UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
INSTITUTO DE HORTICULTURA

LA VARIACIÓN EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CALLOS DE MAÍZ LIMITA LA DETECCIÓN DE GENES TRANSACTIVADOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO MÉXICO
DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

TESIS
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA:

MARTHA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

Chapingo, Estado de México, diciembre del 2003

Investigación y Posgrado
Instituto de Horticultura

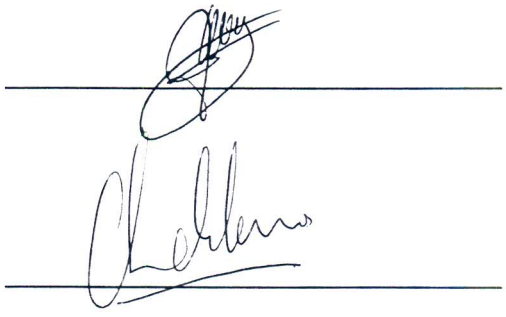
LA VARIACIÓN EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CALLOS DE MAÍZ LIMITA LA DETECCIÓN DE GENES TRANSACTIVADOS

Tesis realizada por **Martha Hernández Rodríguez**, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Dr. José Oscar Mascorro Gallardo:

Director

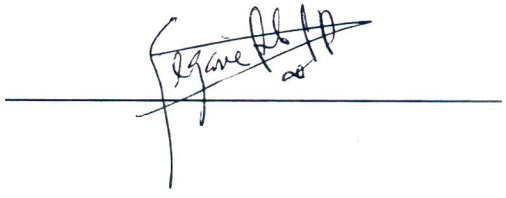


Dr. Olivier Leblanc:

Asesor

Dr. Juan Legaria Solano:

Asesor



Chapingo, Estado de México, diciembre del 2003.

Dedico este trabajo a mis hijos:

Hugo, Mariana y Andrea,

mis razones diarias de ánimo y alegría.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos aquellos que hicieron posible este trabajo; en particular, al Dr. O. Leblanc por su disposición y generosidad durante los cursos de posgrado y la redacción de esta tesis y al Dr. E. Perotti por su tolerancia y consejo al dirigirme durante la investigación, además de la cuidadosa revisión que ambos hicieron del contenido de este trabajo. Al Dr. O. Mascorro Gallardo y al Dr. J. Legaria Solano les agradezco sus valiosas lecciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular que bastante ayudaron en mi desempeño profesional y también por los comentarios que ayudaron a mejorar la calidad de esta tesis. Al Dr. D. Grimanelli y a R. M. López también les manifiesto mi agradecimiento porque con sus charlas y ánimo me motivaron hacia esta meta académica.

A mi esposo Hugo Alvarez Flores, a quien reconozco su enorme amor por nuestros hijos y su ponderada capacidad para tolerar mi ausencia, le agradezco infinitamente porque sin su apoyo, paciencia y comprensión, los cursos y la investigación no hubiesen sido posibles. Mi gratitud también la extiendo a mis queridos padres y a mi cercana familia paterna, de quienes, a través de la distancia, sentí su cariño y aliento para seguir adelante.

Por su apoyo constante, estoy en deuda con la Sra. C. Aguilar González y su familia, así como con mis amigos y compañeros del Centro de Biotecnología Aplicada del CIMMYT, sobre todo con P. Alva, J. V. Guadarrama, G. Palacios, R. M. Brito, V. García, M. Crosby, A. Martínez, C. Martínez y L. Díaz, quienes me apoyaron en los momentos difíciles de este proceso. A mis compañeros y amigos de cursos en la UACh expreso mi sincero aprecio, porque con su ánimo y espiritu de superación crearon una atmósfera cordial durante las jornadas de estudio, particularmente a H. Hernández Solares, gracias. Un reconocimiento especial lo dirigo al Dr. A. Barrientos quien gentilmente apoyó mi deseo de entrar a la UACh, una institución de la que recibí útiles conocimientos, en especial del personal académico del Instituto de Horticultura, con quienes tomé excelentes cursos. Al mismo tiempo, agradezco las facilidades que me brindaron el Dr. M. Pérez Grajales y la Sra. A. Varela para culminar un proceso que parecía interminable, así como al Dr. A. Pellegrineschi, la Dra. M. Warburton, A. Córtez, J. J. Caballero y el Dr. J. Crossa por la asistencia y asesoramiento técnico. Por último, este trabajo se realizó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, la infraestructura del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo y el apoyo del Institut de Recherche pour le Développement.

DATOS BIOGRAFICOS DE LA AUTORA

Martha Hernández Rodríguez nació el 30 de octubre de 1965 en Jojutla de Juárez, Morelos. Quinta hija del matrimonio formado por el Sr. Alberto Hernández López y la Sra. Alicia Rodríguez Martínez, realizó sus estudios básicos de primaria, secundaria y preparatoria en su lugar de origen. En 1984 ingresó a la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, de la que se graduó como Bióloga con especialidad en Agrobiología en 1988. Su desempeño durante este período la hizo acreedora de la medalla al Mérito Académico Universitario, reconocimiento que se otorga al estudiante de más alto aprovechamiento de cada generación. Ese mismo año ingresó al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo para realizar la tesis de licenciatura: "Causas fundamentales de la reducción del intervalo de floración en la población de maíz tropical Tuxpeño-Sequía", misma que le permitió obtener el título profesional en 1998. Desde 1990 hasta la fecha, trabaja para esta intitución en el proyecto de Transferencia de la Apomixis al Maíz donde ha participado como coautora en artículos científicos publicados en Apomixis Newsletter (1991) 3: 30-31, Crop. Sci. (1993) 33: 1029-1035, Apomixis Newsletter (1994) 7: 24-26, Plant Breeding (1995) 114: 226-230, Sexual Plant Reproduction (1997) 10: 279-282, Agrociencia (2000) 34: 729-734 y The Plant Journal (2002) 32: 1057-1066.

CONTENIDO

Pág.

ÍNDICE DE CUADROS x

ÍNDICE DE FIGURAS xii

ÍNDICE DE ABREVIATURAS xv

RESUMEN xvi

ABSTRACT xvii

I. INTRODUCCIÓN 1

II. REVISIÓN DE LITERATURA 4

2.1. Embriogénesis somática y tipos de callo en maíz 4

2.2. Transformación permanente y transitoria de maíz con biobalística 6

2.2.1. Condición física del tejido blanco a transformar 7

2.2.2. Condición biológica del tejido blanco a transformar 8

2.3. Antocianinas 9

2.3.1. Las antocianinas y los genes estructurales de la ruta 9

2.3.2. *C1* y *R*, factores de transcripción de la vía de las antocianinas 11

2.4. cDNA-AFLP, una técnica para detectar diferencias en la expresión de genes 13

III: MATERIALES Y MÉTODOS 15

3.1. Inducción de embriogénesis somática 15

3.2. Vectores de expresión 18

3.3. Cotransformación de los callos 20

3.4. Diseño experimental y evaluación de los datos 21

3.5 Preparación del RNA total 23

3.5.1. Extracción y cuantificación 24

3.5.2. Determinación de la calidad del RNA total 24

3.6. cDNA-AFLP 25

3.6.1. Síntesis del cDNA de una sola cadena (ss-cDNA) 26

3.6.2. Síntesis del cDNA de cadena doble (ds-cDNA) 27

3.6.3. Digestión de los ds-cDNA 27

3.6.4. Ligación de adaptadores en los ds-cDNA digeridos 28

3.6.5. Preamplificación del cDNA ligado a adaptadores 28

3.6.6. Amplificación selectiva del cDNA preamplificado 30

3.6.7. PAGE y detección de los fragmentos amplificados 30

3.7. Confirmación molecular de la expresión de *R* en los callos 31

IV. RESULTADOS 32

4.1. Inducción de los callos 32

4.2. Ensayos de expresión transitoria 34

4.2.1. Influencia del tratamiento osmótico 35

4.2.2. Influencia de los días de subcultivo 37

4.3. Verificación del desempeño de la técnica de cDNA-AFLP 38

4.3.1. Calidad de los moldes primarios: RNA y cDNAs 38

4.3.2. Repetibilidad de la técnica 40

4.3.2. Tamaño y migración de los fragmentos 41

4.4. Análisis de los marcadores cDNA-AFLP 41

4.4.1. .Experimento A: callos sin transformar *vs* callos transformados 42

4.4.2. Experimento B: origen de la variabilidad en la expresión de los callos 46

V. DISCUSIÓN 51

5.1. La embriogénesis y la organogénesis fueron procesos simultáneos favorecidos por el Dicamba y una probable causa de la variabilidad en la expresión de los callos 51

5.2. Un largo pretratamiento osmótico en callos jóvenes favoreció la transformación con biobalística y quizás alteró su expresión génica 53

5.3. Los callos fueron virtualmente clones y no presentaron expresión molecular homogénea 55

VI. CONCLUSIONES 58

VII. LITERATURA CITADA 59

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro Pág.

1. Composición del medio N6 empleado para la inducción de embriogénesis somática en embriones inmaduros de maíz A188 17

2. Oligonucleótidos utilizados para la formación de los adaptadores y secuencias de iniciadores empleados para la pre-amplificación y la amplificación selectiva de fragmentos cDNA-AFLP 29

3. Efecto del período de estrés osmótico antes y después del bombardeo sobre la expresión transitoria de *C1* y *R* en callos de maíz A188 36

4. Expresión transitoria de *C1* y *R* en callos de maíz A188 con diferente período en medio fresco antes de su transformación 37

5. Fragmentos cDNA-AFLP de callos de maíz A188 sin transformar y transformados con *C1* y *R* 42

6. Bandas diferencialmente expresadas en callos sin transformar (cn) y en callos transformados con *C1* y *R* (CT) 43

7. Análisis molecular de varianza de 1578 marcadores cDNA-AFLP obtenidos de callos de maíz A188 sin transformar y transformados con *C1* y *R* 46

8. Fragmentos cDNA-AFLP de callos sin transformar, bajo estrés osmótico, bombardeados sin plásmido y transformados con *C1* y *R* 47

9. Análisis molecular de varianza de 4272 marcadores cDNA-AFLP obtenidos de callos de maíz A188 sin transformar, bajo estrés osmótico, bombardeados sin plásmido y transformados con *C1* y *R* 50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Pág.

1. Ruta de las antocianinas en maíz. Las enzimas se muestran en negritas y en itálicas los genes estructurales que las codifican. **PAL**: fenialanina amonio-liasa; **CHS**: calcona sintasa; **CHI**: calcona isomerasa; **F3H**: flavanona 3-hidroxilasa; **DFR**: dihidroflavonol reductasa; **AS**: antocianidín sintasa; **3GT**: UDPglucosa flavonoide 3-oxy-glucosiltransferasa; **GST**: glutatión S-transferasa. *C2*: colored2, *whp*: white pollen, *A1*: anthocyanin1, *A2*: anthocyanin2, *Bz1*: bronze1, *Bz2*: bronze2 10

2. Diagrama de la estrategia experimental que muestra desde la inducción de callos hasta el análisis de los datos y la posible identificación de genes 16

3. Mapa de los plásmidos p35SC1 y pSRL349 que contienen los cDNAs de los genes *C1* y *R*, respectivamente 19

4. Callo de tipo II de maíz A188 creciendo en medio N6 complementado con 3 mg L^{-1} de Dicamba. El callo tiene tres días en cultivo de mantenimiento y sobre él se aprecian embrioides somáticos en estado globular de acuerdo con Abbe y Stein (1954) 33

5. **a**. Expresión ectópica de *C1* y *R* en callos de maíz A188. Cada uno de los puntos rojos es una célula transformada y en el texto es referida como señal transitoria. Su detección inició entre las 16-20 horas

después del bombardeo. Ocasionalmente, algunas señales permanecieron hasta dos semanas después de su detección inicial. **b**. Magnificación de un sector del callo (125x) 36

6. **a**. Patrones de bandeo de RNA total. Se cargó 1 μg por carril. **b**. Amplicones del gen *actine1* obtenidos en DNA genómico y en ss-cDNA. El marcador de peso molecular es ϕX174/*Hae*III (MW) 39

7. Amplicones obtenidos con iniciadores específicos al gen *R* en moléculas de ds-cDNA. El marcador de peso molecular es ϕX174/*Hae*III (MW) 40

8. Perfil de bandeo que muestra bandas diferencialmente expresadas (↘), reprimidas (↙) o comunes a todos los callos pero diferentes en intensidad (➔). Cada par de carriles compara amplificaciones que se realizaron con seis meses de diferencia. La amplificación se hizo con *Eco*RI-AGG/*Mse*I-CTT 44

9. Dendograma de 1578 marcadores cDNA-AFLP generados por ocho combinaciones de iniciadores en callos de maíz A188 y agrupados en base al coeficiente de similitud de Jaccard. **cn**; callos sin transformar, **CT**; callos transformados. Los números 1, 2, y 3 son las repeticiones de cada uno de los tratamientos. Se utilizó la técnica de agrupamientos UPGMA 45

10. Perfil de bandeo que muestra bandas reprimidas (↙) o comunes a todas las muestras pero diferentes en intensidad (➔) de callos evaluados en diferentes condiciones. La amplificación se hizo con *Eco*RI-AGG/*Mse*I-CTA 48

11. Dendograma de 4272 marcadores cDNA-AFLP generados con 12 combinaciones de iniciadores en callos de maíz A188 y agrupados en base al coeficiente de similitud de Jaccard. **N6**, callos sin transformar; **osm**; callos estresados osmóticamente; **Au**, callos bombardeados sin plásmido; y **C/R**, callos transformados. Las repeticiones de cada tratamiento son indicadas con los números 1, 2 y 3. Se utilizó la técnica de agrupamientos UPGMA 49

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AFLP:	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados.
AMOVA:	Análisis molecular de varianza.
BSA:	Suero de albúmina de bovino.
C1:	*colored-1*
cDNA:	Ácido desoxirribonucleico complementario
CSPD:	[(disodio 3-(4-metroxispiro[1,2-dioxetano-3,2'(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1.3,7]decan]4-yl)fenil fosfato.
DEPC:	Dietil pirocarbonato
dNTPs:	desoxinucleótidos
DTT:	Ditiotreitol
MAE:	MOPS-Acetato de sodio trihidratado-EDTA disódico.
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
PAL	Fenilalanina amonio liasa
R:	*red*
RT-PCR:	Transcripción reversa de la reacción de polimerización en cadena.
SGB:	Sample gel buffer. Amortiguador para cargar muestras en el gel.
UPGMA:	Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average.

RESUMEN

LA VARIACIÓN EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CALLOS DE MAÍZ LIMITA LA DETECCIÓN DE GENES TRANSACTIVADOS

Martha Hernández-Rodríguez. Maestría en Ciencias en Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo. José Oscar Mascorro-Gallardo. Director de Tesis.

Se evaluó la factibilidad de usar callos embriogénicos de maíz A188 como sistema para transactivar genes después de la sobreexpresión de genes reguladores. Los callos se indujeron con ácido 3,6-dicloro-*o*-anísico (Dicamba) en embriones inmaduros y se transformaron con biobalística con los factores de transcripción de antocianinas *C1* y *R*. Los resultados de mejor expresión transitoria ($P<0.05$) se encontraron en callos con tres días en medio fresco de inducción, estresados en medio N6 con maltosa 0.33 M antes del bombardeo. Se esperaba encontrar al menos 10 genes transactivados de la ruta metabólica de antocianinas, pero el agrupamiento de similitud de 5850 marcadores cDNA-AFLP detectó más diferencias dentro de los callos que aquellas asociadas con la presencia de los transgenes. Los AMOVAS confirmaron una variabilidad de 92-100 % para cada callo evaluado. Se sugieren el efecto del Dicamba y la variación somaclonal como causa de la variabilidad en la expresión.

Palabras clave: callos de maíz, expresión génica, biobalística, cDNA-AFLP.

ABSTRACT

VARIATION IN GENE EXPRESSION IN MAIZE CALLUS TISSUE LIMITS DETECTION OF TRANSACTIVATED GENES

Martha Hernández-Rodríguez. Master of Science in Horticulture. Universidad Autónoma Chapingo. José Oscar Mascorro-Gallardo. Thesis advisor.

The feasibility of using embryonic callus of maize as a system for determining targets of transcription factors was determined. Callus was induced from immature embryos using Dicamba (3,6-dichloro-*o*-anisic acid), and was transformed biolistically with the anthocyanin transcription factors *C1* and *R*. The best transient expression results ($P<0.05$) were found with young calli incubated for three days in fresh induction media, then stressed with N6 media containing 0.33 M maltose, and then transformed. It was expected to observe at least 10 transactivated genes associated with the anthocyanin pathway, but the comparison of 5850 cDNA-AFLP markers detected more differences due to the callus tissue itself than to the presence of transgenes. AMOVAS confirmed a variability of 92-100 % in each callus that was evaluated. It is suggested that the effect of Dicamba and somaclonal variation caused the observed variability in gene expression.

Key words: maize callus, gene expression, somaclonal variation, cDNA-AFLP.

I. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son macromoléculas producto de la expresión de los genes. Algunas son generadas de manera constitutiva, mientras que otras son formadas específicamente, como respuesta a señales del desarrollo o del ambiente, mediante un mecanismo conocido como transducción de señales. Estas moléculas se forman por la traducción del RNA mensajero que proviene de la transcripción de los genes. Para que este proceso ocurra se requiere de la integración de un aparato basal de transcripción, pero su regulación requiere del ensamblaje adicional de factores de transcripción específicos. Estos factores pueden ser basales o regulatorios. Los primeros son aquellos con los que mínimamente se expresa el gen. Los segundos son los que activan o reprimen su expresión de un modo controlado temporal y espacialmente (Singh, 1998).

Entre los factores de transcripción regulatorios se encuentran *C1* (*colored 1*) y *R* (*red*) cuya coexpresión está involucrada en la biosíntesis de antocianinas, una de las rutas más conocidas y estudiadas, principalmente en maíz, *Petunia* y *Antirrhinum* donde se conoce con detalle la serie de pasos que guía la formación de los sustratos de las enzimas estructurales y regulatorias (Holton y Cornish, 1995). Como en esta ruta, otros procesos celulares también ocurren en serie, pero solamente han sido clonados algunos de los genes implicados. Las técnicas que se emplean para detectar y aislar genes son variadas; su factibilidad técnica varía dependiendo del protocolo que se emplee y del organismo que se adopte para la expresión y detección de los genes. Por otro lado, la disponibilidad de bancos de datos con secuencias genómicas completas es un factor que

también contribuye a la búsqueda de la posible función de los genes, mediante la comparación con secuencias de genes ya reportados. Bajo estos argumentos, resulta interesante y atractivo desarrollar una técnica que permita detectar genes que participen en cierto proceso celular, después de la sobreexpresión de genes regulatorios asociados. En este aspecto, los callos embriogénicos de maíz podrían emplearse como sistema para el análisis rutinario de la expresión inducida de genes. Al provenir de un embrión único y mantenerse en estado indiferenciado, los callos embriogénicos de maíz se virtúan como clones. Sin embargo, los cambios citogenéticos asociados con el cultivo *in vitro*, debilitan la permanencia genómica intacta de las células que los conforman. No obstante, la producción de callo en un período relativamente corto, es una ventaja que permite tener suficiente material para probar ensayos de transformación. Por lo previamente expuesto, en este trabajo se plantearon el objetivo e hipótesis adelante descritos. Para su cumplimiento, se emplearon la biobalística como técnica para expresar ectópicamente *C1* y *R* en callos de maíz A188 y una versión de cDNA-AFLP como técnica para identificar genes inducidos por la sobreexpresión de *C1* y *R*.

OBJETIVO

Evaluar la factibilidad de desarrollar una técnica de detección de genes después de su transactivación en callos embriogénicos de maíz, tomando como modelo la ruta biosintética de las antocianinas.

HIPÓTESIS

Es posible detectar genes involucrados en una misma vía metabólica después de la sobreexpresión de genes reguladores en callos embriogénicos de maíz A188.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Embriogénesis somática y tipos de callo en maíz

El proceso por el que un explante o grupo de células somáticas diploides o haploides desarrollan un individuo pasando por estados embriológicos característicos sin la fusión de gametos, se conoce como embriogénesis somática (Williams y Maheswaran, 1986, citados por Franzs y Schel 1991). Este proceso se ha reportado para cerca de 250 especies de plantas y puede ser promovido en la mayoría de las células vegetales, principalmente en aquellas que provienen de meristemos o embriones, donde la desdiferenciación genera células en condición totipotente capaces de originar una planta completa. La obtención de un organismo como tal, inicia con la formación de una masa tisular indiferenciada llamada callo. Estas estructuras se forman como respuesta a estímulos hormonales como el de las auxinas, que son los reguladores del crecimiento empleados para la inducción de callos (Chawla, 2002). En maíz, existen reportes de formación de callo a partir de secciones de hojas (Conger *et al.*, 1987), embriones maduros (Wang, 1987), panículas y espigas inmaduras (Zhong *et al.*, 1992), pero la fuente preferida para la formación de callos son los embriones cigóticos inmaduros (Armstrong, 1994; Brettschneider *et al.*, 1997). En estas estructuras, las células que responden al estímulo de las auxinas son las células escutelares de la región coleorrizal y del epiblasto (Vasil *et al.*, 1985; He *et al.*, 1990). Para maíz se ha descrito el desarrollo histológico de callos de líneas maíz como A188 y de algunos híbridos, en estos reportes la inducción siempre se hizo con 2,4-D. Al respecto, Fransz y Schel

(1991), documentaron que los callos de maíz A188 se inician cuando el escutelo se transforma en un tejido translúcido y suave compuesto por grandes agregados de células muy vacuoladas y por unidades embriogénicas de células pequeñas e isodiamétricas. Los agregados celulares están rodeados de grandes espacios intercelulares que dan al callo su apariencia frágil. Las unidades embriogénicas, por otra parte, se distinguen también por ser densamente citoplásmicas. A pesar de que existe divergencia acerca del origen unicelular o pluricelular del embrión, Vasil y colaboradores (1985) señalaron que el desarrollo de los embriones somáticos de maíz muestra la serie de etapas morfológicas características del embrión cigótico que van del estado globular, de corazón, y de torpedo al estado cotiledonar (Abbe y Stein, 1954). Estas observaciones, en cambio, contrastan a los reportes de otros autores, para quienes fue difícil detectar embriones con un eje embrionario plenamente formado; únicamente pudieron visualizar embriones en estado globular (Fransz y Schel, 1991).

La distinción del eje embrionario en los embriones es uno de los criterios que se usa para discriminar los callos organogénicos de los embriogénicos. Para maíz, este grado de diferenciación, aunado a la friabilidad (grado de asociación entre las células) y el modo de regeneración (por embriogénesis u organogénesis) ha permitido clasificar los callos regenerables en tipo I y tipo II. Los cultivos de callos tipo I no son friables y deben ser subcultivados con ayuda de pinzas y escalpelo, regeneran mediante embriogénesis somática y organogénesis, y son altamente diferenciados (porque con frecuencia presentan estructuras foliares y embriones somáticos en estados avanzados de maduración en medio de mantenimiento). Por otro lado, los callos tipo II son muy

friables y a veces pueden subcultivarse con espátula, regeneran casi exclusivamente vía embriogénesis somática y son relativamente indiferenciados (presentan numerosos embriones en estado globular que no pasan a otro estado en medio de mantenimiento). Armstrong (1994) también señala que la clasificación no es absoluta y algunos callos pueden tener características de ambas clasificaciones. A pesar de que la generación de callos tipo II es muy dependiente del genotipo, éstos son los preferidos para algunas aplicaciones, entre las que se encuentran el establecimiento de cultivos en suspensión y la transformación con biobalística.

2.2. Transformación permanente y transitoria de maíz con biobalística.

La biobalística es una técnica que surgió como alternativa para transformar monocotiledóneas (Klein *et al.*, 1987). Inicialmente, la transformación de estas plantas se hizo en células en suspensión (Fromm *et al.*, 1986) y en protoplastos (Rhodes *et al.*, 1988) con métodos que incluían la electroporación o la coprecipitación con fosfato de calcio; sin embargo, estos métodos requerían la remoción de la pared celular como parte del sistema de transformación, lo que limitaba el potencial de regeneración de las células transformadas. En maíz, la transformación con microproyectiles a alta velocidad o biobalística es el método más empleado para transformar establemente este cultivo. En otros cultivos, de dicotiledóneas principalmente, la transformación más frecuente se realiza con *Agrobacterium tumefasciens* porque se evitan las inserciones múltiples del transgén (ya sea completo o en trozos) que suelen ocurrir con la biobalística. Recientemente se reportó la transformación eficiente de maíz con *Agrobacterium*

(Ishida *et al.*, 2003). Las monocotiledóneas, como el maíz, no son hospederos naturales de la bacteria, lo que en un principio limitó el uso extensivo de este sistema de transformación. A pesar de este avance, la transformación con microproyectiles a alta velocidad o biobalística es el método más empleado para transformar maíz u otras plantas donde no se conocen vectores ni cepas de *Agrobacterium* (Sripaoraya *et al.*, 2001). Para ensayos de expresión transitoria, la biobalística es una técnica rápida y adecuada que puede ayudar a monitorear la expresión de genes reporteros como *C1* y *R*. Como en otras técnicas, la aplicación del protocolo precisa requisitos biológicos y físicos que se deben estandarizar antes de su generalización.

2.2.1. Condición física del tejido blanco a transformar

La condición física más importante que requiere tener el tejido antes del bombardeo, es la condición hídrica. El contenido de una célula deshidratada ejerce menos presión sobre la membrana celular que una célula turgente; de esta forma, el impacto de un microproyectil no la rompe y se evita liberar el contenido celular. Para osmoacondicionar una célula o grupo de células se precisa cultivarlas en un medio con potencial osmótico más negativo que el intracelular. Diferentes productos se usan como osmorreguladores. Los carbohidratos-alcohol como el sorbitol y el manitol son los más empleados (Cárdenas y Villegas, 2002), pero también carbohidratos metabolizables como la maltosa pueden emplearse. Además de ser pilares energéticos, los carbohidratos pueden funcionar como osmolitos en concentraciones altas para evitar que los tejidos se hiperhidraten (Chawla, 2002). El agua, como solvente universal, es necesaria para el mantenimiento de los seres vivos, pero también su abundancia puede

ser letal. Los carbohidratos, por su estructura son capaces de atrapar agua haciendo más negativo el potencial osmótico del medio de cultivo, de esta manera permiten que el flujo del agua se dé por absorción y no por difusión. El tiempo que un tejido se encuentre en un medio osmótico influirá negativamente en la turgencia celular (Salisbury y Ross, 1994), lo que favorece la penetración de las partículas (Vain *et al.*, 1993; Kemper *et al.*, 1996). Bajo esta condición, bacterias (Shark *et al.*, 1991), ascomicetos como *S. cerevisae* (Armaleo *et al.*, 1990), células en suspensión, (Vain *et al.*, 1993) y embriones inmaduros (Kemper *et al.*, 1996, Brettschneider *et al.*, 1997) han incrementado el índice de transformación estable o transitoria cuando se han sometido a acondicionamento osmótico previo al bombardeo.

2.2.2. Condición biológica del tejido blanco a transformar

Los reportes acerca de la condición biológica de las células para ensayos de expresión transitoria se infieren de experimentos de transformación estable, que casi siempre van acompañados de cotransformaciones control con genes reporteros. En este caso, la literatura sobre transformación (que persigue en su mayoría regenerar plantas) aporta datos sobre la transformación de tejidos de diferentes edades. En callos embriogénicos de maíz A188, los embrioides tienden a desarrollarse asincrónicamente, de forma que embrioides en diferentes estados de desarrollo pueden encontrarse al mismo tiempo en el callo (Fransz y Schel, 1991). A pesar de ello, la condición biológica remite el uso de células y tejidos en condición juvenil. Al respecto, He y colaboradores (1990) sugieren emplear callos en etapas tempranas de formación para reducir la aparición de quimeras. Por su parte, Armstrong (1994) recomienda usar cultivos jóvenes de células en

suspensión porque conforme envejecen los cultivos, la regeneración y predisposición de las células a la transformación disminuye. El envejecimiento de un cultivo no necesariamente proviene del tiempo que ha permanecido como tal, también dentro de un período de subcultivo los tejidos envejecen; en este sentido, Sellmer y colaboradores (1994) señalan que el subcultivo frecuente o una concentración más alta de 2,4-D garantiza mantener cultivos jóvenes porque evita la maduración de los embriones. En general, la edad del tejido no es el factor más limitante para la transformación con biobalística, esta técnica ha demostrado ser efectiva para transformar tejidos de cualquier edad, como lo demostraron Wan y colaboradores (1995) quienes transformaron callos de maíz de tres años de edad, la limitación parece estar asociada a factores íntrinsecos de períodos largos de cultivo como son la pérdida de capacidad de regeneración y la variación somaclonal.

2.3. Antocianinas

2.3.1. Las antocianinas y los genes estructurales de la ruta

Las antocianinas son la clase más conspicua de los flavonoides. Estos metabolitos secundarios son responsables de la pigmentación floral de la mayoría de las plantas. La ruta biosintética que las genera también incluye enzimas involucradas en la síntesis de otros flavonoides (Figura 1A) que tienen diversas funciones ecológicas entre las que se incluyen protección de las plantas contra la luz UV, patógenos e insectos, viabilidad y germinación del polen, interacción con simbiontes y mediación del transporte de hormonas (Madhuri y Reddy, 1999).

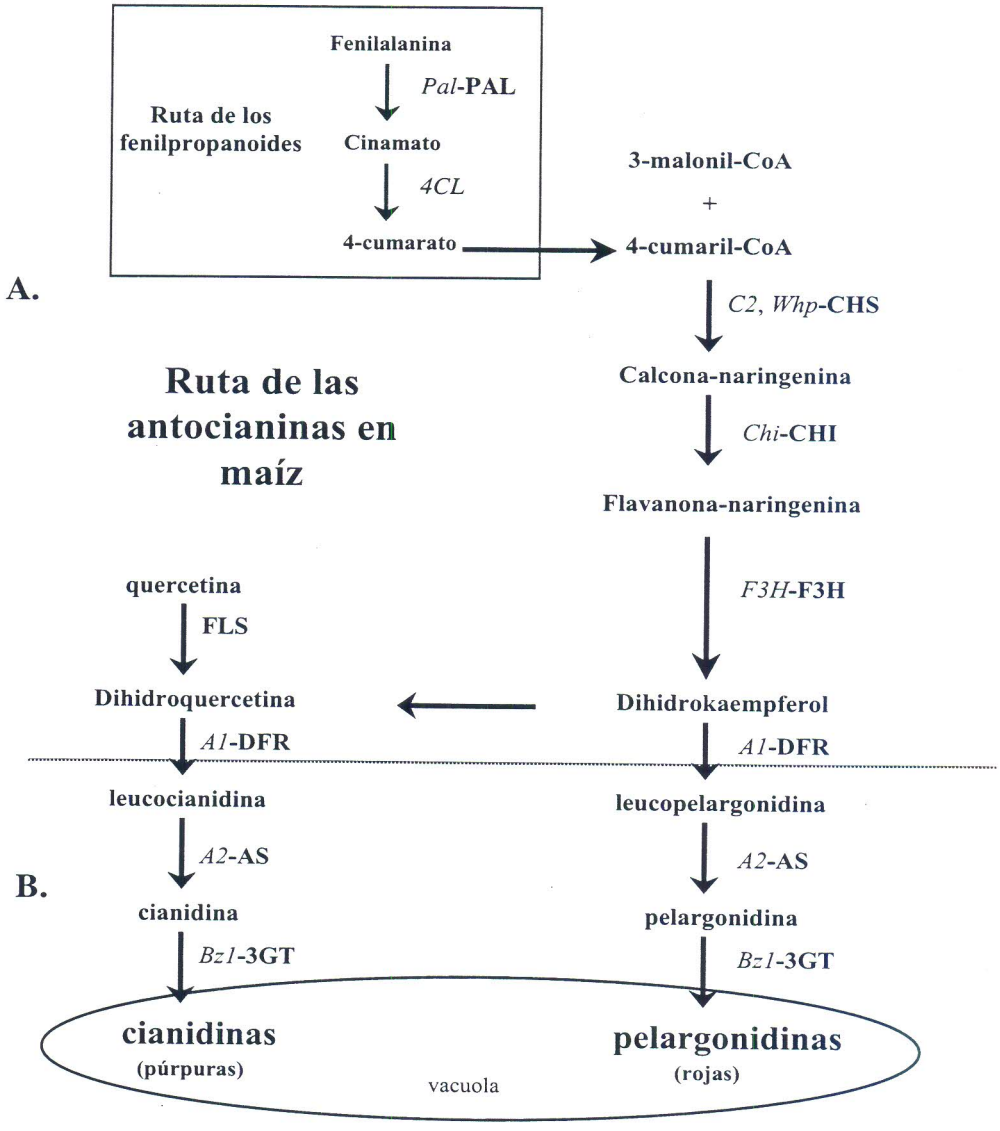


Figura 1. Ruta de las antocianinas en maíz. Las enzimas se muestran en negritas y en itálicas los genes estructurales que las codifican. **PAL**: fenialanina amonio-liasa; **CHS**: calcona sintasa; **CHI**: calcona isomerasa; **F3H**: flavanona 3-hidroxilasa; **DFR**: dihidroflavonol reductasa; **AS**: antocianidín sintasa; **3GT**: UDPglucosa flavonoide 3-oxy-glucosiltransferasa; **GST**: glutatión S-transferasa. *C2*: colored2, *whp*: white pollen, *A1*: anthocyanin1, *A2*: anthocyanin2, *Bz1*: bronze1, *Bz2*: bronze2.

Esta ruta se ha estudiado ampliamente desde principios del siglo XX y es una de las rutas mejor caracterizadas a nivel genético, bioquímico y molecular en *Zea mays* L, *Petunia hybrida* y *Anthirrinhum majus* donde los genes estructurales y algunos genes regulatorios ya fueron clonados (Holton y Cornish, 1995). Recientemente la caracterización se hizo para una cuarta especie, *Ipomoea purpurea*, que además permitió analizar los patrones de evolución entre los genes de la ruta (Rausher *et al.*, 1999). Estos antecedentes permiten que la ruta sea un buen modelo para estudiar la expresión de genes ya que el producto, un pigmento rojizo, es fácilmente cuantificable tanto en presencia como en intensidad (Ludwig *et al.*, 1990). Existen seis genes estructurales de la ruta que Selinger y Chandler (1999) consideran comunes a todas las angiospermas. Estos autores los han dividido en dos grupos. Los productos de los genes "río arriba" (Figura 1A), como la calcona sintasa (CHS), la calcona isomerasa (CHI), la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) y la dihidroflavonol reductasa (DFR) también son precursores de otros flavonoides que no son antocianinas, en tanto que los productos de los genes "río abajo" (Figura 1B), como la antocianidín sintasa (AS) y la UDPglucosa flavonoide 3-oxy-glucosiltransferasa (3GT), son precursores específicos de antocianinas.

2.3.2. *C1* y *R*, factores de transcripción de la vía de las antocianinas

Los factores de transcripción son proteínas que modulan el mecanismo regulatorio más importante de todos los organismos: el control transcripcional del gen. Estructuralmente, los factores de transcripción eucarióticos tienen un dominio de unión al DNA involucrado en el reconocimiento del gen que van a modular, y un dominio

efector responsable de su actividad activadora o represora. El dominio de unión al DNA de los factores de transcripción es el dominio más conservado, lo que permite que estos genes se agrupen en un número reducido de familias. Dos ejemplos de esta conservación son el dominio *myb* y el domino *myc*. Por su parte, los genes regulatorios que han sido clonados de la ruta de las antocianinas se clasifican en dos clases que incluyen homólogos de estas familias de activadores transcripcionales. Una clase es la familia R que consiste de genes que codifican proteínas MYC y contienen un dominio básico hélice-giro-hélice (bHLH) característico de otros activadores transcripcionales como Max y MyoD1 (Purugganan and Wesler, 1994). Esta familia también comprende dos series de genes regulatorios en maíz, el locus R (que incluye los alelos *S*, *Lc* y *Sn*) y el locus B (que incluye los alelos *B-Peru* y *B-1*). La segunda clase es la familia C que consiste de genes que codifican proteínas que contienen el dominio *myb-1* similares a otros genes eucarióticos regulatorios como *c-myb,* un proto-oncogén de vertebrados, y *glabrous,* un gen que controla la formación de tricomas en *Arabidopsis* (Paz-Ares *et al.*, 1987). En maíz, esta familia comprende los genes *c1* y *pl*. Ambas familias tienen genes ortólogos en *Petunia* y *Anthirrinhum* que codifican proteínas similares con diferentes patrones de expresión (Holton y Cornish, 1995; Mol, *et al.*, 1998). La expresión de antocianinas es el resultado de la interacción combinatoria de miembros de las dos familias, los cuales necesitan ser coexpresados para que la biosíntesis ocurra, como lo demostraron estudios donde se indujo la producción de estos pigmentos en tejidos usualmente no pigmentado como embriones y aleuronas incoloras (Goff *et al.*, 1990), raíces y mesocótilos (Ludwig *et al.*, 1990) y callos embriogénicos (Fromm, 1994).

2.4. cDNA-AFLP, una técnica para detectar diferencias en la expresión de genes

Una de las técnicas que se emplea para investigar a gran escala la expresión diferencial de los genes es la de cDNA-AFLP. Esta técnica se basa en el análisis de marcadores moleculares obtenidos por amplificación selectiva por PCR de fragmentos de cDNA. La técnica consiste de tres pasos: 1) fragmentación de cDNAs con enzimas de restricción, 2) ligación de adaptadores en los cDNAs digeridos; y 3) amplificación selectiva de los fragmentos (Money *et al.*, 1996). La eficiencia y reproducibilidad de la técnica ya se ha reportado (Bachem *et al.*, 1996) y aunque no cuantifica la magnitud absoluta o relativa de la abundancia de los transcriptos como la técnica de microarreglos, los cDNA-AFLP son útiles para identificar nuevos transcriptos. Esta técnica ha demostrado ser más confiable que otras técnicas que también investigan la expresión génica diferencial como el despliegue diferencial (Liang y Pardee, 1992) que usa iniciadores usualmente de 10 bases de longitud para amplificar un subconjunto de cDNAs. El despliegue diferencial presenta ciertas limitaciones, una de ellas es la generación de falsos-positivos, por lo que muchas veces las bandas que se aislan y clonan no suelen ser reconocidas en los ensayos tipo northern. Una segunda limitación, es que no es tan eficiente como la cDNA-AFLP para intensificar los cambios en la expresión de los transcriptos raros. La tercera limitación radica en la pobre reproducibilidad. Estas limitantes son consecuencia de la temperatura baja de alineamiento que se requiere para desempeñar el despliegue diferencial. La técnica de cDNA-AFLP, en cambio, emplea iniciadores largos (entre 18-24 bases) y específicos (Vos *et al.*, 1995). Como resultado, las temperaturas de alineamiento que se usan en el paso de amplificación son mucho

más altas que las que se emplean en el despliegue diferencial, lo que proporciona buena reproducibilidad y la generación de verdaderos-positivos (Don *et al.*, 1991). A pesar de estas ventajas, la amplificación de transcriptos raros diferencialmente expresados es baja con la cDNA-AFLP, probablemente por la competencia con los transcriptos más abundantes. Finalmente, como en otras técnicas como los microarreglos, donde se asocia la expresión de los genes con la hibridación fluorescente con fragmentos de genes ya conocidos, la técnica de cDNA-AFLP es útil para investigar cambios en la expresión de genes ya conocidos o no identificados.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en el Centro de Biotecnología Aplicada del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (Cimmyt), localizado en El Batán, Texcoco, México. La estrategia experimental involucró tres etapas: a) inducción de callos a partir de embriones inmaduros de maíz, b) expresión transitoria mediante biobalística de *C1* y *R* en callos de maíz; y c) análisis de marcadores cDNA-AFLP para detectar fragmentos asociados con la sobreexpresión de *C1* y *R* (Figura 2).

3.1. Inducción de embriogenésis somática

La línea de maíz A188, caracterizada por su elevado potencial embriogénico (Armstrong y Green, 1985) se escogió para obtener los embriones inmaduros. Para ello, mazorcas que se polinizaron planta a planta, se cosecharon entre 15-18 días después de la polinización. Posteriormente, las mazorcas sin espatas se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio (6% de ingrediente activo) al 30 % (v/v) y 200 µl L^{-1} de Tween 20 durante 30 min, para luego enjuagarlas con agua esterilizada. De los granos de estas mazorcas, se seleccionaron embriones con tamaño entre 1.0 y 1.5 mm (estado 1 y 2, de acuerdo con Abbe y Stein, 1954), mismos que se colocaron con el eje embrionario en contacto con medio N6 de inducción contenido en cajas de Petri de 60x15 mm. Dicho medio fue una versión del medio de cultivo N6 (Chu *et al.*, 1975)

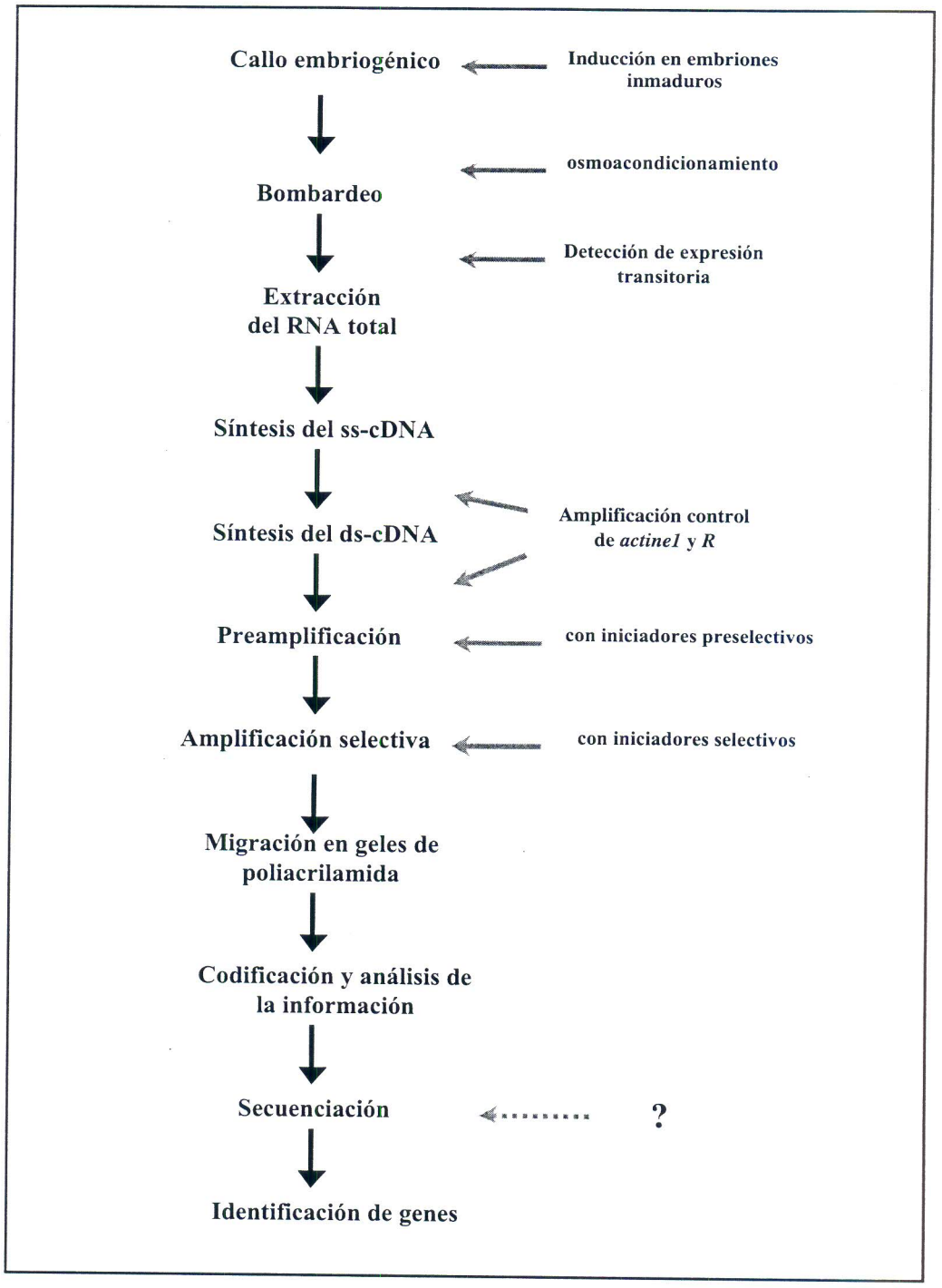


Figura 2. Diagrama de la estrategia experimental que muestra desde la inducción de callos hasta el análisis de los datos y la posible identificación de genes.

modificado por Bohorova y colaboradores (1999a) pero suplementado con 3 mg L^{-1} de ácido 3,6-dicloro-*o*-anísico (Dicamba) (Cuadro 1). Tanto la desinfección como el rescate y cultivo de los embriones se realizaron dentro de una campana de flujo laminar (Veco®, Méx.).

Cuadro 1. Composición del medio N6 empleado para la inducción de embriogénesis somática en embriones inmaduros de maíz A188.

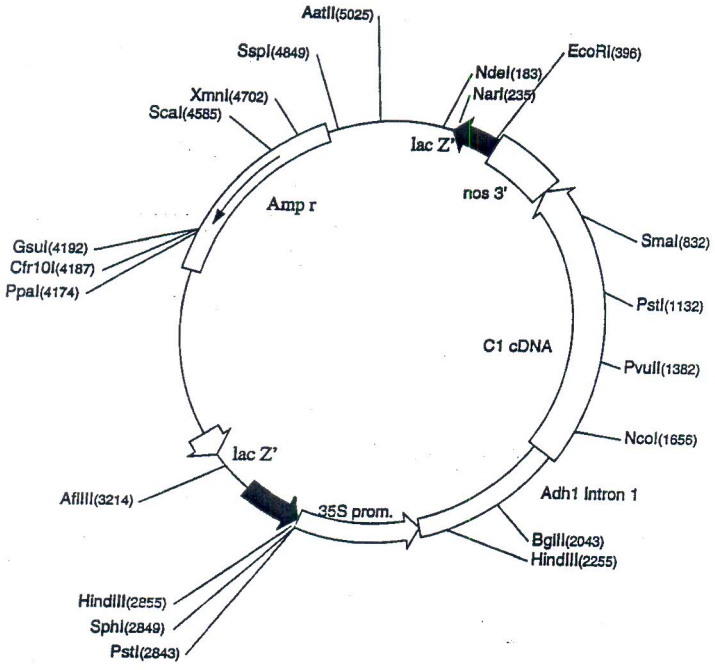
Componente	mg L^{-1}	mM	Componente	mg L^{-1}	mM
$(NH_4)_2SO_4$	463	3.50	Glicina	2	0.0266
KNO_3	2833	28.02	Ácido nicotínico	0.5	0.0040
$CaCl_2.2H_2O$	166	1.13	Tiamina HCl	0.5	0.0014
KH_2PO_4	400	2.94	Piridoxina HCl	1	0.0048
$MgSO_4$	93	0.77			
			L-prolina	2300	
$MnSO_4.H_2O$	59.7	0.353	Caseína hidrolizada	200	
$ZnSO_4.7H_2O$	15	0.052	sacarosa	30000	
H_3BO_3	16	0.258	Dicamba	3	
KI	8	0.048	agar	8000	
$FeSO_4.7H_2O$	278.5	0.1			
Na_2EDTA	372.5	0.1	pH	5.8	

Una vez sembrados los embriones, se mantuvieron bajo oscuridad total a 26 °C dentro de una cámara de crecimiento Biotronette (Lab-Line Instruments, Co., USA) para motivar la inducción de los callos. Una semana después, se realizó una inspección

visual con un estereomicroscopio Leistz Wild® M3Z para detectar los primeros signos de embriogénesis somática. Los embriones que mostraron estos signos se cultivaron nuevamente para generar los callos, en tanto que aquellos embriones que presentaron lento crecimiento o germinación vigorosa se desecharon. Los callos se cambiaron a medio fresco de inducción cada 14 ó 21 días y se mantuvieron bajo los mismos parámetros de crecimiento empleados para la inducción.

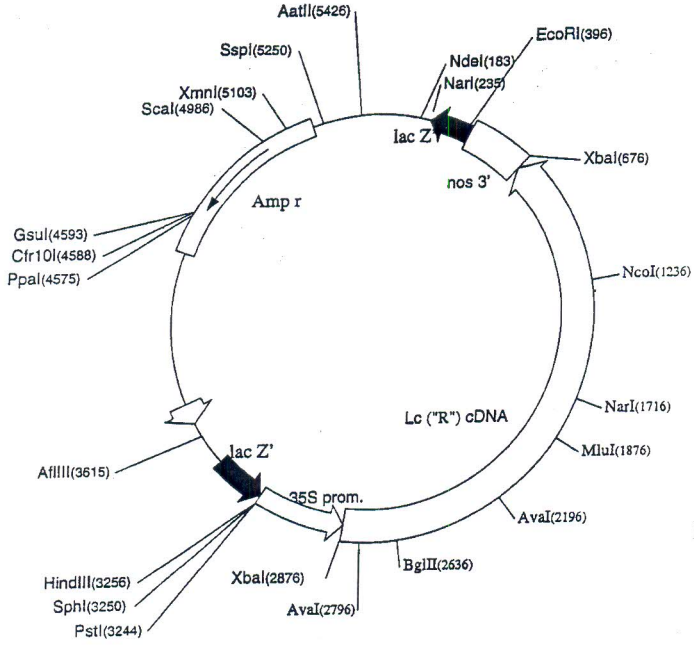
3.2. Vectores de expresión

Se emplearon dos plásmidos para inducir la biosíntesis de antocianinas. Uno de ellos fue el p35SC1 (construido por Goff *et al.*, 1990) que consiste de la región promotora del CaMV 35S, el primer intrón del gen *Adh1* de maíz, el cDNA del gen *C1* y la señal de poliadenilación de *nos*. El segundo plásmido fue pSRL349 (Ludwig *et al.*, 1990) integrado por el promotor CaMV 35S, el cDNA del gen *Lc*(*R*) y la señal de terminación del gen *nos* (Figura 3). Ambas construcciones fueron proporcionadas por M. Raishada de la Universidad de Stanford, USA. La cantidad de estos plásmidos se incrementó con transformaciones que se hicieron en células competentes de *Escherichia coli* cepa DH5α, de acuerdo con Sambrook y colaboradores (1989). Los plásmidos recombinantes se purificaron mediante minipreparaciones en las que se utilizaron los reactivos y protocolo del Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corp., USA). El control del tamaño de los insertos se verificó en geles de agarosa al 1.5 % (p/v) con tinción en bromuro de etidio.



Mapa de p35SC1

Goff *et al.*, EMBO J. 9: 2517-2522



Mapa de pSRL349

Ludwig *et al.*, Science 85: 4305-4309

Figura 3. Mapa de los plásmidos p35SC1 y pSRL349 que contienen los cDNAs de los genes *C1* y *R*, respectivamente.

3.3. Cotransformación de los callos

Se llevó a cabo mediante biobalística con microproyectiles de oro y el sistema de liberación de partículas PDS-100/*He Biolistic* (Bio-Rad®, Germany) impulsado por gas helio. La cotransformación se basó en el protocolo establecido por Bohorova y colaboradores (1999a) y todo el proceso se efectuó dentro de una cámara de flujo laminar (Veco®, Méx.). El procedimiento consistió en homogeneizar una alícuota de 50 μl de microproyectiles de 0.6 μm de diámetro (40 mg ml^{-1}, preparadas de acuerdo al Bio-Rad® Instruction Manual) en un sonicador 8891 (Cole Parmer, USA) por 120 s, para luego cubrirlos con 2.5 μl de cada plásmido (1 $\mu g\ \mu l^{-1}$). Inmediatamente después, sobre esta mezcla se adicionaron 50 μl de $CaCl_2$ 2.5 M más 20 μl de espermidina 0.1 M. La mezcla resultante se agitó en un vórtex durante 15 min para después centrifugarse a 12,000xg durante 2 min. El sobrenadante se eliminó. El precipitado que se obtuvo se lavó con 240 μl de etanol al 75 % (v/v), se resuspendió y volvió a centrifugarse a la misma velocidad y tiempo. Finalmente, el precipitado se disolvió en 240 μl de etanol absoluto y se colocó en hielo. De esta suspensión se tomaron 5 μl (ca. 42 μg de partículas) para dispersarlos sobre una membrana (Bio-Rad®, USA) previamente esterilizada por 5 min con etanol al 70 % (v/v). El DNA en la membrana se dejó secar brevemente antes de efectuar los disparos. Por cada muestra se preparó una membrana.

Antes de la transformación, los callos se sometieron a estrés osmótico en medio de inducción con maltosa 0.33 M durante 4 ó 16 horas. Bajo esta condición, sólo una vez fueron bombardeados. Los microproyectiles se dispararon empleando los siguientes

parámetros: discos con presión de ruptura de 1100 psi (Bio-Rad®, USA), vacío de 50 cm (20'') de Hg, 25 mm entre el disco de ruptura y la membrana, 80 mm entre la malla de detención y el tejido a bombardear. Por último, los callos se cambiaron a medio N6 de inducción sin maltosa después del bombardeo.

3.4. Diseño experimental y evaluación de los datos

Este estudio comprendió dos series de experimentos que se realizaron con la finalidad de optimizar la expresión transitoria de *C1* y *R*, y dos experimentos independientes que se hicieron para buscar genes activados o reprimidos por la sobreexpresión de *C1* y *R* mediante marcadores cDNA-AFLP. En cada experimento, los callos que se usaron fueron de tipo II, es decir, altamente embriogénicos.

La primer serie de experimentos tuvo como objetivo determinar el mejor período de pretratamiento osmótico que registrara la mayor expresión transitoria de *C1* y *R*. Para ello, los callos se colocaron en medio de inducción con maltosa 0.33 M por 0, 4 y 16 h antes del bombardeo. El diseño que se aplicó fue completamente al azar con tres repeticiones (3 días seguidos), siendo el testigo callos no sometidos a estrés. La segunda serie de experimentos se realizó para conocer en cuál momento de la primera semana de subcultivo el callo manifestaba la expresión temporal más alta. En este caso, se transformaron callos con 1 a 7 días de subcultivo, todos sometidos a 16 horas de estrés

osmótico. Para cada día se emplearon callos control no sometidos a estrés. En este experimento el diseño fue un factorial 2x7 completamente al azar con dos repeticiones. Para ambos experimentos, la variable respuesta fue el número de células pigmentadas de rojo oscuro por callo transformado; el conteo de estas células se hizo 48 horas después del bombardeo, para lo cual se empleó un esteromicroscopio Leistz Wild® M3Z. En los dos experimentos, las unidades experimentales fueron cajas de Petri con porciones de callo de 200 mg. La información se analizó manualmente con los datos promedio tomando como base los modelos estadísticos para los diseños que se emplearon (Clarke, 1984).

En los experimentos restantes siempre se emplearon callos con tres días en medio fresco de inducción, estresados 16 horas antes de ser bombardeados y congelados 72 h después de la transformación. En el caso del experimento A se compararon dos tratamientos con tres repeticiones: callos sin transformar y callos transformados con los factores de transcripción. Para los cDNA-AFLP, se evaluaron ocho combinaciones de iniciadores selectivos (Cuadro 2) y una temperatura de alineamiento (52 °C). Finalmente, el experimento B involucró cuatro tratamientos también con tres repeticiones: callos sin transformar, callos estresados osmóticamente, callos bombardeados sin plásmido pero estresados osmóticamente y callos transformados con *C1* y *R* también bajo estrés osmótico. Se evaluaron 12 combinaciones de iniciadores selectivos (Cuadro 2) y dos temperaturas de alineamiento (52 °C y 56 °C).

Los marcadores generados en estos experimentos se capturaron mediante lectura visual en hojas EXCEL versión 2000. De ellos, se construyó una matriz de datos binarios para cada experimento, donde el dígito 1 indicó presencia y el 0 ausencia del fragmento. De esta matriz se obtuvo un índice de polimorfismo (IP, cociente entre el número de bandas polimórficas y el número total de bandas en común) y las matrices de similitud donde se aplicó el coeficiente de Jaccard: a/(n-d), donde a es el número de bandas en común entre dos genotipos; n, es el número de bandas polimórficas del escrutinio y d, es el número de bandas ausentes en los dos genotipos. De dichas matrices de similitud se obtuvieron los agrupamientos basados en el método UPGMA. Ambos procedimientos se efectuaron con el paquete NTSYSpc 2.02 (Rohlf, 1997). Los marcadores AFLP también se sometieron a un AMOVA (Análisis Molecular de Varianza) para obtener el valor de F y la variación explicada entre y dentro de tratamientos; para esta situación, el AMOVA es interpretado como un ANOVA convencional (Excoffier *et al.*, 1992).

3.5. Preparación del RNA total

Para este proceso, todo el material que se empleó se dejó libre de RNAsas, lo cual requirió esterilización previa en autoclave y re-esterilización con calor a 95 °C durante 48 horas, o con 1200 μJ de radiación UV durante 2 min en un *UV Stratalinker*^{TM} 1800 (Stratagene Inc., USA). Por otro lado, el agua con la que se prepararon las soluciones se esterilizó por una noche con dietil pirocarbonato (agua-DEPC) al 0.1% (v/v) para

después re-esterilizarse en autoclave. Durante este proceso se siguieron las normas de seguridad para el manejo y desecho de los reactivos tóxicos.

3.5.1. Extracción y cuantificación

Cada callo se molió por separado en un mortero con nitrógeno líquido evitando la hidratación del tejido. Este tejido se vació en un tubo Eppendorf de 2.5 ml y el RNA total se extrajo con el reactivo desnaturalizador-disociador TRIZOL® Reagent (Invitrogen, USA). El precipitado de RNA que se obtuvo se secó a 56 °C por 2 min y se disolvió en 100 ul de agua-DEPC. Una dilución 150x de RNA total se cuantificó con el espectrofotómetro DU®-65 (Beckman Co., USA). Se asumió que una unidad de absorbancia a 260 nm de RNA es igual a 40 ug ml^{-1} de RNA (Sambrook *et al.*, 1989).

3.5.2. Determinación de la calidad de RNA total

Se efectuó migrando el RNA bajo condiciones desnaturalizantes en base al protocolo de Lehrach y colaboradores (1977) pero modificado para conseguir una nítida resolución del RNA (Goldberg, 1980; Sheiness y Sullivan, 1986). De cada muestra se tomó 1 μg de RNA total, disuelto en 6 μl de agua-DEPC, y se adicionó a un volumen de 19.2 μl compuesto por 12.5 μl de formamida, 4.0 μl de formaldehido (37%), 2.5 μl de MAE 10x (MOPS 200 mM, acetato de sodio trihidratado 50 mM, EDTA disódico 10 mM, pH 7.0 ajustado con KOH) y 0.2 μl de bromuro de etidio (10 mg ml^{-1}) para tener un volumen final de 25.2 μl. Esta alícuota se desnaturalizó a 65 °C por 5 min e inmediatamente después se mantuvo en hielo por otros 5 min para luego cargar solamente 25 μl en un gel de agarosa al 1.2 % (p/v).

El gel se preparó como sigue: 0.6 g de agarosa Nusieve (*FMC*, Rockland, NY, USA) se fundieron en 42.3 ml de agua-DEPC más 5 ml de MAE 10x, la mezcla se dejó enfriar hasta 55 °C y luego se añadieron 2.7 ml de formaldehido (37%). La mezcla se vació en un molde previamente limpiado con NaOH 0.4 M y enjuagado con agua-DEPC. Se dejó evaporar dentro de una campana de extracción por 30 min antes de cargar las muestras. El amortiguador de migración fue MAE 1x. Las muestras se migraron en corriente constante de 75 V por 1.5 h. El RNA se consideró de buena calidad y sin degradación si las bandas del rRNA eran nítidas y no presentaban barridos. La documentación del gel se hizo con el paquete Kodak 1D Image Analysis Software (New Haven, CT, USA).

3.6. cDNA-AFLP

La versión de cDNA-AFLP que se empleó en este estudio se basó en los protocolos descritos por Vos *et al.* (1995), y Money *et al.* (1996), y adaptada por E. Perotti del Cimmyt para la detección cromogénica y quimioluminiscente de marcadores AFLP (Hoisington *et al.*, 2001). La mayoría de los reactivos empleados fueron de Invitrogen (USA), excepto en los casos que son señalados en el texto. El agua que se usó para ajustar los volúmenes se obtuvo de Sigma (Cat. W-3500). Los oligonucleótidos de adaptadores e iniciadores se adquirieron de *OPERON* Technologies, Inc. y los termocicladores usados para las PCR fueron DYAD Dashboard DNA Engine (DYAD™, USA) y Engine Tetrad PTC-225 (MJ Research DNA, USA).

3.6.1. Síntesis del cDNA de una sola cadena (ss-cDNA)

Se hizo con el método de oligo(dT) de acuerdo con el protocolo para RT-PCR de Invitrogen (USA). Cinco microgramos de RNA total se mezclaron con 1 μl de DNasa Amp Grade (1 U μl^{-1}) y agua-DEPC para tener un volumen final de 9 μl. Esta alícuota se incubó 15 min a temperatura ambiente. Inmediatamente después se adicionó 1 μl de EDTA 25 mM y luego se calentó a 65 °C. De este RNA, se tomaron 8 μl para mezclarlos con 1 μl de mezcla de dNTPs 10 mM, 1 μl de oligo$(dT)_{12\text{-}18}$ (0.5 $\mu g\ \mu l^{-1}$), 2 μl de amortiguador 10x para enzima SUPERSCRIPT II RT, 4 μl de $MgCl_2$ 25 mM, 2 μl de DTT 0.1 M, 1 μl de Rnasa Inhibitor Out (40 50 U μl^{-1}) y 2 μl de SUPERSCRIPT II RT (50 U μl^{-1}). Esta mezcla se incubó 10 min a temperatura ambiente y luego a 42 °C por 2 h para permitir la síntesis de los ss-cDNA. La integridad de estas moléculas se verificó amplificando parte del gen de actina con iniciadores diseñados en base a la secuencia del gen *actine1* de maíz (accesión J01238 de la base de datos del NCBI) con el programa OLIGO 4.0 *Primer Análisis Software for Macintosh*. Los iniciadores se denominaron Actf2 (5'-CCTGAAGATCACCCTGTGCT-3') y Actr2 (5'-GCAGTCTCCAGCTCCTGTTC-3'). El volumen de reacción de cada muestra fue de 10 μl [1 μl de ss-cDNA, 2 μl de Actr2 2 μM, 2 μl de Actf2 2 μM y 5 μl de REDTaq™ (Sigma R-2648, USA)]. La amplificación se hizo con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 2 min, 30 ciclos de amplificación de 94 °C por 30 s, 56 °C durante 1 min y 72 °C por 1 min, y un ciclo final de extensión a 72 °C por 5 min. Como control positivo se amplificó parte del gen *actine1* de DNA genómico de maíz y también se incluyó un control negativo que contenía todos los reactivos de la PCR excepto DNA. Los productos de la PCR se migraron en geles de agarosa Nusieve al 1 %

(p/v) y se tiñeron con bromuro de etidio de acuerdo con Hoisington y colaboradores (2001).

3.6.2. Síntesis del cDNA de cadena doble (ds-cDNA)

Para sintetizar los ds-cDNA todos los reactivos se mantuvieron en hielo; el proceso fue así: 19 μl de ss-cDNA de cada reacción se mezcló con 6 μl de amortiguador 10x (Tris·HCl 50 mM, pH7.5; 10 $MgCl_2$ 10 mM, DTT 1 mM, BSA 50 $\mu g\ ml^{-1}$, dNTP mix 20 uM, Sambrook *et al.*, 1989) para la DNA polimerasa I, 0.135 μl de RNasa H (4 U μl^{-1}), 1 μl de DNA polimerasa I (10 U μl^{-1}) y agua para 60 μl. Todo se mezcló en un vórtex y se bajó con una rápida centrifugación. La mezcla se incubó a 16 °C por 2 h para permitir que la síntesis ocurriera. Posteriormente, las enzimas se inactivaron a 70 °C por 10 min. Los ds-cDNA se precipitaron con 6 μl de acetato de sodio 3 M pH 5.2, más 180 μl de etanol absoluto frío y luego se mantuvieron a -80 °C por una hora. Después se centrifugaron a 14,000xg por 60 min a 8 °C. El precipitado se resuspendió en 60 μl de agua. La integridad de los ds-cDNA se verificó amplificando parte del gen *actine1* de la misma manera como se hizo para los ss-cDNA.

3.6.3. Digestión de los ds-cDNA

Los ds-cDNA se fragmentaron usando dos endonucleasas de restricción que generan extremos cohesivos: *Mse*I, de cuatro pares de bases y corte frecuente y *Eco*RI de seis pares de bases y sitio de corte menos frecuente. La digestión involucró primero la acción de *Mse*I, para lo cual de cada muestra se mezclaron 18 μl de ds-cDNA con 23.25 μl de H_20, 5 μl de amortiguador para *Mse*I (React 1 10x) y 0.5 μl de *Mse*I (5 U μl^{-1},

Invitrogen, USA). Esta mezcla se incubó a 37 °C por 2 h. Inmediatamente después, se adicionaron 1 µl de NaCl 5 M y 0.25 µl de *Eco*RI (10 U μl^{-1}, Boehringer Mannheim, Inc., USA). De nuevo, las reacciones se incubaron a 37 °C por 2 h. Por último, las enzimas se inactivaron a 70 °C por 15 min.

3.6.4. Ligación de adaptadores en los ds-cDNA digeridos

Se usaron dos adaptadores, uno específico para el cDNA digerido con *Mse*I y el otro para el cDNA fragmentado con *Eco*RI. Antes de la ligación, los adaptadores se formaron alineando los respectivos oligonucleótidos *sense* y *antisense* (Cuadro 2) de *Mse*I (50 µM) y de *Eco*RI (5µM) con el siguiente programa: desnaturalización a 95 °C por 5 min, alineación a 65 °C por 10 min y extensión a 37 °C por 10 min. Los adaptadores de cadena doble se ligaron a los ds-cDNA digeridos añadiendo por cada reacción 5 µl de H_20, 2 µl de amortiguador de ligación 5x, 1 µl de adaptador *Mse*I 50 µM, 1 µl de adaptador *Eco*RI 5 µM y 1 µl de T4 DNA ligasa (1 U μl^{-1}). Se incubó a temperatura ambiente por 2 h, para después mantener la ligación a -20 °C.

3.6.5. Preamplificación del cDNA ligado a adaptadores

Se realizó utilizando iniciadores con sólo una base selectiva (Cuadro 2), para ello, 4 µl de la reacción de ligación se añadieron a la mezcla de preamplificación [2.5 µl de amortiguador 10x para la Taq polimerasa, 1.40 µl de iniciador *Mse*I-C 10 µM, 1.40 µl de iniciador *Eco*RI-A 10 µM, 2 µl de mezcla de dNTPs (2.5 mM de cada nucleótido), 0.75 µl de $MgCl_2$ 25 mM, 0.20 µl de Taq Polimerasa 5 U·μl^{-1}, 12.75 µl de H_20] para obtener un volumen final de 25 µl por reacción. Cada una de ellas se amplificó con un

un ciclo final de extensión a 72 °C por 4 min. Los productos de la pre-amplificación se diluyeron adicionando 55 μl de H_20 en cada reacción. La calidad de la preamplificación se verificó cargando 5 μl de cada cDNA preamplificado más 2 μl de SGB 5x (Tris-Base 1 M pH 8.0, EDTA 0.05 M pH 8.0, 25% de sacarosa, 2mg ml^{-1} de azul de bromofenol, 2 mg ml^{-1} de xileno cianol) en un gel de agarosa Nusieve al 2 % (p/v), usando 100 ng de ϕX174/*Hae*III como marcador de peso molecular.

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para la formación de los adaptadores y secuencias de iniciadores empleados para la pre-amplificación y la amplificación selectiva de fragmentos cDNA-AFLP.

Tipo de oligonucleótido	Secuencia
adaptador *Eco*RI, *sense*	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-'3
adaptador *Eco*RI, *antisense*	5'-AATTGGTACGCAGTC-3'
adaptador *Mse*I, *sense*	5´-GACGATGAGTCCTGAG-3'
adaptador *Mse*I, *antisense*	5´-TACTCAGGACTCAT-3'
Iniciador pre-selectivo *Eco*RI	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
Iniciador pre-selectivo *Mse*I	5´-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
Iniciador selectivo *Eco*RI *	5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3'
Iniciador selectivo *Mse*I	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC(A/G/T)N-3'[†]

* Marcado con digoxigenina.

[†] N se refiere a cualquiera de las bases A, C, G o T,

3.6.6. Amplificación selectiva del cDNA preamplificado

Se hizo con iniciadores con tres bases selectivas (Cuadro 2). Para cada muestra, el volumen de reacción fue de 10 μl (1 μl de producto pre-amplificado, 2 μl de iniciador *Mse*I-CN(N) 5 μM, 2 μl de iniciador *Eco*RI-AN(N) 2 μM marcado con digoxigenina, y 5 μl de REDTaq^{TM} (Sigma R-2648, USA). El programa de amplificación consideró una temperatura astringente de alineamiento ("touchdown PCR", Don *et al.*, 1991) y consistió en un ciclo de desnaturalización a 94 por 2 min, 6 ciclos a 94 °C por 30 s, 62 °C a 56 °C (disminuyendo 1 °C por ciclo), 72 °C por 1 min, 29 ciclos de 94 °C por 30s, 56 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, y un ciclo final de extensión de 72 °C por 5 min. Cuando la temperatura de alineamiento fue de 52 °C el programa fue el mismo, excepto que la temperatura de astringencia fue de 59 °C a 52 °C con reducción de 1 °C por ciclo.

3.6.7. PAGE y detección de los fragmentos amplificado

Los fragmentos amplificados se detectaron cromogénicamente con nitrato de plata o con quimioluminiscencia con CSPD (Tropix Cat. #CD100, 10 mg ml^{-1}) de acuerdo con Hoisington y colaboradores (2001). La detección cromogénica se hizo en geles de acrilamida al 8 % con el sistema de electroforesis vertical ATTO AE-6220 de 13 x 14 cm y 1 mm de espesor (Tokio, Japan, geles pequeños), en tanto que la detección quimioluminiscente se realizó en geles de secuenciación de acrilamida al 6% (geles grandes de 50 x 38 cm) con el sistema BioRad Sequencing Gel Apparatus (USA).

3.7. Confirmación molecular de la expresión de *R* en los callos

Se llevó a cabo en moléculas de ds-cDNA con iniciadores diseñados en base a la secuencia del locus *R* (accesión X15806 del NCBI data bank). Para su diseño se empleó el programa OLIGO 4.0 *Primer Análisis Software for Macintosh.* Las secuencias de los iniciadores fueron Rforward-2 (5'-TCTGCGACGAAATGGACCTG-3') y Rreverse-2 (5'- AGTGACTTGAGGACGAGGAACAT-3'), los cuales rindieron un amplicón de 348 pb, y Rforward-3 (5'-CGCAGAGATTGCTGAAGAAAGTG-3') y Rreverse-3 (5'-TCATTATTGCCACGGGAGGG-3') que amplificaron un producto de 298 pb. El volumen de reacción fue de 10 ul (1 ul de cDNA, 2 μl de iniciador forward 2 μM, 2 μl de iniciador reverse 2 μM y 5 μl de REDTaq^{TM} (Sigma). El programa de amplificación y la detección de los amplicones se hizo de igual forma como se realizó para el gen de actina.

IV. RESULTADOS

4.1. Inducción de los callos

Los primeros signos de embriogénesis somática se detectaron una semana después de cultivar los embriones. Estos signos fueron pequeñas protuberancias dispuestas en la región coleorrizal del escutelo. Dos semanas después, estas protuberancias generaron un pequeño callo formado por embrioides en estado globular sin suspensores visibles. Este callo se aisló de los restos del eje embrionario y se cultivó nuevamente para promover su proliferación. Cuatro semanas después, el callo sobresalió por ser típicamente de tipo II, como lo describen Armstrong y Green (1985). Sin embargo, en los ciclos subsecuentes de proliferación su morfología cambió de un estado embriogénico y friable (tipo II, Figura 4) a un estado mixto donde, además de los embrioides, también se apreciaron pequeños sectores organogénicos (callo tipo I).

Este cambio morfológico siguió un patrón cíclico a pesar de iniciar cada período de proliferación (subcultivo cada 21 días) con segmentos embriogénicos. Este cambio fue como sigue: los primeros siete días, el callo se mantuvo embriogénico con coloración amarillenta y translúcida; sobre los embrioides se apreciaron minúsculas protuberancias, indicio de la formación de nuevos embrioides; el tejido en el cual estaban sostenidas estas estructuras, denominado "estrato tisular" por Wernicke y colaboradores (1982), empezó a agrandarse y a mostrar una superficie suave, ondulada y brillante; en algunas zonas también denotó formación de protuberancias. No se pudo apreciar la bipolaridad

del embrión característica de las gramíneas, es decir, un eje embrionario dispuesto en un escutelo y sostenido por un suspensor (Kiesselbach, 1980).

Figura 4. Callo tipo II de maíz A188 creciendo en medio N6 complementado con 3 mg L^{-1} de Dicamba. El callo tiene tres días en cultivo de mantenimiento y sobre él se aprecian embrioides somáticos en estado globular de acuerdo con Abbe y Stein (1954).

Entre los días 8 y 16 del ciclo de proliferación, la coloración del callo se tornó de amarillenta a blanquecina en algunos sectores dependiendo del estado de maduración de los embrioides, siendo amarillentos y translúcidos los embrioides más jóvenes. Continuó apreciándose el crecimiento escalonado de embrioides sobre otros embrioides, y en algunos de ellos se notó el alargamiento del coleóptilo. El estrato tisular continuó creciendo, originando protuberancias y áreas con tricomas.

Finalmente, del día 17 al 21, el callo fue suave y embriogénico en su mayor parte, pero en algunas áreas se apreció duro y organogénico, lo que significó una combinación de callo tipo I y tipo II; la coloración sólo cambió en las regiones organogénicas donde el color blanco predominó; la génesis de los embrioides continuó igual; en cambio, la organogénesis permitió detectar tricomas, alargamiento de coleóptilos con apreciación del poro coleoptilar, estructuras foliares anchas y gruesas o muy delgadas y alargadas. El estrato tisular siguió creciendo, se volvió compacto en algunas regiones y en otras se desprendió fácilmente; en ocasiones se pudo visualizar el arreglo paralelinervado de grupos de células, semejante a la vascularidad de las monocotiledóneas.

Este seguimiento morfológico de los callos de Al88 indicó que bajo el efecto del Dicamba, no es factible la proliferación y mantenimiento continuo de callo tipo II durante un período largo (21 días). Sin embargo, la observación de un estado altamente embriogénico durante la primera semana de subcultivo, determinó que se realizaran ciclos de proliferación cada 14 días para mantener un estado tisular sin una aparente organización. Por consiguiente, sólo se usaron callos tipo II para los ensayos de expresión transitoria que en seguida se describen.

4.2. Ensayos de expresión transitoria

Los experimentos preliminares para expresar ectópicamente *C1* y *R*, revelaron una expresión baja y heterogénea de señales transitorias. Varios factores pudieron influir en

ello. Entre éstos se incluyeron los parámetros de bombardeo, el tratamiento osmótico previo al bombardeo y el estado de crecimiento de los callos. Una revisión sobre los parámetros de bombardeo (Klein *et al.*, 1988; Goff *et al.*, 1990; Ludwig *et al.*, 1990; Fromm, 1994; Wan *et al.*, 1995; Brettschneider *et al.*, 1997; Bohorova, *et al.*, 1999b) indicó que los parámetros empleados estuvieron dentro de los usualmente empleados con éxito. Respecto al tratamiento osmótico y la etapa de crecimiento del tejido, reportes sobre el tema señalan que se encuentran entre los críticos para obtener una transformación eficiente (Armaleo *et al.*, 1990; He *et al.*, 1990; Iida *et al.*, 1991, Vain *et al.*, 1993, Kemper *et al.*, 1996; Fromm, 1994). Debido a ello, se trató de encontrar la mejor condición que proporcionara la mayor cantidad de puntos antocianínicos en callos tipo II. Los datos sobre los bioensayos efectuados se presentan a continuación.

4.2.1. Influencia del tratamiento osmótico

Aunque en los medios de cultivo son varios los carbohidratos que se usan como osmorreguladores, en este trabajo solamente se usó maltosa 0.33 M como agente osmótico. Bajo esta situación, un efecto altamente significativo (P=0.01) se encontró para los callos estresados osmóticamente 16 h antes del bombardeo, donde el promedio de señales transitorias fue nueve o tres veces superior, respecto al expresado por callos sometidos sólo 4 horas o a ningún estrés osmótico respectivamente (Cuadro 3). Por otra parte, aunque se observó que la expresión transitoria ocurrió en cualquier parte del callo hubo regiones donde ésta se concentró (Figura 5a), principalmente en las zonas jóvenes donde se apreciaban conglomerados de pequeños embrioides (Figura 5b).

Cuadro 3. Efecto del período de estrés osmótico antes y después del bombardeo sobre la expresión transitoria de *C1* y *R* en callos de maíz A188[†].

Horas bajo estrés		Número de puntos antocianínicos			
Antes	Después	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio
0	4	174[b]	46[c]	38[c]	86
4	4	221[b]	288[b]	246[b]	251
16	4	518[a]	740[a]	902[a]	720

[†] El experimento se hizo por triplicado aplicando siempre un diseño completamente al azar. Cada día representa un experimento; asimismo, se presenta el promedio de los tres experimentos. Los conteos de los puntos antocianínicos se realizaron 48 después del bombardeo y cada valor dentro del Cuadro es el promedio de tres cajas de Petri con ca. 200 mg de callo Tipo II cada una. Valores con letra distinta son estadísticamente diferentes a P=0.05 de acuerdo con la prueba de Duncan.

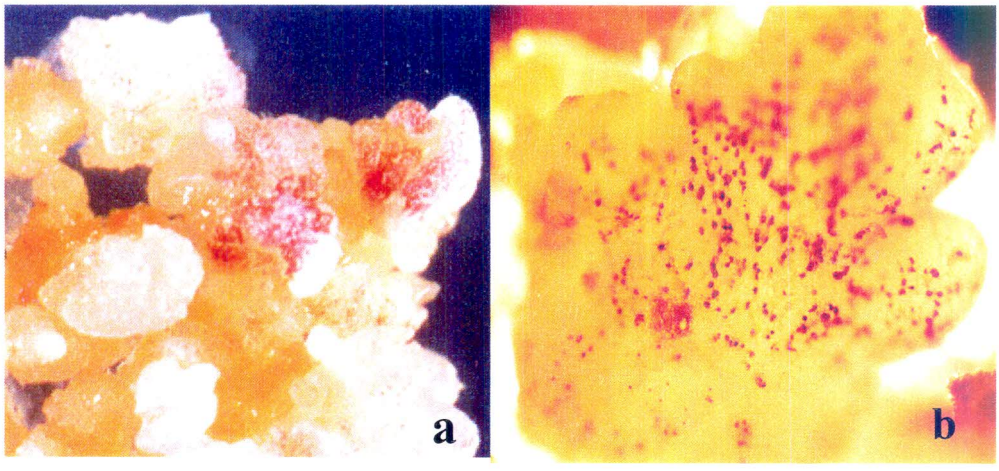


Figura 5a. Expresión ectópica de *C1* y *R* en callos de maíz A188. Cada uno de los puntos rojos es una célula transformada y en el texto es referida como señal transitoria. Su detección inició entre las 16-20 horas después del bombardeo. Ocasionalmente, algunas señales permanecieron hasta dos semanas después de su detección inicial. **b**. Magnificación de un sector del callo (125x).

4.2.2. Influencia de los días de subcultivo

La mejor respuesta de las zonas jóvenes a la transformación observada en el ensayo anterior, llevó a determinar si en la primera semana del ciclo de proliferación de los callos, existía un momento particular que favoreciera la expresión transitoria de *C1* y *R*. Al respecto, la mayor expresión transitoria se registró en callos que tenían 1-3 días en medio fresco cual fuera que haya sido el estrés osmótico (Cuadro 4). Como se esperaba, el número de puntos antocianínicos fue mayor en los callos bajo estrés y aunque esta respuesta tuvo un efecto altamente significativo (P=0.01), no se apreció una definición regular porque hubo cierta variación; por ejemplo, los callos con 2, 5 ó 7 días en medio fresco tuvieron una respuesta estadísticamente igual. No obstante, la obtención de valores altos de puntos antocianínicos en callos con 1-3 días de subcultivo fue lo que guió a emplear este tipo de callos para los experimentos posteriores.

Cuadro 4. Expresión transitoria de *C1* y *R* en callos de maíz A188 con diferente período en medio fresco antes de su transformación†.

Tiempo bajo estrés (horas)	Días en medio fresco N6						
	1	2	3	4	5	6	7
0	174^{cd}	46^{d}	38^{d}	6^{d}	12^{d}	20^{d}	9^{d}
16	526^{b}	216^{c}	1244^{a}	116^{cd}	236^{c}	138^{cd}	344^{c}

† Los datos dentro del cuadro son el valor promedio de puntos antocianínicos contados 48 h después del bombardeo de dos experimentos. Estos datos se analizaron en un diseño factorial 2x7 completamente al azar, donde 2 se refiere a los tratamientos de estrés y 7 a los días de cultivo en medio fresco. Únicamente se presenta la comparación de los promedios entre niveles de factores porque el objetivo de este experimento fue encontrar en qué día y bajo cuál período de estrés había mayor expresión. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con Tukey (P=0.05).

4.3.1. Calidad de los moldes primarios: RNA y cDNAs

Establecido el tratamiento osmótico y la etapa de subcultivo del callo con mejor respuesta a la transformación, la búsqueda de genes regulados por *C1* y *R*, se hizo con la técnica de cDNA-AFLP, la cual es una herramienta útil para detectar diferencias en la expresión de los genes. Por lo tanto, la calidad y cantidad de la molécula primaria, en este caso el RNA, es crucial para su buen desempeño. En este sentido, la carga igual de la molécula molde fue importante para evitar el sesgo en la amplificación. La demostración de cargar cantidades iguales de RNA se aprecia en el luminograma de la Figura 6a, donde las bandas del RNA ribosomal se observan nítidas y homogéneas.

Adicionalmente, la integridad del RNA también es un factor que influye en la síntesis de los cDNA. Una manera de probar si no hubo contaminación con DNA genómico antes de la síntesis de los cDNA, fue amplificando un gen de expresión constitutiva como *actine1*. Para ello, el diseño de iniciadores específicos a este gen, consideró la presencia de un intrón, por consiguiente, si durante la PCR los iniciadores se alinearon a un molde de DNA genómico, el amplicón sería más grande comparado con el producto obtenido en moldes de cDNA. En la Figura 6b se pueden observar bandas de 332 pb que corresponden a alineamientos en moléculas de cDNA y una banda cercana a 600 pb que se obtuvo con DNA genómico. Resultados iguales se obtuvieron para la amplificación de *actine1* en los ds-cDNA.

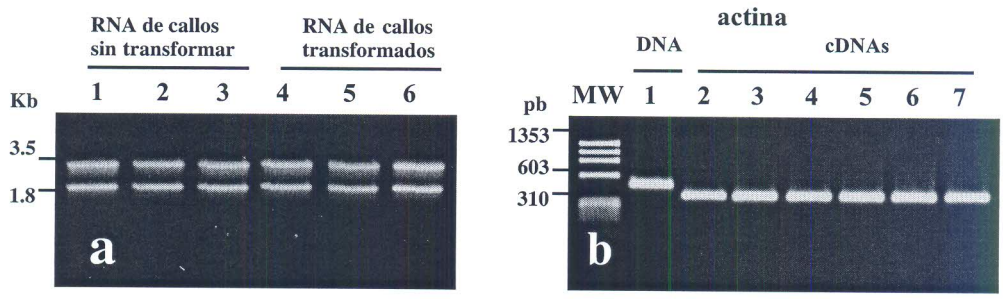


Figura 6a. Patrones de bandeo de RNA total. Se cargó 1 µg por carril. **b**. Amplicones del gen *actine1* obtenidos en DNA genómico y en ss-cDNA. El marcador de peso molecular es ϕX174/*Hae*III (MW).

Además de amplificar parte de *actine1*, también se amplificó parte del gen *R* para detectar su expresión molecular. *R* es uno de los genes implicados en la regulación de la biosíntesis de las antocianinas y la confirmación de su expresión molecular apoyaría la detección visual que se obtuvo en los callos transformados. La Figura 7 muestra los amplicones que se obtuvieron con iniciadores específicos para *R* en moléculas de ds-cDNA. Los amplicones se generaron en los callos donde hubo transformación pero no en los callos sin transformar. Además, la intensidad de las bandas correspondió con la magnitud de la expresión, es decir, a mayor número de puntos antocianínicos mayor intensidad de las bandas. Esto se corroboró con el callo que tuvo una baja expresión (9 puntos antocianínicos, datos no mostrados) donde el amplicón de *R* no se detectó (carriles 3-4 de la Figura 7). Dos amplificaciones más mostraron resultados similares; por lo tanto, los callos transformados que no revelaron amplicones no se consideraron para los análisis de marcadores moleculares.

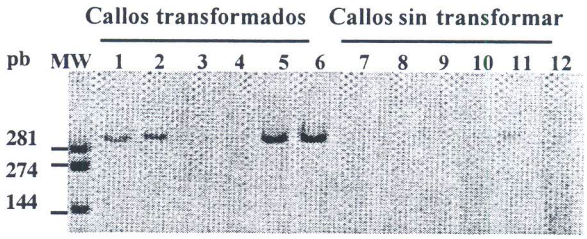


Figura 7. Amplicones obtenidos con iniciadores específicos al gen *R* en moléculas de ds-cDNA. El marcador de peso molecular es ϕX174/*Hae*III (MW).

4.3.2. Repetibilidad de la técnica

Se realizaron dos pruebas de reproducibilidad de la técnica con una diferencia de seis meses entre una y otra con el RNA extraído de tres callos sin transformar y tres callos transformados con *C1* y *R*. Para ello, se usaron ocho combinaciones de iniciadores. Las amplificaciones se realizaron en el mismo termociclador con cDNAs recién sintetizados del mismo RNA y sintetizados seis meses antes. También se migraron en el mismo gel de secuenciación (Figura 8). Los perfiles de bandeo revelaron 1578 marcadores cDNA-AFLP, que siempre fueron los mismos, excepto por dos ocasiones donde el perfil de una y otra prueba no correspondió totalmente. Por consiguiente, la reproducibilidad del patrón de bandeo que se obtuvo permitió confiar en las reacciones de amplificación subsecuentes.

4.3.3. Tamaño y migración de los fragmentos

En general, el tamaño de las bandas fue de 50-600 pb, lo cual se preveía por el barrido de fragmentos obtenidos en la pre-amplificación. Después de la amplificación específica, la migración de los fragmentos se hizo en dos tipos de geles, uno de secuenciación con detección quimioluminiscente con CSPD y otro de migración en geles pequeños (13x14 cm) con detección cromogénica con nitrato de plata. El número de fragmentos amplificados osciló entre 70-120 cuando la migración se hizo en geles de secuenciación, en cambio, cuando los fragmentos se corrieron en geles pequeños, el rango estuvo entre 20-68 bandas (Cuadro 5). Inicialmente, la migración de los fragmentos se realizó en geles de secuenciación, pero debido a la legibilidad que se obtuvo con el despliegue en geles pequeños, se decidió realizar la migración en este tipo de geles para limitar el número de bandas y la reducción del costo y trabajo de la técnica.

4.4. Análisis de los marcadores cDNA-AFLP

Los marcadores se originaron de dos experimentos: el experimento A, que comparó solamente callos sin transformar y callos transformados con *C1* y *R*, y el experimento B, que trató de discriminar bandas que provenían de una situación particular (callos sin transformar, bajo estrés osmótico, estresados por el bombardeo y callos transformados con *C1* y *R*). Cada experimento se analizó por separado.

4.4.1. Experimento A: callos sin transformar *vs* callos transformados

De los 1578 marcadores cDNA-AFLP que se generaron en este experimento se obtuvo el índice de polimorfismo (IP) para ejecutar un análisis rápido de la información (Cuadro 5). Este IP fue muy cercano a 1.0, lo que en otros términos se interpretó como una enorme variabilidad.

Cuadro 5. Fragmentos cDNA-AFLP de callos de maíz A188 sin transformar y transformados con *C1* y *R*.

Iniciadores		Total de	Bandas	
*Eco*RI	*Mse*I	bandas	polimórficas	IP[†]
AGG	CAA	32	25	0.78
AGG	CAC	38	28	0.74
AGG	CAG	29	22	0.76
AGG	CAT	28	22	0.79
AGG	CTA	38	30	0.79
AGG	CTC	68	58	0.85
AGG	CTG	38	28	0.78
AGG	CTT	30	24	0.80

Se analizaron tres repeticiones por tratamiento. La detección se hizo en geles pequeños de poliacrilamida. El número total de bandas incluyó las bandas detectadas a los largo de un carril común a todas ellas. Las bandas polimórficas fueron aquellas que no estuvieron presentes al menos una vez entre todas las muestras evaluadas. [†]IP, índice de polimorfismo es igual al cociente entre las bandas polimórficas y el número total de bandas en común.

El IP permitió tener una panorama general de la variabilidad de las muestras; pero su limitación para proporcionar información acerca del origen de la variabilidad guió a realizar un escrutinio de los perfiles de bandeo. Del análisis detallado que se hizo para cada uno de los perfiles de bandeo de los callos, se encontraron fragmentos únicos a uno

o dos callos dentro de un mismo tratamiento pero ausentes en los demás (Cuadro 6); también se detectaron bandas reprimidas en algunos callos, y al mismo tiempo, bandas comunes a todos los callos pero diferentes en intensidad (Figura 8). Solamente una ocasión se pudo observar un fragmento común a todos los callos sin transformar, pero no presente en los callos transformados. A partir de esta información surgió la sospecha de que los individuos que conformaban cada tratamiento tenían más diferencias que aquellas asociadas con el tratamiento *per se*.

Cuadro 6. Bandas diferencialmente expresadas en callos sin transformar (cn) y en callos transformados con *C1* y *R* (CT)[†].

		Número de bandas únicas en:			
Iniciadores		1 callo		2 callos	
*Eco*RI	*Mse*I	cn	CT	cn	CT
AGG	CAA	2	0	7	1
AGG	CAC	8	0	4	0
AGG	CAG	0	0	4	0
AGG	CAT	7	3	2	0
AGG	CTA	0	0	7	1
AGG	CTC	8	3	8	4
AGG	CTG	6	4	5	5
AGG	CTT	9	3	3	0

[†] Cada tratamiento estuvo conformado por tres callos (repeticiones).

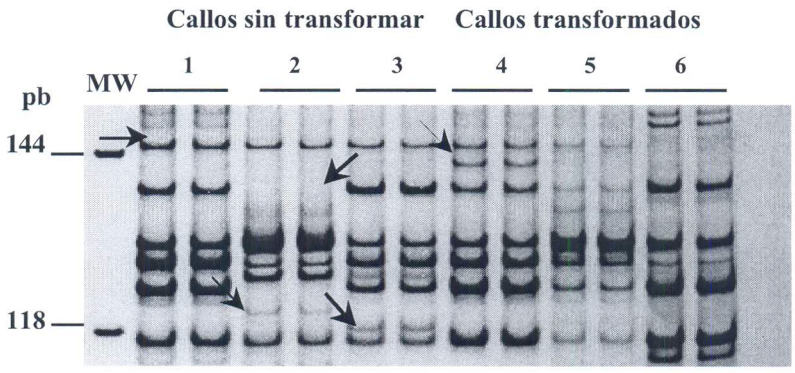


Figura 8. Perfil de bandeo que muestra bandas diferencialmente expresadas (↘), reprimidas (↙) o comunes a todos los callos pero diferentes en intensidad (→). Cada par de carriles compara amplificaciones que se realizaron con seis meses de diferencia. La amplificación se hizo con *Eco*RI-AGG/*Mse*I-CTT.

Lo anterior se confirmó con el análisis de agrupamientos como se muestra en la Figura 9. En este caso, los marcadores distinguieron agrupamientos con coeficientes de similitud bajos, los cuales oscilaron de 0.399 a 0.688, lo que en otros términos significó que de 10 fragmentos, sólo 4 a 7 fueron iguales. En este caso, los callos sin transformar (cn) se agruparon con un coeficiente de similitud de 0.438 y los callos transformados (CT) con un coeficiente ligeramente menor de 0.399. No obstante este resultado, los callos cn fueron más variables que los callos CT; e independientemente del tratamiento, el polimorfismo entre los callos fue muy notable.

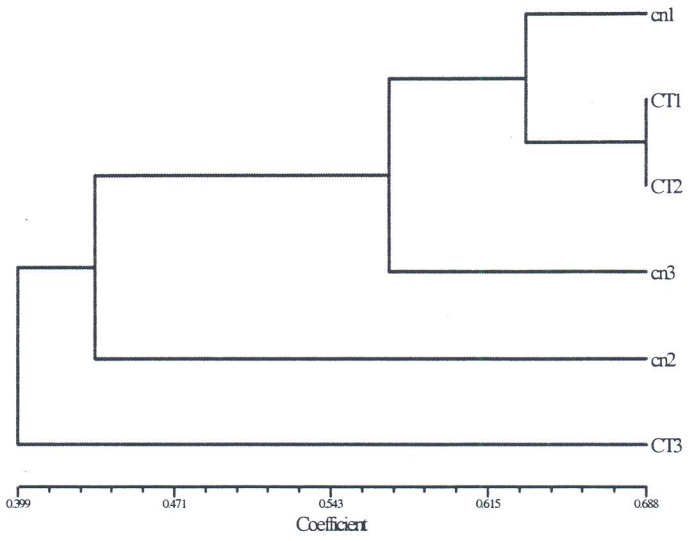


Figura 9. Dendograma de 1578 marcadores cDNA-AFLP generados por ocho combinaciones de iniciadores en callos de maíz A188 y agrupados en base al coeficiente de similitud de Jaccard. **cn**; callos sin transformar, **CT**; callos transformados. Los números 1, 2, y 3 son las repeticiones de cada uno de los tratamientos. Se utilizó la técnica de agrupamientos UPGMA.

El AMOVA que se hizo para este experimento, confirmó estadísticamente que las diferencias en los perfiles de bandeo provinieron de diferencias entre los individuos y no por los tratamientos. En este caso, el valor de F no fue estadísticamente significativo, pero la varianza explicada dentro de las repeticiones de cada tratamiento fue muy grande (100%), lo que señaló que las diferencias en los perfiles de expresión provinieron de los individuos y no de los tratamientos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis molecular de varianza de 1578 marcadores cDNA-AFLP obtenidos de callos de maíz A188 sin transformar y transformados con *C1* y *R*.

Fuente de variación	g. l[†].	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre tratamientos	1	33.667	-0.33333	-0.97
Dentro tratamientos	4	138.667	34.666	100.97
Total	5	172.333	34.333	
Valor de F:	0.00971 **NS**			

El análisis estadístico se efectuó de acuerdo con Excoffier *et al.*, 1992.

[†] Grados de libertad.

Las diferencias de expresión pudieron tener diferentes orígenes, ya sea del propio cultivo, del estrés osmótico al que son sometidos los callos antes del bombardeo, del bombardeo en sí, o de la regulación de *C1* y *R*. Estos resultados conllevaron al desarrollo del experimento B que trató de discriminar los fragmentos que provenían de una condición particular.

4.4.2. Experimento B: origen de la variabilidad en la expresión de los callos

En este experimento se generaron 4272 marcadores cDNA-AFLP. Al igual que en el experimento A también se obtuvo el IP, el cual osciló entre 0.33 a 0.70 (Cuadro 8). Por otra parte, también se encontraron bandas diferencialmente expresadas dentro de un tratamiento particular, pero la discriminación que se hizo al comparar los perfiles de bandeo de los callos, reveló que estas bandas se detectaron entre todos los tratamientos y no solamente para callos transformados con *C1* y *R* (Figura 10). En este experimento,

el agrupamiento no reveló mayores cambios como lo indica el dendrograma de la Figura 11. Aunque en este experimento, se acusó un incremento en el coeficiente de similitud (rango 0.72 a 0.89), de cualquier forma los grupos se formaron con coeficientes se similitud bajos y al menos un individuo de cada tratamiento varió en su perfil de expresión respecto a los demás.

Cuadro 8. Fragmentos cDNA-AFLP de callos sin transformar, bajo estrés osmótico, bombardeados sin plásmido y transformados con *C1* y *R*.

Iniciadores		Total de	Bandas	
*Eco*RI	*Mse*I	bandas	polimórficas	IP[†]
AGG	CAA	26	12	0.46
AGG	CAC	24	8	0.33
AGG	CAG	41	20	0.48
AGG	CAT	37	18	0.37
AGG	CGA	41	24	0.58
AGG	CGC	36	19	0.53
AGG	CGG	29	18	0.62
AGG	CGT	36	21	0.58
AGG	CTA	39	27	0.69
AGG	CTC	23	13	0.57
AGG	CTG	41	26	0.63
AGG	CTT	20	14	0.70

La detección se hizo en geles pequeños de poliacrilamida. Se analizaron tres repeticiones por tratamiento. El número total de bandas incluyó las bandas detectadas a los largo de un carril común a todas ellas. Las bandas polimórficas fueron aquellas que no estuvieron presentes al menos una vez entre todas las muestras evaluadas. [†] IP, índice de polimorfismo es igual al cociente entre las bandas polimórficas y el número total de bandas en común.

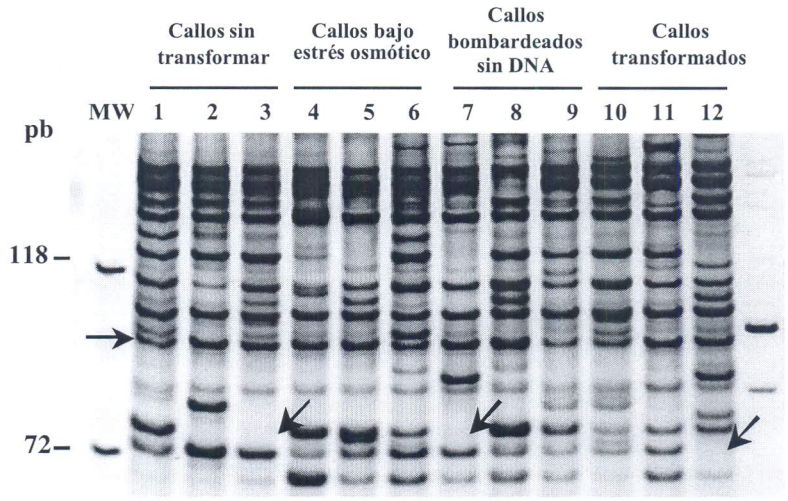


Figura 10. Perfil de bandeo que muestra bandas reprimidas (↙) o comunes a todas las muestras pero diferentes en intensidad (→) de callos evaluados en diferentes condiciones. La amplificación se hizo con *Eco*RI-AGG/*Mse*I-CTA.

Por ejemplo, los individuos 1 y 3 del tratamiento de callos sin transformar (N6) se agruparon con una similitud de 0.86, su compañero faltante el callo 2, se agrupó con ellos hasta una similitud de 0.81. Para los individuos transformados (C/R) el agrupamiento completo de los tres individuos ocurrió hasta 0.81, igual que en callos normales; los callos estresados tanto osmóticamente como por el bombardeo (Au) se agruparon con una similitud de 0.77 y de ellos el individuo 3 fue igual al individuo 1 de los callos transformados con C1/R; por último, los callos sometidos sólo a estrés osmótico (osm) presentaron la mayor variabilidad, ya que el agrupamiento de los tres individuos se dió con un coeficiente de similitud de 0.72.

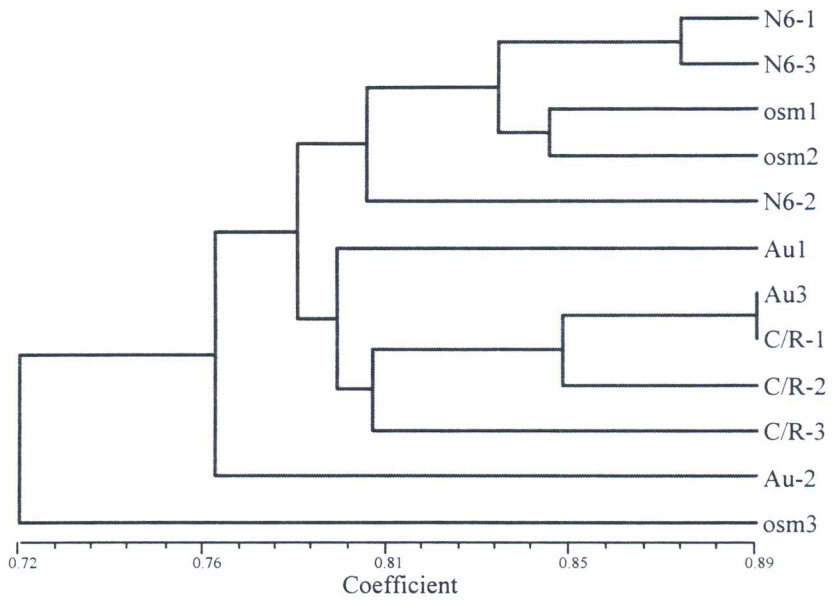


Figura 11. Dendograma en base al coeficiente de similitud de Jaccard de 4272 marcadores cDNA-AFLP generados con 12 combinaciones de iniciadores en callos de maíz A188 sin transformar (N6), estresados osmóticamente (osm), bombardeados sin plásmido (Au) y transformados con *C1* y *R* (C/R). Las repeticiones de cada tratamiento son indicadas con los números 1, 2 y 3. Se utilizó la técnica de agrupamientos UPGMA.

Finalmente, estos resultados fueron reforzados por el AMOVA, donde se encontró que para este experimento sí hubo diferencias significativas (P=0.05) para los efectos de los tratamientos, sin embargo, la varianza explicada dentro de tratamientos (92.3 %) fue aún más alta que la generada entre ellos (7.7 %); por lo tanto, se confirmó nuevamente que el peso de la expresión de los individuos dentro de cada tratamiento fue superior que los efectos generados por los tratamientos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis molecular de varianza de 4272 marcadores cDNA-AFLP obtenidos de callos de maíz A188 sin transformar, bajo estrés osmótico, bombardeados sin plásmido y transformados con *C1* y *R*.

Fuente de variación	g. l[†].	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre tratamientos	3	66.417	1.54630	7.71
Dentro tratamientos	8	148.00	18.500	92.29
Total	11	217.417	20.046	
Valor de F:	0.07714 *			

El análisis estadístico se efectuó de acuerdo con Excoffier *et al.*, 1992.

[†] Grados de libertad.

V. DISCUSIÓN

5.1. La embriogénesis y la organogénesis fueron procesos simultáneos favorecidos por el Dicamba y una probable causa de la variabilidad de expresión en los callos

En este trabajo se evaluó la factibilidad de desarrollar un sistema de monitoreo de genes en callos de maíz mediante la búsqueda de genes regulados por los factores de transcripción *C1* y *R*. Teóricamente, los callos de maíz representarían ventajas asociadas a su origen único y morfología homogénea. Sin embargo, los perfiles de bandeo de los callos sin transformar (Figuras 8 y 10) llevaron a concluir que esto no es así. Los callos de maíz presentaron una gran variación de expresión cuya precisa causalidad no se determinó, pero una de las posibles fuentes pudo haber llegado de la promoción de procesos morfogénicos que el Dicamba indujo en los callos. No obstante que el consenso de la literatura señala al 2,4-D como la hormona comúnmente empleada para la inducción de callos (Armstrong y Green, 1985; Vasil *et al.*, 1985; Vain *et al.*, 1993; Armstrong, 1994; Kemper *et al.*, 1996, Brettschneider *et al.*,1997; Ishida *et al.*, 2003), la decisión de usar Dicamba se basó en el hecho de que esta hormona manifiesta una capacidad superior para inducir callo respecto al 2,4-D (Close y Ludeman, 1987). Por lo tanto, la idea de tener suficiente tejido en un periodo corto de cultivo que soslayara en lo mínimo la variación somaclonal, resultaba atractiva. En este sentido, la formación de callo inducida por el Dicamba coincidió tanto en sitio de inicio como en secuencia de desarrollo con los reportes que sobre el tema existen (Vasil *et al*, 1985; He *et al.,* 1990; Fransz y Schel, 1991; Bohorova *et al.,* 1995).

Las implicaciones de usar Dicamba, se reflejaron en una rápida multiplicación de los callos, pero también en una cíclica y periódica diferenciación tisular, fácilmente visible al final de cada subcultivo. Estos resultados llevaron a clasificar los callos de este trabajo como mixtos, es decir entre tipo I y tipo II, lo cual difiere de la clasificación de Armstrong (1994), quien señala a A188 como línea modelo para la generación de callos tipo II. Por otro lado, estos resultados coinciden parcialmente con los de Ishida y colaboradores (2003), quienes reportaron la formación de callos tipo I en embriones inmaduros de A188 estimulados con 2,4-D.

Las observaciones anteriores determinaron que se realizaran subcultivos cortos y frecuentes para sostener el estado embriogénico de los callos. Una rutina que en realidad es una regla que impide la maduración de los embrioides y mantiene los cultivos jóvenes (Sellmer *et al.*, 1994). Sin embargo, la condición juvenil y embriogénica de los callos no garantizó tener estructuras crípticas en proceso de organogénesis al momento del bombardeo. No obstante, los callos que se transformaron con *C1* y *R* siempre se apreciaron juveniles, una condición reportada como favorable para la transformación (Armaleo *et al.*, 1990; Iida *et al.*, 1991; Fromm, 1994).

Como el crecimiento y la diferenciación es simultáneo con el uso de Dicamba, es probable que la dualidad de procesos morfogénicos que esta hormona promueve, sea un motivo de la variabilidad en la expresión de los callos. Aún así, un estado poco diferenciado como el que el 2,4-D estimula en maíz A188 (Armstrong, 1994) o en trigo (Wernicke *et al.*, 1986), tampoco puede ser garantía de una expresión homogénea.

Ambas hormonas pueden promover la embriogénesis *de novo*, pero su efecto sobre el crecimiento es distinto. El 2,4-D afecta el crecimiento del eje embrionario, quizás por ello es posible apreciar embrioides con una región apical y suspensor, así como un retraso en la diferenciación (Fransz y Schel, 1991). Al respecto, algunos autores prefieren el estado desdiferenciado para transformar, porque de alguna forma se evita la aparición de quimeras. Sin embargo, se ha demostrado que sostener un estado desdiferenciado puede conllevar una fuerte mutagénesis (Armstrong y Phillips, 1988; Buiatti y Bogani, 1999; Sala *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999; Landi *et al.*, 2002) que puede cambiar la expresión génica de los organismos. El Dicamba, en cambio, no parece afectar el crecimiento del eje embrionario, pero su permisión para que ocurra la regeneración en algunos embrioides al mismo tiempo que algunas células inician la embriogénesis, también pudo haber influido en la variabilidad de la expresión y quizás también para no detectar embrioides plenamente formados. Se sugiere, por lo tanto, que esta mezcla de procesos resultó inconveniente para el objetivo de este trabajo por una teórica activación simultánea de genes asociados a embriogénesis y organogénesis.

5.2. Un largo pretratamiento osmótico en callos jóvenes favoreció la transformación con biobalística y quizás alteró su expresión génica

El tratamiento con mejores resultados para expresar transitoriamente *C1* y *R* fue aquel que se hizo con callos jóvenes estresados osmóticamente 16 horas antes del bombardeo (Cuadro 4, sección de Resultados). Estas dos condiciones, edad de los callos y período

largo de estrés osmótico, son consideradas importantes para la transformación (Fromm, 1994; Vain *et al.*, 1993) y posiblemente también fuente de variabilidad en la expresión. Al respecto, cada cambio a medio de cultivo fresco favorece la renovación de los callos. Las células jóvenes que se generan, tienen más citoplasma (Fransz *et al.*, 1991) respecto a las células viejas que son altamente vacuoladas. La acumulación de antocianinas se da en estos organelos (Holton y Cornish, 1995; Mol *et al.*, 1998), lo cual indicaría que si las células viejas resultan transformadas, acumularían más pigmento que las células jóvenes. Este razonamiento es antagónico con los resultados de este trabajo (Cuadro 4), los cuales señalaron que los callos con menos días de subcultivo consiguieron más células expresando *C1* y *R*. Incluso las regiones que al microscopio se apreciaron como las más jóvenes fue donde la expresión se concentró (Figura 5b). Una explicación a este efecto implicaría que las células jóvenes de alguna forma desarrollaron más vacuolas o incrementaron la superficie de la membrana de las ya existentes.

En relación al efecto del estrés osmótico sobre la expresión transitoria, varios investigadores han documentado que el tiempo que un tejido se encuentre en un medio osmótico influye negativamente en la turgencia celular (Salisbury y Ross, 1994), una condición que favorece la penetración de las partículas, porque las células no se rompen con el impacto de ellas (Vain *et al.*, 1993; Kemper *et al.*, 1996). En este sentido, los resultados de este trabajo indicaron que un período de 16 horas en medio con maltosa 0.33 M predispuso mejor las células a la transformación que un período de 4 horas. Este periodo de tiempo es señalado por algunos autores como el idóneo para la transformación en protoplastos (Vain *et al.*, 1993) y escutelos de maíz precultivados

varios días antes del bombardeo (Kemper *et al.*, 1996; Brettschneider *et al.*,1997), así como en ascomicetos como *Saccharomyces cerevisiae* (Armaleo *et al.*, 1990). Si un período de 4 horas ha sido reportado como el que brindó la mayor transformación en estructuras pequeñas como células, protoplastos y escutelos, no fue incongruente la suposición de que un período más prolongado tuviera un mejor efecto en callos de maíz. Como contraparte, la expresión de los callos registró su mayor variabilidad con este tratamiento como se muestra en el Figura 11. Una respuesta a ello no fue posible formularla debido a que la variabilidad pudo haber llegado de la modulación de genes responsables de la tolerancia al estrés osmótico, a la embriogénesis, organogénesis o a los cambios géneticos asociados al cultivo *in vitro*.

5.3. Los callos fueron virtualmente clones y no presentaron una expresión molecular homogénea

Los callos que se emplearon en este trabajo provinieron de embriones inmaduros obtenidos de la misma mazorca polinizada sólo una vez. Cada embrión inmaduro originó un callo. Teóricamente cada callo fue un clon. Al igual en otros sistemas de cultivo, los callos manifiestan altas tasas de crecimiento que en cada subcultivo se reflejan en aumento del tejido (Chawla, 2002). Estas dos características, es decir, uniformidad genética y alta replicación continua, calificaría los callos de maíz como un sistema conveniente para el desarrollo de ensayos de monitoreo génico. Por un lado, se tendría al alcance una fuente relativamente inagotable de material y por el otro, podrían

visualizarse diferencias asociadas con la sobreexpresión de algún gen regulatorio. Omitiendo la ventaja de tener callo suficiente para la experimentación, en este trabajo el panorama de monitoreo génico no dió resultados positivos debido a que los perfiles de bandeo fueron muy variados. Este resultado podría interpretarse de dos formas; por una parte, podría ser que los callos fueron clones que difirieron en su expresión, o bien, fueron callos cuya heterogeneidad en la expresión fue producto de cambios en la secuencia de su ácido nucleico originada por el cultivo *in vitro*.

Esta interpretación provino del análisis de los cDNA-AFLP, que reveló que aún cuando cada réplica de callo provino del mismo embrión, el polimorfismo que presentaron fue extraordinariamente envidiable para quien busca variabilidad molecular. Dicho polimorfismo podría tener origen en diferencias en el desarrollo de las estructuras que componen el callo (Vasil *et al.*, 1985; Fransz y Schel, 1991) y en la variación somaclonal asociada con el cultivo *in vitro* (Armstrong y Phillips, 1988; Buiatti y Bogani, 1999; Sala *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999). Si se adicionan otros factores como concentración de auxina, estrés osmótico, bombardeo o integración de un gen regulatorio, el panorama de la expresión molecular puede tornarse complicado.

En este sentido, los resultados demostraron que aunque los callos de maíz A188 parezcan morfológicamente homogéneos, realmente no lo son. El agrupamiento de casi 6000 marcadores cDNA-AFLP confirmó que a nivel de expresión, los callos de maíz A188 no fueron clones. Si asi fuera, se esperaría que al menos los callos sin transformar se hubieran agrupado con coeficientes altos de similitud, lo que traducido en perfiles de

bandeo reflejara monotonía. Por otra parte, aunque se emplearon callos con diferente tiempo en cultivo (3 meses para el experimento A y 7 meses para el experimento B), no existen datos en la literatura que señalen el momento en que inicia la variación somaclonal. Se sabe que este fenómeno es dependiente del tiempo y que la acumulación de los cambios genómicos (amplificación del DNA, deleciones, rearreglos, metilación) incrementa con el tiempo bajo cultivo (Zhang *et al.*, 1999). Las Figuras 8 y 10, de la sección de Resultados, presentan secciones de luminogramas donde se aprecian bandas activadas, reprimidas o que difieron en intensidad. Es probable que este perfil de expresión halla obedecido a alteraciones genómicas que determinaron cambios metabólicos y cambios fenotípicos, ocultos o visibles, que en última instancia llegaron de cambios en la transcripción de los genes. Estos cambios fueron diferentes entre un callo y otro aún dentro del mismo tratamiento (93 % de variación para los callos del experimento A y 100 % de variación para los callos del experimento B), una respuesta que es semejante al reporte de Sala y colaboradores (1999) sobre variación somaclonal realizados con DNA genómico de diferentes plantas transgénicas empleando diferentes técnicas para el análisis de genomas como RFLP, RAPD; AFLP, RAMP y SSR, en este reporte la variación se comparó mediante un IP (índice de polimorfismo calculado como el porcentaje de secuencias polimórficas de DNA) que osciló de 0.9 a 80. En el presente trabajo, la comparación se hizo a través del IP y de AMOVAS y en cada una de ellas, el consenso fue el mismo: cada callo difirió en su expresión independientemente del tratamiento al que fue sometido.

VI. CONCLUSIONES

La factibilidad de buscar genes regulados por los factores de transcripción *C1* y *R*, usando un sistema basado en callos de maíz, presentó limitaciones asociadas con la variabilidad en la expresión génica de los callos. Se sugiere que la variabilidad de la expresión en los callos de maíz, llegó de factores asociados a la morfogénesis *per se* del callo y a cambios genéticos relacionados con el cultivo *in vitro*.

VII. LITERATURA CITADA

Abbe, E. C., and O. L. Stein. 1954. The growth of the shoot apex in maize: embriogeny. American Journal of Botany 41(4): 285-293.

Armaleo, D., G.-N. Ye, T. M. Klein, K. B. Shark, and J. C. Sanford. 1990. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. Current Genetics 17: 97-103.

Armstrong, C. L. 1994. Regeneration of plants from somatic cell cultures: applications for in vitro genetic manipulation. *In*: The Maize Handbook. Freeling M., and Walbot V. (eds.). Springer-Verlag, New York. pp: 663-671.

Armstrong, C. L., and C. E. Green. 1985. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. Planta 164: 207-214.

Armstrong, C. L., and R. L. Phillips. 1988. Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable, embryogenic tissue cultures of maize. Crop Science 28: 363-369.

Bachem, C. W., R. S. van der Hoeven, S. M. de Bruijn, D. Vreugdenhil, M. Zabeau, and R. G. Visser. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP, analysis of gene expression during potato tuber development. Plant Journal 9: 745-753.

Bohorova, N. E., B. Luna, R. M. Brito, L. D. Huerta, and D. A. Hoisington. 1995. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude, and highland maize inbreds. Maydica 40: 275-281.

Bohorova, N., S. Fennell, S. McLean, A. Pellegrineschi, and D. Hoisington. 1999a. Laboratory protocols. CIMMYT Applied Genetic Engineering Laboratory. México, D. F. 142 p.

Bohorova, N., W Zhang, P. Julstrum, S. McLean, B. Luna, R. M. Brito, L. Díaz, M. E. Ramos, P. Estanol, M. Pacheco, M. Salgado, and D. Hoisington. 1999b. Production of transgenic tropical maize with *cry1Ab* and *cry1Ac* genes via microprojectile bombardment of immature embryos. Theorical and Applied Genetics 99: 437-444.

Brettschneider, R., D. Becker, and H. Lörz. 1997. Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. Theorical and Applied Genetics 94: 737-748.

Buiatti, M., and P. Bogani. 1999. Exploiting genome plasticity for the detection of hypervariable sequences. *In*: Molecular Tools for Screening Biodiversity. A. Karp, P. G. Isaac, and D. S. Ingram (eds.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 471-484.

Cárdenas L. M. A., y A. M. Villegas. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. Revista Fitotecnia Mexicana 25(2): 213-217.

Chawla, H. S. 2002. Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers, Inc. Enfield, New Hampshire, USA. pp. 3-27.

Chu, C. C., C. C. Wang, C. S. Sun, C. Hsu, K. C. Yin., C. Y. Chu, and F. Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Scientia Sinica 18: 659:668.

Clarke, G. M. 1984. Statistic and Experimental Design. Second Edition. Edward Arnold Publishers. London, Great Britain. 188 p.

Close, K. R., Ludeman L. A. 1987. The effect of auxin-like plant growth regulators and osmotic regulation on induction of somatic embryogenesis from elite maize inbreds. Plant Science 52: 81-89.

Conger, B., V. Novak, F. J., Afza, R., Erdelsky, K. 1987. Somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Zea mays*. Plant Cell Report 6: 345-347.

Don, R. H., P. T. Cox, B. J. Mainwright, K. Baker, and J. S. Mattick. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Research 19(14): 4008.

Excoffier, L., P. Smouse, and J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred for metric distances among DNA haplotypes: application to human mithocondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491.

Fransz, P.F., and J. H. N. Schel. 1991. An ultraestructural study on the early development of *Zea mays* somatic embryos. Canadian Journal of Botany 69: 858-865.

Fromm, M., L. P. Taylor, and V. Walbot. 1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. Nature 39: 791-793.

Fromm, M. 1994. Production of transgenic maize plants via microprojectile-mediated gene transfer. *In*: The Maize Handbook. Freeling M., and Walbot V. (eds.). Springer-Verlag, New York. pp: 667-684.

Goff, S. A., T. M. Klein, B. A. Roth, M. E. Fromm, K. C., Cone, J. P. Radicella, and V. L. Chandler. 1990. Transactivation of anthocyanin biosynthetic genes following transfer of *B* regulatory genes into maize tissues. The EMBO Journal 9(8): 2517-2522.

Goldberg, D. A. 1980. Isolation and partial characterization of the *Drosophila alcohol dehydrogenase* gene. Proceedings of National Academic of Sciences USA 77(10): 5794-5798.

He, D. G., M. Yang, J. Bertram, and K. J. Scott. 1990. The histological development of the regenerative tissue derived from cultured immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Science 68: 103-111.

Hoisington, D., M. Khairallah, and D. González-de-León. 2001. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. México, D. F. CIMMYT. (Draft of third edition).

Holton, T. A., and E. C. Cornish. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. The Plant Cell 7: 1071-1083.

Iida, A., T. Yamashita, Y. Yamada, and H. Morikawa. 1991. Efficiency of particle bombardment-mediated transformation is influenced by cell cycle stage in synchronized cultured cell of tobacco. Plant Physiology 97: 1585-1587.

Ishida, Y., H. Saito, Y. Hiei, and T. Komaru. 2003. Improved protocol for transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefasciens*. Plant Biotechnology 20(1): 57-66.

Kemper, E. L., M. J. da Silva, and P.Arruda. 1996. Effect of microprojectile bombardment parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed cultured immature maize (*Zea mays* L) embryos. Plant Science 121: 85-93.

Kiesselbach, T. A. 1980. The Structure and Reproduction of Corn. Reprint of First Edition. University of Nebraska. Research Bulletin no. 161 of Agricultural Experiment Station. 96 p.

Klein, T. M., M. Fromm, A. Weissinger, D. Tomes, S. Schaaf, M. Sletten, and J. C. Sanford. 1988. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. Proceedings of National American Science USA 85: 4305-4309.

Landi, P., L. Chiappetta, S. Salvi, E. Frascaroli, C. Luchesse, and R. Tuberosa. 2002. Responses and allelic frequency changes associated with recurrent selection for plant regeneration from callus cultures in maize. Maydica 47(1): 21-32.

Lehrach, H., D. Diamond, J. M. Wozney, and H. Boedtker. 1977. RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. Biochemistry 16: 4743-4751.

Liang, P., and A. B. Pardee. 1992. Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257: 967-971.

Ludwig, S. R., B. Bowen, L. Beach., and S. R. Wessler. 1990. A regulatory gene as a novel visible marker for maize transformation. Science 247: 449-450.

Madhury, G., and A. R. Reddy. 1999. Plant Biotechnology of flavonoids. Plant Biotechnology 16(3): 179-199.

Mol, J. E., E. Grotewold, and R. Koes. 1998. How genes paint flowers and seeds. Trends in Plant Science 3(6): 212-217.

Money, T., S. Reader, L. J. Qu, R. P. Dunford, and G. Moore. 1996. AFLP-based mRNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 24(13): 2616-2617.

Paz-Ares, J., D. Ghosal, U. Wienan, P. A. Peterson, and H. Saedler. 1987. The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to *myb* proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. The EMBO Journal 6: 3553-3558.

Purugganan, V. A., and S. R. Wessler. 1994. Molecular evolution of the plant R regulatory gene family. Genetics 138: 849-854.

Rausher, M. D., R. E. Miller, and P. Tiffin. 1999. Patterns of evolutionary rate evolution among genes of the anthocyanin biosynthetic pathway. Molecular Biology and Evolution 16: 266-274.

Rhodes, C. A., D. A. Pierce, I. J. Mettler, D. Mascarenhas, J. J. Detmer. 1988. Genetically transformed maize plants from protoplats. Science 240: 204-207.

Rohlf, F. J. 1997. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter, New York. 140 p.

Sala, F., A. Arencibia, S. Castiglione, P.Christou, Y. Zheng, and Y. Han. 1999. Molecular and field analysis of somaclonal variation in transgenic plants. *In*: Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century. A. Altman (ed.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 259-262.

Salisbury, F. B., and Ross, C. W. 2002. Fisiología Vegetal. Cuarta Edición. Traducido por: V. González Velázquez. Grupo Editotial Iberoamericana, S. A. de C. V. México, pp. 29-100.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Book 1. Second Edition. Cold Spring Harbor Press, New York.

Selinger, D. A., and V. L. Chandler. 1999. A mutation in the *pale aleurone color1* gene identifies a novel regulator of the maize anthocyanin pathway. The Plant Cell 11: 5-14.

Sellmer, J. C., S. W. Ritchie, I. S. Kim, and T. K. Hodges. 1994. Initiation, maintenance, and plant regeneration of type II callus and suspension cells. *In*: The

Maize Handbook. Freeling M., and Walbot V. (eds.). Springer-Verlag, New York. pp. 671-677.

Shark, K. B., F. D. Smith, and P. R. Harpending. 1991. Biolistic transformation of a procaryote, *Bacillus megaterium*. Applied Enviroment of Microbiology 57: 480-485.

Sheiness, D., and D. Sullivan. 1986. Staining of RNA in formaldehyde gels. Focus 8(4): 11.

Singh, K. B. 1998. Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. Plant Physiology 118: 1111-1120.

Sripaoraya, S., R. Marchant, J. B. Power, and M. R. Davey. 2002. Herbicide-tolerant transgenic pinneapple (*Ananas comosus*) produced by microprojectile bombardment. Annals of Botany 88: 597-603.

Vain, P., M. D. McMullen, and J. J. Finer. 1993. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. Plant Cell Report 12: 84-88.

Vasil, V., C.-Y. Lu, and I. K. Vasil. 1985. Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.). Protoplasma 127: 1-8.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J, Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23(21): 4407-4414.

Wan, Y., J. M. Widholm, and P. G. Lemaux. 1995. Type I callus as a bombardment target for generating fertile transgenic maize (Zea mays L). Planta 196: 7-14.

Wang, A. 1987. Callus and plant regeneration from maize mature embryos. Plant Cell Report 6: 360-362.

Wernicke, W., I. Potrikus, and E. Thomas. 1982. Morphogenesis from cultured leaf tissue tissue of *Sorghum bicolor*–the morphogenetic pathways. Protoplasma 111: 53-62.

Wernicke, W., J. Gorst, and L. Milkovits. 1986. The ambiguous role of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid in wheat tissue culture. Physiologia Plantarum 68: 597-602.

Zhang, S., S. Zhang, M.-J. Cho, P. Bregitzer, and P. G. Lemaux. 1999. Comparative analysis of genomic DNA methylation status and field performance of plants derived from embryogenic calli and shoot meristematic cultures. *In*: Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century. A. Altman (ed.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 263-267.

Zhong, H., C. Srinivasan, and M. B. Sticklen. 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.