23.47	24.27	30.72	16.77

PCE= Porcentaje de Callo Embriogénico; PCTI= Porcentaje de Callo Tipo I; PCTII= Porcentaje de Callo Tipo II. *Valores con la misma letra implica que no existe diferencia significativa de acuerdo a la prueba Kruskal-Wallis con un $\alpha=0.05$. [†]Se consideró únicamente las líneas que mostraron respuesta.

En cuanto a la formación de callo embriogénico en las líneas de maíz blanco, las cuales fueron evaluadas únicamente en el medio N6C1SN, se puede observar (Cuadro 6) que el 50 % de las líneas (10 líneas) tuvieron un PCE del 100% las cuales también fueron superiores estadísticamente ($\alpha=0.05$) al resto de las líneas y el PCE más bajo ($\alpha=0.05$) fue de 36.67 % de la línea ChBI203. El hecho de que la mitad de las líneas formaran callo embriogénico puede deberse a que el medio N6C1SN con 15.3 mg L^{-1} de AgNO_3 (nitrato de plata) donde crecieron los embriones ayudó a una buena obtención de callo embriogénico, como sucedió en el trabajo de Valdez-Ortiz *et al.* (2007) quienes encontraron que al utilizar el medio N6C1 (Bohorova *et al.* 1995) suplementado con 15 mg L^{-1} de AgNO_3 favoreció a la producción de callo en aproximadamente 80% de los embriones inmaduros contra 58.2% en embriones inmaduros que crecieron en medio sin AgNO_3 . Y Hernández-García *et al.* (2007) encontraron que dosis de 1 y 2 mg L^{-1} de 2,4-D producen mayores porcentajes de callo embriogénico que 5 mg L^{-1} , mientras que

al aplicar Dicamba en las mismas tres dosis la producción de callo embriogénico fue la misma en líneas de maíz blanco tropical.

Bohovora *et. al.* (1995) señalan que los factores que influyen la expresión de totipotencia en el cultivo de células son, genotipo, composición del medio de cultivo, reguladores de crecimiento y tamaño del embrión. Lo anterior queda confirmado en esta investigación al observar que no todas las líneas produjeron callo embriogénico en la misma frecuencia.

Cuadro 6. Porcentaje de callo embriogénico y características físicas de los callos embriogénicos formados en las líneas de maíz blanco.

LÍNEAS	PCE (%)	PCETI (%)	PCETII (%)
ChBI102	100.00 a*	54.55 ed	45.45 ef
ChBI103	71.43 c	71.43 ab	0.00 h
ChBI204	67.86 c	67.86 cd	0.00 h
ChBI205	100.00 a	50.00 e	50.00 de
ChBI206	70.59 c	58.82 d	11.76 g
ChBI208	50.00 d	25.00 f	25.00 g
ChBI101	51.52 d	0.00 g	51.52 def
ChBI306	64.29 c	0.00 g	64.29 cd
ChBI305	100.00 a	0.00 g	100.00 a
ChBI307	100.00 a	82.86 ab	17.14 gh
ChBI308	100.00 a	0.00 g	100.00 a
ChBI301	100.00 a	100.00 a	0.00 h
ChBI309	93.94 b	0.00 g	93.94 ab
ChBI310	100.00 a	20.69 f	79.31 bc
ChBI201	50.00 d	0.00 g	50.00 ef
ChBI202	100.00 a	0.00 g	100.00 a
ChBI303	100.00 a	50.00 e	50.00 def
ChBI203	36.67 e	0.00 g	36.67 g
ChBI402	100.00 a	0.00 g	100.00 a
ChBI401	50.00 d	0.00 g	50.00 def
Promedio [†]	80.31	58.12	60.30
Desviación Est. [†]	22.51	22.98	29.26

PCE= Porcentaje de Callo Embriogénico; PCETI= Porcentaje de Callo Embriogénico Tipo I; PCETII= Porcentaje de Callo Embriogénico Tipo II.

*Valores con la misma letra implica que no existe diferencia significativa de acuerdo a la prueba Kruskal-Wallis con un $\alpha=0.05$ de acuerdo a la prueba Kruskal-Wallis con un $\alpha=0.05$. [†]Se consideró únicamente las líneas que mostraron respuesta.

4.1.2 Características físicas de los callos en las líneas de maíz azul

En las líneas de maíz azul, donde se utilizaron tanto el medio de cultivo N6C1SN como el medio MSE3, ambos tipos de medios indujeron en la mayoría de las líneas la formación de callo tipo I y/o de callo tipo II (Cuadro 5).

El callo tipo I tiende a ser iniciado y regenerado hasta planta en mayor frecuencia que el callo tipo II en las líneas de maíz (Carvalho *et al.*, 1997), esto concuerda con lo encontrado en esta investigación ya que en el cuadro 5 se puede observar mayores promedios de producción de PCTI (Porcentaje de Callo Tipo I) en las líneas de maíz azul.

4.1.2.1 Callo Tipo I

En el cuadro 5 se observa que, usando el medio de cultivo N6C1SN sólo 40% de las líneas (4 de 10 líneas) formaron callo tipo I, mientras que usando el medio MSE3 60% de las líneas (6 de 10 líneas) formaron este tipo de callo. Lo anterior coincide con lo encontrado por Bronsema *et al.* (1997) quienes en la línea A188 al aplicar mayor concentración de sacarosa (6%) en el medio de cultivo, muy parecida a la dada por el medio MSE3 (60 g L⁻¹), obtuvieron mayor proliferación de callo embriogénico tipo I

La variable PCTI (porcentaje de callo Tipo I) en el medio de cultivo N6C1SN las líneas ChAzE8, ChAzE5 y ChAzE7 fueron superiores estadísticamente ($\alpha=0.05$) mientras que en el medio de cultivo MSE3 la línea ChAzE10 y ChAzE9 se comportaron estadísticamente superiores ($\alpha=0.05$) a las demás líneas (Cuadro 5). Y que las líneas ChAzE1 y la línea ChAzE3 no produjeron este tipo de callo en ninguno de los dos medios de cultivo utilizados. Las fotografías de líneas con callo tipo I pueden ser observadas en la figura 5.

4.1.2.2 Callo Tipo II

Al utilizar el medio de cultivo N6C1SN 60% de las líneas produjeron callo tipo II mientras que usando el medio MSE3 solo 40% de las líneas produjeron éste tipo de callo. Lo anterior coincide con lo encontrado por Bronsema *et al.* (1997) quienes en la línea A188 al aplicar menor concentración de sacarosa (2%) en el medio de inducción, muy parecida a la dada por el medio N6C1SN, hay mayor proliferación de callo embriogénico tipo II. Y en la investigación de Armstrong y Green (1984) encontraron que el adicionar L-prolina incrementó linealmente las frecuencias de iniciación de callo friable (tipo II) y la formación de embrioides. Por su parte Valdez-Ortiz *et al.* (2007) observaron que 15 mg L⁻¹ de Nitrato de Plata es el nivel óptimo para la inducción de callo embriogénico Tipo II. Y en esta investigación el medio usado (N6C1SN) cuenta con ambos componentes.

Con medio de cultivo N6C1SN la línea que formó este tipo de callo en mayor proporción (100%) y a la vez tuvo un comportamiento estadístico superior ($\alpha=0.5$) fue la línea ChAzE9 (Cuadro 5); mientras que las líneas ChAzE2 y ChAzE7 (con 63.33% y 50% respectivamente), fueron estadísticamente superiores ($\alpha=0.5$) al resto utilizando el medio MSE3. La línea ChAzE6 no formó éste tipo de callo en ninguno de los dos medios de cultivo utilizados. Las fotografías de líneas con callo tipo II pueden ser observadas en la figura 5.

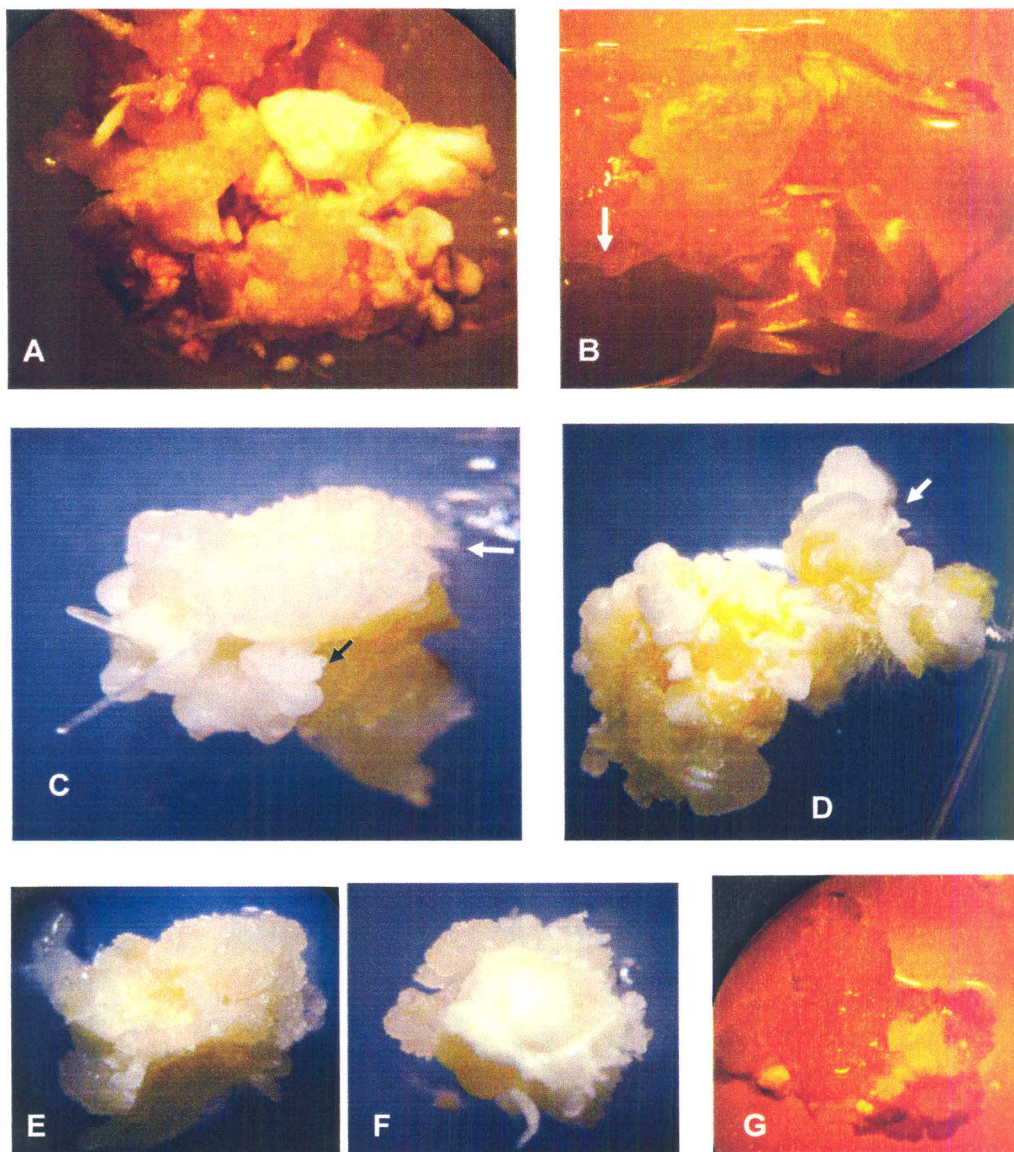


Figura 5. Tipo de callo embriogénico formado en las líneas de maíz azul. (A) Callo embriogénico tipo I de la línea ChAzE7. (B) Callo embriogénico tipo I de la línea ChAzE9. (C) Callo embriogénico tipo I de la línea ChAzE8. (D) Callo embriogénico tipo I de la línea ChAzE10. (E) Callo embriogénico tipo II de la línea ChAzE2. (F) Callo embriogénico tipo II de la línea ChAzE7. (G) Callo embriogénico tipo II de la línea ChAzE5. Las flechas indican la presencia de embriones somáticos escutelares.

4.1.3 Características físicas de los callos en las líneas de maíz blanco

Las líneas de maíz blanco fueron sembradas únicamente en el medio de cultivo N6C1SN. El tipo de callo II se formó en 85% de las líneas (17 líneas), mientras que el callo tipo I se formó en 50% de las líneas (10 líneas) y en promedio se produjo en mayor frecuencia el tipo de callo II (60.30%), mientras que el tipo de callo I sólo se produjo en un 58.12% (Cuadro 6).

Estos resultados concuerdan con los encontrados por Bronsema *et al.* (1997) quienes indican que baja concentración de sacarosa (2%), estimula la formación de callo embriogénico tipo II. Y difieren de los encontrados por Bohorova *et al.* (1995) quienes utilizaron el mismo medio, pero obtuvieron callo tipo I en 77% de todas las líneas evaluadas y callo tipo II en 23% de las líneas. De la misma manera Hernández-García *et al.* (2007) lograron en la mayoría de las líneas de maíz blanco tropicales la inducción de callo tipo I.

La línea ChBI301 fue estadísticamente superior ($\alpha=0.5$) a las demás líneas produciendo, al 100% el callo tipo I. Mientras que las líneas ChBI305, ChBI308, ChBI202, y ChBI402 produjeron al 100 % el callo tipo II y fueron superiores estadísticamente ($\alpha=0.5$) a las demás líneas. Estas líneas pueden ser consideradas para usarse en trabajos posteriores (Cuadro 6). En la figura 6 pueden observarse algunos de los callos procedentes de estas líneas.

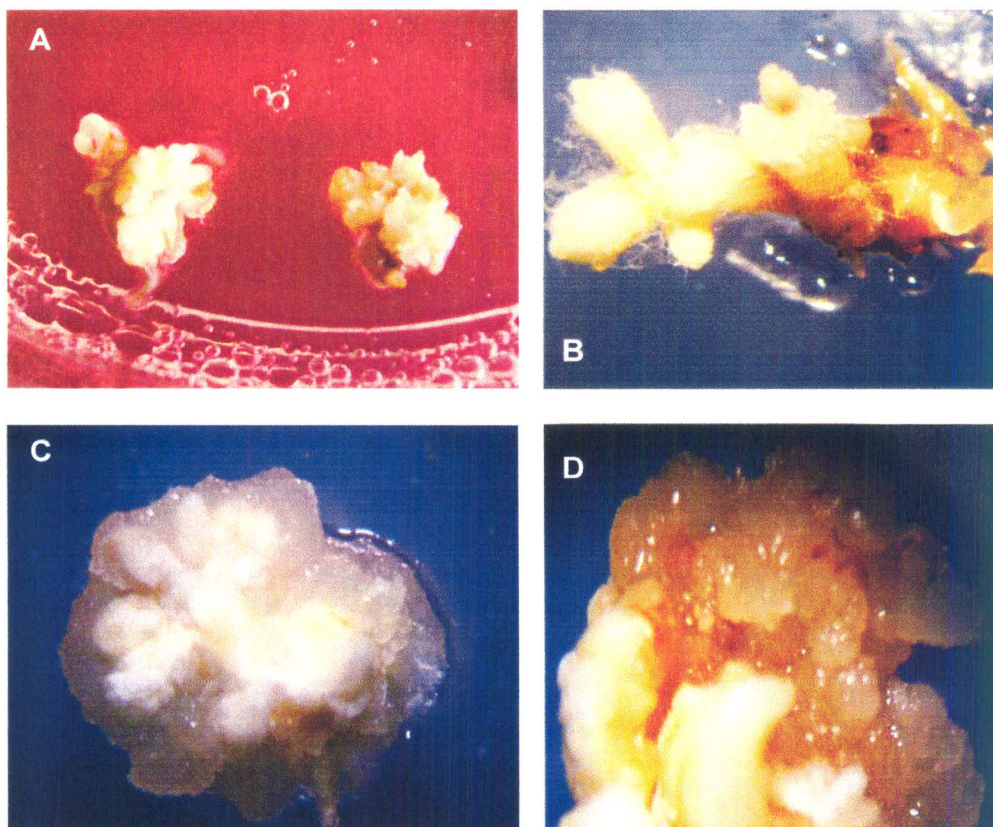


Figura 6. Tipo de callo embriogénico formado en las líneas de maíz blanco. (A) Callo embriogénico tipo I de la línea ChBl206. (B) Callo embriogénico tipo II de la línea ChBl202. (C) Callo embriogénico tipo II de la línea ChBl401. (D) Callo embriogénico tipo II de la línea ChBl203.

4.2 Evaluación de la regeneración

4.2.1 Regeneración obtenida en las líneas de maíz azul

Para inducir la germinación de los embriones somáticos, los callos fueron transferidos a medio de regeneración MSR (inciso 3.1.4.1 y Figura 7-A).

Al realizar la comparación de proporciones binomiales se detectó que el resultado de la variable Brotes por Explante (BE) fue igual ($\alpha=0.05$) al utilizar como medio de inducción el medio N6C1SN, con un promedio 3.0 brotes germinados por explante, o el medio MSE3, con un promedio de 1.2 brotes germinados por explante.

Cuadro 7. Regeneración obtenida en las líneas de maíz azul inducidas en los medios N6C1SN y MSE3, a las 8 semanas después de la inducción de los explantes.

LINEA	Medio de Cultivo N6C1SN		Medio de cultivo MSE3	
	BE (núm)	PR (%)	BE (núm)	PR (%)
ChAzE1	3 ab*	80	0 a*	0
ChAzE2	2.4 ab	80	0.8 a	0
ChAzE3	0.6 ab	20	0 a	40
ChAzE4	2 ab	80	0.6 a	0
ChAzE5	5.6 a	80	0 a	40
ChAzE6	0 b	0	0 a	0
ChAzE7	2.8 ab	80	0 a	0
ChAzE8	5 ab	80	0 a	0
ChAzE9	2 ab	40	0 a	0
ChAzE10	3.2 ab	80	2.2 a	40
Promedio [†]	3.0	68.9	1.2	40.0
Desv. Est. [†]	1.5	22.6	0.9	0.0

PR= Porcentaje de Regeneración, BE= Brotes por Explante. *Valores con la misma letra implica que no existe diferencia significativa de acuerdo a la prueba Kruskal-Wallis con un $\alpha=0.05$ de acuerdo a la prueba Kruskal-Wallis con un $\alpha=0.05$. [†]Se consideró únicamente las líneas que mostraron respuesta.

Lo mismo sucedió, al realizar dicha comparación ($\alpha=0.05$) para la variable Porcentaje de Regeneración (PR) en el cual no se detectó diferencias entre los dos medios de los cuales provenían los callos utilizados, siendo igual el PR al utilizar como medio de inducción el medio N6C1SN o el medio MSE3. Sin embargo en el cuadro 7 se puede observar que numéricamente los callos que provienen del medio de iniciación N6C1SN obtuvieron un PR del 68.9% en promedio, mientras que los que callos que procedieron del medio de iniciación MSE3 sólo obtuvieron un PR promedio del 40%.

En el cuadro 7 también podemos observar que al usar como medio de iniciación el medio N6C1SN, la línea ChAzE5 tuvo la mayor producción de brotes por explante siendo superior a las demás estadísticamente ($\alpha=0.05$) y la mayoría de las líneas (9 de 10 líneas) produjeron brotes, mientras que al utilizar como medio de iniciación el medio MSE3 sólo las líneas ChAzE2, ChAzE4 y ChAzE10 produjeron brotes siendo iguales estadísticamente ($\alpha=0.05$) a las que no los produjeron.

Estos datos coinciden con los encontrados por Bohorova *et al.* (1995) quienes observaron que la composición del medio usado para la formación de callo influye en la determinación de la regeneración.

4.2.1 Regeneración obtenida en las líneas de maíz blanco

Las líneas de maíz blanco se iniciaron únicamente en el medio N6C1SN y al inducir la germinación de los embriones somáticos se observó que únicamente las líneas ChBI103, ChBI206, ChBI208, ChBI307, ChBI201 y ChBI203 produjeron brotes (de 0.2 a 1.19 BE), pero la línea ChBI103 fue estadísticamente superior al resto ($\alpha=0.05$) produciendo 1.19 BE y 80% de PR (Cuadro 8).

Cuadro 8. Regeneración obtenida en las líneas de maíz blanco inducidas en el medio de cultivo N6C1SN, a las 10 semanas después de la inducción de los explantes.

LÍNEA	PR (%)	BE Núm.
ChBI102	0	0.0 d
ChBI103	80	1.19 a
ChBI204	0	0.0 d
ChBI205	0	0.0 d
ChBI206	60	0.23 c
ChBI208	40	0.20 c
ChBI101	0	0.0 d
ChBI306	0	0.0 d
ChBI305	0	0.0 d
ChBI307	40	0.48 c
ChBI308	0	0.0 d
ChBI301	0	0.0 d
ChBI309	0	0.0 d
ChBI310	0	0.0 d
ChBI201	60	0.53 b
ChBI202	0	0.0 d
ChBI303	0	0.0 d
ChBI203	60	0.21 c
ChBI402	0	0.0 d
ChBI401	0	0.0 d
Promedio [†]	56.66	0.47
Desv. Est [†]	13.74	0.34

PR= Porcentaje de Regeneración; BE= Brotes embriogénicos por Explante. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba Kruskal-Wallis con un $\alpha=0.05$. [†] Se consideró únicamente las líneas que mostraron respuesta.

En cuanto a la regeneración Bohorova *et al.* (1995), Carvalho *et al.* (1997) y Hernández-García *et al.* (2007) mencionan que la clasificación de callos embriogénicos no necesariamente implica regenerabilidad. Valdez-Ortiz *et al.* (2007) encontraron que al aplicar nitrato de plata en el medio de cultivo de inducción generó un incremento significativo en las tasas de regeneración.

4.3 Supervivencia de plantas aclimatadas y variación morfológica

Los brotes que crecieron de manera adecuada y que generaron una buena producción de raíces (Figura 7-B) fueron colocados como lo marca el inciso 3.1.6.1 en aclimatación.

Cuadro 9. Plantas regeneradas a través de embriogénesis somática y porcentaje de supervivencia de líneas de maíz azul, después de 12 semanas de inducción de los explantes.

Línea	Plantas regeneradas	Supervivencia %
ChAzE1	0	0
ChAzE2	10	40
ChAzE3	0	0
ChAzE4	8	62.5
ChAzE5	3	33.3
ChAzE6	0	0
ChAzE7	20	65
ChAzE8	5	60
ChAzE9	8	87.5
ChAzE10	5	20
Promedio [†]	8.42	52.61
Desv. Est. [†]	5.2	21.10

[†] Se consideró únicamente las líneas que mostraron respuesta.

En las líneas de maíz azul (Cuadro 9 y figura 7-C) los porcentajes de supervivencia (PS) van de 0 a 87.5 % siendo la línea ChAzE9 la del más alto PS. Y fue sólo en la línea ChAzE7 en la cual se pudo obtener semilla. En la caracterización morfológica se pudieron observar algunas deformaciones como achaparramiento, crecimiento de pelos y granos en las inflorescencias masculinas así como falta de polen (Figura 7-D).

Lo anterior se debe a que al regenerar plantas de maíz es igualmente frecuente obtener variación somaclonal (anormalidades genéticas y citogenéticas) tanto de plantas provenientes de callo tipo I como de plantas provenientes de callo tipo II. Las variaciones observadas incluyen cambios en cualidades heredadas cualitativa y cuantitativamente, cambios en número y estructura de los cromosomas y rearreglos en el ADN mitocondrial (Armstrong y Phillips, 1988).

En el Cuadro 10 se puede observar que tan solo dos de las 20 líneas de maíz blanco evaluadas lograron sobrevivir, esto principalmente fue debido a un problema de Damping-off presentado durante la aclimatación de las plántulas; a pesar de eso se puede observar que estas dos líneas en promedio lograron un porcentaje de supervivencia de 69.45%.

Cuadro 10. Plantas regeneradas a través de embriogénesis somática y porcentaje de supervivencia de líneas de maíz blanco, después de 14 semanas de inducción de los explantes.

Línea	Plantas regeneradas	Supervivencia %
ChBI102	0	0
ChBI103	18	55.56
ChBI204	0	0
ChBI205	0	0
ChBI206	0	0
ChBI208	0	0
ChBI101	0	0
ChBI306	0	0
ChBI305	0	0
ChBI307	12	83.33
ChBI308	0	0
ChBI301	0	0
ChBI309	0	0
ChBI310	0	0
ChBI201	2	0
ChBI202	0	0
ChBI303	0	0
ChBI203	2	0
ChBI402	0	0
ChBI401	0	0
Promedio*	8.5	69.45
Desv. Est*	6.83	13.85

Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba Kruskal-Wallis con un $\alpha=0.05$. * Se consideró únicamente las líneas que mostraron respuesta.



Figura 7. Regeneración y obtención de plantas a través de cultivo *in vitro* en líneas de maíz blancos y azules. (A) Regeneración de brotes embriogénicos. (B) Enraizamiento *in vitro*, de brotes provenientes de la embriogénesis somática. (C) Plantas obtenidas de las líneas de maíz azul. (D) Deformación en la inflorescencia masculina en plantas de las líneas azules.

4.4 Agroinfección

En total se agroinfectaron 25 líneas de maíz siguiendo el protocolo del inciso 3.3.6 (Figura 8), 2 obtenidas del CIMMyT y 23 desarrolladas en la UACH.

Con la construcción *Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS* se agroinfectaron 20 líneas (9 azules, 9 blancas y 2 de CIMMyT); con la construcción *35S::ScTPS1TPS2::NOS* se agroinfectaron 18 líneas (9 azules, 7 blancas y 2 de CIMMyT) y con la construcción *35S::GUSint* se agroinfectaron 9 líneas (4 azules, 3 Blancas y 2 de CIMMyT).

El número total de embriones agroinfectados fue de 1388 (Cuadro 11), de los cuales 756 fueron agroinfectados con la construcción *Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS*, 448 con la construcción *35S::ScTPS1TPS2::NOS* y 184 con la construcción *35S::GUSint*.

4.4.1 Formación de callo

En cuanto al tipo de callo obtenido, se encontró que hubo cuatro tipos callo, 1) Callo embriogénico tipo I (Figura 9-A), 2) Callo embriogénico tipo II (Figura 9-B). Los dos tipos de callo anteriores se presentaron en las líneas CML 216 Y CML 72, como se esperaba ya que estas líneas estaban totalmente probadas, mientras que en las líneas de maíz que no habían sido utilizadas anteriormente se formaron estos tipos de callo solo en 9.3% de las líneas probadas. 3) Callo con ambos tipos de callo, tipo I y tipo II (Figura 9-C) también formado en las líneas CML 216 Y CML 72, y por último 4) Callos granulares no embriogénicos, emergidos del lado axial del embrión (Figura 9-D) estos se produjeron en las líneas de maíz azul y blanco en un 60%, es decir en la mayoría de las líneas.

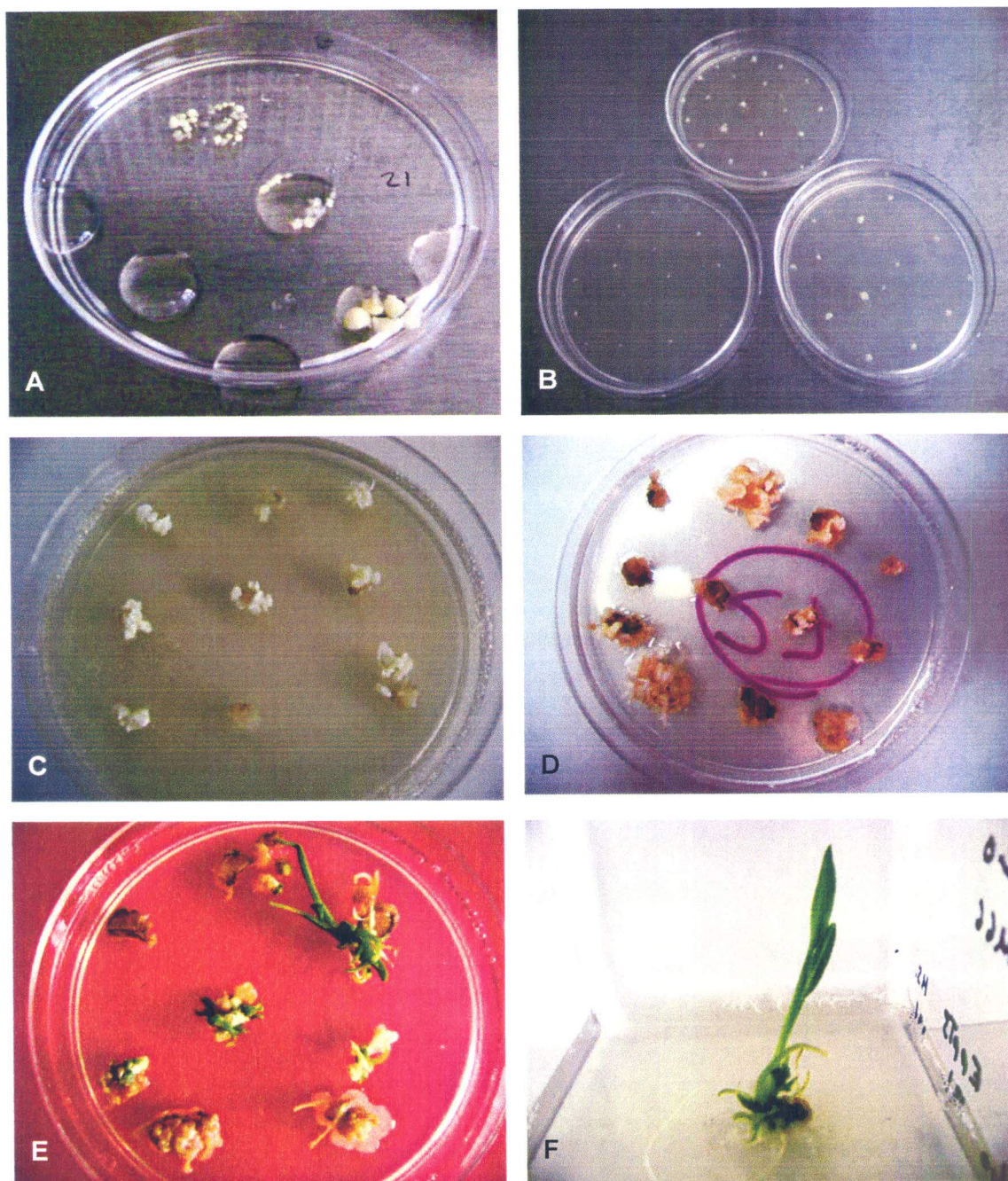


Figura 8. Protocolo de transformación. A) Inoculación. B) Cocultivo y maduración. C) Primera selección con 1.5 mg l^{-1} de PPT. D) Segunda selección con 3.0 mg l^{-1} de PPT. E y F) Regeneración y selección.

Cuadro 11. Número de explantes utilizados en la transformación genética por el método de agroinfección por línea y construcción utilizada.

<i>Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS</i>		<i>35S::ScTPS1TPS2::NOS</i>		<i>35S::GUSint</i>	
Línea	Núm	Línea	Núm	Línea	Núm
ChBI102	19	ChBI102	8	ChBI102	6
ChBI206	10	ChBI206	25	ChBI306	7
ChBI204	25	ChBI204	23	ChAzE11	5
ChBI301	32	ChBI301	17	ChAzE15	4
ChBI304	22	ChBI304	7	ChAzE17	16
ChBI306	45	ChBI307	15	ChAzE20	12
ChBI307	29	ChBI310	16	CMMYT 2143-12	14
ChBI308	16	ChAzE11	12	CML216	47
ChBI310	28	ChAzE12	32	CML72	73
ChAzE11	19	ChAzE15	9		
ChAzE16	34	ChAzE17	8		
ChAzE17	23	ChAzE18	9		
ChAzE18	21	ChAzE20	18		
ChAzE19	27	ChAz 218	18		
ChAzE20	58	ChAz 548	24		
ChAz 218	21	ChAz 717	17		
ChAz 548	20	CML216	95		
ChAz 717	35	CML72	95		
CML216	110				
CML72	162				
TOTAL	756		448		184

En esta parte es muy importante resaltar que las líneas de maíz azul y blanco utilizadas para intentar la transformación no habían sido probadas en su capacidad para formar callo embriogénico, por lo cual, de antemano se sabía del riesgo que se corría de no obtener plantas transformadas por la incapacidad de estos genotipos de formar callo embriogénico, sin embargo se identificaron, 4 líneas de maíz azul que formaron callo embriogénico y que produjeron brotes (Cuadro 12).



Figura 9 Características físicas de los callos obtenidos en las líneas de maíz agroinfectadas. (A) Callo embriogénico tipo I de la línea CML 216 y (B) Callo embriogénico tipo II de la línea CML 216. (C) Callo con ambos tipos de callo tipo I y tipo II. E) Callo granular no embriogénico.

4.4.2 Resistencia a PPT y kanamicina

Una de las formas de comprobar la inserción del transgén fue someter a los callos a $50 \mu\text{l l}^{-1}$ de Kanamicina ó de 1.5 y 3 mg l^{-1} del herbicida PPT, en esta selección se pudo observar que 90% de los callos y 43.79% de los brotes fueron resistentes a estos componentes (Figura 10-A) lo cual implicaría la suposición de que las plantas generadas de ellos podrían haber integrado los genes de interés; ya que al someter a plantas no transformadas al herbicida PPT, como se muestra en la figura 10-B, éstas murieron.

4.4.3 Evaluación de regeneración

Sólo se obtuvieron un total de 137 brotes de cinco líneas diferentes (Cuadro 12), de las dos proporcionadas por CIMMYT y de 4 líneas de maíz azul.

Cuadro 12. Brotación y enraizamiento de plantas obtenidas en los experimentos de agroinfección.

Construcción	Línea	Brotes (núm)	Plantas enraizadas (núm)
<i>Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS</i>	CML 216	26	3
	CML72	14	0
	ChAzE20	2	0
	ChAzE19	1	0
	ChAzE17	1	0
	TOTAL	44	3
<i>35S::ScTPS1TPS2::NOS</i>	CML 216	52	4
	ChAzE20	4	0
	ChAzE18	1	0
	TOTAL	57	4
<i>35S::GUSint</i>	CML 216	19	6
	CML72	16	5
	ChAzE20	1	0
	TOTAL	36	11

En cuanto a la adaptación al suelo, se lograron enraizar en total 18 plantas (29.03%) de éstas; 3 plantas fueron de la línea CML216 con la construcción *Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS* , 4 plantas de la línea CML216 con la construcción *35S::GUSint* y 6 plantas de la línea CML216 y 5 plantas de la línea CML72 con la construcción *35S::GUSint* (Cuadro 12).



Figura 10. Selección y regeneración de brotes embriogénicos posiblemente transformados. (A) Selección de callos y brotes transformados. (B) Línea no transformada crecida en medio sin herbicida (izquierda) y línea no transformada mantenida en medio de regeneración con herbicida (derecha) la foto fue tomada 20 días después de la transferencia a medio de cultivo con herbicida. (C) Línea de maíz en medio de enraizamiento. (D) Plántula adaptada lista para transferencia a suelo. E y F) Plantas de maíz posiblemente transformadas.

4.5 Caracterización molecular por PCR de las plantas transformadas

Al realizar la electroforesis (Figuras 11 y 12) se pudo corroborar que las plantas obtenidas no integraron los genes de interés en la transformación, el gen *GUSint* o el gen de la trehalosa (*ScTPSP*), por lo cual sólo se obtuvieron falsos positivos. Al localizar el gen α -zeína en todas las muestras con ADN de maíz (Figura 11 carriles c a l) se puede comprobar que no existió ningún problema en la realización tanto de la extracción de ADN como de la realización del PCR, que serían unos de los motivos por los cuales no se hubieran podido detectar los genes de interés.



Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para detectar el gen *GUSint* en plantas de maíz transformadas por agroinfección. Carril a: Marcador de peso molecular (1 kb Ladder). Carriles b, c, d, e, f, g, h, i y j líneas transformadas con el gen *GUSint*. Carril j: Control positivo ADN de planta no transgénica + gen *GUSint*. Carril k: Control negativo (mezcla de reacción sin ADN).

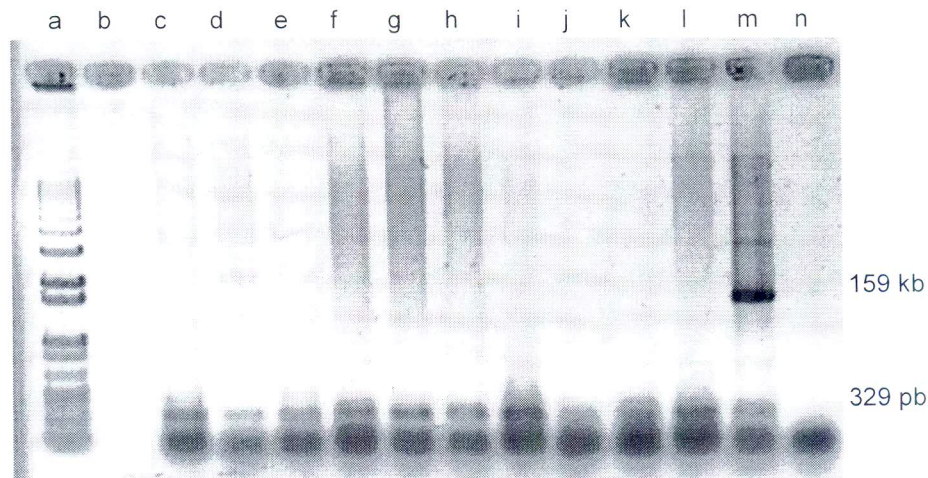


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para detectar el gen *ScTPSP* en plantas de maíz transformadas por agroinfección. Carril a: Marcador de peso molecular (1 kb Ladder). Carriles c, d, e y f controles negativos (plantas transformadas con el gen *GUSint*). Carril l control negativo (planta no transgénica). Carriles g, h, i, j y k líneas transformadas con el gen *ScTPSP*. Carril m: Control positivo ADN de planta no transgénica + gen *ScTPSP* + gen α -zeína. Carril n: Control negativo (mezcla de reacción sin ADN).

La producción de plantas genéticamente transformadas depende de dos cosas 1) la habilidad para integrar los genes foráneos dentro de las células blanco y 2) la eficiencia con la cual las plantas son generadas de células transformadas genéticamente (Bohorova *et. al.*, 1995).

De acuerdo a los resultados obtenidos podríamos agregar que, otro punto muy importante para obtener plantas transformadas es, la selección aplicada en las células transformadas, mediante el uso de la dosis más alta del herbicida y la oportunidad de aplicación después de la agroinfección. Por lo cual para mejorar este trabajo es necesario hacer pruebas en el sistema de selección, tanto en la dosis de fosfonitrícina a aplicar sobre los callos en cada genotipo así como el número de días después de la agroinfección a los cuales se debe aplicar, ya que en este trabajo la presión de selección utilizada de 50 mg L⁻¹ de Kanamicina ó de 1.5 y 3 mg L⁻¹ del herbicida PPT fue muy baja y los 5 a 12 días que transcurrieron después de la agroinfección para aplicar la selección pudieron ser muchos.

De acuerdo a Frame *et al.* (2000) también se debe hacer una separación de los callos tipo II (pre-embriogénicos, tempranos y tardíos) para transformar los callos preembriogénicos ya que estos autores encontraron una mayor eficiencia de la transformación en callos pre-embriogénicos.

V. CONCLUSIONES

En las líneas de maíz evaluadas hubo respuesta favorable en los diferentes materiales en cuanto a la formación de callo embriogénico y la regeneración de plantas obtenidas.

Los componentes del medio no influyen en la formación del callo embriogénico, en las características físicas de los callos ni en la regeneración de plantas

La línea de maíz azul ChAzE5 puede considerarse para realizar trabajos posteriores de regeneración o transformación genética debido a que en ella se obtuvo la más alta regeneración.

La línea de maíz blanco ChBl103, puede ser utilizada en experimentos de transformación ya que fue superior a las demás en la regeneración.

Se recomienda en investigaciones futuras, adecuar los métodos de regeneración y selección de las líneas a utilizar antes de proceder a implementar un método de transformación, sobre todo en los siguientes aspectos:

El potencial de regeneración *in vitro* tiene respuesta diferencial acorde con los genotipos evaluados, por lo que se debe considerar el incremento de peso en los callos y número de estructuras embrionarias formadas por callo cultivado.

Estudiar la generación de curvas de respuesta a fosfonitricina, para determinar la dosis adecuada de selección por herbicida y la oportunidad de aplicación después de la agroinfección, y así evitar escapes de plantas no transformadas durante la selección. Posteriormente se deben realizar ensayos con el gen reportero *35s::GUSint* para determinar el éxito de la agroinfección.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Abed, D., Madasamy, P., Talla, R., Goldman, S. and Rudrabhatla, S. 2007. Genetic engineering of maize with *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 gene using split-seed explants. Crop Science, Vol 47, November- December, pp:2390-2402
- Altam, A. 1998. Agricultural biotechnology. Ed. Marcel dekker, Inc. New York. E.U.
- Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. *In*: Handbook of plant cell culture techniques for propagation and breeding. Evans, D.A., W. R. Sharp, P. V. Ammirato, and Y. Yamada (eds). Macmillan Publishing Company, New York. Vol.1, pp: 82-123.
- Armstrong C. L. and Green, C. E. 1984. Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164:207-214.
- Armstrong, C. L. and Phillips, R. L. 1988. Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated de organogenic and friable, embriogenic tissue cultures of maize. *Crop Science*. 28:363-369.
- Bhaskaran, S. and Smith. R. H. 1990. Cell biology & molecular genetic. regeneration in cereal tissue culture: A review. *Crop Science*. 30:1328-1336.
- Birch, R. G. 1997. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular. Biology*. 48: 297-326.

- Bohorova, N. E.; Luna, B.; Brito, R. M. Huerta, L. D. and Hoisington, D. A. 1995. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude, and highland maize inbreds. *Maydica* 40 (1995): 275-281.
- Bohorova, N.; Zhang, W.; Julstrum, P., McLean, S., Luna, B.; Brito, R. M., Diaz, L., Ramos, M. E., Estañol, P., Pacheco, M., Salgado, M. and Hoisington, D. 1999. Production of transgenic tropical maize with *cryIAb* and *cryIAc* genes via microprojectile bombardment of immature embryos. *Theor Appl Genet* 99:437-444.
- Bohorova, N.; Frutos, R., Royer, M., Estañol, P., Rascón, Q. McLean, S. and Hoisington, D. 2001. Novel synthetic *Bacillus thuringiensis cry1B* gene and the *cry1B-cry1Ab* translational fusion confer resistance to southwern corn borer, sugarcane borer and fall armyworm in transgenic tropical maize. *Theor Appl Genet* 103:817-826.
- Brettschnider R., Becker, D. and Lörz, H. 1997. Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. *Theor Appl Genet* 94:737-748.
- Bronsema F. B. F., van Oostveen, W. J. F. and van Lammeren, A. A. M. 1997. Comparative analysis of callus formation and regeneration on cultured immature maize embryos of the inbred lines A188 y A632. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 50:57-65.
- Carvalho, C. H. S., Bohorova, N., Bordallo, P. N., Abreu, L.L., Valicente, F. H., Bressan, W. and Paiva, E. 1997. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. *Plant Cell Reports* 17:73-76.

- Chu, C. C.; Wang, C. C., and Sun, C. S. 1975. Establishment of an efficient medium for another culture of rice trough comparative experiments on the nitrogen sources. *Science Sinica* 18:659-668.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep. Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.
- Desmond, S. T. N. 1994. An Introduction to genetic engineering. Ed. Cambridge University Press. 167 pp.
- Frame, R. B., Zhang, H, Cocciolone, M. S., Sidorenko, V. L. Dietrich, R. Ch., Pegg, S. E. Zhen, S., Schnable S. P. and Wang, K. 2000. Production of transgenic maize from bombarded type II Callus: Effect of gold particle size and callus morphology on transportation efficiency. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 36:21-29.
- Frame, B., Shou, H., Chikwamba, R. K., Zhang, Z., Xiang, Ch., Fonger, T. M., Pegg, S. E. K., Li, B., Nettleton, D. S., Pei, D. and Wang, K. 2002. *Agrobacterium tumefaciens* - Mediated Transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiology* Vol.129 pp: 13-22.
- Frame, B. R., McMurray, J. M., Fonger, T. M., Main, M. L., Taylor, K. W., Torney, F. J., Paz, M. M. and Wang, K. 2006. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. *Plant Cell Report* 25:1024-1034.
- Furini, A. and Jewell, D. C. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature and mature embryos of tropical and subtropical *Zea mays* L. Genotypes. *Maydica* 39 (1994): 155-164.

Garg, A.K., J.-K. Kim, T.G. Owens, A.P. Ranwala, Y.D. Choi, L.V. Kochian and R. Wu. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. PNAS USA 99: 15898-15903.

Green, C. E. 1983. Tissue Culture methods in *Zea mays* and their utilization in crop improvement. Votr. Pflanzenzüchtg. 2, 25-34.

Green, C. E. and Phillips R. L. 1975. Plant regeneration from tissue cultures of maize. Crop Science 15:417-421.

Heck, R. G., Armstrong, C. L., Astowood, J. D., Behr, C. F., Bookout, J. T., Brown, S. M., Cavato, T. A., DeBoer, D. L., Deng, M. Y., George, C., Hillyard J. R., Hironaka, A. R., Howe, A. R., Jakse, E. H., Ledesma, B. E., Lee, T. C., Lirette, R. P., Mangano, M. L., Mutz, J. N., Qi, Y., Rodríguez, R. E., Sidhu, S. R., Silvanovich, A. Stoecker, M. A., Yingling, R. A. and You, J. 2005. Development and characterization of CP4 EPSPS-based, glyphosate- tolerant corn event. Crop Science 44:329-339.

Hellens, R. P. Edwards, A. E., Leyland N. R., Bean, S. and Mullineaux, P. M. 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. Plant Molecular Biology 42: 819-832.

Hernández-García, C. M., López Peralta, C., Buenrostro-Nava, M.T., Cárdenas-Soriano, E. y Pellegrineschi, A. 2007. Regeneración de maíces blancos subtropicales vía embriogénesis somática. Agrociencia 41 (7):743-753).

Herrera, E. L. y Martínez, T. M. 2007. Plantas Transgénicas. En: Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. Bolivar, Z. F. G. (Ed). El Colegio Nacional. 2da edición. México, D. F. pp: 167-193.

- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* Vol. 14 pp:745-750.
- Ishida, Y., Hiei, Y. y Komari, T. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. *Nature Protocols*. Vol 2 No.7. 1614-1620.
- Klein, T. M., Gradziel, T. Fromm, M. E. and Sanford, J. C. 1988. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high velocity microprojectiles. *Biotechnology* Vol 6 May 559-563.
- Klein, T. M., Kornstein, L., Sanford, J. C. and From M. E. 1989. Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. *Plant Physiol* 91, 440-444.
- Martínez, N. J. C. 2008. Establishment of transformation systems using mature seeds of maize inbred lines. Thesis of Master of Science. Iowa State University. EE. UU. 88pp.
- Mascorro, G. J.O., Avonce, N. e Iturriaga, G. 2005. Biotecnología de la trehalosa en las plantas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11(2):193-202.
- Matell, S. H., Matthews, J. A. y Mckee, R. A. 1985. Principles of plant biotechnology an introduction to genetic engineering in plants. Ed. Blakwell Scientific Publications. Oxford London.
- Mehlo, L., Gahalwa, D., Trug Nghia, P., Thi Loc, N., Capell, T. and Gatehouse, J. A. 2005. An alternative strategy for sustainable pest resistance in genetically enhanced crops. *PNAS* Vol.102 No.22:7812-7816.

- Miranda, J. A., Avonce, N., Suárez, R., Thevelein, J. M., Van Dijck, P. and Iturriaga, G. 2007. A bifunctional TPS–TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 226:1411-1421.
- Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- O'Kennedy, M.M., J.T. Burger, and D.K. Berger. 2001. Transformation of elite white maize using the particle inflow gun and detailed analysis of a low-copy integration event. *Plant Cell Repot.* 20:721-730.
- Paliwal, R. L., Granados, G., Lafitte, H. R., y Violic, A. D. 2001. El maíz en los trópicos mejoramiento y producción. Editorial Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
(<http://www.fao.org/docrep/003/X7650S/x7650s00.HTM>)
- Paul, J. M., Primavesi, F. L., Jhurrea, D. Zhang, Y. 2007. Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Biol.* 342.PP59-17.
- Sharp, W. and Evans, D. A. 1984. Handbook of plant cell culture. *Crop Species* Vol. 2.
- Strosse, H., Domergue, R. Panis, B., Escalant, J. V. y Cote, F. 2003 Banana plantain embryogenic cell suspensions. INIBAP. Technical Guidelines. Francia.
- Rascón-Cruz, Q., Sinagawa-García, S., Osuna-Castro, J. A., Bohorova, N. y Paredes-López, O. 2004. Accumulation, assembly, and digestibility of

amarantin expressed in transgenic tropical maize. Theor Appl Genet (2004) 108:335–342.

Valdez-Ortíz, A., Medina-Godoy, S., Valverde, M. E., y Paredes-López, O. 2007. A transgenic tropical maize line generate by the direct transformation of the embryo-scutellum by *A. tumefaciens*. Plant Cell Tissue Organ Culture 91:201-214.

Vega, J. M., Yu, W., Kennon, A. R., Chen, X. and Zhang, Z. J. 2008. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. Plant Cell Reports 27:297-305.

Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L. and Rocha-Sosa, M. 1990. Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Mol. Gen. Genet. 220: 245-250.

Wang, Z., Zhang, K. Sun, X. Tang, K. and Zhang, J. 2005. Enhancement of resistance to aphids by introducing the snowdrop lectin gene *gna* into maize plants. Journal Bioscience 30 (5):627-638.

Zhong, H., Srinivasan C, Stiklen M. B. (1992). In vitro morphogenesis of corn (*Zea mays* L). I. Differentiation of multiple shoot clumps and somatic embryos from shoot tips. Planta 187:483-489.

Zhong, H., Sun, B., Warkentin, D., Zhang, S., Wu, R., Wu, T., and Sticklen M. B.
1996. The competence of maize shoot meristems for integrative
transformation and inherited expression of transgenes. *Plant Physiology*
110: 1097-1107

Anexo 2. Soluciones y Buffers

Buffer de extracción:

NaCl	500 mM
EDTA	50 mM
Tris-HCl	100 mM, pH 8.0
SDS	1.3%
β -mercaptoetanol	0.2%

Buffer de dilución:

Tris-HCl	50mM, pH 8.0
EDTA	10mM

Buffer TE:

Tris-HCl	10mM, pH 8.0
EDTA	1mM

Buffer 10X para PCR:

Tris-HCl	200 mM, pH 8.4
KCl	500 mM

Buffer de dilución de la Taq polimerasa:

Tris-HCl	20 mM, pH 8.0
EDTA	0.1 mM
DTT	1.0 mM
Glicerol	50 %
Estabilizadores	