



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**CULTIVO *in vitro* MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA
Y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE MAÍZ (*Zea mays* L.)
CON GENES DE BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA

ESBEYDI MARTÍNEZ CRUZ



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Chapingo, Texcoco, Estado de México, 30 de Junio de 2014



**CULTIVO *in vitro* MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA
Y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE MAÍZ (*Zea mays* L.)
CON GENES DE BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA**

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

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:




Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESOR:



Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR:



Dr. José de Jesús López Reynoso

ASESOR:



Dr. Víctor Conde Martínez

**CULTIVO *in vitro* MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA
Y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE MAÍZ (*Zea mays* L.)
CON GENES DE BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA**

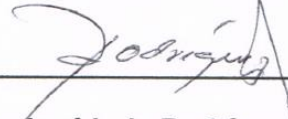
Jurado que revisó y aprobó el examen de grado de Esbeydi Martínez Cruz,
autor de la presente tesis de Doctor en Ciencias en Horticultura estuvo
constituido por:

DIRECTOR:



Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESOR:



Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR:



Dr. José de Jesús López Reynoso

ASESOR:



Dr. Víctor Conde Martínez

LECTOR EXTERNO



Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente

DEDICATORIA

Dedicada a mi esposo y a mi hijo por su paciencia, amor, estímulo y por su incansable apoyo durante la realización de mis estudios.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo por haber permitido que llevara a cabo mis estudios de posgrado y la realización de ésta investigación. Al posgrado en Horticultura por haberme aceptado como su alumna y por brindar las herramientas necesarias a todos sus alumnos para cumplir sus objetivos.

Quiero agradecer muy especialmente al Dr. Oscar Mascorro Gallardo por su dirección en la realización de ésta investigación pero sobre todo por brindarme sus conocimientos y gran experiencia científica. También les doy mis más sinceros agradecimientos al Dr. José Luis Rodríguez de la O, al Dr, Jesús López Reynoso y al Dr. Víctor Conde Martínez por haber aceptado formar parte de mi comité asesor y por su disponibilidad y valiosos consejos dados para mejorar la investigación. Al Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente, por haber fungido como lector externo y al Dr. Ramón Suárez Rodríguez, por su colaboración en la escritura del artículo.

A CONACyT por la beca otorgada para llevar a cabo mis estudios de doctorado. Al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), por el financiamiento del proyecto 107PIC0312 para llevar a cabo esta investigación.

A mis compañeros en el laboratorio de biotecnología Antelmo, Eduardo, Cecilia, y Karina quienes con sugerencias y compañía engrandecieron éste trabajo. A mis amigos y compañeros de generación, en especial a Emigdio y José Luis por compartir sus experiencias, conocimientos y amistad.

A mi familia, mis padres, mi esposo, mi hijo y hermanas, por su infinito amor y apoyo en la realización de una más de mis metas.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de la presente tesis nació en Santa maría Asunción Tlaxiaco, Oaxaca, el 23 de abril de 1979. Cursó sus estudios de licenciatura en la Universidad Autónoma Chapingo durante los años 1999-2002, obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo, Especialista en Fitotecnia, en el año 2004. En el periodo de enero de 2005 a enero de 2006 trabajó en el municipio de San Pedro y San Pablo Teposcolula, Oaxaca, en la elaboración de proyectos productivos. Durante el periodo de 2007-2008 cursó la Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo. Del año 2010 al año 2014, cursó los créditos del Doctorado en Ciencias en Horticultura, en la Universidad Autónoma Chapingo.

CULTIVO *in vitro* MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE MAÍZ (*Zea mays* L.) CON GENES DE BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA

In vitro CULTURE BY SOMATIC EMBRIOGENESIS AND GENETIC TRANSFORMATION OF MAIZE (*Zea mays* L.) WITH TREHALOSE BIOSYNTHESIS GENES

Esbeydi Martínez Cruz¹, José Oscar Mascorro Gallardo¹, José Luis Rodríguez de la O¹, José de Jesús López Reynoso¹, Víctor Conde Martínez²

RESUMEN GENERAL

En México y en el mundo la sequía es el principal factor ambiental que genera enormes pérdidas en las cosechas. El principal objetivo de esta investigación fue obtener plantas transgénicas de maíz que acumulen trehalosa, con mayor tolerancia al estrés abiótico. Para lograr el objetivo, se utilizó la línea de maíz CML72, la cual había sido anteriormente probada para obtención de callo embriogénico a partir de embriones inmaduros. En primer lugar se evaluó la capacidad regenerativa de la línea CML72 utilizando como explantes no sólo embriones inmaduros sino también embriones maduros. Los resultados mostraron que puede inducirse callo embriogénico tipo I en ambos tipos de explantes de la línea CM72. En ambos casos el callo obtenido puede ser regenerado de manera exitosa hasta la obtención de plantas, sin embargo, las plantas obtenidas presentan algunas anomalías, entre las que se destacan aquellas que tienen que ver con la reproducción, como lo son la ausencia de inflorescencia masculina en su mayoría y en algunos casos femenina. En segundo lugar y para descartar que las variaciones somaclonales tuvieran un origen genético, se realizaron análisis con marcadores moleculares RAPDs los cuales no detectaron polimorfismos durante los nueve meses que duró el cultivo *in vitro*, esto fue confirmado al sembrar la generación T1 y observar que el fenotipo original fue recuperado. De lo anterior se concluye que tanto embriones inmaduros como embriones maduros son dos explantes aptos para generar callo embriogénico. A partir de estos resultados previamente descritos, se procedió a realizar la transformación genética de callo embriogénico generado de embriones maduros. Se utilizaron para la obtención de plantas transgénicas tanto bombardeo como agroinfección con dos genes quiméricos 35S::ScTPS1TPS2::NOS y Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS para biosíntesis de trehalosa en el vector *pGreen0229* ó *pTF101.1*. Se obtuvieron y analizaron 10 líneas transgénicas. Algunas de las líneas transgénicas mostraron mayor tolerancia a sequía. Por lo tanto la línea CML72 puede ser exitosamente utilizada en transformación genética con éste y otros genes de interés.

Palabras clave: Embriones inmaduros, embriones maduros, regeneración, ingeniería genética, sequía.

GENERAL ABSTRACT

In Mexico and worldwide, drought is the main environmental factor that produces huge losses in crops. The main goal of this investigation was to obtain transgenic plants of maize that accumulate trehalose, with increased tolerance to abiotic stress. To accomplish this goal, the inbred CML72 of maize was used, which has been previously tested for obtaining embryogenic callus from immature embryos was used. First, the regenerative capacity of inbred CML72, from both kind of explants, immature and mature embryos was evaluated. The results showed up that embryogenic callus type I can be induced from both explants. In both cases, the obtained callus was able to generate shoots and whole plants, although the plants showed some abnormalities, mainly related to reproductive organs, as was the lack of male inflorescence and in few cases the absence of female inflorescence also. Therefore, in second place and for discarding the possible genetic origin of this somaclonal variation, an analysis with RAPDs markers was performed and no polymorphisms were detected along the nine months of *in vitro* culture of calluses. This was also confirmed when T1 plants were grown up, recovering the normal phenotype of plants. Hence, it was concluded that both immature and mature embryos are good explants for generating embryogenic callus. From these previous results, we proceed to perform genetic transformation of embryogenic callus generated from mature embryos. Transgenic plants were generated by both methods, biolistic and agroinfection with two chimerical genes 35S::ScTPS1TPS2::NOS and Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS for trehalose biosynthesis inserted in either the vector *pGreen0229* or *pTF101.1*. Ten transgenic events were obtained and analyzed. Some of these transgenic lines showed up increased tolerance to drought. Therefore, the line CML72 can be used for genetic transformation with this and other genes of interest.

Key words: Immature embryos, mature embryos, regeneration, genetic engineering, drought.

¹Programa de Doctorado en Horticultura. Instituto de Horticultura y Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Edo. de México. CP 56230.

²Centro de Botánica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, Texcoco, Estado de México. C.P 56230.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	4
2. REVISION DE LITERATURA	8
2.1 Cultivo <i>in vitro</i> de maíz	8
2.1.1 Explantes	8
2.1.2 Medios de cultivo	10
2.1.3 Organogénesis	10
2.1.4 Embriogénesis somática	11
2.1.5 Tipo de callo generado	13
2.1.6 Regeneración y enraizamiento	14
2.2 Transformación genética	15
2.2.1 Método de biobalística	16
2.2.1.1 Genotipo y explantes.....	17
2.2.1.2 Medios de cultivo.....	17
2.2.1.3 Bombardeo.....	18
2.2.1.4 Selección.....	19
2.2.2 Método de agroinfección	20
2.2.2.1 Genotipo y explantes.....	21
2.2.2.2 Cepas de <i>Agrobacterium</i> y vectores	21
2.2.2.3 Inoculación y co-cultivo	22
2.2.2.4 Control de <i>Agrobacterium</i> y selección.....	23
3 ARTÍCULO 1	24
CULTIVO <i>IN VITRO</i> Y REGENERACIÓN DE MAÍZ A PARTIR DE EMBRIONES INMADUROS Y MADUROS	24
INTRODUCCIÓN	25
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Inducción de callo embriogénico	28
Regeneración, enraizamiento y crecimiento	30
Caracterización morfológica	32

Evaluación de la estabilidad genética mediante RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA).....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
Inducción de callo embriogénico de embrión maduro.....	33
Generación de callo.....	34
Regeneración	35
Variación morfológica	37
Evaluación de la estabilidad genética	38
CONCLUSIONES	39
AGRADECIMIENTOS	40
LITERATURA CITADA.....	40
4. ARTÍCULO 2	54
OBTENCIÓN DE MAÍZ TRANSGÉNICO QUE ACUMULA TREHALOSA CON MAYOR TOLERANCIA A LA SEQUÍA	54
INTRODUCCIÓN	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
Material Vegetal	59
Transformación.....	60
Agroinfección.....	60
Bombardeo.....	62
Ensayo de resistencia a PPT	63
Regeneración, aclimatación y crecimiento en invernadero.....	64
Extracción de ADN y análisis del transgen por PCR.....	66
Evaluación de tolerancia a sequía	67
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
Ensayos de expresión transitoria	68
Eficiencia de transformación en base a resistencia a PPT	70
Regeneración de posibles transformantes (T0) y crecimiento de la progenie (T1).....	72
Eficiencia de transformación en base a la detección del gen de interés	74
Evaluación de tolerancia sequía	78

CONCLUSIONES	80
AGRADECIMIENTOS	81
LITERATURA CITADA	81
5. DISCUSION GENERAL	98
6. CONCLUSIONES GENERALES	104
7. LITERATURA CITADA.....	105
8. ANEXOS.....	121

1. INTRODUCCIÓN

El maíz es uno de los principales cultivos en el mundo con una producción mundial de 872 millones de toneladas; los principales países productores son Estados Unidos, China, Brasil, la Unión Europea y Argentina, aunque se estima que se cultiva en unos 113 países (FAO, 2012).

El factor que siempre ha sido más limitante para la agricultura es la disponibilidad de agua. Los ambientes secos o zonas áridas cubren alrededor del 47% de la superficie de la tierra los cuales están distribuidos en todos los continentes. En México más del 50% del territorio nacional corresponde a zonas áridas y semiáridas. En nuestro país y en muchas partes del mundo, la mayor parte del maíz se cultiva en temporal.

En general, el maíz necesita por lo menos 500 a 700 mm de precipitación bien distribuida durante el ciclo de cultivo. Sin embargo, aun esa cantidad de lluvia no es suficiente si la humedad no puede ser almacenada en el suelo a causa de la poca profundidad de éste o del escurrimiento, o si la evapotranspiración es muy grande a causa de las temperaturas elevadas y la escasa humedad relativa. La sequía durante la etapa de establecimiento del cultivo puede matar las plantas jóvenes y reducir la densidad de población. El principal efecto de la sequía en el período vegetativo es reducir el crecimiento de las hojas, de tal modo que el cultivo intercepta menos radiación solar. Alrededor de la floración (desde unas dos semanas antes de la emisión de estigmas hasta dos semanas después de

ésta), el maíz es muy sensible al estrés hídrico, y el rendimiento de grano puede ser seriamente afectado si se produce sequía durante ese período. Durante el llenado de granos, el principal efecto de la sequía es reducir el tamaño de éstos (Lafitte, 1993).

Se han generado plantas transgénicas que exhiben una relativa tolerancia a sequía, salinidad, calor o frío. Algunos ejemplos de estos genes, son los involucrados en síntesis de osmoprotectantes, detoxificadores de radicales libres, proteínas LEAs, transportadores de iones, factores de transcripción como DREB1A, o cinasas involucradas en la transducción de señales, composición de la membrana, etc. (Bajaj *et al.*, 1999, Zhang *et al.*, 2000).

Dentro de los genes que se han sometido a un escrutinio más intenso para explorar su posible utilización en la generación de plantas transgénicas tolerantes a sequía, se encuentran los que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de osmolitos (Bajaj *et al.*, 1999). Existen tres grupos de osmolitos en plantas: aminoácidos como la prolina; azúcares y polioles como el manitol y la trehalosa y compuestos cuaternarios de amonio como la glicina betaína y el 3-dimetil sulfonio propanato. Ya que una respuesta común de los organismos a la sequía, a la salinidad, y al estrés por baja temperatura es la acumulación de las azúcares y de otros solutos compatibles. Estos compuestos sirven como osmoprotectores y, en algunos casos, estabilizan biomoléculas bajo condiciones de estrés (Nuccio *et al.*, 1999).

La trehalosa (α -D-glucopiranosil α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor de glucosa, el cual juega un importante papel fisiológico como un protector de estrés abiótico en un gran número de organismos incluyendo bacterias levaduras e invertebrados (Elbein *et al.*, 2003). Una de sus vías de síntesis es a partir de la unión de glucosa 6-fosfato y UDP-glucosa para formar trehalosa 6-fosfato, en una reacción catalizada por la trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS:E:C. 3.1.3.12) posteriormente, una trehalosa 6-fosfato fosfatasa (TPP; E:C:3.1.3.12) desfosforila al intermediario para convertirlo en trehalosa (Cabib y Leloir, 1958).

La trehalosa causa un efecto protector sobre las enzimas y membranas celulares, evitando su desnaturalización, durante la presencia de sequías extremas, adicionalmente, el intermediario trehalosa 6-fosfato y/o la trehalosa misma, inducen genes que contribuyen en la adaptación a diferentes tipos de estrés, tanto biótico como abiótico (Avonce *et al.*, 2004).

Anteriormente se consideraba que en el reino de las plantas, la mayoría de la especies no parecían acumular cantidades perceptibles de trehalosa, con la excepción notable de “la planta de la resurrección” (*Selaginella lepidophylla*) la cual es altamente tolerante a la desecación. Esto cambió a raíz del descubrimiento de genes homólogos para la biosíntesis de trehalosa en *Arabidopsis thaliana* (*AtTPS1*), y varias plantas como el arroz y la papa (Blazquez *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1998).

Miranda *et al.* (2007) construyeron la fusión traduccional quimérica trehalosa-6-fosfato sintasa /fosfatasa (TPS-TPP) con los genes de levadura y la sobreexpresaron en *Arabidopsis thaliana*, obteniendo líneas con un incremento significativo de tolerancia a sequía, heladas, salinidad y calor. Este gen puede ser usado en maíz y otros cultivos importantes para conferir dichas ventajas.

De acuerdo a estos antecedentes en la presente investigación nos planteamos los siguientes objetivos e hipótesis:

Objetivo general:

Obtener plantas transgénicas de maíz (*Zea mays*) que acumulen trehalosa, con mayor tolerancia a estrés abiótico.

Objetivos particulares:

1. Evaluar el comportamiento *in vitro* de la línea CML72 a partir de dos tipos de explantes; embriones inmaduros y embriones maduros.
2. Desarrollar un protocolo eficiente de cultivo *in vitro* y regeneración para maíz.
3. Obtener líneas transgénicas de maíz (T0) con la construcción bifuncional *ScTPS1-TPS2*.
4. Evaluar el comportamiento de las líneas transgénicas ante el estrés por sequía.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Cultivo *in vitro* de maíz

2.1.1 Explantes

El éxito del cultivo tejidos de maíz es altamente dependiente del tejido donador elegido para la iniciación del cultivo, así como del genotipo de las plantas y también de los estados fisiológicos y de desarrollo apropiados (Green, 1983), ya que de estos y de las condiciones de cultivo dependerá la regeneración, por lo general a través de embriogénesis somática. Ésta y algunos de los aspectos más relevantes del cultivo *in vitro* de maíz se resumen en el cuadro del anexo 1.

En las monocotiledóneas, los explantes que contienen células meristemáticas inmaduras, desarrollan callos que son competentes para expresar totipotencia. Los meristemas de brotes, bases de hojas jóvenes, inflorescencias inmaduras, embriones inmaduros, tejido nodal, anteras, embriones maduros y en raras ocasiones puntas de raíz producen callo regenerable en diferentes especies de cereales. Pero los embriones inmaduros son los más ampliamente usados en maíz (Bhaskaran y Smith, 1990). En general, para todas las especies de cereales el tejido escutelar de embriones inmaduros es un explante adecuado, del cual, pueden ser regeneradas plantas fértiles en altas frecuencias vía embriogénesis somática (Brettschneider, *et al.*, 1997). La característica primordial de los embriones inmaduros es que tengan el tamaño adecuado de 1.0 a 2.0 mm, lo

cual se logra a diferentes días después de la polinización dependiendo tanto del genotipo como de las condiciones ambientales.

Debido a los problemas metodológicos y logísticos que implica el uso de embriones inmaduros (tiempo de recolección, tamaño apropiado, polinizaciones artificiales, espacios de crecimiento adecuados) se optó por el uso de semillas maduras para producir los explantes que formarían el callo. Wang (1987) utilizó por primera vez embriones maduros de las líneas A632, B73 y Mo17, logrando la regeneración de las dos últimas. Posteriormente O'Connor-Sánchez *et al.* (2002) y Sairam *et al.* (2003) utilizaron ápices de los cuales se logró formar callo que pudo ser transformado y regenerado. Por otra parte, Huang y Wei (2004) utilizaron plúmulas y más recientemente Al-Abed *et al.* (2006) y Abebe *et al.* (2008) se basaron en la técnica *split seed* en semillas maduras, con la cual quedan expuestas tres distintas regiones capaces de regenerar: el escutelum, el anillo coleopitar y el meristemo apical. Sidorov *et al.* (2006) utilizó secciones nodales de plántulas, con lo cual generó callo tipo I que a su vez podía ser convertido a callo tipo II. Jia *et al.* (2008), utilizaron embriones completos y obtuvieron callo embriogénico. Y Krishna *et al.*, (2013) quienes, al utilizar secciones nodales pudieron inducir callo embriogénico y callo organogénico. Determinaron que hay tres vías distintas de diferenciación: formación de callo, embriogénesis somática u organogénesis directa; dependiendo de la composición del medio y de la región específica del embrión.

2.1.2 Medios de cultivo

El tipo y composición del medio de cultivo influye fuertemente en el crecimiento y morfogénesis del cultivo de tejidos. En el cultivo de tejidos de maíz las condiciones han sido mejoradas usando principalmente como medio de cultivo el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) y el N6 (Chu *et al.*, 1975) y en menor proporción el medio LS (Linsmaier y Skoog, 1965) en combinación con auxinas promotoras de embriogénesis somática como el 2,4- ácido diclorofenoxiacético (2,4- D), dicamba (2-metoxi-3,6-ácido diclorobenzoico), 4-ácido diclorofenoxiacético (CPA) y 4- amino-3,5,6-ácido tricloro-picolínico (Picloram). Además se han incorporado al medio de cultivo citokininas como bencil amino purina (BAP) y la kinetina (KIN). Además, algunos aditivos como el nitrato de plata (AgNO_3), prolina (Armstrong y Green, 1984) y adenina (Muoma *et al.*, 2008) han ayudado a mejorar la tasa de producción de callo tipo II. Más recientemente Joshi *et al.* (2010) observaron que la adición de poliaminas y AG_3 (Ácido giberélico) incrementa la inducción de callo embriogénico.

2.1.3 Organogénesis

La organogénesis es un proceso que implica rediferenciación de células meristemáticas presentes en callos a brotes. Estos brotes son estructuras monopolares las cuales a su vez dan lugar a primordios de hojas y meristemos. Zhong *et al.* (1992) demostraron que los meristemos de maíz obtenidos de semillas maduras son morfológicamente flexibles y pueden ser manipulados para

producir múltiples brotes y embriones somáticos en maneras relativamente independientes del genotipo por simple variación de las condiciones de cultivo *in vitro*.

O'Connor-Sánchez *et al.* (2002), modificaron el protocolo de Zhong *et al.* (1992) y encontraron que, bajo condiciones de luz primero obtuvieron callos organogénicos; subsecuentemente, en oscuridad, algunas regiones de los callos generaron estructuras parecidas a las embriogénicas; las cuales cambiándolas a la luz produjeron callo organogénico. Con esto probaron que la interconversión de callo organogénico a callo embriogénico es posible en maíz. Además de que los callos obtenidos mostraron una alta capacidad de regenerar plantas. Muoma *et al.* (2008), reportaron regeneración por organogénesis directa de dos variedades de polinización abierta (KAT y DLC1), un híbrido (DH01) y una línea (TL08) usando brotes de ápices como explantes. El número de brotes dependió del genotipo. Krishna *et al.* (2013) obtuvieron tanto callo embriogénico como callo organogénico a partir de secciones nodales de embriones maduros del cultivar hindú de maíz tropical HQPM-1.

2.1.4 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática se define como el proceso dónde los cultivos de callos, suspensión o protoplastos desarrollan embriones completos, similares a los embriones cigóticos producidos en las semillas (Green, 1983). El embrión somático es una estructura bipolar independiente y no está morfológicamente

unida al tejido original. Dichos embriones posteriormente desarrollan raíces, ápice y sus órganos cotiledonares, por lo que son capaces de germinar en plántulas de la misma manera como sucede con los embriones cigóticos (Ammirato, 1983).

Cuando los embriones inmaduros son colocados en el medio de cultivo, las células del escutelum se vuelven activas, el número de organelos incrementa y la morfología vacuolar y nucleolar cambia. Esta reacción es llamada respuesta de shock. Una segunda respuesta es la inducción de callo, llamada respuesta de crecimiento y depende de la presencia de reguladores de crecimiento y es caracterizada por actividad mitótica en las células que son sensitivas a estos. En el escutelum se da la aparición de una amplia zona meristemática escutelar y se observa una segunda región meristemática alrededor de la coleorriza (Bronsema *et al.*, 1997).

Las técnicas de embriogénesis somática fueron originalmente desarrolladas para satisfacer dos metas principales: la micropropagación masiva y el desarrollo de herramientas celulares para el mejoramiento genético (por ejemplo semillas sintéticas y transformación genética). Estas técnicas se apoyan en el uso de auxinas sintéticas para inducir la des-diferenciación de los tejidos y la formación de callo embriogénico (Strosse *et al.*, 2003).

2.1.5 Tipo de callo generado

Armstrong y Green (1984) y Armstrong y Phillips (1988) propusieron que al menos dos tipos diferentes de callo en el cultivo de tejido de maíz regenerable puede ser iniciado al cultivar *in vitro* al maíz a partir de embriones inmaduros.

Callo Tipo-I (organogénico/embriogénico) es caracterizado por un alto grado de asociación celular y diferenciación, es decir callo compacto y organizado. Aunque embriones somáticos bien desarrollados son ocasionalmente observados en callos Tipo-I, el modo de origen de regenerar brotes no es obvio, ya que observaciones histológicas a este tipo de cultivo generaron evidencia que la regeneración de plantas puede ocurrir tanto por organogénesis como por embriogénesis somática Armstrong y Green (1984) y Armstrong y Phillips (1988). Hasta la fecha en la mayoría de los protocolos de transformación las plantas regeneradas son obtenidas de éste tipo de callo.

Callo Tipo-II (friable/embriogénico) es disgregable e indiferenciado, excepto por la presencia de numerosos embriones somáticos en estado globular. Observaciones histológicas de callos de maíz Tipo-II han mostrado que la regeneración de plantas ocurre por medio de embriogénesis somática (Armstrong y Green, 1984; Armstrong y Phillips, 1988).

La regeneración de plantas de callo embriogénico Tipo- II derivado de embriones inmaduros ha sido el sistema más utilizado y reproducible de regeneración y/o transformación para maíz (O'Connor-Sánchez *et al.*, 2002).

2.1.6 Regeneración y enraizamiento

Para expresar la totipotencia después de la des-diferenciación, la célula tiene que ser sometida a una re-diferenciación o regeneración la cual es la habilidad de diferenciar una célula para formar una planta u órganos de plantas. Esto puede ocurrir ya sea por organogénesis o por embriogénesis.

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

La regeneración se hace principalmente en medio de cultivo a base de sales MS aunque y en menor proporción en sales N6, con hormonas como 2,4- D, ácido abcísico (ABA), bencil amino purina (BAP), ácido indol acético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), kinetina (KIN) y zeatina (ZEA). Principalmente se busca la dosis adecuada de uno o hasta tres componentes, con la cual se logre la mayor frecuencia de obtención de brotes y plántulas enraizadas.

2.2 Transformación genética

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

Según el Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas ISAAA (International Service for the Acquisition of Agrobiotech Applications, por sus siglas en inglés) en su resumen ejecutivo del 2013, en ese mismo año 18 millones de agricultores en 27 países habían plantado cultivos transgénicos. Los cultivos transgénicos a nivel global han aumentado de 1,7 millones de hectáreas en 1996 a más de 175 millones de hectáreas en el 2013. Y de 1996 a 2011, los cultivos transgénicos habían contribuido a la seguridad alimentaria, sostenibilidad y cambio climático al incrementar la producción de cultivos transgénicos, valorados en US \$ 98,200 millones; lo cual se estima ha permitido reducir el uso de 473 millones de kilos de principios activos de pesticidas (Clive, 2013).

El maíz ha sido transformado principalmente por dos métodos, biobalística y/o agroinfección, por lo cual enfocamos nuestra atención en estas dos tecnologías.

2.2.1 Método de biobalística

La biobalística (balística biológica) consiste en la introducción directa por métodos físicos de ácidos nucleicos a células vegetales. El método físico por el cual se introduce el ADN consiste en el bombardeo de tejidos con micropartículas cubiertas con el ADN o con cualquier otra biomolécula que se pretenda introducir a las células vegetales (Herrera y Martínez, 2007). Los primeros casos exitosos de producción de plantas transgénicas de maíz fueron logrados por éste método a finales de los 80s, cuando se desarrolló como una alternativa para transformar gramíneas como una alternativa a la agroinfección por *Agrobacterium* que se había empleado exitosamente hasta entonces únicamente en plantas dicotiledóneas. La principal ventaja de este sistema es que su efectividad no se ve afectada por el genotipo y evita la compleja interacción entre *Agrobacterium* y la planta, por lo cual el ADN introducido no necesita contener las secuencias necesarias para la transferencia del T-ADN. Una de las limitantes del éxito del bombardeo es la capacidad de regeneración del tejido bombardeado y la eficiencia de la integración estable del ADN. Ya que ha resultado en integración de secuencias de ADN truncado o reorganizado, también como con múltiples copias o concatámero de varios transgenes en los sitios de integración, lo cual puede provocar silenciamiento genético (Newell, 2000).

2.2.1.1 Genotipo y explantes

Para lograr la transformación de maíz por éste método se han utilizado principalmente el híbrido Hi II (A188 x B73), el cual tiene la característica de producir callo tipo II altamente embriogénico, sin embargo dado que es un híbrido posee las características no deseables de la línea A188 progenitora (productora de callo tipo I). Por ello y dado que la embriogénesis somática es altamente dependiente del genotipo, en cada trabajo son estudiadas varias líneas (Anexo 1), de las cuales se han utilizado como explantes en primer lugar embriones inmaduros de 1 a 1.5 mm de longitud, después callo (Tipo I y Tipo II) derivado de embriones inmaduros, ápices de embriones de semillas madura o de anteras; y por último células en suspensión.

2.2.1.2 Medios de cultivo

Durante la iniciación y el mantenimiento de callo, el medio de cultivo en un principio estaba elaborado a base de sales y vitaminas MS (Mushirage and Skoog, 1962); sin embargo ha probado ser más efectivo el medio de cultivo a base de sales y vitaminas N6 (Chu *et al.*, 1975). Mientras que para la regeneración de brotes es más efectivo el medio MS.

2.1.2.3 Bombardeo

La técnica implica esencialmente el recubrimiento de micro partículas acarreadoras (de oro o tungsteno), con el ADN de los genes quiméricos de interés, que deben proyectarse a altas velocidades y bajo un vacío parcial, para penetrar dentro de las células. Brevemente, las micro partículas son asperjadas en películas circulares de plástico (macro acarreador), entonces se pone debajo del disco de ruptura en la cámara de vacío del aparato de biobalística. Debajo, los macro acarreadores son detenidos por una malla y las micro partículas acarreadoras siguen su paso a través de ella para llegar al tejido blanco, que fue colocado debajo de la unidad de lanzamiento, lo penetran y liberan el ADN (Barumpuram y Zhang, 2011).

Durante el bombardeo es de suma importancia tomar en cuenta algunos factores para lograr el éxito en la transferencia de genes, algunos de los cuales se enlistan en el Anexo 2. Estos factores incluyen el diseño de un vector con un tamaño pequeño y alto número de copias también como la cantidad y calidad de ADN liberado. El tipo de partículas a utilizar (tungsteno u oro) y el tamaño de las mismas (en maíz se han utilizado 0.6 a 2.4 μm en diámetro), ya que el grado de penetración requerido dependerá del grosor de la pared celular, el tipo de tejido y la profundidad de las capas de células del tejido blanco. También deben considerarse la presión utilizada para acelerar los microcarriers al tejido blanco; en el caso de los trabajos en maíz se utilizan más frecuentemente los discos de

ruptura entre 650 a 1200 psi, y la distancia que hay desde la malla al tejido blanco, que en caso de maíz han sido probados desde 5 a 15 cm.

Un aspecto muy importante es el tratamiento osmótico que se aplica antes y después de realizar el bombardeo al tejido blanco, con el fin de limitar el daño celular durante el bombardeo por plasmólisis de las células bombardeadas, para lo cual se utiliza principalmente manitol a 0.4 M, sorbitol a 0.2 M y sacarosa al 12 % haciendo una incubación del tejido blanco, usualmente por 4 horas en el medio osmótico, aunque se han probado tiempos de 0.5 hasta 24 horas antes del bombardeo.

2.2.1.4 Selección

Una parte muy importante para lograr plantas transformadas es la selección ya que de ella depende evitar escapes de falsos transformantes. Para la transformación de maíz ha sido muy poco utilizada la selección de plantas a base de antibióticos, por lo cual se ha puesto especial atención desde los primeros trabajos a la selección de resistencia a herbicida, la cual es conferida a través del gen *bar* que codifica para la fosfonitrin acetil transferasa (PAT por sus siglas en inglés) y que da la resistencia vía acetilación de los componentes del herbicida L-fosfonitrina o bialafos. En un principio las dosis del herbicida eran de 1 a 3 mg.L⁻¹, posteriormente se aumentó la dosis a 4 mg.L⁻¹ y últimamente se han utilizado dosis de 3 y hasta 15 mg.L⁻¹. Además algunos autores mencionan que realizan selección durante la regeneración agregando de 1 a 6 mg.L⁻¹ y durante

el enraizamiento con 1 mg.L^{-1} . Desde los primeros trabajos en transformación de maíz el gen de selección *bar* ha sido el más utilizado.

2.2.2 Método de agroinfección

Este fue el primer método diseñado para la transformación de células vegetales y surgió del estudio detallado del mecanismo de infección de la bacteria fitopatógena *Agrobacterium tumefaciens* (Newell, 2000). En 1983 se reportó el primer caso exitoso de la expresión de un transgen en células vegetales, al siguiente año se obtuvo la primera planta de tabaco transgénica (Herrera y Martínez, 2007). Éste método tiene ventajas como el de transferir segmentos relativamente largos de ADN con pocos rearrreglos y la integración de pocos números de copias dentro del cromosoma de la planta. Se pensaba que el método de transferencia de genes por el método de Agroinfección era limitado sólo a plantas dicotiledóneas ya que las monocotiledóneas no son hospedantes naturales de *Agrobacterium tumefaciens* (Ishida *et al.*, 1996), pero uno de los primeros trabajos sobre transformación de maíz con *Agrobacterium* fue el realizado por Gould *et al.* (1991). La descripción más detallada de algunas de las investigaciones hechas en agroinfección de maíz pueden consultarse en el Anexo 3.

2.2.2.1 Genotipo y explantes

El genotipo más usado es el híbrido Hi II, seguido por las líneas A188, B73 y Mo17; aunque se siguen explorando la utilización de otras líneas en menor proporción. Como explantes se han utilizado principalmente embriones inmaduros (los cuales se extraen de 9 a 20 días después de la polinización y de una tamaño de 1 a 2.5 mm dependiendo del genotipo utilizado; en menor proporción se ha utilizado partes de embriones obtenidos de semilla madura como el meristemo apical y la región nodal. También se menciona la utilización de callo tipo II de 0.3 a 0.4 mm.

2.2.2.2 Cepas de *Agrobacterium* y vectores

En los primeros trabajos hechos con agroinfección se usó principalmente la cepa EHA101; a partir del 2003 en el trabajo de Sairam *et al.* (2003) se probó el uso de la cepa de *Agrobacterium* LBA4404, y EHA105 las cuales son las más usadas hasta la fecha. En cuanto a los vectores, en un principio se utilizaron vectores super binarios los cuales contienen copias extras de los genes *vir*, a partir de Frame *et al.* (2002) se ha venido utilizando sistemas de vector binario estándar los cuales tienen la ventaja de no necesitar de un paso adicional de recombinación homóloga para introducir el gen de interés en la cepa de *Agrobacterium*. La combinación adecuada de la cepa y el plásmido influye en la eficiencia de la transformación.

2.2.2.3 Inoculación y co-cultivo

La inoculación es el primer paso en el proceso de infección en donde los explantes son colocados junto con la suspensión de *Agrobacterium* por un periodo de tiempo determinado, el cual ha variado desde 5, 10, 15, 20 y 45 minutos, aunque también se han hecho inoculaciones por tres horas (Sairam *et al.*, 2003) y hasta por toda una noche (Dinalova y Dolgikh *et al.*, 2005). Una vez pasado este tiempo se elimina el exceso de bacteria y se coloca cada explante en co-cultivo junto con la bacteria antes de aplicar al medio de cultivo algún antibiótico que elimine completamente la bacteria, éste paso se ha probado por 2 a 5 días.

Durante la inoculación se realizan algunas acciones para aumentar la eficiencia de la transformación entre ellas se ha aplicado infiltración por vacío, bombardeo o aplicación de vortex, siendo la infiltración por vacío la que mejores resultados se ha obtenido al dañar en menor proporción a los explantes con lo cual se logra la recuperación de callo embriogénico (Dinalova y Dolgikh, 2005). Mientras que, en el periodo de co-cultivo se ha utilizado el inductor fenólico acetosyringona (en dosis de 100-200 μM) el cual promueve la activación de los genes *vir* del plásmido los cuales están implicados en promover la transferencia de ADN de la bacteria a las células de la planta (Sheikholeslam y Weeks, 1987).

2.2.2.4 Control de *Agrobacterium* y selección

Después del co-cultivo es necesario eliminar *Agrobacterium* para permitir el crecimiento del callo embriogénico que posteriormente se pondrá a regenerar. Este paso se ha hecho mediante antibióticos como carbenicilina (500 mg.L⁻¹), cefotaxima (100-400 mg.L⁻¹), vancomicina (200 mg.L⁻¹) y ticarcilina (250 mg.L⁻¹) o bien la combinación de ellos (Birch, 1997).

Para evitar falsos transformantes es necesario insertar un gen que permita crecer al tejido transformado y eliminar el no transformado, al que se denomina marcador de selección. Para ello se han utilizado principalmente el gen *bar* el cual codifica para la enzima fosfinotricina acetil transferasa que confiere resistencia a herbicidas basados en glufosinato de amonio (fosfonitricina, basta, bialfos, glifosato, etc). Y el segundo gen más utilizado en la selección es el gen *nptII*, el cual codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia al antibiótico kanamicina.

Con el gen *bar* la selección se ha realizado durante la etapa de formación de callo embriogénico principalmente utilizando dosis de 1.5 y 3 mg.L⁻¹, aunque se han utilizado hasta 10 mg.L⁻¹ del herbicida para la selección, y durante un tiempo que va de mínimo de 6 semanas hasta máximo 4.5 meses. La kanamicina se ha utilizado dosis de 0.5, 7.5 y 10mg.L⁻¹. La selección puede continuar durante la regeneración y en algunos casos se realiza hasta la etapa de enraizamiento.

3 ARTÍCULO 1

CULTIVO *IN VITRO* Y REGENERACIÓN DE MAÍZ A PARTIR DE EMBRIONES INMADUROS Y MADUROS

IN VITRO CULTURE AND REGENERATION OF MAIZE FROM IMMATURE AND MATURE EMBRYOS

Esbeydi Martínez Cruz³, José Oscar Mascorro Gallardo¹, José Luis Rodríguez de la O¹,
José de Jesús López Reynoso¹, Víctor Conde Martínez⁴, Ramón Suárez Rodríguez⁵,
Gabriel Iturriaga de la Fuente³

RESUMEN

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una técnica que permite la propagación clonal de especies de propagación vegetativa o de variedades que se pretende someter a protocolos de transformación genética. En éste trabajo se evaluó la capacidad de obtención de callo embriogénico y la capacidad de regeneración a partir de dos tipos de embriones inmaduros y embriones maduros de la línea CML72 que es altamente homocigótica y fenotípicamente uniforme. También se analizó la variación somaclonal en algunas de las plantas regeneradas hasta la etapa reproductiva. Primero se indujo la formación de callo embriogénico de ambos tipos de explantes en un medio de inducción de callo posteriormente la regeneración por germinación de los embriones somáticos a los 3, 5, 7 y 9 meses. Las plantas regeneradas se crecieron en un invernadero hasta la etapa reproductiva. Los resultados muestran que en este caso es más conveniente obtener los callos a partir de embriones maduros ya que no se afecta la eficiencia de regeneración ni ocurre un incremento en la variación somaclonal generada durante el cultivo *in vitro*.

PALABRAS CLAVE: *Zea mays*, embriogénesis somática, embrión maduro, embrión inmaduro, regeneración, variación somaclonal.

ABSTRACT

The *in vitro* plant tissue culture is a technique that allows clonal propagation of vegetatively propagated species or varieties to be subjected to genetic transformation protocols. In this work, the ability to confer embryogenic callus and regeneration capacity from two types of explants, immature and mature embryos of line CML72, which is highly homozygous and phenotypically uniform was evaluated. Somaclonal variation was also analyzed in some of regenerated plants to the reproductive stage. First, the formation of embryogenic callus was induced in both explant types in an induction medium of callus, then regeneration was induced by germinating somatic embryos at 3, 5, 7 and 9 months time. The obtained plants were grown in a greenhouse up to reproductive stage for data collection. The results show that in this case it is more convenient to obtain callus from mature embryos than from immature ones, without affecting regeneration efficiency and that somaclonal variation regenerated during *in vitro* culture is similar in both cases.

INDEX WORDS: *Zea mays*, immature embryo, mature embryo, regeneration, somaclonal variation.

³Programa de Doctorado en Horticultura. Instituto de Horticultura y Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Edo. de México. CP 56230.

⁴Centro de Botánica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México- Texcoco. Montecillo, Texcoco, Estado de México. C.P 56230.

⁵Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad No. 1001, Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos C.P. 62209

*Autor de correspondencia (joscar@correo.chapingo.mx)

INTRODUCCIÓN

La regeneración eficiente de plantas completamente diferenciadas a través del cultivo *in vitro* es un requisito indispensable para poder llevar a cabo la transferencia de genes mediante transformación genética.

En maíz, la regeneración de plantas a partir del cultivo *in vitro* se reportó en 1975 por Green y Phillips mediante la vía de embriogénesis somática a partir de embriones inmaduros de la línea A188 (Furini y Jewell, 1994 y Bronsema *et al.*, 1997). Armstrong y Green (1984) y Armstrong y Phillips (1988), propusieron que al menos dos tipos diferentes de callo pueden ser obtenidos por cultivo de tejidos en algunos genotipos. El callo tipo I que se caracteriza por un alto grado de diferenciación, en el cual pueden observarse embriones somáticos bien desarrollados; sin embargo, el origen de los brotes diferenciados no es obvio, ya que mediante cortes histológicos en este tipo de cultivo arrojaron evidencias de que la regeneración de plantas puede ocurrir tanto por organogénesis como por embriogénesis somática. En contraste, el callo tipo II es friable e indiferenciado, excepto por la presencia de numerosos embriones somáticos en estado globular. Observaciones histológicas de este tipo de callo han mostrado que la regeneración de plantas ocurre por medio de embriogénesis somática. La regeneración a partir del callo embriogénico tipo II derivado de embriones inmaduros ha sido el sistema más reproducible de regeneración y/o transformación descrito para maíz (O'Connor-Sánchez *et al.*, 2002). Carvalho *et al.* (1997) y Frame *et al.* (2000) mencionan que el callo tipo I es fácilmente

obtenido de embriones inmaduros de maíz, mientras que el callo tipo II tiende a ser iniciado en menor frecuencia en este mismo tipo de explantes y es obtenido de pocos genotipos, sin embargo este es el preferido ya que debido a su naturaleza friable permite el establecimiento de suspensiones celulares, cultivo de protoplastos y algunos tipos de manipulación *in vitro*, así como de mantener la habilidad de regenerar plantas por más tiempo. Por otra parte, dependiendo del genotipo puede haber una conversión entre callo tipo I, tipo II y callo organogénico después de varios subcultivos (Sidorov, 2013).

Generar y obtener embriones inmaduros de maíz es complicado e implica mucho tiempo, esfuerzo e instalaciones como invernaderos, por lo cual se exploró el uso de semillas maduras para producir callos embriogénicos. Wang (1987), utilizó por primera vez embriones maduros de las líneas A632, B73 y Mo17, logrando la regeneración de las dos últimas. En otros trabajos, han utilizado ápices de los cuales se logró formar callo que pudo ser transformado y regenerado. La técnica de *split seed* se lleva a cabo también con semillas maduras y el uso de secciones nodales de plántulas del cual se logró generar callo tipo I (O'Connor-Sánchez *et al.* 2002, Sairam *et al.* 2003, Huang y Wei 2004, Al-Abed *et al.* 2006, Sidorov *et al.* 2006, Abebe *et al.* 2008).

La variación somaclonal se define como la variación genética y fenotípica encontrada entre plantas propagadas por cultivo *in vitro* a partir de un genotipo donador (Kaepler *et al.*, 2000). El cultivo *in vitro per se*, puede ser muy estresante para las células vegetales e involucra procesos mutagénicos durante el

establecimiento del explante, la inducción de callo, la formación de embriones y la regeneración de plantas. Los mecanismos que generan estas variantes no han sido completamente elucidados, pero entre sus causas se mencionan alteraciones de tipo genético y epigenético, como cambios en el cariotipo es decir, alteraciones en número y estructura cromosómica, mutaciones puntuales, recombinación somática, intercambio de cromátidas hermanas, rearrreglos génicos somáticos, elementos genéticos transponibles, amplificación y/o metilación del ADN y cambios en el ADN de los organelos. Se ha observado que este tipo de variación no es transmitida muy a menudo a las siguientes generaciones, lo cual indicaría que se trata de variación somaclonal de origen epigenético, más que genético (Phillips *et al.*, 1988, Lee y Phillips, 1987, Olhoft y Phillips, 1995, Kaepler *et al.*, 2000, Cardone *et al.*, 2010). Aunque la variación somaclonal puede ser una fuente de variación, cuando se requiere obtener plantas idénticas al material parental puede ser indeseable, como cuando se utiliza ingeniería genética en los programas de mejoramiento genético, para lo cual se requiere que las plantas receptoras sean genética y morfológicamente adecuadas para la correcta inclusión de las características deseables y donde la variación somaclonal originada por el cultivo de tejidos puede complicar este requerimiento, reduciendo la efectividad de la transformación (Vilaca de Vasconcelos *et al.*, 2008).

El objetivo principal de este trabajo fue analizar el comportamiento de la línea CML72 bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Para lograr lo anterior, se evaluó la capacidad de obtención de callo embriogénico y la capacidad de regeneración a

partir de dos tipos de explantes, embriones inmaduros y embriones maduros, y se evaluó la variación somaclonal en las plantas regeneradas *in vitro* por embriogénesis somática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material de investigación se utilizó la línea tropical CML72 de semilla amarilla, desarrollada en el Centro Internacional de Mejoramiento Genético de Maíz y Trigo (CIMMYT). Primero, se obtuvo callo embriogénico generado a partir de dos tipos de explantes: embriones inmaduros o maduros; una vez que se tuvo suficiente callo se pusieron en medio de brotación para obtener la regeneración, a partir de los tres meses de iniciado el cultivo *in vitro*, cada 2 meses (a los 3, 5, 7 y 9 meses) se puso a regenerar un grupo de callos que se llevaron hasta planta. Para cada tratamiento se registró la respuesta de 10 explantes o callos. Las plantas se adaptaron *ex-vitro* y se crecieron hasta la producción de semilla en un invernadero para la toma de datos de variables morfológicas. En la etapa vegetativa se tomaron muestras de tejido para realizar análisis moleculares en el laboratorio. Como testigo se utilizaron plantas de la misma línea obtenidas a partir de semilla cigótica.

Inducción de callo embriogénico

Se utilizaron dos métodos de obtención de callo:

1) A partir de embriones de semilla madura, se realizó la desinfección de la semilla (alcohol al 70% durante 3 min y cloro 50% durante 15 min), y se dejaron remojando por 24 hrs. Posteriormente, se extrajeron los embriones, se desinfectaron con cloro al 10% por 15 minutos, se secaron en papel filtro y se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo para su germinación en sales basales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con maltosa 40 g.L⁻¹, caseína hidrolizada 0.1 g.L⁻¹, MES 1.95 g.L⁻¹, cloruro de magnesio 0.75 g.L⁻¹, glutamina 0.5 g.L⁻¹, ácido ascórbico 0.1 g.L⁻¹, picloram 10 mg.L⁻¹ y BAP 3 mg.L⁻¹, pH 5.8 y 8 g.L⁻¹ de agar (Sidorov *et. al.*, 2006). Después de 3-5 días en germinación en oscuridad a 27 °C, se extrajeron las porciones nodales de cada plántula germinada y se colocaron en medio MSW57 (Sales basales y vitaminas MS, más tiamina HCL 0.5 g.L⁻¹, caseína hidrolizada 0.5 g.L⁻¹, sacarosa 30 g.L⁻¹, L-prolina 1.38 g.L⁻¹, nitrato de plata 15 mg.L⁻¹, 2-4D 0.5 mg.L⁻¹, picloram 2.2 mg.L⁻¹, pH 5.8 y 8 g.L⁻¹ de agar) para propiciar el desarrollo de callo embriogénico (Sidorov *et. al.*, 2006). Después de 2 semanas en el medio de inducción de callo las porciones nodales se colocaron en medio N6C1SN donde se indujo la formación del callo embriogénico (Bohorova *et. al.*, 1995) el cual consiste de medio basal y vitaminas N6 (Chu *et al.*, 1975) más caseína hidrolizada 200 mg.L⁻¹, L-prolina 2.302 mg.L⁻¹, sacarosa 30 g.L⁻¹, ácido 3,6-dicloro-O-anísico (Dicamba) 2 mg.L⁻¹, nitrato de plata 15.3 mg.L⁻¹, pH 5.8 y 8 g.L⁻¹ de agar. Se mantuvieron en oscuridad a 26 °C y se realizaron sub-cultivos cada 2-3 semanas. Se evaluaron 3 tratamientos a partir de las porciones nodales 1) se extrajo el nudo coleoptilar el cual se cortó a la mitad y se colocó en el medio, esto se realizó 7 días después de germinación; 2) se extrajo el nudo coleoptilar y el nudo escutelar los cuales se colocaron sin cortar 7 días después de germinación en el medio y 3) se

extrajo tanto el nudo coleoptilar como el nudo escutelar sin cortar y fueron colocados en el medio a sólo 3 días después de germinación. A las 6 semanas después de iniciado el cultivo *in vitro* se evaluó el porcentaje de formación de callo.

2) A partir de embriones inmaduros reportado por Bohorova *et. al.* (1995). La inducción de callo embriogénico se realizó a partir de embriones inmaduros de 1.0-1,5 mm (extraídos en promedio unos 21 días después de la polinización). Primero se realizó una esterilización a la mazorca con alcohol al 70% por 3 min y cloro al 50% por 30 min. Los embriones inmaduros fueron asépticamente removidos de los granos para posteriormente colocar 30 embriones con la cara plana hacia abajo en cajas de Petri de 100x15 mm que contenían el medio de cultivo N6C1SN. Los embriones fueron incubados en oscuridad a 26 °C y el callo obtenido se resembró en el mismo medio cada 2-3 semanas.

Regeneración, enraizamiento y crecimiento

Para obtener brotes y plantas completas, se pusieron a regenerar callos a los 3, 5, 7 y 9 meses de cultivo *in vitro* transfiriéndolos a cajas magenta con medio de regeneración (sales basales y vitaminas MS, más myo-inositol 100 mg.L⁻¹, tiamina HCL 0.4 mg.L⁻¹, extracto de malta 250 mg.L⁻¹, sulfato de adenina 80 mg.L⁻¹, sacarosa 30 g.L⁻¹, AIA 0.5 mg.L⁻¹, BAP 1 mg.L⁻¹, pH 5.8 y se adicionaron 8 g.L⁻¹ de agar y 0.8 g.L⁻¹ de carbón activado antes de la esterilización). Los cultivos fueron incubados en cuarto de crecimiento a 26° C bajo fotoperiodo de 16 horas de luz (luz blanca fría fluorescente con una intensidad lumínica de 68 µmol. m⁻²

s⁻¹) y 8 de oscuridad. Los brotes fueron transferidos a medio de enraizamiento, y los callos con posibilidad de producir más brotes fueron mantenidos en el medio. Cada brote transferido a medio de enraizamiento fue contabilizado para estimar la regeneración total.

El medio de enraizamiento fue colocado en frascos de vidrio (400 ml de capacidad) y consistió de sales basales y vitaminas MS, más myo-inositol 100 mg.L⁻¹, tiamina HCL 0.4 mg.L⁻¹, extracto de malta 200 mg.L⁻¹, sulfato de adenina 80 mg.L⁻¹, sacarosa 20 g.L⁻¹ y 1 mg.L⁻¹ ANA, pH 5.8 y 8 g.L⁻¹ de agar. Se colocaron 4 brotes por frasco y fueron mantenidos en cámaras de crecimiento bajo las mismas condiciones que en la regeneración hasta que generaron suficientes raíces para poder transferirlos a suelo. Cada plántula fue extraída del medio de cultivo, se le eliminó el exceso de medio con agua destilada estéril y se colocó en una mezcla de peatmoss, vermiculita y agrolita (2:1:1) como sustrato; las plantas fueron adaptadas gradualmente al ambiente externo por aproximadamente 2-3 semanas dentro de los mismos cuartos de crecimiento y completaron su crecimiento en condiciones de invernadero, en bolsas de plástico de 30X30cm con la mezcla de sustrato mencionada anteriormente, la temperatura del invernadero osciló entre 15-35 °C y la iluminación fue la natural obtenida dentro del invernadero.

Para garantizar la obtención de semillas de las plantas regeneradas *in vitro*, se llevó a cabo la polinización manual de los jilotes con polen proveniente de plantas obtenidas de semilla de la línea CML72.

Caracterización morfológica

Se registraron los siguientes datos morfológicos y fenológicos al momento de la floración y en la cosecha: altura de planta, número de hojas, días a floración masculina, días a floración femenina, peso de mazorca, tamaño de mazorca, número de granos y días a madurez de grano. Se generaron bases de datos con el programa Excel 2010 y a las variables se les realizó un análisis de medias mediante el paquete estadístico SAS para Windows 9.0.

Evaluación de la estabilidad genética mediante RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA)

La estabilidad genética fue evaluada en plantas en estado vegetativo para lo cual se extrajo ADN en la etapa de hoja bandera, utilizando el método empleado por Dellaporta *et al.*, (1983). La concentración fue determinada usando un espectrofotómetro Nanodrop. La integridad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 0.8%, que se corrió a 100 volts y se visualizó con bromuro de etidio, se registró la imagen con un fotodocumentador con luz UV (Vilber Lourmat).

La reacción de amplificación contenía: 60 ng de ADN, buffer PCR 1x, 2 μ M de dNTPs, 30 pm del iniciador (Oligo-Datenblatt de la serie ROTH) y 2 unidades de Taq polimerasa, en un volumen final de 25 μ l y se llevó a cabo en un termociclador modelo: MaxyGene Gradient. El programa térmico consistió de un ciclo a 92°C por 4 min, 40 ciclos con un paso de desnaturalización a 92°C por 1

min, un paso de alineamiento 37°C por 1 min y un paso de extensión a 72°C 2 min. Finalmente un ciclo a 72°C por 5 min. Los productos de la amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 1.6%. Se obtuvieron patrones de amplificación con 6 iniciadores.

Se comparó el patrón de bandeo encontrado entre las plantas generadas de callo proveniente de embrión inmaduro, plantas generadas de callo proveniente de embrión maduro y plantas provenientes de semilla cigótica. Únicamente las bandas más intensas y reproducibles fueron consideradas para el análisis y se les asignó el valor de 0 a la ausencia y 1 a la presencia de una banda. Se cuantifico el número de bandas producto de la amplificación para cada iniciador, asignándose un número de acuerdo con la distancia de migración en el gel. Se realizó un registro de los patrones RAPD obtenidos con los 6 iniciadores para todas las plantas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de callo embriogénico de embrión maduro

Con la finalidad de evaluar y conocer la inducción de callo a partir de embriones maduros en la línea CML72, se determinó el porcentaje de formación de callo en las porciones nodales. Los resultados (Cuadro 1) muestran una mayor formación de callo (55%) al colocar las porciones nodales (nudo coleoptilar + nudo escutelar) sin seccionarlas por la mitad y colocándolas sólo 3 días después de

germinar los embriones en el medio de inducción de callo. Es importante mencionar que también con este tratamiento hubo una reducción en la oxidación de los explantes, lo que favoreció a la formación de callo. Igualmente la formación de callo se vio favorecida al eliminar la parte radicular y el ápice cada vez que estos crecen de los explantes. Los porcentajes de obtención de callo son muy parecidos a los encontrados por Sidorov *et al.* (2006) quienes reportan una frecuencia de inducción de callo embriogénico en secciones nodales cortadas a la mitad de 38-42% para las líneas L4 y L9. Y Jia *et al.*, (2008) quienes reportan 39.2 y 42% de formación de callo embriogénico a partir de embriones maduros y ejes embrionarios respectivamente. Por su parte, Abebe *et al.* (2008) lograron la máxima inducción de callo (90%), a partir de la técnica de *split seed* de embriones maduros, al utilizar el medio de cultivo LS suplementado con 3 mg L⁻¹ de 2,4-D. Y Krishna *et al.*, (2013) obtuvieron una inducción de callo de 90% al utilizar medio MS suplementado con 2 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L⁻¹ de BAP.

Generación de callo

En ambas fuentes de explantes ya sea embriones maduros o inmaduros de la línea de maíz CML72 (Figura 1 A y B) propiciaron el desarrollo de callo tipo I (Figura 1 C y D), las características físicas de éste callo son muy similares a las descritas por Armstrong y Green (1984) y Armstrong y Phillips (1988) quienes mencionan que el callo tipo I es compacto y organizado aunque algunas estructuras embrionarias son visualizadas ocasionalmente. Lo cual coincide con lo reportado por Bohorova *et al.*, (1999), quienes obtuvieron callo tipo I de la línea

CML72 generado de embriones inmaduros y; Sidorov *et al.*, (2006) quienes demostraron que utilizar plántulas derivadas de embriones maduros es una muy buena alternativa para obtener callo tipo I. Ambos autores reportaron regeneración y obtención de plantas de ese tipo de callo.

Regeneración

La regeneración obtenida en los callos se muestra en el Cuadro 2 y Figura 1 E y F, se puede observar que la capacidad regenerativa de los callos no se vio afectada con el tiempo en subcultivos, lo cual indica que se podrían utilizar dichos callos por un periodo de 9 meses de subcultivo sin perder la capacidad regenerativa de los mismos y lograr obtener plantas durante este periodo de cultivo. Sin embargo, un aspecto crítico es llevar a cabo subcultivos periódicos en el medio embriogénico cada 2 a 3 semanas, de otra forma los callos pierden su capacidad de regeneración.

Al realizar el análisis estadístico (Cuadro 2, $p < 0.05$) para diferenciar la regeneración obtenida, expresada como número de brotes y número de plantas adaptadas *ex vitro*, obtenidas de callos provenientes de embriones inmaduros contra la de callos provenientes de embriones maduros, se determinó que, estadísticamente se produce un mayor número de brotes, 75.5 brotes en promedio, de callos que proviene de embrión maduro (Figura 1-H) que de callo proveniente de embrión inmaduro, 47.25 brotes en promedio (Figura 1-G) En cuanto al número de plantas que se lograron adaptar *ex vitro*, estadísticamente

no se encontró diferencias entre el número de plantas que provienen de embrión inmaduro (Figura 1-I) y el número de plantas generadas al utilizar callo proveniente de embrión maduro (Figura 1-J).

Bohorova *et al.*, (1995) reportaron una regeneración de 65% de los embriones inmaduros iniciados, y un promedio de 5-15 plantas por embrión en la línea CML72. Sin embargo, únicamente determinaron la regeneración utilizando embriones inmaduros. Bajo nuestras condiciones, obtuvimos un 100% de regeneración, es decir de los callos puestos a regenerar, en el 100% de ellos obtuvimos brotes; lo cual confirma que puede obtenerse callo embriogénico y brotes tanto de embriones inmaduros como de embriones maduros, y con ello facilitar la obtención de explantes de embriones inmaduros en el estado óptimo.

Hernández- García *et al.*, (2007) encontraron al estudiar líneas tropicales de maíz un porcentaje de callos embriogénicos con embriones somáticos germinados de 83.9 % en la mejor de las líneas probadas similar a los testigos 85.5-97.2% (CML72 x CML216 y CML216 x CML72 respectivamente). Sin embargo a pesar de los altos índices de brotación sólo obtienen 1.1 plantas por callo en su mejor línea y de 0.74 a 0.95 plantas por callo en los testigos, muy bajas comparadas con los obtenidos en el presente trabajo, al utilizar 1 mg L^{-1} y AIA 0.5 mg L^{-1} como lo reporta Gorji *et al.*, (2011) Mientras que Krishna *et al.* (2013) encontraron que la mejor combinación para obtener brotes de callo generado de secciones nodales de embriones maduros es BAP 2 mg L^{-1} , KIN 1 mg L^{-1} y ANA 0.5 mg L^{-1} .

Variación morfológica

De acuerdo a la comparación de medias en el Cuadro 3 se puede observar que existen diferencias morfológicas significativas entre las plantas obtenidas por cultivo *in-vitro* (Figura 1 I-L) y las plantas obtenidas de semilla cigótica (Figura 1-N y Ñ) en todas las variables comparadas ($p < 0.05$), excepto para la variable días a floración masculina, en donde solo fueron diferentes en las regenerantes que no tenían ese tipo de floración. Lo cual nos indica que, durante el cultivo *in vitro* hay variación somaclonal, y que, ésta variación es estadísticamente similar entre las plantas que provienen de embrión inmaduro como de las que proceden de embrión inmaduro durante las 4 fechas de regeneración. Lo anterior difiere con lo encontrado por Armstrong y Phillips (1988) quienes atribuyen un mayor efecto en la aparición de variaciones a la edad del cultivo que al tipo de cultivo, ya que después de 16 semanas en cultivo *in vitro* un 20.8 y 33.3 33.3 % de las plantas regenerantes de callo tipo I y callo tipo II respectivamente tenían por lo menos una anomalía. Éstos valores aumentaron a 24.2 y 37.2 % respectivamente después de 36 semanas de cultivo.

Dentro de las variables evaluadas las más importantes son las que tienen que ver con el rendimiento, ya que de ello depende la obtención de semilla. Es importante mencionar que, no todas las plantas que se obtuvieron presentaban la inflorescencia femenina o masculina y de las plantas que se regeneraron a los 9 meses de sub-cultivos ninguna produjo flores masculinas. Lo cual genera un problema para la obtención de semillas y por lo cual es necesario prever la

siembra de plantas que provengan de semilla cigótica que sirvan como productoras de polen.

Aunque, las variables peso de mazorca, tamaño de mazorca y número de granos se vieron afectadas con una reducción de las mismas en las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* (Cuadro 3 y Figura 1- K y L). Es importante mencionar que de las plantas que se lograron adaptar en el invernadero el 63.38 % produjeron mazorcas, lo cual asegura la obtención de semilla. También es importante mencionar que el fenotipo normal se recupera en la generación T₁ al sembrar las semillas obtenidas después del cultivo *in vitro* (Figura1-M y N). La mayoría de los trabajos en regeneración no evalúan este aspecto, sobre las variables reproductivas, sin embargo, es de suma importancia realizarlas, ya que estas nos indican qué tan factible será la obtención de semillas viables después del proceso de cultivo *in vitro*.

Evaluación de la estabilidad genética

Fue importante determinar si en este trabajo, las variaciones morfológicas observadas en las plantas eran debidas a causas genéticas (rearrreglos cromosómicos, actividad de transposones, mutaciones), o si eran variaciones epigenéticas debidas a alteraciones en la expresión genética inducida por las condiciones de cultivo *in vitro*, para lo cual a todas las plantas que fueron adaptadas *ex vitro* se les extrajo ADN para realizar análisis mediante RAPDs. Se encontró que usando los 6 iniciadores se amplificaron 47 loci en total los cuales

fueron en su totalidad monomórficos. Cada oligonucleótido produjo un promedio de 7.83 loci. Ninguna diferencia fue detectada entre las plantas obtenidas mediante regeneración *in vitro* durante 9 meses de regeneración al ser comparadas con las plantas obtenidas de semilla cigótica (Cuadro 4 y Figura 2). Aunque se lograron amplificar pocos loci por PCR, a partir de este muestreo se deduce que los cambios genéticos debidos al cultivo *in vitro*, no son muy frecuentes. La variación somaclonal entonces podría atribuirse principalmente a variación epigenética por cambios en el patrón de metilación del ADN (Peredo *et al.*, 2006).

Dado los resultados obtenidos en el presente trabajo demostramos que, ambos protocolos (Figura 3) pueden ser exitosamente utilizados para lograr regeneración en la línea CML72 de maíz con frecuencias aceptables de obtención de brotes y plantas.

CONCLUSIONES

Mediante éste trabajo se demostró que, los cultivos mantienen su capacidad callogénica y regenerativa, de ambos tipos de explantes, hasta los 9 meses en que fueron evaluados. Así como que, la frecuencia y el tipo de las variaciones somaclonales es similar para plantas regeneradas de ambos tipos de explantes y las variaciones fenotípicas de las plantas T₀ al parecer no son de naturaleza genética, pues no se detectaron polimorfismos del ADN en los análisis con RAPDs durante los 9 meses de evaluación y no se transmiten a la generación T₁.

Por las dificultades logísticas para obtener callos embriogénicos a partir de embriones inmaduros, en este trabajo se muestra que es más conveniente obtenerlos a partir de embriones maduros sin que se afecte la eficiencia de regeneración ni ocurra un incremento en la variación somaclonal generada durante el cultivo *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

E.M.C. agradece a CONACyT por la beca otorgada para llevar a cabo sus estudios de doctorado. J.O.M.G., R.S.R. y G.I.F., agradecen al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), por el financiamiento del proyecto 107PIC0312 para llevar a cabo esta investigación.

LITERATURA CITADA

Abebe D Z, W Teffera, J S Machuka (2008) Regeneration of tropical maize lines (*Zea mays* l.) from mature zygotic embryo through callus initiation. African Journal of Biotechnology 7 (13): 2181-2186.

Al-Abed D, S Rudrabhatla, R Talla, S Goldman (2006) Split-seed: a new tool for maize researchers. Planta 223: 1355–1360.

Armstrong C L, C E Green (1984) Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164:207-214.

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

Balkrishna R A, S S Shankarrao (2013) *In vitro* screening and molecular genetic markers associated with salt tolerance in maize. *African Journal of Biotechnology* 12(27):421-4255.

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

Bohorova N, W Zhang, P Julstrum, S McLean, B Luna, R M Brito, L Diaz, M E Ramos, P Estañol, M Pacheco, M Salgado, D Hoisington (1999) Production of transgenic tropical maize with *cryIAb* and *cryIAc* genes via microprojectile bombardment of immature embryos. *Theoretical and Applied Genetics* 99:437-444.

Bronsema F B F, W J F van Oostveen, A A M van Lammeren, (1997) Comparative analysis of callus formation and regeneration on cultured immature

maize embryos of the inbred lines A188 y A632. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 50:57-65.

Cardone S. S Olmos, V Echenique (2010) Variación Somaclonal: En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. G Levitus, V Echenique, C Rubinstein, E Hopp, Mroginski (eds). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. pp: 229-241.

Chu C. C, C C Wang, C S Sun (1975) Establishment of an efficient medium for another culture of rice trough comparative experiments on the nitrogen sources. *Science Sinica* 18:659-668.

Dellaporta S L, J Wood, J B Hicks (1983) A plant DNA miniprep. Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.

Frame R B, H Zhang, M S Cocciolone, V L Sidorenko, R Ch Dietrich, S E Pegg, S Zhen, S P Schnable, K Wang, (2000) Production of transgenic maize from bombarded type II Callus: Effect of gold particle size and callus morphology on transportation efficiency. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 36:21-29.

Furini A, D C Jewell (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature and mature embryos of tropical and subtropical *Zea mays* L. Genotypes. *Maydica* 39: 155-164.

González G A, M G Pacheco, O C Décima, V J Etchart, M V Kandus, J C Salerno, G Eyherabide, D Presello, D M Lewi, (2012) Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458.

Gorji A H, M Zolnoori, A Jamasbi, Z Zolnoori (2011) *In vitro* plant generation of tropical maize genotypes. *Proceedings of the International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology* 16:52-59.

Hernández-García C M, C López-Peralta, M T Buenrostro-Nava, E Cárdenas-Soriano, A Pellegrineschi (2007) Regeneración de maíces blancos subtropicales vía embriogénesis somática regeneration of subtropical white maize via somatic embryogenesis. *Agrociencia* 41: 743-753.

Huang X, Z Wei (2004) High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.). *Plant Cell Rep* 22:793–800.

Jia X X, J W Zhang, H N Wang, W P Kong (2008) Efficient maize (*Zea mayz* L.) regeneration derived from mature embryos in vitro. *Maydica* 53:239-248.

Kaeppler S M, H F Kaeppler, Y Rhee (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 79–188.

Krishna M P, S Tula, H K Kamrul, V K Srivastava, N Tuteja (2013) An efficient and rapid regeneration via multiple shoot induction from mature seed derived embryogenic and organogenic callus of Indian maize (*Zea mays* L.). *Plant Signaling & Behavior* 8(10):e25891-1- e25891-6.

Lee M, R L Phillips (1987) Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. *Genome* 29: 122-128.

Matheka J M, E Magiri, A O Rasha, J Machuka (2008) *In vitro* selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (*Zea mays* L.). *Biotechnology* 7(4):641-650.

Murashige T, F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.

Neelakandan A K, K Wang (2012) Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Report* 31:597–620.

Olhoft P, R L Philips (1995) Genetic and epigenetic changes induced by maize tissue culture. In: *Proceeding. Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement*. FAO. IABA. Viena (Austria).pp:187-198.

Omondi E G O, M N Makobe, M H Matasyoh, C A Onyango (2013) Genetic variability of tissue cultured *Sorghum bicolor* (L) Moench as revealed by morphological traits and simple sequence repeats (SSR) markers. African Journal of Biotechnology 12(1): 1-7.

O'Connor-Sánchez J L, M Cabrera-Ponce, P Valdez-Melara, J L Téllez-Rodríguez; J Pons-Hernández, L Herrera-Estrella (2002) Transgenic maize plants of tropical and subtropical genotypes obtained from calluses containing organogenic and embryogenic-like structures derived from shoot tips. Plant Cell Rep (2002) 21:302–312.

Peredo E L, M A Revilla, R Arroyo-García (2006) Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures of organogenic calli. Journal of Plant Physiology 163: 1071-1079.

Phillips R L, D A Somers, K A Hibberd (1988) Cell/tissue culture and in vitro manipulation: In: Corn and Corn Improvement-Agronomy Monograph. G F Sprague, J W Dudley (eds). No. 18, 3rd edition. pp:345-387.

Rhee Y.; H Lin, R Buell, K Childs, S Kaeppler (2009) A *c2* allele of maize identified in regenerant-derived progeny from tissue culture results from insertion of a novel transposon. Maydica 54: 429-437.

Rival A, L Bertrand, T Beulé, M C Combes, P Trouslot, P Lashermes (1998)

Suitability of RAPDs analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). Plant Breeding 117 (1):73-76.

Sairam R V, M Parani, G Franklin, Z Lifeng, B Smith, J MacDougall, C Wilber,

H Sheikhi, N Kashikar, K Meeker, D Al-Abed, K Berry, R Vierling, S L

Goldman (2003) Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L.

transformation. Genome 46: 323–329.

Sidorov V. A (2013) Plant tissue culture in biotechnology: Recent advances in

transformation through somatic embryogenesis. Biotechnologia Acta UDK

575327/275.854 (6) 4:118-131.

Sidorov V, L Gilberston, P Addae, D Duncan (2006) Agrobacterium-mediate

transformation of seedling-derived maize callus. Plant Cell Report 25:320-

328.

Vilaca de Vasconcelos M J, M S Antunes, S M Barbosa, C H S Carvalho

(2008) RAPD analysis of callus regenerated and seed grown plants of Maize

(*Zea mays* L.). Revista Brasileira de Milho e Sorgo7(2):93-104.

Cuadro 1. Frecuencia de inducción de callo a partir de embriones maduros de la línea CML72 de maíz.

Tratamiento	Número de explantes usados	Respuesta	
		Número de explantes con formación de callo.	% de formación de callo ^a
T1= Nudo coleoptilar cortado a la mitad (7 días después de germinación)	74	8	10.81
T2=Nudo coleoptilar + nudo escutelar sin cortar (7 días después de germinación)	130	26	20.0
T3= Nudo coleoptilar + Nudo escutelar sin cortar (3 días después de germinación)	40	22	55.0

^aEl porcentaje de formación de callo fue evaluado contando el número de explantes que formaron callo con respecto al número total de explantes x 100.

Cuadro 2. Brotes y plantas obtenidos de 10 callos embriogénicos generados de embriones maduros e inmaduros.

Explante	Número de brotes				Promedio
	3 meses	5 meses	7 meses	9 meses	
Embrión maduro	57	35	65	129	75.5 a*
Embrión inmaduro	64	39	49	37	47.25 b
Promedio	60.5 a*	37 a	57 a	83 a	
Desv. Estándar	4.9	2.8	11.3	65.0	
Explante	Número de plantas				Promedio
	3 meses	5 meses	7 meses	9 meses	
Embrión maduro	7	7	33	34	20.25 a
Embrión inmaduro	7	18	19	3	11.75 a
Promedio Plantas	7 a*	12.5 a	26 a	18.5 a	
Desv. Estándar	0	7.8	9.9	21.9	

*Valores con la misma letra indican que no existe diferencia significativa de acuerdo a la prueba Kruskal-Wallis con un $\alpha=0.05$.

Cuadro 3. Comparación morfológica y fenológica entre plantas obtenidas por cultivo *in vitro* y obtenidas de semilla cigótica.

Origen de las plantas evaluadas		AP	NH	DFF	DFM	PM	TM	NG	DMG
Línea de maíz CML72		75.4 a	15.6 a	124.3 a	111.5 a	11.7 a	7.4 a	86.7 a	196.8 a
Regeneración 3 meses	EM	36.1 b	9.0 cd	86.1 cd	95.0 a	8.9 abc	6.5 ab	47.8 ab	131.4 b
	EI	45.9 b	9.5 bcd	77.5 d	96.0 a	7.2 abcd	5.3 ab	41.6 b	134.6 b
Regeneración 5 meses	EM	45.9 b	9.2 cd	96.5 bc	94.8 a	9.6 ab	6.5 ab	43.8 ab	133.4 b
	EI	41.7 b	10.0 bcd	95.5 bcd	91.8 a	5.8 abcd	5.5 ab	30.7 b	129.8 b
Regeneración 7 meses	EM	39.7 b	8.0 d	108.0 ab	114.0 a	3.3 cd	4.7 b	19.8 b	132.5 b
	EI	30.8 b	8.7 cd	94.2 bcd	94.0 a	3.0 cd	4.6 b	15.3 b	142.9 b
Regeneración 9 meses	EM	30.7 b	10.3 bc	81.2 cd	0 b	4.2 bcd	5.5 ab	36.6 b	137.9 b
	EI	31.3 b	11.6 b	88.0 cd	0 b	2.5 d	4.6 b	15.3 b	143.6 b

EM= Embrión maduro, EI=Embrión inmaduro, AP=Altura de planta, NH=Número de hojas, DFF= Días a floración femenina, DFM=Días a floración masculina, PM= Peso de mazorca, TM= Tamaño de mazorca, NG=Número de granos, DMG=Días a madurez de grano. *Valores con la misma letra indican que no existe diferencia significativa de acuerdo a la prueba Tukey con un $\alpha=0.05$.

Cuadro 4. Loci detectados mediante RAPDs en muestras de ADN de plantas maíz obtenidas de cultivo *in vitro* de embriones maduros, embriones maduros y semilla cigótica.

INICIADOR	SECUENCIA DE NUCLOÓTIDOS (5'-3')	LOCI	
		Monomórficos	Polimórficos
ROTH- B 05	TGCGCCCTTC	10	0
ROTH-B 06	TGCTCTGCCC	9	0
ROTH-B 08	GTCCACACGG	8	0
ROTH-B 09	TGGGGGACTC	6	0
ROTH-B 10	CTGCTGGGAC	5	0
ROTH-B 15	GGAGGGTGTT	9	0
TOTAL		47	0
Promedio		7.83	0

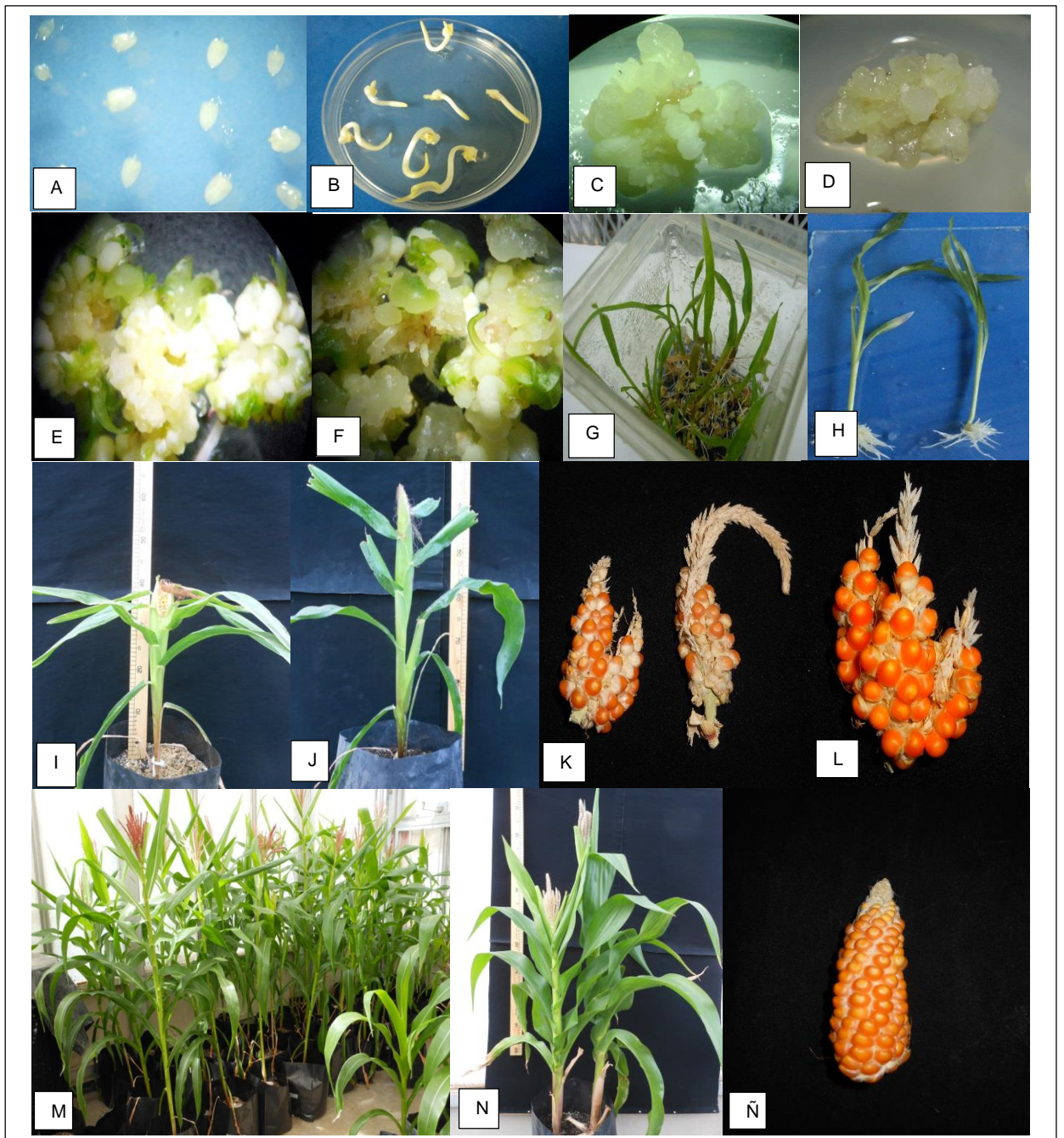


Figura 1: Proceso de cultivo *in vitro* y regeneración de maíz CML72 mediante embriones inmaduro y embriones maduros.
 A) Explantes: Embirones inmaduros. B) Explantes: Embriones maduros. C) Callo embriogénico tipo I, derivado de embriones inmaduros. D) Callo embriogénico tipo I, derivado de embriones maduros. E) Callo embriogénico derivado de embriones inmaduros en regeneración. F) Callo embriogénico derivado de embriones maduros en regeneración. G) Plántulas generadas embriones somáticos de callo embriogénico derivado de embriones inmaduros. H) Plántulas generadas embriones somáticos de callo embriogénico derivado de embriones maduros. I) Planta adaptada ex vitro proveniente embriones somáticos de callo embriogénico derivado de embriones inmaduros. J) Planta adaptada ex vitro proveniente embriones somáticos de callo embriogénico derivado de embriones maduros. K) Mazorcas obtenidas de plantas T0 iniciadas de embrión inmaduro. L) Mazorcas obtenidas de plantas T0 iniciadas de embrión maduro. M) Plantas T1 obtenidas de semillas T0 obtenidas después del cultivo *in vitro*. N) Plantas obtenidas de semilla cigótica. Ñ) Mazorcas de plantas obtenidas por semilla cigótica.

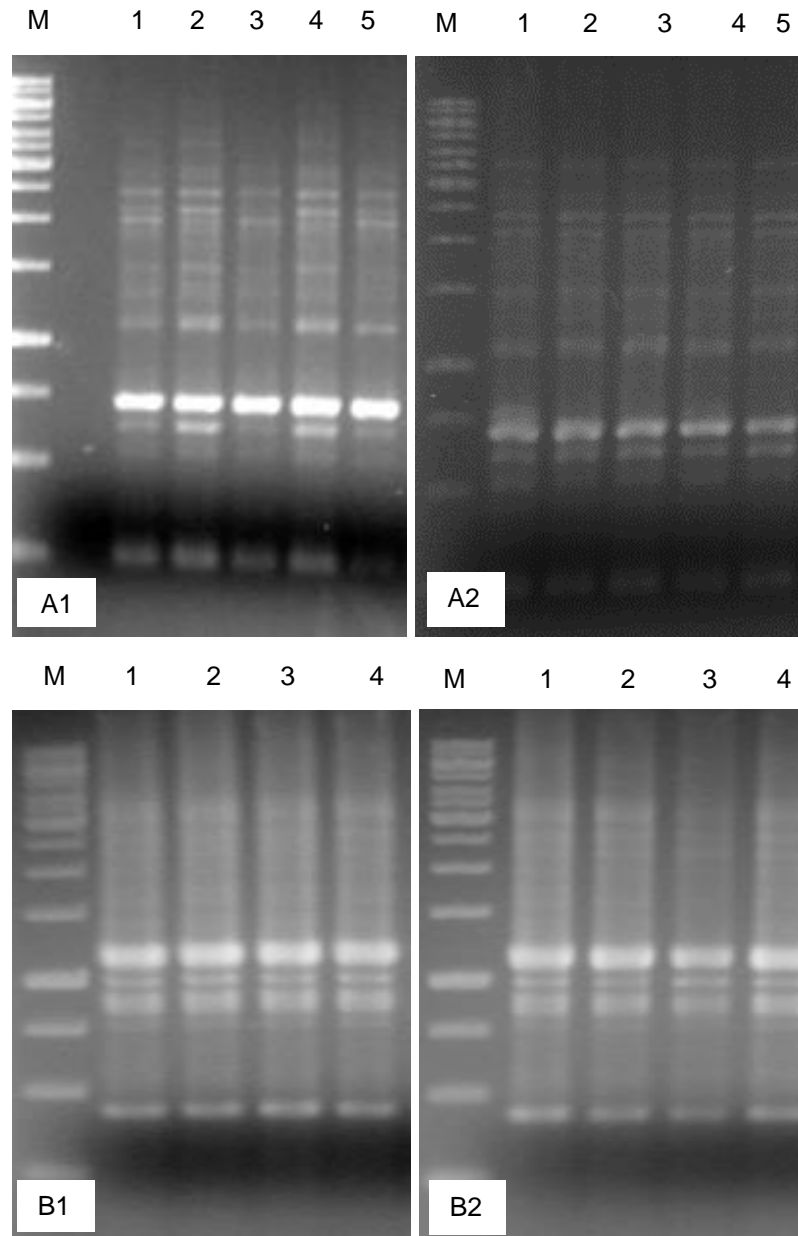
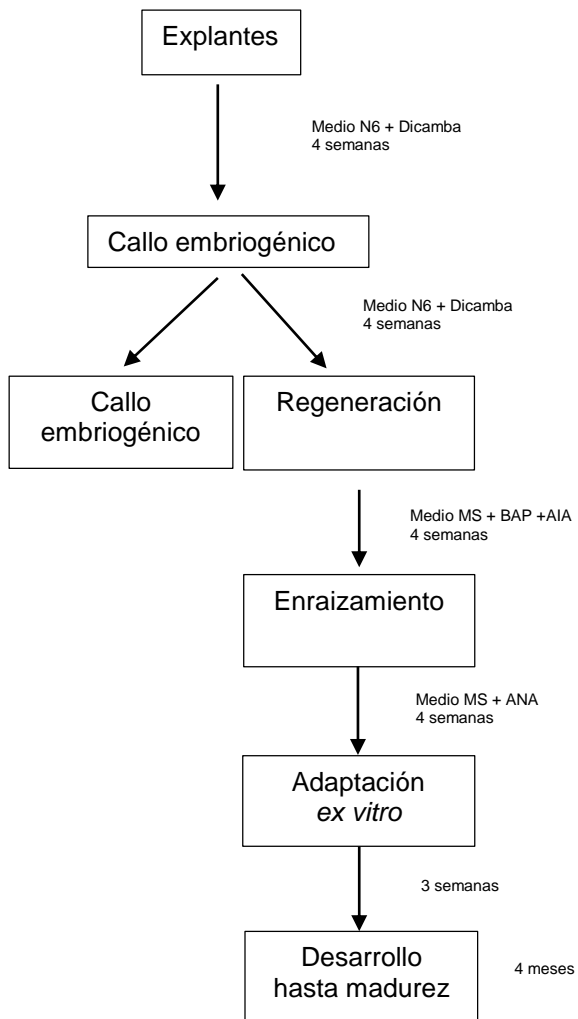


Figura 2. Patrón de bandeo obtenido con RAPDs en muestras de plantas de maíz. A-1) iniciador ROTH-B05 carril 1-4 plantas provenientes de embrión inmaduro a 7 meses de cultivo *in vitro*, carril 5 planta proveniente de semilla cigótica. A-2) iniciador ROTH-B05 carril 1-4 plantas provenientes de embrión maduro a 9 meses de cultivo *in vitro*, carril 5 planta proveniente de semilla cigótica. B-1) iniciador ROTH-B10 carril 1-3 plantas provenientes de embrión inmaduro a 3 meses de cultivo *in vitro*, carril 4 planta proveniente de semilla cigótica. B-2) iniciador ROTH-B10 carril 1-3 plantas provenientes de embrión maduro a 9 meses de cultivo *in vitro*, carril 4 planta proveniente de semilla cigótica. M, marcador de peso molecular 1 kb ladder, Fermentas®

EMBRIONES INMADUROS



EMBRIONES MADUROS

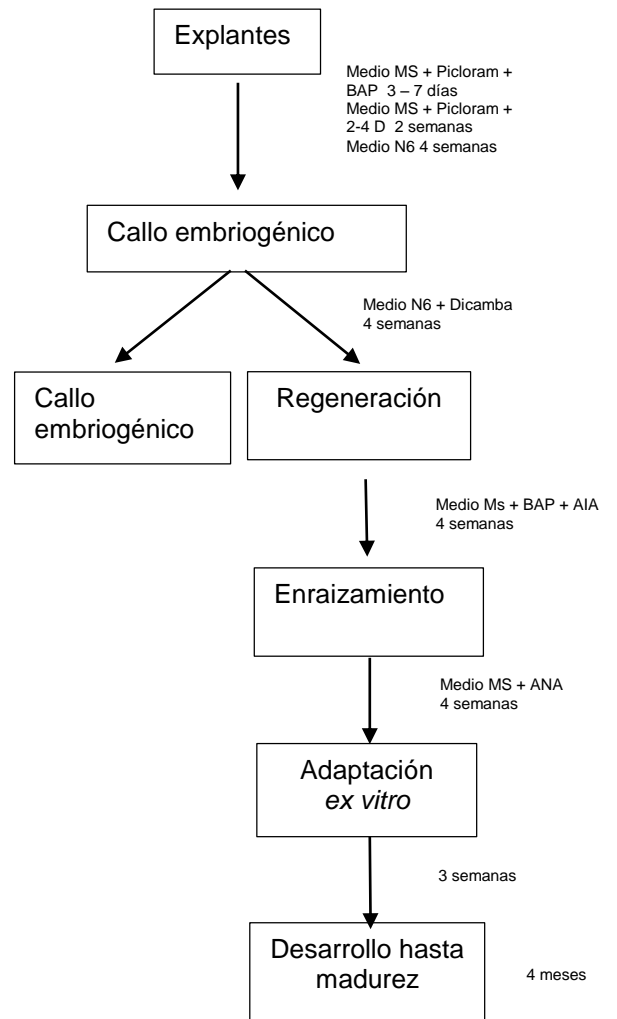


Figura 3. Protocolo de regeneración de maíz CML72 a partir de dos tipos de explantes.

4. ARTÍCULO 2

OBTENCIÓN DE MAÍZ TRANSGÉNICO QUE ACUMULA TREHALOSA CON MAYOR TOLERANCIA A LA SEQUÍA

GETTING OF TRANSGENIC MAIZE THAT ACUMULATE TREHALOSE WITH A MAJOR DROUGHT TOLERANCE

Esbeydi Martínez Cruz⁶, José Oscar Mascorro Gallardo¹, José Luis Rodríguez de la O¹, José de Jesús López Reynoso¹, Víctor Conde Martínez⁷,

RESUMEN

El crecimiento y la producción de los cultivos se ven gravemente afectados por la insuficiencia de agua. Se estima, según datos de la FAO que, desde 1900 más de 11 millones de personas han muerto a consecuencia de las sequías y más de 2 billones han sido afectadas por estas. La trehalosa (α -D-glucopiranosil α -D-glucopiranosido) juega un importante papel fisiológico como un protector de estrés abiótico y podría ser utilizada en cultivos de importancia como el maíz. Empleando los genes quiméricos *35S::ScTPS1TPS2::NOS* y *Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS* en el vector *pGreen0229* ó *pTF101.1* se realizó transformación por agroinfección y bombardeo en callos embriogénicos de línea de maíz CML72. Mediante PCR se detectó la presencia del gen *TPS2* en 6 líneas obtenidas con el vector *pGreen0229* y en 4 líneas obtenidas con el vector *pTF101.1*. Las plantas con la construcción bifuncional exhiben un contenido relativo de agua (CRA) mayor que las plantas no transformadas después de haber sido sometidas a un periodo largo de sequía.

Palabras clave: Maíz, sequía, transformación, trehalosa.

ABSTRACT

The growth and crop yield are severely affected by insufficient water availability. It is estimated, according to FAO that since 1900 more than 11 million people have died as a result of drought and more than two billion have been affected by it. Trehalose (α -D-glucopyranosyl α -D-glucopyranoside) plays an important physiological role as a protector against abiotic stress and could be used on important crops such as corn. By employing the chimeric genes *35S::ScTPS1TPS2::NOS* and *Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS* subcloned in the *pGreen0229* or *pTF101.1* vector transformation was conducted by embryogenic callus bombardment and agroinfection of CML72 line. After PCR the presence of *TPS2* gene in six lines obtained with the vector *pGreen0229* and four lines obtained with the vector *pTF101.1* was detected. Plants with the bifunctional gene did exhibit relative water content (RWC) higher than non-transformed plants after being subjected to a long period of drought.

Key words: Maize, drought, transformation, trehalose.

⁶Programa de Doctorado en Horticultura. Instituto de Horticultura y Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Edo. de México. CP 56230.

⁷Centro de Botánica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México- Texcoco. Montecillo, Texcoco, Estado de México. C.P 56230.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de las plantas y la producción de los cultivos se ve gravemente afectada por la insuficiencia de agua. Deikman *et al.* (2012) define a la sequía en el contexto de la agricultura como una situación donde la cantidad de agua disponible para la planta es menos que la que es requerida para sostener un máximo crecimiento y productividad. Los mejoradores han hecho excelentes progresos en mejorar la fenología de los cultivos, tales como tiempo de floración, altura y otras que pueden afectar la utilización de agua a través de estrategias de evasión, pero es claro que es necesario seguir investigando sobre éste punto sobre todo en la productividad de los cultivos que se producen durante sequías periódicas o que están sometidos a estrés por sequía como aquellos que son cultivados bajo agricultura de temporal o cuando el riego es limitado. Hoy en día estos caracteres pueden ser incorporados en los cultivos a través del mejoramiento tradicional, de la biotecnología, o con una combinación de ambos. La ingeniería genética, definida como la manipulación en laboratorio de la información genética de un organismo utilizando las técnicas de la biología molecular, se presenta como una poderosa alternativa para obtener cultivares transgénicos que superen en su productividad y calidad a sus contrapartes obtenidas por métodos tradicionales (Herrera y Martínez, 2007), pero sin dejar de lado las metodologías convencionales de mejoramiento, es decir, que los nuevos conocimientos y la tecnología del ADN deben ser combinados con el trabajo práctico de campo y llegar a mayores y más rápidos logros en la productividad del maíz (Paliwal *et al.*, 2001).

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los principales cultivos en el mundo no sólo por usarse en la alimentación humana sino también por otros usos como: alimento para animales, abono, usos industriales y para estudios de genética, genómica y biología molecular.

Sharp y Evans (1984), mencionan que el cultivo de tejidos en maíz comenzó probablemente en 1947 con los trabajos de La Rue con endospermo de maíz. Pero la regeneración de plantas se reportó en 1975 por Green y Phillips mediante la vía de embriogénesis somática a partir de embriones inmaduros (Furini y Jewell, 1994; Bronsema *et al.*, 1997). El éxito del cultivo tejidos de maíz es frecuentemente dependiente del tejido donador elegido para la iniciación del cultivo, el cual depende del genotipo de las plantas y también de los estados fisiológicos y de desarrollo apropiados. Ya que de estos y de las condiciones de cultivo dependerá la regeneración y especialmente la embriogénesis somática (Green, 1983). Para todas las especies de cereales el tejido escutelar de embriones inmaduros es un explante adecuado, del cual, pueden ser regeneradas plantas fértiles en altas frecuencias vía embriogénesis somática (Brettschneider *et al.*, 1997). Zhong *et al.*(1992) demostraron que los meristemas de maíz obtenidos de semillas maduras son morfológicamente elásticos y pueden ser manipulados para producir múltiples brotes y embriones somáticos en maneras relativamente independientes del genotipo por simple variación de las condiciones de cultivo *in vitro*.

El primer método de transformación utilizado en maíz fue el de biobalística (balística biológica) consiste en la introducción directa por métodos físicos de ácidos nucleicos a células vegetales. El método físico por el cual se introduce el ADN consiste en el bombardeo de tejidos con micropartículas cubiertas con el ADN o con cualquier otra biomolécula que se pretenda introducir a las células vegetales (Herrera y Martínez, 2007). Fue mediante éste método que se logró obtener la primeras plantas transgénicas de maíz en a finales de los 80's y principios de los 90's (Klein *et al.*, 1988; Gordon-Kamm *et al.*, 1990). Actualmente se ha reportado en varios trabajos que la transformación de esta especie puede llevarse a cabo utilizando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Este método ofrece ventajas adicionales como, la posibilidad de transferir grandes segmentos de ADN dentro de las células, la regeneración de un número alto de eventos transgénicos, estables, con bajo número de copias.

El déficit de agua provoca complejas respuestas comenzando con la percepción del estrés, la cual inicia con la vía de transducciones de señales que se manifiestan en cambios a niveles celulares, fisiológicos y de desarrollo del cultivo. El grupo de respuestas observadas depende de la severidad y duración del estrés, genotipo de la planta, estado de desarrollo y factores ambientales que proveen el estrés. Los genes expresados durante el estrés promueven tolerancia celular a la deshidratación a través funciones protectoras en el citoplasma, alteración del potencial celular de agua para promover la absorción, control de la acumulación de iones y la posterior regulación de la expresión de genes (Bray, 1993). La trehalosa es un disacárido compuesto de dos unidades de glucosa (α

-D-glucopiranosil α -D-glucopiranosido). Está presente en todos los reinos y tiene funciones en el almacenaje de carbohidratos, protege proteínas y membranas celulares de la inactivación o desnaturalización causada por estrés abiótico y juega un importante papel en la regulación metabólica. La biosíntesis ocurre en dos pasos; primero, la trehalosa 6-fosfato (T6P) se sintetiza a partir de UDP-glucosa y glucosa 6-fosfato por la enzima T6P sintasa (TPS), posteriormente la T6P es convertida a trehalosa por la enzima T6P fosfatasa (TPP) (Godijn y van Dun, 1999; Elebin *et al.*, 2003; Avonce *et al.*, 2004; Satoh-Nagasawa *et al.*, 2006). Por medio de la ingeniería genética, se han utilizado los genes involucrados en la síntesis de trehalosa para obtener plantas que sobre expresen la acumulación de la misma logrando tolerancia a sequía, salinidad y frío (Garg *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2007; Karim *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2007). Miranda *et al.* (2007) construyeron la fusión traduccional quimérica trehalosa-6-fosfato sintasa/fosfatasa (TPS-TPP) de levadura que codifica para las enzimas involucradas en la síntesis de trehalosa y la sobreexpresaron en *Arabidopsis thaliana*, obteniendo líneas con un incremento significativo de tolerancia a sequía, heladas, salinidad y calor. Lo anterior abre la posibilidad de convertir a otros cultivos importantes como el maíz, resistentes a la sequía, desde el punto de vista de resistencia en ciertos períodos de escasez de agua. Por lo cual el objetivo del presente trabajo es obtener y caracterizar plantas transgénicas de maíz (*Zea mays* L) que acumulen trehalosa, con mayor tolerancia a estrés abiótico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se utilizó la línea tropical CML72 (amarilla) proveniente del Centro Internacional de Mejoramiento Genético de Maíz y Trigo (CIMMYT), la cual fue utilizada en trabajos anteriores expresando un alto porcentaje de regeneración (Bohorova *et al.*, 1995). Ésta línea fue crecida bajo condiciones de invernadero y autopolinizada para obtener semilla y embriones maduros con los cuales se obtuvo callo embriogénico tipo I que se utilizó para la transformación.

El protocolo para obtener callo a partir de embriones maduros fue tomado de Sidorov *et al.* (2006) y en donde se reporta que a partir de plantas polinizadas se dejó madurar la semilla, se extrajeron los embriones los cuales se germinaron en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), en esta parte del trabajo el medio MS constó de Sales y vitaminas MS, maltosa 40 g.L⁻¹, caseína hidrolizada 0.1 g.L⁻¹, MES 1.95 g.L⁻¹, cloruro de magnesio 0.75 g.L⁻¹, glutamina 0.5 g.L⁻¹, ácido ascórbico 0.1 g.L⁻¹, picloram 10 mg.L⁻¹ y de BAP 3 mg.L⁻¹, pH 5.8 y 8 g.L⁻¹ de agar. Una vez germinados los embriones (2-3 días), se obtuvieron las secciones nodales de las plántulas a partir de las cuales se genera callo embriogénico. Estos se mantuvieron en medio de cultivo con sales y vitaminas MS, tiamina-HCL 0.5 g.L⁻¹, caseína hidrolizada 0.5 g.L⁻¹, sacarosa 30 g.L⁻¹, L-prolina 1.38 g.L⁻¹, nitrato de plata 15 mg.L⁻¹, 2-4D 0.5 mg.L⁻¹ y picloram 2.2 mg.L⁻¹, pH 5.8 y 8 g.L⁻¹ de agar. Una vez que se obtuvo callo (3-4 semanas) éste se

mantuvo en medio compuesto por sales y vitaminas N6 más caseína hidrolizada 200 mg.L⁻¹, L-prolina 2.302 mg.L⁻¹, sacarosa 30 g.L⁻¹, ácido 3,6-dicloro-O-anísico (Dicamba) 2 mg.L⁻¹ y nitrato de plata 15.3 mg.L⁻¹, pH 5.8 y 8 g.L⁻¹ de agar (Bohorova *et al.*, 1995).

Transformación

La transformación se llevó a cabo mediante agroinfección y bombardeo utilizando los genes quiméricos : *35S::ScTPS1TPS2::NOS* y *Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS* (Miranda *et al.*, 2007) con el gen bifuncional de trehalosa (*ScTPS1TPS2*) en el vector *pGreen0229* ó el vector *pTF101.1* (Anexos 4).

Agroinfección

El protocolo fue modificado del presentado por Vega *et al.* (2008). La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 fue utilizada en el presente estudio. La cepa de *Agrobacterium* se tomó directamente del vial que se encontraban en glicerol a -20 °C y se incubó por 3 días a 28 °C en medio LB (Sigma L-3152) solidificado con 15.0 g L⁻¹ de bacto- agar (Difco) hasta que se formaron colonias aisladas; las colonias resultantes fueron seleccionadas con rifampicina 100 mg L⁻¹ + kanamicina 50 mg L⁻¹ para el vector *pGreen0229* y rifampicina 100 mg L⁻¹ + estreptomicina 50 mg L⁻¹ para el vector *pTF101.1*. A partir de este cultivo y se hizo una re-inoculación en 50 ml de medio líquido LB. Los cultivos se crecieron hasta una densidad óptica $D.O_{600}=1.0$.

Con la finalidad de optimizar las condiciones de agroinfección se realizó un ensayo de expresión transitoria con el gen gus expresado a partir de la construcción 35S::GUSint en el vector pGreen0229 y la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, tomando como principales variables a observar el tiempo esperado después de resuspender la bacteria, antes de realizar la infección y el tiempo de co-cultivo. Tres tratamientos fueron evaluados: 1) Infección hecha después de 2 horas de haber resuspendido la bacteria y 3 días de co-cultivo; 2) Infección hecha después de 20 min de haber resuspendido la bacteria y 3 días de co-cultivo; y 3) Infección hecha después de 2 horas de haber resuspendido la bacteria y 4 días de co-cultivo. Las tinciones se realizaron 3 días después de la agroinfección con X-gluc y se observó el porcentaje de tinción para decidir las mejores condiciones a utilizar con los genes de interés.

Para la agroinfección con los genes de interés, callos que habían sido sembrados en medio N6, fueron removidos de éste medio y colocados medio de infección, el cual consiste de: sales y vitaminas N6 a la mitad de su concentración más sacarosa 68.5 g.L⁻¹, glucosa 36 g.L⁻¹, L-prolina 0.7 g.L⁻¹, MES 0.5 g.L⁻¹, 2,4- D 1.5 g.L⁻¹, nitrato de plata 0.85 mg.L⁻¹ y acetosiringona 100 µM con un pH de 5.2. Se hicieron 3 lavados en este medio, después de los cuales se les adicionó la suspensión de *Agrobacterium* dejando los explantes inmersos con la bacteria durante 20 minutos, para después retirar el excedente de bacteria y los callos fueron transferidos a cajas de Petri de 100x15 mm que contenían el medio de co-cultivo, el cual consiste de: sales N6 y vitaminas N6 más sacarosa 30 g.L⁻¹, L-prolina 0.7 g.L⁻¹, MES 0.5 g.L⁻¹, 2,4- D 1.5 g.L⁻¹, nitrato de plata 0.85 mg.L⁻¹, L-

cisteína 0.4 g.L⁻¹, DTT 0.1 5 g.L⁻¹ y acetociringona 100 µM. El pH fue ajustado a 5.8 y fue solidificado con 8 g L⁻¹ de bacto- agar (Difco). Las cajas con los callos infectados se mantuvieron en co-cultivo por 2-3 días en oscuridad y a 26 °C.

Después del co-cultivo, el callo fue transferido a cajas petri 100 x15 mm con medio N6 sin herbicida pero con el antibiótico Meropenem 25 mg L⁻¹ (Ogawa y Mii, 2007) por 1 semana. Después de esa semana la selección se llevó a cabo en 3 fases: en la primera, la selección se realizó por 3 semanas en medio N6 con 2.0 mg L⁻¹ de herbicida PPT (2-amino-(metilfosfinil) ácido butanoico) (fosfonitricina, Duchefa); en la segunda, se adicionó 4.0 mg L⁻¹ de PPT al medio y se mantuvo por 3 semanas y en la tercera se adicionó 6.0 mg L⁻¹ de PPT al medio y se mantuvo por 2 semanas más. Durante toda la selección se agregó 25 mg L⁻¹ de Meropenem al medio de cultivo para evitar la proliferación de la bacteria. Las cajas Petri se mantuvieron en la cámara de incubación en oscuridad y a una temperatura de 26 °C. Después de la selección se contabilizó el número de callos que sobrevivieron y se obtuvo el porcentaje de resistencia a PPT.

Bombardeo

El protocolo para realizar el bombardeo fue modificado del utilizado por (Bohorova *et al.*, 1999). Como blancos del bombardeo se utilizó callo embriogénico generado a partir de embriones maduros. Cuatro horas antes del bombardeo los callos fueron trasferidos a medio osmótico (medio N6 pero suplementado con 3.64 % de maltosa). Las condiciones óptimas de bombardeo

fueron determinadas haciendo un experimento donde se probaron dos tamaños de partículas (0.6 y 1 μm), dos distancias de disparo (6 y 9 cm) y cuatro discos de ruptura (650, 900, 1100 y 1350 psi). Después de realizar las tinciones con X-gluc se observó el porcentaje de tinción para definir el mejor tratamiento. De acuerdo a los resultados obtenidos en la optimización, el bombardeo de los genes de interés se realizó con una pistola de genes PDS 1000/He (Bio-Rad), con disparos de 1,100 psi del disco de ruptura, con un tamaño de partículas de 0.6 μm , membrana de ruptura de 650 psi, utilizando 120 ng de ADN y distancia de 6 cm. Una hora después del bombardeo los explantes fueron transferidos al medio N6 sin herbicida por 1 semana. La selección de callo transformado se llevó a cabo de la misma manera que en el método de agroinfección.

Ensayo de resistencia a PPT

Con la finalidad de optimizar la selección de los callos transformados, se realizó un experimento de resistencia a PPT en callos sin transformar obtenidos de embrión maduro. En el medio N6 utilizado para propagación de callo (mencionado anteriormente) fue adicionado PPT a 0, 2, 4, 6, 8 y 10 mg L^{-1} , se colocaron 30 callos en cajas de Petri y se contabilizó el porcentaje de sobrevivencia a los 10, 15, 20 y 25 días después de haber sido colocados en medio.

Regeneración, aclimatación y crecimiento en invernadero

La obtención de brotes germinados a partir de embriones somáticos se realizó transfiriendo los callos embriogénicos a cajas Magenta con medio de regeneración que consta de sales y vitaminas MS, suplementado con inositol 100 mg.L^{-1} , tiamina 0.4 mg.L^{-1} , extracto de malta 250 mg.L^{-1} , sulfato de adenina 80 mg.L^{-1} , 30 g.L^{-1} de sacarosa, 0.5 mg.L^{-1} AIA y 1 mg.L^{-1} de BAP. El pH fue ajustado a 5.8 y fue solidificado con 8 g L^{-1} de bacto- agar (Difco). Las cajas fueron incubadas en cuartos de crecimiento a $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, proporcionada por lámparas de luz blanca fría fluorescente con una intensidad lumínica de $68 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Una vez que los brotes embriogénicos crecieron se transfirieron a frascos de vidrio con medio de enraizamiento que consta de sales y vitaminas MS, suplementado con myo-inositol 100 mg.L^{-1} , tiamina 0.4 g.L^{-1} , extracto de malta 200 mg.L^{-1} , sulfato de adenina 40 mg.L^{-1} , sacarosa 20 g.L^{-1} y ANA 1 mg.L^{-1} y se mantuvieron en las mismas cámaras de crecimiento bajo las mismas condiciones que en la regeneración.

Para realizar la transferencia a suelo, a las plantas se les eliminó el agar lavando las raíces con agua destilada estéril; a continuación se transfirieron a vasos de plástico de 150 ml que fueron utilizados como maceta, con una mezcla de peatmoss 50 % , agrolita 25 % y vermiculita 25 % como sustrato, cada maceta fue cubierta con otro vaso de plástico por 2 semanas para una mayor adaptación, y se mantuvieron en la cámara de crecimiento; una vez transcurrido este tiempo se trasladaron a un

invernadero donde se trasplantaron en bolsas de plástico negro (35X35 cm) con la misma mezcla de sustrato, para desarrollar las plantas hasta la producción de semilla. Durante la etapa de crecimiento las plantas fueron regadas con solución nutritiva Steiner. En las primeras 4 semanas la solución nutritiva se aplicó al 50 %, posteriormente y hasta el final del cultivo se aplicó al 100 %. Los riegos fueron realizados dos veces a la semana con 1 L⁻¹ de solución en cada uno y se alternó con un riego de agua sin ningún fertilizante, una vez al mes, con la finalidad de eliminar el exceso de sales en el sustrato.

En ésta etapa se contabilizó el número de plantas que sobrevivieron en el invernadero para obtener de ésta forma la eficiencia de transformación que se tomó como número de plantas crecidas en el invernadero con respecto al número de callos inoculados, expresado en porcentaje.

Las plantas que tuvieron flor femenina fueron polinizadas por la línea isogénica no transformada para la obtención de semilla; una vez que se obtuvo la madurez del grano se sembraron de una a seis semillas por cada evento bajo condiciones de invernadero para obtener la generación T1, una vez que llegaron a la floración se realizaron las siguientes cruza: Cruza 1: Autofecundación del evento (en las que hubo sincronía en la floración) ó cruza 2: Se cruzó la T1 con la línea isogénica no transformada.

Extracción de ADN y análisis del transgen por PCR

A todas las plantas potencialmente transformadas (generación T_0) se les extrajo ADN genómico con el método de Dellaporta *et al.* (1983) con aproximadamente 100 mg de tejido de hoja que fue pulverizado en nitrógeno líquido en tubos Eppendorf de 1.5 ml, adicionando buffer de extracción (375 μ l). Cada ADN fue precipitado con isopropanol y disuelto en TE, además se le agregó una solución de ARNasa al 1 %, y posteriormente se volvió a precipitar con acetato de sodio 3M e isopropanol; finalmente se lavó con etanol al 70 %, dos veces, se resuspendió en 20 μ l de TE y se almacenó a 4 °C. La concentración fue determinada usando un espectrofotómetro Nanodrop. La calidad del ADN se observó en un gel de agarosa al 0.8 %, que se corrió a 150 volts y se tiñó con bromuro de etidio (10 μ g ml^{-1}) visualizados bajo luz UV en fotodocumentador (Vilber Lourmat).

La reacción de amplificación fue llevada a cabo en 25 μ l y contenía: 1 μ l de ADN (20 ng de ADN 2.5 μ l buffer PCR 1x, 2.0 μ l de dNTPs (2 mM), 2.0 μ l de cada iniciador TPS1 ó TPS2 sentido y antisentido (10 μ M) y 0.2 μ l de Taq polimerasa (1 unidad), y se realizó en un termociclador (MaxyGene Gradient). Se amplificó 498 pb del gen *ScTPS1* $TPS1$ -5': 5'-GTTGGAAGGGTTGAAGAAGA-3' y $TPS1$ -3': 5'- TGAACCCGACTAAATCACA-3' ó 230 pb $TPS2$ - 5': 5'-ATCAACATGGCAAACCACAG-3' y $TPS2$ -3': 5'-ACCAGACTTTGGAAGAGAGA-3'. El programa térmico consistió de una entrada a 95 °C por 4 min, después 35 ciclos con un paso de desnaturalización a 95 °C por 1 min, un paso de

alineamiento 53 ó 50 °C (para el iniciador TPS1 y TPS2 respectivamente) por 1 min y un paso de extensión a 72 °C 1 min. Después de los 35 ciclos se hizo la salida a 72 °C por 10 min más. Entonces los productos de la amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 1.6 %, poniendo 20 µl de la reacción más 5 µl de buffer de carga, se corrió a 150 volts teñidos con bromuro de etidio (5 µg ml⁻¹), visualizados y fotografiados bajo luz UV en fotodocumentador (Vilber Lourtmant).

Evaluación de tolerancia a sequía

Las semillas de líneas T₀ transformadas con el vector pGreen0229 que amplificaron en la PCR fueron sembradas en invernadero y las plantas fueron sometidas a un experimento para corroborar la susceptibilidad o tolerancia a la sequía. Se sembraron 8 semillas en bolsas de plástico 35x35 cm con una mezcla de sustrato de peatmoss 50 %, agrolita 25 % y vermiculita 25 %. Cuando las plantas tenían 2 meses se les suspendió el riego hasta que presentaron síntomas de daño por sequía. En ese momento se extrajo una porción de la hoja de aproximadamente 3 cm de largo, las cuales fueron colocadas en bolsas de plástico inmediatamente después de cortarlas para evitar la evaporación. Las secciones de hoja fueron removidas de las bolsas para tomar el peso a cada una y obtener así el peso de la masa fresca. Cada porción de hoja se colocó en cajas de Petri con agua destilada por 12 horas para rehidratarlas, durante este tiempo se mantuvieron en un refrigerador a 4 °C; después de la hidratación cada hoja fue secada con papel filtro hasta eliminar el exceso de agua y fue pesada inmediatamente para obtener el peso de la masa turgente.

Finalmente fueron secadas a 80 °C por 72 horas y nuevamente pesadas para obtener el peso de la masa seca. El contenido relativo de agua fue determinado usando la siguiente ecuación como se reporta en Nguyen *et al.* (2013):

$$\text{CRA (\%)} = [(MF - MS)/(MT - MS)] \times 100,$$

Donde: CRA= Contenido relativo de agua, MF- masa fresca, MS- masa seca,
MT- masa turgente

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos de expresión transitoria

Para realizar la transformación con *Agrobacterium* se evaluó el tiempo de inmersión con la bacteria y el tiempo en co-cultivo. Se pudo observar (Figura 1- C) que al exponer a los callos a la bacteria, 2 horas después de resuspenderla y realizando un co-cultivo de 4 días, es el tratamiento con la cual se logra el mayor porcentaje de tinción (90 % dato no mostrado). Sin embargo, también debido a que el co-cultivo se llevó a cabo por 4 días se hizo más difícil el control de la bacteria y se optó por realizar una inmersión con la bacteria de 20 minutos, ya que no hubo diferencias entre 20 min y 2 horas (Figura 1 A y B), y hacer el co-cultivo por 2-3 días, para evitar la proliferación excesiva de la bacteria.

Esto coincide con lo encontrado por Huang y Wei (2005) quienes reportan que unos de los parámetros que influyen en la transformación de maíz por medio de *Agrobacterium* es el tiempo de inoculación y el tiempo de co-cultivo, siendo el mejor tiempo de inoculación para obtener el mayor porcentaje de callos resistentes a PPT, 20 min, y que hacerlo por un periodo de mayor tiempo (40 a 60 min) repercute de manera negativa en la transformación. Al igual que en el tiempo en co-cultivo, ya que al prolongarlo por más de 3 días resulta en una abundante proliferación de la bacteria y en un subsecuente decremento de la frecuencia de callos resistentes a PPT.

Para decidir qué condiciones deberían ser utilizadas para obtener una mayor eficiencia de transformación con la técnica de bombardeo, se probó, el tamaño de partículas de oro, la distancia del disparo y el tipo de membrana de ruptura. Los callos fueron colocados en cajas de Petri con medio osmótico 4 horas antes del bombardeo. Como se muestra en la Figura 1-D, después de 24 horas del bombardeo en los callos teñidos con X-gluc se observó la tinción (Figura 1-D y E). En el Cuadro 1 se puede observar los tratamientos y las frecuencia de tinción logradas con bombardeo. Al utilizar la combinación de partículas de 0.6 μm a una distancia de 9 cm y una membrana de ruptura de 1100 psi se logró que 100 % de los callos se tiñeran, por lo cual los bombardeos para insertar el gen TPS1-TPS2, se realizaron bajo esas condiciones.

Es importante tratar de optimizar los parámetros de bombardeo ya que en la mayoría de los casos de ello depende la eficiencia en la transformación. Frame

et al. (2000) lograron las mayores eficiencias de transformación (4.6 a 31.4 %) al utilizar partículas de oro de 0.6, mientras que con partículas de 0.9 μm la eficiencia fue de 0.0 a 1.9 %. Por otro lado, Pereira *et al.*, (2008) mencionan que las mejores condiciones para transformación por bombardeo son: realizar dos disparos a una presión de helio a 1100 psi y una distancia de 6 cm. De esa manera, sus frecuencias de transformación fluctuaron de 0.9-2.31 %.

Eficiencia de transformación en base a resistencia a PPT

Se pudo observar que los callos tipo I de la línea CML72 son susceptibles a la fosfonitricina ya que desde los 10 y hasta los 25 días después de poner callos embriogénicos en medio que contiene PPT se observa un decremento en la supervivencia del callo comparada con los que crecen en medio sin PPT. A los 25 días se observa la mayor tasa de susceptibilidad de callo en todas las dosis aplicadas. Sin embargo, a dosis de 8 y 10 mg L^{-1} esa susceptibilidad puede ser irreversible, haciendo que los callos se mueran y no se logre recuperación de transformantes, por lo cual las dosis para seleccionar el callo transformado fueron 2, 4 y 6 mg L^{-1} de PPT (Figura 2), y se distribuyeron de la siguiente manera: 3 semanas con 2.0 mg L^{-1} de PPT; 3 semanas con 4.0 mg L^{-1} de PPT y finalmente 2 semanas con 6.0 mg L^{-1} de PPT .

En cuanto a la eficiencia de la transformación medida como callos resistentes a PPT (Cuadro 2), se detectaron diferencias entre cada uno de los métodos utilizados; con agroinfección se obtuvieron eficiencias que van de 5.09 a 10.02 %

mientras al utilizar bombardeo la eficiencias de transformación disminuyeron de 2.25 a 4.83 %. Lo cual nos indica que utilizando el método de agroinfección se obtiene una mayor recuperación de callos resistente a PPT.

Nuestros resultados resultan mejores que los obtenidos por Ombori *et al.* (2013), quienes obtienen eficiencias de transformación como callos resistentes a PPT de 0 a 8.7 % utilizando el método de agroinfección, y lo atribuyen a un alto índice de oxidación y apoptosis de los callos después de la agroinfección. Y son muy cercanos a los encontrados por Frame *et al.*, (2002) quienes obtuvieron en promedio 5.5 % de eficiencia de transformación (no. de eventos resistentes a bialafos recobrados por 100 embriones infectados).

Por otra parte, Frame *et al.* (2006) reportan que al utilizar el vector pTF101.1 (mismo que el que fue utilizado en nuestra investigación) obtienen eficiencias de transformación (tomando como base callos resistentes a PPT) de 0.0 a 15 % cuando utiliza sales MS con 300 mg.L⁻¹ de cisteína o sin ella, mientras que al utilizar sales N6 con 300 mg.L⁻¹ de cisteína o sin ella, únicamente obtiene 0.0 a 2.3 % de eficiencia de transformación. Respecto al uso de sales N6, estos resultados habían sido también obtenidos por Ishida *et al.* (1996) quienes mencionan que con un medio a base de sales N6 no obtuvieron callos resistentes a PPT, por lo cual el medio que contenía sales LS fue mejor para obtener una mayor eficiencia de transformación. Lo cual contradice a nuestros resultados ya que utilizando el vector pTF101.1 obtuvimos una frecuencia de transformación

promedio de 5.9% (en base a callos resistentes a PPT), a pesar de utilizar el medio de cultivo N6.

Regeneración de posibles transformantes (T0) y crecimiento de la progenie (T1)

La línea CML72 utilizada en este trabajo es una buena fuente de callo embriogénico tipo I ya sea cuando éste se obtiene de embriones inmaduros como cuando se obtiene de embriones de semillas maduras (Figura 3-B y C). El primer requerimiento de un blanco óptimo para transformación es que los tejidos o las células que reciben el ADN exógeno sean cultivables *in vitro*, de activa división y capaces de formar plantas fértiles (O'Connor-Sánchez *et al.*, 2002) La línea CML72 es apta para la producción de callo embriogénico tipo I y para la regeneración de plantas (Bohorova *et al.*, 1999). La producción de callo embriogénico tipo I se corrobora en el presente trabajo y además demostramos que dicho callo puede ser obtenido tanto de los embriones inmaduros, como tradicionalmente se hacía, como de embriones de semilla madura. Lo cual facilita la obtención de callo sin tener que condicionarse a los requerimientos de obtención de embriones inmaduros como son, tamaño de embriones y días después de polinización (O'Connor- Sánchez, 2002; Sidorov *et al.*, 2006). Frame *et al.* (2006), reportan la obtención de brotes y plantas transformadas a partir de callo tipo I; al igual que sucedió con la línea CML72 que utilizamos en la presente investigación.

Después de 8 semanas en selección (Figura 3-A) las secciones de callo que sobrevivieron fueron transferidas a medio sin PPT para propiciar el incremento de callo embriogénico. Cuando el callo alcanzó un tamaño adecuado se transfirió a medio de regeneración (Figura 3-D), donde después de 3 semanas en el mismo se regeneraron plántulas posiblemente transformadas de manera exitosa, sin embargo la sobrevivencia al adaptarlas *ex vitro* fue baja (25 % aproximadamente).

Después enraizar y adaptar las plántulas, éstas se crecieron en el invernadero y al cabo de seis meses se lograron tener plantas T_0 que presentaron algunas variaciones morfológicas respecto al material parental (Figura 3 E, F, G y H). La principal variación fue la ausencia de inflorescencia masculina, en casi la mayoría de las plantas, y femenina en algunas plantas; sin embargo, de las plantas en las que se tuvo inflorescencia femenina se obtuvo semilla polinizándola con la línea isogénica no transformada y se sembró la generación T_1 en la cual se pudo observar una recuperación exitosa del fenotipo (Figura 3-I).

Las variaciones somaclonales en cultivo de tejido de maíz son bastante comunes. Ishida *et al.* (1996) reportan que de 120 plantas resistentes a PPT y positivas a GUS de la línea A188, la mayoría (cerca del 70 %) de ellas produjeron tantas semillas como las plantas control. Huang y Wei (2005) reportaron haber obtenido 42 líneas morfológicamente normales, pero reportan que solo 85 % de ellas fueron fértiles. Frame *et al.* (2006) reportan la obtención de 9 a 71 % de eventos fértiles T_0 . Lo cual coincide con nuestros resultados ya que sólo un 60 % de las líneas obtenidas fueron fértiles y se pudieron obtener semillas. Liu *et al.* (2009) reportan

que de la línea 18-599 (roja) usada en transformación por bombardeo, de 295 callos puestos a regenerar en 180 de ellos obtuvieron plantas verdes, después de enraizar y aclimatar las plantas 34 fueron trasplantadas en el invernadero y finalmente sólo 9 crecieron hasta la obtención de semilla. Almeida, *et al.* (2007) reportaron como única variación fenotípica observada en plantas T₀ una disminución en el tamaño, y en semillas T₁ observaron principalmente carencia de endospermo. Gordon-Kamm *et al.* (1999) describe la aparición de variaciones fenotípicas en plantas T₀ como, hojas palmadas, hojas divididas, marchitamiento, estigmas gruesos, y espigas subdesarrolladas, flores pistiladas desarrolladas en las espigas, carencia de mazorcas la cual fue exclusiva de algunas líneas, así como el fenotipo pastoso (con hojas largas y estrechas) y la senescencia prematura; estas diferencias las atribuyen a variaciones somaclonales. Esas y otras variaciones genéticas y citogenéticas en plantas regeneradas de callo embriogénico de maíz han sido ampliamente documentadas (Phillips *et al.*, 1977; Lee y Phillips, 1987; Olhoft y Phillips, 1995; Kaepler *et al.*, 2000; Cardone *et al.*, 2010).

Eficiencia de transformación en base a la detección del gen de interés

Se obtuvo una eficiencia de transformación mayor al utilizar el método de transformación por agroinfección (0.28 %) que el de bombardeo (0.15 %), al evaluarla en base a las plantas T₀ positivas a PCR. Además, la combinación a la cual se obtiene la mayor transformación (0.4 %) es al utilizar el vector pTF101.1 con el promotor 35-S.

Lo cual concuerda con Shou *et al.* (2004), quienes mencionan que es posible que, al utilizar el método de bombardeo, eventos con un alto número de copias del gen *bar* y del gen *NPK1* pudieron no haber sobrevivido debido al silenciamiento inducido por el número excesivo de copias del transgen en tales eventos, ya que en los que sí lograron sobrevivir contabilizaron que en un 67 % de los eventos obtenidos por bombardeo contenían más de 10 copias del transgen. Con lo cual confirman que la transformación con *Agrobacterium* da como resultado un bajo número de copias del transgen en las transformantes. A su vez, se reitera que este es un mejor método para realizar transformación genética. Así mismo, Dai *et al.* (2001) confirmaron que la transformación mediada por *Agrobacterium* es un buen sistema para obtener plantas con menor número de copias, con una expresión del gen foráneo intacto y estable, mientras que, el método de bombardeo de partículas es un sistema altamente eficiente para producir un gran número de plantas transgénicas con un amplio rango de expresión del gen. De igual manera, Zaho *et al.* (1998) obtuvieron una eficiencia de transformación de 39.8 % con *Agrobacterium* mientras que solo de un 10 % al utilizar bombardeo, tomando como eventos de transformación aquellos que tuvieran un bajo número de copias y un simple patrón de inserción del transgen.

En cuanto a los vectores utilizados obtuvimos que, empleando el vector pGREEN0229 se agoinfectaron 1254 callos y se bombardearon 2000 callos. En total se obtuvieron 47 eventos, 38 con la construcción bifuncional Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS y 9 con la construcción bifuncional 35S::ScTPS1-TPS2::NOS (Cuadro 2). De esos 47 eventos, sólo en 28 se obtuvieron semilla, los

demás presentaron deformaciones como la falta de floración femenina y masculina que impidieron se obtuviera semilla; de las 28 líneas que sí tuvieron semilla se sembraron para obtener semilla de la generación T1 (Figura 3-I) y se pudo observar que el fenotipo fue normal en todas las plantas logrando la obtención de semillas en la totalidad de ellas. Con el vector pTF101.1 se agroinfectaron 1786 callos, de los cuales se obtuvieron 13 eventos con la construcción bifuncional Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS y 17 con la construcción bifuncional 35S::ScTPS1-TPS2::NOS (Cuadro2). De los 30 eventos obtenidos sólo en 6 de ellos se obtuvieron semillas debido a la falta de floración femenina en las plantas y desafortunadamente, no hubo coincidencia entre las plantas con las que se obtuvo semilla y las que dieron positivo en las pruebas de PCR. Los análisis de PCR al ADN genómico revelaron la presencia del fragmento de 320 pb del gen TPS2 de la bifuncional en plantas T₀ posiblemente transformadas usando ambos vectores; el vector pGREEN0229 tanto por agroinfección como por bombardeo (Cuadro 2 y Figura 4) y con el vector pTF101.1 aunque éste último solo se utilizó con agroinfección (Cuadro 2 y Figura 5). La eficiencia de transformación basada en plantas T₀ positivas a PCR varió de 0 a 0.2 % usando el vector pGREEN0229 y de 0.09 a 0.4 % usando el vector pTF101.1. Así mismo puede observarse que, se obtiene una mayor eficiencia de transformación al utilizar como vector el pTF101.1 (0.2 %) que al utilizar el vector pGREEN0229 (0.1 %).

Muchos son los factores que afectan la eficiencia de la transformación, Frame *et al.* (2006) mencionan que al utilizar el vector pTF101.1 en la cepa de

Agrobacterium EHA101 obtuvieron una consistente pero baja eficiencia de transformación (0.2 %), cuando infectaron embriones inmaduros y los co-cultivaron en medio N6 o MS con 300 mg.L⁻¹. Sus datos coinciden con los nuestros ya que, que utilizando el vector pTF101.1 logramos eficiencia de transformación de 0.9 y 0.4 %. Por su parte Almeida *et al.* (2007), utilizaron el vector pGREEN0229 para insertar el gen *AtTPS1* en maíz por electroporación, y reportan que de 16 plantas obtenidas por regeneración en 9 de ellas detectaron el gen por PCR, indicando una eficiencia del 50 %, sin embargo, únicamente toman en cuenta las plantas regeneradas con lo cual se incrementa significativamente la eficiencia. Al realizar el análisis Northern blot no se detectaron expresión del gen *AtTPS1*, esto posiblemente fue debido a una inserción incompleta de gen o un nivel de expresión extremadamente bajo. Por otra parte, los resultados que obtuvimos utilizando el método de agroinfección coinciden con los encontrados por Ombori *et al.* (2013) quienes reportan haber obtenido frecuencias de transformación basadas en plantas positivas a PCR que van de 0 a 2.1 %, ellos lo atribuyen a la muerte y necrosis de embriones y callos de maíz que fueron agroinfectados.

También se menciona que pueden existir escapes generados durante la selección, lo cual pudo haber sucedido en el presente trabajo, ya que a pesar de obtener varias líneas resistentes a PPT, no todas expresan el gen de interés. Gordon- Kamm *et al.* (1990) mencionan que debido al bombardeo de partículas puede haber aparición de tejido quimérico. Los cuales pueden surgir como resultado ya sea de una protección cruzada del tejido no transformado por el tejido

transformado o por múltiples eventos de transformación dentro de una población de células que darán lugar una línea de callos seleccionados. Park *et al.* (1998), citado por Howe *et al.* (2002) dice que, estos escapes son el resultado de la desintoxicación del agente selectivo por células, los cuales son transitorios, o que expresan establemente el marcador de selección, creando una zona de "protección cruzada" con una presión selectiva reducida para las células vecinas de tipo silvestre.

Evaluación de tolerancia sequía

Después de mantener a las plantas T₁ por 90 días sin agua, las plantas transformadas mostraron mayor resistencia a la falta de agua, como se puede observar en la gráfica de la figura 6, el contenido de humedad relativa en las hojas de las plantas transformadas es mayor (68.2, 62.7, 64.1 %) en comparación con las plantas control (43.9 %). En promedio en las plantas transformadas había un 56.25 % de plantas verdes, 25 % de plantas semi-secas y 12.5 % de plantas completamente secas; mientras que en la plantas control únicamente había plantas semi-secas en un 37.5 % y plantas completamente secas en un 62.5 %. En un periodo de sequía de 90 días, sobrevivieron 43 % de las plantas transgénicas mientras que de las plantas no transformadas sobrevivieron solo 12.5 %.

Como se esperaba, al sobre expresar el gen bifuncional *ScTPS1-TPS2* nuestros resultados coinciden con los encontrados por Miranda *et al.* (2007) quienes

encontraron que líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobre expresaron la enzima bifuncional ScTPS1-TPS2 de levadura presentaban un incremento en tolerancia a sequía, frío, salinidad y calor. Utilizando la misma construcción en crisantemo se observó que, las líneas que sobre expresaban el gen bifuncional TPS1-TPS2 presentaban mayor tolerancia a sequía (Valle *et al.*, 2008).

Dentro de las propiedades de la trehalosa están la estabilización de proteínas y membranas bajo condiciones de estrés, especialmente durante desecación, reemplazando el agua a través de uniones de hidrógeno a residuos polares, la trehalosa previene la desnaturalización de proteínas y la fusión de membranas (Crowe *et al.*, 1998 citado por Wingler, 2002). En años recientes ha habido un interés creciente en el metabolismo de la trehalosa como un medio para realizar mejoramiento en los cultivos por medio de ingeniería genética contra el estrés abiótico (Penna, 2003). Garg *et al.* (2002) sobre expresaron los genes de trehalosa *otsA* y *otsB* de *Escherichia coli* en arroz. Las líneas obtenidas exhibieron un crecimiento sostenido de las plantas, menos daño foto-oxidativo, y un balance mineral más favorable bajo condiciones de estrés por salinidad, sequía y bajas temperaturas. Jang *et al.* (2003), produjeron plantas de arroz transgénico introduciendo un gen que codifica para una fusión bifuncional (TPSP) de trehalosa-6-fosfato (T-6-P) sintasa y T-6-P fosfatasa de *Escherichia coli*. Además de la acumulación de trehalosa en las plantas transformadas también tuvieron una incrementada tolerancia a sequía, salinidad y frío. Karim *et al.* (2007), observaron que la mayoría de las plantas de *Arabidopsis* transformadas

con el gen ScTPS1 de levadura se repusieron a la deshidratación, recuperando su crecimiento mientras que las plantas control no transformadas murieron y se blanquearon después de 72 hrs de rehidratación. También observaron la pérdida de peso durante estrés por sequía en plantas transgénicas y líneas control. Las líneas transgénicas mostraron una mejor retención de agua, sin embargo, en el contenido relativo de agua en hojas no encontraron diferencias entre transgénicas y controles.

CONCLUSIONES

De las plantas analizadas por PCR se logró detectar el genTPS2 en 10 eventos, por lo cual es necesario utilizar otro iniciadores y hacer pruebas Southern blot para detectar con mayor certeza el transgen.

Se logró una mayor eficiencia de transformación, tomada tanto como callos resistentes a PPT como plantas positivas a la PCR, al utilizar el método de agroinfección que al utilizar el método de bombardeo

Se obtuvo una mayor eficiencia de transformación al utilizar el vector el pTF101.1 que al utilizar el vector pGREEN0229.

Las líneas trasgénicas T₁ muestran mayor resistencia a sequía y un mayor contenido relativo de agua en hojas que las plantas control no transformadas.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca otorgada para llevar a cabo sus estudios de doctorado. y al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), por el financiamiento del proyecto 107PIC0312 para llevar a cabo esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Almeida, A. M.; Villalobos, E.; Araújo, S. S.; Cardoso, L. A.; Santos, D. M.; Santos, M. E. Fevereiro, P. F.; Torne, J. M. 2007. Electroporation of maize embryogenic calli with the trehalose-6- phosphate synthase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Physiologi Plant* 29:273–281.
- Avonce, N.; Leyman, B.; Mascorro-Gallardo, J.O.; Van Dijck, P.; Thevelein, J.M.; Iturriaga, G. The *Arabidopsis* Trehalose-6-P Synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiology* 136: 3649–3659.
- Bohorova, N. E.; Luna, B.; Brito, R. M. Huerta, L. D.; Hoisington, D. A. 1995. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude, and highland maize inbreds. *Maydica* 40 (1995): 275-281.

- Bohorova, N.; Zhang, W.; Julstrum, P.; McLean, S.; Luna, B.; Brito, R. M.; Diaz, L.; Ramos, M. E.; Estañol, P.; Pacheco, M.; Salgado, M.; Hoisington, D. 1999. Production of transgenic tropical maize with *cryIAb* and *cryIAc* genes via microprojectile bombardment of immature embryos. *Theor Appl Genet* 99:437-444.
- Brettschnider R.; Becker, D.; Lörz, H. 1997. Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. *Theor Appl Genet* 94:737-748.
- Bronsema F. B. F.; van Oostveen, W. J. F.; van Lammeren, A. A. M. 1997. Comparative analysis of callus formation and regeneration on cultured immature maize embryos of the inbred lines A188 y A632. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 50:57-65.
- Cardone S.; S. Olmos; V. Echenique 2010 Variación Somaclonal: En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. G Levitus, V Echenique, C Rubinstein, E Hopp, Mroginski (eds). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. pp: 229-241.
- Chu, C. C.; Wang, C. C.; Sun, C. S. 1975. Establishment of an efficient medium for another culture of rice trough comparative experiments on the nitrogen sources. *Science Sinica* 18:659-668.

- Dai, S.; Zheng, P.; Marmey, P.; Zhang, S.; Tian, W.; Chen, S.; Beachy, R. N. Fauquet, C. 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediate transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding* 7(1):25-33.
- Deikman, J.; Petracek, M.; y Heard, J. E. 2012. Drought tolerance through biotechnology: improving translation from the laboratory to farmers' fields. *Current Opinion in Biotechnology* 23:243–250.
- Dellaporta, S. L., Wood, J.; Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep. Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.
- Elbein, A.D.; Pan, Y.T.; Pastuszak, I.; Carroll, D. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13: 17R-27R.
- Frame, R. B.; Zhang, H; Cocciolone, M. S.; Sidorenko, V. L.; Dietrich, R. Ch.; Pegg, S. E.; Zhen, S.; Schnable S. P.; Wang, K. 2000. Production of transgenic maize from bombarded type II Callus: Effect of gold particle size and callus morphology on transportation efficiency. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 36:21-29.
- Frame, B.; Shou, H.; Chikwamba, R. K.; Zhang, Z.; Xiang, Ch.; Fonger, T. M.; Pegg, S. E. K.; Li, B.; Nettleton, D. S.; Pei, D.; Wang, K. 2002. *Agrobacterium*

tumefaciens - Mediated Transformation of maize embryos using a standard binary vector system. Plant Physiology Vol.129 pp: 13-22.

Frame, B.R.; McMurray, J. M.; Fonger, T. M.; Main, M.L.; Taylor, K.W.; Torney, F. J.; Paz, M.M.; Wang, K. 2006. Improved Agrobacterium-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. Plant Cell Rep 25: 1024–1034.

Furini, A.; Jewell, D. C. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature and mature embryos of tropical and subtropical *Zea mays* L. Genotypes. Maydica 39 (1994): 155-164.

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

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

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

Goddijn, J. M.; van Dun, K. 1999. Trehalose metabolism in plants. Trends in plant science 4(8):315-319.

Gordon-Kamm, W.J.; Spencer, T.M.; Mangano, M.L.; Adams, T.R.; Daines, R.J.; Start, W. G.; O'Brien, J.V.; Chambers, S.A.; Adams, W.R.Jr.; Willetts, N.G.; Rice, T.B.; Mackey, C. J.; Krueger, R.W.; Kausch, A.P.; Lemaux, P.G. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic Plants. *The Plant Cell* 2: 603-618.

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

Howe, A. R.; Gasser, Ch. S.; Brown, S. M.; Padgett, S. R.; Hart, J.; Parker, G. B.; Fromm, M. E.; Armstrong, Ch. L. 2002. Glyphosate as a selective agent for the production of fertile transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. *Molecular Breeding* 10: 153–164.

Huang, X.; Wei, Z. 2005. Successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of maize elite inbred lines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83: 187-200.

Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T., Kumashiro, T. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* 14:745-750.

Jang, I-C.; Oh, S-J.; Seo, J-S; Choi W-B.; Song, S. I.; Kim, Ch. H.; Kim, Y. S.; Seo, H-S.; Choi, Y. D.; Nahm, B. H.; Kim, J-K. 2003. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6phosphate synthase and trehalose-6-phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant physiology* 131:516-524.

Kaeppler, S. M.; Kaeppler, H.F.; Rhee, Y. 2000 Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 179–188.

Karim, S.; Aronsson, H.; Ericson, H.; Pirhonen, M.; Leyman, B.; Welin, B.; Mäntylä, E.; Palva, E. T.; Van Dijck P.; Holmström, K-O. 2007. Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. *Plant Mol Biol* 64:371–386.

Klein, T. M.; Fromm, M.; Weissinger, A.; Tomes, D.; Schaaf, S.; Sletten, M.; y Sanford, J.C. 1988. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles (gene transfer/cell culture). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 85: 4305-4309.

Lee, M. y Phillips R. L. 1987. Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. *Genome* 29: 122-128.

Liu, X.; Zhang, H.; Wu, Ch.; Tan, Z.; He, D.; Li, L. 2009 Establishment of a high-efficiency plant regeneration and transformation system for the elite maize inbred lines from three heterotic groups. *African Journal of Biotechnology* 8 (19): 4911-4917.

Miranda, J. A.; Avonce, N.; Suárez, R.; Thevelein, J. M.; Van Dijck, P.; Iturriaga, G. 2007. A bifunctional TPS–TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 226:1411-1421.

Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.

Nguyen, T. X.; Nguyen, T.; Alameldin, H.; Goheen, B.; Loescher, W.; y Sticklen, M. 2013. Transgene Pyramiding of the *HVA1* and *mtID* in T3 Maize (*Zea mays* L.) Plants Confers Drought and Salt Tolerance, along with an Increase in Crop Biomass. *International Journal of Agronomy* Article ID 598163, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/598163>.

O'Connor-Sánchez, A.; Cabrera-Ponce, J.L.; Valdez-Melara, M.; Téllez-Rodríguez, P.; Pons-Hernández, J.L., Herrera-Estrella, L. 2002. Transgenic maize plants of tropical and subtropical genotypes obtained from calluses containing organogenic and embryogenic-like structures derived from shoot tips. *Plant Cell Rep* 21:302–312.

- Ogawa, Yoichi; Mii, Masahiro. 2007. Meropenem y moxalactam: Nobel β -lactam antibiotics for efficient *Agrobacterium*-mediate transformation. *Plant Science* 172:564-572.
- Olhoft P.; R. L. Philips. 1995. Genetic and epigenetic changes induced by maize tissue culture. In: Procending. Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement. FAO. IABA. Viena (Austria).pp:187-198.
- Ombori, O.; Omondi, M. J. V.; Machuka, J. 2013. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of selected tropical inbred and hybrid maize (*Zea mays* L.) lines. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 113:11–23.
- Paliwal, R. L., Granados, G., Lafitte, H. R., y Violic, A. D. 2001. El maíz en los trópicos mejoramiento y producción. Editorial Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
(<http://www.fao.org/docrep/003/X7650S/x7650s00.HTM>)
- Penna, S. 2003. Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends in Plant Science* 8: 355–357.
- Pereira, P. C.; Portilho, C. N.; Corsetti, P. A. A.; Siqueira, C. C. H.; Donizeti, A. J.; Almeida C. A. 2008. Optimization of particle bombardment parameters for

the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 43 (3): 371-378.

Satoh-Nagasawa, N.; Nagasawa, N.; Malcomber, S.; Sakai, H.; Jackson, D. 2006. A trehalose metabolic enzyme controls inflorescence architecture in maize. *Nature* 441: 227-230.

Sharp, W. and Evans, D. A. 1984. Handbook of plant cell culture. *Crop Species* Vol. 2.

Sidorov, V.; Gilberston, L.; Addae, P.; Duncan, D. 2006. *Agrobacterium*-mediate transformation of seedling-derived maize callus. *Plant Cell Report* 25:320-328.

Shou, H.; Frame, B. R.; Whitham, S. A.; Wang, k. 2004. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding* 13: 201–208.

Valle-Sandoval, M.R. 2008. Obtención de plantas transgénicas de crisantemo (*Dendranthema x grandiflorum* Kitam) cv Indianapolis que acumulan trehalosa. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México. México. pp. 137.

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

Wingler, A. 2002. The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry* 60: 437-440.

Zhao Z. Y.; Gu W.; Cai T.; Tagliani L.A.; Hondred D. A.; Bond D.; Krell S.; Rudert M.L.; Bruce W. B.; Pierce D. A. 1998. Molecular analysis of T0 plants transformed by *Agrobacterium* and comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation with bombardment transformation in maize. *Maize Genet. Coop. Newsletter* 72: 34–37.

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

Cuadro 1. Evaluación de la expresión transitoria *gus* en callos bombardeados

Tamaño de partícula (µm)	Distancia de disparo (cm)	Disco de ruptura (psi)	Tinción (%)		
0.6	6	650	94		
		900	90		
		1100	82		
		1350	87		
	9	650	88		
		900	96		
		1100	100		
		1350	90		
		1	6	650	90
				900	96
1100	96				
1350	94				
9	650		96		
	900		93		
		1100	66		
		1350	69		

Cuadro 2. Eficiencia de transformación de maíz CML72 por agroinfección y bombardeo.

Método de Transformación	Vector	Construcción	Callos agroinfectados ó bombardeados (núm)	Callos resistentes a PPT (%) ^a	Plantas adaptadas ex vitro (núm)	Eficiencia de transformación basada en plantas adaptadas ex vitro (%) ^b	Plantas T ₀ positivas a PCR (núm)	Eficiencia de transformación basada en plantas T ₀ positivas a PCR (%) ^c
Agroinfección	pGREEN0229	Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS	798	10.02	25	3.1	2	0.2
		35S::ScTPS1-TPS2::NOS	456	7.62	9	2	1	0.2
	pTF101.1	Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS	1060	5.09	13	1.2	1	0.09
		35S::ScTPS1-TPS2::NOS	726	6.88	17	2.2	3	0.4
Bombardeo	pGREEN0229	Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS	1500	4.83	13	0.9	3	0.2
		35S::ScTPS1-TPS2::NOS	500	2.25	0	0	0	0

^a Número de callos resistentes a PPT con respecto al número total de callos agroinfectados o bombardeados x100

^bNúmero de plantas T₀ con respecto al número total de callos agroinfectados o bombardeados x 100.

^c Número de plantas T₀ que fueron positivas a la PCR con respecto al número total de callos agroinfectados o bombardeados x 100.

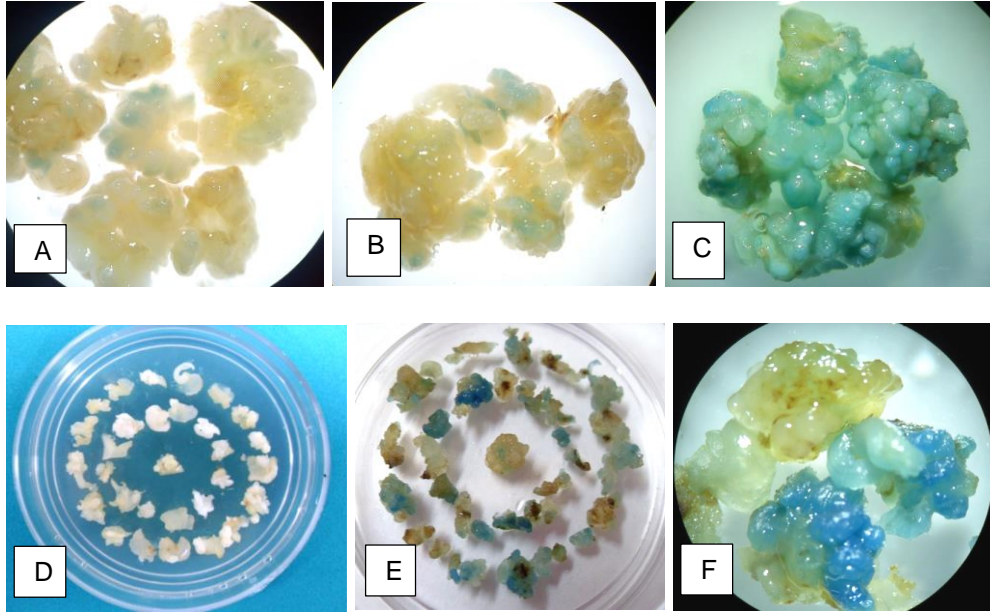


Figura 1. Ensayos de expresión transitoria del gen *gus* en callo embriogénico de maíz CML72. A, B y C, Expresión transitoria con agroinfección. A) Infección hecha 2 horas después de resuspender la bacteria, con 3 días de co-cultivo. B) Infección hecha 20 min después de resuspender la bacteria, con 2 días de co-cultivo. C) Infección hecha 2 horas después de resuspender la bacteria, con 4 días de co-cultivo. C, D y E Expresión transitoria con bombardeo. C) Colocación callos en medio osmótico antes del bombardeo. D) Tinción de callos después del bombardeo. E) Observación de la tinción en callos bombardeados.

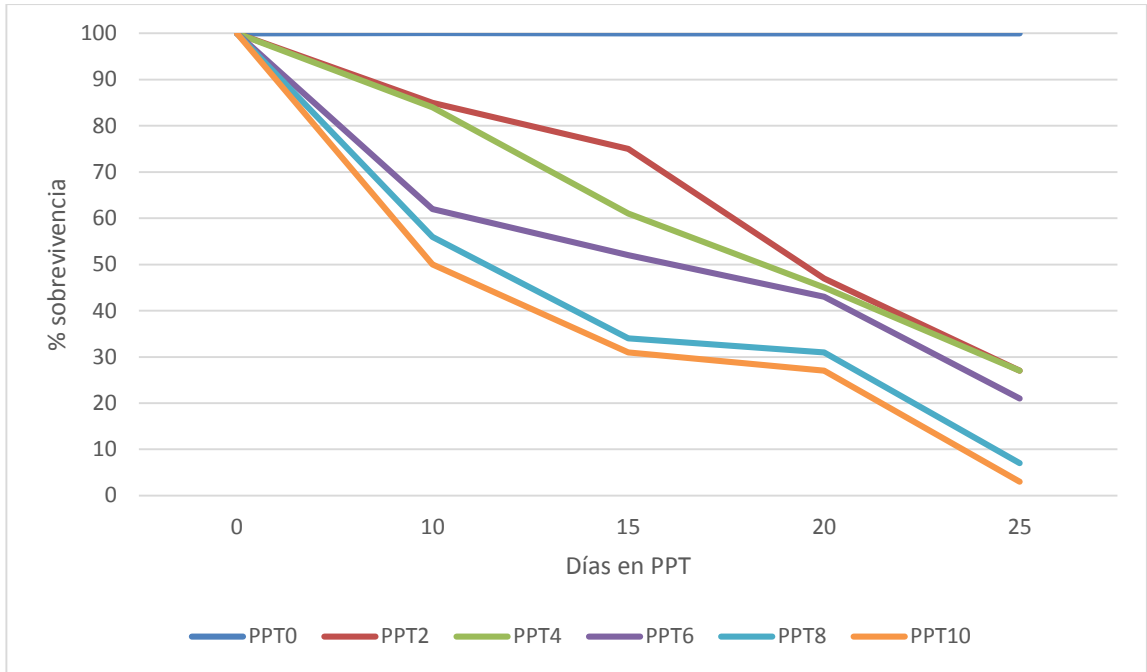


Figura 2. Evaluación de resistencia a diferentes concentraciones de PPT (mg.L^{-1}) de embriogénicos de maíz CML72 en un periodo de 25 días.

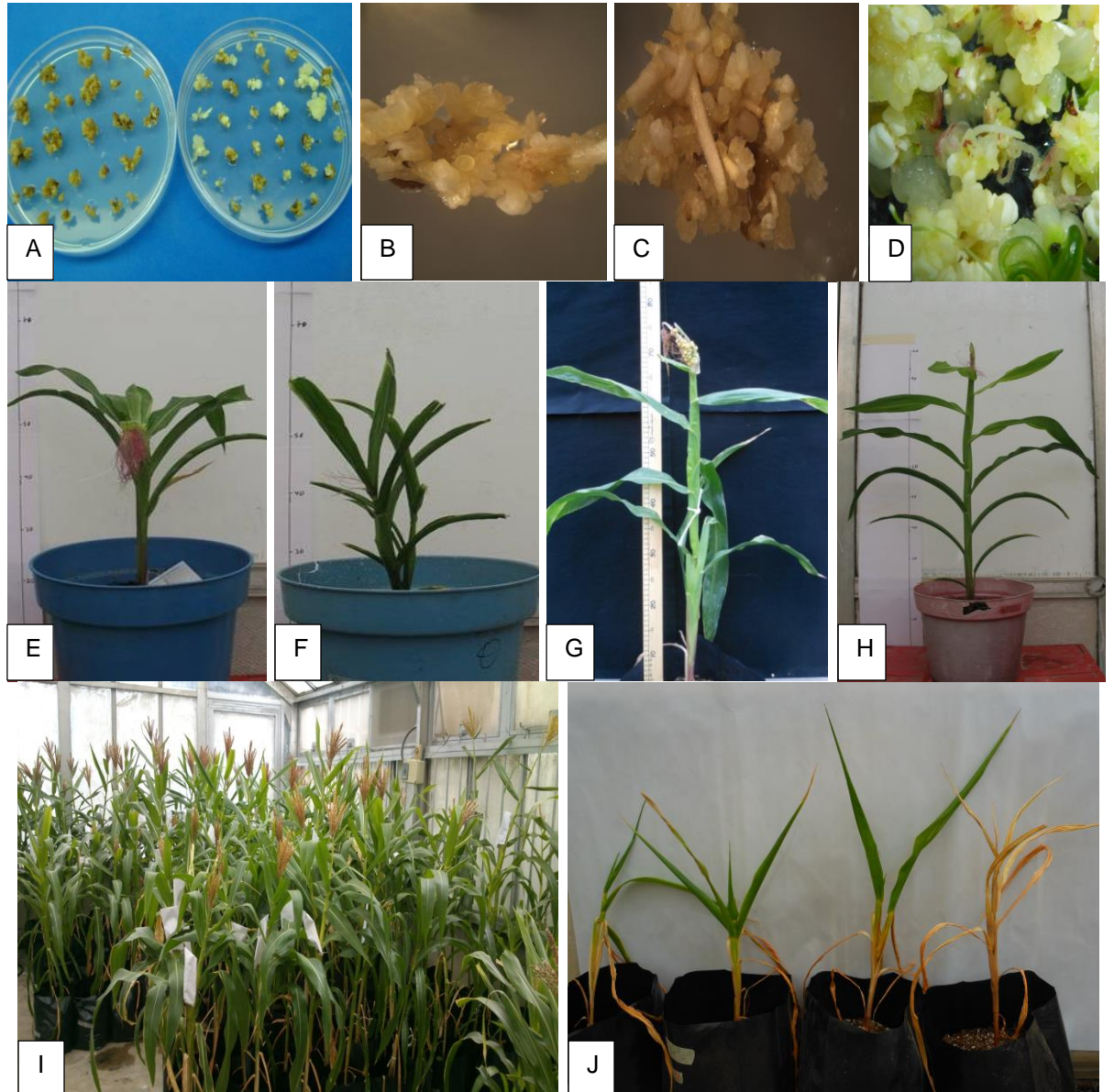
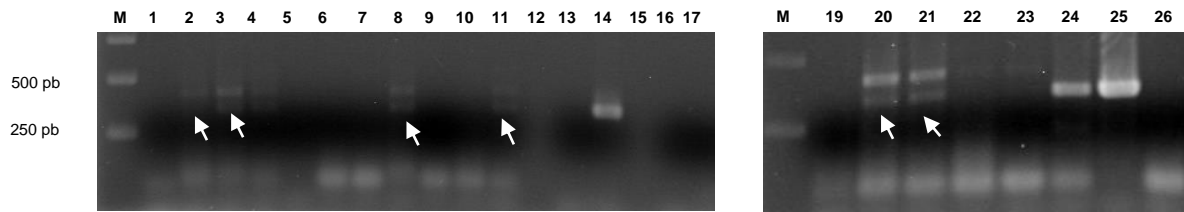
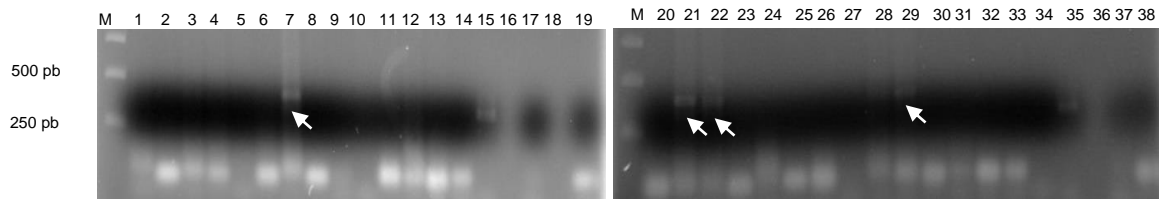


Figura 3. Cultivo in vitro y regeneración de maíz transgénico con tolerancia a sequía. A) Callos después de 8 semanas en selección con PPT (Izq. Control. Der. Callo transformado. B) y C) Callo en regeneración. D) Callos en regeneración con germinación de embriones somáticos., E) a H) Plantas T0 regeneradas y crecidas en el invernadero. I) Plantas T1 crecidas en invernadero. J) Plantas T1 sometidas a sequía, de izquierda a derecha las tres primeras son plantas transformadas, la cuarta planta es el control, no transformada.



Carril M: Marcador de peso molecular 1kb. Carril 1-11 y 19-23: ADN de plantas de maíz transformado. Carril 14 y 25: aplicación del control positivo (CML72 + pGREENRdBIF). Carril 16 y 26: control negativo, ADN de maíz no transformado. Carril 17: Control doble negativo muestra sin ADN. Las flechas indican la amplificación 320 pb del gen *ScTPS2*.

Figura 4. Análisis de PCR de plantas T0 transformadas con el vector pGREEN0229. Se amplificó el ADN total de 37 eventos usando el gen *TPS2* de la bifuncional (320 pb.)



Carril M: Marcador de peso molecular 1kb. Carril 1-14 y 20-33: ADN de plantas de maíz transformado. Carril 15 y 35: aplicación del control positivo (CML72 + pGREENRdBIF). Carril 19 y 38: control negativo, ADN de maíz no transformado. Las flechas indican la amplificación 320 pb del gen *ScTPS2*.

Figura 5. Análisis de PCR de plantas T0 transformadas con el vector pTF101.1. Se amplificó el ADN total de 27 eventos usando el gen *TPS2* de la bifuncional (320 pb.)

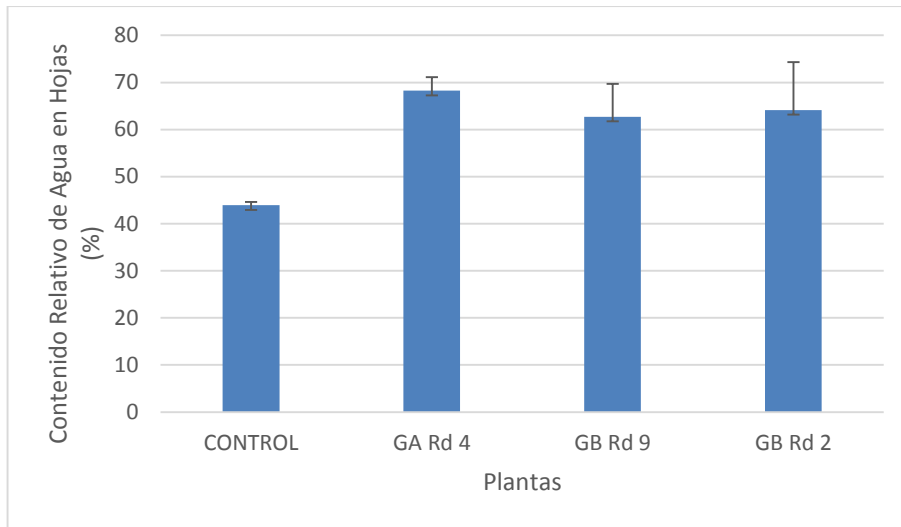


Figura 6. Contenido relativo de agua en hojas de plantas sin transformar y plantas transformadas, después de suprimir el riego.

5. DISCUSION GENERAL

Evaluación del cultivo *in vitro* y eficiencia en regeneración de la línea CML72

La ingeniería genética no podría ser implementada sin el uso del cultivo *in vitro*. Al someter a cultivo *in vitro* al maíz pueden inducirse tres tipos de callo de los cuales se puede obtener regeneración: callo organogénico, callo tipo I y callo tipo II (Sidorov, 2013). Se ha observado que ésta respuesta es altamente dependiente del genotipo, por lo cual, en esta investigación se decidió utilizar una línea de maíz que cumpliera con los requisitos de producir con alta eficiencia callo embriogénico y brotación. Sin embargo, hasta ahora la obtención de ese callo en la línea CML72 había sido realizada únicamente a través de la inducción de embriones inmaduros, mismos que deben tener características muy específicas para lograrlo, sin contar que la producción de embriones inmaduros de maíz es difícil y requiere de invernaderos bien equipados y de un control de la polinización artificial laboriosa. Además, la eficiencia de polinización artificial varía entre las estaciones (Krishna *et al.*, 2013). Utilizando medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con picloram 10 mg.L⁻¹ y BAP 3 mg.L⁻¹ para germinar los embriones por 3-5 días, posteriormente colocando las porciones nodales de cada embrión en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con picloram 10 mg.L⁻¹ y BAP 3 mg.L⁻¹ por 2 semanas, se logra la inducción de callo de 55% de los embriones maduros iniciados. Al igual que lo han logrado otros autores como Sidorov *et al.* (2006), Jia *et al.* (2008), Abebe *et al.* (2008), Krishna *et al.* (2013). Sidorov *et al.* (2006) indican que el callo embriogénico en embriones de semilla

madura podría ser iniciado de los nudos, localizados en el área del nudo coleoptilar (particularmente de primordios juveniles de hojas) o a través de formaciones de *novo* de embriones somáticos lo cual puede ocurrir en el área nodal.

Al comparar la regeneración obtenida como número de brotes transferidos a medio de enraizamiento se pudo determinar que es mayor estadísticamente el número de brotes generados de callos que provienen de embriones maduros que los que se obtienen al iniciar el callo de embriones inmaduros. Esto debido a un aumento en la producción de brotes en la última fecha en la que se regeneraron los callos. Además de la edad del callo, la capacidad de regeneración de plantas de callo que ha sido cultivado por un largo tiempo, parece estar relacionado a otros factores. En muchos casos se ha observado que, la cantidad de callo incrementa o decrece independientemente de la edad. Durante el subcultivo de callos el número de embriones somáticos en el callo no permanece uniforme, si no que varía con el tiempo. Es posible que la iniciación y/o proliferación de células embriogénicas oscila con el tiempo, resultando en alteraciones en la capacidad de regeneración de plantas (Carvalho, *et al.* 1997). Esto sucede gracias a que conforme se hacen subcultivos de los callos, se seleccionan células embriogénicas capaces de regenerar plantas y se incrementa la proporción de esas células en relación a la masa total del callo, no así en callo joven donde el número de células embriogénicas capaces de regenerar plantas es pequeño (Vilaca *et al.*, 2008). Para el caso de la línea de maíz CML72, la regeneración se

mantuvo igual a lo largo de los 9 meses en los que se realizó, lo cual da una ventaja más al utilizar cualquiera de los dos protocolos descritos.

Lee y Phillips 1987, mencionan que la variación somaclonal puede ser afectada por factores como el origen genético, el tipo de explante, las características de la forma de iniciar el crecimiento, la composición del medio, el procedimiento de transferencias y la edad del cultivo. Armstrong y Phillips (1988) demostraron que en cultivo de tejidos de maíz, las anormalidades genéticas y citogenéticas son frecuentemente recobradas en plantas de ambos tipos de callo, ya sea organogénico o friable. Kaepler *et al.* (2000) menciona que los mecanismos epigenéticos juegan un papel importante en la variación somaclonal, ya que existe evidencia de la activación de elementos transponibles y retrotransposones, así como el posible silenciamiento de genes y alta frecuencia de variación del patrón de metilación de secuencias de una simple copia durante la regeneración en cultivo de tejidos.

Por medio de RAPDs nosotros probamos que las variaciones fenotípicas y fenológicas presentadas en las plantas regeneradas eran debidas a variaciones somaclonales y no a variaciones genéticas. Es importante destacar que la presencia de variaciones somaclonales fueron igualmente mostradas en plantas generadas de callo de ambos explantes, esto es probablemente debido a que de ambos tipos de explantes generan de callo tipo I. A diferencia de otros trabajos (Lee y Phillips, 1987; Armstrong y Phillips, 1988) encontramos que las variaciones son igualmente detectadas en plantas regeneradas a 3 meses de

subcultivos como a 9 meses de subcultivos. Lo cual nos permitiría utilizar el callo tipo I para regenerar plantas durante ese periodo de tiempo sin que haya un aumento en el número de plantas con variaciones somaclonales.

Por todo lo anterior podemos afirmar que ambos protocolos para obtención de callo embriogénico tipo I son eficaces y pueden ser utilizados en trabajos de transformación genética.

Transformación genética con el gen ScTPS1TPS2

Antes de realizar la transformación estable se trató de optimizar algunas partes de la transformación tanto por agroinfección como por bombardeo. Para ello, se realizaron experimentos de expresión transitoria utilizando el gen *GUS*, con los cuales se aumentó la expresión transitoria. Aunque se ha reportado transformación en muchos trabajos en maíz, los parámetros deben tratar de ser ajustados para cada genotipo utilizado. Las frecuencias de actividad *GUS* fueron de hasta un 90% de los callos con tinción por *Agrobacterium* y de hasta un 100 % de tinción con bombardeo. Sin embargo, la eficiencia de transformación medida como callos resistentes a PPT, mostró mejores resultados al utilizar el método de agroinfección (5.09 a 10.02 %) que al utilizar el método de bombardeo (2.25 a 4.83 %): Lo anterior es atribuible a que cuando se utiliza el bombardeo puede haber aparición de silenciamiento de los genes que impiden se exprese correctamente el transgen (Zaho *et al.*; 1998, Shou *et al.*, 2004; Dai *et al.*, 2001).

Por lo tanto, el método de agroinfección se considera la mejor alternativa para para transformar la línea de maíz CML72 con el gen bifuncional *ScTPS1-TPS2*. Lo anterior se corroboró al analizar las plantas por PCR para detectar el gen de interés (*ScTPS1-TPS2*), obteniendo una eficiencia de transformación mayor (0.28 %) al utilizar el método de agroinfección que al utilizar el método de bombardeo (0.15 %). Sin embargo, la eficiencia de transformación, fue muy baja (0-0.4 %). Son muchos los factores que influyen en la eficiencia de transformación y la recuperación de eventos estables dentro de los que se incluyen el genotipo, tipo y estado de desarrollo del explante, tipo y concentración de las cepas de *Agrobacterium* en caso de agroinfección, tipo de vector, genes de selección y promotores, condiciones de inoculación y cocultivo en agroinfección, condiciones de bombardeo en caso del mismo, condiciones medio de cultivo y regeneración. (Wang *et al.*, 2009; Barumpura y Zhong, 2001). En nuestra investigación encontramos que la eficiencia de transformación basada en plantas T₀ positivas a PCR es mayor cuando se utiliza como vector el pTF101.1 (0.2 %) que al utilizar el vector pGREEN0229 (0.1%). Sin embargo, las plantas positivas a PCR no coincidieron con las plantas de las cuales se obtuvo semilla. Lo cual es el mayor problema al cual nos enfrentamos. Por una parte la selección debe ser mejorada para evitar la incidencia de escapes ya que en trabajos anteriores se ha demostrado que no hay un 100 % de coincidencia entre las plantas regeneradas en PPT y las plantas que expresan el gen de interés (Gordon-Kam *et al.*, 1990; Howe *et al.*, 2002), lo mismo pudo haber ocurrido en la presente investigación. Por otra parte, es necesario minimizar la cantidad de plantas que no presentan floración femenina, utilizando el callo embriogénico para transformar en el menor

tiempo posible después de iniciar el cultivo *in vitro* (máximo de 6-9 meses después de iniciado el cultivo *in vitro*) con lo cual se disminuirán la presencia de variaciones somaclonales que generan dicha variación fenotípica (Phillips *et al.*, 1977; Lee y Phillips, 1987; Cardone *et al.*, 2010; Kaepler *et al.*, 2000)

A pesar lo los problemas encontrados, el presente trabajo provee una plataforma importante para lograr la transformación de maíz usando el gen *ScTPS1-TPS2*, ya que al realizar la evaluación más importante, el contenido relativo de agua después de sequía, las líneas transgénicas mostraron una mayor tolerancia a la sequía al perder sólo el 35 % de humedad mientras que las plantas no transformadas perdieron más del 50 % agua en las hojas cuando fueron sometidas a sequía, además de que la mayoría de las plantas presentaban un aspecto seco o semi-seco. Como se esperaba, el gen confiere resistencia a estrés abiótico tal como sucedió al insertarlo en el genoma de *Arabidopsis* y crisantemo (Miranda *et al.*, 2007; y Valle-Sandoval *et al.*, 2008). Y con lo cual se comprueba que la trehalosa (α -D-glucopiranosil α -D-glucopiranosido), juega un importante papel fisiológico como un protector de estrés abiótico (Elbein *et al.*, 2003). Además de que, el intermediario trehalosa 6-fosfato y/o la trehalosa misma, inducen genes que contribuyen en la adaptación a diferentes tipos de estrés, tanto biótico como abiótico (Avonce *et al.*, 2004). En nuestra investigación únicamente los análisis de PCR fueron llevados a cabo para detectar el transgen, por lo cual es necesario realizar análisis de Southern blot para confirmar la integración del mismo, así como análisis de HPLC para determinar la acumulación de trehalosa.

6. CONCLUSIONES GENERALES

1. Se pudo inducir callo embriogénico tipo I a partir de dos tipos de explantes de maíz CML72, embriones inmaduros y embriones maduros.
2. Se logró obtener regeneración y plantas de manera eficiente de callo embriogénico/organogénico tipo I inducido de los dos tipos de explantes evaluados (embriones maduros e inmaduros).
3. Las variaciones somaclonales que presentan las plantas regeneradas no obedecen a variaciones genéticas por lo cual el fenotipo original puede ser recuperado en la siguiente generación.
4. Se desarrolló un protocolo eficiente de regeneración por embriogénesis/organogénesis de la línea de maíz CML72.
5. Se logró la transformación de la línea CML72 por los métodos de bombardeo y agroinfección.
6. Fue más eficiente la transformación estable con el vector pTF101.1
7. Las líneas transgénicas obtenidas presentaron una mayor tolerancia a estrés por sequía.

7. LITERATURA CITADA

- Abebe, D. Z.; Teffera, W.; Machuka, J. S. 2008. Regeneration of tropical maize lines (*Zea mays* L.) from mature zygotic embryo through callus initiation. African Journal of Biotechnology 7(13): 2181-2186.
- Al-Abed, D.; Madasamy, P.; Talla, R.; Goldman, S.; Rudrabhatla, S. 2007. Genetic engineering of maize with *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 gene using split-seed explants. Crop Science 47: 2390-2402.
- Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. *In*: Handbook of plant cell culture techniques for propagation and breeding. Evans, D.A., W. R. Sharp, P. V. Ammirato, and Y. Yamada (eds). Macmillan Publishing Company, New York 1: 82-123.
- Armstrong C. L.; Green, C. E. 1984. Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. Planta 164:207-214.
- Armstrong, C. L.; Phillips, R. L. 1988. Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated de organogenic and friable, embriogenic tissue cultures of maize. Crop Science. 28:363-369.

- Avonce, N.; Leyman, B.; Mascorro-Gallardo, J.O.; Van Dijck, P.; Thevelein, J.M.; Iturriaga, G. 2004. The *Arabidopsis* Trehalose-6-P Synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiology* 136: 3649–3659.
- Bajaj, S.; J. Targolli, L.F. Liu; T.H.D. Ho; R. Wu. 1999. Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. *Mol. Breed.* 5: 493-503.
- Barumpuram, S.; Zhang, Z. J. 2001. Recent advances in plant transformation. In: *Plant Chromosome Engineering: Methods and Protocols, Method in Molecular Biology* Vol. 701. James A. Birchler (ed.). Springer Science + Business Media, LLC.
- Bhaskaran, S.; Smith. R. H. 1990. Cell biology & molecular genetic. regeneration in cereal tissue culture: A review. *Crop Science.* 30:1328-1336.
- Birch, R. G. 1997. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular. Biology.* 48: 297-326.
- Binott, J. J.; Songa, J. M.; Ininda, J.; Njagi, E. M.; Machuka, J. 2008. Plant regeneration from immature embryos of Kenyan maize inbred lines and their respective single hybrids through somatic embryogenesis cross. *African Journal of Biotechnology* 7 (8): 981-987.

- Bohorova, N. E.; Luna, B.; Brito, R. M. Huerta, L. D.; Hoisington, D. A. 1995. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude, and highland maize inbreds. *Maydica* 40 (1995): 275-281.
- Bohorova, N.; Frutos, R.; Royer, M.; Estañol, P.; Rascón, Q.; McLean, S.; Hoisington, D. 2001. Novel synthetic *Bacillus thuringiensis cry1B* gene and the *cry1B-cry1Ab* translational fusion confer resistance to southwerner corn borer, sugarcane borer and fall armyworm in transgenic tropical maize. *Theor Appl Genet* 103:817-826.
- Blazquez, M. A.; Santos, E.; Flores, C.L.; Martínez-Zapater, J.M.; Salinas, J.; Gancedo, C. 1998. Isolation and molecular characterization of *Arabidopsis* TPS1 gen, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *The plant journal* 13(5): 685-689.
- Bray, E. 1993. Molecular Response to water deficit. *Plant physiologi* 104:1035-1040.
- Brettschnider R.; Becker, D.; Lörz, H. 1997. Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. *Theor Appl Genet* 94:737-748.
- Bronsema F. B. F.; van Oostveen, W. J. F.; van Lammeren, A. A. M. 1997. Comparative analysis of callus formation and regeneration on cultured

immature maize embryos of the inbred lines A188 y A632. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 50:57-65.

Cabib, E.; Leloir, F. 1958. The biosynthesis of trehalose phosphate. *J. Biol. Chem.* 231: 259-275.

Carvalho, C. H. S.; Bohorova, N.; Bordallo, P. N.; Abreu, L.L.; Valicente, F. H.; Bressan, W.; Paiva, E. 1997. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. *Plant Cell Reports* 17:73-76.

Chu, C. C.; Wang, C. C.; Sun, C. S. 1975. Establishment of an efficient medium for another culture of rice trough comparative experiments on the nitrogen sources. *Science Sinica* 18:659-668.

Clive, J. 2013. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013*. ISAAA Brief No. 46. ISAAA: Ithaca, NY.

Dai, S.; Zheng, P.; Marmey, P.; Zhang, S.; Tian, W.; Chen, S.; Beachy. R. N. Fauquet, C. 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediate transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding* 7(1):25-33.

Danilova, S. A; Dolgikh, Y. I. 2005. Optimization of agrobacterial (*Agrobacterium tumefaciens*) transformation of maize embryogenic callus. Russian Journal of Plant Physiology 52(4): 535–541.

Danson, J. W; M. Lagat; M. Mbogori. 2006. Screening tropical maize lines for the production and regeneration of friable and embryogenic type II callus. African Journal of Biotechnology 5 (23): 2367-2370.

Desmond, S. T. N. 1994. An Introduction to genetic engineering. Ed. Cambridge University Press. 167 pp.

Elbein, A.D.; Pan, Y.T.; Pastuszak, I.; Carroll, D. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Glycobiology 13: 17R-27R.

FAO. 2012. www.fao.org/nr/abouttnr/nrl

Frame, R. B.; Zhang, H; Cocciolone, M. S.; Sidorenko, V. L.; Dietrich, R. Ch.; Pegg, S. E.; Zhen, S.; Schnable S. P.; Wang, K. 2000. Production of transgenic maize from bombarded type II Callus: Effect of gold particle size and callus morphology on transportation efficiency. In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant 36:21-29.

Frame, B.; Shou, H.; Chikwamba, R. K.; Zhang, Z.; Xiang, Ch.; Fonger, T. M.; Pegg, S. E. K.; Li, B.; Nettleton, D. S.; Pei, D.; Wang, K. 2002. *Agrobacterium*

tumefaciens - Mediated Transformation of maize embryos using a standard binary vector system. Plant Physiology Vol.129 pp: 13-22.

Frame, B.R.; McMurray, J. M.; Fonger, T. M.; Main, M.L.; Taylor, K.W.; Torney, F. J.; Paz, M.M.; Wang, K. 2006. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. Plant Cell Rep 25: 1024–1034.

Furini, A.; Jewell, D. C. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature and mature embryos of tropical and subtropical *Zea mays* L. Genotypes. Maydica 39: 155-164.

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

Gould, J.; Devey, M.; Hasegawa, O.; Ulian, E.C.; Peterson, G. y Smith, R.H. 1991. Transformation of *Zea mays* L. Using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. Plant Physiol 95: 426-434.

Gordon-Kamm, W.J.; Spencer, T.M.; Mangano, M.L.; Adams, T.R.; Daines, R.J.; Start, W. G.; O'Brien, J.V.; Chambers, S.A.; Adams, W.R.Jr.; Willetts, N.G.; Rice, T.B.; Mackey, C. J.; Krueger, R.W.; Kausch, A.P.; Lemaux, P.G. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic Plants. The Plant Cell 2: 603-618.

- Hernández-García, C. M.; López-Peralta, C.; Buenrostro-Nava, M. T; Cárdenas-Soriano, E.; Pellegrineschi, A. 2007. Regeneración de maíces blancos subtropicales vía embriogénesis somática regeneration of subtropical white maize via somatic embryogenesis. *Agrociencia* 41: 743-753.
- Herrera, E. L.; Martínez, T. M. 2007. Plantas Transgénicas. *En: Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. Bolívar, Z. F. G. (Ed). El Colegio Nacional. 2da edición. México, D. F. pp: 167-193.
- Howe, A. R.; Gasser, Ch. S.; Brown, S. M.; Padgett, S. R.; Hart, J.; Parker, G. B.; Fromm, M. E.; Armstrong, Ch. L. 2002. Glyphosate as a selective agent for the production of fertile transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. *Molecular Breeding* 10: 153–164.
- Huang, S.; Gilbertson, L. A.; Adams, T. H.; Malloy, K. P.; Reisenbigler, E.K.; Birr, D. H.; Snyder, M. W.; Zhang, Q.; Luethy, M. H. 2004. Generation of marker-free transgenic maize by regular two-border *Agrobacterium* transformation vectors. *Transgenic Research* 13: 451–461.
- Huang, X.; Wei, Z. 2004. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.). *Plant Cell Rep* 22:793–800.

- Huang, X.; Wei, Z. 2005. Successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of maize elite inbred lines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83: 187-200.
- Ishida, Y.; Saito, H.; Ohta, S.; Hiei, Y.; Komari, T.; Kumashiro, T. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* Vol. 14:745-750.
- Ishida, Y.; Saito, H.; Hiei, Y.; Komari, T. 2003. Improved protocol for transformation of maize (*Zea mays* L) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant biotechnology* 20(1):57-66.
- Jia, X. X.; Zhang, J. W.; Wang, H. N.; Kong, W. P. 2008. Efficient maize (*Zea mays* L.) regeneration derived from mature embryos in vitro. *Maydica* 53:239-248.
- Joshi, R.; Shukla, A.; Kumar, P. 2010. Interactive effect of GA₃ and polyamines on *in vitro* somatic embryogenesis from immature embryos in maize (*Zea mays* L.). *Maydica* 55: 111-119.
- Kaeppeler, S. M.; Kaeppeler, H.F.; Rhee, Y. 2000 Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 179–188.

Klein, T. M.; Fromm, M.; Weissinger, A.; Tomes, D.; Schaaf, S.; Sletten, M.; y Sanford, J.C. 1988. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles (gene transfer/cell culture). Proc. Natl. Acad. Sci. USA . 85: 4305-4309.

Krishna, M. P.; Tula, S.; Kamrul. H. K. Md.; Srivastava, V. K.; Tuteja, N. 2013. An efficient and rapid regeneration via multiple shoot induction from mature seed derived embryogenic and organogenic callus of Indian maize (*Zea mays* L.). Plant Signaling & Behavior 8(10):e25891-1- e25891-6.

Lafitte, H. R. 1993. Identificación de problemas en la producción de maíz tropical. Guía de campo. México, D.F. CIMMYT.

Lee, M.; Phillips R. L. 1987. Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. Genome 29: 122-128.

Li, J.; Yu, H.; Zhang, F.; Lin, C.; Gao, J. 2013. A built-In strategy to mitigate transgene spreading from genetically modified corn. PLoS ONE 8(12): e81645. doi:10.1371/journal.pone.0081645.

Linsmaier, E. M.; Skoog, F. 1965 Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. Physiol Plant 18: 100-127.

- Liu, X.; Zhang, H.; Wu, Ch.; Tan, Z.; He, D.; Li, L. 2009 Establishment of a high-efficiency plant regeneration and transformation system for the elite maize inbred lines from three heterotic groups. *African Journal of Biotechnology* 8 (19): 4911-4917.
- Manivannan, A.; Kaul, J.; Singode, A.; S. Dass. 2010. Callus induction and regeneration of elite Indian maize inbreds. *African Journal of Biotechnology* 9(44): 7446-7452.
- Miranda, J. A., Avonce, N.; Suárez, R.; Thevelein, J. M.; Van Dijck, P.; Iturriaga, G. 2007. A bifunctional TPS–TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 226:1411-1421.
- Mohamalawari, D.; Sharma, N. C.; Cristae, P.; Sahi, S. V. 2002. Transformation of maize by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one resistant *Agrobacterium* strains. *Biotechnology Letters* 24: 197–203.
- Muoma, J.; Muluvi, G.; Machuka, J. 2008. *In vitro* regeneration by indirect organogenesis of selected kenyan maize genotypes using shoot apices. *Biotechnology* 7(4):732-738.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.

Newell, C. A. 2000. Plant Transformation Technology. Developments and Applications. *Molecular biotechnology* 16:53-65.

Negrotto, D.; Jolley, M.; Beer, S.; Wenck, A. R.; Hansen, G. 2000. The use of phosphomannose-6-phosphotransferase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant cell reports* 19: 798-803.

Nuccio, M.L.; D. Rhodes; S.D. McNeil ;. Hanson, A.D. 1999. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance, *Curr. Op. Plant Biol.* 2: 128-134.

O'Connor-Sánchez, A.; Cabrera-Ponce, J.L.; Valdez-Melara, M.; Téllez-Rodríguez, P.; Pons-Hernández, J.L., Herrera-Estrella, L. 2002. Transgenic maize plants of tropical and subtropical genotypes obtained from calluses containing organogenic and embryogenic-like structures derived from shoot tips. *Plant Cell Rep* 21:302–312.

Ombori, O.; Gitonga N. M.; Machuka J. 2008. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of tropical maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Biotechnology* 7 (2):224-232.

- Ombori, O.; Omondi, M. J. V.; Machuka, J. 2013. Agrobacterium-mediated genetic transformation of selected tropical inbred and hybrid maize (*Zea mays* L.) lines. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 113:11–23.
- Pereira, P. C.; Portilho, C. N.; Corsetti, P. A. A.; Siqueira, C. C. H.; Donizeti, A. J.; Almeida C. A. 2008. Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 43 (3): 371-378.
- Phillips, R. L.; Somers, D. A.; Hibgerd, K. A. 1977. Cell/tissue culture an *in vitro* manipulation. In: *Corn and Corn improvement- Agronomy Monograph no 18*. Frederick, G.; Wis, M. (eds). 3rd edition. Madison, USA. 774 p.
- Sairam, R. V.; M. Parani. G. Franklin; Z. Lifeng; B. Smith; J. MacDougall; C. Wilber; H. Sheikhi; N. Kashikar; K. Meeker; D. Al-Abed; K. Berry; R. Vierling; S. L. Goldman. 2003. Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation. *Genome* 46: 323–329.
- Schläppi, M; Hohn, B. 1992. Competence of Immature Maize Embryos for Agrobacterium-Mediated Gene Transfer. *The Plant Cell* 4: 7-16.
- Sharp, W.; Evans, D. A. 1984. Handbook of plant cell culture. *Crop Species Vol. 2*.

- Sheikholeslam, S. N.; Weeks, D. P. 1987. Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant molecular biology. Plant Molecular Biology 8: 291-298.
- Shou, H.; Bordallo, P.; y Wang, K. 2004. Expression of the Nicotiana protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. Journal of experimental botany 55(399): 1013-1019.
- Sidorov, V.; Gilbertson, L.; Prince, A.; Duncan, D. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus. Plant Cell Rep 25: 320-328.
- Sidorov, V. A. 2013. Plant tissue culture in biotechnology: Recent advances in transformation through somatic embryogenesis. Biotechnologia Acta UDK 575327/275.854 (6) 4:118-131.
- Songstad, D.D.; Armstrong, C.L.; Petersen, W.L.; Hairston, B.; Hinchee, M.A.W. 1996. Production of transgenic maize plants and progeny by bombardment. In Vitro Cell. Dev Biol.--Plant 32:179-183.
- Strosse, H.; Domergue, R.; Panis, B.; Escalant, J. V.; Cote, F. 2003 Banana plantain embryogenic cell suspensions. INIBAP. Technical Guidelines. Francia.

- Takavar, S.; Rahnama, H.; Rahimian, H.; Kazemitabar, K. 2010. *Agrobacterium* mediated transformation of maize (*Zea mays* L.). Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran 21(1): 21-29.
- Vain, P.; Yean H.; Flament P. 1989. Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L. by AgNO₃. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 18: 143-151.
- Valdez-Ortiz, A.; Medina-Godoy, S.; Valverde, M. A.; Paredes-López, O. 2007. A transgenic tropical maize line generated by the direct transformation of the embryo-scutellum by *A. tumefaciens*. Plant Cell Tiss Organ Cult 1:201–214.
- Valle-Sandoval, M.R. 2008. Obtención de plantas transgénicas de crisantemo (*Dendranthema x grandiflorum* Kitam) cv Indianapolis que acumulan trehalosa. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México. México. 137 p.
- Vega, J. M.; Yu, W., Kennon, A. R.; Chen, X.; Zhang, Z. J. 2008. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays* L) using standard binary vectors. Plant Cell Reports 27:297-305.
- Vilaca de Vasconcelos, M. J.; Antunes, M. S.; Barbosa, S. M.; Carvalho, C. H. S. 2008. RAPD analysis of callus regenerated and seed grown plants of Maize (*Zea mays* L.). Revista Bras Milh Sorgo7(2):93-104.

- Voguel, G.; Aeschbacher, R. A.; Müller, J.; Boller, T.; Wiemken, A. 1998. Trehalose 6-phosphate phosphatases of *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant. *The plant journal* 13(15): 673-683.
- Wan Y.; J. M. Widholm; 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. S. 1987. Callus induction and plant regeneration from maize mature embryos. *Plant Cell Reports* 6(5):360-632.
- Wang, K.; Frame, B.; Ishida, Y.; Komari, T. 2009. Maize Transformation. In: *Handbook of Maize Genetic and Genomics*. J. L. Bennetzen y S. Hake (ed). Springer. 798 p.
- Willman, M. R.; Schroll, S. M.; Hodges, T. K. 1989. Inheritance of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from primary (type 1) callus in maize. *In vitro cellular & Developmental biology* 25(1):95-100.
- Zhang, J.; Klueva, Y. N.; Wang, Z.; Wu, R.; HO, T. D.; Nguyen, T. H. 2000. Genetic engineering for abiotic stress resistance in crop plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 36 (2):108-114.

Zhao Z. Y.; Gu W.; Cai T.; Tagliani L.A.; Hondred D. A.; Bond D.; Krell S.; Rudert M.L.; Bruce W. B.; Pierce D. A. 1998. Molecular analysis of T0 plants transformed by *Agrobacterium* and comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation with bombardment transformation in maize. *Maize Genet. Coop. Newsletter* 72: 34–37.

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

Zhu, Y.; Zhao, F.; Zhao, D. 2011. Regeneration and transformation of a maize elite inbred line via immature embryo culture and enhanced tolerance to a fungal pathogen *Exserohilum turcicum* with a balsam pear class I chitinase gene. *African Journal of Agricultural Research* 6(7): 1923-1930.

8. ANEXOS

Anexo 1. Técnicas usadas en el cultivo *in vitro* de maíz.

Fuente	Genotipo/explantos	Medios de cultivo/ Auxinas	Tipo de callo formado.	Regeneración	Enraizamiento	Observaciones
Wang (1987)	Líneas A623, B73 y Mo17 Embriones maduros	MS (Mushirage and Skoog, 1962) 1-2 mg.L ⁻¹ 2, 4-D, para la inducción de callo y MS 2 mg.L ⁻¹ Dicamba	Línea A623 produjo, callo blanco, blando, de rápido crecimiento, y no embriogénico. De la líneas B73 y Mo17 fueron callos compactos, de crecimiento lento y organogénico	MS sin hormonas	MS sin hormonas	Se obtuvo regeneración por tres años de 10, 80 y 5 plantas R0 cada año respectivamente. Sólo en el segundo año las plantas R0 tuvieron 50% de esterilidad de polen y en la generación R1 no se detectaron variantes de segregación.
Armstrong y Phillips (1988)	Línea A188 y A188-BC6 F2 de la cruce A188XB73 Embriones inmaduros 1.0-1.5 mm	N6 modificados (Chu <i>et al.</i> , 1975) 1.0 ó 1.5 mg.L ⁻¹ 2, 4-D 3 sem. 0, 6 ó 25 µM de L-prolina	Callo tipo I y Callo Tipo II.	Callo de 16-36 semanas. Callo tipo I: Sales MS y 0.0 ó 0.05 mg.L ⁻¹ 2, 4-D a las 16 y 36 sem respectivamente. Callo tipo II: Sales MS+ 0.1 mg.L ⁻¹ 2, 4-D + 10 ⁻⁶ MABA (2 sem) N6 + 60 g.L sacarosa (2 sem). MS + 20 g.L sacarosa	NE	La frecuencia de regenerantes con cambios genéticos o citogenéticos es más alta en callo tipo II que de tipo I. La frecuencia de quimerismo en plantas regeneradas es menor de callo tipo II que de Tipo I y decrece con el incremento de edad en ambos tipos de cultivos.
Vain <i>et al.</i> (1989)	A188 Embriones inmaduros 1.0-2.0 mm	MS con 1.0 mg.L ⁻¹ de 2, 4-D y tres concentraciones de AgNO ₃ 0, 5.0, 10.0 y 20 mg.L ⁻¹ .	Callo tipo I y tipo II, éste último fue mantenido para regenerar plantas.	Medio de maduración: MS + 6% sacarosa, por 2-3 sem. Medio de regeneración: MS + 2% sacarosa	MS + 2% sacarosa	El AgNO ₃ no influyó en la formación de callo tipo I, y todas las concentraciones incrementaron la producción de callo tipo II. Tampoco modificó estadísticamente la cantidad de C ₂ H ₄ . Pero si mejoró significativamente la regeneración de plantas del callo tipo II.
Willman <i>et al.</i> (1989)	Líneas: A188, Mo17 y B73 Híbridos: A188XMo17 Mo17X A188 A188XB73 Embriones inmad. 1.3-1.8 mm	MS 1.0 ó 1.5 mg.L ⁻¹ 2, 4-D 3 sem.	Embriogénico	Callo de 3 semanas a medio MS sin hormonas. 6 sem. en cultivo (2 sem en luz)	MS sin hormonas por 3 semanas.	Factores genéticos, citoplásmicos, maternos así como también paternos influyen la embriogénesis somática.
Furini y Jewell (1994)	10 líneas Embriones inmaduros 1.0-1.5	N6 modificados 2, 4-D o dicamba a 1.1 ó 2.2 mg.L ⁻¹	Callo tipo II Callo tipo I	Callo de 6 a 9 semanas a medio N6 sin hormonas	N6 sin hormonas	Dicamba (2.2 mg.L ⁻¹) fue superior a 2, 4-D en cuanto a respuesta embriogénica en el callo.

	mm 12 a 14 días después de polinización (ddp) Embriones maduros (coleptilos y hapices cortados a la mitad)	N6 modificados 2, 4-D o dicamba a 1.1 ó 2.2 mg.L ⁻¹				
Bohorova <i>et al.</i> (1995)	44 líneas tropicales 23 de altitud media Embriones inmaduros 1.0-1.5 mm	N6 modificado 2 mg.L ⁻¹ Dicamba MS Modificado 2 ó 2.5 mg.L ⁻¹ 2, 4-D	67% de las líneas formaron callo tipo I nodular y compacto. 23% callo tipo II friable y amarillento.	MS ó N6 con o sin auxinas o AIA y 6-BAP	Igual que en regeneración	La auxina dicamba junto con la prolina y nitrato de plata formó callo friable con pequeños embriones somáticos en la superficie. La regeneración fue mejor en el medio MS.
Bronsema <i>et al.</i> (1997)	A188 (línea embriogénica) A632 (línea no embriogénica) Embriones inmaduros 1.0-1.5 mm 11-12 ddp	N6 modificado 0.8 µm de 2, 4-D. Durante la inducción de callo se reemplazó la sacarosa (6 ó 2%) por sorbitol (1.6%)	Principalmente callo tipo I	Medio MS con 2% de sacarosa sin reguladores de crecimiento.	NE	De la línea A188 se obtuvo callo embriogénico hasta por 1 año, mientras que de la línea A632 se obtuvo únicamente callo no embriogénico. Cuando se adicionó 6% de sacarosa significativamente más callo fue formado.
Huang y Wei (2004)	Líneas: 9046, C8605, 478, 8112, Mo17, Qi319, Su1 Embriones maduros remojados 72 hrs en agua + 4 mg.L ⁻¹ 2, 4-D. Después se cortó la sección de la plúmula (2-5 mm) longitudinalmente y se puso en medio de inducción.	N6 modificado 0, 1, 2, 3 y 4 mg.L ⁻¹ de 2, 4-D 0, 0.2 ó 0.5 mg.L ⁻¹ de BA	Callo embriogénico: Compacto, friable, forma irregular y color amarillo brillante o crema.	Callo de 7 semanas después del inicio. Medio basal N6/B5 + 0.5 mg.L ⁻¹ de BA da la más alta frecuencia de formación de brotes.	Medio basal MS con 15 g.L ⁻¹ de sacarosa y 0.6 mg.L ⁻¹ de AIB	2 mg.L ⁻¹ de 2, 4-D y 0.2 mg.L ⁻¹ de BA fue la combinación más efectiva para lograr la más alta frecuencia en formación de callo embriogénico. Adicionar 10 mg.L ⁻¹ de AGNO ₃ al medio de formación de callo incrementa la formación de callo embriogénico. La frecuencia de regeneración fue de 19.8 a 32.4%.
Danson <i>et al.</i> (2006)	22 líneas usadas en la formación de híbridos en diferentes zonas ecológicas de Kenia. Embriones inmaduros de 1.0 a 2.0 mm y de 12 a 14 ddp.	N6 modificado 2 mg L ⁻¹ Dicamba	Callo tipo II	Callo de 5 meses desde inicio. Medio MS + 0.5 ml.L ⁻¹ de AIA y 1 ml.L ⁻¹ de BAP	Medio MS (Mushirage and Skoog, 1962) con 1 mg L ⁻¹ de ANA.	Identificaron 4 líneas de tierras altas con respuesta embriogénicas altas (56 a 80%).
Al- Abed <i>et al.</i> (2006)	Híbridos H11, LH198XLH227 Líneas R23 y B73 Semilla maduras, partidas a la mitad.	Sales Basales LS Linsmaier and Skoog 1965) 2, 4-D (0, 4.5, 9, 13.6, 18, 22.6 or 27.2 µM)	Callo embriogénico u organogénico	MS BAP solo (0, 4.4, 8.8, 13.2, 17.6, 22.0 or 26.4 µM) o en combinación con Kinetina (4.6, 9.2, 13.9 or 18.4 µM)	NE	No hubo diferencia significativa en la frecuencia de inducción de callo entre los genotipos evaluados. El número máximo de brotes (30) por explante se dio cuando se combinó BAP y Kinetina (17.6 y 9.2 µM)

Hernández-García <i>et al.</i> (2007)	Nueve líneas del CIMMYT adaptadas a los climas subtropicales de África. Embriones inmaduros de 1.0 a 1.5 mm y de 16 ddp.	N6 modificado 1, 2 y 5 mg L ⁻¹ de 2, 4-D ó Dicamba.	Callo embriogénico, que se clasificó como: callo tipo I y callo tipo II.	Medio MS + 0.5 mg L ⁻¹ de AIA + 1 mg L ⁻¹ de BAP + 5 mg L ⁻¹ ZEA por 21 días, posteriormente otros 21 días en el mismo medio pero sin ZEA	Medio MS (Mushirage and Skoog, 1962) con 1.5 mg L ⁻¹ de ANA.	5 de las 9 líneas probadas formaron callo embriogénico. En promedio entre líneas la dosis de 5 mg L ⁻¹ de 2, 4-D produjo menores porcentajes de embriogénesis, que las otras dosis. Con dicamba las tres dosis produjeron los mismos resultados. La mayoría de las líneas formaron en mayor proporción callo tipo I. La línea 78 mostró 83.9% de sus callos germinados
Abebe <i>et al.</i> (2008)	Katumani: Variedad tropical de polinización abierta. CML216: Línea tropical. Semillas maduras	Sales basales LS y vit. B5. 0-6 mg L ⁻¹ de 2, 4-D ó 3 mg L ⁻¹ de 2, 4-D + KIN 0-2 mg L ⁻¹	Embriogénico y organogénico.	Para maduración Callos organogénicos: MS suplementado con ABA 1 mg L ⁻¹ + KIN 2 mg L ⁻¹ Callos embriogénicos: Sales basales LS y vit. B5. Después de maduración: Sales MS sin hormonas	Medio MS (Mushirage and Skoog, 1962) libre de hormonas.	La mayor inducción de callo (90%) se logró al usar las sales basales LS combinadas con vit. B5 y 3 mg L ⁻¹ de 2, 4-D. Mientras que la misma dosis de 2,4-D se combinó con KIN se obtuvo 52.5%. La frecuencia de regeneración fue de 21.2 y 16.5% para la línea CML 216 y Katumani respectivamente realizada a partir de callo organogénico.
Binott <i>et al.</i> (2008)	12 líneas usadas para generar híbridos de cruce simple. Embriones inmaduros de 10,15,18, 21 y 24 ddp.	N6 modificado Varios niveles de 2,4-D (0.0 a 20.0 mg.L ⁻¹)	Callo embriogénico	Callo de 10 semanas. Medio MS sin hormonas	Medio MS a la mitad (Mushirage and Skoog, 1962)	Entre los híbridos la inducción de callo fue óptima 15 DDP (1.0-1.3 mm). Entre las líneas el estado óptimo fue 18-21 DDP (1.5-2.0 mm). Una inducción de callo óptima se logró con 2 mg.L ⁻¹ 2,4-D.
Jia <i>et al.</i> (2008)	Línea 9046, 478 y 87-1. Embriones maduros	MS suplementado con 3% de maltose y 3 mg.L ⁻¹ de 2,4-D.	Callo organogénico	Medio MS suplementado con 3% de maltose+0.5 mg.L ⁻¹ de 2,4-D+0.1 mg.L ⁻¹ de BAP	Medio MS (Mushirage and Skoog, 1962) suplementado con 3%+ 0.6 mg.L ⁻¹ AIB	La frecuencia de formación de callo embriogénico fue de 38-43% y la frecuencia de formación de brotes fue de 35.4-39.2%. No se encontró variación genética por SSR.
Muoma <i>et al.</i> (2008)	Genotipos tropicales de Kenia: KAT y DLC1 Variedades de pol. libre; DHO1, Híbrido local; TLO8 línea. Ápices de 15 a 17 mm de longitud incluyendo el mesocotilo y coleoptilo	MS suplementado con 9 µM de 2-4,D, BAP a 0, 8.88, 17.75, 26.64, 35.52 ó 44.40 µM y con o sin 296 µM de Adenina.	Callo organogénico	Medio MS Sin hormonas	Medio MS (Mushirage and Skoog, 1962) suplementado con 0-4.92 µM de AIB	La frecuencia de formación de callo fue genotipo dependiente. La administración de adenina complementó el efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción y formación de callo organogénico.
Ombori <i>et al.</i> (2008)	Líneas: TL18, TL22, MU25, CML216, CML 78 y CML331	N6 modificado 0-20 mg.L ⁻¹ de 2,4-D.	Callo no embriogénico y callo embriogénico tipo I y tipo II.	Callo de 4 semanas de cultivo. 2 sem en medio de maduración (Medio N6 + 6% sacarosa + 1	Medio MS (Mushirage and Skoog, 1962) con 0-1 mg L ⁻¹ de AIB.	La línea CML331 no formó callo. La concentración de 2,4-D para la iniciación de callo embriogénico es genotipo dependiente. el porcentaje

	Embriones inmaduros de 1.0 a 2.5 mm y de 16 ó 20 ddp.			mg.L ⁻¹ ANA en oscuridad. Medio de regeneración MS + 3% de sacarosa a 16/8 hrs luz/oscuridad.		de callo embriogénico fue menor con embriones de 16 ddp. La línea CML216 produjo el mayor núm. de brotes, entonces la regeneración es genotipo dependiente. 0.8 mg L ⁻¹ de AIB dió la mayor formación de raíces
Lui <i>et al.</i> (2009)	18 líneas de germoplasma de maíz chino. Embriones inmaduros de 1.0 a 2.0 mm y de 11 ddp.	Se probaron 6 medios de cultivo con sales basales N6, MS ó 8114 para inducción de callo, probando 2,4-D, 6-BA y Kin. 3 medios para regeneración e inducción de raíces con sales basales N6 o MS y 2 mg.L ⁻¹ de 2,4-D ó 3.3 mg.L ⁻¹ de dicamba	Callo color amarillo paja, friable y de rápido crecimiento.	Medio basal N6 sin hormonas	Medio MS (Mushirage and Skoog, 1962) con 0.5 mg L ⁻¹ de ANA.	El 2,4-D juega un papel importante en la iniciación de callo pero, el mayor porcentaje de inducción de callo embriogénico se logró con la adición de 3.3 mg.L ⁻¹ de dicamba al medio.
Joshi <i>et al.</i> (2010)	Variedad viz. Gaurav. Embriones inmaduros de 1.0 a 1.5 mm	Medio MS suplementado con 5 mg.L ⁻¹ 2,4-D 2 mg.L ⁻¹ NAA + 1 mg.L ⁻¹ BAP. Se probaron 50 µM, 100 µM and 150 µM de putrescina, epermina y espermidina con concentraciones variadas de GA3 como regulador de crecimiento (50 µM, 100 µM, and 150 µM).	Callo embriogénico	Medio MS suplementado con 2 mg.L ⁻¹ BAP y 3% de sacarosa.	NE	Concentraciones altas de putrescina (150 µM) con GA3 (50-150µM) fueron las más efectivas para inducir embriogénesis somática. La frecuencia de embriogénesis rengueo de 65-78% y la de formación de brotes de 35-48%.
Manivannan <i>et al.</i> (2010)	Cinco líneas de maíz élite de la India HKI1105, HKI1105, HKI335, CM300 and LM5 Embriones inmaduros de 14 ddp de 1.0 a 2.0 mm	N6 modificado, con 3 niveles de 2, 4-D (1, 2 y 3 mg.L ⁻¹) y tres niveles de dicamba 1, 2 y 3 mg.L ⁻¹)	Callo embriogénico.	Medio de maduración (MS+60gr sacarosa) 3 semanas, seguido de dos semanas con el mismo medio sin hormonas y 10 días a medio R2-1 (MS + IAA 0.5 mg L ⁻¹ + BAP 1.0 mg L ⁻¹).	Medio de enraizamiento R2-2 (MS + NAA 1 mg L ⁻¹) por 1 semana.	La inducción de callo embriogénico fue mejor con 2 mg.L ⁻¹ de 2,4-D en los genotipos probados y la línea CM300 mostró la mejor respuesta en inducción de callo. La relación 0.5 auxina:1 citoquinina (AIA:BAP) es óptima para el desarrollo de brotes y ANA (1 mg L ⁻¹) para el desarrollo de raíces.
Krishna <i>et al.</i> , (2013)	Cultivar de maíz tropical Hindú HQPM-1 Embriones maduros	MS + 1.0–3.5 mg L ⁻¹ 2,4-D + BAP (0.1–2.5 mg L ⁻¹) para inducción de callo embriogénico u organogénico.	Callo embriogénico o callo organogénico	MS + various concentration of BAP(0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, y 3.0 mg L ⁻¹) , KIN (0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 y 1.5 mg L ⁻¹) and ANA(0.0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg L ⁻¹).	NE	La mayor frecuencia de inducción de callo embriogénico se logró con MS + 2 mg L ⁻¹ 2,4-D + BAP (1 mg L ⁻¹). La mayor frecuencia de inducción de callo organogénico se logró con MS + 2.5 mg L ⁻¹ 2,4-D + BAP (1.5 mg L ⁻¹). Y la regeneración en 2.0 mg L ⁻¹ BAP+ 1 mg L ⁻¹ KIN+ 0.5 mg L ⁻¹ ANA.

NE= No Especificado

Anexo 2. Técnicas usadas en la transformación genética por biobalística.

Fuente	Genotipo	Medios de cultivo	Explantos / Tratamiento osmótico	Plasmido /genes	Caract. de bombardeo	Medio de restitución	Selección	Regeneración	Enraizamiento	Frec. Transf./ Genotipo
Klein <i>et al.</i> (1988)	Maíz Dulce Negro Mexicano, líneas: 3-86-17 and 13-217.	Medio MS	Células en suspensión / Manitol 0.4 M 30 min antes del bombardeo y 30 min después del bombardeo.	pCaMVI ₁ CN y pCaMVCN / Gen quimérico de Cloranfenicol acetiltransferasa (CAT).	Part. tungsteno (1.2, 0.6 ó 2.4 µm) a 15 cm de las células	NE	NE	NE	NE	Al bombardear la misma muestra varias veces se encontró un incremento en la actividad de CAT.
Gordon – Kamm (<i>et al.</i> 1990)	A188 x 873 y A188 x 884	Medio MS	Callo embriogénico Tipo II obtenido de embriones inmaduros (1.6 a 1.8 mm) / NE	pDPGI65/ <i>bar</i> pDPG208/GUS	Part. tungsteno (1.2 µm) a 5 cm de las células.	MS modif. líquido 7-14 días	1 mg.L ⁻¹ bialaphos 3-4 semanas, 3 mg.L ⁻¹ bialaphos 3-4 semanas	MS 0.25 mg.L ⁻¹ 2,4-D y 10 mg.L ⁻¹ BAP por 2 semana. Posteriormente MS sin hormonas.	MS sin hormonas , 1% de sacarosa	Se confirmó la integración del gen <i>bar</i> en todas las líneas de callos resistentes a bialaphos. Se detectaron 29 de 53 plantas R1 con el gen <i>bar</i> .
Wan <i>et al.</i> (1995)	Anteras obtenidas de las cruas entre las líneas H99, FR16 y Pa91.	Medio D de Duncan (Duncan <i>et al.</i> 1985)	Callo tipo I derivado de cultivo de anteras de 10 meses de subcultivos / NE	Pbargus/ Selec.: <i>bar</i> pAHC25 / Selec.: <i>bar</i>	Part. oro (1.0 µm). DuPont PDS 1000 He Biolistic Delivery System a 8 cm del disco de ruptura, a 1100 psi.	Medio D de Duncan (Duncan <i>et al.</i> 1985) 4-10 días después de bombardeo.	1 mg.L ⁻¹ bialaphos 10-14 días, 3 mg.L ⁻¹ bialaphos por 12 semanas	De acuerdo al método descrito por Duncan <i>et al.</i> , (1985) 1 mg.L ⁻¹ bialaphos	NE	Todas las líneas transgénicas muestran los dos genes (<i>bar</i> y <i>uidA</i>).
Songstad <i>et al.</i> (1996)	Hi II (A188 x B73)	N6 modificado	Embriones inmaduros (1.5-2.0 mm) cultivados por 2 a 4 días antes del bombardeo / NE	pEC9/Resistencia a clorsulfuron pMON8678 y pMON19433/ GUS	Part. tungsteno M10. Pistola de genes PDS-1000 (Bio-Rad)	14 días con N6 modif. (Chu <i>et al.</i> , 1975)	20 ppb de clorsulfuron por 6 a 10 semanas después del bombardeo	NE	NE	2 de cada 100 embriones son transgénicos cuando los embriones son cultivados por 2-5 días antes del bombardeo.
Frame <i>et al.</i> (2000)	Hi II	N6 modificado	Embriones inmaduros (1.5-2.0 mm.)o callo Tipo II de 2 a 6 meses de la fecha de iniciación 1.5-2.0 mm. / 12% de sacarosa ó 0.2 M sorbitol y 0.2 M manitol.	pBAR184 / <i>bar</i>	Part. oro (1.0 ó 0.6 µm). Pistola de genes PDS-1000. 6 cm del disco de ruptura, a 650 psi	N6 modif. (Chu <i>et al.</i> , 1975) 7-10 días después de bombardeo	2 mg.L ⁻¹ bialaphos 6 a 8 sem. (transf. c/ 2 sem.) Clonas individuales 4 semanas en 2 mg.L ⁻¹ bialaphos	MS sin hormonas, 6% de sacarosa y 0-3 mg.L ⁻¹ bialaphos 2 a 3 sem sin luz; entonces se transfirieron a Ms sin hormonas, sin bialaphos y 3% sacarosa con luz.	MS sin hormonas, sin bialaphos	Eficiencia de trasform.= Núm de callos resistentes a bialaphos desp.de 10 sem en selección por 100 pzs. de callo bombardeado. 4.6 a 31.4 % con part. de oro de 0.6 µm y de 0.0 a 1.9% con con part. de oro de 1 µm. Embrión-invernadero= 4.0±0.9 %

										Embrión-campo= 18.9±1.7 % Callo-invernadero= 9.3±0.9 % Callo-campo= 10.9±1.4 %
Bohorova <i>et al.</i> (2001)	CML 72 CML 216	N6 modificados	Embriones inmaduros 1.0-1.5 mm /	<i>pUbi1B-1Ab / bar</i> <i>pAct1B-1Ab / bar</i>	Part. oro (0.6 µm). Pistola de genes Bio-Rad PDS-1000	NE	3 mg.L ⁻¹ bialaphos 4 semanas	7 mg.L ⁻¹ PPT	1 mg.L ⁻¹ bialaphos	97% resist. a herbicida Basta 25% resist. a dos insectos SWCB Y SCB.
Howe <i>et al.</i> (2002)	Maíz Dulce Negro Mexicano.	N6 modificados	Callo embriogénico ó células en suspensión / NE	pMON8631 pMON19640 / EPSPS de resistencia a glyfosato	Part. de tugsteno y ADN a 1 µg.µl ⁻¹ . Pistola de genes PDS-1000.	N6 modif. (Chu <i>et al.</i> , 1975) por 2-3 días después de bombardeo.	1 mM glyfosato 1 mes y 3 mM glyfosato 12 semanas para callo. 5mM de glyfosato por 11 semanas en las células en suspensión.	Con o sin 0.01 mM glyfosato	Con o sin 0.01 mM glyfosato	Se recuperaron 15 eventos transgénicos, con resistencia a Glyfosato, no se encontró ningún escape a la selección.
O'Connor-Sánchez <i>et al.</i> (2002)	Líneas: LPC13, LPC16, LPC18 y LPC21. CR-5 Híbridos: ZM-1 y ZM-71. Var. trop.: FR28-1 y FR28-2	Germinación y formación de callo MS modificado.	Callo embriogénico derivado de ápices de embriones de semillas maduras / 0.4 M manitol ó 0.4 M sacarosa 24 hrs. antes del bombardeo	pBARGUS / <i>bar</i>	Part. Tugsteno M10 0.73 µm. Pistola de genes PDS-1000. 7cm del disco de ruptura, a 1200psi	2 semanas	1) 4 mg.L ⁻¹ PPT o Bialaphos 2-9 semanas en oscuridad. 2) 4 mg/l PPT o Bialaphos 3 semanas en luz.	Sin PPT	Sin PPT	22 de 29 plantas T0 tuvieron el gen <i>bar</i> 5 de 8 plantas hibridaron con la zonda del gen <i>uidA</i> . Al utilizar sacarosa 0.4 M en el tratamiento osmótico se incrementa la frecuencia de transformación 4 veces más.
Shou <i>et al.</i> (2004)	Híbrido Hi II	NE	Embriones inmaduros / NE	pSHX002 / Prot. Kinasa de <i>Nicotiana</i> (NPK1) <i>pBAR184 / bar</i>	NE	NE	NE	NE	NE	Se obtuvieron 12 eventos. La expresión del gen <i>NPK1</i> incrementó la tolerancia a sequía.
Pereira <i>et al.</i> (2008)	Líneas de maíz tropical L1395 y L3	N6 modificado con 3.3 mg. L ⁻¹ de Dicamba	Embriones inmaduros de 1 a 2 mm de longitud (8-16 días después de polinización) / sacarosa 12%	pCAMBIA 3301 / beta-glucoronidasa y <i>bar</i>	Part. tugsteno M10/ 0.8 µm. Pistola de genes PDS-1000. Disco de ruptura a 6.6, 9.9 y 13.2 cm de distancia. 650 y 1100 psi. Y 1, 2 y 3 disparos por plato.	NE	14 días después del bombardeo 3, 6 y 9 mg.L ⁻¹	MS + 3 mg.L ⁻¹ ANA + 6 mg.L ⁻¹ de glufosinato de amonio. Por dos semanas, luego a medio MS a la mitad, sin hormonas y 3 mg.L ⁻¹ de glufosinato	NE	El callo generado fue Tipo I en su mayoría. Se encontró mayor expresión transitoria cuando los embriones fueron sometidos a tratamiento osmótico de 4 hrs antes de bombardeo y transferidos a medio de inducción de callo 16 hrs después. Así como al utilizar 1100 psi, realizar dos disparos por plato y a una distancia

										del disco de ruptura de 6.6 cm.
Lui <i>et al.</i> (2009)	Línea de germoplasma de maíz chino18-599(red)	N6 modificados	Callo color amarillo paja, friable y de rápido crecimiento / 0.2 M manitol, 4 hora antes del bombardeo.	p35SBarNos / bar	Part. oro (1.1 μm). Pistola de genes Bio-Rad PDS-1000/He. 6 cm de distancia con 1100 psi de presión	7 días en medio osmótico a base de sales basalesN6 modificados (Chu <i>et al.</i> , 1975) y 0.4 mol.L ⁻¹	6, 10, 15 mg.L ⁻¹ PPT por 28 días en cada una de las concentraciones.	N6 con 0.5 mg L ⁻¹ 6-BA sin PPT por 7 días. 7 días más en medio N6 sin hormonas y sin PPT.	Medio MS con 0.5 mg L ⁻¹ de ANA.	67.7% , se analizaron platas regeneradas a las cuales se les detectó el gen <i>Bar</i> por PCR.

NE= No Especificado

Anexo 3. Técnicas usadas en la transformación genética por agroinfección

Referencia	Genotipo	Medio inducción y cultivo	Explantos/Tipo de callo	Cepa/Vector	Promotor/Marcador de selección/Gen de interés	Tiempo inoculación / Días en coocultivo / Dosis de acetocyringona
Gould <i>et al.</i> (1991)	Variedad Funk's G90	MS modificado	Apices de 1.0 x 0.3 mm aprox.	EHA 1 / pTiBO542	CaMv35-S / <i>NPTII</i> / β -glucuronidasa GUS	NE / 2 días / 30 μ M
Schläppi y Hohn (1992)	Línea A188, el mutante bx/bx, línea W23 y la línea 880254A	MS modificado	Embriones inmaduros germinados > 1mm con el meristemo apical perforado 10 a 20 ddp/NE	C58/NE	NE/NE/VMS (Virus Rayado de maíz)	NE/2días/NE
Ishida <i>et al.</i> (1996)	Líneas A188,W 117 W59E, A554, W153R, H99 y el cultivar BMS	Sales LS o Sales N6	Embriones inmaduros 1.5-2.0 mm 11-16 ddp y de 2.0 a 2.5 mm 13 a 18 ddp/ callo tipo I	LBA4404/pTOK233 y Psb113	CaMv35-S/hpt/ <i>NPTII</i> β -glucuronidasa GUS CaMv35/ <i>bar</i> / β -glucuronidasa GUS	5 min, con un pre tratamiento de vortex por 30 seg./ 3 días / 100 μ M
Negrotto <i>et al.</i> (2000)	Línea A188	Sales LS	Embriones inmaduros (0.8-1.4 mm)/NE	LBA4404 / pNOV117 y psB1	Ubiquitina <i>UbiP</i> / gen <i>pmi</i> que codifica para una fosfomanosa-isomerasa que convierte la manosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato	5 min, con un pre tratamiento de vortex por 30 seg./ 3 días / 100 μ M
Frame <i>et al.</i> (2002)	Híbrido Hi II	N6 modif	Embriones inmaduros / Embriogénico tipo II	EHA101 / pTF102	CaMv35-S / <i>bar</i> / β -glucuronidasa GUS	5 min. / 3 días / 100 μ M inf y coocultivo.
Mohamalawari <i>et al.</i> (2002)	Línea FRB73	MRM (Maize Recovery Medium) Bommineni <i>et al.</i> (1989).	Meristemos apicales (1-2 mm) de plántulas de 20 días ó embriones inmaduros(1-2mm) 14-16 ddp	K289 yChry9 Resistentes a 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA) el cual inhibe el crecimiento de agrobacterium en maíz /pGUS y pBG5	CaMv35-S / <i>NPTII</i> / β -glucuronidasa GUS	45 min con infiltracion por vacio a 0.5-0.6 atm / 2 días / 100 – 200 μ M
Ishida <i>et al.</i> (2003)	A188, H99, W117 y W182E	LSD1.5	Embriones inmaduros de 1.0-1.2 mm. /Callo tipo II	LBA4404 / pSB131	CaMv35-S / <i>bar</i> / β -glucuronidasa GUS	5min. / 3 días/ 100 μ M inf y coocultivo.
Sairam <i>et al.</i> (2003)	Híbridos: LH 74 x A 641, LH 262 x LH 252, LH 198 x LH 227, FR 1064 x FR 1064 (SDMS) x LH 185, and LH 176 x LH 177 DMS Línea: R23	MS modificado conteniendo (BAP; 5-10 mg·L ⁻¹ y Kinetina; 0.5-2.0 mg·L ⁻¹)	Meristemos / Embriogénico	EHA105 LBA4404 GV3101 / pBI121 pMP90RK	NE / NE / β -glucuronidasa GUS <i>gfp</i>	3 hrs./ 3-4 días / 200 μ M inf
Huang <i>et al.</i> (2004)	LH198XHill	NE	NE	/ pMON65153 (Plásmido binario con dos bordes)	NE/ <i>epsps-cp4</i> / <i>GOI</i> La región del T-DNA del plásmido codifica para el	NE

					marcador de selección y para el gen de interés.	
Shou <i>et al.</i> (2004)	Híbrido Hi II	NE	Embriones inmaduros	EHA101 pSHX004 / Prot. Kinasa de <i>Nicotiana</i> (NPK1)	35-S 2X / Dominio kinasa (800pb) de la Prot. Kinasa de <i>Nicotiana</i> (NPK1)	NE
Dinalova y Dolgikh (2005)	Líneas A188 y R91 y el híbrido F1(A188xR91)	MS + 1 mg·L ⁻¹ 2,4-D	Callo embriogénico inducido de embriones inmaduros 11 ó 12 ddp	LBA4404 / pBI121	<i>nos</i> (nopalina sintasa de <i>Agrobacterium</i>) / <i>NPTII</i> (neomicin fosfotransferasa II) CaMv35-S / β-glucuronidasa GUS	Toda la noche (combinado con bombardeo, infiltración por vacío 20 min a 0.8 atm y tratamiento con vortex 30 seg.) / sin cocultivo/ 100 μM o exudado de hojas de tabaco en la infección
Huang y Wei (2005)	Líneas 9046, Mo17 y 414	N6 modif.	Embriones inmaduros 10-15 ddp y 1.0-2.0 mm. / NE	GV3101 EHA105 LBA4404 / pCAMBIA3301	CaMv35-S / <i>bar</i> / β-glucuronidasa GUS	20 min./ 3 días / 200 μM inf y cocultivo
Sidorov <i>et al.</i> (2006)	Líneas: H99, LH198xHilI, PHA (Pa99xH99)xA188, KHI, L1, L2, L4 y L9, L9xL5	MSW57 induc. de callo.	Mitades de regiones nodales de 7-10 ddp, 5mm arriba y abajo del nudo. 16 hrs luz. / Tipo I 38-42%	ABI derivado de C58 / p MON30113	CaMv35-S / <i>nptII</i> / <i>gfp</i>	10 min./ 2 días / 200 μM inf
Frame <i>et al.</i> (2006)	B73, B104, B114, H99, Mo17, Ky21, W64, Oh43, A188, Mp420, W22, GT-Mas: gk	N6 modif ó MS	Embriones inmaduros 10-16 ddp y 1.2-2.0 mm. / Embriogénico (Tipo I y tipo II)	LBA4404 EHA101 / pTF102 pTF101.1	CaMv35-S / <i>bar</i> / β-glucuronidasa GUS	5 min./ 3 días/ 100 μM inf y cocultivo
Valdez-Ortiz <i>et al.</i> (2007)	Línea tropical LPC13	N6C1	Embriones inmaduros 1.5-2.0mm/	LBA4404, EHA101 y EHA105 /pCAMBIA3301	CaMv35-S / <i>bar</i> / β-glucuronidasa GUS	15 min/3-5 días/100 μM inf
Vega <i>et al.</i> (2008)	Hi-II A y Hi-II B	N6 modif. Infección y cocultivo con sales a la mitad.	Embriones inmaduros F2 9-13 ddp. Aprox. de 1.5 mm. / Embriogénico	LBA4404 EHA101 / pCAMBIA3301 Pzy101.1	CaMv35-S /	10 min./ 3 días / 100 μM inf
Takavar <i>et al.</i> (2010)	Líneas: S61, B73, Mo 17, A188. Híbridos: HiII B, HiII C	N6 modif.	Embriones inmaduros de 1.5-2.5 mm. / NE	LBA4404 EHA101 EHA105 / pCAMBIA3301	CaMv35-S / <i>bar</i> / β-glucuronidasa GUS	20 min./ 3 días/ 100 μM inf
Zhu <i>et al.</i> (2011)	Línea Jiao 51	N6 modif.	Callo 0.3-0.4 mm / Callo tipo II	EHA105 / Pc Mcchit1	CaMv35-S ó Ubiquitina (<i>Ubi-1</i>) / <i>bar</i> / β-glucuronidasa GUS Gen de Quitinasa (<i>Mcchit1</i> , DQ407723)	10 min./ 3 días / 100 μM inf
Li <i>et al.</i> (2013)	Híbrido Hi II	LSD1.5	Tejido embrionario proveniente de semillas de 8-	LBA4404/ Basado en pCAMBIA1300.	CaMv35-S/ Cassette de ARNi para suprimir la expresión de la enzima	5min. / 3 días/ 100 μM inf y cocultivo.

			10 días de desarrollo.		CYP81A9 y un cassette de expresión para el gen G10 de tolerancia a Glifosato	
Ombori <i>et al.</i> (2013)	Líneas: CML78, CML216, CML331, TL18, TL27, MU25 y A188 Híbridos: H627, PTL02	N6 modificado	Embriones inmaduros (1.0-2.0 mm) y sólo para el híbrido H627 callo derivado de embrión inmaduro	EHA101/pTF102 EHA101, AGL1 y LBA4404/Pbeck2000.4 LBA4404, GV Y, EHA105 / pCAMBIA2301 AGL1/pSB223	CaMv35-S / <i>bar</i> ó <i>NPTII</i> / β -glucuronidasa GUS	5 min para embriones y 60 min para callo/ 3-4 días 200 μ M medio de infección y coocultivo

NE= No especificado

Anexo 3 (Continuación). Técnicas usadas en la transformación genética por agroinfección.

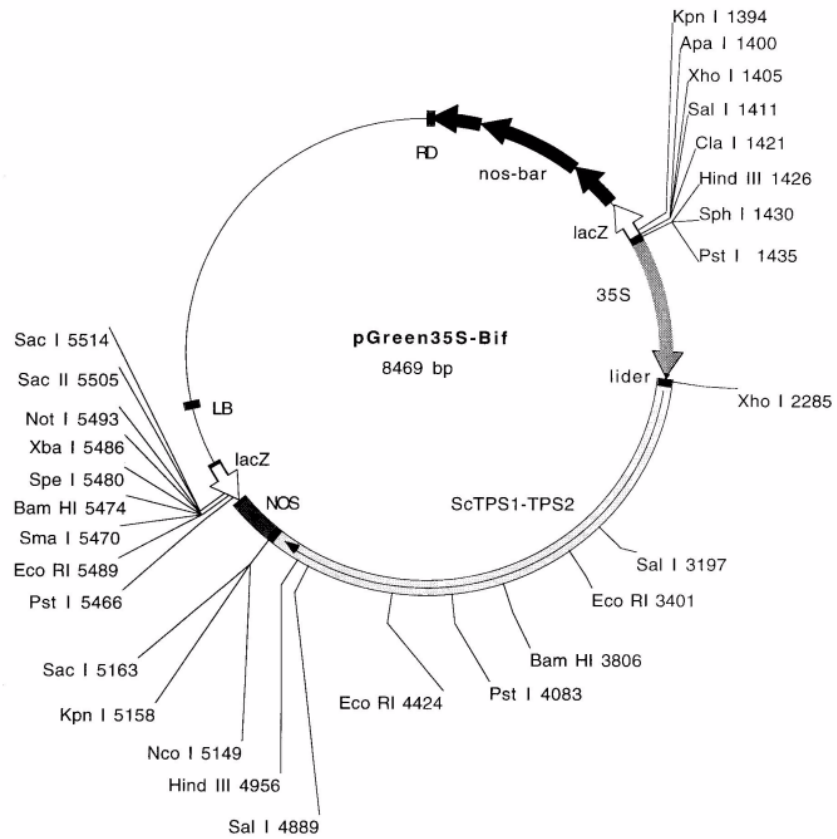
Referencia	Control de Agrobacterium	Agente selectivo de plantas.	Condiciones de Regeneración	Condiciones de Enraizamiento	Frecuencia de transformación
Gould <i>et al.</i> (1991)	Carbeniciliana 500 mg.L ⁻¹	Kanamicina 7.5 mg.L ⁻¹	Después del coocultivo se mantuvieron 3 días en un medio MS sin hormonas y con Carbeniciliana (500 mg.L ⁻¹). Después se agregó al medio Kanamicina (7.5 mg.L ⁻¹) y se dejaron de 7 a 10 días, después se quitó la kan y se dejaron crecer los brotes.	Medio MS sin hormonas y con Carbeniciliana (500 mg.L ⁻¹). Los brotes fueron transferidos a suelo 4 semanas después de el aislamiento.	De 15 plantas recobradas 6 se encontraron positivas para GUS; después de haber inoculado 60 ápices. Se detectaron plantas positivas para GUS en la F1, F2 y F3.
Schläppi y Hohn (1992)	Carbeniciliana 500 mg.L ⁻¹ Cefotaxime 250 mg.L ⁻¹	NE	NE	NE	30 a 90% (calculado como plántulas que muestran síntomas de MSV. Hay mayor competencia en embriones con estados embriogénicos tardíos. La línea A188 fue altamente competente, comparada con las demás.
Ishida <i>et al.</i> (1996)	Cefotaxime 250 mg.L ⁻¹	5 y 10 mg.L ⁻¹ de PPT ó 10 y 30 mg.L ⁻¹ de higromicina por 8 semanas	Medio LS suplementado con Zeatina 0.5 mg.L ⁻¹ y 5 mg.L ⁻¹ de PPT ó 30 mg.L ⁻¹ de higromicina	Medio LS a la mitad	
Negrotto <i>et al.</i> (2000)	Cefotaxime 250 mg.L ⁻¹	Manosa 10 g.L ⁻¹ por 6 semanas	Medio LS suplementado con ansimidol 25 mg.L ⁻¹ , kinetina 0.5 mg.L ⁻¹ por 2 semanas. Después 1 ó 2 semanas en el mismo medio sin	Medio LS a la mitad suplementado con 5 g.L ⁻¹ manosa	Usando una selección con manosa al 1% y sacarosa 0.5% por 12 semanas obtuvieron una frecuencia de transformación de hasta 30%

			reguladores y con 2.5 g.L ⁻¹ manosa		
Frame <i>et al.</i> (2002)	Cefotaxime 100 mg.L ⁻¹ Vancomicina 100 mg.L ⁻¹	1.5y 3 mg.L ⁻¹ Bialafos	Cefotaxime 250 mg.L ⁻¹ Bialafos 3 mg.L ⁻¹ ó Glufosinato de amonio 4 mg.L ⁻¹	NE	5.5%
Mohamalawari <i>et al.</i> (2002)	Carbenicilina 500 mg.L ⁻¹ Vancomicina 200 mg.L ⁻¹	Kanamicina 100 mg.L ⁻¹	NE	NE	La expresión de GUS fue más alta en los meristemos apicales (21-34%) y fue dependiente del tipo de cepa y de la edad del explante.
Ishida <i>et al.</i> (2003)	Carbeniciliana ó Cefotaxime 250 mg.L ⁻¹	5 mg.L ⁻¹ PPT, 1-2 semanas 10 mg.L ⁻¹ PPT, 6 semanas	5 mg. L ⁻¹ PPT	NE	La combinación de AgNO ₃ y Carbenicilina incrementaron la frecuencia de inducción de callo tipo I en H99 y W182E. El promedio de la frecuencia de transformación fue 2.8%
Sairam <i>et al.</i> (2003)	Carbeniciliana 500 mg.L ⁻¹ Cefotaxime 250 mg.L ⁻¹	0.5 mg L ⁻¹ Kanamicina	0.5 mg L ⁻¹ Kanamicina Carbeniciliana 50 mg.L ⁻¹ Cefotaxime 500 mg.L ⁻¹	NE	60-86%
Huang <i>et al.</i> (2004)	NE	NE	NE	NE	3.0 a 13.4% (Eventos generados/ embriones tratados). Además se encontró que reposicionando el gen del marcador de selección en el back-bone y dejando únicamente el gen de interés en la región del T-DNA, se generaron más eficientemente plantas transgénicas sin marcador.
Shou <i>et al.</i> (2004)	NE	NE	NE	NE	Se obtuvieron 24 eventos, con menos de 5 copias del transgen <i>NPK1</i> . La expresión del gen <i>NPK1</i> incrementó la tolerancia a sequía.
Danilova y Doligkh (2005)	Cefotaxime 150 mg.L ⁻¹	25 mg.L ⁻¹ kanamicina aplicado durante el enraizamiento.	MS Mushirage and Skoog, 1962)	MS Mushirage and Skoog, 1962) a la mitad de la concentración 25 mg.L ⁻¹ kanamicina + Cefotaxime 150 mg.L ⁻¹	La infiltración con vacío y la activación de la bacteria con acetosirynghona o exudado de hojas de tabaco ayudó a aumentar la frecuencia plantas resistentes a Kanamicina.
Huang y Wei (2005)	Carbeniciliana 250 mg.L ⁻¹ Cefotaxime 400 mg.L ⁻¹	5 mg.L ⁻¹ PPT, 2 sem. 10 mg.L ⁻¹ PPT, 2 meses	Sin PPT	Sin PPT	2.35 a 5.26%
Sidorov <i>et al.</i> (2006)	NE	Carbenicilina 500 mg.L ⁻¹ y Paranimicina 100 mg.L ⁻¹ Glifosato 0.1mM	250 mg.L ⁻¹ Car y 100 mg.L ⁻¹ Par ó Glifosato 0.1mM	250 mg.L ⁻¹ Car y 100 mg.L ⁻¹ Par ó Glifosato 0.1mM	60% de los eventos contienen 1-2 copias del transgen.
Frame <i>et al.</i> 2006	Carbeniciliana 250 mg.L ⁻¹	1.5, 3 y 5 mg.L ⁻¹ Bialafos, 2 semanas cada uno.	MS (Mushirage and Skoog, 1962). Sin hormonas con 4 ó 6 mg/L	NE	B114 (0.2%), ky21 (2%) Núm de callos resistentes al herbicida/Total de embriones infectados (x100). La frecuencia de

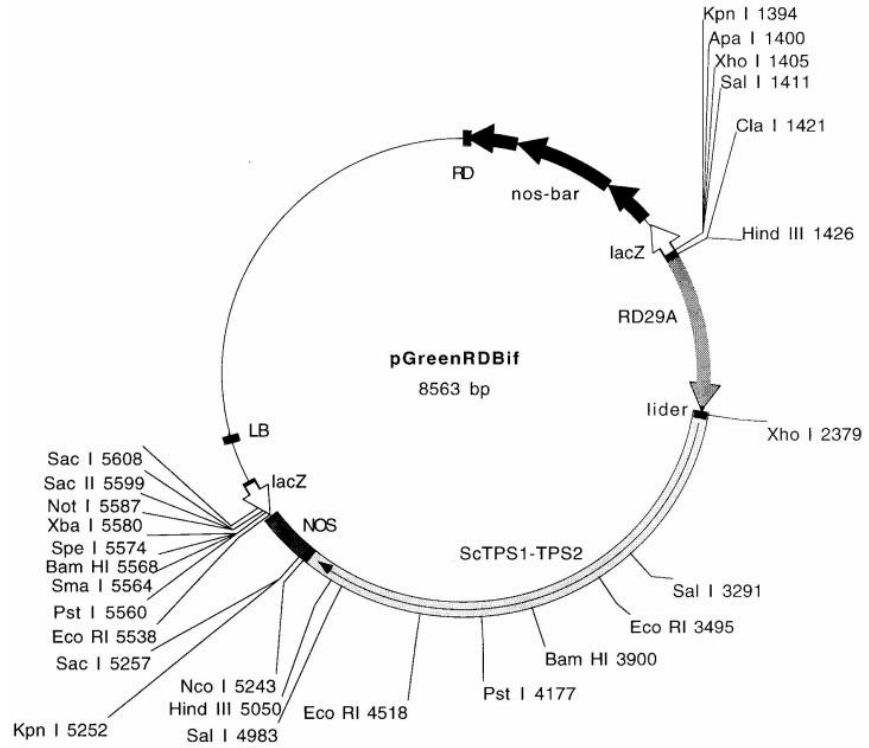
			glufosinato de amonio y 250 mg.L ⁻¹ de Car en oscuridad por 2-3 sem y sin glufosinato ni Car y en luz, para germinación de embriones.		transformación promedio fue más alta en medio MS (4%) que en medio N6 (0.5%).
V aldez-Ortiz <i>et al.</i> (2007)	Cefotaxime 250 mg.L ⁻¹	1.5 y 3 mg.L ⁻¹ Bialafos	MS (Mushirage and Skoog, 1962) con 3 mg.L ⁻¹ Bialafos	NE	5.42% y 6.82% usando embriones agroinfectados y a los cuales se les lesionó con bombardeo y sonicación respectivamente.
Vega <i>et al.</i> (2008)	Cefotaxime 250 mg.L ⁻¹	1.5 mg.L ⁻¹ PPT 2 semanas. 3 mg.L ⁻¹ PPT 3 a 4 meses.	3 mg.L ⁻¹ PPT	Sin PPT	12%
Takavar <i>et al.</i> (2010)	Timetin (Ticarclina y Ácido Clavulónico) 250 mg.L ⁻¹	1.5, 3 y 5 mg.L ⁻¹ PPT 2 semanas en cada uno.	5 mg.L ⁻¹ PPT y 250 mg.L ⁻¹ Timetin	5 mg.L ⁻¹ PPT y 250 mg.L ⁻¹ Timetin	6.45%
Zhu <i>et al.</i> (2011)	-	1.5 mg.L ⁻¹ PPT 2 semanas. 3 mg.L ⁻¹ PPT 3 a 4 meses.	Sin antibiótico y sin PPT	Sin antibiótico y sin PPT	En los análisis de PCR y Southern-blot, 7 de 8 plantas mostraron la integración del transgen.
Li <i>et al.</i> (2013)	250 mg.L ⁻¹ de Carbeniciliana ó Cefotaxime	Glifosato 2 mM	-	Glifosato 0.1 mM	Las plantas obtenidas fueron sensibles a nicosulfuron y resistentes a glifosato. Con lo cual las plantas pueden ser eliminadas con aplicaciones de 40g/Ha de nicosulfuron.
Ombori <i>et al.</i> (2013)	Carbeniciliana 500 mg.L ⁻¹	1.5 mg.L ⁻¹ Bialafos por 2 semanas y 3 mg.L ⁻¹ por 3 semanas	MS (Mushirage and Skoog, 1962). Sin hormonas con 3 mg.L ⁻¹ Bialafos en oscuridad por 2 semanas. Después en medio MS sin hormonas y sin bialafos con luz.	MS (Mushirage and Skoog, 1962). Sin bialafos.	La frecuencia de transformación se tomó como número de callos resistentes obtenidos al final del cultivo en medio de selección con respecto al número total de callos o embriones inoculados. La líneas A188 y CML216 tuvieron las más altas frecuencias de callos resistentes con 5.4 y 8.7% respectivamente. En la línea PTL02 se logró una eficiencia de transformación estable del 1.4%.

NE= No Especificado

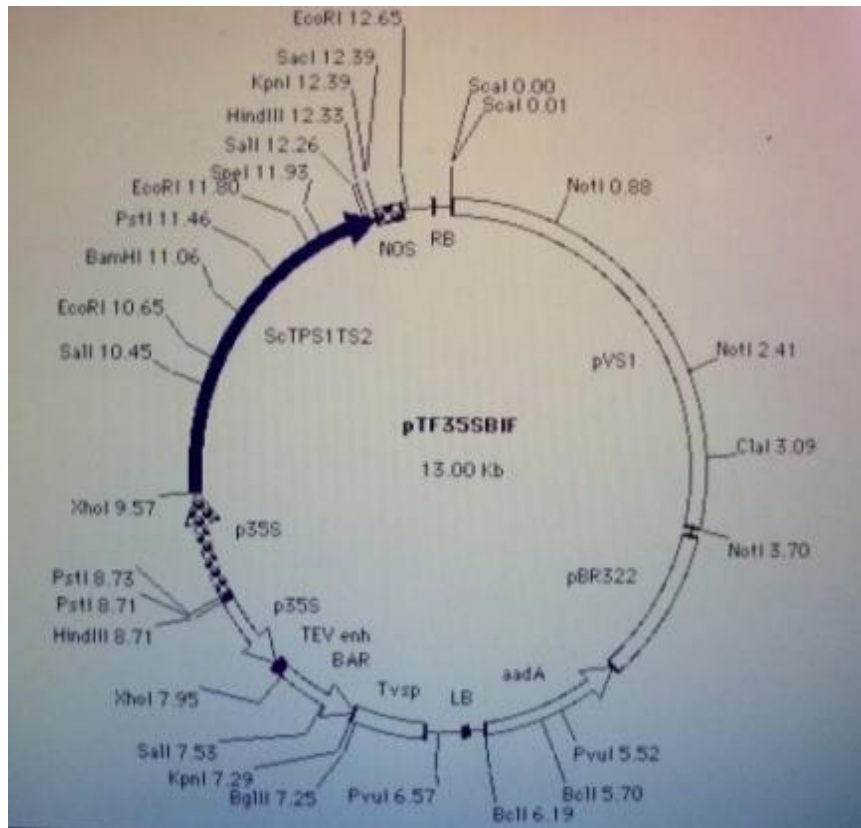
Anexo 4. Vectores



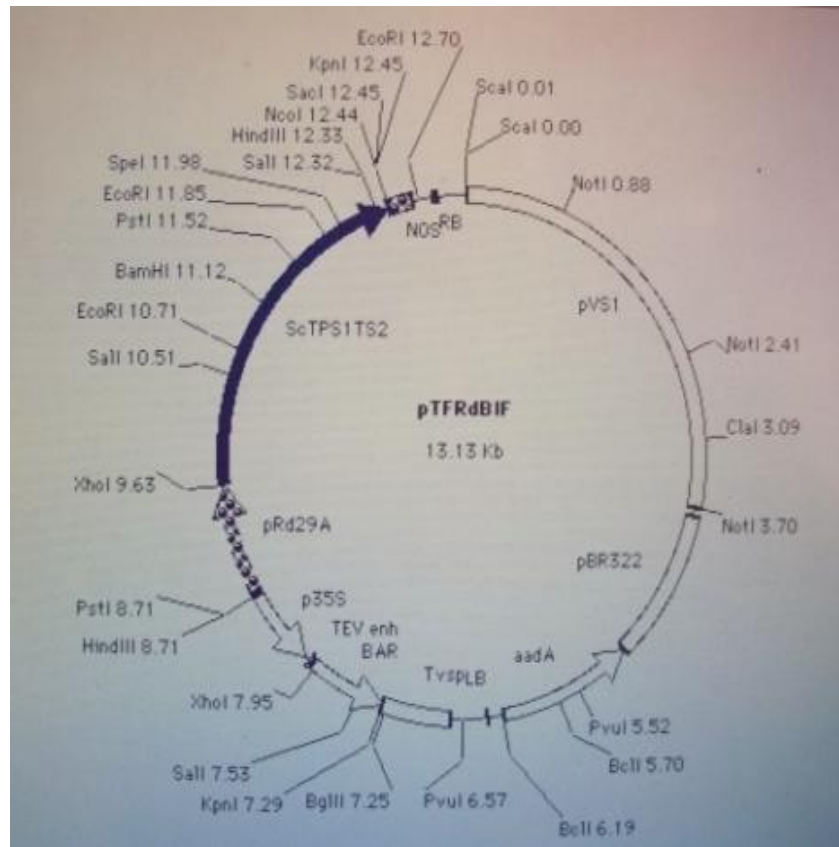
Vector pGreenII 0229 (*35S::ScTPS1-TPS2::NOS*), con el gen quimérico *35S::ScTPS1-TPS2::NOS* expresado ectópica y constitutivamente, y el gen de selección *nos::bar* para la selección durante la transformación.



Vector pGreenII 0229 (*Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS*) con el gen quimérico *Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS* con el promotor *Rd29A* inducible por sequía y por frío y el gen de selección nos::bar para la selección durante la transformación.



Vector pTF101.1 (*35S::ScTPS1-TPS2::NOS*), con el gen quimérico *35S::ScTPS1-TPS2::NOS* expresado ectópica y constitutivamente, y el gen de selección *nos::bar* para la selección durante la transformación.



Vector pTF101.1 (*Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS*) con el gen quimérico *Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS* con el promotor *Rd29A* inducible por sequía y por frío y el gen de selección *nos::bar* para la selección durante la transformación.