



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Obtención de variedades híbridas asexuales de maíz tolerantes a
sequía**

Tesis

Que presenta

KENNY ALEJANDRA AGREDA LAGUNA

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la Tesis: **Dra. Beatriz Xoconostle Cázares**

El presente trabajo de investigación para la obtención del grado de Doctora en Ciencias, se desarrolló en el laboratorio 24 de Biología Molecular de Plantas del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, unidad Zacatenco, bajo la dirección de la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares y con asesoría del Dr. Roberto Ruiz Medrano, la Dra. María Eugenia Hidalgo Lara y del Dr. Jesús Hinojosa.

Esta investigación fue financiada por CONACyT 105985 (BXC) y Beca CONACyT número 3222222.

AGRADECIMIENTOS

A Janed Laguna mi madre por estar siempre a mi lado y apoyarme en cada paso que doy, es mi fortaleza y mi ejemplo a seguir.

A Conacyt y Cinvestav por el apoyo financiero y de instalaciones para la realización de este trabajo.

A la Dra. Beatriz Xoconostle por su asesoría, apoyo y por haberme permitido ser parte de su laboratorio, donde pude adquirir muchos conocimientos y pude llevar a cabo este trabajo de titulación.

Al Dr. Roberto Ruíz por brindarme asesoría y apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A mis asesores por la asesoría brindada durante el transcurso de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio 24 y 12 que me brindaron siempre su cariño y apoyo, y que lograron que siempre me sintiera bienvenida en México.

A Estelita y a Lulu por siempre brindarme su amistad y cariño en todo momento, son muy buenas personas y sobretodos estupendas amigas.

Al técnico de laboratorio José Luis Sánchez Figueroa por todo el soporte, ayuda (sobre todo cuando había que preparar kilos y kilos de tierra) y amistad brindada. Siempre tuvo una sonrisa para mí.

Al auxiliar de investigación M. en C. Leandro Alberto Núñez Muñoz por la asesoría, apoyo y amistad brindada.

Al M. en C. Victor Hugo Rosales por el apoyo y asesoría durante la realización de clitómetro de flujo.

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 El Maíz.....	5
1.1.1 Características del maíz	5
1.1.2 Cultivo y Producción.....	5
1.2 Vigor Híbrido/Heterosis	6
1.2.1 Plantas haploides	6
1.3 El Nucleosoma.....	7
1.3.1 Histonas	8
1.3.2 El amino-terminal de la histona	8
1.4 Proteína CENH3	11
1.5 Trehalosa.....	12
1.5.1 Rutas de biosíntesis	13
1.5.2. Hidrólisis de la trehalosa	14
1.5.3 Propiedades de la trehalosa como molécula	15
1.5.4 Usos biotecnológicos de la trehalosa	16
1.6 Cultivo de Tejidos Vegetales.....	17
1.6.1 Embriogénesis somática	18
1.7 Transformación Genética de Plantas	19
1.8 Variedades de Maíz Transformadas	19
2. ANTECEDENTES.....	21
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS.....	28
5. OBJETIVO GENERAL	29
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
7.1 Diseño Y Obtención de Construcciones.....	30
7.1.1 Construcción gen CENH3 de maíz	30
7.1.1.1 Ensamblaje de construcciones	31

7.1.1.2	Ligación de construcciones ensambladas a vector de entrada.....	32
7.1.1.3	Subclonación a vector de expresión	33
7.1.2	Construcción RNA antisentido de Trehalasa	34
7.1.3	Electroforesis de producto de PCR.....	35
7.2	Obtención de Plantas Genéticamente Modificadas	35
7.2.1	Transformación de callos por biobalística con el gen cenh3 y TreAS	35
7.2.1.1	Generación de callos embriogénicos.....	35
7.2.1.2	Recubrimiento de microproyectiles para biobalística	36
7.2.1.3	Bombardeo de microproyectiles	37
7.2.1.4	Selección y regeneración de callos transformados	37
7.2.2	Obtención de Plantas GM por Agroinfección	38
7.2.3	Obtención de plantas B73 con TreAS.....	38
7.2.4	Crecimiento en invernadero de plantas GM.....	38
7.3	Análisis Moleculares de plantas GM	39
7.3.1	Extracción de DNA	39
7.3.2	Detección de transgen por PCR punto final.....	39
7.3.3	Número de copias por ddPCR.....	39
7.4	Cuantificación de los niveles de expresión del mRNA.....	40
7.5	Análisis de ciclo celular en plantas con cenh3	40
7.5.1	Citometría de flujo	40
7.5.2	Análisis morfológico de anteras (Meiocitos).....	41
7.5.3	Análisis morfológico y ciclo celular en raíz.....	41
7.6	Análisis bromatológico y toxicológico de Plantas de TreAS	42
7.8	Cuantificación del contenido de trehalosa.....	43
8.	RESULTADOS	44
8.1	Diseño y Obtención de construcciones	44
8.1.1	Construcción del gen CENH3.....	44
8.1.1.1	Análisis bioinformático de N-terminal de cenh3	44
8.1.1.2	Ensamblaje in vitro de CENH3	45
8.1.1.3	Secuenciación de CENH3	46
8.1.1.4	Ensamblaje de las construcciones	46
8.1.1.5	Clonación en vector de entrada y vector destino	48
8.1.2	Clonación de Trehalasa antisentido a vector de entrada y vector destino.....	49
8.2.1	Plantas obtenidas por biobalística	50

8.2.1.1	Obtención y transformación de callos embriogénicos líneas H99 y H99xB73 ..	50
8.2.1.2	Selección y regeneración de callos transformados	51
8.2.1.3	Eficiencia de selección y regeneración.....	53
8.2.1.4	Crecimiento y desarrollo de plantas transformadas por biobalística	54
8.2.2	Obtención de plantas transformadas por Agrobacterium	55
8.2.2.1	Selección de plantas transformadas	56
8.2.2.2	Crecimiento de plantas transformadas por Agrobacterium	57
8.3	Análisis Moleculares de plantas GM	57
8.3.1	Extracción de DNA	57
8.3.2	Detección del transgen por PCR punto final	58
8.3.2.1	Detección en Plantas H99	58
8.3.2.2	Detección en Plantas H99xB73	60
8.3.2.3	Detección del transgen en progenie F1 de plantas H99.....	60
8.3.2.4	Detección del transgen en plantas transformadas por Agrobacterium.	61
8.3.2.5	Detección del transgén en progenie F1 plantas transformadas por Agrobacterium.....	61
8.3.2.6	Eficiencia de transformación por biobalística	62
8.3.2.7	Eficiencia de transformación por Agroinfección	63
8.3.4	Número de copias por ddPCR	63
8.4	Cuantificación de los niveles de expresión por RT-ddPCR.....	66
8.5	Análisis del ciclo celular	68
8.5.1	Citometría de flujo	68
8.5.2	Análisis morfológico de meiocitos de anteras	71
8.5.3	Análisis morfológico y ciclo celular en raíz.....	72
8.6	Análisis bromatológicos y toxicológicos de las plantas TreAS.	73
9.	DISCUSIÓN	75
10.	CONCLUSIONES	82
11.	PERSPECTIVAS	84
12.	REFERENCIAS	85
13.	ANEXOS	93

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Esquema representativo del efecto de los centrómeros alterados.	7
Fig. 2 Esquemática del ensamble de las histonas para la formación del nucleosoma.	8
Fig. 3 Imagen de la entrada y salida de los amino-terminales en las histonas.	9
Fig. 4 Esquema de la alteración de la cromatina por incorporación de variantes de histonas.....	11
Fig. 5 Estructura de la molécula de trehalosa.....	13
Fig. 6 Vías de síntesis de trehalosa.....	13
Fig. 7 Esquema de la hidrólisis de la trehalosa en dos moléculas de glucosa	14
Fig. 8 Vías de catálisis de trehalosa	15
Fig. 9 Esquema de la función de la trehalosa como osmoprotector	16
Fig. 10 Análisis de crecimiento y parámetros fotosintéticos de plantas tolerantes a sequía	23
Fig. 11 Esquema representativo del diseño de las construcciones el gen CenH3	30
Fig. 12 Esquema del vector de clonación PCR8/GW/TOPO	33
Fig. 13 Esquema del vector de expresión destino pBGWFS7	34
Fig. 14 Esquema del diseño de la construcción antisentido del gen Trehalasa (TreAS).	35
Fig. 15 Secuencia de la proteína y su estructura 2D y 3D	44
Fig. 16 Alineamiento de proteínas histona centroméricas H3.....	45
Fig. 17 Gel electroforético de ensamble in-vitro del gen CENH3.....	46
Fig. 18 Gel electroforético de la amplificación Tnos, 35S-P y Knotted	47
Fig. 19 Geles electroforéticos de ensamble de construcciones	47
Fig. 20 Verificación de las construcciones clonadas en el vector pCR8/GW	48
Fig. 21 Verificación de las construcciones en el vector de expresión pBGWFS7.0 ..	49
Fig. 22 Clonación de la construcción de Trehalasa antisentido (TreAS)	50
Fig. 23 Esquema representativo de la transformación de embriones somáticos por Biobalística.....	51
Fig. 24 Embrión somático control de transformación con antocianinas.	51
Fig. 25 Selección de callos embriogénicos H99	52
Fig. 26 Selección de callos embriogénicos H99xB73	52
Fig. 27 Clonas seleccionadas llevadas a medio de regeneración.	53
Fig. 28 Plantas regeneradas y aclimatadas de la línea H99.....	53
Fig. 29 Plantas regeneradas y aclimatadas de la línea H99xB73.....	53
Fig. 30 Crecimiento de plantas en condiciones de invernadero.....	55
Fig. 31 Esquema de transformación de semillas con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ...56	
Fig. 32 Selección con glufosinato de amonio en hojas de maíz VT401	56
Fig. 33 Crecimiento de plantas transformadas por <i>Agrobacterium</i> en condiciones de invernadero.	57

Fig. 34 Geles electroforéticos de DNA de plantas obtenidas por biobalística y agroinfección.....	58
Fig. 35 Detección del gen Bar y el T-nos por medio de PCRpf en la línea H99.....	58
Fig. 36 Detección del gen CenH3 en C1 por medio de PCRpf en la línea H99.....	59
Fig. 37 Detección del gen CenH3 en C2 por medio de PCR en la línea H99.....	59
Fig. 38 Detección del gen de Trehalasa antisentido (TreAS).....	59
Fig. 39 Detección del gen Bar en H99XB73 por medio de PCRpf en plantas C1, C1T, C2 y C2T.	60
Fig. 40 Detección del gen TreAS en H99XB73 por medio de PCRpf en plantas C2T, C1T y TreAS	60
Fig. 41 Detección del gen Bar por PCRpf en planta C2 generación F1 línea H99....	60
Fig. 42 Detección del transgen BAR por PCRpf en plantas C1 transformadas por agroinfección.....	61
Fig. 43 Detección del transgen BAR por PCRpf en plantas C2 transformadas por agroinfección.....	61
Fig. 44 Detección del transgen BAR por PCRpf en plantas TreAS transformadas por agroinfección.....	61
Fig. 45 Detección del número de copias del gen Bar en plantas de la línea H99	64
Fig. 46 Detección del número de copias del gen Bar en plantas H99xB73	64
Fig. 47 Detección del número de copias de 35S en plantas H99xB73	65
Fig. 48 Detección del número de copias del gen Bar en plantas VT401	65
Fig. 49 Cuantificación de los niveles de expresión de CENH3 por RT-ddPCR en plantas H99.....	66
Fig. 50 Cuantificación de de los niveles de expresión de TreAS por RT-ddPCR en plantas H99.....	66
Fig. 51 Cuantificación de los niveles de expresión de CENH3 por RT-ddPCR en plantas H99XB73	67
Fig. 52 Cuantificación de de los niveles de expresión de TreAS por RT-ddPCR en plantas H99XB73	67
Fig. 53 Graficas de Ciclo celular por Citometría en plantas WT y en plantas H99....	68
Fig. 54 Graficas de Ciclo celular por Citometría en plantas WT y en plantas H99 x B73.....	69
Fig. 55 Graficas de Ciclo celular por Citometría en plantas WT y en plantas VT40170	
Fig. 56 Histogramas de Citometría de flujo.....	71
Fig. 57 Análisis comparativo por fluorescencia con DAPI (63x) de polen de plantas	72
Fig. 58 Imágenes de núcleos de raíces teñidas con DAPI	73
Fig. 59 Núcleos de raíces teñidas con DAPI.....	73

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Distribución y modificaciones de las variantes de histonas en eucariontes. .	10
Tabla 2 Usos biotecnológicos de la trehalosa.....	17
Tabla 3 Reportes en efecto de la acumulación de trehalosa en diferentes plantas ...	22
Tabla 4 Mezcla de reacción para amplificación mediante PCR del Promotor 35S, knotted, cenH3 y tnos.	31
Tabla 5 Condiciones de amplificación por PCRpf de cada componente de las construcciones	31
Tabla 6 Rampa de ensamblaje para la obtención de las construcciones.	32
Tabla 7 Mezcla de reacción para ligación.....	33
Tabla 8 Mezcla de clonasa para la subclonación de las construcciones	34
Tabla 9 Composición del medio MS	36
Tabla 10 Eventos de transformación utilizados y sus respectivos medios de selección.	51
Tabla 11 Registro de la eficiencia de regeneración	54
Tabla 12 Eficiencia de transformación por biobalística	62
Tabla 13 Eficiencia de transformación por <i>Agrobacterium</i>	63

RESUMEN

Al observar durante la maestría que la inhibición de la enzima trehalasa confiere tolerancia a sequía en plantas de maíz B73 probadas en invernadero, se llevó a cabo una prueba piloto en campo que corroboró los resultados previamente obtenidos. También se realizó la cuantificación de trehalosa por medio de un ensayo fluorométrico, observando una mayor acumulación del disacárido en plantas GM (Genéticamente modificados) con respecto a los controles. Al realizar la cuantificación del número de copias y abundancia del mensajero mediante el uso de digital droplet PCR (ddPCR), se detectaron de una a dos copias por evento y una disminución de mensajero. Por otra parte, se realizó una prueba toxicológica y bromatología en semillas de maíz GM y sus controles, que no evidenciaron efectos o cambios significativos.

Al demostrar que el uso de un siRNA para la trehalasa confiere tolerancia a sequía, se propuso usar esta construcción en variedades híbridas de maíz en conjunto con una construcción para el gen de la histona CENH3 involucrada en la correcta migración de los cromosomas sin la región N-terminal. Esto con la finalidad de que la característica de tolerancia a sequía se pueda conservar en las siguientes generaciones mediante la obtención de dobles haploides que tengan solo la información de un parental, debido a que las autopolinizaciones en el maíz conllevan a la pérdida de la heterocigosis.

Para llevar a cabo esta parte del proyecto, se transformaron diferentes líneas híbridas de maíz por biobalística y *Agrobacterium* y se evaluó el número de copias y niveles de expresión mediante el uso de ddPCR, obteniendo una sola copia por evento y una disminución de los niveles de expresión de CENH3. Al evaluar el ciclo celular de las plantas GMs por citometría de flujo y microscopia confocal, se pudo detectar un cambio en la dinámica del ciclo celular en especial en el número de células que estaban en los estados G1/G2 y en la segregación de los cromosomas en anafase, al igual que una reducción del contenido de DNA que nos indicaba una inducción de haploidía. En conclusión, la modificación de la histona CENH3 nos podría permitir la obtención de plantas haploides pero con una progenie limitada pero posiblemente podrían mantener la característica de tolerancia a sequía.

ABSTRACT

We observed during my master that the inhibition of the trehalase enzyme confers tolerance to drought in B73 maize plants tested in greenhouse, for this reason in this project the pilot test was carried out in the field that corroborated the previously obtained results. Also, the quantification of trehalose was carried out by means of a fluorometric test, observing a greater accumulation of the disaccharide in genetically modified (GM) plants with respect to the controls. When quantifying the number of copies and abundance of the messenger using digital droplet PCR (ddPCR), we detected one to two copies per event and a messenger decrease. On the other hand, toxicological and bromatology tests were carried out on GM corn seeds and their controls, which did not show significant effects or changes.

After our results demonstrating that the use of a siRNA for trehalase confers tolerance to drought, we used this construct in hybrid corn varieties together with a construction for the histone gene CENH3 involved in the correct migration of the chromosomes without the N-terminal region, with the purpose that the property of tolerance to drought can be conserved in the following generations by obtaining double haploids that have only the information of a parent, because the self-pollination in the corn leads to the loss of the heterozygosis.

In order to carry out this part of the project, different hybrid corn lines were transformed using biobalistic and Agrobacterium. The number of copies and levels of expression were evaluated using ddPCR, obtaining a single copy per event and a decrease in the levels of expression of CENH3. When evaluating the cell cycle of the GM plants with flow cytometry and confocal microscopy, a change in the cell cycle dynamics was detected, especially in the number of cells that were in the G1/G2 states and in the segregation of the chromosomes in anaphase, as well as a reduction in DNA content that indicated an induction of haploidy. In conclusion, the modification of CENH3 histone could allow us to obtain haploid plants, with a limited progeny, possibly maintaining the property of drought tolerance.

INTRODUCCIÓN

El maíz es uno de los cultivos más importantes junto con el arroz y el trigo, para el consumo humano. Según información de la USDA 2017, México se ubica entre los 10 principales países productores de maíz, pero solo llega a ser el octavo en rendimiento, sin poder sobrepasar a EE.UU y China. La baja productividad del cultivo de maíz en México es debido a falta de germoplasma mejorado, ausencia de técnicas agronómicas, así como los efectos originados por estrés biótico y abiótico; entre estos el más predominante la sequía. Actualmente se conoce que las plantas en su ambiente natural se encuentran expuestas a diversos niveles de limitación de agua, por lo que han adquirido estrategias de adaptación que les permiten, en muchos casos, mantener sus actividades metabólicas a bajos potenciales de agua (Díaz y Antón, 2002), involucrando diversos mecanismos de respuesta tanto a nivel molecular, metabólico y fisiológico en distintas especies de plantas (Monneveux y Belhassen, 1996), dichos mecanismos adquiridos pueden ser mejorados para permitir una respuesta más rápida y eficiente frente a dichos estrés ambientales.

Si se vincula lo comentado anterior con la creciente demanda de maíz en el mundo, es necesario la adopción de nuevas tecnologías; como es el caso de EE.UU, donde los rendimientos de maíz han aumentado drásticamente, debido a la adopción de variedades híbridas y genéticamente modificadas, el uso de insumos químicos y la eficiencia de la utilización diferentes períodos de siembra. Para el caso de México aún se siguen usando para su producción el uso de variedades convencionales (Jaffé y Rojas, 1994) y solo un 20% se basa en el uso de variedades híbridas.

Algo importante para tener en cuenta, es que el uso de híbridos puede conllevar a una dependencia tecnológica, ya que los híbridos comerciales disminuyen la ganancia neta y el rendimiento del grano entre generaciones debido a las autopolinizaciones y esto origina la necesidad de adquirir en cada cosecha semillas nuevas certificadas, aumentando el costo de la producción de maíz.

Por lo anteriormente mencionado se propone la evaluación en campo de variedades de maíz tolerantes a sequía (obtenidas mediante el uso de RNA antisentido de trehalasa) ya evaluadas en invernadero con el fin de comprobar su eficacia en condiciones no controladas y así mismo determinar los contenidos de trehalosa y sus transcritos. Al mismo tiempo implementar la modificación del gen CENH3 en maíz, que es una proteína específica del cinetocoro involucrada en el movimiento de los cromosomas en la meiosis y mitosis, y en el reclutamiento de otras proteínas (Zhong et al., 2002). Con esta modificación se pretende mantener el estado híbrido de plantas de maíz que posteriormente presentaran el fondo genético de tolerancia a sequía, y así obtener gametos diploides capaces de eliminar el genoma uniparental después de la fertilización y conservar las características de uno de los parentales, como se ha observado en plantas modificadas de *Arabidopsis* (Ravi y Chan, 2010).

Para llevar a cabo este objetivo se empleó una mutación dominante negativa en CENH3 (sin N-terminal) bajo la regulación de un promotor constitutivo (35S CaMV) y el promotor tejido específico (KNOTTED1) en construcciones independientes junto con el gen de Trehalasa anti-sentido que disminuye la actividad de la enzima trehalasa que hidroliza al disacárido trehalosa y permite que las plantas adquirieran tolerancia a sequía. Con el fin de posteriormente obtener variedades de maíz que mantengan el estado híbrido y posean el fondo genético de tolerancia a sequía.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 El Maíz

El maíz (*Zea mays L.*) perteneciente a la familia de las Poaceae (Gramíneas), tribu Andropogoneae, subtribu Tripsacinae, fue domesticado a partir del Teocintle (*Zea mays ssp mexicana*) hace 8000 años como resultado de mutaciones acumulativas que le permitieron evolucionar en hábitats variados bajo selección humana y natural (León y Rodríguez, 2010). Posteriormente, se produjo una enorme diversificación de variedades con las que los pueblos lograron satisfacer sus necesidades alimenticias, convirtiéndolo en el alimento básico en las culturas y civilizaciones precolombinas avanzadas, como la Inca en Sudamérica, la Maya y la Azteca en Mesoamérica.

1.1.1 Características del maíz

El maíz es una gramínea anual, monoica, con una altura que varía entre 1 y 4 metros, tienen un tallo erguido, rígido y sólido. Sus necesidades hídricas varían a lo largo del cultivo y durante el crecimiento vegetativo es cuando más agua requiere. Se adapta a diferentes condiciones ambientales, es capaz de crecer en altas y bajas altitudes, en climas tropicales y subtropicales (Pingali y Pandey, 2000).

1.1.2 Cultivo y Producción

El maíz se cultiva prácticamente en todo el mundo, con una producción total de aproximadamente 1.025 millones de toneladas en el periodo de 2016/2017 y un rendimiento promedio de 5.4 toneladas por hectárea (Ha), para el caso de México, se registra una producción cerca de 25 millones de toneladas (www.produccionmundialdemaiz.com y USDA 2016), que permite ubicarlo entre los principales productores a nivel mundial, aunque por debajo de EE.UU y China, que representan cerca del 60% de la producción mundial (Galarza y cols, 2004).

1.2 Vigor Híbrido/Heterosis

El mejoramiento genético de plantas se lleva a cabo desde hace miles de años, presumiblemente desde la domesticación de los cultivos; realizándose mediante cruzas entre especies de plantas (hibridación sexual), que aumenta la variabilidad genética y la productividad de ciertos cultivos, al igual que la transmisión de tolerancia a cierto número de factores bióticos o abióticos, pero esta hibridación sexual entre organismos de diferentes especies puede estar limitada por barreras de incompatibilidad que no permite la obtención de híbridos en todas las especies. También existe la desventaja de la pérdida de rendimientos cuando se da autofecundación en los híbridos, como es el caso del maíz en el que la productividad de la F2 y F3 disminuye respecto a la F1, por lo que esto llega a generar pérdidas al usar generaciones avanzadas de híbridos (Martínez-Gómez y col, 2006) y una alternativa es el uso de plantas haploides que contienen solo la información deseada de un solo parental.

1.2.1 Plantas haploides

Existen distintos métodos por lo que se puede generar plantas haploides y permitir que las características deseadas perduren, como son el cultivo de células gametofíticas para regenerar plantas haploides a partir de anteras y óvulos, pero muchas especies son recalcitrantes a este proceso. Otra vía es por medio de la ginogénesis en células femeninas no fertilizadas que desarrolla un embrión, proceso similar a la partenogénesis, o también se pueden inducir por cruzas interespecíficas o manipulación genética, donde uno de los genomas de los parentales es eliminado después de la fertilización; esto se puede deber a la interacción desigual de los centrómeros de las dos especies con el huso mitótico, causando así la eliminación selectiva de los cromosomas (Finch, 1983; Laurie y Bennett, 1986; Forster y cols, 2007; Ravi y Chan, 2010).

Un ejemplo del uso de plantas haploides donde el genoma de uno de los parentales es eliminado selectivamente después de la fertilización originando haploides con cromosomas que derivan de un solo parental es la cruce entre dos cultivares de cebada (*Hordeum vulgare* X *Hordeum bulbosum*), en donde lo cromosomas de *H.*

bulbosum son mal segregados y eliminados durante la embriogénesis (Sanei y cols, 2011). De igual manera se encontró en plantas de *Arabidopsis thaliana* una nueva estrategia para la obtención de dobles haploides, en dónde al realizar una perturbación sutil en la histona CENH3 específica del centrómero (**Fig.1**); involucrada en el funcionamiento del cinetocoro, es posible obtener progenie haploides y dobles haploides (mediante duplicación de cromosomas espontáneamente y/o por meiosis no reduccional), ya que los cromosomas al tener defectos en el cinetocoro y al ser mal segregados son eliminados durante la mitosis cigótica (Ravin y Chan, 2010).

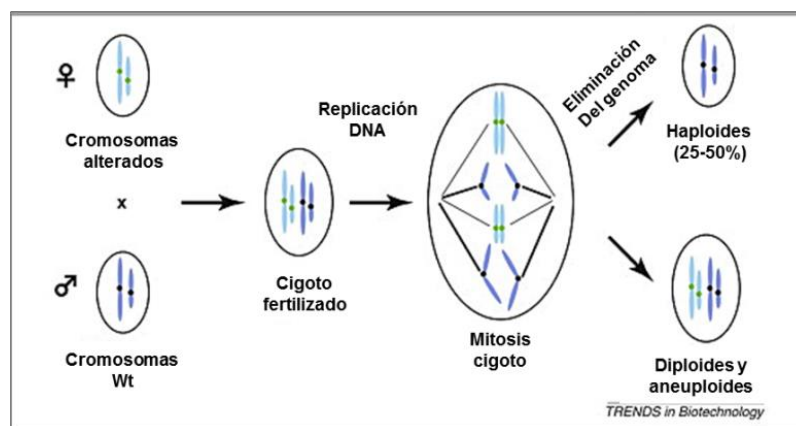


Fig. 1 Esquema representativo del efecto de los centrómeros alterados.

Las plantas que expresan la proteína CENH3 alterada (cromosomas azul claro), al ser cruzada con plantas silvestres (cromosomas azul oscuro) durante la mitosis cigótica, se produce una mala segregación de los cromosomas ocasionado la eliminación del genoma de uno de los parentales, donde una fracción sustancial (25-50%) de las plantas adultas pueden ser haploides, con cromosomas solo del parental silvestre (azul oscuro) (Chan, 2010).

1.3 El Nucleosoma

Los nucleosomas son los componentes básicos de los cromosomas en las células eucariotas y cada nucleosoma se componen de un octámero de histonas, en las cuales el DNA se envuelve alrededor de ellas (DNA de núcleo), que permiten la condensación del DNA y con ello la formación de los cromosomas (Watson y cols, 2007; Lewin, 2008).

1.3.1 Histonas

Las histonas son proteínas que conforman el nucleosoma y comúnmente contiene cinco histonas: H1, H2A, H2B, H3 y H4; de las cuales dos copias de cada una de estas histonas forman las proteínas del núcleo alrededor del cual el DNA nucleosomal es envuelto, y es la histona H1 la que une el DNA entre nucleosomas (histona de unión) siendo esta la única con una sola copia, a diferencia de las otras histonas (Watson y cols, 2007).

Para la formación de los nucleosomas, primero las histonas H3 y H4 forman heterodímeros, los cuales juntos forman tetrámeros, y las histonas H2A y H2B forman entre ellas heterodímeros; que posteriormente se unen al complejo para formar el nucleosoma final (Fig. 2) y conllevar al ensamblaje de la cromatina y luego a la formación visible de los cromosomas en la metafase (Watson y cols, 2007).

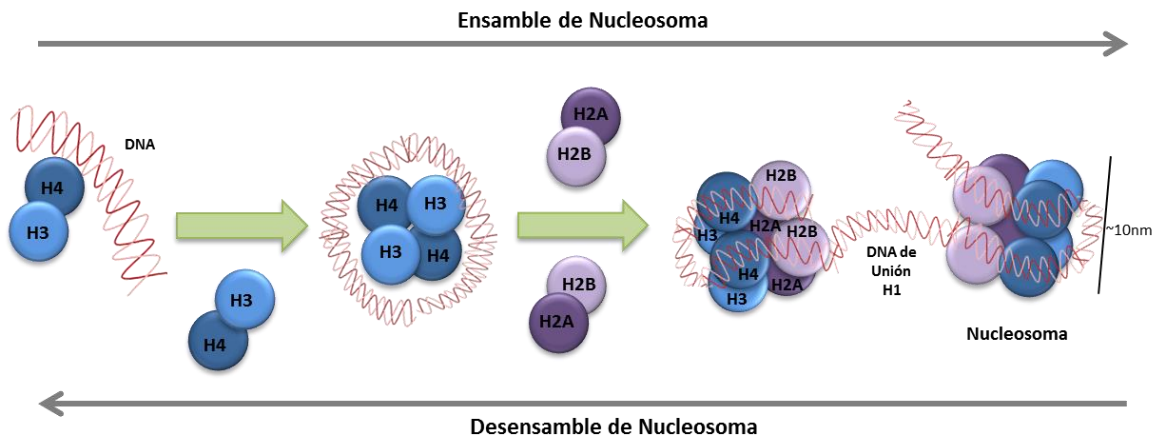


Fig. 2 Esquema del ensamblaje de las histonas, para la formación del nucleosoma.

1.3.2 El amino-terminal de la histona

El N-terminal de la histona se encarga de estabilizar el envolvimiento del DNA alrededor del octámero (Fig.3) (Watson y cols, 2007; Lewin, 2008). Los amino-terminales de las histonas son frecuente modificados en una variedad de moléculas pequeñas que origina las llamadas variantes de histonas, tal es el caso de la lisina que es frecuentemente modificada con grupos acetilos o metilos, al igual la arginina

que es frecuentemente fosforilada o metilada al igual que la serina. Estas modificaciones pueden llegar a afectar la capacidad de las matrices de los nucleosomas para una mayor represión de la estructura de la cromatina y la modulación de la formación de las fibras de nucleosomas de 30-nm (Watson y cols, 2007).

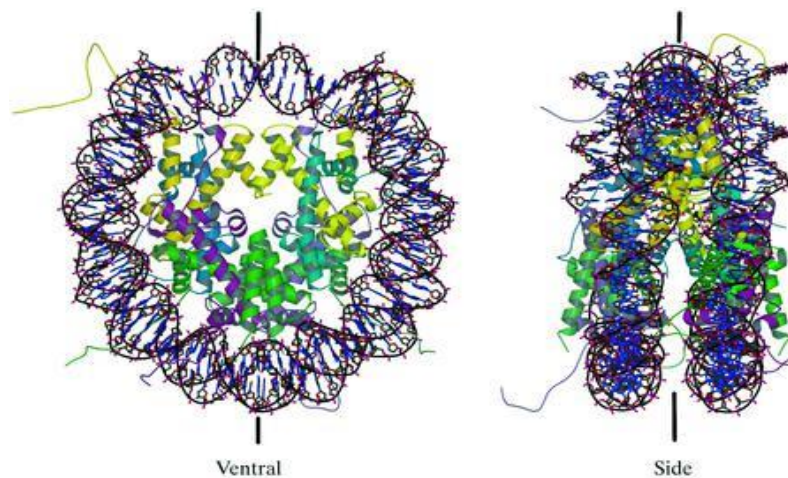


Fig. 3 Imagen de la entrada y salida de los amino-terminales de las histonas en la formación del nucleosoma (Harp y cols, 2000).

Aunque las histonas están entre las proteínas más conservadas de los eucariotas, existen numerosas variantes de histonas (**Tabla 1**) que pueden reemplazar una de las cuatro histonas originando una forma alterna del nucleosoma (**Fig.4**), un ejemplo representativo es la histona H2A.X que es la variante de la H2A y que se localiza adyacentemente a la hebra del DNA cuando esta sufre ruptura y es fosforilada, permitiendo el reconocimiento de enzimas reparadoras del DNA. Una segunda variante de histona es CENP-A en humanos (HTR12 en *Arabidopsis thaliana* y CENH3 en otros organismos) que reemplaza a la histona H3 conservando el dominio C-terminal de H3 con un 62% de identidad (Howman y cols, 2000). La pérdida de CENP-A puede interferir con la asociación de componentes del cinetocoro con el DNA centromérico (Sullivan y cols, 1994; Watson y cols, 2007; Chan, 2010; Ravi, 2011.), siendo fundamental para la formación del cinetocoro y el ensamble de

proteínas mitóticas que media la unión al huso mitótico a los cromosomas (Sullivan y cols, 1994; Chan, 2010; Ravi, 2011).

FAMILIA	VARIANTE/SP	DISTRIBUCIÓN	PTMs*
H3	H3 (canonica)/Ubicua	Global.	Metilación, y hipoacetilación.
	H3.3/Metazoarios	Telómeros, centrómeros, cromatina paterna.	Metilaciones.
	CENH3/Ubicua	CENTRÓMEROS.	Acetilación y metilación.
	H3t/Mamíferos	Núcleo de células somáticas.	NA.
	H3.X.Y/ Primates	Euromatina.	NA.
	H3.5/Homínidos	Específica de testículo, euromatina.	NA.
H4	H4(Canonica)/Ubicua	Global.	Hipoacetilación y metilación.
H2A	H2A(Canonica)/Ubicua	Global.	ND.
	H2A.X/Metazoarios	Global.	ND.
	H2AZ/Ubicua	Núcleo, telómeros y centrómeros.	ND.
	H2AL1,L2/Roedores	Centrómeros	ND.
	H2ABbd/Mamíferos	Euromatina	NA.
H2B	H2B (Canonica)/ubicua	Global	ND.
	TSH2B/Mamíferos	Global (esperma) y Telómeros	NA.
	H2BFWT/Mamíferos	Telómeros (esperma)	NA.

Tabla 1 Distribución y modificaciones de las variantes de histonas en eucariontes (Müller and Almouzni, 2017; Watson y cols, 2007).

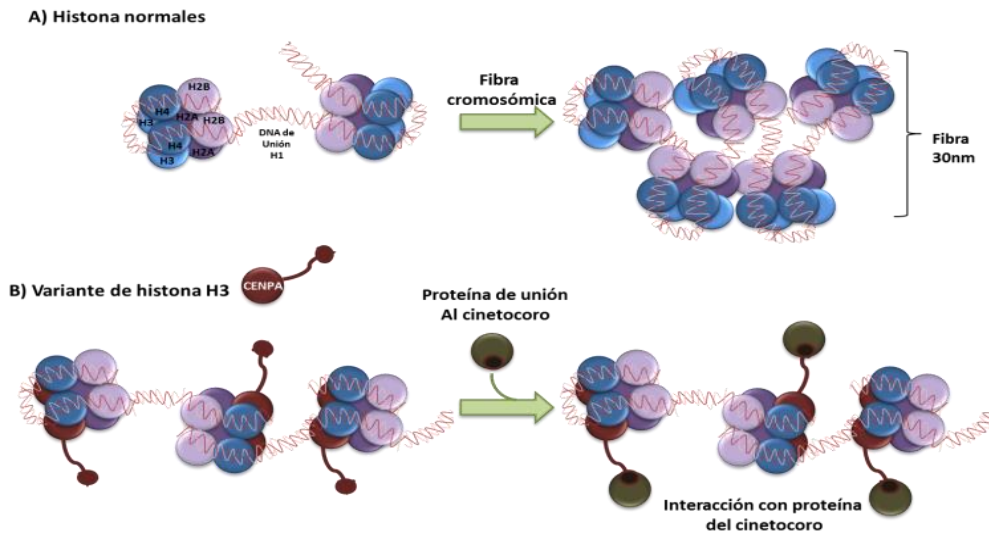


Fig. 4 Esquema de la alteración de la cromatina por incorporación de variantes de histonas. A) transición entre la fibra de 10-nm a 30-nm por histonas convencionales. B) incorporación de la histona CENP-A (CENH3 en plantas) en lugar a la histona H3, actuando como sitio de unión de una o más componentes de proteínas del cinetocoro.

1.4 Proteína CENH3

CENH3 (Histona específica de centrómero variante de H3) llamada originalmente CENP-A en humanos y HTR12 en *Arabidopsis thaliana*, es una proteína esencial para la función del cinetocoro de todos los eucariotas ya que está especializada en el empaquetamiento de la cromatina en los centrómeros y reemplaza a la histona convencional H3, involucrada en la organización del nucleosoma por dimerización de dos moléculas de H3 en la interfase mediante el C-terminal (Earnshaw y Rothfield, 1985; Sullivan y cols, 1994; Malik y Henikoff, 2003; Ravi y Chan, 2010), al igual presenta un pliegue en el dominio N-terminal que sobresale del nucleosoma permitiendo así su papel en el reclutamiento de otras proteínas importantes para el ensamble del cinetocoro y por lo general carece de un residuo de glutamina en la $\alpha 1$ -helice. A diferencia de las histonas convencionales, su N-terminal es muy divergente, permitiendo dilucidar que ha evolucionado rápidamente al realizarse comparaciones con histonas convencionales y sus variantes entre especies relacionadas de plantas y animales, encontrándose alteraciones en el N-terminal y el loop-1, denominados firmas evolutivas entre especies. (Malik y Henikoff, 2003; Chan S, 2010; Ravi y cols, 2010; Marimuthu y cols, 2011).

La proteína CENH3 ha sido principalmente centro de estudio de funcionalidad epigenética en distintos organismos eucariotas como en mamíferos (Earnshaw y Rothfield, 1985; Howman y cols, 2000; Goshima y cols, 2003), *Caenorhabditis elegans* (Monen y cols, 2005) *Drosophila melanogaster* (Blower y cols, 2006) y en plantas como cebada (Sanei y cols, 2011), maíz (Zhong y cols, 2002), tabaco (Nagaki y cols, 2010), y arabidopsis (Ravi y cols, 2010; Ravi y Chan, 2010), donde han observado el bloqueo de la formación de centrómero y/o la inadecuada segregación cromosómica cuando se realiza una modificación en el CATD (centromere targeting domain), en el N-terminal, silenciamiento de CENH3 y mutaciones en componentes SAC (spindle attachment checkpoint).

Cabe resaltar que a pesar de que CENH3 interviene en la segregación de las cromátidas hermanas hacia al mismo polo en la meiosis I, éste proceso también depende de proteínas específicas de meiosis como el componente monopolin, o de proteínas constitutivas del cinetocoro, como es la proteína esencial CENP-C que recluta a Moa1p, misma que interactúa con Rec8 en el núcleo del nucleosoma en *S. pombe* (Yokobayashi y Watanabe, 2005) y en maíz la proteína MIS12 que interactúa específicamente con NDC80 y que tiene el papel de fusionar los cinetocoros y mantener su integridad en la meiosis I interactuando indirectamente con CENH3 y CENP-C.

1.5 Trehalosa

La Trehalosa (α -D-glucopiranosil-(1-1)- α -D-glucopiranosido; $C_{12}H_{22}O_{11}$; PM=342.31) es un disacárido compuesto por dos moléculas de glucosa (Elbein y Mitchell, 1974) unidos por un enlace α - α -1,1 que conecta los extremos reductores de los residuos de glucosa anulando así su poder reductor (Paiva y Penek, 1996) (**Fig. 5**). La trehalosa está ampliamente distribuida en varias especies de Eubacterias, Archeas, hongos, invertebrados, en plantas de resurrección (*Selaginella lepidophyllay* y *Botrychium lunaria*) y plantas superiores (Elbein y Mitchell, 1974). La trehalosa juega distintos papeles en los microorganismos como fuente de carbono, osmoregulador y molécula señalizadora, éste último tiene un importante papel en la protección contra distintos

estrés abiótico, en especial durante condiciones de deshidratación, congelamiento, altas temperaturas, salinidad, oxidación y radiación (Colaco y cols, 1992).

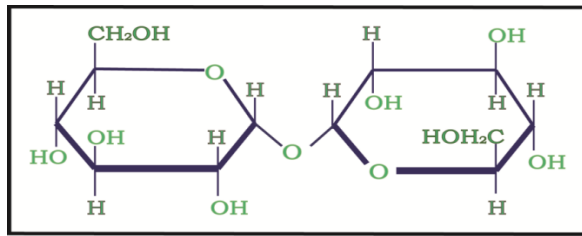


Fig. 5 Estructura de la molécula trehalosa.

1.5.1 Rutas de biosíntesis

Existen distintas vías de biosíntesis para la trehalosa (Fig. 6), entre las más estudiadas se encuentra la vía TPS/TPP, que se encuentra en una gran variedad de organismos como insectos, plantas de resurrección, plantas superiores, nematodos, levaduras y bacterias (Crowe y cols, 1984; Pan y cols, 2003). La biosíntesis de la trehalosa comprende la formación de Trehalosa-6-fosfato a partir de UDP-Glucosa y Glucosa-6-fosfato por medio de la enzima Trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS), con una subsecuente desfosforilación que origina la formación de trehalosa por medio de la enzima trehalosa-6-fosfato fosfatasas (TPP) (Cabib y Leloir, 1957).

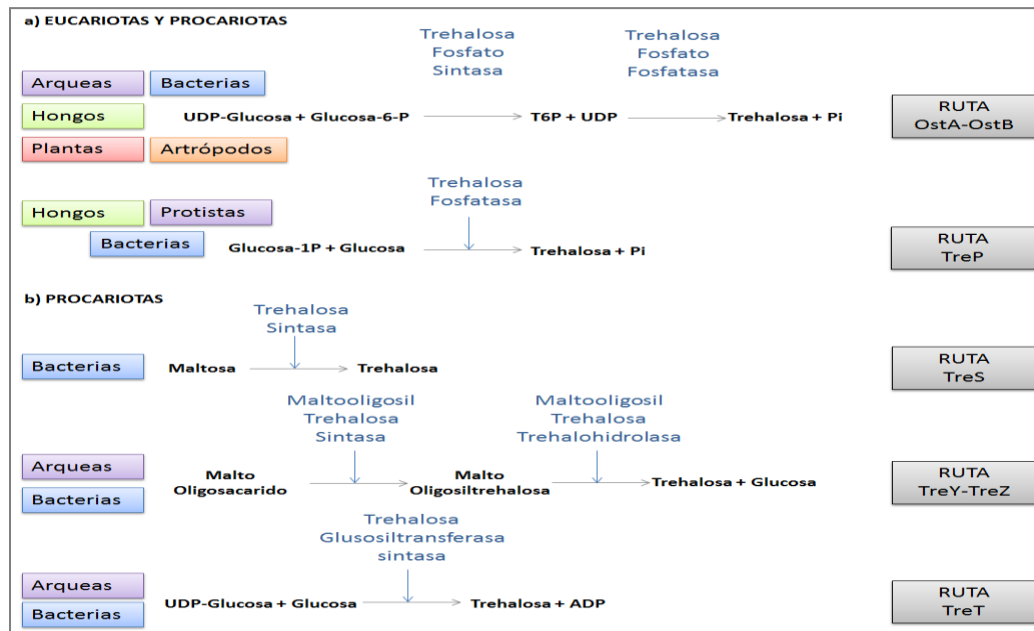


Fig. 6 Vías de síntesis de trehalosa (pie de figura continua en la siguiente página).

- a) Eucariotas y b) Procariotas. UDP, uridin difosfato; Glucosa-6P, glucosa 6-fosfato; T6P, trehalosa 6-fosfato; glucosa-1P, glucosa 1-fosfato; ADP, adenosin trifosfato. (Modificada de Paul y cols, 2008)

1.5.2. Hidrólisis de la trehalosa

La enzima trehalasa (α,α -glucohidrolasa trehalasa) es la responsable del catabolismo de la molécula trehalosa (**Fig. 7**) mediante la hidrólisis de uno de los dos enlaces glucosídicos, originando una inversión en la configuración anomérica y por medio de un ataque nucleofílico de una molécula de agua que realiza la hidrólisis de uno de los enlaces (Gibson, 2007). La hidrólisis enzimática de la trehalosa se observó por primera vez en *Aspergillus niger* por Bourquelot en 1893 y posteriormente en muchos otros organismos, tanto en plantas y como animales.

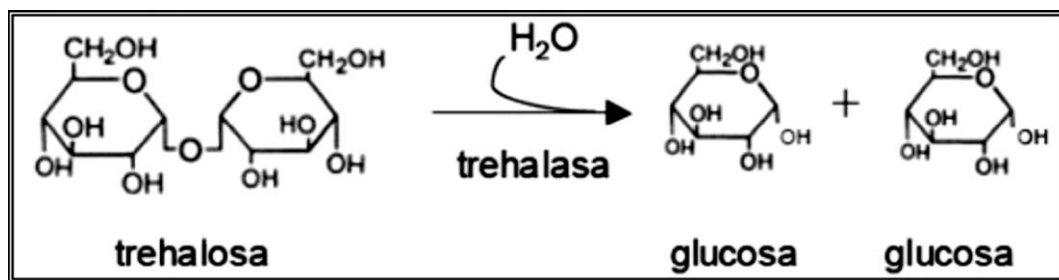


Fig. 7 Esquema de la hidrólisis de la trehalosa (Mascorro-Gallardo y cols, 2005)

La trehalosa puede ser hidrolizada por tres vías (**Fig. 8**); en *Euglena gracilis* y *Pichia fermentans* por trehalosa fosforilasa (Schick y cols, 1995), en *Escherichia coli* por fosforilación y subsecuente hidrólisis por trehalosa-6-fosfato hidrolasa (Rimmele y Boos, 1994) y en plantas, hongos, animales y bacterias por la enzima Trehalasa (Kendall y cols, 1990; Müller y cols, 1995; Horlacher y cols, 1996).

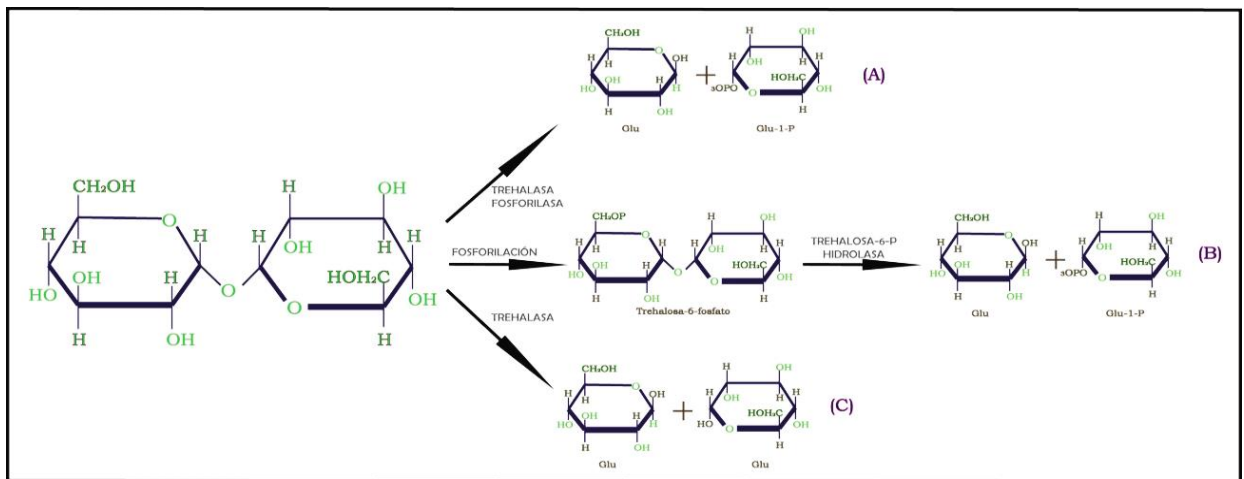


Fig. 8 Vías de catálisis de trehalosa

Reportadas para distintos organismos (A) *Euglena gracilis* y *Pichia fermentans* (B) *Escherichia coli* (C) Plantas, hongos, animales y bacterias.

Esta enzima está presente en un gran número de organismos y su función es movilizar la trehalosa cuando es requerida a larga distancia o cuando es usada para proveer de energía a la célula (Maruta, 1996). La enzima trehalasa es ubicua en las plantas vasculares y sugiere que podría desempeñar un papel en los mecanismos de defensa a estrés y su acción directa en degradación de trehalosa derivada de microorganismos asociados a las plantas como es el caso de micorrizas (Uno y cols, 2000).

1.5.3 Propiedades de la trehalosa como molécula

La trehalosa cuenta con distintas propiedades que le permiten ser de gran utilidad en el área biotecnológica, como es la capacidad de osmoprotección y retención de agua en condiciones de estrés abiótico, protección en condiciones de desecación, altas temperaturas, salinidad, oxidación, y formación de cristales en condiciones de congelamiento sin ocasionar ruptura de las células (Crowe y cols, 1984 y Avonce y cols, 2004). Respecto a la sustitución de agua, la trehalosa toma su lugar durante la deshidratación o congelamiento y este mecanismo ayuda a estabilizar las moléculas; en el caso de las proteínas éstas mantienen su actividad bajo estrés abiótico en presencia de trehalosa (Lins y cols, 2001), protegiendo así su estructura terciaria y su actividad (Fig. 9A). Esta capacidad es mediada por la interacción de puentes de hidrogeno entre ambas moléculas debido a los grupos polares de la proteína y los grupos hidroxilos de la trehalosa (Elbein y cols, 2003).

La trehalosa también tiene la cualidad de permanecer estable a altas temperaturas y pH bajos al no ser un azúcar reductor como la sacarosa, evitando así la reacción de Maillard en la que los grupos aldehído de los azúcares reduce a los grupos aminos, produciendo el típico color café asociado a la degradación de las proteínas, reacción que es acelerada a mayores temperaturas (Elbein y cols, 2003; Paiva y Panek, 1996). La forma en que la trehalosa protege las membranas durante la deshidratación radica en que interactúa con ellas para favorecer la permanencia del estado fluido de los lípidos, para así evitar la fusión entre ellos, la separación de las fases y el rompimiento de las membranas (Crowe y cols, 1984) (**Fig. 9B**), al encajar entre los grupos polares de las cabezas de los fosfolípidos con los que interactúa mediante sus grupos hidroxilos (Crowe y cols, 2001).

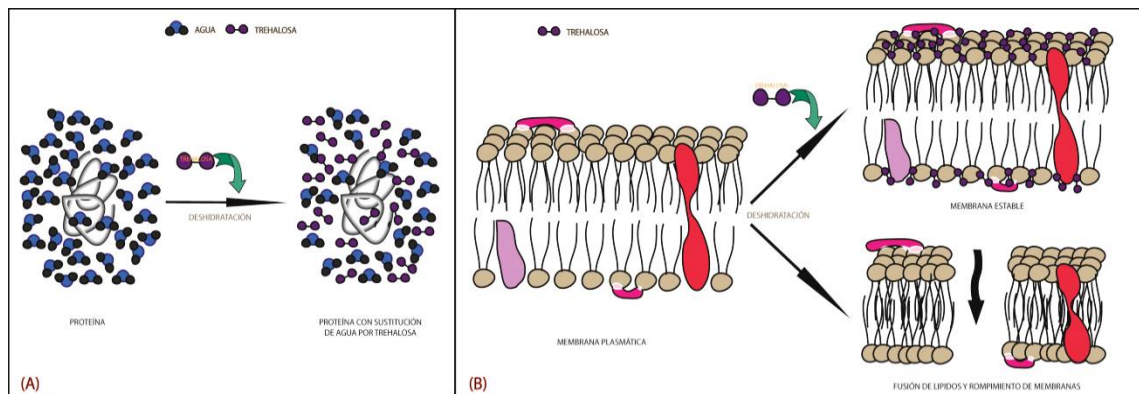


Fig. 9 Esquema de la función de la trehalosa como osmoprotector

- a) Protección de proteínas por la trehalosa, b) Protección de membranas plasmáticas (Xoconostle y cols, 2013).

1.5.4 Usos biotecnológicos de la trehalosa

La trehalosa tienen distintos fines biotecnológicos que van desde usos industriales hasta médicos, de los cuales algunos se han desarrollado a nivel comercial (**Tabla 2**).

USOS	FUNCIÓN
Industrial alimentaria	Aditivo, preservador, endulzante o sustituto de sacarosa.
Protector de actividad enzimática	Mantiene a T° ambiente enzimas termolábiles como DNA polimerasa, enzimas de restricción y DNA ligasa.
Estabilizador y protector de moléculas	Mantenimiento de la actividad de moléculas inestables como anticuerpos después de años de almacenaje.
Osmoprotector en plantas transgénicas	Acumulación de trehalosa, conlleva a incrementar la tolerancia a sequía, salinidad y frío.
Marcador de selección	Para la selección de plantas transgénicas, el gen AtTPS1 de <i>A. thaliana</i> , cuando se sobreexpresa la plantas es capaz de conferir insensibilidad a la glucosa en semillas y tejidos en cultivo <i>in-vitro</i> , que de otra forma se ven inhibido por este monosacárido.
Uso en cosméticos	Para atrapar y reducir la liberación de malos olores, para su uso en cremas faciales, corporales o desodorantes.
Usos médicos	Para la disminución de los síntomas de enfermedad de Huntington que evita la formación de agregados proteicos poli-glutámicos y en la osteoporosis.

Tabla 2 Usos biotecnológicos de la trehalosa. (Fuente: Mascorro y cols, 2005; Iturriaga y cols, 2009).

1.6 Cultivo de Tejidos Vegetales

El cultivo de tejidos se refiere a una serie de técnicas diseñadas para el crecimiento y multiplicación de células, tejidos y órganos usando soluciones nutritivas en un ambiente controlado y aséptico. Esta técnica también se aplica a la modificación y mejoramiento de plantas, obtención de plantas libres de patógenos, almacenamiento de germoplasma, propagación clonal y obtención de metabolitos (Loyola y Vázquez, 2005; George y cols, 2008). El cultivo *in vitro* permite la obtención de plantas por distintas vías de cultivo como es la embriogénesis somática, anteras, meristemas, protoplastos, óvulos o cualquier otra parte de la planta.

El cultivo *in vitro* tiene distintas ventajas como:

- Obtención de plantas libres de enfermedades (hongos, bacterias, micoplasmas y virus).
- Permite la propagación masiva de material vegetal en corto tiempo conservando su potencial genético y calidad sanitaria.
- Facilita el cultivo de un gran número de plantas en una superficie pequeña.

- Conservación de material biológico por tiempo prolongado.
- Fitomejoramiento.

1.6.1 Embriogénesis somática

Una de las utilidades del uso de cultivo de tejidos *in vitro* en la inducción de embriones somáticos, a partir de células somáticas, sin la necesidad de fusión de gametos, caracterizándose estos por ser semejantes tanto estructural, fisiológica y bioquímicamente a los embriones cigóticos y capaces de pasar por estadios similares y desarrollar plántulas completas, con tallo y raíz (Freire, 2003).

Existen dos tipos diferentes de embriogénesis somática:

a) Embriogénesis directa, en este caso el embrión se origina directamente, a partir de una célula o tejido, sin que se produzca formación previa de callo (Freire, 2003).

b) Embriogénesis indirecta, este tipo de embriogénesis lleva a la formación de un callo a partir del cual se desarrolla posteriormente los embriones. En este caso las células a partir de las cuales se forman los embriones, reciben el nombre de **células embriogénicas madres** (Freire, 2003). Otra característica es que durante las fases iniciales del cultivo se necesita una alta relación auxina/citoquinina durante la división celular y la baja relación entre estos componentes durante la fase de diferenciación (Söndahl y cols, 1991). El proceso de inducción y desarrollo de embriones se divide en cuatro fases:

- ✓ **Fase 0:** Las células individuales competentes (estado 0) forman masas embriogénicas en presencia de auxina y adquieren paulatinamente el potencial para formar embriones, dando lugar a agregados celulares en estado 1.
- ✓ **Fase 1:** Es inducida cuando se produce una activación de la división celular (estado 2) en zonas localizadas.
- ✓ **Fase 2:** Dichos agregados conduce a la formación de embriones globulares.
- ✓ **Fase 3:** Los embriones se desarrollan hasta plántulas pasando por los estados de corazón, torpedo y cotiledonar.

1.7 Transformación Genética de Plantas

- Sistema biológico

Existen un gran número de estrategias para la transferencia de genes, como el uso de *Agrobacterium* un patógeno natural de plantas; que es una herramienta aplicable a distintas especies de plantas dicotiledoneas y monocotiledoneas, que al ser modificado genéticamente para eliminar sus genes de virulencia para la planta, permite ser un sistema de transferencia del fragmento de DNA de interés. En general *Agrobacterium* ofrece la ventaja de que la inserción del DNA de transferencia (T-DNA) en el genoma, que ocurre frecuentemente en una o bajo número de copias en el genoma de las plantas transformadas. Existen varios factores que pueden afectar eficiencia de transformación cuando se usa *Agrobacterium* como son la edad, tipo de explante y el tipo de cultivo celular *in vitro*; siendo de mayor facilidad la transformación de embriones inmaduros, hojas o raíces (Loyola y Vázquez, 2005).

-Sistema mecánico

Otro sistema de transformación es por biobalística, que se basa en el bombardeo de microproyectiles ya sea de oro o tungsteno recubiertas de DNA que entran a las células blancas por aceleración de estas partículas mediante una explosión o una alta descarga de presión usando gases como Helio o CO₂, permitiendo así la incorporación de DNA foráneo al DNA de la célula (Sanford, 1993). Esta técnica se implementó dado a la necesidad de transformar plantas que eran recalcitrantes a la transformación por *Agrobacterium* (Loyola y Vázquez, 2005).

1.8 Variedades de Maíz Transformadas

En este proyecto se trabajó con distintas variedades de maíz como:

- **Maíz H99:** Línea pura de maíz originada en Indiana y cuyo número de acceso es PI 587129 (<http://www.ars.grin.gov/cgi-bin/npgs/acc/display.pl1073895>) y que se caracteriza por tener un alto vigor y desempeño en la formación de callos embriogénicos por medio de cultivo *in vitro* (Martínez-Nicolás, 2008). Así como la facilidad de cultivo y mantenimiento en laboratorio

- **Maíz híbrido Hi-II (H99 x B73):** Esta variedad y otras son llamadas Hi-II por que presentan una alta frecuencia de inducción de callos embriogénicos Tipo II que son menos compactos, mas friables y desdiferenciados como los describe Armstrong y cols, 1991.
- **Maíz híbrido VT-401:** Se caracteriza por ser una variedad híbrida para alturas de 800 a 1800 msnm, es decir valles altos y de transición de 1800 a 2200 msnm. Esta variedad fue desarrollada por el INIFAP campus Toluca y es producto de la crusa de dos progenitores con genotipo contrastante.

Esta dos últimas variedades se usaron con el fin de observar el efecto de la modificación del gen CENH3 en plantas híbridas con alto rendimiento.

2. ANTECEDENTES

Existen diferentes reportes que han asociado la tolerancia a sequía a la presencia de trehalosa como es el caso de *Selaginella*, que es una planta resucitadora que puede restablecer su desarrollo después de la ausencia de agua. En el caso de *Arabidopsis* al alterar la ruta biosintética de la síntesis de trehalosa, se han evidenciado efectos en el desarrollo de los embriones y hojas, en la división celular y síntesis de la pared celular, en la arquitectura de las inflorescencias, biomasa de las plántulas y plantas adultas, en la fotosíntesis, utilización de la sacarosa, en el metabolismo del almidón y tolerancia a estrés abióticos, en particular a sequía y altas temperaturas (Elbein y Mitchell, 1974; Crowe y cols, 1984; Pan y cols, 2003; Cortina y Culiáñez-Macià, 2005; Miranda y cols, 2007). Pero también existen efectos en el crecimiento o floración precoz, atribuyendo que estos efectos posiblemente al aumento del intermediario trehalosa-6-fosfato (T6P).

Respecto a la adquisición de tolerancia a sequía en plantas y en especial a las de interés agronómico, se han reportado principalmente dos estrategias para la obtención de plantas genéticamente modificadas tolerantes a sequía, la primera es el uso y manipulación de los genes involucrados en la síntesis de trehalosa, originando la obtención de cierta tolerancia a estrés abióticos y en especial a sequía, pero obteniendo también alteraciones fisiológicas en algunas de ellas, la segunda estrategia es la inhibición o silenciamiento de la enzima trehalasa, que se ha llevado a cabo principalmente en plantas de tabaco, usando el RNA antisentido de trehalasa de alfalfa, y hasta el momento no ha originado alteraciones fisiológicas en las plantas (Tabla 3).

GEN	ORIGEN	PLANTA TRANSFORMADA	ALTERACIONES MORFOLÓGICAS	TOLERANCIA	REFERENCIA
TPS1	<i>E. coli</i>	Tabaco	No reportadas	Sequía	Holmström, K.O <i>et al.</i> , 1996
TPS1	Levadura (<i>S. cerevisiae</i>)	Tabaco	Esterilidad Parcial, Pérdida de dominancia apical, hojas, raíz.	Sequía	Romero <i>et al.</i> , 1997
TPS1-2	<i>S. cerevisiae</i>	Tabaco	Aberraciones pleiotropicas en el crecimiento	Sequía	Karim <i>et al.</i> , 2007

TPS1	<i>S. cerevisiae</i>	Tomate	Alteración en el desarrollo de la raíz y brotes.	Sequía y Salinidad	Cortina, y Culiáñez-Macià, 2005
TPS1	Arabidopsis	Arabidopsis	Retraso de floración	Sequía	Avonceet <i>et al</i> 2004
OtsA- OtsB ^c / TPS-TPP	<i>E. coli</i>	Arroz	No	Sequía, Salinidad y Bajas Temperaturas	Garg <i>et. al.</i> , 2002 Jang <i>et at</i> 2003
TPS1-TPS2 ^e	<i>S. cerevisiae</i>	Arabidopsis	No	Sequía, Salinidad, Altas Temperaturas y Congelamiento	Miranda, <i>et al.</i> , 2007
TPS1- TPS2	<i>S. cerevisiae</i>	Alfalfa	Retraso del Crecimiento	Sequía, Salinidad, Altas Temperaturas y Congelamiento	Suárez, <i>et al.</i> , 2009
TPS1-TPP	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Azospirillum brasilense</i> – Maíz	No	Sequía	Rodríguez <i>et al.</i> , 2009
Anti-RNA ^m Trehalasa (TRE)	Alfalfa	Tabaco	No	Sequía	Gámez <i>et al.</i> , 2004
Anti-TRE Y RNAi	Alfalfa	Tabaco	No	Sequía	Guo <i>et al.</i> , 2010

Tabla 3 Reportes del efecto de la acumulación de trehalosa en diferentes plantas, otorgando cierta tolerancia a sequía y a otros estreses abióticos.

Por lo anteriormente mencionado en el trabajo de maestría se generaron plantas tolerantes a sequía evaluadas en invernadero, obtenidas mediante el uso de un mRNA anti-sentido de la enzima trehalasa bajo la regulación del promotor 35SCamv (35S-TreAS-Tnos), que nos permito disminuir la hidrólisis de la molécula de trehalosa en dos moléculas de glucosa; logrando así una mayor acumulación de trehalosa y obteniendo plantas de maíz con una mayor tolerancia a estrés por sequía y mejores características fisiológicas cuando se compararon con su contraparte silvestre en condiciones de invernadero; cabe resaltar que también se observó que la inhibición de la enzima trehalasa tiene efectos no sólo de protección contra estrés hídrico, sino también impacta positivamente el crecimiento, fotosíntesis y tolerancia a bajas temperaturas en plantas de maíz (Fig. 10).

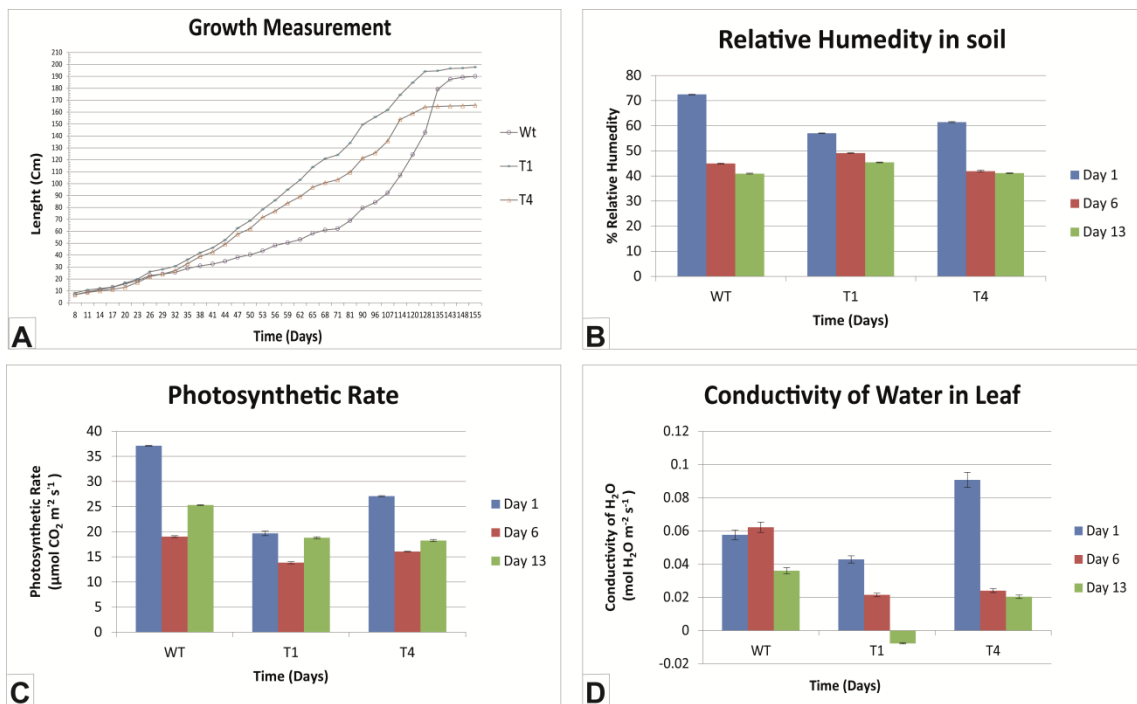


Fig. 10 Análisis de crecimiento y parámetros fotosintéticos de plantas tolerantes a sequía en invernadero, comparadas con plantas de maíz silvestre B73. A) Gráfica comparativa de crecimiento vegetativo de plantas de maíz genéticamente modificadas (GMs) Vs silvestres; B) medición del porcentaje de humedad relativa, C) medición de tasa fotosintética; y D) contenido interno de H₂O en hojas de plantas silvestres y GMs en condiciones de humedad y sequía.

Entre las principales búsquedas de mejoramiento de los cultivares de interés agronómico es la tolerancia o resistencia a estrés biótico y abiótico, y al mismo tiempo la presencia de vigor híbrido o heterocigosis en estas plantas, como es el caso del maíz. Actualmente existen grandes dificultades técnicas para la producción de maíz híbrido dado al elevado de la costo de obtención de este tipo de semillas y por otro lado, la productividad en especies de polinización abierta depende en gran medida del estado de heterocigosis de la planta; mientras mayor heterocigosis de la plantas, mayor productividad obtenida; pero a medida que se dan las autopolinizaciones esta heterocigosis disminuye ocasionando la perdida de ciertas características deseadas y ocasionando la dependencia de semilleras. En nuestro caso al querer evaluar plantas GM en campo que sean tolerantes a sequía, pueden estás perder esta capacidad en el transcurso de las generación y además es de vital importancia que esta cualidad este presente también en variedades de alta productividad (vigor híbrido) y que se preservé en las generaciones. Esto es posible

si se pudieran tener plantas que fueran dobles haploides, capaces de eliminar el genoma de uno de los parentales y así obtener cigotos haploides que son convertidos a dobles haploides después de la fertilización. Tal es el caso de la cebada (*Hordeum vulgare* X *Hordeum bulbosum*) que cuenta con un mecanismo selectivo de eliminación de uno de los genomas en los cigotos por una mala segregación de los cromosomas, encontrándose que dicho efecto recae sobre la acción de la histona específica de centrómero variante de H3 (CENH3), por pérdida de su actividad o incorporación no equitativa en los centrómeros cuando se da la cruce interespecífica (Sanei *et al.*, 2011). Talbert y cols, en el 2002 encontraron la variante de la histona H3 en *Arabidopsis thaliana* denominada HTR12, observando que dicha proteína igualmente se localiza en los centrómeros tanto en mitosis como en meiosis, y que el N-terminal es altamente hipervariable entre especies de *Arabidopsis* y mamíferos como *Drosophila*, sugiriendo el papel de este amino evolutivamente para el desarrollo y formación del centrómero en plantas y animales.

En otros trabajos donde se han enfocados en la obtención de plantas haploides, como los realizados por Ravi y Chan en el 2010, se demostró que perturbaciones en la histona centromérica CENH3 usando como planta modelo *Arabidopsis thaliana*, es posible crear progenie haploides y dobles haploides. En este trabajo tenían una mutante nula rescatada por GFP-*tailswap* que expresa la proteína alterada de CENH3 por cambio del amino-terminal por la de la histona convencional H3, y al ser cruzada con una planta silvestre, los cromosomas de la mutante en la meiosis son eliminados y se obtiene una progenie haploide, que son espontáneamente convertidos a diploides fértiles (dobles haploides). Este fenómeno se explica como una duplicación de los cromosomas o divisiones no reduccionales durante la meiosis, lo que permite que el genotipo de un solo parental se perpetúe. Con dicho hallazgo se propone que este comportamiento se debe a que los centrómeros controlan la herencia de los cromosomas, por lo que al recibir el cigoto los cromosomas de GFP-*tailswap*, son mal segregados y eliminados, originando así plantas haploides, y al ser CENH3 altamente conservada en los eucariotas se podría usar esta estrategia en otras plantas.

En el mismo año Ravi y cols, 2010, observaron que al usar distintas variantes transgénicas de CENH3 en *Arabidopsis thaliana*, para su correcto funcionamiento se requiere del dominio N-terminal, ya que al realizar una complementación en la mutante nula *cenh3* con un N-terminal de una CENH3 heteróloga de una especie cercana; caso que no ocurre en trabajos realizado con CENP-A de humanos. También confirmaron que el dominio del N-terminal fusionado al dominio del C-terminal de la histona H3.3 no se localiza en el cinetocoro, pero una proteína que contenga el dominio del N-terminal H3.3 y el dominio de la histona CENH3 (GFP-tailswap) muestra fluorescencia en el cinetocoro indicando su localización y está al mismo tiempo rescata el fenotipo *cenh3-1* que es embriogénicamente letal (caso reportado previamente por Ravin y Chan, 2010). Por otro lado presenta una disminución a nivel de funcionalidad respecto a la nativa, que induce un alto nivel de inadecuada segregación de los cromosomas y aborto de semillas cuando es cruzado con silvestres, de igual manera las plantas mutantes letales rescatadas son estériles, lo que conlleva a pensar que esta proteína es funcional en mitosis pero no en meiosis. Al evaluar estos resultados los autores propusieron eliminar el N-terminal de CENH3 y solo funcionar el dominio de la histona CENH3 con GFP y sin GFP, conllevando esto a la no obtención de progenie con GFP, sugiriendo que CENH3 requiere de éste dominio N-terminal para tener un cinetocoro funcional en meiosis.

Ravi y cols en el 2011 corroboró con otros estudios que variantes de CENH3 y alteraciones en el dominio N-terminal, conllevan a esterilidad en *Arabidopsis* por inadecuada segregación de los cromosomas, estableciendo que éste es el primer defecto que se observa al inicio de la metafase I, permitiendo deducir que los centrómeros tienen un mecanismo específico que involucra el dominio N-terminal de CENH3.

Trabajos realizados en tabaco y arroz por Nagaki y cols, 2009, observaron en cultivos de células de tabaco, la localización de CENH3 se da en el centrómero pero que no sucede lo mismo en plantas poliploides como arroz y luzula que está tanto en centrómero como dispersa y que CENH3 de luzula puede localizarse en el centrómero de células de tabaco, al igual que observaron que el N-terminal es importante para las interacciones proteína-proteína.

Lo anteriormente mencionado sugiere que una planta heterocigota puede mantener su vigor híbrido al generar cigotos haploides que eliminan el material genético de uno de sus parentales y luego originar dobles haploides (diploides); lo que permite plantear que plantas heterocigotas pueden realizar un mantenimiento asexual a través de la expresión de la proteína modificada de CENH3, que al expresarse en un organismo diploide puede conllevar a la obtención de cigotos que sean dobles haploides híbridos similares al progenitor, manteniendo así su acervo genético. Si se aplica a maíz que posee una elevada polinización abierta nos permitirá generar híbridos asexuales sin tener que realizar cruzas previas de acuerdo al modo actual de producción mundial de híbridos, al igual que originar una barrera biológica para posibles cruzas con material silvestre en campo.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente son las empresas semilleras trasnacionales las que comercializan la mayor cantidad de semilla certificada de maíz (*Zea mays* L.) en México, lo que ha llevado a un aumento en el precio de la semilla y a que los agricultores dependan de ellos en cada período de cosecha; por lo que es necesario la búsqueda de transferencia de nuevos híbridos, variedades mejoradas de maíz y de tecnología de producción de semilla.

Una alternativa muy factible y adecuada para solucionar esta dependencia, es la obtención de híbridos que puedan mantener su vigor en el transcurso de las generaciones, permitiéndoles así el uso de semillas obtenidas en cada cosecha. Por lo anterior se propone modificar genéticamente variedades híbridas, a partir de la modificación del gen *CENH3*, mediante la eliminación del N-terminal, ya que en trabajos previos se ha dilucidado la importancia del N-terminal en el correcto funcionamiento de esta proteína en la mitosis, pero principalmente en la meiosis, permitiendo así la obtención de plantas dobles haploides.

Además se propone conjuntamente el uso de un fondo genético de tolerancia a sequía mediante la utilización de trehalasa anti-sentido con el fin de disminuir la actividad de dicha enzima que es la encargada de hidrolizar el disacárido trehalosa, y con esto permitir su acumulación y otorgar tolerancia a distintos estrés abióticos como sequía en plantas; dato ya corroborado en la fase de invernadero en el trabajo de maestría con la obtención de plantas de maíz CEIA-9, y durante el transcurso de este trabajo se realizó una prueba en campo para la evaluación del desarrollo, tolerancia a sequía, pruebas bromatológicas y toxicológicas en estas plantas con tolerancia a sequía con el fin de implementarlo en plantas que tengan la histona *cenH3* mutada y que permitan mantener esta capacidad de tolerancia en sequía en plantas de un alto vigor híbrido.

4. HIPÓTESIS

H1: Mediante la manipulación del gen CENH3 (histona específica de centrómero variante de H3) se originará un efecto en el contenido del material genético, permitiendo originar una reducción de diploidía a haploidía que puede ser usado en el fondo genético de tolerancia a sequía.

H2: Plantas con el fondo de tolerancia a sequía presentarán un mejor desarrollo y tolerancia a distintos niveles de sequía en campo.

5. OBJETIVO GENERAL

- 1- Obtención de líneas de maíz con una mutación dominante negativa en el gen CENH3 para mantener el estado híbrido para ser aplicado en el fondo genético de tolerancia a sequía.
- 2- Evaluación en campo usando distintos niveles de sequía en plantas CIEA9 que tienen el fondo de tolerancia a sequía.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Elaboración de las construcciones del gen CenH3 tanto con el promotor 35S-CaMV y Knotted1.
2. Obtención de plantas de maíz que tenga la modificación CENH3 y TreAS.
3. Verificación de la obtención de plantas genéticamente modificadas con el gen CenH3 y TreAS.
4. Cuantificación de los transcritos de las plantas con modificación en el gen CENH3 y TreAS.
5. Determinación del efecto de la modificación en la histona CENH3 en el ciclo celular de las plantas.
6. Análisis bromatológicos y toxicológicos de las plantas de maíz tolerantes a sequía con TreAS.
7. Evaluación fisiológica, productividad y tolerancia a sequía en campo de plantas con el fondo genético de tolerancia a sequía.
8. Cuantificación del contenido de trehalosa en plantas tolerantes a sequía.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diseño Y Obtención de Construcciones

7.1.1 Construcción gen CENH3 de maíz

Para la obtención de la construcción se realiza la amplificación por PCR de cada uno de los componentes de las construcciones (Tabla 4 y 5; Anexo 1), para posteriormente realizar el ensamble total de cada construcción. La primera construcción llamada **C1** está compuesta por el gen CENH3 (ID Q8LK76) sin el amino terminal, bajo la regulación de promotor Knotted1 (ID AY260164.1), y el terminador Nos (ID JN811690.1); la segunda construcción llamada **C2** esta es bajo la regulación de promotor 35S- CaMV (ID AB626683.1) (Fig. 11).

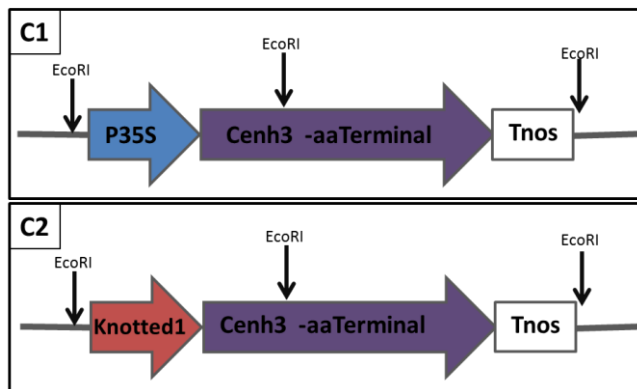


Fig. 11 Esquema representativo del diseño de las construcciones el gen CENH3 sin el amino terminal (-aaTerminal).

La obtención del gen CENH3 es mediante un ensamblaje *in vitro* de 5 oligos de 98 pb que contienen 20pb que permite la hibridación entre los oligos durante la PCR de cada fragmento que compone el gen (Tabla 4 y 5). Posteriormente se realiza una PCR que amplifique todo el fragmento que tiene también bases que hibridan con su respectivo promotor y terminador.

Reacción	Volumen (µL)
Agua destilada estéril	8.45
Buffer 10 x	1
dNTP's 25 Mm	1
Oligo Directo (5')	0.5
Oligo reverso (3')	0.5
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	0.05
DNA Molde (100 ng/µL)	1
Volumen final	12.5

Tabla 4 Mezcla de reacción para amplificación mediante PCR del Promotor 35S, knotted, cenh3 y tnos.

	Promotor 35S CaMV y TNos		Promotor Knotted1		Gen CenH3	
	Temperatura (°C)	Tiempo (m:s)	Temperatura (°C)	Tiempo (m:s)	Temperatura (°C)	Tiempo (m:s)
1	94	0:30	94	0:30	94	4:00
2	94	0:10	94	0:10	94	0:40
3	45 / 67	0:30	67	0:45	62	0:30
4	72	0:30	72	1:00	72	1:20
5	72	5:00	72	5:00	72	7:00
6	16	-----	16	-----	16	----

Tabla 5 Condiciones de amplificación por PCRpf de cada componente de las construcciones promotor 35S de 853pb, knotted de 1358pb; transgen de 330 pb y Tnos de 271pb. En todas se realizaron 35 ciclos (del paso 2 al 4) para asegurar la amplificación de los insertos.

7.1.1.1 Ensamblaje de construcciones

El ensamble in vitro de los promotores con el gen CENH3 y el terminador, se realiza en distintas etapas, en el caso de la primera construcción **C1** (35S-Cenh3-Tnos) se

ensambla primero el promotor con el gen usando el oligo directo del promotor y el oligo reverso del gen y ya obtenido este fragmento se realiza el ensamble de este con el T-nos, usando el oligo directo del promotor y el oligo reverso del T-nos (Tabla 6); en el caso de la segunda construcción **C2** (Knotted1-CENH3-T-nos) se ensambla primero el gen con el T-nos usando el oligo directo del gen y el oligo reverso del T-nos, una vez obtenido este fragmento se realiza el ensamble de este con el promotor Knotted1, usando el oligo directo del promotor y el oligo reverso del T-nos (Tabla 6).

	Volumen (μ l)	Programa (Rampa 1)
Fragmento 1 (50 ng)	1	94 °C ----- 5 min
Fragmento 2 (50 ng)	1	Rampa de 1 °C / 1 min
Buffer Takara 10 Nm	2.5	Hasta llegar a 45 °C
H₂Odd	15.5	
Reacción 2	Volumen (μ l)	Programa (Rampa 2)
dNTPs 25 mM	2.5	72 °C ----- 10 min
Enzima Takara	0.1	
H₂Odd	24	
Reacción 3	Volumen (μ l)	Programa (Rampa 3)
H₂Odd	15.1	94 °C ----- 45 seg
Buffer Pfu 10X	2	94 °C ----- 45 seg
dNTPs 25 mM	0.5	60 °C ----- 45 seg X 30
DNA fragmento rampas	1	72 °C ----- 1 min
Oligo F (Fragmento 1)	0.5	72 °C ----- 10 min
Oligo R (Fragmento 2)	0.5	16 °C ----- end
Enzima Pfu	0.4	

Tabla 6 Rampa de ensamblaje para la obtención de las construcciones.

7.1.1.2 Ligación de construcciones ensambladas a vector de entrada.

Los productos ensamblados son ligados en el vector de entrada pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] Kit (invitrogen) (Fig. 12 y Tabla 7A), siguiendo las

instrucciones del proveedor, se incubaba a 24°C (toda la noche) y se utiliza el producto de la reacción para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Anexo 2). La verificación de los insertos en el vector se realiza mediante la extracción de DNA plasmídico (Anexo 3), para posteriormente realizar digestión enzimática (Tabla 7B) y PCR para verificación de las clonas positivas (Sambrook y cols, 1999). Simultáneamente, dichas clonas positivas son llevadas a los servicios de secuenciación para verificar el correcto ensamble.

A)	Reacción	Volumen µl	B)	Reacción	Volumen µl
	H ₂ O dd	1		DNA molde (5µg/µl)	2
	Buffer	0.5		Buffer NE1 (1X)	0.5
	Producto de PCR	1		EcoR1	0.02
	Vector PCR8/GW/TOPO	0.5		H ₂ O destilada estéril	2.48
	Volumen final	3		Volumen final	5

Tabla 7 Mezcla de reacción para ligación

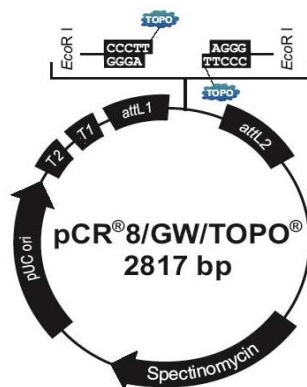


Fig. 12 Esquema del vector de clonación PCR8/GW/TOPO que contiene el gen de selección por espectinomycin, y sitio de clonación con los sitios flanqueantes attL1 y attL2.

7.1.1.3 Subclonación a vector de expresión

Posterior a la clonación de las construcciones en el vector de entrada PCR8/GW/TOPO, se realiza la subclonación al vector destino de expresión pBGWFS7 de Karimi y cols, 2002 (Fig. 13 y Tabla 8) que contiene en gen de selección Bar; que permite seleccionar las plantas mediante el uso del herbicida Glufosinato de amonio tanto en cultivo in vitro o directamente en la planta. Realizada la reacción de

subclonación se transforman las células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (Anexo 2) por choque térmico y luego se verifica la subclonación siguiendo los mismos pasos que en la clonación al vector PCR8. Posteriormente el vector de expresión es introducido a *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 por electroporación (Anexo 4).

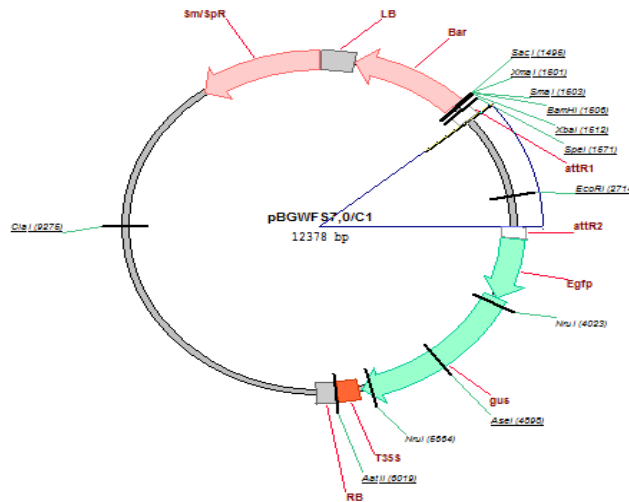


Fig. 13 Esquema del vector de expresión destino pBGWFS7 que contiene el gen de selección espectinomicina en bacteria, en planta el gen Bar y el sitio de clonación con los sitios flanqueantes att1 y att2.

Reacción	Volumen μ l
H ₂ O	1.5
PCR8/GW/TOPO (Vector de entrada linearizado – 75ng)	2
pBGWFS7 (Vector destino sin inserto -150ng)	2
Enzima LR Clonase	0.5
Volumen final	6

Tabla 8 Mezcla de clonasa para la subclonación de las construcciones en el vector PCR8 al vector pBGWFS7 (incubación a 25°C por 4h o toda la noche).

7.1.2 Construcción RNA antisentido de Trehalasa

La construcción antisentido de Trehalasa (TreAS) (ID 100280412) está bajo la regulación del promotor 35S-CVM y el terminador Nos (Fig. 14). Esta construcción proviene del vector PUC57, la cual fue posteriormente clonada al vector

PCR8/GW/TOPO y que fue usada para la transformación de *E. coli* DH5 α por choque térmico (Anexo 1). El vector obtenido con la construcción es subclonada al vector de expresión pBGWFS7 y luego se lleva a *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 (Anexo 4). La construcción es verificada por PCR y digestión enzimática durante todo el proceso de clonación y subclonación (Tabla 7B). La metodológica específica de plantas B73 obtenidas por biobalística tolerantes a sequía evaluadas en campo se encuentra en el artículo anexo.

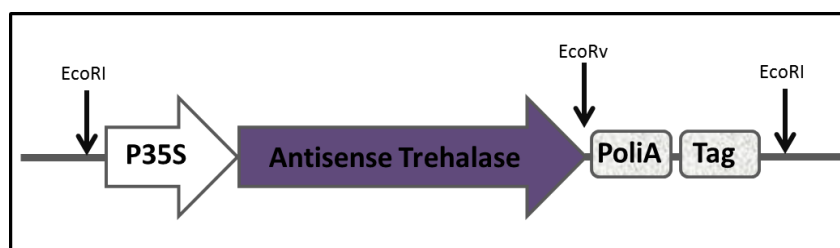


Fig. 14 Esquema del diseño de la construcción de RNA antisentido del gen Trehalasa (TreAS).

7.1.3 Electroforesis de producto de PCR

Usando agarosa al 1.0 % p/v en amortiguador TBE 0.5% (Maniatis *et al.* 1982), el producto de PCR es visualizado utilizando un transiluminador de radiación ultravioleta (Hoefler-Uvis-20). La imagen es digitalizada con el Fotodocumentador EDAS 120 Kodak Digital Science™.

7.2 Obtención de Plantas Genéticamente Modificadas

7.2.1 Transformación de callos por biobalística con el gen *cenh3* y TreAS

7.2.1.1 Generación de callos embrionarios

Para la inducción de callos embrionarios Tipo II se usan semillas de las líneas de maíz H99 y H99 x B73, que son germinadas en medio Murashige & Skoog (MS) de inducción (Tabla 9). Posteriormente, los callos generados son propagados y recultivados cada 20 días en medio de mantenimiento (Tabla 9).

Componentes	Medio MS (Inducción de callos y mantenimiento)	Medio S (Selección)	Medio G (Regeneración)
Macronutrientes (5X)	200 ml/L	200 ml/L	100 ml/L
Micronutrientes (100X)	10 ml/L	10 ml/L	5 ml/L
Vitaminas (50X)	20 ml/L	20 ml/L	10 ml/L
Adenina	80 mg/L	80 mg/L	-----
Caseína Hidrolisada	750 mg/L	750 mg/L	-----
Sacarosa	30 g/L	30 g/L	30 g/L
Agar (Phytigel)	3 g/L	3 g/L	3 g/L
Ph	5.8	5.8	5.8
Dicamba	2 mg/L	2mg/L	-----
BAP (ác. Aminopurina)	-----	----	0.2 mg/L
PEG 3% (5x)	100 ml/L	----	----
PEG 12% (5x)	100 ml/L	----	----
Glufosinato de amonio	----	1 ml/L	----

Tabla 9 Composición del medio MS

7.2.1.2 Recubrimiento de microproyectiles para biobalística

El recubrimiento de los proyectiles se basa siguiendo los protocolos de Tomes y cols, 1995; Cabrera y cols, 1997 y el descrito por la Universidad de Iowa, 2005. El cual consiste en el uso de partículas de oro de 0.6 μm (1.5 mg en 50 μl de H_2O) (**Anexo 5**), a las que se les adiciona DNA a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (usando el kit de extracción de plásmidos de Qiagen), posteriormente se adicionan 50 μl de Cloruro de Calcio (2.5M) y se mezcla suavemente. Luego se adicionan 20 μl de espermidina base libre (0.1M) y se mezcla mediante sonicación hasta que esté homogénea la

mezcla, a continuación se centrifuga a 5000 rpm por 15 segundos. El sobrenadante es retirado y se inicia la precipitación adicionando 600µl de etanol absoluto (100%) frío y sonicar hasta que este homogénea la mezcla. Se vuelve a centrifugar a 5000 rpm por 15 segundos. Posteriormente se retira el sobrenadante y se adicionan 75 µl de etanol absoluto (volumen para un total de 7 disparos) y por último, en cada membrana de Kapton (macroacarreador) se colocan 10µl de las partículas ya recubiertas.

7.2.1.3 Bombardeo de microproyectiles

Los microproyectiles recubiertos con el DNA plasmídico fijados en la membrana macroacarreadora, son usados para la proyección en embriones somáticos (1mm de tamaño), estos últimos son puestos de manera individual en el centro de las cajas petri (30 embriones por caja por triplicado) que contienen medio MS suplementado con sacarosa al 8%. Para el bombardeo se utiliza el sistema de biobalística PDS-1000/He™ System (Bio-Rad) con discos de ruptura y presión de helio de 1100 psi basados en Cabrera-Ponce y cols, 1997 y Sanford y cols, 1993.

7.2.1.4 Selección y regeneración de callos transformados

Los callos (embriones somáticos) previamente transformados son sometidos al medio MS de selección (**Tabla 6**) que contiene Bialafos, PEG 12% o combinación de estos agentes de selección, esto último en callos transformados al mismo tiempo con las construcciones del gen CENH3 y TreAS. Posteriormente son incubados a 26 °C en oscuridad y cada 10 días se realizan pases a medio nuevo de selección (4 a 5 pases en total). Terminada la etapa de selección, los callos que crecen en el medio de selección son llevados a medio de regeneración (**Tabla 6**) donde están de 7 a 10 días en oscuridad a 26°C y luego se llevan a fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 26 °C hasta la regeneración de la planta.

7.2.2 Obtención de Plantas GM por Agroinfección

Para la obtención de plantas GM con las construcciones anteriormente mencionadas, también se utilizó otro método que consiste en la transformación de plántulas de maíz de la variedad VT401 (60 semillas por construcción por cuadruplicado) de tres días de germinación mediante la exposición del meristemo a *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 previamente transformado y crecido en cajas Petri de medio Luria-Bertani (LB) con espectinomicina, kanamicina y carbenicilina como antibióticos (**Anexo 4**) a 28 °C por dos días. Posteriormente, *Agrobacterium* es resuspendido en medio MS líquido previamente inducido con acetosiringona (140µM). A continuación, las plántulas son expuestas a la solución con *Agrobacterium* y se dejan crecer durante dos días en cámara de humedad y luego son sembradas en invernadero.

Cuando las plantas tienen de 15 a 20 días de crecimiento se aplica Glufosinato de amonio al 1% con tween 80 al 0,1% en la tercera, cuarta y quinta hoja con un hisopo de algodón en un área de 0.5 x 0.5 cm², con el fin de evaluar la tolerancia al herbicida y seleccionar las plantas que están transformadas.

7.2.3 Obtención de plantas B73 con TreAS

Plantas B73 transformadas por biobalística usando el RNA antisentido de trehalasa (684pb) y que fueron evaluadas en invernadero durante la maestría, están flanqueadas por el promotor 35S-CaMV y el Terminador Nos. Las líneas evaluadas en este trabajo que presentaron tolerancia a sequía en condiciones de invernadero fueron llamadas CIEA9-1 y CIEA9-2. Estas fueron las usadas para evaluar en campo junto con otras con B73 silvestre como control (B73), maíz criollo rojo (CR) y el híbrido CIEA9 X CR (Para mayor información se anexa artículo).

7.2.4 Crecimiento en invernadero de plantas GM

Las plantas provenientes de cultivo in vitro cuando presentan un tamaño adecuado y buen desarrollo radicular en medio de regeneración, son trasplantadas a macetas para su aclimatación en la cámara de crecimiento marca Percival y después de 15 días son llevadas a condiciones de invernadero y sembradas en macetas de 60 cm de altura que contienen 40% turba, 40 % tierra y 20% agrolita a una temperatura

entre 25 a 30 °C y humedad relativa de 40 al 50% y un fotoperiodo de 16h luz y 8h oscuridad. Las plantas son suplementadas con una solución nutritiva de Miracle-Gro y TR Nutrigarden que contienen nitrógeno, fosforo y potasio (17-17-17). Estas condiciones de invernadero fueron tanto para las plantas de cultivo in vitro como las obtenidas por agro-infección.

7.3 Análisis Moleculares de plantas GM

7.3.1 Extracción de DNA

La extracción de DNA se realiza tanto a controles silvestres, como a plantas GM (H99, HII H99XB73, VT-401 y B73). El tejido es pulverizado por crio-fractura con nitrógeno líquido, y la extracción se realizada mediante el sistema comercial DNeasy® Plant (QIAGEN, Hilden, Alemania), de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

7.3.2 Detección de transgen por PCR punto final

Para la comprobación de la transformación de las plantas transformadas con *cenh3* y/o TreAS, se amplifica por PCR punto final (PCR_{pf}) tanto el promotor 35s, gen *cenh3* / TreAS o T-Nos y en algunos casos se detecta solo el gen Bar, para el caso de plantas transformadas con ambas construcciones (*cenh3* / TreAS) (**Anexo 1**). Para plantas B73 usadas en la prueba de campo se detectaron mediante la amplificación del promotor 35S-CaMV (Para mayor información se anexa artículo). Las condiciones de amplificación son a 94°C, 4 min (1 ciclo); 94°C, 40 seg, 60°C, 30 seg y 72°C, 1 min (35 ciclos); 72°C, min (1 ciclo).

7.3.3 Número de copias por ddPCR

Para la identificación del número de copias por genoma de las plantas transformadas, el DNA genómico de todas las muestras es tratado con la enzima de restricción EcoRI (15u) por 1h a 37°C, la fragmentación del DNA es necesaria para obtener un óptimo análisis del número de copias y adecuada distribución de la

muestra en el equipo de digital droplet PCR (ddPCR) QX200 de Bio-Rad. La mezcla de reacción se realiza en un volumen de 20 µl y se diseñan oligos y sonda para detectar el gen BAR (para las construcciones del gen CENH3) y el promotor 35S-CaMV (en el caso de TreAS) como gen exógeno/Blanco y el gen HMG1 como gen endógeno/referencia (**Anexo 1**). La concentración final de los oligos es de 900 mM, la sonda a 250 mM y el DNA a 100 ng/µl en plantas, B73, H99 Y H99XB73 (HII) y a 50 ng/µl en plantas Vt-401 (**Tabla 8**). En cada reacción se procesan aproximadamente 20,000 nanogotas (Droplet generator QX-200) en una reacción de PCR y posteriormente se realiza su análisis en el Droplet-reader QX200. La mezcla de reacción se realiza según especificaciones del proveedor (PrimePCR™ ddPCR™ Copy Number Variation (CNV) assay – BioRad) y las condiciones en el termociclador son 60°C, 30 min (1 ciclo); 95°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 30 seg and 60°C. 1 min (40 ciclos); 94°C, 10 min (1 ciclo). El análisis de los datos se realiza por la distribución de Poisson mediante el software del programa de ddPCR.

7.4 Cuantificación de los niveles de expresión del mRNA

Para la cuantificación absoluta del mensajero de CENH3, TreAS y HMG1 (**Anexo 1**), se realiza la extracción de RNA de hojas de plantas transgénicas y controles, usando el kit Direct-zol™ RNA (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del proveedor. La cantidad de RNA usado es de 10 ng para una reacción de 20 µl del kit One Step RT-ddPCR (Bio-Rad) siguiendo instrucciones del proveedor. La concentración final de los oligos y sonda es de 900 mM y 250 mM respectivamente. Las condiciones en el termociclador son 60°C, 30 min (1 ciclo); 95°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 30 seg y 60°C. 1 min (40 ciclos); 94°C, 10 min (1 ciclo). El análisis de los datos se realiza por la distribución de Poisson mediante el software del programa RT-ddPCR.

7.5 Análisis de ciclo celular en plantas con *cenh3*

7.5.1 Citometría de flujo

Considerando que la modificación en la histona CENH3 podría originar cambios en el ciclo celular y niveles de aploidia en las plantas genéticamente modificadas, se realiza la detección del ciclo celular por citometría de flujo de núcleos de hojas

mediante el uso del Kit CyStain UV Precise P, que consiste en cortar aproximadamente 1 cm² de hoja y fragmentarlo mediante un bisturí por 1 min y luego adicionar el buffer de extracción e incubar por 30 min, después de la incubación las muestras son filtradas (diámetro de 50 µm de poro del filtro) y se adiciona a la muestra 1.6 ml de buffer de tinción (contiene DAPI) y se incuba por 1 min. Posteriormente, se analizan usando el citometro Fortessa con el canal de luz UV.

7.5.2 Análisis morfológico de anteras (Meiocitos)

El análisis de células sexuales de anteras se realiza al inicio de la época de floración temprana de las plantas. Los meiocitos de las anteras son fijadas en solución Carnoy's (etanol: ácido acético glacial en proporción 3:1 v/v) durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavan con etanol al 96% y se dejan en etanol al 70% a 4°C hasta su uso (Freeling & Walbot 1993 y Reichmann & Wellmer 2014). La anteras fijadas son lavadas 3 veces con buffer de citrato (Citrato de Sodio 0.01M y D-Sorbitol 0.32M) y luego se adiciona el buffer de extracción de núcleos del kit CyStain UV Precise P por 1h a temperatura ambiente, se lava 3 veces con buffer de citrato y se ponen a teñir en el buffer de tinción con DAPI del kit CyStain UV Precise por 4 a 6 h a 4°C en oscuridad. A continuación las anteras son puestas en el porta-objetos y se cortan transversalmente para poder sacar los meocitos y se descartan células externas (epidermis, endotedium, tapetum, etc) y se visualizan mediante microscopia confocal usando el láser UV del equipo Leica SP8, en el objetivo de 63X con aceite de inmersión (Ruzin, 1999).

7.5.3 Análisis morfológico y ciclo celular en raíz

Con el fin de evaluar la composición cromosómica de las plantas transgénicas, se analizan tanto parentales como progenie mediante el uso de meristemos de raíz. En el caso de las plantas F0 que son transformadas, los meristemos de raíz son colectados antes de sembrar las plantas y en el caso de la progenie F1, son germinadas sobre papel filtro en placas petri a 25°C para colectar los meristemos. Las raíces se incuban durante 2 h con Colchicina para acumular células en mitosis y contraer los cromosomas y luego son fijadas en solución Carnoy's (etanol: ácido acético glacial en proporción 3:1 v/v) toda la noche a temperatura ambiente.

Posteriormente, se lavan con etanol al 96% y se dejan en etanol al 70% a 4°C hasta su uso (Freeling y Walbot, 1993; Reichmann y Wellmer; 2014). A continuación las raíces se lavan 3 veces con agua destilada y son puestas en buffer de digestión de extracción de núcleos del kit CyStain UV Precise P por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se hace una posfijación 10 min en glutaraldehído al 2% en buffer de citrato (Citrato de Sodio 0.01M y D-Sorbitol 0.32M) y se lava cuidadosamente 2 veces en agua destilada y se incuba 5 min en SDS 2% en buffer de Tris 50 mM.

Para la tinción se ponen las raíces en el buffer de tinción que tiene DAPI del kit CyStain UV Precise P a 4°C por 4 – 6 horas a oscuridad, por último los meristemos son puestos en porta objetos y con un cubreobjetos se realiza la técnica de squash y se visualizan por microscopia confocal mediante el láser de UV (Leica confocal sp8) usando el objetivo 63X con aceite de inmersión.

7.6 Análisis bromatológico y toxicológico de Plantas de TreAS

El análisis bromatológico se lleva a cabo en semillas obtenidas de las líneas CIEA9-1 y CIEA9-2 de B73 que tienen en transgén de TreAS, mediante el servicio prestado por el laboratorio de constatación agroindustrial. Para el análisis toxicológico se usaran ratones Balb/c, los cuales son alimentados con maíz GM y convencional, que es adicionado a su dieta convencional por 30 días y se realiza tomas de muestras hemáticas y de peso al inicio y fin del experimento (Para mayor información se anexa artículo).

7.7 Evaluación fisiológica, productividad y tolerancia a sequía en campo

La evaluación en campo de plantas tolerantes a sequía se realizo en Sinaloa-México, en donde se aplica cuatro bloques de 8 m² con diferentes porcentajes de riego que van del 40, 50, 60 y 70% y se realiza la medición del contenido relativo de agua del suelo. Para la evaluación de la respuesta fisiológica a los diferentes niveles de riego se cuantifica la tasa fotosintética mediante el uso del sistema portable de fotosíntesis LICOR (Para mayor información se anexa artículo).

7.8 Cuantificación del contenido de trehalosa

El contenido de trehalosa se determina mediante el método de fluorometría reportado por Lunn y cols, 2006 y Carrillo y cols, 2013. En este se usaron muestras de plantas B73 silvestres (control) y plantas tolerantes a sequía que fueron expuestas a condiciones normales de riego y a sequía (Para mayor información se anexa artículo).

8. RESULTADOS

8.1 Diseño y Obtención de construcciones

8.1.1 Construcción del gen CENH3.

El tamaño de la proteína CENH3 en maíz es de 157 aa (acceso Q8LK76) y su secuencia en bases es de 474 pb (acceso AAM74226.1), el amino terminal de esta proteína tiene 69 residuos, por lo que los oligos diseñados no incluyen esta zona (**Fig.15**) para así eliminarlo, quedando un tamaño del gen de 294 pb. También se adiciono el codón de inicio y la secuencia consenso de Kozak ACCATGGCA.

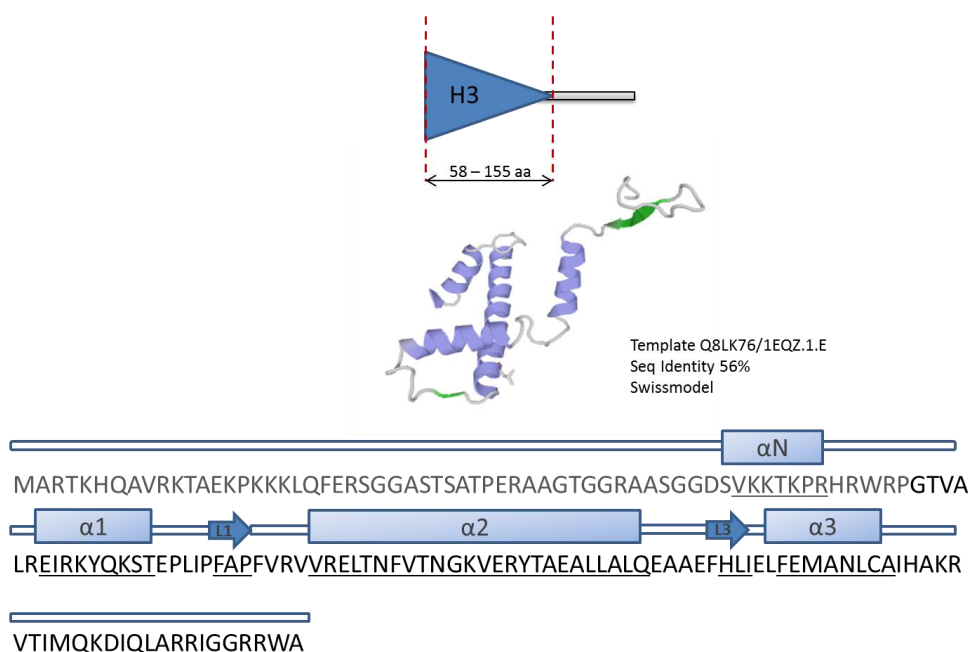


Fig. 15 Secuencia de la proteína y su estructura 2D y 3D

(2D sobre los aa y 3D imagen superior), especificando que aa que hacen parte del N-terminal (en color gris en la secuencia) y el dominio conservado de las histonas H3 (triángulo en la parte superior de la estructura 3D).

8.1.1.1 Análisis bioinformático de N-terminal de cenh3

Con el fin de demostrar que la región N-terminal de la proteína CENH3 en maíz presenta mayor variación entre especies con respecto al resto de la proteína, se realizó el alineamiento de 10 proteínas histona centrómeras H3, usando T-Coffe versión 11.0 y se pudo observar que la secuencia del N-terminal presentan una

mayor variación respecto al resto de la secuencia que pertenece al dominio conservado de la familia de las histonas h3 en los organismos analizados (FIG. 16).

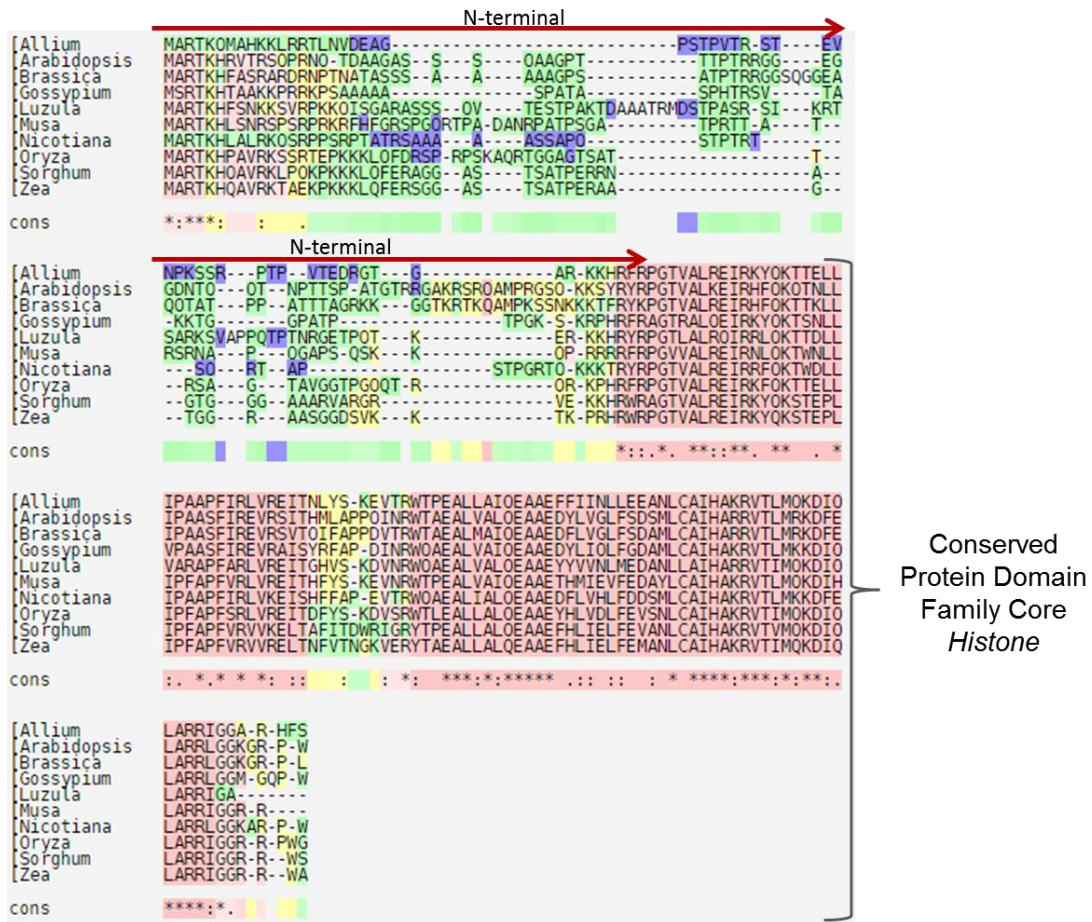


Fig. 16 Alineamiento de proteínas histona centromericas H3

usando T-COFFE, observando una alta variabilidad en las secuencias del N-Terminal.

8.1.1.2 Ensamblaje in vitro de CENH3

Para la obtención del gen CenH3 se realizó un ensamble *in vitro* mediante el diseño de oligos de un tamaño de 97 a 98pb, teniendo en cuenta que entre ellos deben tener secuencias conectoras que permitan su hibridación. Por otra parte, se diseñaron oligos al inicio y al final del gen que contenían una secuencia de 18pb conectoras para el respectivo promotor y terminador (Anexo 1). El ensamble se llevó a cabo en distintas etapas, ensamblando los oligos por parejas, es decir el oligo 1-2, 3-4 y 5-2, para luego el ensamble final de 12-34 y 52-34 (el oligo denominado 1 es específico para conectar el gen con el promotor 35S, el oligo 5 es específico para conectar el gen con el promotor Knotted1, el oligo 4 para conectar el gen con el

terminador y los oligos 2 y 3 son propios del gen). Después de cada ensamble se realizó una PCR_{pf} para la re-amplificación de cada fragmento ensamblado (Fig.17), que fueron clonados en el vector P-Drive (Qiagen).

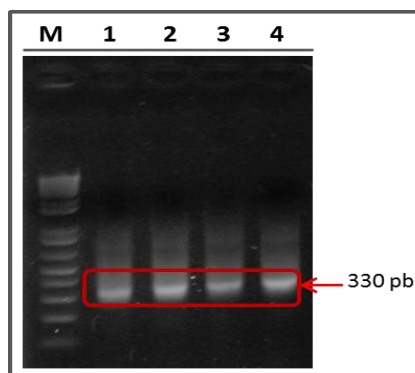


Fig. 17 Gel electroforético de ensamble *in vitro* del gen Cenh3, el carril 1 y 2 son Cenh3 con el conector a 35S y a T-nos y los carriles 3 y 4 son Cenh3 con el conector a Knotted y a T-nos.

8.1.1.3 Secuenciación de CENH3

El gen Cenh3 ensamblado y clonado en el vector p-Drive (Qiagen) fue secuenciado en los Servicios genómicos de la FES-Iztacala; y al realizar un alineamiento de pares (usando <http://pir.georgetown.edu>) para evaluar su identidad con la reportada en las bases de datos y se obtuvo una homología del 99 % en ambos fragmentos.

8.1.1.4 Ensamblaje de las construcciones

Para el ensamble de las construcciones del gen con su respectivo promotor y terminador se realizó la amplificación de cada uno de estos por separado y de la siguiente manera:

- **Promotor 35S CaMV:** Para la obtención de este promotor constitutivo se usó el vector PBIN m-gfp5-ER que contiene el promotor 35S-CaMV de un tamaño de 853 pb (Fig. 18; Anexón 1).

- **Promotor knotted1:** Para la amplificación de promotor Knotted1 (Anexón 1) de maíz de un tamaño de 1358 pb, se utilizó DNA genómico de maíz VT-401 (Fig. 18) y el fragmento obtenido fue clonado en el vector p-Drive (Qiagen) y enviado a secuenciar al servicio genómicos FES-Iztacala (Secuencia-Anexos); esta secuencia se les

realizo un alineamiento de pares (usando <http://tcoffee.crg.cat/>) para evaluar su identidad con la reportada en las bases de datos y se obtuvo una homología del 98 % .

- **Terminador Nos (T-Nos):** Para la obtención del terminador Nos se usó el vector PBIN m-gfp5-ER que contiene dicho terminador de un tamaño de 271 pb (Fig. 18; Anexo 1).

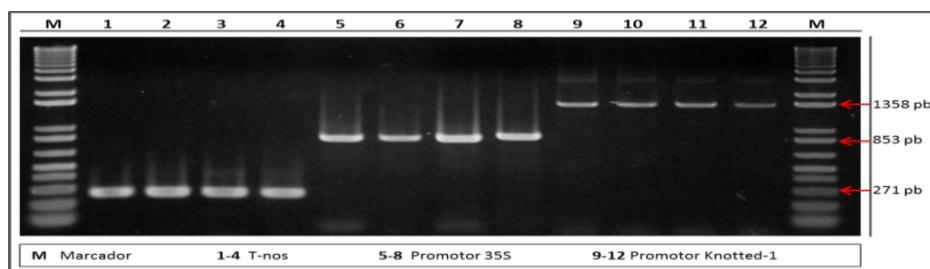


Fig. 18 Gel electroforético de la amplificación Tnos, 35S-P y Knotted

Terminador NOS (T-nos) de 271 pb (carril 1 al 4), promotor 35S de 853 pb (carril 5 al 8) a partir del vector PBIN m-gfp5-ER y promotor KNOTTED1 de maíz a partir de DNA genómico de 1358 (carril 9 al 12). Estos fragmentos fueron purificados y utilizados para los respectivos ensambles de las construcciones.

Para el ensamblaje *in vitro* de los promotores con el gen CENH3 y el T-Nos se llevó a cabo en distintas etapas como se menciona en la metodología (Fig. 19).

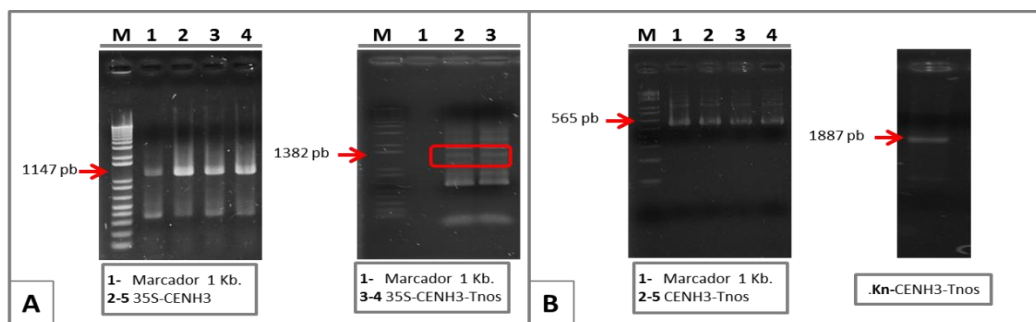


Fig. 19 Geles electroforéticos de ensamble de construcciones

A) Ensamble de la construcción C1 del promotor 35S y el gen CENH3 de 1147 pb y posteriormente el ensamble de este con el fragmento de T-nos de 1382 pb; B) Ensamble de la construcción C2 del gen CENH3 con el T-nos de 565 pb, posteriormente ensamblado al promotor Knotted1.

8.1.1.5 Clonación en vector de entrada y vector destino

Las construcciones ensambladas fueron clonadas en el vector de entrada pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen) y se verificó inserto por digestión enzimática y PCR (Fig. 20) en cada una de las construcciones. Se realizó secuenciación de las construcciones en los servicios de secuenciación de la FES Iztacala.

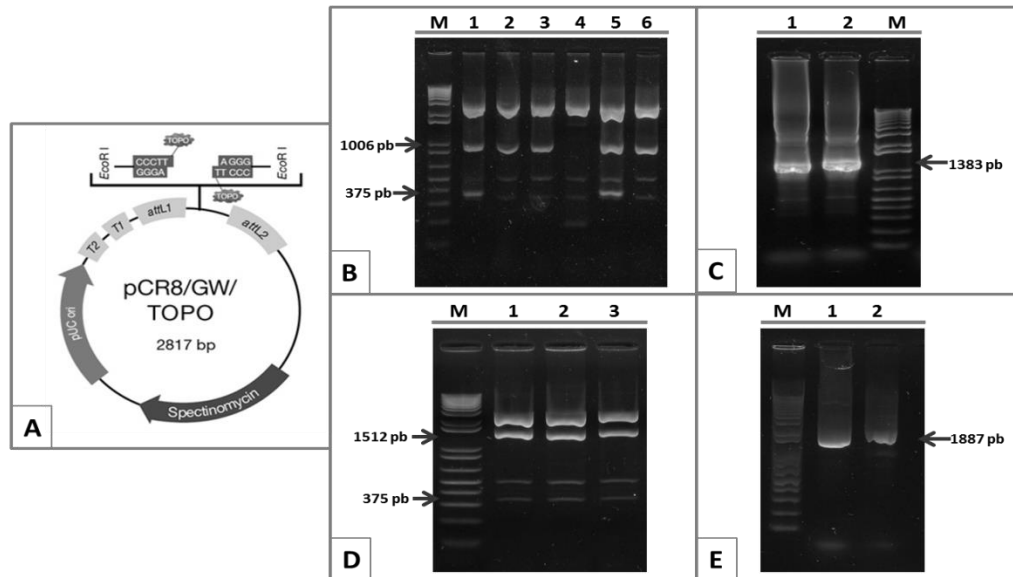


Fig. 20 Verificación de las construcciones clonadas en el vector pCR8/GW

A) Esquema representativo del vector pCR8 con su respectivo sitio de clonación entre sitios EcoRI (2817 pb); B-C) Clonación de la construcción C1 fue verificada por digestión con EcoRI (1006 Y 375 pb) y por PCRpf (1383 pb) respectivamente, D-E) Clonación de la construcción C2 fue verificada por digestión con EcoRI (375-1512pb) y por PCRpf (1887).

Después se realizó su subclonación al vector destino de expresión pBGWFS7.0 por medio del sistema Gateway LR clonasa, que cuenta con el marcador de selección BAR (Fig 21A), y se comprobó también el inserto por PCR y digestión enzimática (Fig 21 B-E) en cada una de las construcciones.

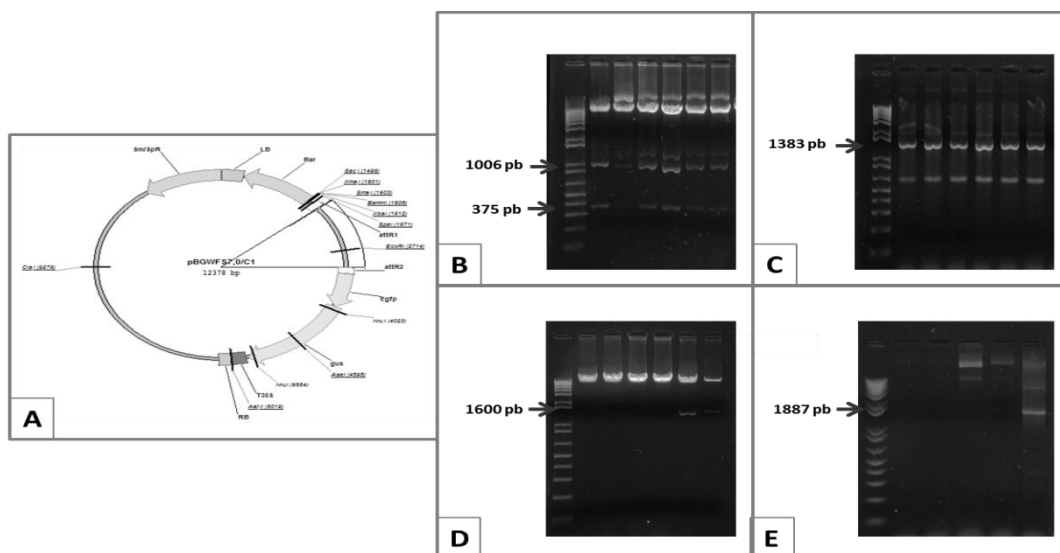


Fig. 21 Verificación de las construcciones en el vector de expresión pBGWFS7.0

A) Esquema del vector PBGWFS7 con un tamaño de 12451 pb; B) PCR de comprobación de la construcción C1 (1383pb); C) Digestión de C1 con EcoRI (375-1006pb), siendo positiva todas las clonas analizadas de C1; D) PCR de comprobación de la construcción C2 (1887) donde dio positiva las clonas del carril 4 y 5 y E) Digestión de C2 con SmaI (1600pb)

8.1.2 Clonación de Trehalasa antisentido a vector de entrada y vector destino

La construcción de trehalasa antisentido usada para otorgar resistencia a sequía que estaba en el vector Puc57, se uso para amplificar toda la construcción y el producto de PCR fue clonado en el vector pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] Kit (invitrogen) y se verifico el inserto por digestión enzimática y PCR (Fig. 22 A,B,C). Después se realizó la subclonación al vector de expresión pBGWFS7.0 por medio del sistema Gateway LR clonasa, que cuenta con el marcador de selección Bar (Fig. 22A) y se comprobó también el inserto por PCR y digestión enzimática (Fig. 22C). La construcción obtenida en este vector de expresión fue la usada para la transformación de plantas por agroinfección, ya que en plantas transformadas por biobalística se uso solo la construcción liberada del vector.

Para el caso de plantas B73 tolerantes a sequía evaluadas en campo los resultados están en el artículo anexo (Fig. 1 del artículo) junto con la información de transformación y regeneración.

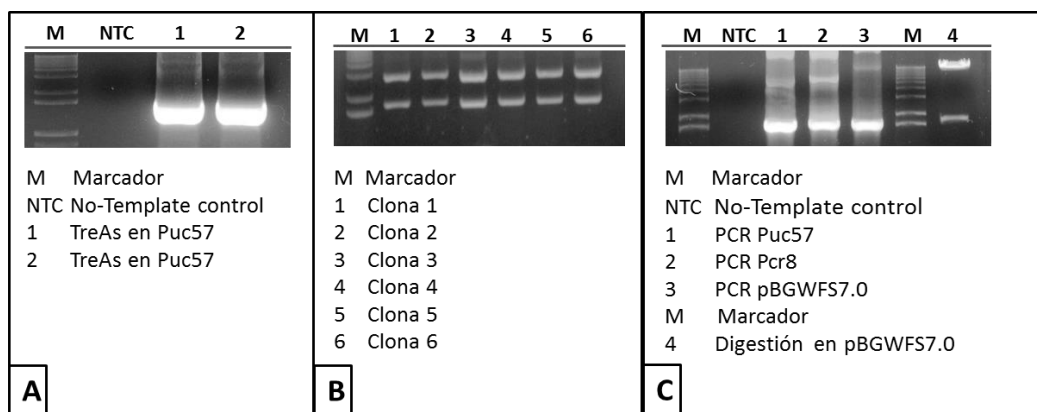


Fig. 22 Clonación de la construcción de Trehalasa antisentido (TreAS)
 A) Amplificación de la construcción a partir del vector Puc57 (1776 pb); B) clonación de la construcción en el vector pCR8 y verificación por digestión enzimática con EcoRI (1776pb); C) verificación por PCRpf de la construcción en los vectores Puc57, pCR8 y pBGWFS7 (1776pb, Carril 1,2,3) y comprobación por digestión de la subclonación en el vector pBGWFS7 (1776pb, carril 4).

8.2 Obtención y transformación de plantas genéticamente modificadas

8.2.1 Plantas obtenidas por biobalística

8.2.1.1 Obtención y transformación de callos embriogénicos líneas H99 y H99xB73

Para la obtención de callos embriogénicos de maíz de la línea **H99** se partió de embriones cigóticos inmaduros (obtenidos después de 10 a 14 días de la fertilización) con la auxina 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiácetico) y para la línea H99xB73 híbrida se obtuvo de la germinación de semillas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con la auxina Dicamba. Estas líneas fueron transformadas por biobalística (**Fig. 23**) con las construcciones del gen CenH3 con su respectivo promotor (**C1 Y C2**) junto con la construcción de tolerancia a sequía (**TreAS**) y al mismo tiempo se realizó una combinación de C1-TreAS y C2- TreAS como se muestra en la **Tabla 10**. Este experimento se hizo por triplicado y se manejó en cada caja aproximadamente 50 embriones para cada línea somática.

También fueron transformados embriones con un vector que expresa de manera transitoria acumulación de antocianinas, que nos permite verificar nuestra eficiencia de transformación y el éxito tanto del recubrimiento de las partículas como la transformación en los embriones somáticos (**Fig. 24 y Tabla 10**).

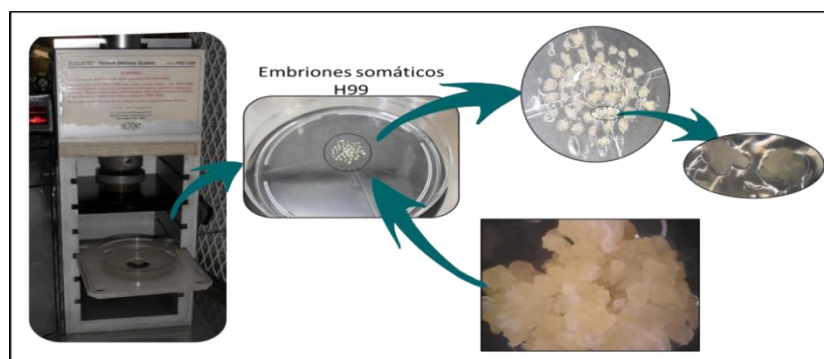


Fig. 23 Esquema representativo de la transformación de embriones somáticos por Biobalística.

Eventos de transformación							
Medio MS de selección	35S Cenh3 T-nos	Kn1 Cenh3 T-nos	35S TreAS T-nos	35S Cenh3 T-nos	Kn1 Cenh3 T-nos	35S Ant T-nos	CONTROL NO TRANSFORMADO
Herbicida Bialaphos 6mg/L	X	X				X	X
PEG 12%/L			X			X	X
Bialaphos 6mg + PEG 12%				X	X	X	X
MS normal						X	

Tabla 10 Eventos de transformación utilizados y sus respectivos medios de selección.



Fig. 24 Embrión somático control de transformación con antocianinas.

8.2.1.2 Selección y regeneración de callos transformados

Después de ser transformados, los embriones de H99 y H99XB73 fueron sometidos a selección en medio con herbicida (Bialaphos 6mg/L) y PEG al 12% (Fig 25 y 26) según la construcción usada. Posteriormente, se llevaron a 25 °C a oscuridad tanto los embriones transformados como controles no transformados. Los embriones de la línea H99 y H99xB73 que presentaron crecimiento y supervivencia en estos medios de selección fueron llevados a medio de regeneración a 25°C con 8h luz y 16h oscuridad (Fig. 27). Ya regeneradas las plantas son aclimatas y llevadas a invernadero para su crecimiento y respectivos análisis moleculares (Fig. 28 y 29).

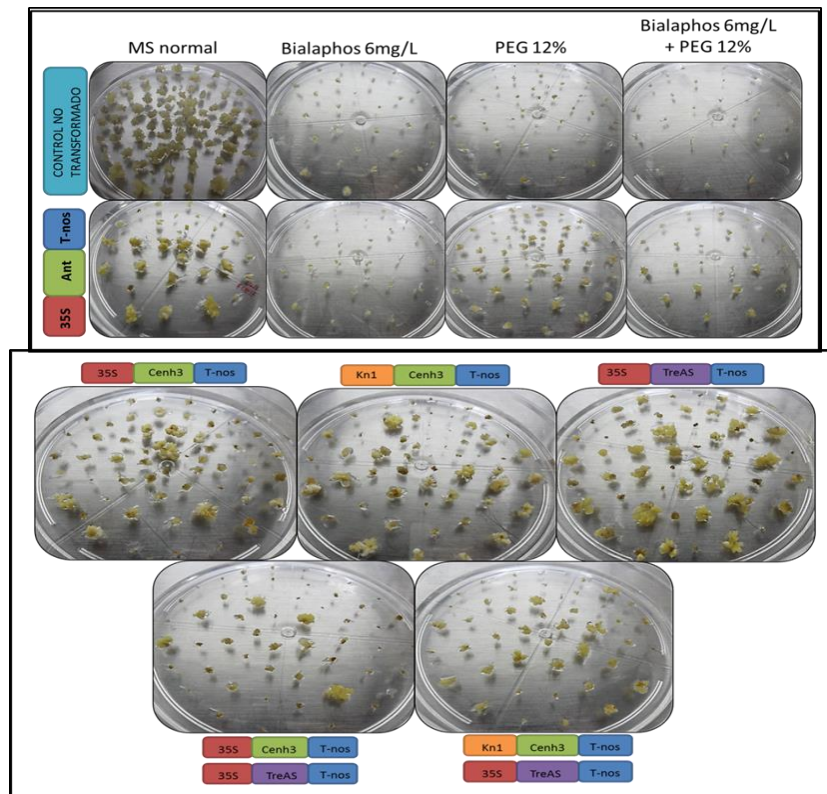


Fig. 25 Selección de callos embriogénicos H99 tanto control como transformados con las respectivas construcciones (5 semanas de selección).

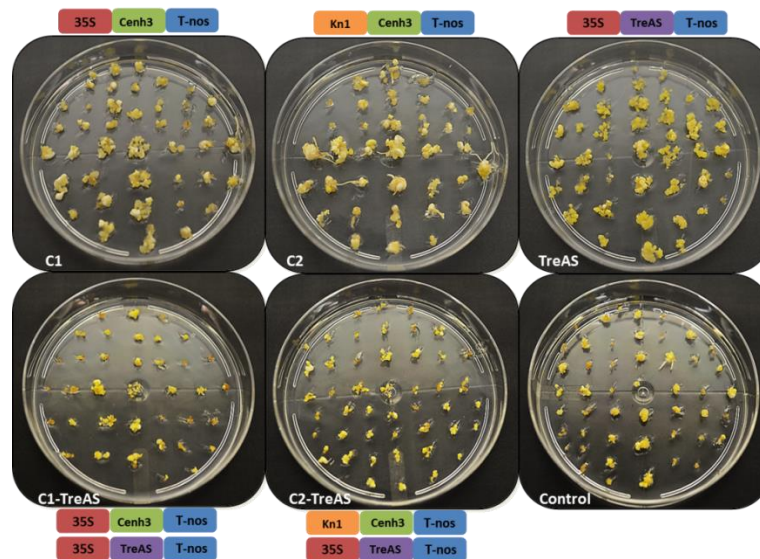


Fig. 26 Selección de callos embriogénicos H99xB73 tanto control como transformados (5 semanas de selección).

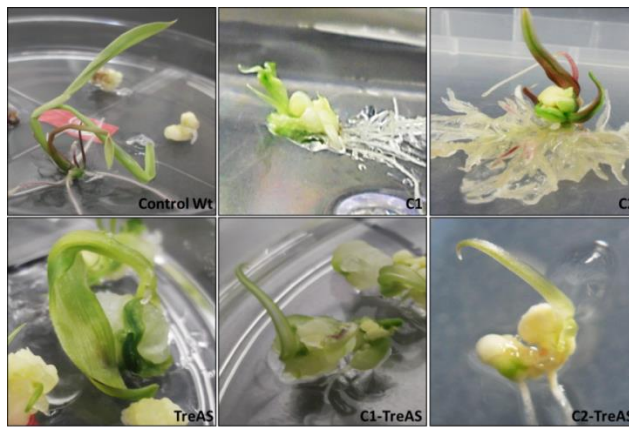


Fig. 27 Clonas seleccionadas llevadas a medio de regeneración.

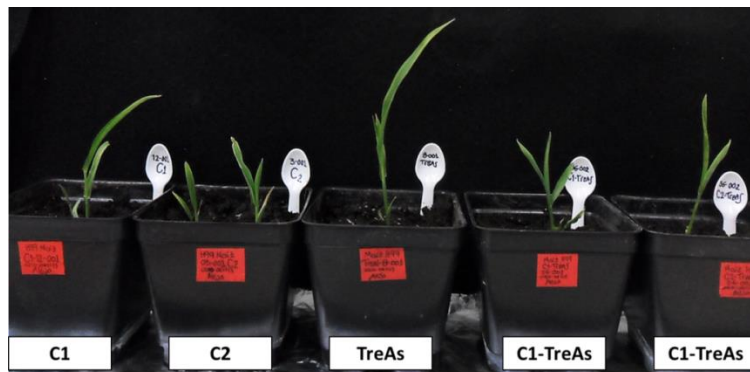


Fig. 28 Plantas regeneradas y aclimatadas de la línea H99.

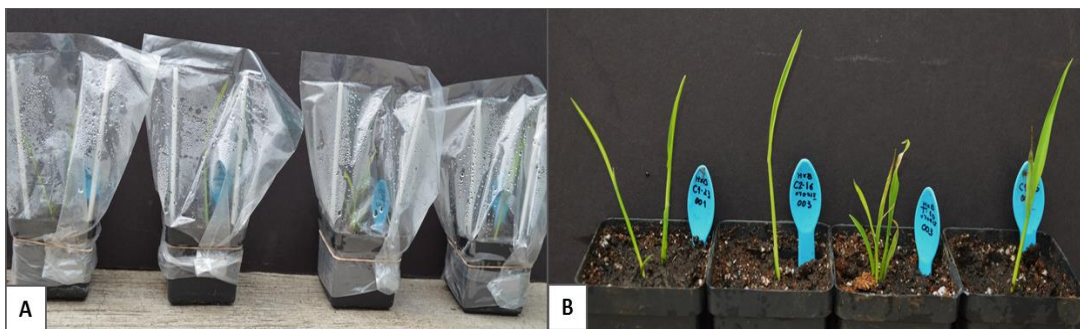


Fig. 29 Plantas regeneradas y aclimatadas de la línea H99xB73
A) aclimatización de las plantas y B) crecimiento en invernadero.

8.2.1.3 Eficiencia de selección y regeneración

A partir de los 50 embriones (por triplicado) transformados por biobalística, que posteriormente se seleccionaron y regeneraron, se obtuvo un porcentaje del 5 al 8% (promedio del 6.6%) en plantas con las construcciones C1, C2 y TreAS, pero al combinar las construcciones de CENH3 con TreAS se llegó a obtener un porcentaje

del 8 al 20% (promedio del 14.4%), siendo la eficiencia general del sistema de transformación del 9.77 %.

Construcción	Clonas Iniciales	Clonas Regenerada	% Eficiencia Regeneración
C1	90	8	8.88
C2	90	5	5.55
TreAS	90	5	5.55
C1+TreAS	90	8	8.88
C2+TreAS	90	18	20

Tabla 11 Registro de la eficiencia de regeneración

a partir de las clonas que se obtuvieron en cada transformación y que fueron regeneradas y su respectivo porcentaje de Eficiencia del sistema respecto a la regeneración de los tres eventos de transformación.

8.2.1.4 Crecimiento y desarrollo de plantas transformadas por biobalística

Al realizar la evaluación del crecimiento en invernadero de plantas GM, se observó que algunas plantas presentaron menor crecimiento respecto a otras aun entre la misma construcción (**Fig. 30**), principalmente en la construcción C2. Las únicas plantas que dieron semillas, aun en poca cantidad, fueron las de la construcción C2 y Trehalasa; esto posiblemente debido a que el gen CENH3 al estar involucrado en la correcta distribución de los cromosomas en la mitosis y meiosis ocasiona plantas con un menor crecimiento o también existe la posibilidad del que el sitio de inserción esté afectando algún otro gen.

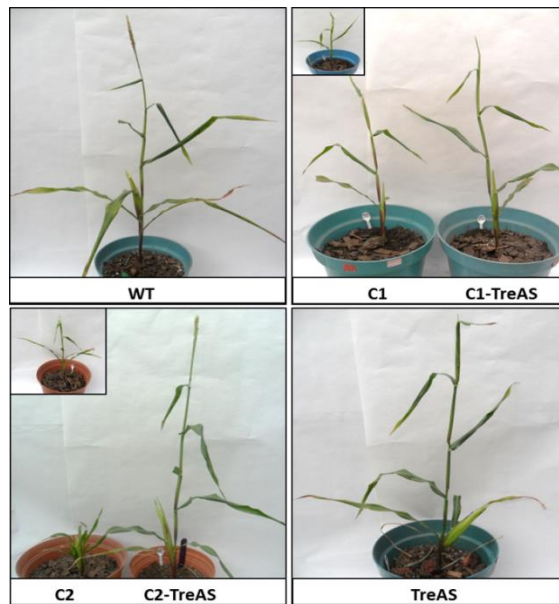


Fig. 30 Crecimiento de plantas en condiciones de invernadero y su comparación entre construcciones y control.

8.2.2 Obtención de plantas transformadas por *Agrobacterium*

Esta técnica de transformación creada en el laboratorio nos permite transformar de manera transitoria, mediante la inoculación del meristemo de plántulas de VT401 que recién germinaron (3d) en cámara húmeda a 25°C en oscuridad mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL1 que contiene cada una de nuestras construcciones; para esto se realizó un corte en el coleóptilo con el fin de dejar en descubierto el meristemo para la inoculación *Agrobacterium* directamente en esta zona (Fig. 31). Después de la transformación, las plantas se regeneraron de manera normal.

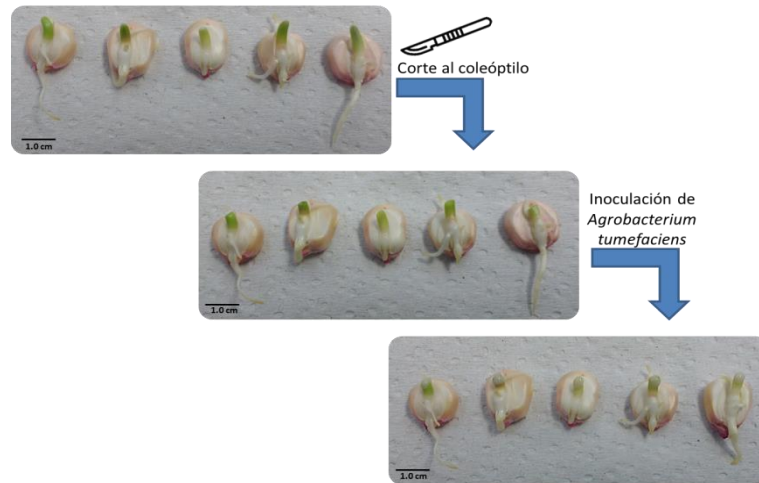


Fig. 31 Esquema de transformación de semillas con *Agrobacterium tumefaciens*.

8.2.2.1 Selección de plantas transformadas

Luego de la transformación de las semillas, éstas son sembradas en tierra para su crecimiento y luego son seleccionadas cuando tienen de 5 a 6 hojas, mediante el uso de glufosinato de amonio al 1% con Tween 80 al 0.1%, mediante la ayuda de un hisopo para su aplicación en un área de las hojas de 1cm² (se inoculan desde la 3^{ra} a la 5^{ta} hoja). Tres días después de la aplicación del herbicida se selecciona las plantas que no presentan daños como amarillamiento fuerte o necrosis del tejido (**Fig. 32**). Con esto pudimos observar que mediante el uso del herbicida en una sola parte de la hoja nos permite realizar una selección visual de las plantas transformadas.

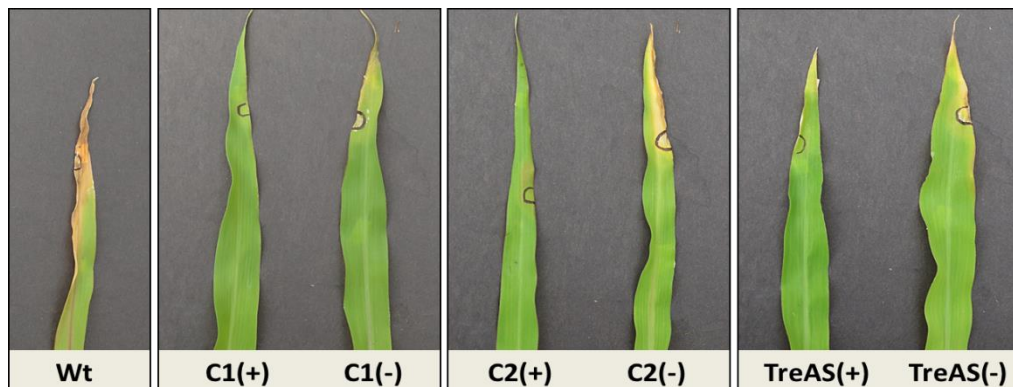


Fig. 32 Selección con glufosinato de amonio en hojas de maíz VT401 en comparación con plantas Wt, transformadas negativo y positivo.

8.2.2.2 Crecimiento de plantas transformadas por *Agrobacterium*

Las plantas que toleraron el glufosinato fueron sembradas en macetas cilíndricas y me mantuvieron en condiciones de invernadero donde se tomaron muestras para los análisis moleculares y de ciclo celular. Las plantas no presentaron diferencias muy notorias en su crecimiento solo algunas de la construcción C1 presentaron tamaños menores (**Fig. 33**).

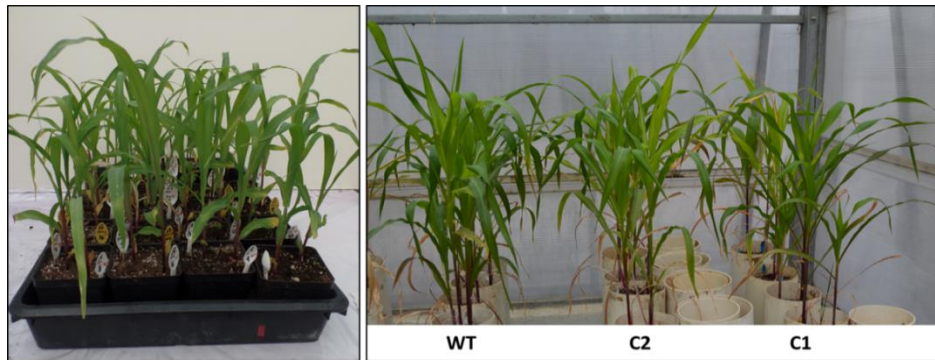


Fig. 33 Crecimiento de plantas transformadas por *Agrobacterium* en condiciones de invernadero.

Plantas transformadas con *Agrobacterium* fueron capaces de generar semillas F1 de la construcción C2 (37 semillas y germinaron 19) y TreAS (81 semillas y germinaron 31 pero solo 14 sobrevivieron) que también fueron analizadas tanto molecular como fisiológicamente.

8.3 Análisis Moleculares de plantas GM

8.3.1 Extracción de DNA

La extracción del DNA de plantas H99, H99XB73 y VT401 transformadas se realizó con el fin de verificar la transformación mediante PCRpf y ddPCR. A continuación se muestran geles de algunos de los DNA extraídos de las plantas obtenidas (**Fig. 34**).

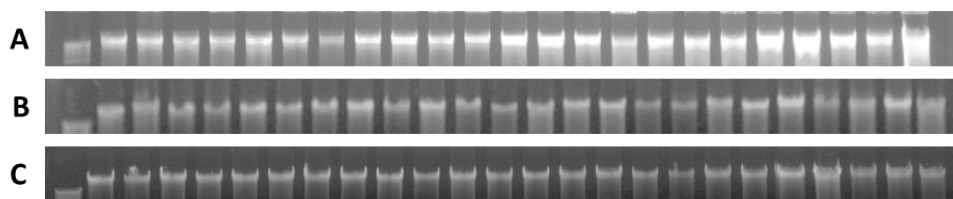


Fig. 34 Geles electroforéticos de DNA de plantas obtenidas por biobalística y agroinfección A- plantas de la línea H99, B- plantas de la línea H99XB73 y C- plantas de la línea VT401 (el primer carril de cada gel es el marcado 1kb plus).

8.3.2 Detección del transgen por PCR punto final

8.3.2.1 Detección en Plantas H99

Plantas H99 transformadas y regeneradas con las construcciones C1 y C2 y en convinsción con TreAS, fueron verificadas por PCRpf mediante la amplificación del gen Bar y el T-Nos (**Fig. 35**). Se detectó el gen Bar y T-nos simultáneamente en 4 plantas de C1y C2, aunque se detectó T-nos en 1 planta C1, en 3 plantas C1-TreAS, en 2 plantas C2 y en 3 plantas de C2-TreAS.

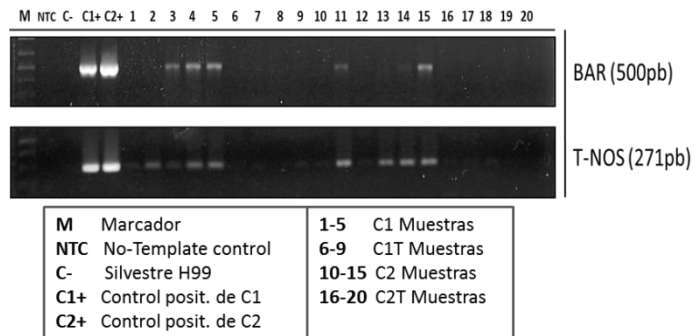


Fig. 35 Detección del gen Bar y el T-nos por medio de PCRpf en la línea H99.

Se consideró detectar más elementos genéticos de la construcción, por ello se amplifico el gen CenH3 de la construcción C1 usando oligos que contienen una pequeña secuencia que se alinea tanto con el promotor y el terminador (**Fig. 36**), obteniendo amplificación de estos en las mismas muestras y también en las que amplificaron T-nos pero no el gen Bar.

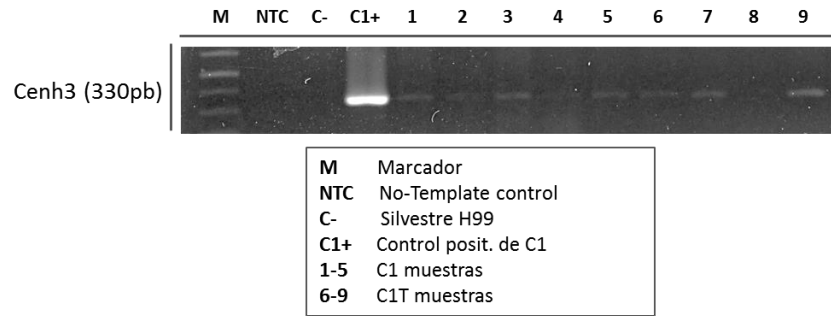


Fig. 36 Detección del gen Cenh3 en C1 por medio de PCRpf en la línea H99.

También se amplificó el gen Cenh3 de C2 (**Fig. 37**), amplificando en una planta (carril 9) donde se había amplificado el gen Bar y T-nos y en 7 plantas en las cuales el gen Bar no amplifico pero si T-nos. Hay que resaltar que en este caso no se puede amplificar el promotor Knotted dado que es un promotor endógeno en maíz.

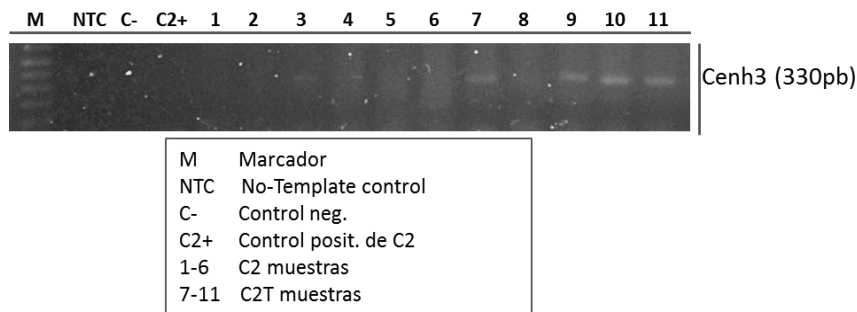


Fig. 37 Detección del gen Cenh3 en C2 por medio de PCR en la línea H99.

Igualmente se detectó plantas transformadas que contienen el transgen de Trehalasa antisentido en plantas que tienen solo esta construcción y en combinación con el transgen de Cenh3 (**Fig. 38**).

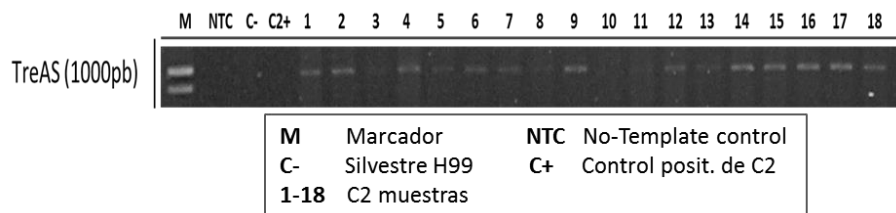


Fig. 38 Detección del gen de Trehalasa antisentido (TreAS) en plantas con este transgen o combinadas con Cenh3 por medio de PCRpf.

8.3.2.2 Detección en Plantas H99xB73

En plantas crecidas en invernadero se corroboró la transformación por PCRpf mediante la amplificación del gen Bar (Fig. 39) y Trehalasa (Fig. 40) encontrando plantas transformadas de C1, C1T Y C2T de la línea H99 X B73

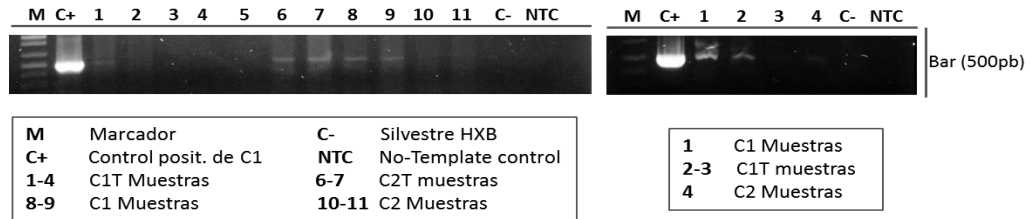


Fig. 39 Detección del gen Bar en H99XB73 por medio de PCRpf en plantas C1, C1T, C2 y C2T.

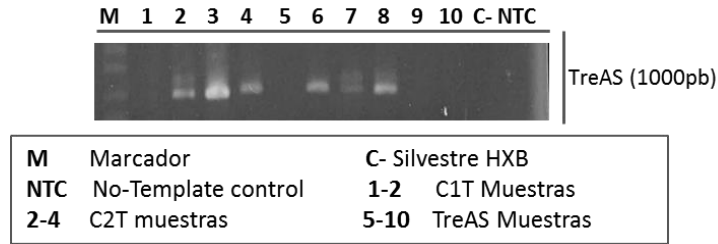


Fig. 40 Detección del gen TreAS en H99XB73 por medio de PCRpf en plantas C2T, C1T y TreAS

8.3.2.3 Detección del transgen en progenie F1 de plantas H99

De las plantas de la línea H99 transformadas por biobalística con la construcción C2 que generaron semillas, solo dos germinaron pero no generaron polen ni semillas en su etapa adulta y al realizar la detección del transgén por PCRpf, se pudo detectar que si se heredó la transformación (Fig. 41).

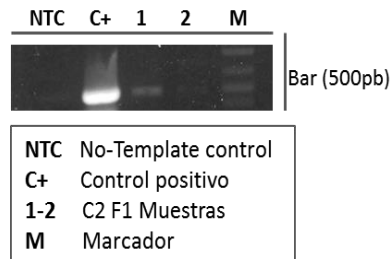


Fig. 41 Detección del gen Bar por PCRpf en planta C2 generación F1 línea H99.

8.3.2.4 Detección del transgen en plantas transformadas por *Agrobacterium*.

Las semillas transformadas VT401 por medio de agroinfección con la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* que fueron crecidas en invernadero se les realizó extracción de DNA (Fig. 34) y se verifico la transformación por PCRpf mediante la detección de gen Bar de 111pb en 19 plantas de C1 (Fig. 42), en 25 plantas de C2 (Fig. 43) y en 32 plantas de TreAS (Fig. 44), las cuales mostraron alta o mediana resistencia a la selección por herbicida. Esta metodología se repitió 4 veces con 50 semillas por evento y el gel es de uno de los eventos por transformación.

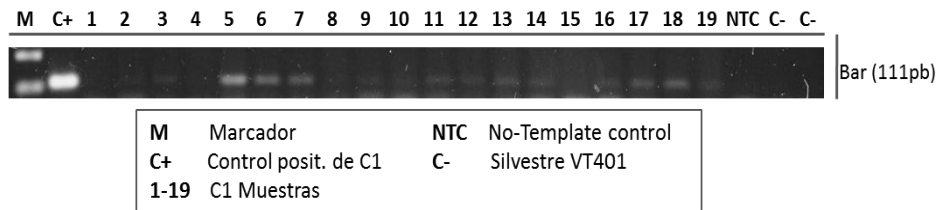


Fig. 42 Detección del transgen BAR por PCRpf en plantas C1 transformadas por agroinfección.

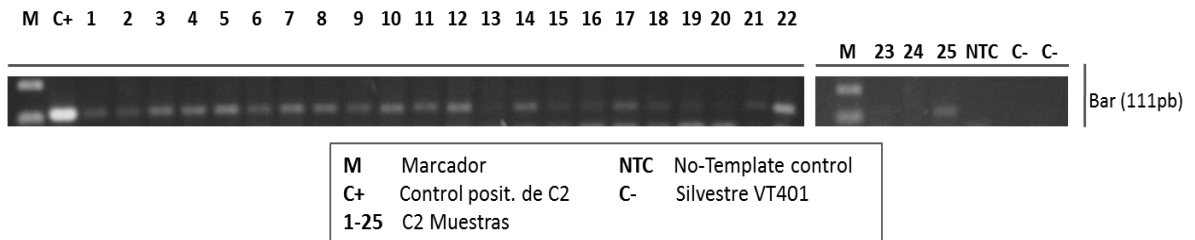


Fig. 43 Detección del transgen BAR por PCRpf en plantas C2 transformadas por agroinfección.

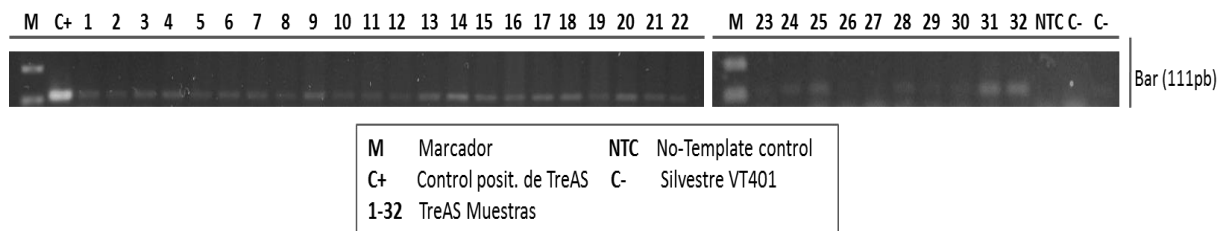


Fig. 44 Detección del transgen BAR por PCRpf en plantas TreAS transformadas por agroinfección.

8.3.2.5 Detección del transgén en progenie F1 plantas transformadas por *Agrobacterium*.

Plantas obtenidas por agroinfección las únicas con progeñie fueron las de la construcción C2 y TreAS, que fueron cruzadas con plantas Vt401 silvestres (donadoras de polen). A estas plantas se les realizo análisis por PCRpf para la detección del transgen de Bar, pero no se logro la detección del transgen ni por PCRpf, ni por presencia o ausencia por RT-PCR o por ddPCR, lo que nos indica que las plantas no heredan esta transformación al usar el sistema de agroinfección ya que este es un sistema de transformación transitorio o puede ser que se esté generando una eliminación del genoma materno que contienen los cromosomas alterados y por ello no podernos detectar la transformación.

8.3.2.6 Eficiencia de transformación por biobalística

Mediante la detección de los transgenes por PCRpf se comprobó la transformación de las plantas por biobalística (**Tabla 12**); permitiendo obtener el porcentaje de eficiencia del sistema que fue del 3.33 al 15.55 % dependiendo de la construcción, al calcular la eficiencia general del sistema de transformación se obtuvo un valor del 6.87%, estando dentro de los valores deseados en la transformación de maíz.

CONSTRUCCIÓN	N° C.R	N° P.T.	% Transformación
C1	8	5	5.55
C2	5	5	5.55
C1+TreAS	5	3	3,3
C2+TreAS	8	4	4,44
TreAS	18	14	15.55

Tabla 12 Eficiencia de transformación por biobalística

registro de clonas regeneradas y número de plantas comprobadas que están realmente transformadas de los tres eventos de transformación, al igual que el cálculo del porcentaje de transformación basados en un promedio de cada uno de los eventos que tuvieron transformadas y en 90 embriones que se utilizaron para la transformación en cada evento. N° CR(número de clonas regeneradas) y N° P.T(número de plantas transformadas).

8.3.2.7 Eficiencia de transformación por Agroinfección

Mediante la detección de la transformación por PCRpf se pudo obtener la eficiencia de transformación (Tabla 13) por construcción que fue del 28 al 52% y la eficiencia del sistema de transformación en fue del 39.3%, siendo este un valor alto para la transformación de maíz.

CONSTRUCCIÓN	N° I.S	N° P.H.	N° P.P	% Transformación
C1	50	19	14	28
C2	50	25	19	38
TreAS	50	32	26	52

Tabla 13 Eficiencia de transformación por *Agrobacterium*

registro de semillas transformadas por agroinfección por evento de transformación, que fueron regeneradas y posteriormente seleccionadas por resistencia al herbicida Bialafos. La plantas seleccionadas fueron verificadas por PCRpf, que nos permitio obtener nuestra eficiencia de transformación. N° I.S (número inicial de semillas), N° P.H (número plantas positivas por herbicida), N° P.P (Número de plantas positivas por PCRpf).

8.3.3 Detección del transgén en plantas B73 evaluadas en campo

Plantas B73 tolerantes a sequía que fueron evaluadas en campo se del promotor 35S por PCRpf de las líneas CIEA9-1 y CIEA9-2, estos resultados se pueden encontrar en la información suplementaría de artículo anexo (**Supl. 1 artículo**).

8.3.4 Número de copias por ddPCR

La obtención del número de copias se realizó mediante el uso de dd-PCR, usando el gen BAR como gen blanco para la detección de plantas transformadas con las construcciones C1 y C2 y el promotor 35S en el caso de las plantas con el gen de TreAS, y el HMG1 como gen endógeno de maíz. Para esto se realizaron pruebas a distintas temperaturas (58 °C a 62 °C) y diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-10}) partiendo desde una concentración de 100ng/ μ l, obteniendo que la temperatura a usar es de

60 a 62 °C y que se puede usar 10ng en muestras de DNA maíz H99 y en plantas híbridas H99Xb73 y VT401 una concentración de 50ng.

Plantas obtenidas por biobalística:

Se realizó la detección del número de copias del gen Bar en cada línea de maíz tanto en H99 (**Fig. 45**) y el híbrido H99Xb73 (**Fig. 46**) detectando una copia por genoma en cada planta analizada.

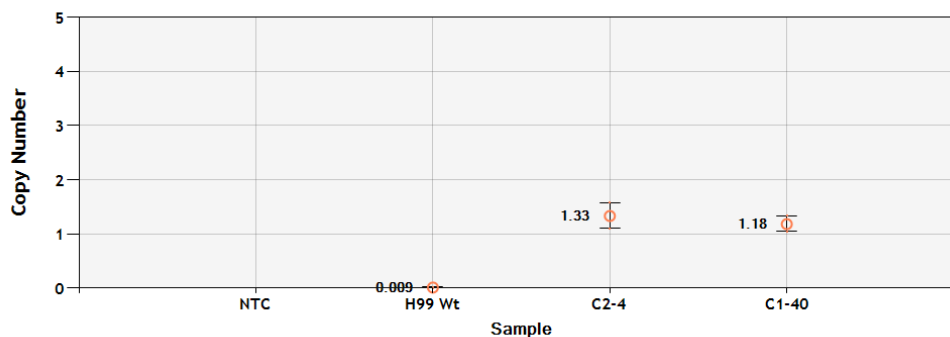


Fig. 45 Detección del número de copias del gen Bar en plantas de la línea H99 transformadas por biobalística con las construcciones C1 y C2 (Distribución de Poisson analizado por el software ddPCR).

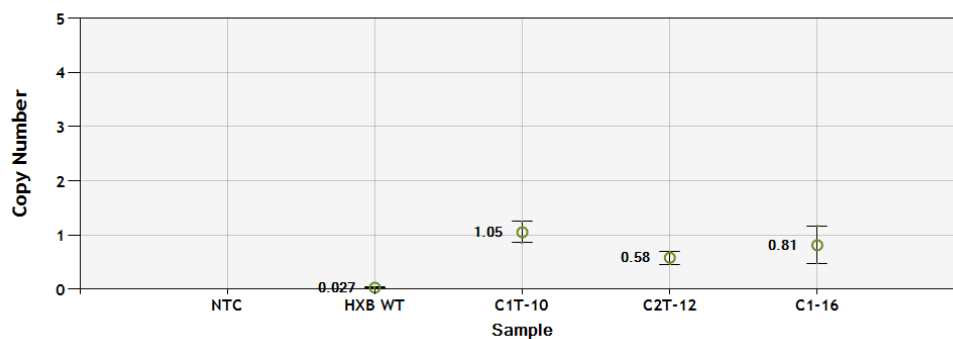


Fig. 46 Detección del número de copias del gen Bar en plantas H99x73 transformadas por biobalística con las construcciones C1, C2, C1-TreAS (C1T) y C2-TreAS (C2T) (Distribución de Poisson analizado por el software ddPCR).

Por otra parte para la detección de TreAS en plantas H99XB73 se usaron oligos para el promotor 35S (**Fig. 47**), observando una copia por genoma en plantas que solo tienen el gen de TreAS pero cuando está combinada con la construcción C1 solo se

detectó una copia de este, cuando esperábamos dos copias ya que la construcción C1 tiene el promotor 35S al igual que la construcción de TreAS; para el caso de la construcción C2 no se detectó el promotor 35S, por lo que puede ser que no se logró la transformación simultanea de las construcciones con C1 o C2 con TreAS.

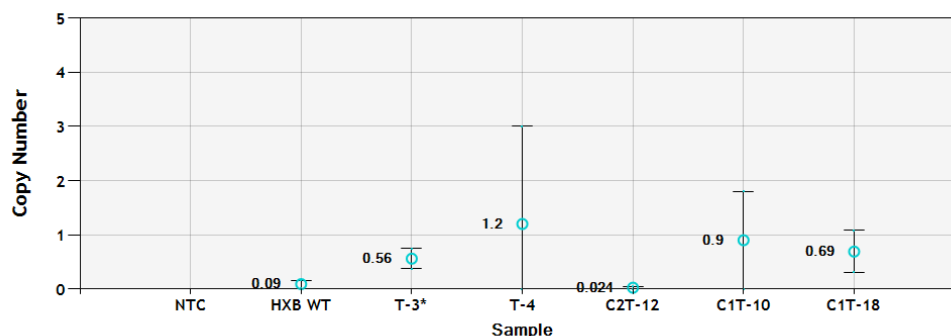


Fig. 47 Detección del número de copias de 35S en plantas H99xB73 transformadas por biobalística con las construcciones TreAS (T), C1-TreAS (C1T) y C2-TreAS (C2T) (Distribución de Poisson analizado por el software ddPCR).

Plantas obtenidas por Agroinfección:

Al realizar la detección del número de copias del gen Bar en plantas obtenidas por agroinfección en cada una de las construcciones (C1, C2 y TreAS), pudimos detectar una copia por genoma en las plantas analizadas (**Fig. 48**).

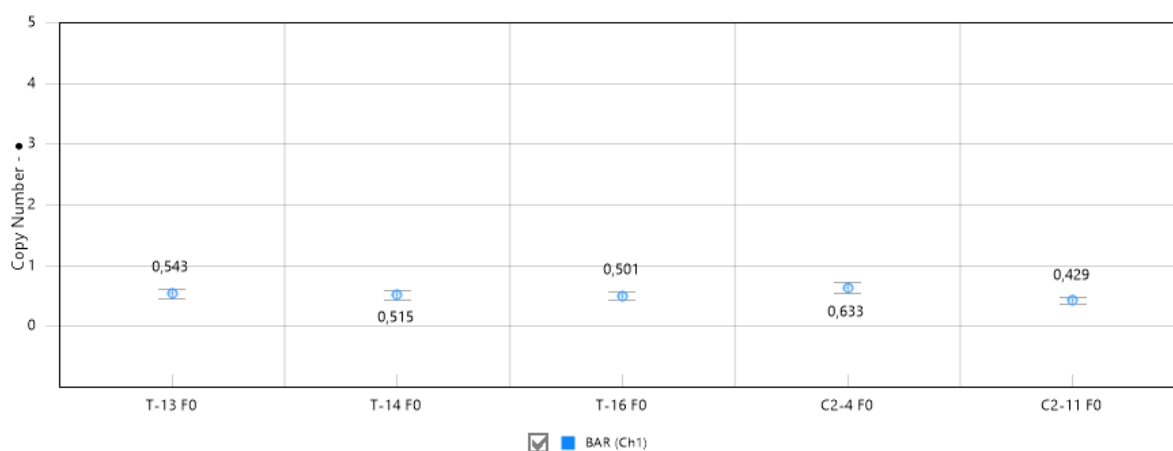


Fig. 48 Detección del número de copias del gen Bar en plantas VT401 transformadas por agroinfección.

Plantas B73 evaluadas en campo

Plantas B73 tolerantes a sequía que fueron evaluadas en campo, la detección del número de copias se realizó mediante la detección del promotor 35S por ddPCR de las líneas CIEA9-1 y CIEA9-2, estos resultados se pueden encontrar en el artículo anexo (**Supl. 1b artículo**).

8.4 Cuantificación de los niveles de expresión por RT-ddPCR

Se realizó la cuantificación de los niveles de expresión de CENH3 y TreAS como genes blanco y HMG como gen endógeno, en cada una de las plantas de las respectivas líneas y eventos de transformación, mediante el uso de RT-ddPCR por cuantificación absoluta.

Cuantificación por RT-ddPCR en plantas H99

Se observó en la mayoría de las plantas una disminución de los transcritos tanto de CenH3 como de Trehalasa (**Fig. 49 y 50**), pero con una mayor disminución en la construcción C1.

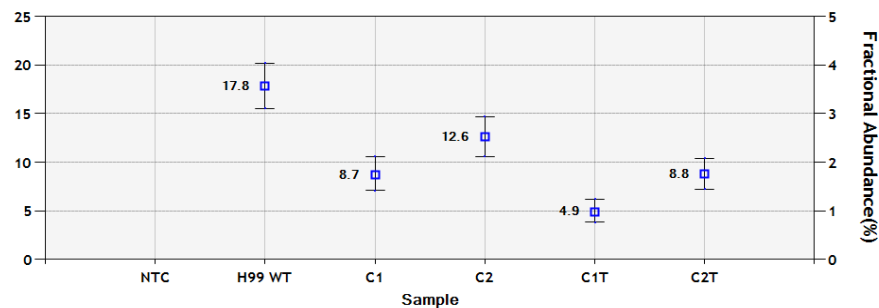


Fig. 49 Cuantificación de los niveles de expresión de CENH3 por RT-ddPCR en plantas H99 de cada construcción (Distribución de Poisson analizado por el software ddPCR).

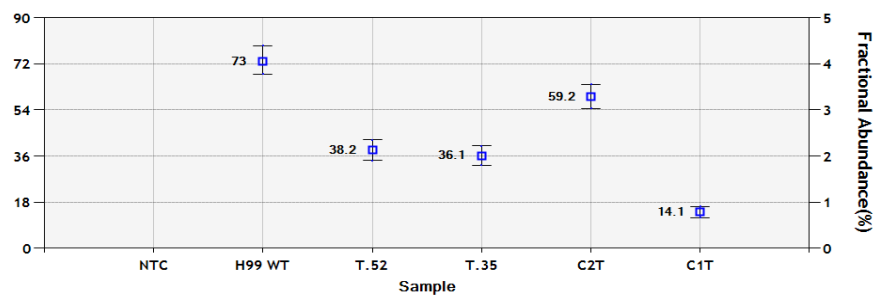


Fig. 50 Cuantificación de los niveles de expresión de TreAS por RT-ddPCR en plantas H99 de cada construcción (Distribución de Poisson analizado por el software ddPCR).

Cuantificación por RT-ddPCR en plantas H99XB73

En las plantas analizadas se observó una disminución de los transcritos tanto de CenH3 como de Trehalasa (Fig. 51 y 52), pero con una mayor disminución en la construcción C1 en la línea H99XB73, al igual que en plantas H99.

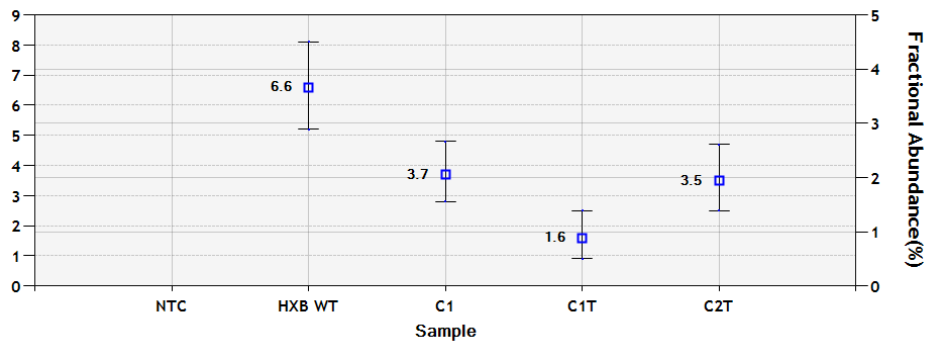


Fig. 51 Cuantificación de los niveles de expresión de CENH3 por RT-ddPCR en plantas H99XB73 de cada construcción (Distribución de Poisson analizado por el software ddPCR).

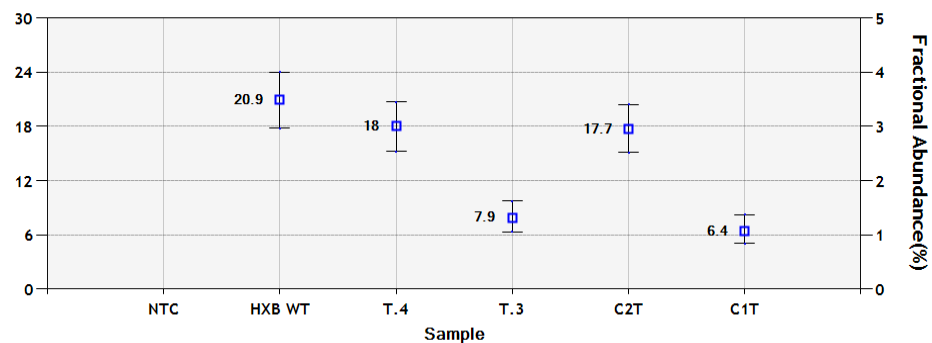


Fig. 52 Cuantificación de los niveles de expresión de TreAS por RT-ddPCR en plantas H99XB73 de cada construcción (Distribución de Poisson analizado por el software ddPCR)

Cuantificación por RT-ddPCR en plantas B73 evaluadas en campo

Plantas B73 tolerantes a sequía que fueron evaluadas en campo se cuantificó los niveles de RNA mensajero mediante la detección de Trehalosa por RT-ddPCR de las líneas CIEA9-1 y CIEA9-2, estos resultados se pueden encontrar en la información suplementaria de artículo anexo (Fig. 2a).

8.5 Análisis del ciclo celular

8.5.1 Citometría de flujo

El análisis por Citometría se realizó con el fin de detectar en que parte del ciclo celular se encuentra la mayoría de las células y si se observa alteraciones en la detección cuando se analizan en el citómetro, dado a que dicha modificación que se está realizando en la histona CENH3 específica de centrómero podría originar cambios en el ciclo celular y en los niveles de aploidía en las plantas genéticamente modificadas. Para la realización del análisis de Citometría de las plantas H99, H99XB73 y VT401, se usaron muestras de hojas jóvenes que fueron confirmadas que están transformadas.

Ciclo celular de plantas H99

El análisis del ciclo celular en la línea H99 (Fig. 53) permitió observar que la modificación en esta histona origina que las células se encuentren en un mayor porcentaje en G0/G1 respecto a las plantas controles (wt) y en la fase de Mitosis y fase S son las plantas wt las que tienen un mayor porcentaje de sus núcleos en esta fase.

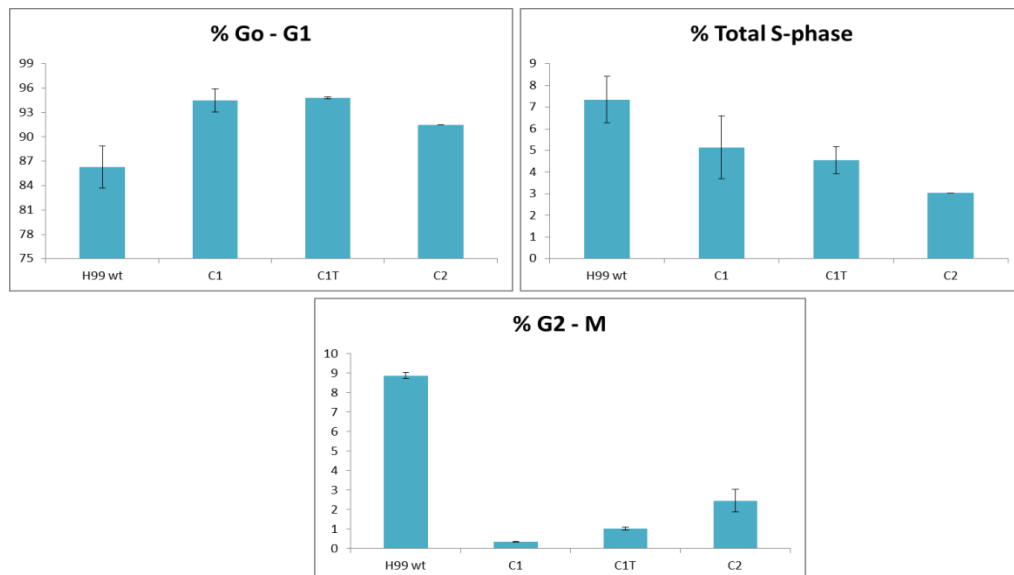


Fig. 53 Gráficas de ciclo celular por Citometría en plantas WT y en plantas H99 transformadas con C1, C2, Y C1+TreAS.

Ciclo celular de plantas H99XB73

En el caso del ciclo celular de las plantas de la línea H99 x B73 (**Fig. 54**) se observó un mayor proporción de núcleos transgénicos en G2/M respecto a wt, pero en el caso de la fase S las plantas controles (wt) tiene una mayor proporción respecto a las GM. También podemos decir que dependiendo del promotor de la construcción dependerá de la fase en la que se encuentren un mayor número de células.

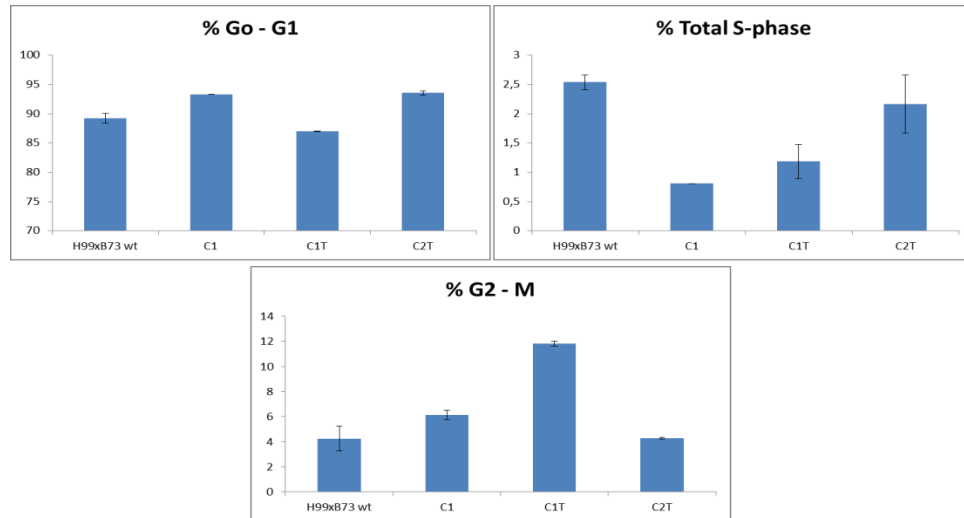


Fig. 54 Gráficas de Ciclo celular por Citometría en plantas WT y en plantas H99 x B73 transformadas con C1, C2, Y C1+TreAS.

Ciclo celular de plantas VT401

Con el análisis del ciclo celular en la línea VT401 (**Fig. 55**), pudimos observar que la modificación en esta histona origina que las células se encuentren en un mayor porcentaje en G0/G1 respecto a las plantas controles (wt) y que en la fase de Mitosis son las plantas wt las que tienen un mayor porcentaje de sus núcleos en esta fase al igual que en la fase S.

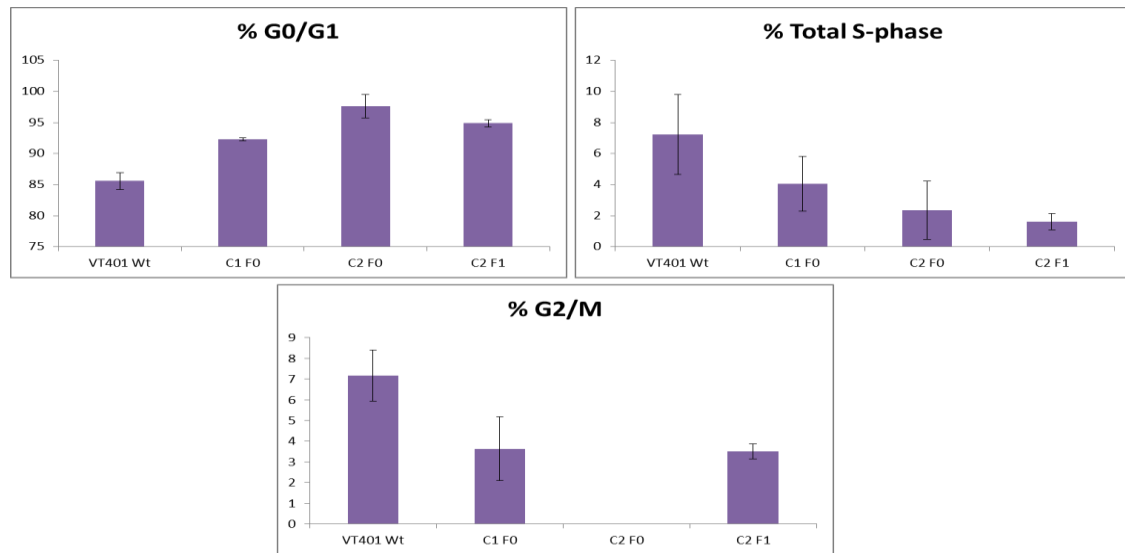


Fig. 55 Gráficas de Ciclo celular por Citometría en plantas WT y en plantas VT401 transformadas con C1, C2, Y C1+TreAS.

Algo interesante que encontramos al observar los histogramas de Citometría en relación del número de células en el eje Y respecto al eje X de la intensidad de fluorescencia que corresponde al contenido de DNA (**Fig. 56**) es que plantas F0 transformadas presentan un desplazamiento (menor) de fluorescencia (pico 1 de 70-90 y pico 2 de 140-180) respecto a las plantas Wt (pico 1 de 100-130 y pico 2 de 200-260) entre plantas H99 y VT401, que nos puede indicar que existe una disminución en el contenido de DNA, ya que en la progenie analizada de vt401 F1 donde observamos anteriormente en la detección del transgén al parecer no se hereda sino que la transformación *con Agrobacterium* es transitoria, en este análisis pudimos comprobar que dichas plantas tienen un desplazamiento (mayor) de la fluorescencia (pico 1 de 100 - 110 y pico 2 de 200 - 220) que las F0 y su histograma se traslapa con las silvestres, indicando que no hay afectación en el contenido de DNA y que este sistema nos permite evaluar de manera transitoria una construcción.

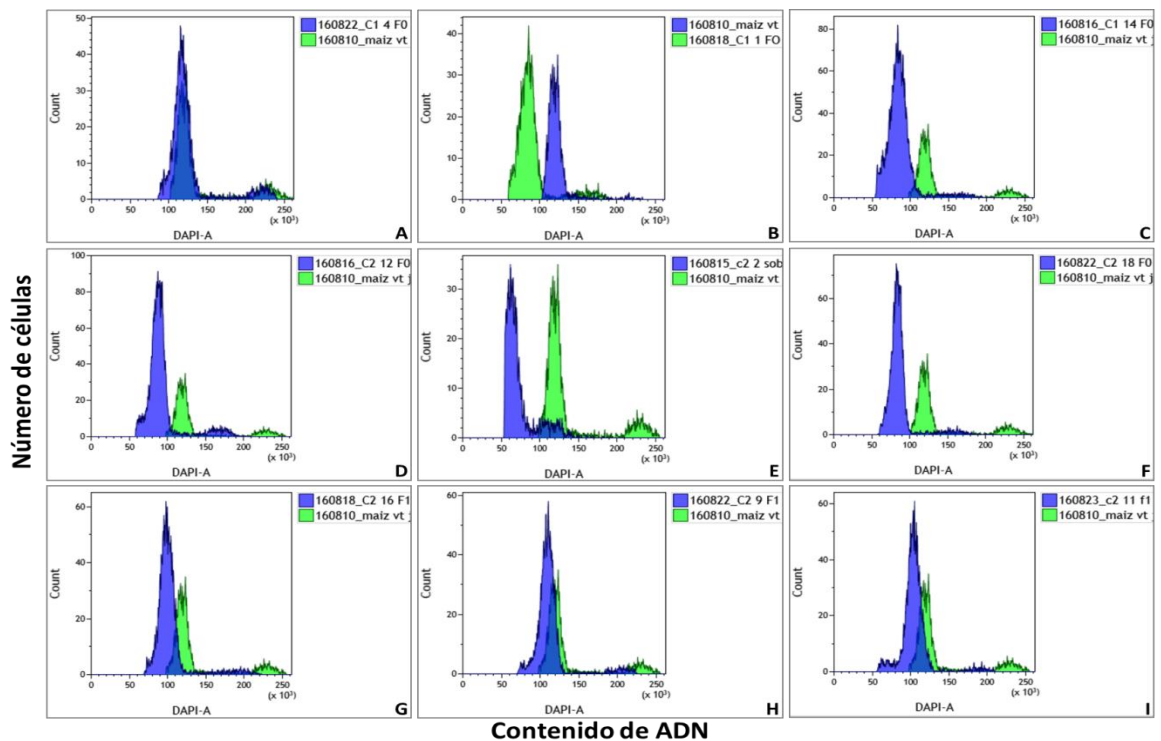


Fig. 56 Histogramas de Citometría de flujo

en relación del número de células (eje X) respecto a la intensidad de la fluorescencia (eje Y) que equivale al contenido de DNA en plantas C1/Wt y C2/Wt generación F0 y plantas C2/Wt generación F1, donde observamos un desplazamiento de la fluorescencia tanto en F0 como en F1 respecto a plantas Wt.

8.5.2 Análisis morfológico de meiocitos de anteras

Al realizar el análisis morfológico de granos de polen mediante la tinción por DAPI, se pudo observar que en las plantas F0 GM de las construcciones C1 y C2 presentan un tipo de colapso interno en el polen, observando un mayor efecto en plantas C1 (Fig. 57A), ya que en plantas C2 (Fig. 57B-C) encontramos tanto polen con colapso como uniforme; esto respecto a la comparación con el polen Wt que presenta una membrana gruesa y un contenido interno uniforme (Fig. 57F). En el caso de polen F1 de plantas C2 (Fig. 57D-E) este presenta características tanto a nivel externo como interno similar a polen Wt.

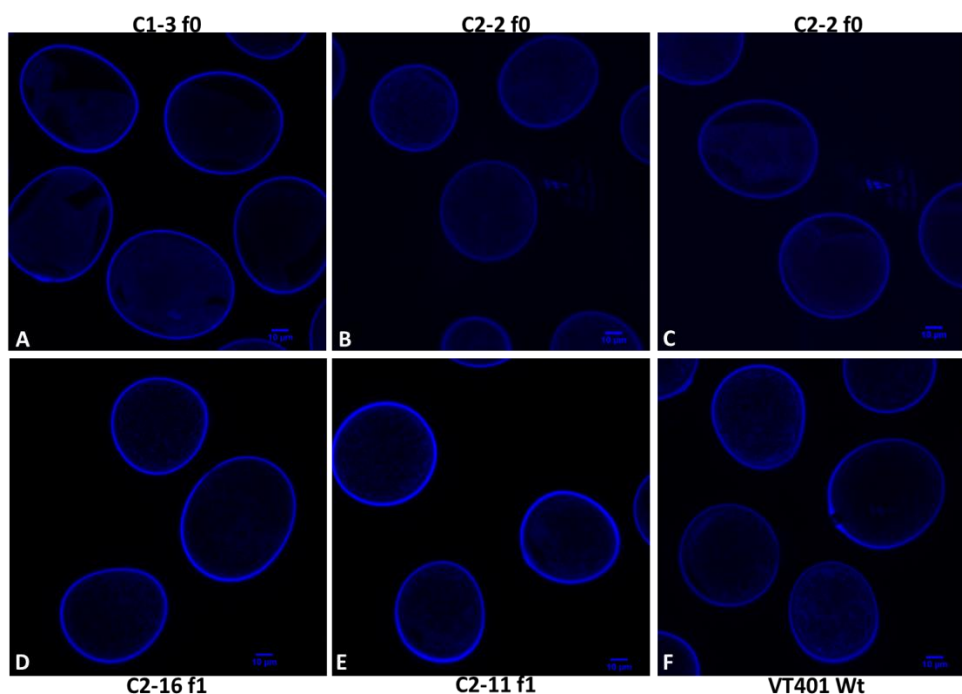


Fig. 57 Análisis comparativo por fluorescencia con DAPI (63x) de polen de plantas GM de las constricciones C1 (a), C2 (b-c) generación F0 y plantas C2 (d-e) generación F1 respecto a polen Wt (f).

8.5.3 Análisis morfológico y ciclo celular en raíz

Mediante la evaluación morfológicamente por tinción con DAPI usando microscopia confocal, se pudo observar que las plantas C1 (Fig. 58B,E) y C2 (Fig. 58C,F) presentaron un tamaño de la células y núcleos más pequeños respecto a plantas Wt (Fig. 58A,D) (observándolos tanto en el objetivo de 40X y 63X).

Respecto al análisis del ciclo celular (Fig. 59) obtenido mediante imágenes de las raíces a 40x, pudimos observar que plantas C1 tanto en metafase, anafase y telofase se puede detallar que tienen una distribución no equitativa del DNA y en plantas C2 igual en anafase y telofase se ve células con distribución no igualitaria, todo esto respecto a las células de las plantas Wt.

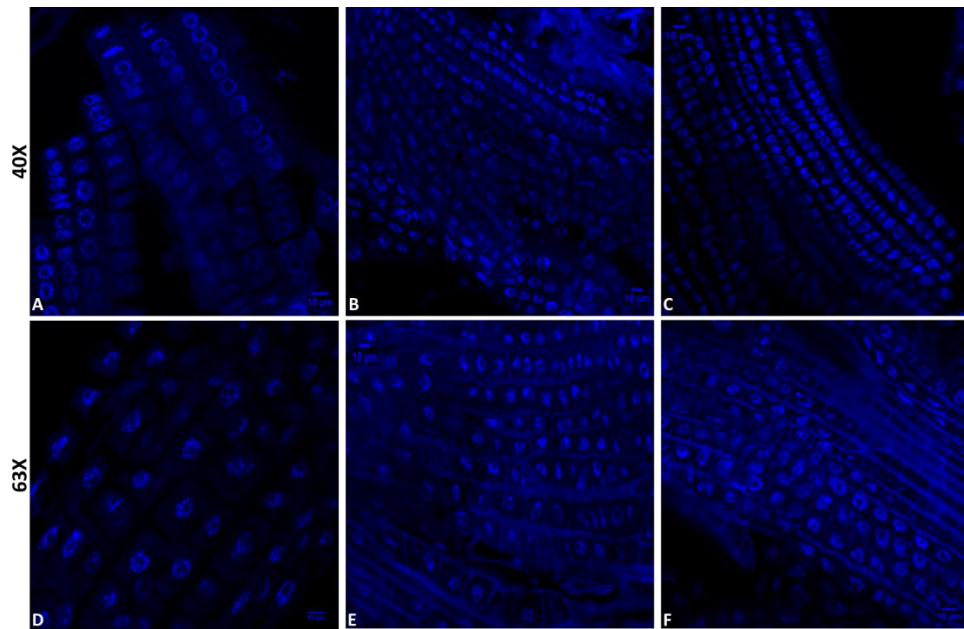


Fig. 58 Imágenes de núcleos de raíces teñidas con DAPI de plantas WT (A-D), C1 (B-E) y C2 (C-F) en objetivo 40X y 63x por medio de microscopia confocal SP8.

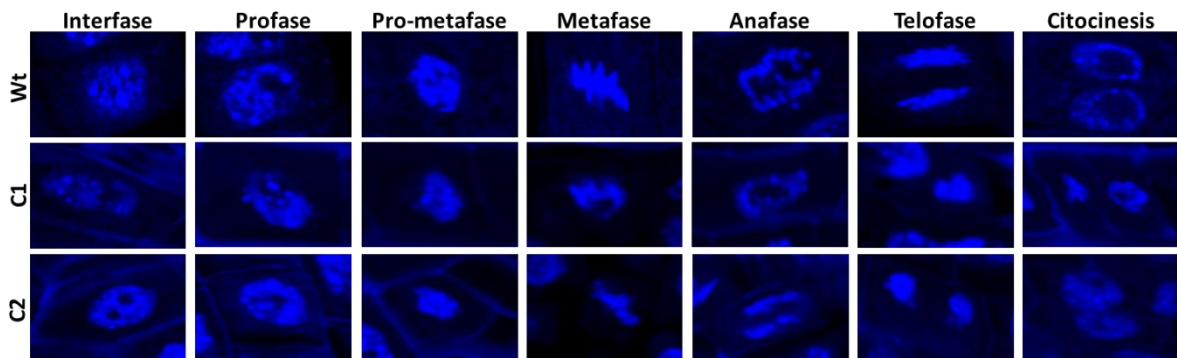


Fig. 59 Núcleos de raíces teñidas con DAPI de plantas WT, C1 y C2 en distintas fases mitóticas en objetivo 40X por medio de microscopia confocal SP8.

8.6 Análisis bromatológicos y toxicológicos de las plantas TreAS.

Los resultados obtenidos de plantas tolerantes a sequía por TreAS evaluadas en campo se encuentran en el artículo anexo (Fig. 6 del artículo).

8.7 Evaluación fisiológica, productividad y tolerancia a sequía en campo

Los resultados obtenidos de plantas tolerantes a sequía por TreAS evaluadas en campo se encuentran en el artículo anexo (Fig. 3,4,5 y Supl. 2,3 del artículo).

8.8 Cuantificación del contenido de trehalosa en plantas tolerantes a sequía.

Los resultados obtenidos de la acumulación de trehalosa en plantas tolerantes a sequía por TreAS evaluadas en campo se encuentran en el artículo anexo (Fig. 2b del artículo).

9. DISCUSIÓN

Diseño y Obtención de construcciones

Se sabe que el DNA centromérico es diverso en todas las especies, pero aun así todos los eucariotas cuentan con una histona específica de centrómero variante de H3. Al realizar el alineamiento de proteínas histona centroméricas H3 incluida la proteína CENH3 de maíz, se observó que la secuencia del N-terminal presentan una mayor variación, algunos autores sugieren que esto podría ser una indicación de que CENH3 en especial el N-terminal, están involucrados en la rápida evolución de esta histona en los organismos (Malik y Henikoff, 2001; Talbert y cols, 2002; Cooper y Henikoff, 2004). La secuencia restante de la proteína pertenece a un dominio conservado de proteínas de la familia de la histona H3.

También podemos comentar que la técnica de ensamble nos permite la obtención de un gen o una construcción completa de manera muy confiable y que se puede clonar en vectores de entrada y destino de la tecnología Gateway.

Transformación por biobalística de callos embriogénicos

El uso del sistema de transformación por biobalística en maíz fue reportado por Gordon-Kamm et al. (1990) y posteriormente fue usado para la transformación de distintos tejidos, embriones cigóticos inmaduros y callos embriogénicos, de este último los más eficientes para la transformación son los tipo II que se caracterizan por ser friables y de rápido crecimiento (Armstrong and Green, 1985), aunque no se puede inducir este tipo de callo es todos los germoplasma, pero en el caso variedades Hi-II (A188XB73 o H99Xb73) presentan una mayor facilidad de inducción de este tipo de callos (Armstrong y cols. 1991).

Respecto al porcentaje de regeneración obtuvimos un rango del 5.5 al 20% cabe resaltar que esto depende del fenotipo y el tipo de construcción que se evalué, ya que Wang en 1987 obtuvo solo un porcentaje del 4-5% usando B73 y Mon17 contrario a Huang and Wei (2004) que obtuvieron un rango del 19.8 al 32.4 % pero usando 7 líneas distintas a la de nosotros y sin transformar solo evaluando la

obtención de callos y la eficiencia de regeneración. Trabajos donde si se transforman callos presentaron un rendimiento general de regeneración del 42.2 como el de El-Itribi et al. 2003, el cual es similar al rendimiento general que obtuvimos en el proceso de regeneración del 48.86%.

Transformación de semillas de maíz con *A. tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens ofrece la capacidad de transferir segmentos de DNA grandes (Hamilton et al., 1996), bajo número de copias y alta eficiencia (Ishida y cols, 1996) con una mayor facilidad de transformación en dicotiledones, aunque también se puede usar con monocotiledonas. *Agrobacterium* se usa especialmente para transformaciones estables como es el caso en *Arabidopsis thaliana* por floral dip o en embriones inmaduros de maíz, trigo y entre otros. En nuestro trabajo se implementó un sistema de transformación no estable mediante la agroinfección de semillas en germinación, esto nos permite tener un método rápido y eficaz para la evaluación de la función de un gen y en nuestro caso nos permite evaluar de manera más rápida el desarrollo vegetativo y efecto del gen, pero también permite evaluar la actividad bioquímica, localización subcelular, como lo reporta Li y cols, 2009, al realizar este tipo de transformación en plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

Con este sistema pudimos seleccionar plantas de 3 a 4 semanas de edad mediante el uso del herbicida glufosinato de amonio de manera cualitativa y así discriminar entre las que no se transformaron y proseguir a los análisis moleculares. Cabe resaltar que no se observaron diferencias muy notorias fisiológicamente en las plantas con cada construcción C1, C2 y TreAS, excepto que las plantas C1 que presentaron un crecimiento más reducido que las otras y se tuvo una eficiencia muy alta de transformación.

Detección del transgen por PCR en plantas H99 y H99XB73 transformadas por biobalística

Mediante el uso de oligos específicos para la detección de Bar en plantas C1, C2, C1TreAS y C2TreAS podemos discriminar entre plantas positivas y negativas si se

llegara a presentar fugas el sistema de selección in vitro. Los oligos usados para detectar Tnos solo se puede usar para la detección de la construcción TreAS ya que el gen Bar presente en las construcciones C1 y C2 cuentan también con el Tnos.

Al lograr la detección de las respectivas construcciones en las plantas transformadas por biobalística, pudimos calcular una eficiencia de transformación del sistema del 34.39%, siendo nuestro valor más alto al reportado por Framer y cols, 2000, que transformaron callos embriogénicos por biobalística y usaron también partículas de oro de tamaño del 0.6 μm . Por otra parte Wright y cols, 2001 obtuvieron una eficiencia del 45% usando también callos embriogénicos y como agente de selección Bialafos, pero podemos decir que también la eficiencia de transformación depende de lo que evaluamos y el efecto que esto puede tener en la plantas.

Detección del transgen por PCRpf en plantas VT401 transformadas con *Agrobacterium*.

Para la detección de los transgenes en la transformación por *Agrobacterium* se utilizaron oligos para el gen Bar en las construcciones C1, C2 y TreAS, que nos permitió determinar la eficiencia de transformación transitoria de 39.33%. Respecto a esta eficiencia no la podemos comparar con un sistema similar, ya que el único reporte similar pero en dicotiledóneas fue el trabajo de Li y cols, 2009, los cuales no reporta la eficiencia por planta sino una eficiencia por célula del cotiledón (50%). Por otro lado si comparamos la esta eficiencia con el uso de *Agrobacterium* en la transformación de embriones inmaduros de maíz, podemos decir que los rangos varían según la variedad como A634, H99, A188 y V177 del 15 al 50%, Hi-II (A188xB73) del 5.5% al 45% (Ishida y cols, 2007, Zhao y cols, 2002; Frame y cols, 2002).

Detección del transgen por PCRpf en plantas B73 evaluadas en campo

Se logró detectar el promotor 35S de plantas transformadas con TreAS que estaban en la Línea de maíz B73, que fueron usadas para la evaluación de tolerancia a sequía en invernadero y en campo (Para mayor información ver artículo anexo).

Número de copias y niveles de expresión por ddPCR en plantas transformadas

La detección de una sola copia por genoma tanto en plantas obtenidas por Biobalística como *Agrobacterium*, permite dilucidar que aunque por medio de la transformación por biobalística donde podemos tener una mayor probabilidad de obtener más de una inserción a diferencia de *Agrobacterium* que se caracteriza por generar bajo número de copias, nuestros dos sistemas utilizados nos permitió obtener una sola copia y así poder evaluar los efectos en los niveles de expresión de los transcritos, encontrando una disminución de los niveles de expresión en las plantas H99 del 30% al 72% en CENH3 y del 19% al 80% en TreAS; en plantas H99xB73 del 44% al 76% en CENH3 y del 14% al 69% en TreAs. Estos niveles de expresión permiten evaluar el efecto de las modificaciones de los genes en los distintos niveles de expresión sin que exista una inactivación génica, ya que contienen una sola copia por genoma. En plantas VT401 no se realizó la medición de los niveles de expresión porque al ser una transformación transitoria no se vio relevante esta medición.

En el caso de plantas B73 que tienen en el transgén de TreAS, la línea CIEA9-1 presentó una sola inserción por genoma y en el caso de la línea CIEA9-2 esta presentó 2 inserciones por genoma (Para mayor información ver el artículo anexo).

Análisis del ciclo celular por Citometría de flujo

Nuestros análisis muestran que el comportamiento de las células de plantas genéticamente modificadas respecto al número de células que están en las diferentes fases del ciclo celular varía de acuerdo al promotor que dirige la expresión del gen y también el comportamiento en el ciclo celular está regido por la modificación en el gen CENH3. En las diferentes interfaces del ciclo celular, las plantas genéticamente modificadas presentaron un mayor número de células en la fase G1 respecto a las plantas WT, esto se puede deber a que la fase G1 es el primer punto de control de la célula que permite que se continúe con el proceso de división, y en las fases S y G2 presentó Wt un mayor número de células, que nos puede indicar que la alteración en el gen CEH3 afecta el proceso del ciclo celular y

en especial las construcciones que tienen el promotor 35S-CaMV. Según Lermontova y cols, 2006 y 2007, comprobaron que la histona CENH3 se sintetiza y ensambla en el cinetocoro en la fase G2, de igual manera se encontró que la histona CENH3 en células HeLa la síntesis ocurre en la fase G2 y al restringir la fase S, se impide el ensamblaje del cinetocoro (Shelby y cols, 2000) y a diferencias de las otras histonas que se expresan antes en la fase S, ya que la formación del cinetocoro se inicia por la sustitución de la histona H3 por CENH3 en los centrómero pero no en todos los nucleosomas centromérico, esto puede originar que en la fase G2 a M se encuentren un menor número de células respecto a células sin modificar.

De igual manera, al analizar los histogramas obtenidos por Citometría, se evidenció que la eliminación del N-terminal de CENH3 origina un nivel de haploidia en plantas genéticamente modificadas por *Agrobacterium* ya que se observa un corrimiento de los picos de 2N (70-80) Y 4N (140-160) respecto a plantas silvestres que tienen picos 2N (130) Y 4N (260), efecto similar al que observaron Kelliher y cols, 2016, donde hicieron el cambio de algunos aminoácidos conservando la misma cantidad de aminoácidos en el N- terminal o el cambio del N-terminal por el de la histona H3 en plantas de maíz NP2222 F1 cruzadas con Wt. Observaron que se origina un 3,6% de haploidia, determinada también mediante Citometría (esta aploidia fue dada por el cambio del N-terminal por el H3). De igual manera Ravin y Chan en el 2010 produjeron líneas de plantas de Arabidopsis donde cambiaron el N-terninal de CENH3 por la de la histona H3, que al ser cruzadas con polen de plantas Wt, observaron que se generaba un 30% de haploides androgénicas en donde el genoma paterno es eliminado y me mantenía la información materna. Esto podría estar dado por que se reducía la unión del cinetocoro al huso, llevando a la eliminación de estos por fragmentación de los cromosomas y formación de micro núcleos durante la mitosis.

Es de aclarar que nosotros no realizamos una medición del porcentaje de haploidía dado que no pudimos evaluar la generación F1 de plantas transformadas por biobalística y en la F0 donde se observó la haploidía fue en plantas transformadas de manera transitoria con *Agrobacterium*. Pero los resultados obtenidos nos puede indicar que la no obtención de progenie puede estar dada a una alta tasa de aborto

de los embriones posiblemente dada por una inestabilidad de los cromosomas al presentar una disminución de la expresión de CENH3 (esto obtenido por RT-ddPCR). Zhang y cols, 2008 encontraron que la producción de dobles haploides se caracteriza por el alto índice de abortos de embriones dado a inestabilidad de los cromosomas durante el desarrollo del endospermo y del embrión.

Análisis morfológico de meiocitos de anteras

Al realizar la observación de meiocitos de anteras de plantas genéticamente modificadas con las dos construcciones de CENH3 por microscopia confocal, se observó una especie de colapso interno en el polen, ya que no se ve una señal homogénea del DAPI a comparación con plantas Wt; esto nos puede hacer pensar que el efecto observado en plantas con transformación transitoria es una evidencia de que la mayor frecuencia de inducción de haploidía en maíz puede ser ginogénico (Ravin y Chan, 2010; Kelliher y cols, 2016) donde los cromosomas masculinos son eliminados y los femeninos son mantenidos, esto si pensamos en el resultado obtenido por citometría. También nos puede indicar que existe una alta tasa de esterilidad tanto masculina como femenina ya que en plantas obtenidas por biobalística la tasa de obtención de progenie fue muy baja tanto en plantas polinizadas por polen Wt o transgénico (eliminación del N-terminal), ya que Ravin y Chan (2010) reportaron que al realizar una alteración (reemplazo N-terminal) de CENH3 en *Arabidopsis* obtenían una alta tasa de esterilidad pero que conllevaba a alta frecuencia de haploidía, cuyo comportamiento puede ser solo efectivo en *Arabidopsis*, porque Kelliher y cols, 2016 al realizar este tipo de modificaciones (reemplazo N-terminal) en maíz la tasa de obtención de haploides fue baja y en nuestro caso donde realizamos la eliminación del N-terminal que podría generar una mayor tasa de haploidía pero al mismo tiempo una alta frecuencia de esterilidad.

Análisis morfológico y ciclo celular en raíz

Mediante el análisis del ciclo celular en raíz de plantas VT401 transformadas transitoriamente pudimos observar un cambio en el tamaño de las células de raíz respecto al a plantas Wt, así mismo al observar distintas fases del ciclo no se vio una clara definición de la distribución del material genético en la fase de anafase y

telofase respecto al control. Se recomienda usar una marca específica de centrómero para poder visualizar mejor los cromosomas y su distribución durante la mitosis en raíz.

Análisis bromatológicos y toxicológicos

Los resultados no evidenciaron cambios a nivel bromatológico en plantas de maíz B73 modificadas con TreAS ni causaron efectos toxicológicos en el consumo de granos de maíz en ratones que estuvieron suplementando su alimentación con maíz GM (Para mayor información ver artículo anexo).

Evaluación fisiológica, productividad y tolerancia a sequía en campo

Plantas de maíz GM con TreAS evaluadas en campo presentaron un desarrollo fisiológico mayor a plantas B73 wt aun bajo condiciones de sequía tanto en campo como en invernadero. Estas tuvieron una respuesta similar a la obtenida en invernadero, ya que también presentaron una floración temprana y esta es una característica agronómica deseable en cualquier tipo de cultivo. Por otra parte cuando las plantas son sometidas a diferentes niveles de sequía presentan una mayor productividad respecto a plantas control, lo que significa que el uso de RNA antisentido de trehalasa es efectivo para brindarles a las plantas tolerancia a bajos niveles de suministro de agua y que aun bajo este estrés las plantas son capaces de seguir con la producción de maíz (Para mayor información ver artículo anexo).

Cuantificación del contenido de trehalosa en plantas tolerantes a sequía

La evaluación del contenido de trehalosa evidenció una mayor acumulación de este disacárido en las dos líneas CIEA9-1 y CIEA9-2 de plantas tolerantes a sequía aun en condiciones de riego como en condiciones de bajos niveles de agua, lo que nos demuestra que si es la acumulación de trehalosa lo que origina en las plantas la tolerancia a sequía y que esta acumulación está directamente relacionada con la disminución de los niveles de expresión de la enzima trehalasa (Para mayor información ver artículo anexo).

10. CONCLUSIONES

- Mediante el uso de las líneas de maíz H99 y H99xB73 se puede obtener callos embriogénicos para la transformación por biobalística con una alta tasa de transformación.
- El uso de un sistema de transformación transitorio de maíz permite obtener una evaluación rápida del efecto de una modificación.
- Al observar una disminución de los transcritos de CENH3 y TreAS nos indica que la función de este gen si se ve afectada por las construcciones utilizadas sin observar una diferencia entre el promotor usado y la disminución de los niveles de expresión.
- Al evaluar el ciclo celular mediante citometría de flujo en plantas transformadas por biobalística y agroinfección permitió observar un porcentaje mayor de células en G2-G1 y menor en la fase G2/M, respecto a las plantas controles que están en mayor porcentaje en esta fase; que nos indica que posiblemente en maíz la histona CENH3 se carga en la fase G2 del ciclo celular por lo que no permite el paso de muchas células a la fase M como lo han reportado en otros organismos.
- El análisis de los histogramas obtenidos por citometría de flujo de plantas VT401 agroinfiltradas mostraron un desplazamiento de los picos respecto a plantas control, indicando que se genera un nivel de aploidia que no es heredado en la progenie, ya que estas presentan un restablecimiento del valor de los picos comparado con plantas Wt.
- La inducción de haploidia al realizar un remplazo del N-terminal por el de la histona H3 en *Arabidopsis* y maíz es del 9% al 3% respectivamente (Ravin y Chan, 2010; Kelliher y cols, 2016), esta eficiencia de haploidía pudo deberse a que este cambio en CENH3 aun permite seguir llevando a cabo la función de segregación de los cromosomas, pero en nuestro caso al realizar la eliminación del N-terminal genera una alteración en esta histona fundamental para la correcta segregación de los cromosomas.
- Al evaluar el ciclo celular en raíces de maíz transformadas se puede observar que en las fases de segregación de los cromosomas existe una fluorescencia con

distribución no homogénea en la distribución del material genético respecto al control que indican un desequilibrio en el ensamble del huso mitótico para llevar a cabo la segregación.

- La cuantificación de trehalosa en plantas con RNA antisentido de trehalasa, demostró una mayor acumulación tanto en condiciones de humedad como en sequía respecto a plantas control.
- Plantas modificadas con TreAS no evidencian cambios sustanciales a nivel nutricional ni toxicológico, demostrando que esta modificación no altera la seguridad para el consumo humano.
- Plantas de maíz tolerante a sequía crecido en campo bajo distintas condiciones de riego evidenciaron que aun bajo condiciones no controladas dichas plantas presentan una alta tolerancia a sequía, que permite ver la factibilidad del uso de estas plantas en la agricultura.
- El análisis fenológico en campo indicó que las plantas GM presentan aparición temprana de estigmas e inflorescencia femenina respecto a plantas control, originando una ventaja agronómica aún al ser sometidas a estrés hídrico ya que pueden ser productivas y acortar su ciclo reproductivo.

11. PERSPECTIVAS

- La evaluación del conteo de cromosomas por microscopía confocal puede darnos una explicación del desplazamiento observado en los histogramas obtenidos por citometría y así poder concluir si se genera aploidía.
- Se podría optar por la implementación de uso de la técnica SNPs (single nucleotide polymorphism) en el dominio N-terminal de la histona CENH3 para evaluar la inducción de haploidía sin la necesidad del reemplazo o eliminación de este dominio para la obtención de plantas haploides, así como lo logro Karimi-Ashtiyani y cols, 2015 y Kuppu y cols, 2016 en plantas de *Arabidopsis*.
- El Polen de plantas transformadas evidenciaron una morfología distinta al compararlo con polén Wt, por lo que sería adecuado realizar una evaluación de la viabilidad del polen de dichas plantas, para conocer la tasa de esterilidad originada por estos cambios genéticos y análisis más específicos de morfología y de contenido de almidón.

12. REFERENCIAS

Allen M. y Ingram W. (2002) Constraints on future changes in climate and the hydrological cycle. Nature Publishing Group 419:224-232.

Avonce N., Leyman B., Mascorro-Gallardo J.O., Van Dijck P., Thevelein J.M. y 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.

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

Armstrong C.L.; Green C.E. y Phillips R.L (1991) Development and availability of germplasm with high Type II culture formation response. Maize Genetics Cooperative New sletter 65:92–93.

Blower M.D., Daigle T., Kaufman T. y Karpen G.H. (2006) *Drosophila* CENP-A mutations cause a BubR1-dependent early mitotic delay without normal localization of kinetochore components. PLoS Genetics 2:1025-1033.

Cabib E. y Leloir L.F. (1957) The biosynthesis of trehalose phosphate. Journal of Biological Chemistry 231:259-275.

Cabrera-Ponce JL, López L, Assad-Garcia N, Medina-Arevalo C, Bailey AM and Herrera-Estrella L (19987) An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Plant Cell Reports 16: 255–260.

Chan, Simon (2010) Chromosome engineering: power tools for plant genetic. Cell press. 18, 605-610.

Colaco C., Sen S., Thangavelu M., Pinder S. y Roser B. (1992) Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. Biotechnology 10:1007-1111.

Cooper J.L., and Henikoff S. (2004) Adaptive evolution of the histone fold domain in centromeric histones. Mol. Biol. Evol. 21: 1712–1718.

Cortina C. y Culiáñez-Macia F. (2005) Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. Plant Science 169:75 – 82.

Crowe J.H., Crowe L.M. y Chapman D. (1984) Preservation of membrane in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. Plant Science 223:701–703.

Crowe L.M.; Crowe J.H.; Oliver A.E.; Tsvetkova N.; Wolkers W. y Tablin F. (2001) The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology* 43:89-105.

Díaz C. y Antón D. (2002) Sequía en un mundo sin agua. Edición en línea. CIRA-UAMEX. México. <http://www.cosmovisiones.com>. Consultado el 20 de febrero 2017.

Earnshaw W. y Rothfield N. (1985) Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma (Berl)* 91:313-321.

Elbein A.D. y Mitchell M. (1974) Effects of polyanions and polycations on the trehalose phosphate synthetase of *Mycobacterium smegmatis*. *Carbohydrate Research* 37:223-238.

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

Framer B., Zhang H., Cocciolone S., Sidorenko L., Dietrich C., Pegg S.E., Zhen S., Schnable P. y Wang K. (2000) Production of transgenic maize from non-barded type II callus: effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36:21-29.

Frame B., Shou H., Chikwamba R.K., Zhang Z., Xiang C., Fonger T.M., Pegg S.K., Li B., Nettleton D.S., Pei D., y Wang K. (2002) *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation of Maize Embryos Using a Standard Binary Vector System. *Plant Physiol.* 129: 14-22.

Finch R. A. (1983) Tissue-specific elimination of alternative whole parental genomes in one barley hybrid. *Chromosoma* 88:386-393

FIRA (2015) Panorama agroalimentario Maíz. Extraído de www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61952/Panorama_Agroalimentario_Ma_z_2015.pdf

Forster B., Heberle-Bors E., Kasha K. y Touraev A. (2007) The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Sci.* 12:368-375.

Freeling M. y Walbot V. (1993) *The Maize Handbook*. Editorial Springer. Capítulo 66: 432-441 pp

Freire M. (2003) Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotechnología vegetal* 3:195-209.

Galarza J., Miramontes U., Muñoz D. y Hernández G. (2004) Situación actual y perspectivas del maíz en México. Sitio Web: <http://www.campomexicano.gob.mx>.

Gámez A., Cabrera J., Herrera L., Hernández L. y Montes de Oca R. (2004) Mejora del crecimiento de plantas de tabaco mediante la inhibición del gen de la trehalasa. *Ciencia UANL* 7:483-4

Garg A., Kim J., Owens T., Ranwala A., Choi Y., Kochian L. y Wu R. (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:15898–15903.

George E., Hall M. y De Klerk G. (2008) *Plant propagation by tissue culture*. Editorial Springer, pp1–28.

Gibson R.P. (2007) Molecular basis for trehalase inhibition revealed by the structure of trehalase in complex with potent inhibitors. *Angewandte Chemie.* 46:4115 –4119.

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

Goshima G., Kiyomitsu T., Yoda K. y Yanagida M. (2003) Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *Cell Biology* 160: 25–39

Guo B., Song Y., Guo X., Wang W. y Ding N. (2010) Inhibition of gene expression of trehalase enhances drought resistance in transgenic tobacco. 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering.

Hamilton C.M., Frary A., Lewis C., Tanksley S.D. (1996) Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9975–9979

Harp J.M., Hanson B.L., Timm D.E. y Bunick G.J. (2000) Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 Å resolution. *Biological Crystallography* 56: 1513-1534.

Holmström K.O., Mäntylä E., Welin B., Mandal A., Palva E.T. y Tunnela O.E. *et al.*, (1996) Drought tolerance in tobacco. *Nature* 379:683-684.

Howman E., Fowler K., Newson A., Redward S., MacDonald A., Kalitsis P. y Choo A. (2000) Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci* 97:1148–1153.

Horlacher R., Uhland K., Klein W., Ehrmann M. y Boss W. (1996) Characterization of a cytoplasmic trehalase of *Escherichia coli*. *Journal Bacteriol.* 178:6250-6257.

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

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

Iturriaga G., Suárez R. y Nova-Franco B. (2009) Trehalose metabolism: from smoprotection to signaling. *Int. Journal Molecular Sciences* 10:3793-3810.

Jaffé W. y Rojas M. (1994) "Maize Hybrids in Latin America: Issues and options. *Biotechnology and Development Monitor*, No.19, p.6-8.

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

Karim S., Aronsson H., Ericson H., Pirhonen M., Leyman B., Welin B., Mäntylä E., Palva T., Van Dijck P. y Holmström K. (2007) Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalosa. *Plant Molecular Biology* 64:317-386.

Karimi M., Inzé D. y Depicker A. (2002) Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7(5): 193-195.

Karimi-Ashtiyani R., Ishii T., Niessen M., Stein N., Heckmann S., Gurushidze M., et al. (2015) Point mutation impairs centromeric CENH3 loading and induces haploid plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112:11211–11216.

Kelliher T., Starr D., Wang W., McCuiston J., Zhong H., Nuccio M. y Martin B. (2016) Maternal Haploids are preferentially Induced by CENH3-*tailswap* transgenic complementation in maize. *Front Plant Sci* 7: 414.

Kendall E.J., Adams R.P. y Kartha K.K. (1990) Trehalase activity in plans tissue cultura. *Phytochemistry* 29:2525-2528.

Kuppu S., Tan E.H., Nguyen H., Rodgers A., Comai L., Chan S.W.L., et al. (2015) Point mutations in centromeric histone induce post-zygotic incompatibility and uniparental inheritance. *PLoS Genet.* 11:e1005494.

Laurie D. y Bennett M.(1989) The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat x maize crosses. *Genome* 32:953–961.

León C. y Rodríguez R. (2010) El cultivo del maíz, temas selectos II. En: Capítulo 1, Importancia del maíz en mesoamerica a partir de las representaciones prehispánicas, Mera O.L. y Caballero N.J. Ed. Mundi-prensa México, pp 1-14.

Lermontova I., Schubert V., Fuchs J., Klatte S., Macas J. y Schubert I. (2006) Loading of *Arabidopsis* centromeric histone CENH3 occurs mainly during G2 and requires the presence of the histone fold domain. *The Plant Cell* 18:2443-2451.

- Lewin B. (2008) GENES IX. Editorial Mc Graw Hill. Pp 757-795.
- Li J.F., Park E., von Arnim A.G., Nebenführ A. (2009) The FAST technique: A simplified Agrobacterium-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of Arabidopsis and other plant species. Plant Methods 5: 6.
- Lins R.D., Pereira C.S. y Hunenberger P.H. (2001) An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. Trends in Plant Science 65:510-513.
- Loyola-Vargas V. y Vázquez-Flota F. (2005) Methods in molecular biology: Plant cell culture protocols. Editorial human Press 318:3-9.
- Malik H.S. y Henikoff S. (2003) Phylogenomics of the nucleosome. Nat. Struct. Biol. 10: 882–891.
- Malik H.S. y Henikoff S. (2001) Adaptive evolution of Cid, a centromere-specific histone in Drosophila. Genetics 157: 1293– 1298.
- Maniatis T., Fritsch E.F. y Sambrook J. (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Marimuthu M., Jolivet S., Ravi M., Pereira L., Davda J., Cromer L., Wang L., Nogué F., Chan S., Siddiqi I. y Mercier R. (2011) Synthetic clonal reproduction through seeds. Science 331: 876-878.
- Martínez-Gómez M.I., Gaytán-Bautista R., Reyes-Muro L., Mayek-Pérez N., Padilla-Ramírez J.S. y Luna-Flores M. (2006). Rentabilidad de las generaciones f1, f2 y f3 de híbridos de maíz. Agrociencia 40: 677-685.
- Maruta K., Hattori K., Nakada T., Kubota M., Sugimoto T. y Kurimoto M. (1996) Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from Rhizobium sp. Q36. Bioscience Biotechnology Biochemistry 60:717–20
- Mascorro-Gallardo J.O., Avonce N. y Iturriaga G. (2005) Biotecnológica de la trehalosa en las plantas. Revista Chapingo Serie Horticultura 11:193-202.
- Miranda J., Avonce N., Suárez R., Thevelein J., Dijck P., y 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.
- Monen J., Maddox P., Hyndman F., Oegema K., y Desai A. (2005) Differential role of CENP-A in the segregation of holocentric C. elegans chromosomes during meiosis and mitosis. Nature cell biology 7: 1248-1255.
- Monneveux P. y Belhassen E. (1996) The diversity of drought adaptation in the wide. Plant Growth Regulation 20:85-92.
- Müller J., Boller T. y Wiemken A. (1995) Trehalose and trehalase in plants: recent developments. Plants Sciences 112:1-9.

Müller S. y Almouzni G. (2017) Chromatin dynamics during the cell cycle at centromeres. *Epigenetics* 18: 192-208.

Murashige T and Skoog F (1962) A revised Medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia plantarum*. 15: 473–497.

Nagaki K., Terada K., Wakimoto M., Kashiwara K. y Murata M. (2010) Centromere targeting of alien CENH3s in Arabidopsis and tobacco cells. *Chromosome Research* 18:203–211.

Paiva C.L.A. y Panek A.D. (1996) Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotechnol. Annual Review* 2:293-314.

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

Parry M.A.J., Flexas J. y Medrano H. (2005) Prospects for crop production under drought: research priorities and future directions. *Annals of applied biology* 147:211–226.

Paul M., Primavesi L., Jhureea D. y Zhang Y. (2008) Trehalose metabolism and signaling. *The annual review of plant biology* 59:417–41

Pingali P.L. y Pandey S. (2000) Meeting world maize needs: technological opportunities and priorities for the public sector. *CIMMYT 2000 World Maize Facts and Trends*, pp 1-9.

Producción mundial de maíz cosecha 2015-2016. Extraído de www.produccionmundialdemaiz.com

Ravi M. y Chan S. (2010) Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* 464(7288): 615–618.

Ravi M., Kwong P.N., Menorca R.M., Valencia J.T., Ramahi J.S., *et al.*, (2010) The rapidly evolving centromere-specific histone has stringent functional requirements in Arabidopsis thaliana. *Genetics* 186: 461–471.

Ravi M., Shibata F., Ramahi J.S., Nagaki K., Chen C., Murata M. y Chan S.W. (2011) Meiosis-specific loading of the centromere-specific histone CENH3 in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.* 7:1-16.

Riechmann J.L. y Wellmer F. (2014) Flower Development. *Methods and protocols*. Humana Press. Capítulo 7, 157-189 pp.

Rimmeles M. y Boss W. (1994) Trehalose-6-phosphate hydrolase of *Escherichia Coli*. *Journal Bacteriol.* 176:5654-5664.

Rodríguez A., Suárez R., Caballero J. y Iturriaga G. (2009) Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. FEEMS Microbiology letter 296:52–59.

Romero C., Belles J., Vaya J., Serrano R. y Culianez-Macia F. (1997) Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. Planta 201: 293 – 297.

Ruzin S.E (1999) Plant microtechnique and mycroscopy. Oxford University Press pp 102-116.

Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press Vol. 2.

Sanford J, Smiih F and Russell J (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. Methods in enzymology 217:483-509.

Sanei M., Pickering R., Kumke K., Nasuda S. y Houben A. (2011) Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. Proc Natl Acad Sci 1-8

Schick I., Haltrich D. y Julb K.D. (1995) Trehalose phosphorylase from pichia fermentans and its role in the metabolism of trehalosa. Applied Microbiology Biotechnology 43:1088-1095.

Shelby, R.D., Monier, K., and Sullivan, K.F. (2000). Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication. J. Cell Biol. 151, 1113–1118.

Sondahl M., Nakamura T. y Sharp W. (1991) Propagación *in vitro* del café. En: Roca, W. y Mooginski Li (eds). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. pp. 621-642. CIAT. Cali

Suarez R., Calderon C. y Iturriaga G. (2009) Enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic alfalfa accumulating trehalose. Crop Science 49:1791-1799.

Sullivan K., Hechenberger M. y Masri K. (1994) Human cenp-a contains a histone h3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. Cell Biology 127: 581-592.

Talbert P.B., Masuelli R., Tyagi A.P., Comai L. y Henikoff S. (2002) Centromeric localization and adaptive evolution of an Arabidopsis histone H3 variant. Plant Cell 14: 1053–1066.

Tomas D.T., Ross M.C. y Songstad D.D. (1995) Plant cell, tissue and organ culture. Chapter 4: Direct DNA transfer into intact plant cells via microprojectile bombardment p.p 197-213. Editorial Springer Lab Manual.

Uno Y., Furihata T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic

acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:11632-11637.

Wang A. (1987) Callus induction and plant regeneration from maize mature embryos. *Plant Cell Reports* 6:360-362

Watson L. y Dallwitz M.J. (1999) *Grass genera of the world: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval; including synonyms, morphology, anatomy, physiology, phytochemistry, cytology, classification, pathogens, world and local distribution, and references.* Sitio web <http://biodiversity.uno.edu/delt>.

Watson J., Baker T., Bell S., Gann A. y Levine M. (2007) *Molecular biology of the gene.* Editorial Addison-wesley. pp 135-192.

Wright M., Dawson J., Dunder E., Suttie J., Reed J., Kramer C., Chang Y., Novitzky R., Wang H., y Artim-Moore L., (2001) Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. *Plant Cell Rep* 20:429–436

Xoconostle-Cázares B., Ruiz-Medrano R., Gutiérrez-Galeano D.F., Ramírez-Ortega F., Calderón-Pérez B., Agreda-Laguna K.A., Martínez-Navarro A.C. y Cabrera-Ponce J.L. (2013) Tolerancia a sequía en plantas de interés agrícola. Editorial académica española pp 15.

Yokobayashi S. y Watanabe Y. (2005) The kinetochore protein *Moa1* enables cohesion-mediated monopolar attachment at meiosis I. *Cell* 123: 803–817.

Zhang Z., Qiu F., Liu Y., Ma K., Li Z. y Xu S. (2008) Chromosome elimination and in vivo haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Reports* 12:1851-1860.

Zhong C., Marshall J., Topp C., Mroczek R., Kato A., Nagaki K., Birchler J., Jiang J., Jiang J., y Dawe K. (2002) Centromeric retroelements and satellites interact with maize kinetochore protein CENH3. *The Plant Cell* 14:2825-2836.

13. ANEXOS

ANEXO 1. Oligos (5' - 3')

SECUENCIA DE INICIADORES PARA ENSAMBLE In-Vitro de CENH3

✓ 35s-CENH3 directo 1 (98pb)

TCATTTGGAGAGAACACGACCATGGCAACTGTAGCGCTGCGGGAGATCAGGAAGTACCAGAAG
TCCACTGAACCGCTCATCCCCTTTGCGCCTTTCGT

✓ CENH3 reverso 2 (97pb)

GCGCAAGGAGGGCTTCTGCGGTATAGCGCTCTACTTTCCCGTTTGTTACGAAATTGGTTAACT
CCCTCACCACACGGACGAAAGGCGCAAAGGGGAT

✓ CENH3 directo 3 (98pb)

CGCAGAAGCCCTCCTTGCCTGCAAGAGGCAGCAGAATTCCACTTGATAGAACTGTTTCAAAT
GGCGAATCTGTGTGCCATCCATGCCAAGCGTGTCA

✓ CENH3-TNOS reverso 4 (97pb)

CCAAATGTTTGAACGATCTCATGCCCAACGCCTTCCCTCCGATACGCCTTGCAAGTTGTATGTC
CTTTTGCATGATTGTGACACGCTTGGCATGGATG

✓ Knotted-CENH3 directo 5 (98pb)

GGGAGAGAAGGCATACTCACCATGGCAACTGTAGCGCTGCGGGAGATCAGGAAGTACCAGAAG
TCCACTGAACCGCTCATCCCCTTTGCGCCTTTCGT

SECUENCIA DE INICIADORES DE PROMOTORES Y TERMINADOR

✓ Promotor 35S CaMV:

- 35S Directo: AGATTAGCCTTTTCAATTCAGAAAGAATG

- 35S/CENH3 conector reverso: GCTACAGTTGCCATGGTCGTGTTCTCTCCAAATGA

✓ Promotor knotted1:

- Kotted Directo: GTCGACGAGAATTAACCATATACCGACGAG

- Knotted/CENH3 conector reverso: CGCTACAGTTGCCATCCTGAGTATGCCTTCTCTCCC

✓ Terminador Nos (T-Nos):

- CENH3/T-Nos conector directo: GGAAGGCGTTGGGCATGAGATCGTTCAAACATTTGG

- T-Nos Reverso: GATCTAGTAACATAGATGACACCGCGCGCG

✓ Gen Bar

Bar Directo: GTGCTTGTCTCGATGTAG

Bar Reverso: GAGGGGATCTACCATGAG

ANEXO 2. Transformación de células competentes por choque térmico

Viales que contienen células competentes de *E. coli DH5 α* se les adiciona 2 μ l del producto de la reacción de ligación. Incubación en hielo durante 20 min; y posteriormente, las células son sometidas a un choque térmico incubándolas a 42 °C durante 50 s, y trasladándolas al hielo inmediatamente después; donde se les adiciona 250 μ L de medio SOC. Las células se incuban durante 1-2 horas a 37°C en agitación constante (200 rpm). Después la suspensión es distribuida uniformemente en medio TB sólido suplementado con ampicilina (100 mM/mL), y las cajas son incubadas a 37°C toda la noche para posteriormente seleccionar las colonias candidatas a contener plásmidos recombinantes (Sambrook et al. 1999).

Medio SOC

- Triptona 2%,
- Extracto de levadura 0.5%,
- NaCl 10 mM,
- KCl 2.5 mM,
- MgCl₂ 10 mM,
- Glucosa 20 mM,
- Ajustar pH a 7.0.
-

MEDIO Terrific Broth (TB)

- Triptona 1.2%,
- Extracto de levadura 2.4%,
- Glicerol 4 ml/L,
- KH₂PO₄ 17 mM,
- K₂HPO₄ 72 mM

ANEXO 3. Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina de *E. coli*

Las colonias candidatas positivas son cultivadas en 3 ml de medio "Terrific Broth" con 100 mM/ml de ampicilina durante 16 h a 37°C en agitación constante (300 rpm). Las células fueron obtenidas por centrifugación a 13000 rpm durante 1 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante por decantación. La pastilla fue resuspendida en 100 µl de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0), después a esa suspensión se añadieron 200 µl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se incubó en hielo durante 10-15 min (aprox.) para permitir la lisis celular. Al cabo de este tiempo, se adicionaron 150 µl de solución III (acetato de potasio 3M, ácido acético glacial 11%), se mezcló por inmersión y se incubó la mezcla por 5 min adicionales en hielo.

Posteriormente, se centrifugó la suspensión a 13000 rpm durante 5 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante (sin restos celulares) a un tubo Eppendorf limpio. A continuación se adiciono 450 µl de Fenol: Cloroformo isoamílico, se mezcló y se centrifugo a 13000 rpm durante 15 min; se recuperó la fase acuosa a un tubo limpio y se precipitó el DNA con 2 volúmenes de etanol absoluto, mezclando ligeramente, para después mantener el tubo a -20 °C durante toda la noche.

Luego se centrifugó la mezcla a 13000 rpm por 15 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 200 µl de etanol al 70% en dos ocasiones. La pastilla se secó a temperatura ambiente y el material fue resuspendido en 30 µL de agua bidestilada estéril. Se agregó 1 µl de RNasa A (10 mg/ml). El material obtenido fue almacenado a -20 °C hasta su uso (Sambrook, 1999). También se midió la concentración de cada uno de los plásmidos por espectrofotometría en el Nanodrop (ND-1000).

ANEXO 4. Electroporación *Agrobacterium tumefaciens*

Se realiza mediante el uso MicroPulser™ Electroporatio cuvettes 0.1cm (Biorad) en un MicroPulser electroporator a 1800 vlts que contiene la cepa AGL1 y el vector de interés, posteriormente se dejan incubando 2 h a 28 °C y luego se plaquea en cajas de LB con espectinomicina (50mg), kanamicina (25 mg) y carbenicilina (50 mg) y se deja a 28°C por dos días.

ANEXO 5. Preparación de micropartículas de tungsteno

(Tomes et al., 1995; modificado por Cabrera et al., 1997) y me baso también en el protocolo de bombardeo de la universidad de Iowa 2005.

1. Pesar 15 mg de partículas de Oro (~0.6 micras Biorad) y transferir a un tubo estéril 1.5 ml, este tubo es considerado 10X.
2. En campana adicionar 500 µl de etanol 100% frío y sónicar hasta que estén bien dispersas las partículas.
3. Dejar que precipiten un poco.
4. Centrifugar 1 min a 3000rpm y remover el sobrenadante.
5. Adicionar 1ml de H2O Fría por las paredes del tubo y resuspender con vortex finger y dejar precipitar.
6. Centrifugar 15-30seg a 5000rpm y removemos el sobrenadante.
7. Se sónica hasta homogenizar y alícuotar (50 µl = 1.5 mg =1X)
8. Almacenar a -20°C.