



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

Departamento de Biotecnología y Bioquímica

**“TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE
AMARANTO POR MEDIO DE ONDAS DE CHOQUE”**

Tesis que presenta

Biol. Cecilia Nava Sandoval

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

con especialidad en Biotecnología de Plantas

Directores de Tesis

**Dr. John Paul Délano Frier
Dr. Miguel Ángel Gómez Lim**

Irapuato, Gto.

Enero, 2019

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología de la Defensa de Plantas bajo la asesoría del Dr. John Paul Délano Frier, del Departamento de Biotecnología y Bioquímica, así como en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas y Microorganismos bajo la asesoría del Dr. Miguel Angel Gomez Lim, del Departamento de Ingeniería Genética, ambos pertenecientes al Cinvestav-IPN- Unidad Irapuato.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo económico otorgado para realizar mis estudios de maestría con la beca número 610113.

Al **Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato**, por facilitar los recursos necesarios para la realización de este proyecto.

Al **Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada** de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme y proporcionarme el espacio y materiales necesarios para la realización de los experimentos de transformación en este trabajo.

A **todo el personal del Cinvestav Unidad Irapuato**, en las diferentes áreas, académico, administrativas y de mantenimiento y servicios por su amabilidad y por facilitar mi estancia en este centro.

Al **Dr. John Paul Délano Frier y Dr. Miguel Angel Gomez Lim** por permitirme formar parte de sus respectivos equipos de trabajo, por su asesoría, orientación, apoyo, paciencia y tiempo otorgado a lo largo del trabajo.

Al **Dr. Neftalí Ochoa Alejo** y a la **Dra. June Kilpatrick Simpson Williamson** por sus observaciones y aportaciones que fueron de vital importancia durante la realización de este trabajo.

A la **QFB. Norma Angélica Martínez Gallardo** por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio, así como por su tiempo, paciencia y asesoría en la cuantificación de la expresión génica y los ensayos de actividad enzimática.

A **mis compañeros que forman y han formado parte del laboratorio de Fisiología de la Defensa de Plantas**, que siempre estuvieron dispuestos a compartir su conocimiento, opinar, resolver dudas y por todas las vivencias tan gratas durante estos años.

A **mis compañeras Yareli y Diana del Laboratorio de Biotecnología de Plantas y Microorganismos**, por ser una guía muy importante durante el desarrollo del trabajo, por su apoyo, consejos y por su grata convivencia.

A **mis amigos del laboratorio y de Cinvestav** por su imprescindible amistad y compañía en este viaje académico lleno de sorpresas, así como por sus consejos y ayuda en diversas ocasiones. En especial a **Nicolás, Alan, Erika y Aurora** por hacer de mi estancia en Irapuato un bonito viaje lleno de crecimiento académico y personal.

A **Julio** por su compañía y enseñanzas pero sobretodo por darme paz y cariño.

Y a **las personas más importantes en mi vida, a mis padres**, cuyo ejemplo, amor y enseñanzas están conmigo todos los días. Y a **mi hermana Tamara**, por ser mi amiga y hermana al mismo tiempo, pero sobretodo por su apoyo incondicional durante todos estos años.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1 INVERTASAS.....	5
2.2 SACAROSA SINTASAS	5
2.2.1 Sacarosa sintasa en amaranto	8
2.3 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS.....	10
2.3.1 Transformación genética de amaranto	13
2.3.2 Ondas de choque.....	14
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. OBJETIVOS	18
4.1 OBJETIVO GENERAL	18
4.1.1 Objetivos específicos.....	18
V. METODOLOGÍA	19
5.1 MATERIAL BIOLÓGICO	19
5.2 ADN PLASMÍDICO	19
5.3 GENES DE SACAROSA SINTASA EN AMARANTO.....	19
5.4 CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE TRANSFORMACIÓN.....	19
5.4.1 Diseño de oligonucleótidos de los genes <i>AhSUS2</i> y <i>AhSUS3</i>	19
5.4.2 Generación de la construcción del vector de expresión pB7WG2D con el gen <i>AhSUS2</i> Y <i>AhSUS3</i>	20
5.5 MEDIO DE SELECCIÓN PARA SEMILLAS DE AMARANTO TRANSFORMADAS	21
5.6 TRANSFORMACIÓN POR ONDAS DE CHOQUE	22
5.6.1 Descripción del equipo experimental	22
5.6.2 Preparación de la muestra	23

5.6.3	Escrutinio de probables plantas transformadas	24
VI.	RESULTADOS.....	29
6.1	CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR CON EL GEN <i>AhSUS2</i>	29
6.1.1	Verificación por restricción enzimática con XbaI, de la clonación en el vector TOPO 8- <i>AhSUS2</i>	29
6.1.2	Verificación por restricción enzimática con XbaI, de la clonación en el vector pB7WG2D- <i>AhSUS2</i>	30
6.2	CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR CON EL GEN <i>AhSUS3</i>	30
6.2.1	Verificación por restricción enzimática con XbaI y XhoI, de la clonación en el vector TOPO8- <i>AhSUS3</i>	30
6.2.2	Verificación por restricción enzimática con BglI, de la clonación en el vector pB7WG2D- <i>AhSUS3</i>	31
6.3	MEDIO DE SELECCIÓN PARA SEMILLAS DE AMARANTO TRANSFORMADAS	31
6.4	ESTANDARIZACIÓN DEL TIEMPO DE ESCARIFICACIÓN Y NÚMERO ONDAS DE CHOQUE ADECUADAS PARA LA TRANSFORMACIÓN CON EL VECTOR VACÍO (pB7WG2D).....	32
6.5	TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE SEMILLAS DE AMARANTO CON EL VECTOR pB7WG2D.....	33
6.6	TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE SEMILLAS DE AMARANTO CON LAS CONSTRUCCIONES PORTADORAS DE LOS GENES DE SACAROSA SINTASA.....	35
6.7	FENOTIPO DE LAS PLANTAS CONTROL Y LAS PLANTAS TRANSFORMADAS CON LOS GENES <i>AhSUS2</i> y <i>AhSUS3</i> CAPACES DE AMPLIFICAR, POR PCR, LOS GENES <i>bar</i> Y <i>GFP</i>	39
6.8	ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN POR RT- qPCR Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA SACAROSA SINTASA EN HOJAS DE PLANTAS TRANSFORMADAS	40
6.8.1	Niveles de actividad enzimática <i>in vitro</i> de sacarosa sintasa.....	40
6.8.2	Análisis de expresión mediante RT-qPCR	41
6.9	ANÁLISIS DE LA HEREDABILIDAD DEL ADN FORÁNEO EN LA GENERACIÓN F1 DE LAS PLANTAS TRANSFORMADAS CON EL VECTOR pB7WG2D.....	42
VII.	DISCUSIÓN	44
7.1	Selección de plantas de amaranto transgénicas mediante análisis por PCR.....	44

7.2 Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP)	45
7.3 Características morfológicas de plantas de amaranto transgénico	46
7.4 Cuantificación de la expresión génica	47
7.5 Actividad enzimática	49
7.6 Análisis de la generación F1	51
VIII. CONCLUSIONES	52
IX. PERSPECTIVAS	52
X. BIBLIOGRAFÍA	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Niveles de actividad de la sacarosa sintasa (SUS) medidos como μ moles de equivalentes de glucosa por gramo de peso fresco liberados por minuto en diferentes especies de amaranto y bajo diferentes condiciones de estrés hídrico.....	9
Figura 2. Esquema simplificado de un generador de ondas de choque submarinas electrohidráulico.....	15
Figura 3. Esquema del perfil de presiones de una onda de choque submarina.....	16
Figura 4. Aspecto del generador electrohidráulico Mexilit II usado en este estudio.....	22
Figura 5. Simulación del patrón de bandeo para la construcción “Sentido” y “Antisentido” TOPO8- <i>AhSUS2</i> y la electroforesis de confirmación para la construcción en sentido de TOPO8- <i>AhSUS2</i>	29
Figura 6. Simulación del patrón de bandeo para la construcción pB7WG2D- <i>AhSUS2</i> y TOPO8- <i>AhSUS2</i> y la electroforesis de confirmación para la construcción pB7WG2D- <i>AhSUS2</i>	30
Figura 7 Simulación del patrón de bandeo para la construcción pB7WG2D- <i>AhSUS3</i> y TOPO8- <i>AhSUS3</i> y la electroforesis de confirmación para la construcción pB7WG2D- <i>AhSUS3</i>	30
Figura 8. Simulación del patrón de bandeo para la construcción pB7WG2D- <i>AhSUS3</i> y TOPO8- <i>AhSUS3</i> y la electroforesis de confirmación para la construcción pB7WG2D- <i>AhSUS3</i>	31
Figura 9. Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en hojas jóvenes.....	33
Figura 10. Gel de electroforesis para el análisis de los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen <i>bar</i> para las plantas generadas a partir de semillas sometidas a 100 y 200 ondas de choque.....	34
Figura 11. Gel de electroforesis para el análisis de los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen <i>GFP</i> para las plantas generadas a partir de semillas sometidas a 100 y 200 ondas de choque.....	34
Figura 12. Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en raíz de las plantas de amaranto capaces de amplificar los genes <i>bar</i> y <i>GFP</i> por PCR.....	35
Figura 13. Expresión de la proteína verde fluorescente en hojas jóvenes.....	36
Figura 14. Geles de electroforesis para el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen <i>GFP</i> en plantas generadas a partir de semillas sometidas a 100 y 200 ondas de choque.....	37
Figura 15. Geles de electroforesis para el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen <i>bar</i> en plantas generadas a partir de semillas sometidas a 100 y 200 ondas de choque.....	38
Figura 16. Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en raíces de plantas positivas a la amplificación por PCR de los genes <i>bar</i> y <i>GFP</i>	38
Figura 17. Fenotipo de la planta control comparada con plantas obtenidas de semillas sometidas a ondas de choque para permitir la transformación con dos genes de la sacarosa sintasa: <i>AhSUS2</i> y <i>AhSUS3</i>	39

Figura 18. Actividad de sacarosa sintasa (SUS) en hojas de 13 plantas generadas a partir de semillas de amaranto sometidas a ondas de choque y positivas a la amplificación por PCR de <i>bar</i> y/o <i>GFP</i>	40
Figura 19. Expresión relativa de los genes de la sacarosa sintasa <i>AhSUS2</i> y <i>AhSUS3</i> en plantas de amaranto transformadas y en la planta "19".....	41
Figura 20. Geles de electroforesis para el análisis de la amplificación por PCR del gen marcador <i>GFP</i> en plántulas germinadas a partir de las semillas (F1) producidas por plantas generadas originalmente de semillas sometidas a ondas de choque.....	42
Figura 21. Geles de electroforesis para el análisis de la amplificación por PCR del gen de selección <i>bar</i> en plántulas germinadas a partir de las semillas (F1) producidas por plantas generadas originalmente de semillas sometidas a ondas de choque.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de algunos métodos para la transformación genética de las plantas.	11
Tabla 2. Parámetros evaluados para el protocolo de transformación de semillas de amaranto por ondas de choque.	24
Tabla 3. Concentraciones utilizadas de las diferentes marcas comerciales de glufosinato de amonio	32

RESUMEN

El amaranto es una planta de elevado potencial agronómico por su alto contenido nutricional y por su capacidad de crecer en condiciones ambientales desfavorables, al poseer una alta tolerancia a diferentes tipos de estrés (a)biótico. La generación de datos transcriptómicos, así como la reciente secuenciación de su genoma, constituyen herramientas útiles para evaluar el potencial de varios genes asociados a estas propiedades. Desafortunadamente, muchos de ellos, a pesar de mostrar marcados efectos sobre la tolerancia a estrés (a)biótico al ser sobreexpresados en *Arabidopsis*, tienen una función desconocida en amaranto. Sin embargo, la utilización de la transformación genética del amaranto como herramienta de estudio de estos genes por los métodos tradicionales, es problemática, al requerir protocolos laboriosos y no reproducibles. Ante la reciente y llamativa evidencia reportada de la transformación por ondas de choque submarinas, que es un método de manipulación genética rápida, fácil y eficiente en especies recalcitrantes, bacterias, hongos, células animales y tabaco, se decidió utilizar este método para transformar el amaranto de grano a partir de semillas con dos genes de la familia de la sacarosa sintasa (*AhSUS2* y *AhSUS3*). La aplicación de ondas de choque sobre las semillas permitió la inserción tanto del vector vacío pB7WG2D, así como de las construcciones con los genes *AhSUS2* y *AhSUS3*. El porcentaje de transformación obtenido se encontró entre 1.25 y 3.75%, y fue validado por la amplificación vía PCR de los genes *bar* y *GFP*, en hojas de plantas maduras, y por la expresión de la proteína verde fluorescente (o "*GFP*", por sus siglas en inglés), en raíz. Sin embargo, el patrón de expresión de *GFP* fue irregular y de menor intensidad a lo largo de la raíz en comparación con las raíces pilosas de *A. hypochondriacus* transformadas con *A. rhizogenes*. Lo anterior, plantea la posibilidad de haber obtenido plantas mosaico. El fenotipo de las plantas sobreexpresantes de los genes de la sacarosa sintasa tuvieron un retraso en su desarrollo, que puede correlacionarse con la supresión de la expresión del gen *AhSUS2*, pero no de *AhSUS3*. Tampoco se observó una correlación directa entre los niveles de expresión de los genes y la actividad de la sacarosa sintasa de hojas de plantas transformadas, medida *in vitro*. El análisis de la F1 mostró un patrón característico de plantas quiméricas al no conservar un patrón de heredabilidad del transgen a la siguiente generación. De tal manera, que si bien no se obtuvieron plantas completamente transformadas mediante el protocolo con ondas de choque, éste podría ser una método exitoso de transformación en plantas mediante el uso de callos o células en suspensión junto con la posibilidad de utilizar herramientas moleculares como vectores de recombinación homóloga o incluso junto con la nueva técnica para el uso de CRISPR/Cas9 que permita una inserción puntual en el genoma de la planta.

ABSTRACT

Amaranth is a plant of high agronomic potential due to its high nutritional content and the ability to tolerate (a)biotic stress. The availability of transcriptomic data and the recently sequenced genome, have become useful tools to evaluate the potential of several amaranth genes that might be associated with abiotic stress responses. Genetic transformation, as a tool to study gene function, would be ideal to investigate the function of many of these identified amaranth genes. However, transformation of amaranth by traditional methods is highly inefficient, time-consuming and non-reproducible. A number of amaranth genes, despite showing marked physiological effects when over expressed in *Arabidopsis*, still have unknown function(s) in amaranth. Alternatively, transformation by underwater shock waves has been reported as a fast, easy and efficient method to transform bacteria, fungi and animal cells. The aim of this work was to test this method in order to transform amaranth seeds with two genes of the sucrose synthase (SUS) family (*AhSUS2* y *AhSUS3*) by means of an electrohydraulic shock wave generator. The application of shock waves allowed the insertion of the transformation vector (pB7WG2D) as well as the constructions with the *AhSUS2* and *AhSUS3* genes. The transformation percentage was between 1.25 and 3.75%, and was validated by the PCR amplification of the genes *bar* and *GFP*, in mature plants, and by the expression of the green fluorescent protein (GFP) in roots. However, the pattern of *GFP* expression was irregular and less intense along the root compared to the hairy roots of *A. hypochondriacus* transformed with *A. rhizogenes*. The above raises the possibility that this transformation procedure generated mosaic plants. The phenotype of plants overexpressing the sucrose synthase genes was characterized by a delayed development, which correlated with the suppression of the *AhSUS2* gene, but not of *AhSUS3*. There was also no direct correlation between the expression levels of these genes and the *in vitro* SUS activity levels measured in leaves of transformed plants. The analysis of the F1 showed a characteristic pattern of chimeric plants by being unable to inherit the transgene to the next generation. The results showed that the shock wave method was unable to successfully transform all the cells in the seed embryo, thereby producing chimeric mosaic plants. A proposal for future work is based on the use of undifferentiated tissues (e.g., calli) or suspension cell cultures as the starting point for the generation of fully transformed plants from individually transformed cells. Another possibility could be the use of homologous recombination or even the highly specific CRISPR/Cas9 system to permit the precise insertion, via this transformation technique, of a given gene in the amaranth's genome.

I. INTRODUCCIÓN

El amaranto es una planta dicotiledónea, herbácea anual, con metabolismo C4, clasificada como pseudocereal (Belton y Taylor, 2002). Pertenece al género *Amaranthus*, que incluye cerca de 70 especies nativas de los trópicos y de las regiones templadas de todo el mundo, de las cuales 40 pertenecen al continente Americano que es su centro de origen. El resto de las especies de amaranto son de Australia, África, Asia y Europa (Espitia-Rangel *et al.*, 2010).

Por su producción de grano, Sauer (1950, 1967) reconoció tres especies principales del género *Amaranthus*: *A. cruentus*, *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* que son las más importantes para la producción de grano. Por otro lado, se encuentran sus parientes silvestres *A. hybridus* L. y *A. powellii* S. Wats que fueron introducidas en Europa en el siglo XVI. Otras especies son consideradas malezas agresivas que afectan muchas zonas de producción agrícola en el mundo (Steckel, 2007).

A. cruentus y *A. hypochondriacus* conforman el centro de diversidad más importante y se encuentran ampliamente distribuidas en México, *A. cruentus* en la región sureste de México y América Central y *A. hypochondriacus* en las regiones norte y centro de México (Espitia-Rangel *et al.*, 2012; Kulakow y Hauptli, 2018). A su vez, *Amaranthus caudatus* L., al ser originaria de los Andes, está adaptada a días cortos y bajas temperaturas (Grubben y Van Sloten, 1981). Al parecer, sobre la base de su cercanía genética, todas descienden del amaranto maleza *A. hybridus* (Kulakow y Hauptli, 2018).

Aunque el amaranto fue una de las fuentes de alimento básico en la civilización centro y sudamericana precolonizada, su uso y cultivo cayó en el olvido después de la conquista (Espitia-Rangel *et al.*, 2010). Sin embargo, hoy en día el amaranto es considerado como el cultivo de oro del futuro (Das, 2016) y fue considerado a partir de los años 80 por la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América, como el mejor alimento de origen vegetal para consumo humano (Ulbricht *et al.*, 2009); por lo que tiene el potencial para convertirse en un cultivo básico por su elevado potencial agronómico, tanto por la producción de grandes volúmenes de biomasa, como por su capacidad de crecer en condiciones ambientales desfavorables, como aquellas con baja disponibilidad de agua, altas intensidades de luz, suelos pobres y temperaturas extremas (Espitia-Rangel *et al.*, 2010; Délano-Frier *et al.*, 2004, 2011). Asimismo, es importante por su alto valor nutricional (Ulbricht *et al.*, 2009), que lo hace ser una fuente de alimento altamente nutritiva por su alto contenido proteico en semilla que es incluso mayor al del trigo, arroz y maíz. Además, sus niveles del aminoácido lisina que es generalmente deficiente en otros cereales, son elevados y similares a los presentes en proteínas de alta calidad, como la caseína (Belton y Taylor, 2002). Es por lo anterior que la cadena productiva y la

derrama económica podrían llegar a ser tan importantes como en el maíz, trigo, sorgo, cebada, arroz, entre otros (Espitia-Rangel *et al.*, 2010).

Además, el amaranto presenta muy variadas y amplias aplicaciones tecnológicas, pues se puede aprovechar integralmente toda la planta, tanto el grano como sus hojas, que también se caracterizan por contener altos niveles de proteína, calcio, magnesio y fósforo, así como vitaminas. Hasta el tallo y su inflorescencia, donde el primero puede servir de forraje para los animales y el segundo tiene un valor ornamental (Akubugwo *et al.*, 2007; Espitia-Rangel *et al.*, 2010).

Y aunque existe interés por compañías de la industria alimenticia extranjera por incluirlo en diversos productos (Espitia-Rangel *et al.*, 2010), también ha surgido un interés amplio para el uso de varios otros de sus componentes, como los péptidos biológicamente activos derivados de la hidrólisis de las proteínas de semilla, los cuales se ha comprobado que tienen propiedades promotoras para la salud. Lo anterior sugiere que su consumo puede ser benéfico en personas con problemas de hipertensión, y/o enfermedades cardiovasculares asociadas a hiperlipidemias y diabetes. Ofrece, el potencial de prevenir algunos tipos de cáncer. Además, sus lípidos son una rica fuente de tocoferoles y otros compuestos esteroideos, incluyendo escualeno, que es un componente del aceite de las semillas, utilizado para la industria farmacéutica, nutracéutica y cosmética (Huerta-Ocampo y Barba de la Rosa, 2011; Se-Kwon y Fatih, 2012; Martirosyan *et al.*, 2017).

II. ANTECEDENTES

La sacarosa es un disacárido en el que la glucosa y la fructosa se encuentran unidos mediante un enlace O-glicosídico. Este disacárido cumple funciones cruciales en la mayoría de las especies vegetales, pues es el principal fotosintato que se transporta a los sitios de crecimiento y desarrollo, así como a órganos en los que su función es el almacenamiento de energía (Sturm y Tang, 1999; Salerno y Curatti, 2003; Koch, 2004; Lemoine *et al.*, 2013).

En plantas, la escisión de la sacarosa es catalizada por dos enzimas con propiedades completamente diferentes: las invertasas que la convierten en glucosa y fructosa, y las sacarosa sintasas que catalizan la formación de sacarosa en UDP-glucosa y fructosa. De modo que la sacarosa, así como los productos resultantes de su hidrólisis, no sólo son sustratos para sostener el crecimiento heterotrófico de los tejidos sino que también son importantes moléculas de señalización (Roitsch, 1999), así como eficientes moduladores de expresión génica que regulan desde el metabolismo de las plantas en diferentes etapas del desarrollo hasta la percepción de la luz (Jang y Sheen, 1997; Wind *et al.*, 2010; Ruan 2012).

2.1 INVERTASAS

Las invertasas son hidrolasas que escinden la sacarosa en glucosa y fructosa. Los productos resultantes de la hidrólisis de sacarosa pueden alterar la expresión de diversos genes (Koch, 1996). Sus isoformas presentan diferentes propiedades bioquímicas dependiendo de su localización. Las invertasas que se encuentran en el espacio extracelular (i. e., invertasas de pared celular) y en vacuola (i. e., invertasas vacuolares) se encuentran asociadas con la expansión y desarrollo de los tejidos, regulando la relación órgano productor-órgano sumidero y la descarga del floema (Roitsch *et al.* 1995; Tang *et al.* 1999; Roitsch y González, 2005).

Por otro lado, las que se acumulan en el citoplasma (i. e., invertasas neutras o alcalinas) han sido implicadas en procesos importantes, como el correcto desarrollo celular en los meristemas radicular y apical, así como el establecimiento de la floración y la fertilidad del polen (Jia *et al.*, 2008; Barratt *et al.*, 2009; Welham *et al.*, 2009). Además, sus genes son temporal y espacialmente expresados durante el desarrollo de la planta, y están regulados por factores ambientales (Sturm, 1999; Sturm y Tang, 1999).

2.2 SACAROSA SINTASAS

Las sacarosa sintasas son glicosil transferasas que catalizan la formación de UDP-glucosa y fructosa. Estas enzimas sacarolíticas están codificadas por una pequeña familia multigénica (Komatsu *et al.*, 2002). En plantas, las isoformas de sacarosa sintasa, usualmente tienen aminoácidos altamente homólogos y propiedades bioquímicas similares (Fu y Park, 1995). Sin embargo, la función de cada isoforma en una familia proporciona múltiples funciones que varían de una planta a otra. Tienen, además, un patrón de expresión único a través de los diferentes tejidos y etapas de desarrollo (Sturm y Tang, 1999).

Aunque las invertasas tienen un papel crítico en el crecimiento normal de las plantas, las sacarosa sintasas también están claramente involucradas en una gran diversidad de funciones (Bieniawska *et al.*, 2017). Se encuentran principalmente en el citoplasma de las células vegetales, y en la membrana celular (Sturm y Tang, 1999), donde han sido repetidamente identificadas por su papel predominante en la modulación de la entrada de carbono en el metabolismo en células no fotosintéticas, y en la determinación tanto de la fuerza del sumidero como de la carga del floema (Chourey y Nelson, 1976; Zrenner *et al.*, 1995; Tang y Sturm, 1999; Hévenot *et al.*, 2005). De manera que son un determinante principal en el crecimiento de las

plantas, de acuerdo a Tang y Sturm (1999), que encontraron una relación entre la actividad reducida de la sacarosa sintasa y el tamaño de las raíces de zanahoria, pues en última instancia, las raíces resultaron ser más pequeñas y las plantas presentaron un menor número de hojas en relación a las plantas control. Otro ejemplo similar fue el realizado por D'Aoust *et al.* (1999) donde plantas transgénicas de jitomate que mostraron actividad reducida de sacarosa sintasas mostraron una reducción del tamaño del fruto.

Del mismo modo, se ha demostrado que la regulación positiva de las sacarosa sintasas influye en el crecimiento de otras plantas. En tabaco, por ejemplo, la sobreexpresión de una sacarosa sintasa de *G. hirsutum* dio como resultado un aumento de la altura de las plantas (Coleman *et al.*, 2006). De igual modo, el trabajo de Wei *et al.* (2015) demostró que líneas transgénicas de tabaco capaces de sobreexpresar una sacarosa sintasa proveniente de *Populus simonii* × *Populus nigra* (*PsnSuSy2*) presentaban un aumento en el crecimiento de la planta en comparación con el control. En otro estudio, plantas transgénicas de algodón sobreexpresantes de una sacarosa sintasa de papa, aumentaron su superficie foliar; presentaban, además, un desarrollo temprano y una reducción del porcentaje de aborto de la semilla, además de promover el alargamiento de las fibras (Xu *et al.*, 2012).

Por otro lado, la sacarosa sintasa se ha relacionado también tanto en la biosíntesis de la pared celular como en la biosíntesis y movilización del almidón, pues se ha reportado que plantas mutantes antisentido con actividad de sacarosa sintasa suprimida, mostraron una disminución en el contenido de almidón: 62% en maíz (Chourey y Nelson, 1976); 34% -63% en papa (Zrenner *et al.*, 1995), y 26% en zanahoria (Tang y Sturm, 1999). Y aunque la supresión de la sacarosa sintasa causa un efecto profundo en la producción de almidón, el incremento de la actividad no altera directamente el contenido de almidón o celulosa, lo que sugiere que, aunque la sacarosa sintasa puede ser crítica y necesaria para la biosíntesis de almidón, como con los niveles de carbohidratos, otros factores se vuelven limitantes cuando la sacarosa sintasa se está sobreexpresando (Xu *et al.*, 2012).

Como ya se mencionó, la sacarosa sintasa también es clave para la formación de la pared celular pues afecta la deposición de celulosa. Experimentos en raíces de trigo, mostraron que una alta actividad de sacarosa sintasa (causada por hipoxia) estaba asociada con un mayor contenido de celulosa (Albrecht y Mustroph, 2003), y en estudios con álamo, la enzima se encontró asociada con la generación de pared celular secundaria más gruesa del xilema y, por lo tanto, con una mayor densidad de madera (Coleman *et al.*, 2009). Eso es similar a lo reportado por Wei *et al.* (2015) para plantas de tabaco sobre expresantes de la isoforma *PsnSuSy2*, las cuales presentaron un aumento en la biosíntesis y deposición de celulosa que se relacionó con una pared celular secundaria más gruesa y un efecto positivo sobre la longitud de

las fibras de celulosa de la misma. También se observó una disminución asociada en el contenido de celulosa en plantas mutantes antisentido de sacarosa sintasa de zanahoria y algodón. En algodón, por ejemplo, se demostró que no se formaban fibras de alta celulosa si la actividad de la sacarosa sintasa era disminuida significativamente (Tang y Sturm, 1999; Ruan *et al.*, 2003).

Otro papel involucrado con la actividad de la sacarosa sintasa es el implicado en la vía metabólica del carbono durante el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis*, pues Ángeles-Núñez y Tiessen (2010, 2012) demostraron que los genes *SUS2* y *SUS3* modulan la homeostasis metabólica de la semilla de *Arabidopsis*. A su vez, las mutantes de *SUS1* presentaron una disminución del contenido de almidón que se correlacionó con la disminución de la actividad total de la sacarosa sintasa durante la maduración, afectando el peso seco de la semilla al inicio de la maduración, el cociente hexosas/sacarosa, así como también una disminución en la acumulación de ácidos grasos (Ángeles-Núñez *et al.*, 2014).

En varias especies de plantas, las isoformas de sacarosa sintasa se encuentran reguladas por diversas condiciones de estrés ambiental, como la privación de oxígeno (anoxia), deshidratación, bajas temperaturas, radiación extrema, estrés osmótico, así como respuesta a azúcares y regulación por factores de transcripción (Baud *et al.*, 2004; Bieniawska *et al.*, 2007; Ángeles-Núñez y Tiessen, 2010, 2012).

También, se ha observado que los niveles de sacarosa sintasa aumentan frente a estrés biótico fomentando la distribución de carbohidratos desde las hojas hacia los tallos y raíces, cuando plantas de tabaco o álamo fueron sometidas a daño mecánico seguido de la aplicación de saliva de insectos herbívoros. De igual forma, en *Amaranthus cruentus* se ha reportado que la isoforma SuS2, está involucrada en el proceso de tolerancia a la defoliación, la cual podría basarse en la acumulación transitoria de reservas de C en tejidos no expuestos al insecto, como tallo y raíz. Esta regulación diferencial de expresión genética de la sacarosa sintasa bajo diferentes tipos de estrés podría representar parte de una respuesta celular general al ajuste del metabolismo de carbohidratos durante los procesos de aclimatación y/o daño en plantas (Maraña *et al.*, 1990; Déjardin *et al.*, 1999; Schwachtje *et al.*, 2002; Babst *et al.*, 2005; Castrillón-Arbeláez *et al.*, 2012).

La expresión del gen de la sacarosa sintasa también está asociada con al menos algunas relaciones mutualistas en plantas, principalmente aquellas relacionadas con organismos fijadores de nitrógeno o micorrizas. Por ejemplo, la mutación *rug4-a* que reduce los niveles de sacarosa sintasa en semillas de chícharo, también inhibe la fijación de nitrógeno por los nódulos (Gordon *et al.*, 1999). Por el contrario, la ausencia de sacarosa sintasa está relacionada con nódulos de soya que albergan simbiontes incapaces de fijar nitrógeno (Xie *et al.*, 2003), así

como también la sacarosa sintasa y otras invertasas también se inducen específicamente en las células de las raíces colonizadas por micorrizas arbusculares (Blee y Anderson, 2002).

2.2.1 Sacarosa sintasa en amaranto

El análisis transcriptómico del amaranto (Délano-Frier *et al.*, 2011), ha sido una herramienta útil para el entendimiento de muchos de los mecanismos involucrados en respuestas de defensa y tolerancia al estrés (a)biótico en plantas del género *Amaranthus*. Gracias a esta información, y a la secuenciación del genoma del amaranto (Clouse *et al.*, 2016), fue posible detectar un grupo de genes, involucrados en el rompimiento, movilidad, degradación y síntesis de los carbohidratos solubles no estructurales.

Dentro de este grupo de genes relacionados con el metabolismo de los carbohidratos se pudieron identificar 7 diferentes isoformas de la familia de la sacarosa sintasa inducidas bajo estrés hídrico, de las cuales se seleccionaron *AhSUS2* y *AhSUS3*, debido a la homología que presentaron estas dos enzimas con respecto a las isoformas SBSS1 y SBSS2 de *Beta vulgaris*, respectivamente, las cuales se ha reportado que son inducidas en condiciones de anoxia, bajas temperaturas y daño mecánico (Klotz y Haagensohn, 2008). Además, estudios más precisos indicaron que la sacarosa sintasa 2 de *Amaranthus cruentus* se encuentra inducida bajo estrés por defoliación en raíz y tallo, mientras que la isoforma 3 no presentó ningún cambio ante este tipo de estrés (Castrillón-Arbeláez *et al.*, 2012; Cisneros-Hernández, 2016).

Por otro lado, un trabajo realizado sobre la actividad enzimática de la familia de la sacarosa sintasa en diferentes especies de amaranto bajo diferentes grados de estrés hídrico fue el realizado por González-Rodríguez (2016). En este estudio, se observó un aumento en la actividad de la sacarosa sintasa en plantas de amaranto sometidas a diferentes intensidades de estrés hídrico (Figura 1). Asimismo, los resultados de este trabajo sugirieron que podría haber una relación entre la actividad de esta enzima y la capacidad de las especies a tolerar la sequía, pues de las cuatro especies estudiadas, *A. hypochondriacus* fue la que presentó la mayor actividad enzimática, la cual coincidió con su mayor tolerancia a este tipo de estrés, comparada con las otras especies estudiadas, como por ejemplo *A. hybridus*, en la cual una mayor susceptibilidad a la sequía coincidió con una menor actividad enzimática de SUS.

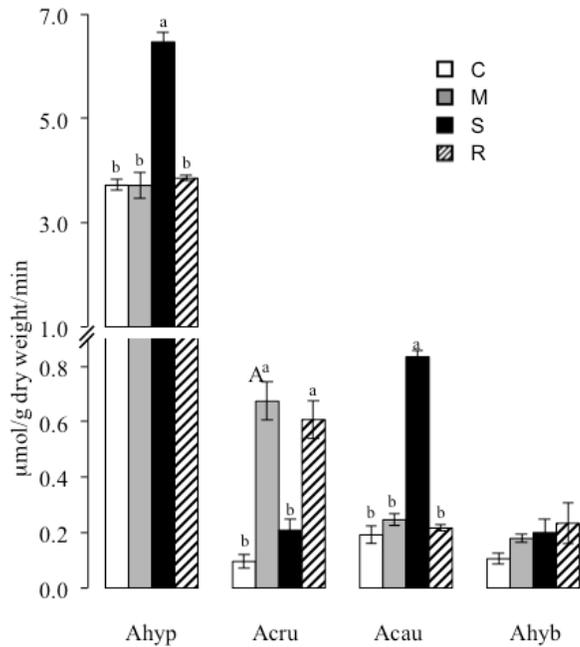


Figura 1. Niveles de actividad de la sacarosa sintasa (SUS) medidos como μ moles de equivalentes de glucosa por gramo de peso fresco liberados por minuto en diferentes especies de amaranto y bajo diferentes condiciones de estrés hídrico. La actividad de SUS se midió en plantas control (C), regadas regularmente; en plantas sometidas a estrés hídrico medio (M), con 30% de humedad residual en el suelo; en plantas sometidas a estrés hídrico severo (S) con 10% de humedad residual en el suelo, y en plantas sometidas a un proceso de recuperación (R), en las cuales el riego se restauró después de mantenerse bajo estrés hídrico severo. Los experimentos se realizaron en plantas de *A. hypochondriacus* (Ahyp), *A. cruentus* (Acru), *A. caudatus* (Acau) y *A. hybridus* (Ahyb), respectivamente (González-Rodríguez, 2016).

Debido a los antecedentes anteriores relacionados con la inducción por estrés hídrico y en otros tipos de estrés por parte de las isoformas de la sacarosa sintasa *AhSUS2* y *AhSUS3*, junto con la razón de que la sacarosa sintasa pertenece a una familia multigénica, que le confiere importantes funciones que podrían permitir la manipulación del metabolismo de carbohidratos por medio de ingeniería genética (Sturm y Tang, 1999). El presente trabajo plantea, como uno de sus objetivos principales, evaluar el potencial funcional de dos genes de la sacarosa sintasa mediante la transformación del amaranto por ondas de choque.

2.3 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS

La transformación genética de plantas consiste en incorporar y expresar de manera estable, un segmento de ADN foráneo en el genoma de una célula vegetal (Birch, 1997). Actualmente, la lista de especies de plantas transformadas aumenta cada día, ya que para varias plantas, como lo citan Rivera *et al.* (2012), el enfoque transgénico es la mejor alternativa para aumentar la productividad de los cultivos para proporcionar mejores cualidades nutricionales, así como una herramienta experimental para lograr un mejor entendimiento de los mecanismos de resistencia a herbicidas, plagas, sequía, insectos, virus, antibióticos, alta salinidad, modificadores de color, procesos biosintéticos o para estudios relacionados con el metabolismo, y en el análisis de diferentes genes y proteínas, entre otros.

El problema principal de la transformación es que el ADN es una macromolécula altamente cargada, difícil de manipular y no puede difundirse a través de la membrana celular, que está formada por una capa hidrofóbica protectora de aproximadamente 10 nm que actúa como una barrera. Además, un método de transformación de plantas debe garantizar el éxito de la transferencia de genes, su integración en el genoma vegetal y la regeneración de las plantas. Es importante mencionar que hasta ahora no se ha desarrollado ningún protocolo universal para la transformación de plantas, incluso el protocolo más eficiente debe ser ajustado a sistemas específicos (Cruz y Campos, 2012).

Por ello, la optimización de un método de transformación implica varios requerimientos, tales como costos bajos, simplicidad técnica, que implica las manipulaciones mínimas y que conduzcan a un gran número de transformaciones por evento. Además, debe garantizar la facilidad para regenerar las plantas transgénicas, la seguridad del operador, evitando procedimientos o sustancias peligrosas, la capacidad para introducir de manera estable el ADN deseado sin secuencias de vector que no sean necesarias para la integración o expresión de genes y la obtención de un pequeño número de copias genéticas introducidas en cada célula (Birch, 1997; Darbani *et al.*, 2008; Brigulla, 2010; Sood *et al.*, 2011). Estos requerimientos han hecho necesario desarrollar diversos métodos de transformación alternativos (Tabla 1), que se clasifican generalmente en transformación indirecta, que son métodos biológicos que usan bacterias, y la transformación directa, que son métodos físicos que se basan en la penetración de la pared celular (Qayyum *et al.*, 2009) tales como: la 1) electroporación; 2) biobalística; 3) infiltración al vacío; 4) ultrasonido y ondas de choque; 5) transformación mediada por fibras de carburo de silicio; 6) microinyección; 7) macroinyección; 8) rayos láser, y 9) electroforesis (Cruz y Campos, 2012).

Tabla 1. Comparación de algunos métodos para la transformación genética de las plantas (Rivera *et al.*, 2012).

Método	Procedimiento	Ventajas	Desventajas	Grado de eficiencia
<i>Agrobacterium</i> spp.	Una bacteria patógena introduce un plásmido que contiene un gen de interés.	La integración del transgen al genoma es preciso y sencillo, con extremos definidos. Herencia estable, y una expresión génica constante a lo largo de las generaciones. Se pueden usar diferentes tipos de células. Protocolos reproducibles y eficaces para muchos cultivos de dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas.	Varios parámetros que no son fáciles de manejar afectan la eficiencia y la regeneración de la planta. Proceso lento. Introducción de vectores asociados innecesarios que producen expresiones genéticas desconocidas en la planta.	Presentan alta eficiencia.
Electroporación	Los impulsos eléctricos inducen la permeabilización de la membrana proporcionando una fuerza motriz para el transporte iónico y molecular a través de los poros.	Se puede aplicar a protoplastos de plantas. Se pueden usar diferentes tipos de células. Simple, rápido y barato.	Protocolos laboriosos. A menudo requiere la formación de protoplastos. Depende de las características electrofisiológicas de la planta.	Bajo rendimiento de transformación.
Biobalística	Utiliza pequeñas partículas cubiertas con genes que al ser aceleradas penetran la pared celular.	Es un procedimiento sencillo. La pared celular no requiere pretratamiento. Es independiente de las propiedades fisiológicas de la célula. Es posible la transformación con múltiples transgenes.	Costoso. Requiere un suministro continuo de consumibles. El ADN puede ser dañado. Produce múltiples copias de genes introducidos, lo que puede conducir a efectos no deseables.	Bajo rendimiento de transformación.
Infiltración al vacío	El vacío hace que los espacios de aire entre células del tejido vegetal disminuyan permitiendo la infiltración de bacterias como <i>Agrobacterium</i> .	Simple y rápido. Se obtienen muchas plantas independientes transformadas.	Requiere el uso de bacterias que pueden tener consecuencias no deseadas.	Eficiencia media.

Método	Procedimiento	Ventajas	Desventajas	Grado de eficiencia
Ultrasonido y ondas de choque	La cavitación acústica cambia la permeabilidad de la membrana y facilita la absorción del ADN.	Simple y seguro.	Costoso. Puede causar alteraciones en las células. Protocolos no estandarizados.	Eficiencia media.
Transformación mediada por fibras de carburo de silicio	Las fibras de carburo de silicio se mezclan en un vórtex con una suspensión de tejido y ADN que permite su introducción por abrasión.	Fácil, rápido y barato. Puede ser utilizado en varias plantas, sin limitaciones.	El daño en las células puede afectar su capacidad de regeneración. Posibles lesiones en el operador debidas a la inhalación de fibras.	Muy baja eficiencia (inferior a la biolística).
Microinyección	Inoculación directa de ADN en la célula de la planta a través de una pipeta de inyección.	Permite la introducción de plásmidos y cromosomas enteros.	Costoso, tedioso y lento.	Eficiencia de transformación extremadamente alta.
Macroinyección	Inyección de materiales heredables utilizando una jeringa hipodérmica.	Alta estabilidad y reproducibilidad.	Sólo una parte de la planta se transforma.	Muy baja eficiencia.
Microrrayo de láser	El microrrayo de láser hace un agujero en la pared celular permitiendo la introducción del ADN.	Precisión.	Costoso y laborioso.	Eficiente.
Electroforesis	Los embriones se colocan entre dos pipetas conectadas a electrodos. El ADN fluye a través de las células desde el cátodo hasta el ánodo.	Barato y simple.	Los embriones tratados tienen baja viabilidad para sobrevivir.	La orquídea es, hasta ahora, la única planta transformada por electroforesis (Griesbach y Hammond, 1994)

2.3.1 Transformación genética de amaranto

Los métodos para la transferencia de genes en plantas son diversos y permiten la selección de enfoques que satisfagan las necesidades económicas o biológicas del investigador (Cruz y Campos, 2012). El éxito en la manipulación transgénica de amaranto se ha reportado haciendo uso de embriones maduros de *A. hypochondriacus* para la obtención de callos generadores de embriones somáticos, empleando una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* (Jofre-Garfias *et al.*, 1997). No obstante, el éxito reportado en la regeneración para obtener plantas maduras y su progenie transgénica es pobre, y el proceso es largo y laborioso.

Por otro lado, existe un segundo reporte de transformación en *A. tricolor* empleando una cepa de *A. rhizogenes* por Swain *et al.* (2010). Sin embargo, las plantas obtenidas mediante este método resultaron tener fenotipos aberrantes conferidos por la bacteria.

Pal *et al.* (2013) reportaron la obtención de líneas germinales transgénicas utilizando explantes de epicotilos de *A. tricolor* L., infectados con *A. tumefaciens* para generar brotes quiméricos. Sin embargo, este trabajo contradice lo publicado por Jofre-Garfias *et al.* (1997) quienes demostraron que cepas oncogénicas de amaranto no fueron capaces de generar tumores en segmentos de explantes conteniendo al meristemo apical (García-Canales, 2015).

En 2015, García-Canales retomó los procedimientos descritos por Pal *et al.* (2013) y Jofre-Garfias *et al.* (1997) para realizar una comparación y, además, aplicó diferentes metodologías para obtener un protocolo de transformación genética de amaranto confiable y estandarizado. Entre las estrategias utilizadas, dos fueron mediadas por *A. tumefaciens*: semillas en germinación y flores vía inmersión floral, y una por *A. rhizogenes*, mediante inducción de raíces pilosas o “hairy roots”. Los resultados indicaron que sólo la metodología de inmersión floral y la mediada por *A. rhizogenes* fueron exitosas debido a la presencia de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en una planta proveniente del ensayo de inmersión floral y la expresión positiva del gen *rolB* en las raíces pilosas.

Finalmente, los procedimientos experimentales que involucraban confirmar la reproducibilidad de los trabajos de Pal *et al.* (2013), usando meristemos apicales, y el de Jofre-Garfias *et al.* (1997), usando tejido embrionario, no tuvieron éxito, demostrando la poca reproducibilidad de estos protocolos.

Recientemente se utilizó con éxito la técnica de inmersión floral o “floral dip” mediante *A. tumefaciens* para transformar *A. reflexus* (Kuluev *et al.*, 2017) y la inducción de raíces pilosas en *A. hypochondriacus* por *A. rhizogenes* (Castellanos, resultados no publicados). Finalmente, aunque en ambos casos se destacó una transformación genética exitosa, los protocolos empleados fueron largos y laboriosos. De modo que hasta el momento, ha habido incertidumbre en cuanto a la transformación genética del amaranto, debido a la falta de reproducibilidad de los protocolos experimentales descritos, que han impedido la obtención confiable de plantas transgénicas de amaranto completas con mayor eficacia.

Ante las limitaciones de los métodos descritos anteriormente para manipular genéticamente el amaranto, y ante la reciente y llamativa evidencia reportada para la

transformación por ondas de choque submarinas en bacterias, hongos, células animales y humanas (Lauer *et al.*, 1997; Jagadeesh *et al.*, 2004; Magaña-Ortíz *et al.*, 2013; Escobar-Tovar *et al.*, 2015; Divya Prakash *et al.*, 2011), se plantea que las ondas de choque podrían ser una alternativa para incrementar la posibilidad de una transformación más eficiente de células vegetales, y por tanto, la obtención de una herramienta eficaz en la manipulación genética del amaranto.

2.3.2 Ondas de choque

El estudio de las ondas de choque, o también llamadas ondas acústicas, se originó a mediados del siglo XX para la desintegración de cálculos renales que es una de las mayores aportaciones terapéuticas en la historia de la urología y es el principal recurso terapéutico en el campo de la litiasis urológica. Entre las ventajas del uso de ondas de choque para la desintegración de cálculos renales (o litotricia extracorpórea) destacan la baja morbilidad y su carácter no invasivo (Magaña-Ortíz, 2010). Además, las ondas de choque pueden generarse de manera controlada en el laboratorio. Los cambios casi instantáneos en la velocidad del fluido y la presión producida por las ondas pueden utilizarse para aplicaciones innovadoras en diversos campos como la medicina, la industria y, recientemente, en las ciencias biológicas, donde se han utilizado con éxito para la transformación genética de diferentes organismos (Jagadeesh *et al.*, 2004; Rivera *et al.*, 2012). Para producir ondas de choque submarinas con aplicaciones biomédicas, se han diseñado dispositivos electrohidráulicos, piezoeléctricos o electromagnéticos (Cleveland *et al.*, 2007; Loske, 2011).

2.3.2.1 Descripción del generador electrohidráulico de litotricia extracorpórea utilizado en este trabajo

Los generadores de ondas de choque electrohidráulicas producen ondas de choque bajo el agua por ruptura eléctrica entre dos electrodos sumergidos en agua ubicados en el foco (F1) cercanos a un reflector metálico paraelipsoidal. La generación de la chispa eléctrica de alto voltaje (15 a 30 kV) en F1, evapora y expande el fluido circundante, generando ondas de choque que se concentran en el segundo foco F2 (Fig. 2) (Esteban-Fuertes *et al.*, 1994; Loske, 2017).

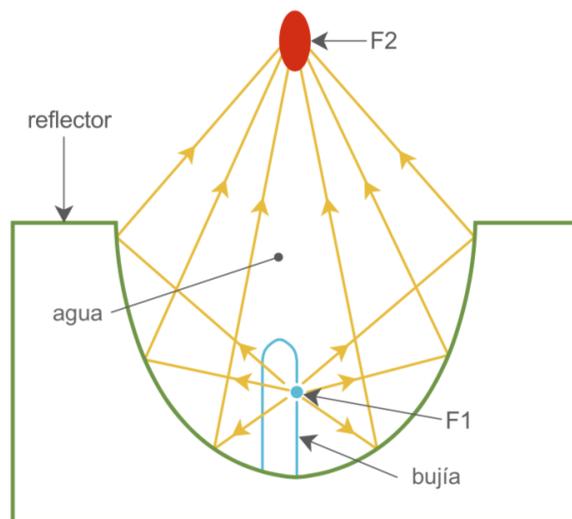


Figura 2. Esquema simplificado de un generador de ondas de choque submarinas electrohidráulico. El generador de onda se sitúa en un foco F1, con un reflector elipsoidal, que concentra las ondas de choque reflejadas en un segundo punto focal (F2) (Loske *et al.*, 2014).

Los equipos generadores de onda de choque generan impulsos de presión positiva y negativa de microsegundos como los mostrados en la Figura 3. El pico de presión positiva puede ser tan alto como 150 MPa, con una duración de fase de 0.5-3 μs y se efectúa durante la exposición a la onda de choque, en donde las microburbujas contenidas en el medio sufren una compresión forzada, obteniendo energía cinética y potencial por el pico de presión positivo. Casi inmediatamente después de esta compresión, ocurre una caída súbita de presión que puede ser de hasta -20 MPa y una duración de fase de 2-20 μs , donde las burbujas generalmente expanden su tamaño cientos de veces, en aproximadamente 50 a 100 μs , después del paso de la onda de choque hasta que toda la energía cinética se ha transformado en energía potencial. Su radio aumenta y permanece casi estable durante una "fase tranquila" que dura entre 200 a 450 μs hasta un segundo colapso más violento (Bailey *et al.*, 2005; Loske, 2011). Producto de este colapso, es la formación de ondas de choque secundarias y pequeños chorros de líquido (o "microjets") con velocidades de hasta 400 m/s (Ohl, 2002; Klaseboer *et al.*, 2007).

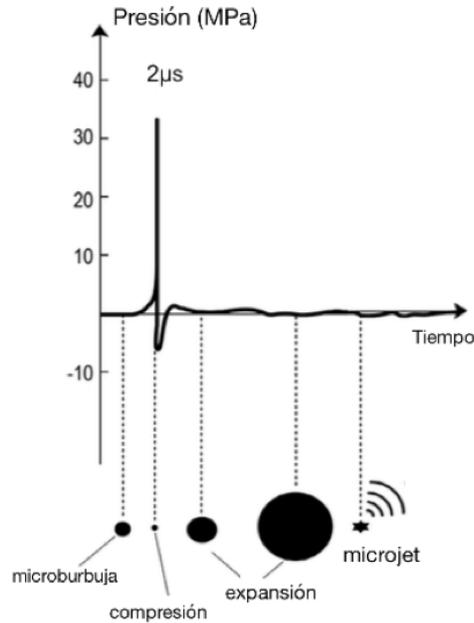


Figura 3. Esquema del perfil de presiones de una onda de choque submarina (Modificado de Loske *et al.*, 2014).

Las lesiones en las células, causadas por la liberación de estos chorros de velocidad considerable, son capaces de generar un aumento transitorio de la permeabilidad de la membrana celular (Ohl e Ikink, 2003; Arora *et al.*, 2005). El fenómeno anterior se conoce como cavitación acústica, que es la que ejerce un efecto considerable sobre la superficie de los cálculos renales y es el fenómeno más importante para la transformación celular (Jagadeesh *et al.*, 2004; , Loske *et al.*, 2011). El aumento transitorio de la permeabilidad de la membrana celular, es el que permite la absorción de macromoléculas contenidas en el fluido que rodea las células (Gambihler *et al.*, 1994; Lauer *et al.*, 1997; Ohl e Ikink, 2003; Arora *et al.*, 2005; Zarnitsyn *et al.* 2008). Sin embargo, los mecanismos implicados en la permeabilización de células asistida por ondas de choque siguen siendo inciertos y sujetos de investigación (Loske, 2017).

2.3.2.2 Evidencias de la transformación de células por cavitación acústica

El uso de ondas de choque ha sido usado exitosamente para la transformación de diferentes tipos celulares. La primera transformación por ondas de choque en procariotas fue la realizada por Jagadeesh *et al.* (2004) en bacterias de *E. coli*, donde comprobaron que la eficiencia de transformación obtenida por ondas de choque fue significativamente mayor en comparación con el método estándar de transformación bacteriana quimiocompetente. Posteriormente, en 2011, se logró la inserción de ADN heterólogo en las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium*, según lo reportado por Divya Prakash *et al.* (2011), cuyo método de transformación fue tan eficiente como la electroporación, ofreciendo las ventajas de una mejor recuperación de las células, un

costo reducido y el hecho de que la metodología es independiente de la fase de crecimiento de los microorganismos.

En cuanto a células eucariotas, Magaña-Ortíz *et al.* (2013) utilizaron las ondas de choque para la transformación de hongos debido a la ineficiencia, baja reproducibilidad y lo laborioso de los protocolos disponibles para estos organismos. La metodología empleada por estos autores involucró la utilización de un generador de onda de choque piezoeléctrico para exponer los conidios de *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma reesei* y *Phanerochaete chrysosporium* al ADN heterólogo. Sus resultados demostraron una mayor frecuencia de transformación entre dos y cuatro órdenes de magnitud en comparación con los métodos publicados anteriormente. Posteriormente Escobar-Tovar *et al.* (2015) logran transformar un hongo recalcitrante más por este mismo método.

La aplicabilidad general de este nuevo método para la transferencia de ADN plasmídico también ha sido un éxito en células de mamíferos de diferentes especies y tejidos celulares, como las células de hígado “Chang”, células de hepatoma HepG2, células HeLa de origen humano, células de fibroblastos L-M (TK-) y células de leucemia linfocítica L1210 de ratón, así como células de riñón de mono CV-1 (Lauer *et al.*, 1997). Recientemente, semillas de *Nicotiana benthamiana* expuestas a ondas de choque producidas por un generador piezoeléctrico lograron ser transformadas con el vector pCAMBIA, conservando un patrón de heredabilidad del 100% para la progenie F1 (Guzmán, resultados no publicados).

III. JUSTIFICACIÓN

Considerando que los métodos actuales de transformación genética de amaranto no han tenido éxito o han resultado ser protocolos parcialmente exitosos o muy largos, en este trabajo se propone generar un protocolo estandarizado y confiable de transformación genética del grano de amaranto por medio del relativamente novedoso método de transformación genética por ondas de choque. De ser exitoso, éste permitirá evaluar el potencial funcional de los genes *AhSUS2* y *AhSUS3*, que son parte de la familia génica que codifica a sacarosa sintasas que se expresan en condiciones de estrés hídrico en plantas de amaranto de grano.

De manera que la información generada podría ser aplicada en un futuro para fortalecer programas de mejoramiento de cultivos comerciales, así como permitir que la transformación genética del amaranto sea usada como herramienta básica para su estudio.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Demostrar la aplicabilidad de las ondas de choque como herramienta para transformar genéticamente plantas de amaranto a partir de sus semillas.

4.1.1 Objetivos específicos

- Determinar las variables (i. e., número de ondas de choque, concentración de ADN, concentración del medio de selección y tiempo necesario de escarificación) que permitan obtener la transformación de semillas de *A. hypochondriacus* por ondas de choque.
- Establecer el protocolo que permita obtener mayor eficiencia en la transformación. La transformación se evaluará mediante el análisis de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) y de la amplificación de genes marcadores, vía PCR, en aquellas plantas capaces de crecer en medio de selección. Los ensayos anteriores se utilizarán para validar la presencia del vector de expresión.
- Generación de las construcciones con los genes de interés *AhSUS2* y *AhSUS3*, para posteriormente transformar plantas de *A. hypochondriacus* utilizando un sistema de expresión constitutivo.
- Verificar la transformación genética de amaranto con los genes de la sacarosa sintasa mediante el análisis de la expresión de *GFP* y de secuencias propias de estos genes, por PCR.
- Analizar el fenotipo, los patrones de expresión por RT-qPCR y la actividad enzimática correspondiente a sacarosa sintasa, en hojas de plantas de *A. hypochondriacus* transformadas.
- Análisis de semillas de la generación F1 de las plantas transformadas, para evaluar si la transformación genética por ondas de choque es heredable.

V. METODOLOGÍA

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- Semillas de *Amaranthus hypochondriacus* var. *Gabriela*, amablemente proporcionadas por el Dr. Eduardo Espitia Rangel, curador del banco de germoplasma de amaranto del SINAREFI.
- Células electrocompetentes *Stellar* de *E. coli*, utilizadas para la multiplicación de los vectores de transformación.

5.2 ADN PLASMÍDICO

Se utilizó el plásmido pB7WG2D (Karimi *et al.*, 2002). Este plásmido confiere resistencia a glufosinato de amonio a partir del gen *bar*, que codifica a la enzima fosfinotricina acetil transferasa de *Streptomyces hygroscopicus*, acoplado al promotor de expresión constitutiva CaMV35S del virus del mosaico de la coliflor.

5.3 GENES DE SACAROSA SINTASA EN AMARANTO

Se seleccionaron dos de las siete isoformas de genes de sacarosa sintasa de amaranto detectadas en un análisis transcriptómico previo (Délano-Frier *et al.*, 2011). Un análisis por medio de NCBI BLAST mostró que las regiones codificantes de los genes *AhSUS2* y *AhSUS3* son altamente homólogas a dos isoformas presentes en *Beta vulgaris*.

AhSUS2 presentó un 90% de identidad en su secuencia de aminoácidos con la isoforma *SBSS1*, mientras que *AhSUS3* mostro tener un 88% de identidad a la secuencia de aminoácidos de la isoforma *SBSS2*, ambas de *B. vulgaris*. Estas isoformas de genes de sacarosa sintasa han demostrado ser inducidas en condiciones de anoxia, bajas temperaturas y daño mecánico en betabel (Klotz y Haagensohn, 2008).

5.4 CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE TRANSFORMACIÓN

5.4.1 Diseño de oligonucleótidos de los genes *AhSUS2* y *AhSUS3*

El diseño de oligonucleótidos para la amplificación de los genes de interés se realizó con la ayuda del programa OligoEvaluator (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). La secuencia de los mismos se representa a continuación:

AhSUS2

Iniciador directo: 5'-CTTCTCCATTCATCACATTTCTCTCTC-3'.

Iniciador reverso: 5'-TACACCACAATACAACGCAACAT-3'.

AhSUS3

Iniciador directo: 5'-TAGAAAAAAAAAATGGCTGGTTCG-3'.

Iniciador reverso: 5'-CTCATTCAAAGCATTACCAAC-3'

5.4.2 Generación de la construcción del vector de expresión pB7WG2D con el gen *AhSUS2* Y *AhSUS3*

Para obtener la construcción del gen *AhSUS2* y *AhSUS3* se amplificó la secuencia codificante completa de cada gen utilizando una mezcla de cADN de hoja, tallo y raíz en relación 1: 1: 1 de *A. hypochondriacus* como templado. La amplificación por PCR de ambos genes se inició con una desnaturalización primaria a 94°C por 5 min, seguida de 25 ciclos de amplificación con tres pasos por ciclo, un paso de desnaturalización a 94°C por 1 min; un paso de alineamiento a 64°C y a 62°C por 1 min para *AhSUS2* y *AhSUS3*, respectivamente, y el último paso de elongación a 72°C por 3 min, seguido por una elongación final a 72°C por 15 min. Los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 0.1%. El producto obtenido se ligó en el vector comercial de clonación "PCR8/GW/TOPO TA Cloning kit" siguiendo las especificaciones del fabricante (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) con un tiempo de incubación de 15 min. Posteriormente, se colocaron 9 µL de la reacción de la clonación con TOPO8 diluida 1: 4 v/v y se mezclaron en 100 µL de células electrocompetentes de *E. coli* cepa Stellar para electroporar. Éstas se incubaron 1 h a 37°C en medio LB y luego en cajas Petri con medio LB y espectinomicina (100 µg/ mL) a 37°C por 16 h a 37°C.

Para confirmar la clonación de los genes de interés, se realizó un análisis con enzimas de restricción realizando una extracción de ADN plásmido de las colonias capaces de crecer en presencia del antibiótico. Cada cepa positiva se inoculó en 3 mL de medio LB con 100 µg/ mL de espectinomicina por 16 h, a 37°C.

Para la selección de las enzimas de restricción se utilizó el programa de simulación SnapGene. La enzima utilizada para digerir el ADN plasmídico de *AhSUS2*-TOPO8 fue XbaI; y para la construcción *AhSUS3*-TOPO8 las enzimas XbaI y XhoI (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA). Las reacciones se llevaron a cabo bajo las especificaciones del proveedor y fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 0.1%.

Una vez comprobado el éxito de la clonación con enzimas de restricción para las dos construcciones de los genes de sacarosa sintasa, se purificaron los vectores recombinantes por medio del "Kit Protocol" (Qiagen, Hilden, Alemania) para obtener la concentración, pureza y calidad adecuadas para su secuenciación realizada por el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT-UNAM, México).

Una vez confirmada la integridad de las secuencias se realizó la linearización de los vectores (TOPO8-*AhSUS2* y TOPO8-*AhSUS3*) con la enzima de restricción BglI para inactivar al gen de resistencia a espectinomicina y así evitar falsos positivos para la clonación con el vector de salida pB7WG2D debido a la presencia de este mismo gen en este vector.

Transcurrido este tiempo se comprobó el corte del vector por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 0.1%.

Seguido de esta digestión se prosiguió a realizar el método de recombinación por el sistema Gateway usando la reacción LR para transferir el gen *AhSUS2* y *AhSUS3* de TOPO8 al vector Gateway de salida pB7WG2D por medio de la enzima comercial LR Clonase (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante, usando una relación 1: 1 entre el vector TOPO8 y *AhSUS3* o *AhSUS2* a una concentración de 150 ng/ μ L del vector de expresión.

Después de realizar la recombinación, se transformó *E. coli* mediante electroporación. Las células se incubaron durante 4 h a 28°C en 100 μ L de medio LB. Transcurrido el tiempo de incubación, se colocó el cultivo en placa Petri en medio LB adicionado con espectinomycin (100 μ g/ mL) y se incubaron durante 16 h a 37°C.

Para la confirmación de la clonación por Gateway, se extrajo DNA plasmídico a partir de las colonias capaces de crecer en medio con espectinomycin y se realizó una digestión con la enzima de restricción XbaI para pB7WG2D-*AhSUS2*, y BglI para pB7WG2D-*AhSUS3*, ambas de Invitrogen. Posteriormente, se analizó el patrón de bandeo por electroforesis en un gel de agarosa al 0.1%.

5.5 MEDIO DE SELECCIÓN PARA SEMILLAS DE AMARANTO TRANSFORMADAS

Para evitar la presencia de falsos transformantes se realizaron pruebas, previas a los protocolos de transformación, para establecer los límites de resistencia de las semillas de amaranto al herbicida glufosinato de amonio de diferentes casas comerciales.

El glufosinato de amonio es un herbicida no selectivo que es utilizado como agente de selección en plantas. Su mecanismo de acción está influido por el isómero L- de la fosfotricina que es el agente activo del glufosinato de amonio el cual inhibe la actividad de la enzima glutamina sintetasa que tiene un papel crucial en la asimilación del nitrógeno y como resultado se alcanzan niveles tóxicos de amonio en las células de la planta (Reyes *et al.*, 2010).

En este estudio se probaron 3 marcas de productos con glufosinato de amonio (Finale Ultra (Bayer, NJ, USA), Basta 20S (Hoechst, Frankfurt, Alemania) y glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a seis diferentes concentraciones (5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 50.0 mg/ L) más el control positivo, en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962).

Se utilizaron 3 réplicas por cada tratamiento que contenían 50 semillas previamente esterilizadas y escarificadas por caja Petri. Diez días después de la siembra se determinó la mortalidad de las plantas en las diferentes concentraciones del agente selectivo.

5.6 TRANSFORMACIÓN POR ONDAS DE CHOQUE

5.6.1 Descripción del equipo experimental

Para el protocolo de transformación desarrollado en este trabajo se empleó el litotriptor MEXILIT II (Fig. 4) diseñado en el Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El equipo consta de un circuito de energía pulsado que proporciona pulsos múltiples a una chispa inmersa en agua (Loske y Yarger, 1991). El conjunto del electrodo de chispa se encuentra en el punto focal de un reflector parabólico de acero inoxidable, montado en el fondo de un tanque de agua de vidrio de $1200 \times 800 \times 600$ mm. La aplicación de alta tensión (de 20 kV) a los electrodos genera una onda de choque que se propaga al agua circundante y se refleja en el reflector. Además, cuenta con un sistema de posicionamiento controlado por computadora que se coloca en la parte superior del dispositivo (F2) para sujetar la muestra a cualquier posición deseada dentro del tanque (Loske, 2007).



Figura 4. Aspecto del generador electrohidráulico Mexilit II usado en este estudio.

5.6.2 Preparación de la muestra

5.6.2.1 Desinfección y escarificación de semillas

Las semillas de amaranto fueron sometidas a un proceso de desinfección y escarificación para favorecer la entrada del ADN a las células del embrión, antes de ser sometidas a ondas de choque. Lo anterior, para determinar el tiempo necesario de escarificación para evitar la muerte del embrión. De modo que en un tubo Eppendorf de 1 mL, se adicionaron 40 semillas con 1 mL de ácido sulfúrico 1 N por un tiempo de 1, 3, 5 y 7 min, seguidos de 4 enjuagues con agua destilada. Después, se realizó un protocolo de desinfección adicionando 1 mL de cloro al 20% por 3 min en agitación, seguido de 3 min en reposo y finalmente 3 min en agitación. Una vez cumplidos estos tiempos, se realizaron 4 lavados con 1 mL agua destilada estéril.

5.6.2.2 Protocolo de transformación genética de semillas de amaranto

En bolsitas de propileno (1.5 cm x 1.5 cm) previamente esterilizadas con luz UV, se colocaron 80 semillas de *A. hypocondriacus* previamente escarificadas y desinfectadas con 10 μ L o 5 μ L de ADN plasmídico a una concentración de 1 μ g/ μ L y 250 μ L de agua estéril.

5.6.2.3 Estandarización de ondas de choque adecuadas para la transformación con muestras con ADN plasmídico (PB7WG2D)

En total se prepararon seis muestras con la concentración referida de ADN (pB7WG2D) y seis muestras sin ADN, como control negativo. Cada una de las muestras, así como su control negativo, fue tratada con un número determinado de ondas de choque. El número de ondas de choque probado fue de 100, 200, 300, 400, 500 y 600 a un voltaje de 20 kV con 0.5 Hertz.

Después del tratamiento, las semillas provenientes de las muestras tratadas con ADN fueron sembradas en medio MS con 5 mg/ L de glufosinato de amonio Finale Ultra (Bayer, NJ, USA) para identificar plantas transgénicas individuales. Los controles negativos fueron sembrados en medio MS para determinar el efecto de las ondas de choque ante la viabilidad de la semilla. La incubación se llevó a cabo en un cuarto de crecimiento a 25°C. Diez días después de la siembra, las plantas con fenotipo de resistencia (plantas con hojas verdes, de tallos largos y/o que presentaban fluorescencia de *GFP*) fueron trasplantadas a macetas de 1.3 L para continuar con su desarrollo y el escrutinio de probables plantas transformadas.

5.6.2.4 Muestras sometidas a ondas de choque con las construcciones de *AhSUS2* Y *AhSUS3*

En total se prepararon ocho muestras sometidas a 100 y 200 ondas de choque con una concentración de 100 y 50 ng/ μ L de ADN (Tabla 2) y cuatro muestras sin ADN, como control negativo. Las ondas de choque se generaron a un voltaje de 20 kV con 0.5 Hertz.

Tabla 2. Parámetros evaluados para el protocolo de transformación de semillas de amaranto por ondas de choque.

<i>AhSUS2</i>		<i>AhSUS3</i>	
Numero de ondas de choque	Concentración de ADN (ng/ μ L)	Numero de ondas de choque	Concentración de ADN (ng/ μ L)
100	50	100	50
100	100	100	100
200	50	200	50
200	100	200	100

Después del tratamiento, las semillas tratadas con ADN foráneo fueron sembradas en medio MS con 9 mg/ L de glufosinato de amonio Basta 20S (Hoechst, Frankfurt, Alemania) para identificar plantas transgénicas individuales. Los controles negativos fueron sembrados tanto en medio MS como en medio de selección. La incubación se llevó a cabo en un cuarto de crecimiento a 25°C. Diez días después de la siembra, las plantas que mostraron el fenotipo de resistencia (plantas de hojas verdes y/o que presentaban fluorescencia de *GFP*) fueron trasplantadas a macetas de 1.3 L para continuar con su desarrollo y el escrutinio de probables plantas transformadas.

5.6.3 Escrutinio de probables plantas transformadas

5.6.3.1 Evaluación de plantas capaces de crecer en el medio de selección y/o de expresar la proteína verde fluorescente en hojas jóvenes

Diez días después de la siembra de las semillas sometidas a ondas de choque en medio de selección con 9 mg/ L de glufosinato de amonio Basta 20S (Hoechst, Frankfurt, Alemania), se realizó un escrutinio con el microscopio trinocular (Carl Zeiss, Mainz, Alemania) con accesorio para Epifluorescencia LED FITC 470 nm para seleccionar las plantas que tuvieran

actividad de la proteína verde fluorescente en hojas jóvenes. Las plantas que mostraron resistencia al medio de selección (plantas de hojas verdes, tallos largos) y/o que presentaron fluorescencia debida a la *GFP*, fueron transplantadas a macetas de 1.3 L para continuar su desarrollo hasta emergencia de panoja y generación de semillas.

5.6.3.2 Extracción de ADN total de hoja usando miniprep a base de urea

La extracción de ADN de las plantas seleccionadas como posibles transformantes se aisló a partir de hojas de plántulas de 5 días por medio del protocolo de urea-fenol (Shure *et al.*, 1983) con las siguientes modificaciones: el tejido vegetal se pulverizó con nitrógeno líquido. Se pesaron 100-200 mg de tejido congelado en polvo, y se adicionaron 700 μ L del buffer (urea 8.0 M, NaCl 5 M, Tris-HCl 0.5 M [pH 8], EDTA 0.5 M [pH 8] y N-lauroilsarcosinasarcosilo al 1%) y se agitó en vortex hasta homogeneizar. Se agregaron 700 μ L de una mezcla 3: 1: 1 de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, se agitó en vortex, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min, y se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio. Posteriormente, se adicionaron 400 μ L de isopropanol y la concentración de sal se incrementó mediante la adición de 40 μ L de acetato de sodio 3 M. Luego, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min y luego se desechó el sobrenadante. Finalmente, se lavó la pastilla con etanol 70%, se centrifugó a 12,000 rpm 5 min, se dejó secar y se re-disolvió en 30 μ L de agua desionizada.

5.6.3.3 PCR: confirmación de los genes *bar* y *GFP*

Para detectar la inserción del gen reportero *GFP* y el gen de selección *bar* en el genoma de las plantas transgénicas, se realizaron pruebas con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con 150 ng/ μ L de ADN de hoja.

Para el gen *bar*, presente en el plásmido pB7WG2D se emplearon los siguientes oligonucleótidos selectivos para este gen:

Iniciador directo: 5' CTCAGCAGGTGGGTGTAGA 3'

Iniciador reverso: 5' GCACCATCGTCAACCACTAC 3'

Las condiciones de la reacción fueron: 94°C de desnaturalización por 4 min; seguida de 30 ciclos de amplificación con tres pasos por ciclo, un paso de desnaturalización a 94°C por 30 s; un paso de alineamiento a 61°C por 30 s y el último paso de elongación a 72°C por 40 s, seguido por una elongación final a 72°C por 1 min. Posteriormente, los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 0.1%.

Para la detección de *GFP* se emplearon los siguientes oligonucleótidos selectivos:

Iniciador directo: 5' CCACCATGGTGAAGACTAATCTTTTTCTCT 3'

Iniciador reverso: 5' CCACTCGAGTTACAGCTCGTCCTTCTTGTA 3'

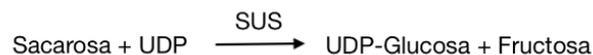
Las condiciones de la reacción fueron: 94°C de desnaturalización por 4 min; seguida de 30 ciclos de amplificación con tres pasos por ciclo, un paso de desnaturalización a 94°C por 30 s; un paso de alineamiento a 60°C por 30 s y el último paso de elongación a 72°C por 40 s, seguido por una elongación final a 72°C por 1 min. Posteriormente, los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 0.1%.

5.6.3.4 Expresión de la proteína verde fluorescente en raíces de plantas maduras

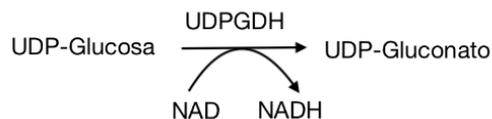
Para verificar la expresión de la proteína *GFP* en raíces de las plantas que resultaron *GFP*-positivas por PCR, se prosiguió a tomar una muestra de raíces pequeñas para poder evaluarlas bajo un microscopio Olympus BX50 (Hamburg, Alemania) con accesorio para epifluorescencia a 480 nm.

5.6.3.5 Medición *in vitro* de la actividad enzimática de sacarosa sintasa

La actividad enzimática se midió por medio del protocolo de Wright *et al.* (1998) con algunas modificaciones. Se pesaron 50 mg de tejido fresco molido con nitrógeno líquido, y el tejido se resuspendió en 500 µL del buffer de extracción (50 mM Hepes KOH pH 8; 5 mM MgCl₂; 2 mM EDTA; 1 mM MnCl₂; 1 mM CaCl₂; 1 mM benzamidina; 1 mM ditioneitol; 0.1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) que actúa como inhibidor de serin y tripsin proteasas). La muestra se mantuvo en agitación a 1,250 rpm por 30 min a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 12,000 por 15 min a 4°C. Del sobrenadante obtenido, se tomaron 250 µL para la muestra y 250 µL para el blanco. Los blancos fueron hervidos a 98°C durante 10 min. Tanto las muestras como los blancos fueron depositados en una microplaca de 96 pozos donde se mezclaron con 200 µL del buffer de reacción (62.5 mM Hepes KOH pH 8; 1.25 mM MgCl₂; 500 mM sacarosa y 6.25 mM UDP). La reacción se incubó a 37°C por 30 min y después se detuvo incubando a 99°C por 10 min. La reacción analizada es la siguiente:



Transcurrido el tiempo, se agregaron 20 µL de solución glicina-NAD (glicina 166 mM, pH 8.9; NAD 10 mM), se agitó durante 10 s y se leyó la absorbancia a 340 nm (A1). Enseguida, se agregaron 2 µL de UDP-glucosa deshidrogenasa (UDPGH) y uridina-5-difosfoglucosa-deshidrogenasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) y se leyó la absorbancia a 340 nm cada 2 min hasta que el incremento de absorbancia fuera constante (A2). La reacción ocurrida es:



La actividad de sacarosa sintasa se determinó en dirección del rompimiento de sacarosa y se analizó sobre la base de la UDP glucosa formada en la reacción.

Para calcular la cantidad de UDP-glucosa liberada por la sacarosa sintasa, se restan las absorbancias de los blancos de las absorbancias de las muestras, obteniendo el incremento de absorbancia de ambos.

$$\Delta_{abs} = \Delta A_m - \Delta A_B$$

El resultado de la diferencia de absorbancia correspondiente a la glucosa liberada (Δ_{abs}) se utilizó en la siguiente fórmula para determinar la concentración de UDP-glucosa:

$$\text{UDP-glucosa } \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg}} = \frac{\Delta_{abs}}{17.7 (1/\mu\text{mol})} * \frac{1}{\text{Vol extracto } (\mu\text{l})} * \frac{\text{Vol. extracto total } (\mu\text{l})}{\text{PF (mg)}}$$

Dónde:

17.7 = Coeficiente de extinción molar del NADPH para una placa de 96 pozos con una profundidad de 10 mm.

Vol. extracto = Volumen del extracto ensayado en la placa (en nuestro caso, 20 μL).

Vol. extracto total = Volumen total de extracción de azúcares (en nuestro caso, 500 μL).

PF = Peso fresco de la muestra (en nuestro caso, 50 mg).

5.6.3.6 Análisis de expresión mediante RT-qPCR

Extracción de ARN

El ARN total fue extraído a partir de 100-200 mg de tejido molido congelado empleando TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Éstas consistieron en la adición de una solución salina (citrato de sodio 0.8 M + 1.2 M de cloruro de sodio) durante la precipitación en una proporción 1: 1 v/v con isopropanol. Posteriormente, se llevó a cabo una purificación adicional con LiCl (8

M) por una hora a 4°C. Todas las muestras de ARN fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa-formaldehído-formamida, confirmando su integridad a través de las bandas de ARN ribosomal y la concentración y pureza fueron determinadas por espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Síntesis de ADNc

Un total de 4 µg de ARN fue usado para la síntesis del ADNc, utilizando un Oligo(dT)₂₀, desoxirribonucleótidos (dNTPs) y 200 unidades de la transcriptasa reversa SuperScript III TM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación del gen endógeno actina (*Ah-ACT7*, isotig 10321) se utilizó para corroborar la síntesis de ADNc.

Ensayos de PCR en tiempo real (qRT-PCR)

Para los ensayos de amplificación por RT-qPCR se utilizó ADNc a partir de 4 µg de ARN total, diluido en un factor de 1: 25. Las amplificaciones se realizaron usando química de detección SYBR Green y se analizaron por cuatuplicado en placas de reacción de 96 pozos con el equipo *CFX96 Touch Real-Time PCR DetectionSystem* (BioRad, Hercules, CA, EUA). Cada reacción de PCR tuvo un volumen total de 20 µL consistiendo en 2 µL de ADNc, 8 µL de *SYBR Green Supermix*, 2 µL de una solución 2 µM de cada oligonucleótido (directo y reverso) y 6 µL de agua desionizada destilada (dd) estéril. Para el protocolo de amplificación para ambos genes, se emplearon oligonucleótidos sintetizados por Cisneros-Hernández (2016). El proceso consistió en una desnaturalización primaria a 95°C durante 60 s, seguida de 40 ciclos de amplificación con dos pasos por ciclo, un paso de desnaturalización a 95°C por 15 s y un paso de alineamiento-elongación a 60°C por 60 s. Las curvas de amplificación fueron analizadas con el programa CFX Manager Software, proporcionado por el fabricante, utilizando un valor para la línea umbral de 10 unidades de fluorescencia relativa (RFU, por sus siglas en inglés) para la obtención del valor de ciclo umbral (CT por sus siglas en inglés) para cada curva de amplificación (Cisneros-Hernández, 2016).

El análisis de los niveles de expresión relativa se calcularon mediante el parámetro $2^{-\Delta\Delta CT}$ donde:

$\Delta\Delta CT = (CT \text{ gen blanco} - CT \text{ promedio de los genes de referencia})_{\text{Tratamiento}} - (CT \text{ gen blanco} - CT \text{ promedio de los genes de referencia})_{\text{Control}}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

5.6.3.7 Análisis de herencia de la F1 de las plantas transformadas con el vector vacío pB7WG2D

Se sembraron 100 semillas (F1) provenientes de cada una de las plantas cuyo diagnóstico de transformación genética resultó negativo en medio MS adicionado con 10, 8.2 y 6.6 mg/ L de glufosinato de amonio, grado reactivo. Debido a que no se obtuvieron plantas que sobrevivieran a estas condiciones, se realizó un análisis de PCR para los genes *bar* y *GFP* de un total de 36 plántulas provenientes de la F1 de las plantas transformadas identificadas como “3”, “4”, “9” y “10”; para descartar una mala selección por el uso de concentraciones demasiado altas del medio de selección.

VI. RESULTADOS

6.1 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR CON EL GEN *AhSUS2*

6.1.1 Verificación por restricción enzimática con XbaI, de la clonación en el vector TOPO 8-*AhSUS2*

1.-Marcador de peso molecular:

“MW:1 Kb Plus DNA Ladder”

Tamaño de las bandas esperadas en:

2.-Orientación sentido: TOPO8-*AhSUS2*

1. 3330 pb

2. 1599 pb

3. 418 pb

3.-Orientación antisentido: TOPO8-*AhSUS2*

1. 3928 pb

2. 1001 pb

3. 418 pb

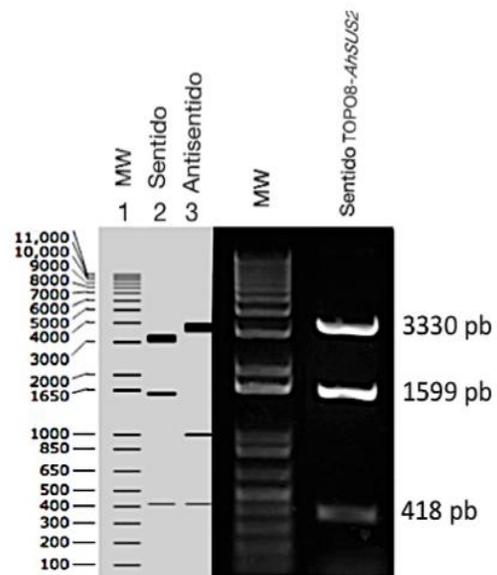


Figura 5. Simulación del patrón de bandeo para la construcción “Sentido” y “Antisentido” TOPO8-*AhSUS2* y la electroforesis de confirmación para la construcción en sentido de TOPO8-*AhSUS2*.

6.1.2 Verificación por restricción enzimática con XbaI, de la clonación en el vector pB7WG2D-*AhSUS2*

1.-Marcador de peso molecular:

“MW:1 Kb Plus DNA Ladder”

Tamaño de las bandas esperadas en:

2.-pB7WG2D- *AhSUS2*

1. 8095 pb

2. 3278 pb

3. 1653

4. 418 pb

3.- TOPO8-*AhSUS2*

1. 3330 pb

2. 1599 pb

3. 418 pb

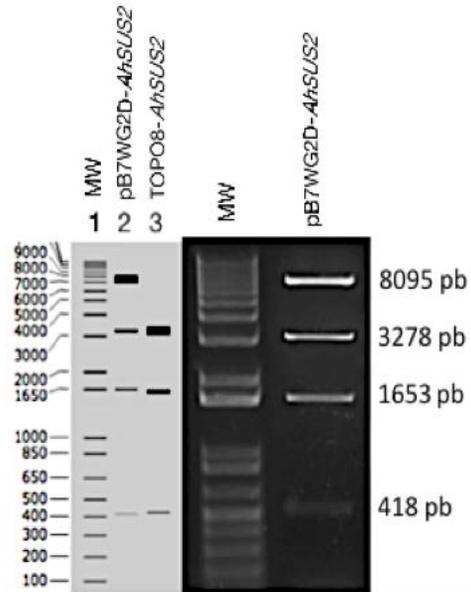


Figura 6. Simulación del patrón de bandeo para la construcción pB7WG2D-*AhSUS2* y TOPO8-*AhSUS2* y la electroforesis de confirmación para la construcción pB7WG2D-*AhSUS2*.

6.2 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR CON EL GEN *AhSUS3*

6.2.1 Verificación por restricción enzimática con XbaI y XhoI, de la clonación en el vector TOPO8-*AhSUS3*

1.-Marcador de peso molecular:

“MW:1 Kb Plus DNA Ladder”

Tamaño de las bandas esperadas en:

2.-Orientación sentido: TOPO8-*AhSUS3*

1. 2197 pb

2. 1834 pb

3. 1153 pb

3.-Orientación antisentido: TOPO8-*AhSUS3*

1. 3010 pb

2. 1153 pb

3. 1021 pb

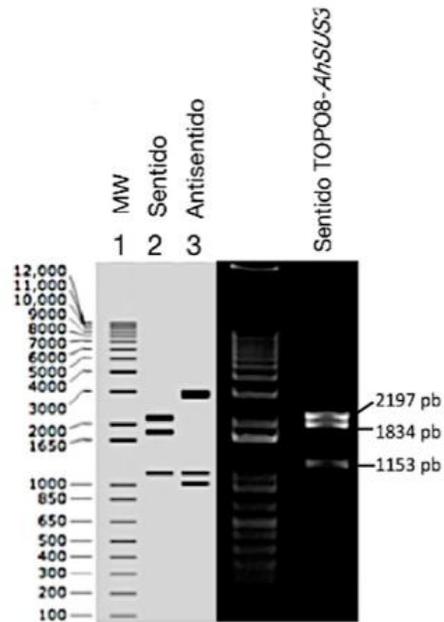


Figura 7. Simulación del patrón de bandeo para la construcción “Sentido” y “Antisentido” TOPO8-*AhSUS3* y la electroforesis de confirmación para la construcción en sentido de TOPO8-*AhSUS3*.

6.2.2 Verificación por restricción enzimática con BglI, de la clonación en el vector pB7WG2D-*AhSUS3*

1.- Marcador de peso molecular:

“MW:1 Kb Plus DNA Ladder”

Tamaño de las bandas esperadas en:

2.- pB7WG2D- *AhSUS3*

1. 3945 pb
2. 2605 pb
3. 2265 pb
4. 2059 pb
5. 853 pb
6. 413 pb
7. 386 pb
8. 312 pb

3.- TOPO8-*AhSUS3*

1. 5184 pb
2. 1599 pb
3. 418 pb

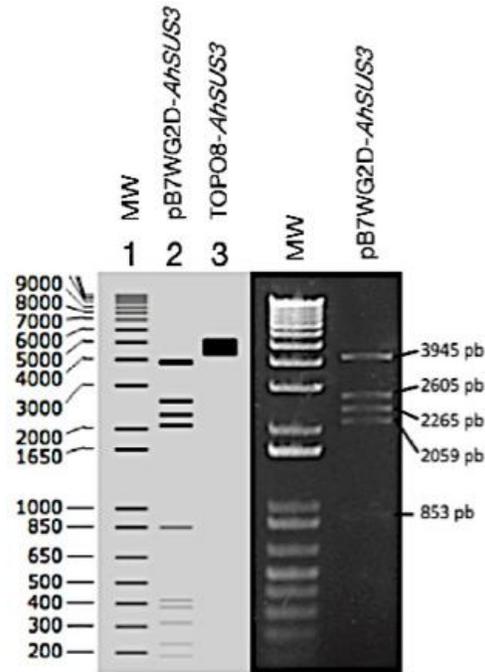


Figura 8. Simulación del patrón de bandeo para la construcción pB7WG2D-*AhSUS3* y TOPO8-*AhSUS3* y la electroforesis de confirmación para la construcción pB7WG2D-*AhSUS3*.

6.3 MEDIO DE SELECCIÓN PARA SEMILLAS DE AMARANTO TRANSFORMADAS

Para evitar la presencia de falsos transformantes, se realizaron varias pruebas previas a los protocolos de transformación, para establecer los límites de resistencia al herbicida glufosinato de amonio.

Debido a la disponibilidad del compuesto a lo largo del trabajo se utilizaron tres marcas comerciales de este compuesto, *Finale*[®] Ultra (Bayer, NJ, USA), Basta 20S (Hoechst, Frankfurt, Alemania) y glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones utilizadas de las diferentes marcas comerciales de glufosinato de amonio

Marca	Concentración
<i>Finale</i> [®] Ultra	5 mg/ L
Basta 20S	9 mg/ L

Para el uso del medio de selección con glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) se usaron tres diferentes concentraciones (10, 8.2, y 6.6 mg/ L) para la selección de las plantas F1 transformadas.

6.4 ESTANDARIZACIÓN DEL TIEMPO DE ESCARIFICACIÓN Y NÚMERO ONDAS DE CHOQUE ADECUADAS PARA LA TRANSFORMACIÓN CON EL VECTOR VACÍO (pB7WG2D)

Para favorecer la entrada de ADN al embrión, las semillas de amaranto se sometieron a un protocolo de escarificación. Se determinó que el tiempo necesario para someter las semillas en ácido sulfúrico 1 N para lograr un adelgazamiento de la testa fue de 5 min, debido a que tiempos mayores provocaron la muerte del embrión.

Una vez establecido el tiempo óptimo de escarificación de las semillas (5 min), se determinó, a continuación, el número de ondas de choque necesario para evitar daños en el embrión y lograr la transfección exitosa de ADN en la semilla.

Utilizando 100 y 200 ondas de choque, las semillas sembradas en medio MS sobrevivieron sin ningún efecto en su desarrollo en comparación con el control. A su vez, el uso de 300 y 400 ondas de choque generó plantas con fenotipos deformes debido al efecto de las ondas en la integridad del embrión, mientras que la aplicación de 500 ondas de choque inhibió por completo la germinación de las semillas.

Debido a que no se observaron problemas en el desarrollo de las plantas después de la aplicación de entre 100 y 200 ondas de choque, se eligió este número de ondas para el protocolo de transformación de semillas de amaranto.

6.5 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE SEMILLAS DE AMARANTO CON EL VECTOR pB7WG2D

Se realizó un ensayo inicial con el plásmido pB7WG2D que confiere resistencia a glufosinato de amonio, y que además es portador del gen reportero *GFP*, usando 100 y 200 ondas de choque.

Se obtuvieron tres plantas resistentes al medio de selección (preparado con el herbicida "Liberty"; 5 mg/ L) y dos con actividad de *GFP* en hojas jóvenes (Fig. 9) para plantas germinadas de semillas sometidas a 100 ondas de choque con 100 µg/ µL de ADN. A su vez, se obtuvieron ocho plantas resistentes al medio de selección (usando "Liberty"; 5 mg/ L) y 3 con actividad de *GFP* en hojas jóvenes de plantas generadas a partir de semillas sometidas a 200 ondas de choque y misma cantidad de ADN.

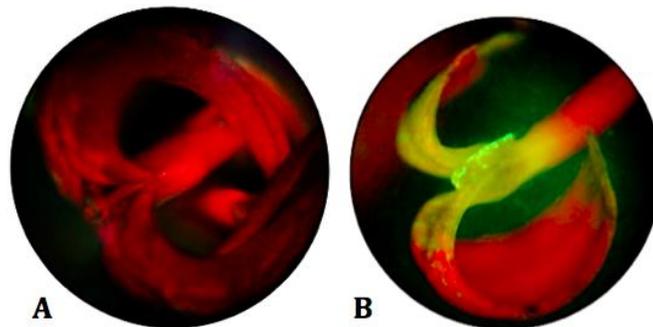


Figura 9. Expresión de la proteína verde fluorescente (*GFP*) en hojas jóvenes (A) planta control; (B) planta generada a partir de semillas sometidas a ondas de choque. Puede observarse un patrón muy localizado y exclusivo de expresión en hojas jóvenes.

Para el análisis por PCR se utilizaron 100 ng/ µL de ADN total de hoja de las 11 plantas resistentes al medio de selección y/o que presentaron actividad de *GFP*. Se obtuvo un fragmento del tamaño esperado para el gen reportero *GFP* de (812 pb) (Fig. 11), además de un fragmento de 272 pb, correspondiente al gen de selección *bar* en las plantas "3", "4", "9" y "10", así como para una muestra del plásmido pB7WG2D, usado como control positivo. (Fig. 10). Por el contrario, en la planta de amaranto no transformada o control, así como en el resto de las plantas analizadas, no se observó ningún producto de amplificación.

Debido a que 3 de las 80 plantas provenientes de las semillas sometidas a ondas de choque resultaron positivas al amplificar *bar* y *GFP* (i. e., plantas "3", "9" y "10") la eficiencia calculada para este protocolo usando 200 ondas de choque con 100 µg/ µL de ADN fue de 1.25%. A su vez, la eficiencia para el protocolo usando 100 ondas de choque con 100 µg/ µL de ADN, fue de 1.25% debido a que solo se obtuvo una planta positiva de las 80 plantas analizadas.

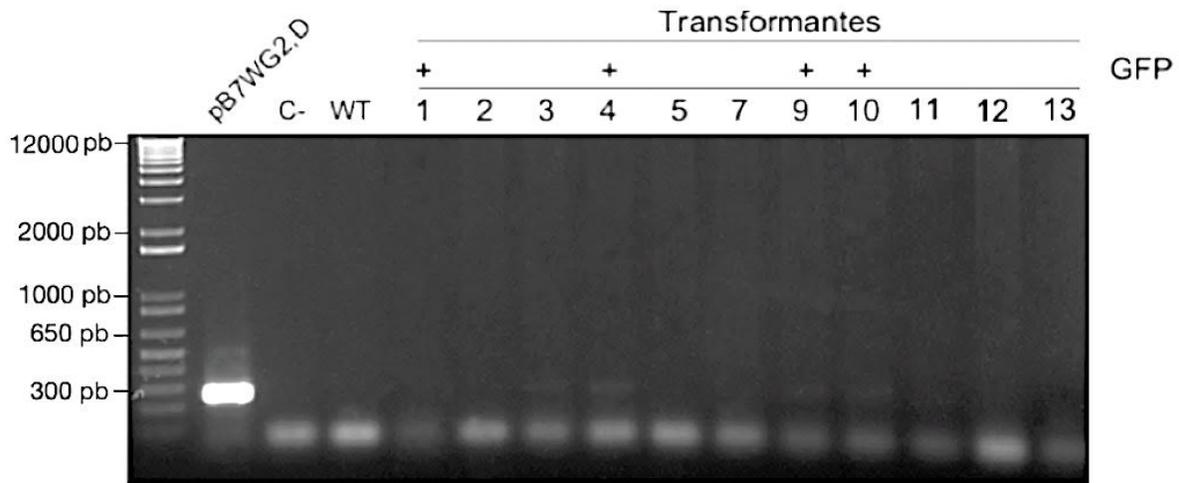


Figura 10. Gel de electroforesis para el análisis de los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen *bar* para las plantas generadas a partir de semillas sometidas a 100 y 200 ondas de choque. Carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2 control positivo (pB7WG2D). Carril 3 control negativo (agua, sin ADN). Carril 4 planta control no transformada. Carril 5-15 ADN genómico de plantas resistentes al medio de selección y/o *GFP* positivas. Este gel demuestra que las plantas “3”, “4”, “9” y “10”, portan el plásmido pB7WG2D, ya que la amplificación por PCR del gen de selección *bar* resultó positiva.

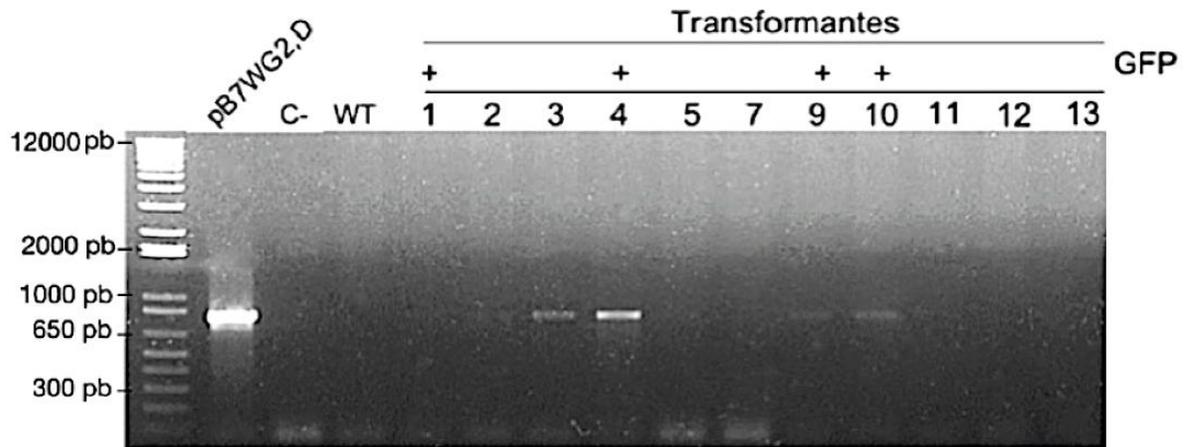


Figura 11. Gel de electroforesis para el análisis de los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen *GFP* para las plantas generadas a partir de semillas sometidas a 100 y 200 ondas de choque. Carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2 control positivo (pB7WG2D). Carril 3 control negativo (agua, sin ADN). Carril 4 planta control no transformada. Carril 5-15 ADN genómico de plantas resistentes al medio de selección y/o *GFP* positivas. Este gel demuestra que las plantas “3”, “4”, “9” y “10”, portan el plásmido pB7WG2D, ya que la amplificación por PCR del gen marcador *GFP* resultó positiva.

Para un escrutinio más fino de la actividad de *GFP*, se tomaron raíces de las plantas que resultaron positivas al amplificar los genes *bar* y *GFP* por PCR (i. e., plantas “3”, “4”, “9” y “10”), las cuales fueron observadas a una ampliación 20 x en un microscopio Olympus BX50 de epifluorescencia a 480 nm. Los resultados obtenidos muestran un patrón de fluorescencia uniforme para raíces transgénicas de *A. hypochondriacus* transformadas mediante *A. rhizogenes*, las cuales fueron usadas como control positivo. Por el contrario, las plantas “3”, “4”, “9” y “10” presentaron una expresión de menor intensidad, comparada con el control, al igual que “mosaicos”, o zonas que presentaron una mayor intensidad que otras a lo largo de la raíz (Fig. 12).

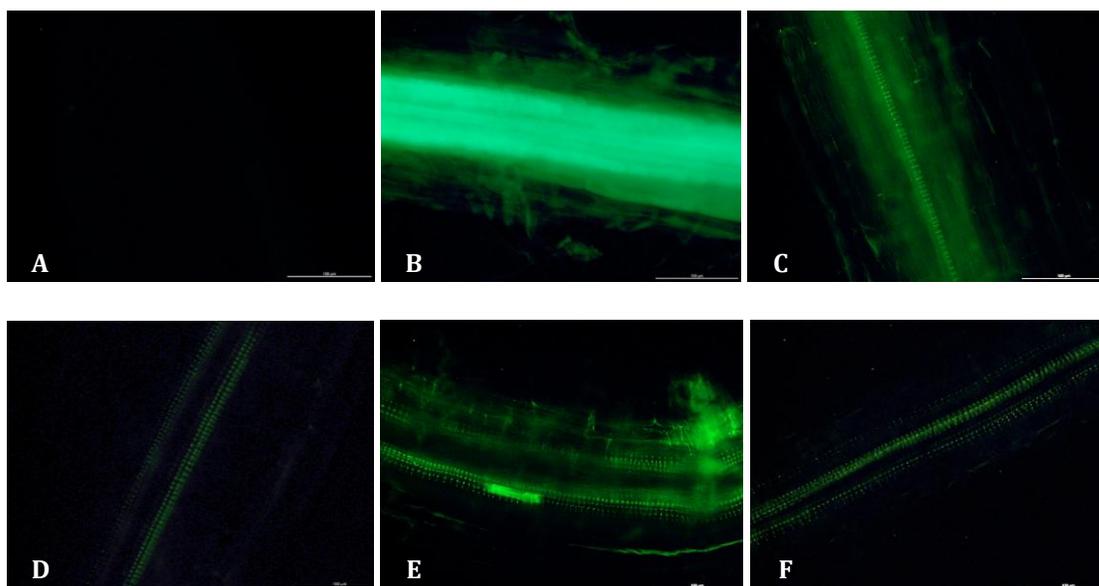


Figura 12. Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en raíz de las plantas de amaranto capaces de amplificar los genes *bar* y *GFP* por PCR. (A) Control negativo, raíz de planta no transformada; (B) control positivo, raíz pilosa, transformada por *A. rhizogenes*; (C), (D), (E) y (F) raíces de las plantas *GFP* positivas “3”, “4”, “9” y “10” respectivamente. Éstas fueron generadas a partir de semillas sometidas a ondas de choque para introducir ADN foráneo.

6.6 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE SEMILLAS DE AMARANTO CON LAS CONSTRUCCIONES PORTADORAS DE LOS GENES DE SACAROSA SINTASA

Para la construcción con el gen *AhSUS2* se obtuvieron 12 plantas resistentes al medio de selección (herbicida “Basta”, 9 mg/ L) usando 100 ondas de choque y 8 plantas usando 200 ondas de choque, de las cuales solo 5 presentaron actividad de *GFP* en hojas jóvenes (Fig. 13), mientras que para la transformación con el gen *AhSUS3* se obtuvieron cinco plantas resistentes al medio de selección (i. e., Basta, 9 mg/ L) usando 100 ondas de choque, una de las cuales presentaba actividad de *GFP* en hojas jóvenes. En este caso, sólo

se obtuvieron seis plantas resistentes al medio de selección usando 200 ondas de choque.

Con lo anterior, se llegó a un total de 31 plantas seleccionadas para realizar las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa para el gen reportero y de selección.

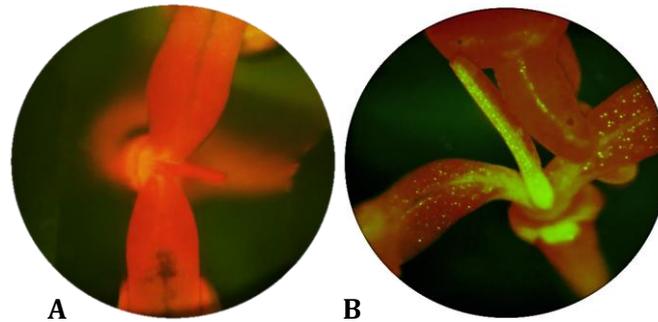


Figura 13. Expresión de la proteína verde fluorescente en hojas jóvenes. (A) Planta control; (B) planta generada a partir de una semilla sometida a ondas de choque. Puede observarse un patrón muy localizado y exclusivo de expresión de *GFP* en hojas jóvenes.

Para el análisis por PCR se utilizaron 150 ng/ μ L de ADN total de hoja en cada reacción. Sólo en 3 de las 31 plantas analizadas por PCR se obtuvo una amplificación positiva. Es decir, un fragmento del tamaño esperado para el gen reportero *GFP* (812 pb) (Fig. 14), y un fragmento de 272 pb (Fig. 15) para el gen de selección *bar* para las plantas "12", "15" y "18", así como en el control positivo (plásmido pB7WG2D). Por el contrario, el ADN extraído de la planta control no transformada, no mostró ninguna amplificación en la reacción de PCR.

Además, en dos de las tres plantas positivas pudo observarse la expresión de la proteína verde fluorescente en hojas jóvenes. Sin embargo, en un análisis más fino bajo el microscopio Olympus, operado a 470 nm, las tres plantas positivas presentaron actividad del gen reportero en raíz (Fig. 16). Aunque la expresión de *GFP* fue menos intensa comparada con el control positivo, similar al escrutinio realizadas con las plantas transformadas con el vector vacío (Fig. 12).

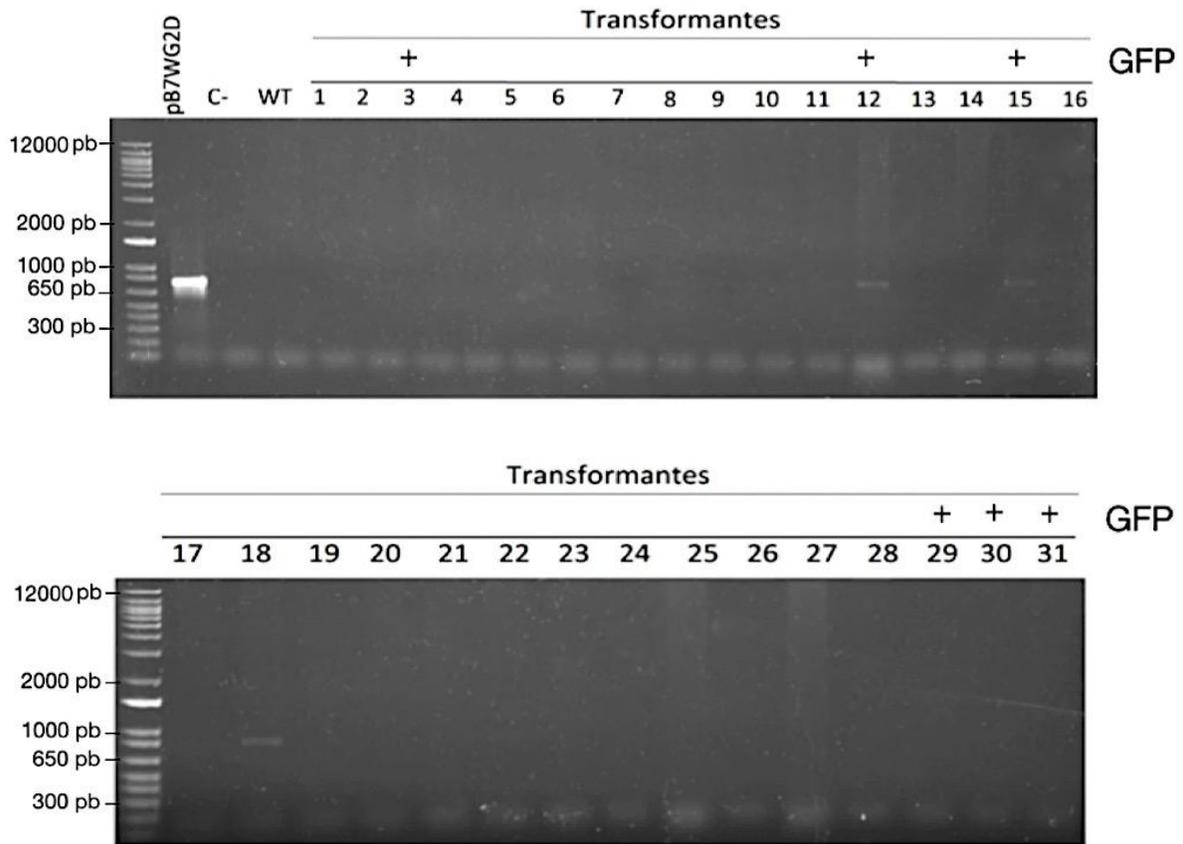
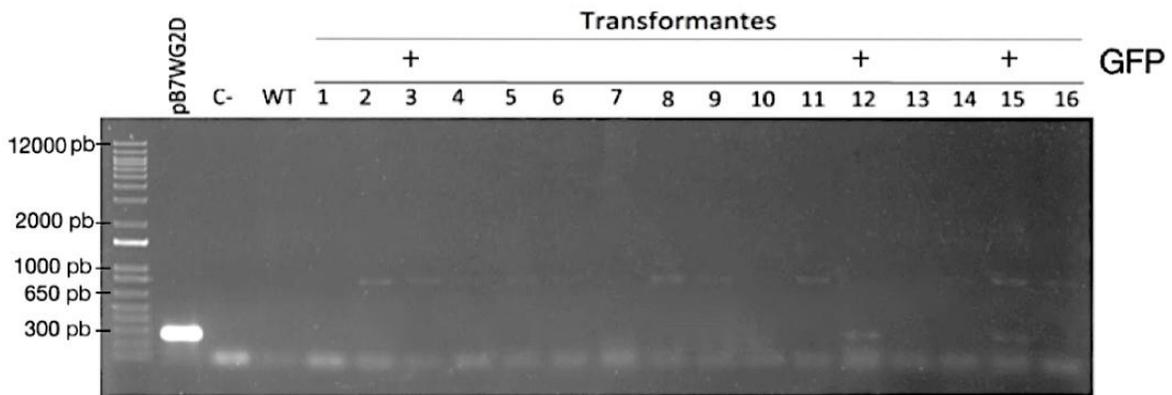


Figura 14. Geles de electroforesis para el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen *GFP* en plantas generadas a partir de semillas sometidas a 100 y 200 ondas de choque. Carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2 control positivo (pB7WG2D). Carril 3 control negativo (agua, sin ADN). Carril 4 planta control no transformada. Carril 5-31 ADN genómico de plantas resistentes al medio de selección y/o *GFP* positivas. Este gel demuestra que las plantas “12”, “15” y “18”, portan el plásmido pB7WG2D, ya que la amplificación por PCR del gen marcador *GFP* resultó positiva.



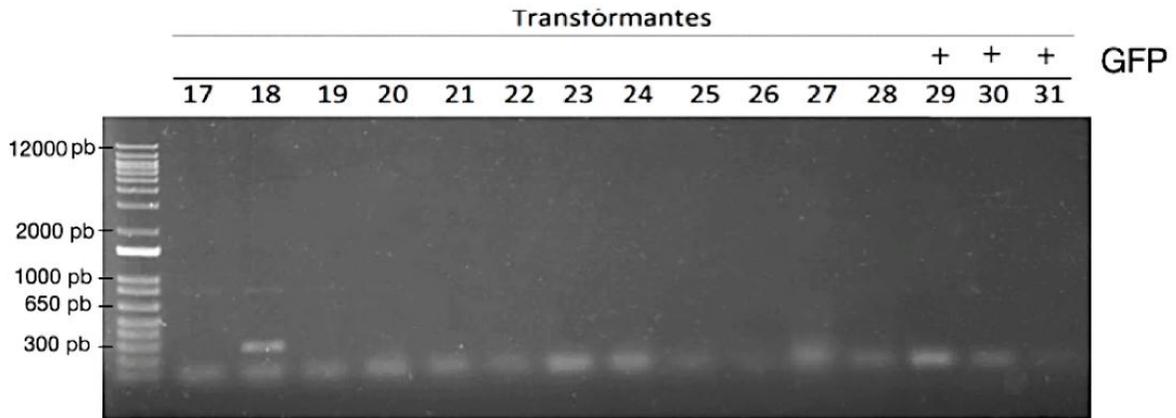


Figura 15. Geles de electroforesis para el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen *bar* en plantas generadas a partir de semillas sometidas a 100 y 200 ondas de choque. Carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2 control positivo (pB7WG2D). Carril 3 control negativo (agua, sin ADN). Carril 4 planta control no transformada. Carril 5-31 ADN genómico de plantas resistentes al medio de selección y/o *GFP* positivas. Este gel demuestra que las plantas "12", "15" y "18", portan el plásmido pB7WG2D, ya que la amplificación por PCR del gen de selección *bar* resultó positiva.

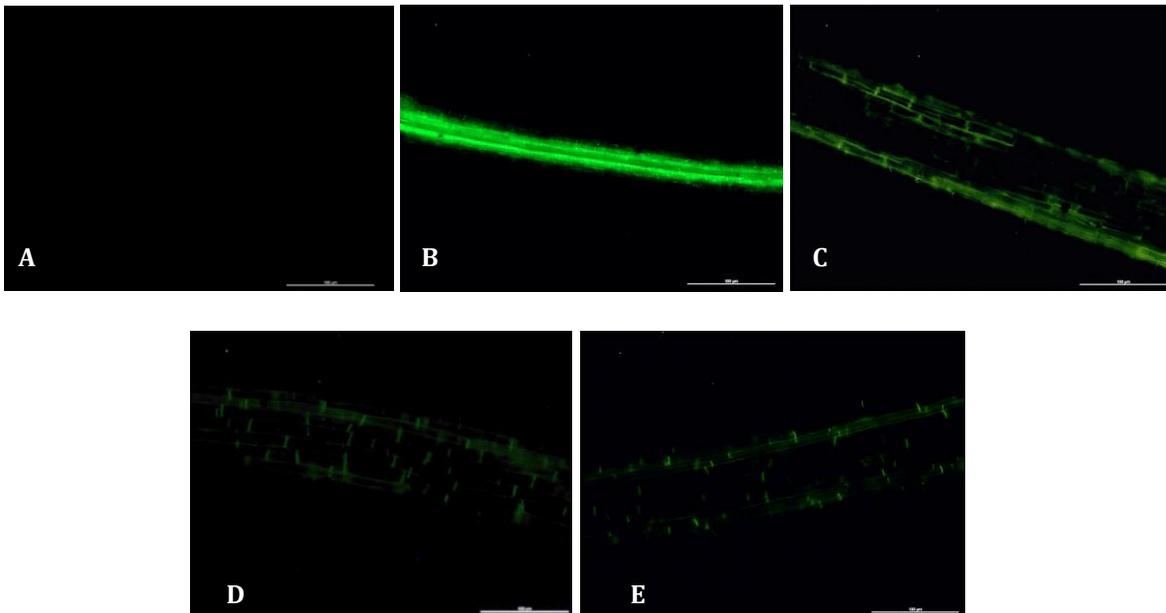


Figura 16. Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en raíces de plantas positivas a la amplificación por PCR de los genes *bar* y *GFP*. (A) Control negativo: raíz de planta no tratada; (B) control positivo, raíz pilosa transformada por *A. rhizogenes*; raíces de las plantas (C) "12"; (D) "15" y (E) "18", todas ellas generadas a partir de semillas sometidas previamente a ondas de choque.

Debido a que una de las 80 plantas sometidas a 200 ondas de choque usando *AhSUS2* resultó positiva usando tanto 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (i. E., planta "18") como 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (i. e., planta "15") de ADN, la eficiencia calculada en este protocolo fue de 1.25%

independientemente de la concentración de ADN utilizada, mientras que la eficiencia para el protocolo del gen *AhSUS3* usando 100 ondas de choque con 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADN fue igualmente de 1.25%, debido a que sólo se obtuvo una planta positiva (planta "12") de las 80 sometidas a este número de ondas de choque.

6.7 FENOTIPO DE LAS PLANTAS CONTROL Y LAS PLANTAS TRANSFORMADAS CON LOS GENES *AhSUS2* Y *AhSUS3* CAPACES DE AMPLIFICAR, POR PCR, LOS GENES *bar* Y *GFP*

La Figura 17 muestra el fenotipo de las plantas obtenidas de semillas sometidas a la transformación con genes de la sacarosa sintasa positivas a la PCR (paneles B, C y D) las cuales, en general, presentaron menor longitud y grosor del tallo en relación al control (panel A). La planta "15" (panel C) presentó el fenotipo más marcado, pues fue la planta de menor crecimiento vegetativo (en términos de grosor y longitud del tallo y área foliar) y un retraso en la floración, que fue de dos semanas con respecto al control. A su vez, la planta "19" (panel E) presentó un fenotipo contrastante con respecto al control y a las demás plantas transformadas mostradas en la figura, ya que tuvo una floración prematura, así como una mayor longitud y grosor del tallo mayor.



Figura 17. Fenotipo de la planta control comparada con plantas obtenidas de semillas sometidas a ondas de choque para permitir la transformación con dos genes de la sacarosa sintasa: *AhSUS2* y *AhSUS3*. (A) Planta control, no transformada; (B) planta "12" transformada con el gen *AhSUS3*; (C) planta "15" transformada con el gen *AhSUS2*; (D) planta "18" transformada con el gen *AhSUS2*; (E) planta "19", en la cual la amplificación por PCR de los genes marcadores y de selección resultó negativa.

6.8 ANALISIS DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN POR RT- qPCR Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA SACAROSA SINTASA EN HOJAS DE PLANTAS TRANSFORMADAS

6.8.1 Niveles de actividad enzimática *in vitro* de sacarosa sintasa

El análisis enzimático realizado muy probablemente reflejó la actividad total de SUS, derivada de las siete isoformas de la sacarosa sintasa presentes en amaranto, incluyendo las isoformas *AhSUS2* y *AhSUS3* expresadas en forma constitutiva en las plantas provenientes del tratamiento con ondas de choque (i. e., plantas “12”, “15” y “18”).

Los resultados obtenidos de la medición *in vitro* de la actividad enzimática se muestran en la Fig. 18. En ella, se observa que la actividad de la sacarosa sintasa para la mayoría de las plantas se encontró en un rango entre 0.27 (planta “4”) y 0.42 $\mu\text{moles/g FW}$ (planta “27”). Estos valores no fueron significativamente diferentes a los de las plantas control. Por otro lado, se detectó un claro incremento de la actividad de sacarosa sintasa en las plantas “12” y “18” positivas a la PCR (con excepción de la planta “15”) y en la planta “19”.

Las plantas “12” y “19” presentaron un incremento significativo de casi el doble de la actividad de sacarosa sintasa con respecto al control, mientras que la planta “18” mostró un incremento del doble de su actividad.

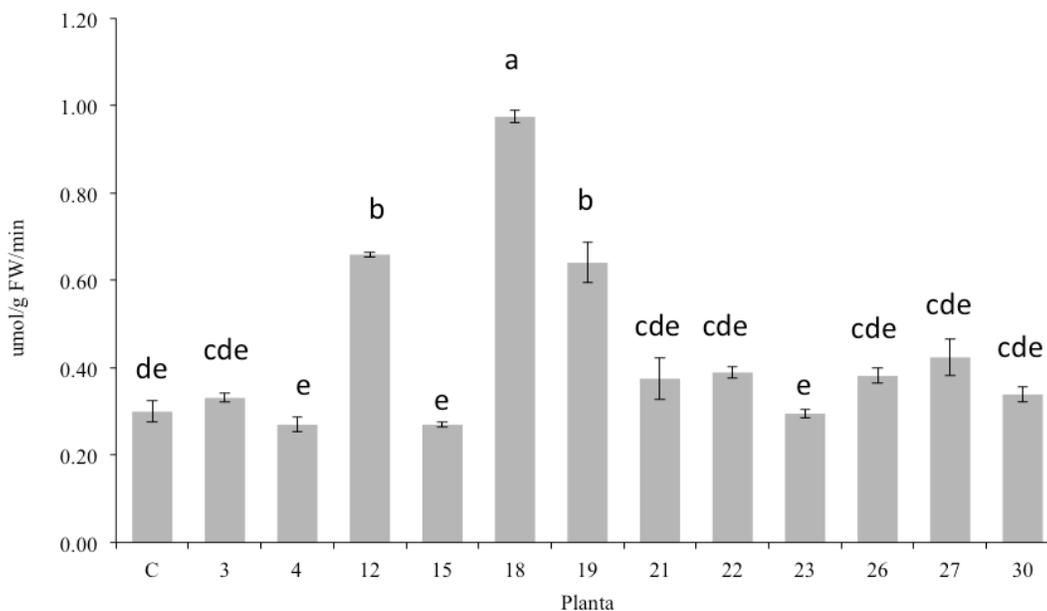


Figura 18. Actividad de sacarosa sintasa (SUS) en hojas de 13 plantas generadas a partir de semillas de amaranto sometidas a ondas de choque y positivas a la amplificación por PCR de *bar* y/o *GFP*. Las barras representan la media \pm DS de la actividad de SUS expresada como μmoles equivalentes de glucosa por gramo de peso fresco liberados por minuto. Sólo se encontraron cambios significativos en las plantas control, no tratadas, y en las plantas “12”, “18” y “19”. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Distintas letras sobre las barras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 14$).

6.8.2 Análisis de expresión mediante RT-qPCR

Los ensayos enzimáticos de la sacarosa sintasa se complementaron con un análisis de expresión por RT-qPCR de las isoformas *AhSUS2* y *AhSUS3*, empleadas para la transformación.

Para interpretar los resultados obtenidos por RT-qPCR mediante la relación $\Delta\Delta CT$, se partió de la abundancia relativa del control para ambos genes, que fue normalizada a 1. Por convención, valores de abundancia relativa mayores o iguales a 2 son tomados como una inducción de la expresión, mientras que valores menores o iguales a 0.5 indican una represión de la expresión.

Los resultados del análisis por RT-qPCR indicaron la expresión del gen *AhSUS2* se encontraba reprimida en las plantas transformadas “15” y “18”, mientras que los niveles de expresión de *AhSUS3* en las plantas “12” (transformada) y “19” permanecieron sin cambios (Fig. 19).

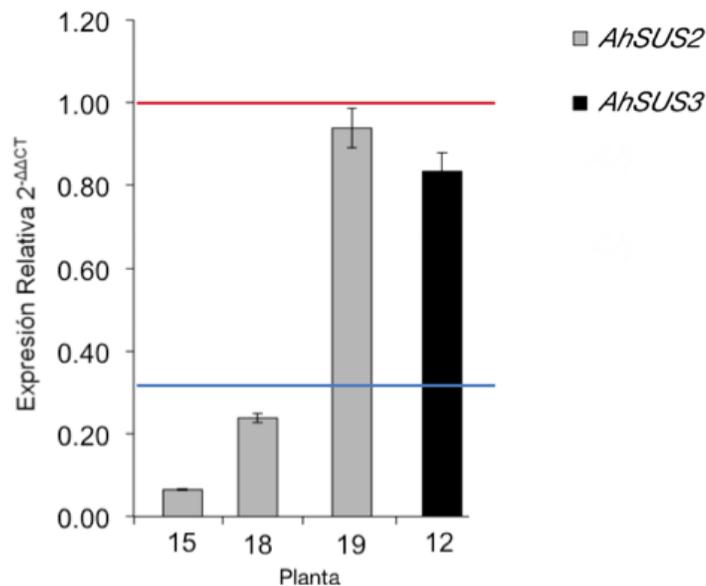


Figura 19. Expresión relativa de los genes de la sacarosa sintasa *AhSUS2* y *AhSUS3* en plantas de amaranto transformadas (“12”, “15” y “18”) y en la planta “19”. Las barras muestran la media \pm DS. La línea en azul representa el límite debajo del cual se considera que la expresión está reprimida. La línea roja representa la abundancia relativa del control para ambos genes que se encuentra normalizada a 1. Las barras grises representan a las plantas transformadas con el gen *AhSUS2* y la barra negra a la planta 12 transformada con el gen *AhSUS3*. Las plantas transformadas “15” y “18” presentan una expresión relativa del gen *AhSUS2* reprimida, mientras que tanto la planta transformada “12” como la planta “19” que no fue positiva a la transformación, no presentan una diferencia en la abundancia relativa del gen *AhSUS3* y *AhSUS2*, respectivamente.

6.9 ANÁLISIS DE LA HEREDABILIDAD DEL ADN FORÁNEO EN LA GENERACIÓN F1 DE LAS PLANTAS TRANSFORMADAS CON EL VECTOR pB7WG2D

Los resultados del análisis de PCR para el gen marcador *GFP* y el gen de selección *bar* de las semillas correspondientes a la generación F1 de las plantas transformadas con el vector vacío pB7WG2D fueron negativos para ambos genes (Figs. 20 y 21). De manera que las plantas transgénicas generadas por la exposición de semillas a ondas de choque no mostraron un patrón de heredabilidad estable del vector pB7WG2D a la siguiente generación de semillas (F1).

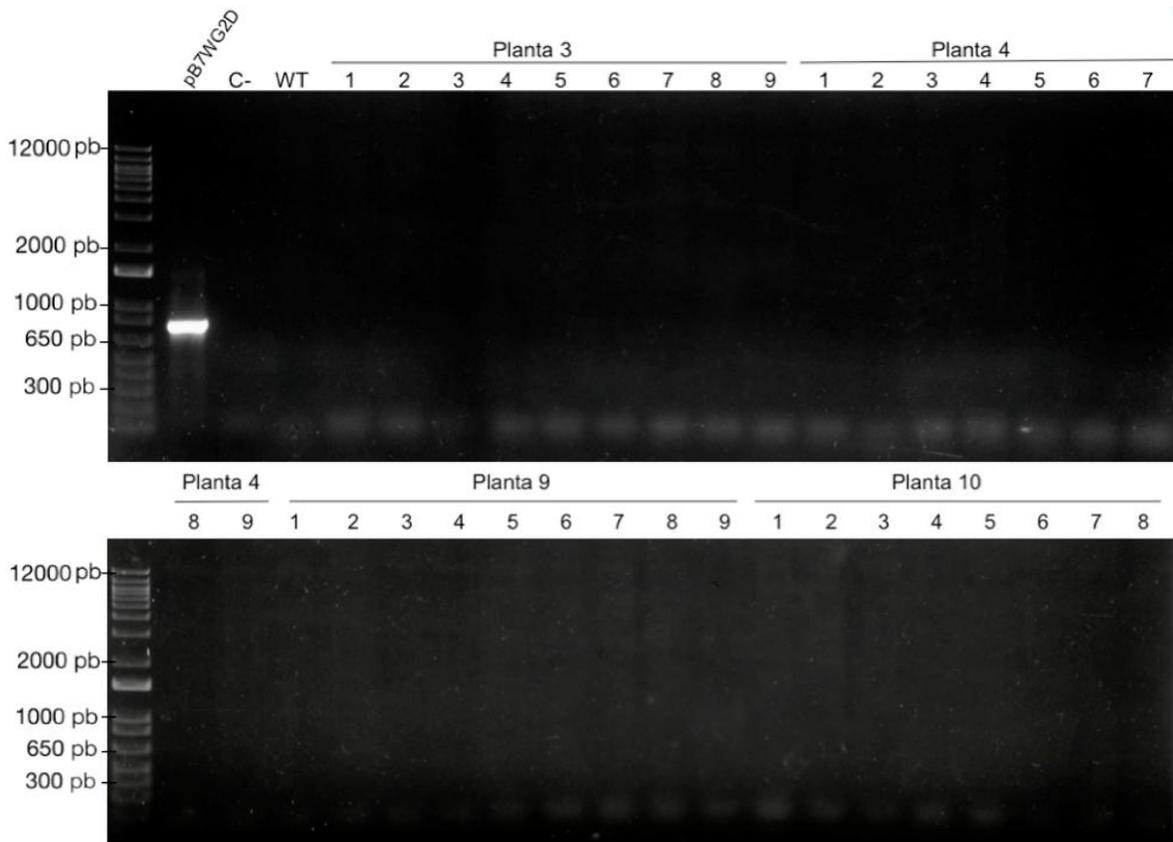


Figura 20. Geles de electroforesis para el análisis de la amplificación por PCR del gen marcador *GFP* en plántulas germinadas a partir de las semillas (F1) producidas por plantas generadas originalmente de semillas sometidas a ondas de choque. Carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2 control positivo (pB7WG2D). Carril 3 control negativo (agua, sin ADN). Carril 4 planta no transformada. Carril 5-40 ADN genómico de plantas F1 provenientes de las plantas transformadas únicamente con el vector vacío (Planta "3", "4", "9" y "10"; ver arriba). Este gel demuestra que ninguna de las plantas analizadas, provenientes de la F1, portan el plásmido pB7WG2D, ya que la amplificación por PCR del gen marcador *GFP* resultó negativa.

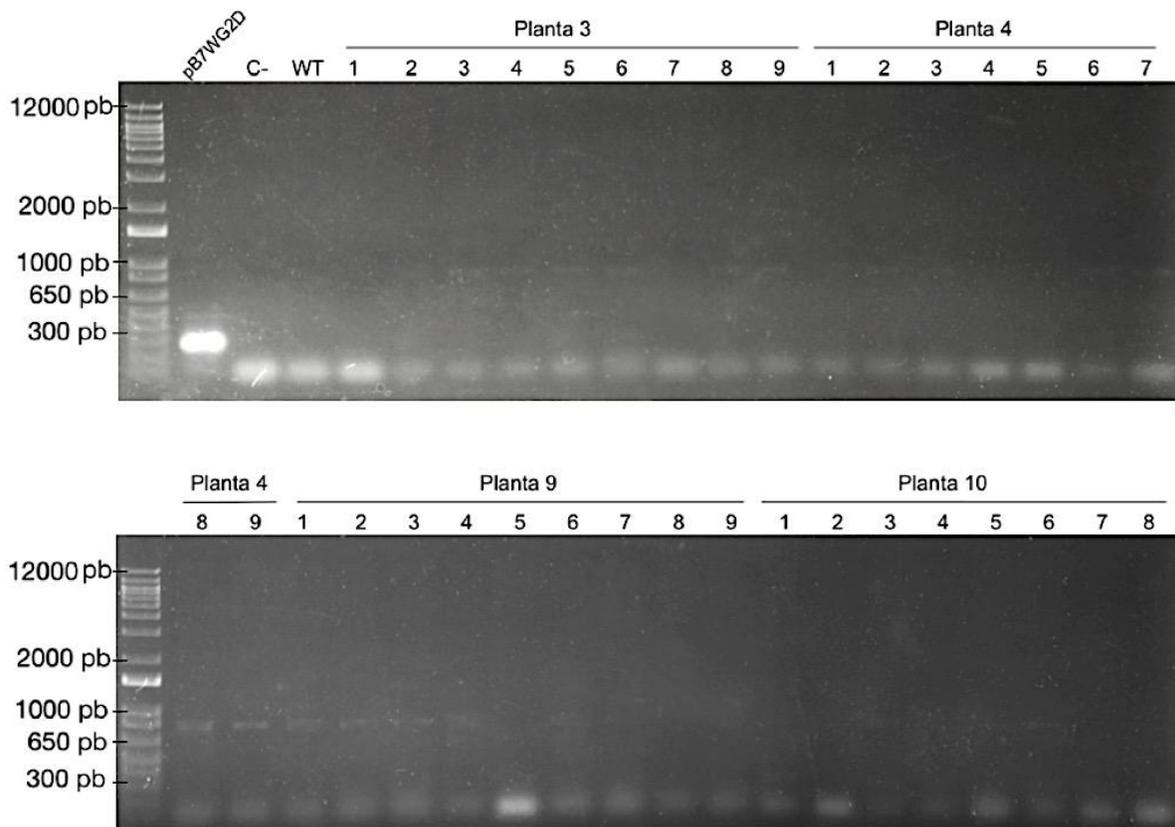


Figura 21. Geles de electroforesis para el análisis de la amplificación por PCR del gen de selección *bar* en plántulas germinadas a partir de las semillas (F1) producidas por plantas generadas originalmente de semillas sometidas a ondas de choque. Carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2 control positivo (pB7WG2D). Carril 3 control negativo (agua, sin ADN). Carril 4 planta no transformada. Carril 5-40 ADN genómico de plantas F1 provenientes de las plantas transformadas únicamente con el vector vacío (Planta "3", "4", "9" y "10"; ver arriba). Este gel demuestra que ninguna de las plantas analizadas, provenientes de la F1, portan el plásmido pB7WG2D, ya que la amplificación por PCR del gen de selección *bar* resultó negativa.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Selección de plantas de amaranto transgénicas mediante análisis por PCR

Fue posible detectar, por PCR, plantas transformantes de amaranto que contenían el gen de selección *bar*, que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio y el gen marcador *GFP*, que codifica a la proteína verde fluorescente. Se amplificó un fragmento específico de 272 pb para *bar* y el fragmento de 812 pb para *GFP*, tanto en las plantas transformadas con el vector vacío únicamente (Fig. 10 y 11), así como en plantas transformadas con construcciones diseñadas para sobre expresar los genes *AhSUS2* y *AhSUS3*, codificantes de 2 isoformas de la sacarosa sintasa presentes en amaranto de grano, respectivamente. Estos fragmentos no pudieron detectarse en plantas control no transformadas (Fig. 14 y 15). A pesar de que se partió de una concentración de 150 ng de ADN para todas las muestras, en el análisis de PCR se obtuvieron bandas tenues, aunque de diferente intensidad, lo que puede estar determinado por el número de células transformadas y/o el número de copias presentes en cada célula transformada, pues es sabido que una estimación de la cantidad de ADN en una banda de ADN particular está en función de su intensidad (Lee *et al.*, 2012).

Aunque los mecanismos precisos que dan paso a la transformación de células por ondas de choque permanecen desconocidos (Loske, 2017), se reconoce a la cavitación acústica como el fenómeno físico necesario para la transformación celular (Jagadeesh *et al.*, 2004; Loske *et al.*, 2011). Lo anterior, basado en reportes que describen que la cavitación acústica generada por la propagación de ondas de choque en el agua provoca el colapso de las microburbujas en el medio, emitiendo ondas de choque secundarias y pequeños chorros de líquido de velocidades considerables llamados “microjets” los cuales, se cree, son los causantes de un aumento transitorio de la permeabilidad de la membrana celular, permitiendo la entrada de macromoléculas contenidas en el fluido que rodea las células (Gambihler *et al.*, 1994; Lauer *et al.*, 1997; Ohl e Ikink, 2003; Arora *et al.*, 2005; Zarnitsyn *et al.*, 2008). Por medio de este proceso, se ha logrado la integración exitosa de ADN exógeno en células bacterianas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium* (Jagadeesh *et al.*, 2004; Divya Prakash *et al.*, 2011), y en hongos de diferentes géneros, como *A. niger*, *F. oxysporum*, *T. reesei*, *P. chrysosporium* y *M. fijiensis* (Magaña-Ortíz *et al.*, 2013; Escobar-Tovar *et al.*, 2015), y en diferentes tipos de células animales (Lauer *et al.*, 1997).

Los resultados reportados en este trabajo demuestran que la transformación mediada por ondas de choque es una herramienta eficaz para la inserción de genes heterólogos en semillas de amaranto. Se encontró que la eficiencia de inserción de ADN foráneo fue baja, oscilando entre 1.25 y 3.75 %, con la ventaja de que el tiempo requerido para la transformación y la laboriosidad del trabajo involucrado en el proceso, se redujo en comparación con otros métodos. El porcentaje de eficiencia descrito en los trabajos de transformación genética de amaranto más prometedores reportados hasta ahora, como el de la transformación de raíces de *A. hypochondriacus* mediado por *A. rhizogenes* (Castellanos, resultados no publicados), y el protocolo de transformación de *A. retroflexus*

por inmersión floral (Kuluev *et al.*, 2017) fue entre 15.6% y 27%, y de 1.4%, respectivamente.

Sin embargo, para el protocolo de inmersión floral, Kuluev *et al.* (2017) indicaron que, si bien, éste resultó ser un método prometedor, económico y productivo para transformar amaranto, fue aun necesario el uso de otro gen selectivo (*hptII*, que confiere resistencia a higromicina) o la necesidad de realizar análisis por PCR en todas las plantas tratadas, pues se presentaron diversos problemas para la selección de sus transformantes, aun realizando una doble selección con higromicina combinada con la búsqueda del fenotipo deseado. Estos detalles le confieren al método cierto grado de subjetividad e incrementan la laboriosidad del mismo.

Como se mencionó anteriormente, el protocolo de transformación de raíces de *A. hypochondriacus* por *A. rhizogenes* permitió elevar la eficiencia de transformación entre 15.6% y 27% (Castellanos, resultados no publicados). Sin embargo, los métodos de regeneración de plantas completas a partir de raíces pilosas de *A. hypochondriacus* (Castellanos, resultados no publicados) o de brotes de células indiferenciadas para otras especies de amaranto, permanecen sin desarrollar (Kuluev *et al.*, 2017).

7.2 Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP)

La presencia de la actividad del gen marcador *GFP* para la selección de plantas creciendo en el medio de selección, permitió seleccionar plantas putativamente transformadas. Curiosamente, el patrón de expresión de *GFP* fue localizado e irregular, observándose sólo en hojas jóvenes emergentes que aún eran fotosintéticamente inmaduras. Este patrón podría haberse presentado debido a que *GFP* es difícilmente detectable en hojas maduras por la interferencia del alto contenido de clorofila que compite fuertemente al absorber energía lumínica para fluorecer en la misma longitud de excitación usada por *GFP*, evitando así que ésta última pueda ser detectada (Zhou *et al.*, 2005; Faize *et al.*, 2010).

Para comprobar si la expresión del vector de transformación empleado en este estudio era uniforme en intensidad y distribución a lo largo del tejido de raíz, se realizó un escrutinio de la expresión de *GFP* en raíces de plantas *GFP* positivas por PCR. El patrón detallado de expresión del vector insertado en células de la raíz, señaló importantes tendencias que concordaron con los análisis de PCR. De modo que la expresión de *GFP* en las raíces, tanto de las plantas transformadas con el vector vacío como con las plantas transformadas con las construcciones de la sacarosa sintasa, presentaron un patrón de expresión de *GFP* irregular y débil a lo largo de la raíz, en comparación con las raíces de *A. hypochondriacus* transformadas mediante *A. rhizogenes* que presentaron una intensidad mayor y uniforme de *GFP*, debido a la expresión constitutiva de la misma. Asimismo, el patrón de expresión irregular, observado tanto en raíces como en hojas jóvenes, sugiere que la transformación por ondas de choque genera una mezcla, o mosaico, de células transformadas y no transformadas en estos tejidos. Lo anterior sugiere que las plantas

transgénicas generadas podrían ser plantas quiméricas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que Soboleski *et al.* (2005) indicaron que cambios en la intensidad de la expresión de *GFP* podrían deberse, también, a un reducido número de copias insertado en el ADN de las plantas o a una disminución de la abundancia de ARNm de *GFP* en las células. En referencia a lo anterior, el patrón variable de intensidad concuerda con evidencia experimental que señala la posibilidad de la inserción de dos o hasta de más de cuatro inserciones de copias de ADN exógeno mediante el uso de ondas de choque en hongos (Escobar-Tovar *et al.*, 2015). Lo anterior sugiere que el patrón variable de intensidad observado en la raíz de plantas de amaranto transformadas por ondas de choque podría haberse debido a la inserción de varias copias cuando el embrión de las semillas fue sometido a las ondas de choque.

Por otro lado, la ausencia de reportes de obtención de organismos quiméricos mediante el uso de ondas de choque se debe a que los trabajos que han publicado resultados exitosos mediante el uso de la transformación con este método, lo han logrado usando sólo células procariotas (Jagadeesh *et al.*, 2004; Divya Prakash *et al.*, 2011) o en el caso de eucariotas, haciendo uso sólo de células de mamífero en suspensión o conidios de hongos (Lauer *et al.*, 1997; Magaña-Ortiz *et al.*, 2013; Escobar-Tovar *et al.*, 2015), lo que evade, *per se*, la posibilidad de obtener quimeras.

7.3 Características morfológicas de plantas de amaranto transgénico

La transformación de plantas de amaranto de grano con dos genes de la sacarosa sintasa en este trabajo, mostró que la sobreexpresión constitutiva de los mismos generó plantas transgénicas que se caracterizaron por una evidente disminución del área foliar, y del grosor y longitud del tallo, en comparación con el control (Figura 17). Sin embargo, estos fenotipos negativos contrastan con varios otros estudios que han mostrado que la sobreexpresión de los genes de la sacarosa sintasa en plantas tiene un impacto positivo en la producción de biomasa (Goren *et al.*, 2017), lo que concuerda con el concepto de las enzimas de la sacarosa sintasa como determinantes principales del crecimiento de las plantas (Tang y Sturm, 1999). En este sentido, estudios previos sobre la sobreexpresión de genes de la sacarosa sintasa en otras plantas, reportaron un aumento en la altura de plantas de tabaco (Coleman *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2015) y un aumento de la superficie foliar, así como un desarrollo temprano en plantas de papa (Xu *et al.*, 2012).

No obstante lo anterior, en nuestras plantas transformadas de amaranto ocurrió lo contrario. Esto sugiere que pudo haberse presentado un evento de silenciamiento de los dos genes de la sacarosa sintasa introducidos (i. e., *AhSUS2* y *AhSUS3*), situación que podría explicar, al menos parcialmente, el efecto negativo observado en el desarrollo de las plantas de amaranto. En sintonía con esta propuesta, se describen los resultados reportados en plantas de zanahoria silenciadas en un gen de la familia de la sacarosa sintasa (Tang y Sturm, 1999). Este silenciamiento condujo a un efecto negativo en su desarrollo, reduciendo no sólo el tamaño de la planta y el de sus raíces, sino también en su superficie foliar.

7.4 Cuantificación de la expresión génica

El método de RT-qPCR permite medir la síntesis de ARNm a partir de complejos de transcripción posibilitando la estimación de la actividad transcripcional de los genes de interés. Los resultados de la estimación de la acumulación de transcritos del gen *AhSUS2* sugieren fuertemente que la expresión de este gen en las plantas transformadas, representadas con los números “15” y “18”, se encontraba reprimida, lo que sugiere que el gen había sido silenciado.

El fenómeno del silenciamiento génico se ha observado en muchas especies de plantas como resultado de la sobreexpresión y en general se caracteriza por causar un efecto contrario al deseado, es decir, la expresión disminuida de gen(es) insertado(s) en plantas T0 o en sus progenies segregantes (Pickford y Cogoni, 2003). Un factor que a menudo se ha asociado con el silenciamiento génico es el abundante número de copias insertado en las células (Stam *et al.*, 1997). En este sentido, existe la posibilidad de que las plantas que resultaron positivas después de los ensayos de PCR hayan presentado regiones ricas en células con copias múltiples. Lo anterior se deduce de los patrones de expresión de *GFP* observados en raíces y hojas jóvenes. El impacto del número de copias en la expresión de transgenes ha sido evaluado por varios autores, donde las secuencias repetidas se han implicado en el silenciamiento génico (Selker, 1999). Un estudio de Xu-Gang *et al.* (2002), mostró que algunas plantas de tabaco transformadas con *35S-GUS* presentaron una alta actividad del gen *uidA* (que codifica a la enzima GUS) en líneas de tabaco transgénicas con una o dos copias, mientras que las plantas con tres a cuatro copias no mostraron actividad GUS. Del mismo modo, Lechtenberg *et al.* (2003) encontraron que el silenciamiento del gen *uidA* en construcciones reguladas por el promotor constitutivo CaMV35S insertado en plantas transgénicas de *Arabidopsis* se producía cuando los genes indicadores se encontraban repetidos en tándem. Asimismo, Ma y Mitra (2001) demostraron que bastaban 3 o 4 repeticiones directas de *GFP* impulsadas por el promotor constitutivo 35S para inducir el silenciamiento de este gen reportero en plantas de tabaco. Por otro lado, Iglesias *et al.* (1997) también propusieron como las causas de silenciamiento, el número de copias y el efecto posicional de los transgenes.

Por otro lado, el uso de transgenes homólogos también se ha asociado con el silenciamiento génico, que se conoce como “silenciamiento génico dependiente de homología” (o “HDGS” por sus siglas en inglés) (Kooter *et al.*, 1999). HDGS puede ocurrir a nivel transcripcional (Meyer *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1996) o postranscripcional (English *et al.*, 1997), dependiendo de que múltiples copias de genes compartan homología en promotores o secuencias transcritas, respectivamente. En primer lugar, el silenciamiento génico transcripcional (TGS) es el resultado de un bloqueo en la síntesis de ARN, es decir que resulta de la inactivación del promotor, mientras que el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) implica la degradación selectiva de ARN homólogos en el citoplasma (Matzke *et al.*, 2002). Éste último, también es conocido por servir para varios otros fines en la planta como: i) un sistema inmunitario, basado en el reconocimiento de ARN foráneo, que desencadena respuestas de defensa al detectar la invasión de genes

extraños provenientes de virus (Incarbone y Dunoyer, 2013; Pumplin y Voinnet, 2013); ii) un mecanismo de regulación de genes endógenos (Cogoni y Macino, 2000; Wilson y Doudna, 2013); y iii) un mecanismo de represión de transgenes (Gazzani *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2013).

Un tipo de silenciamiento génico postranscripcional dependiente de la homología (i.e., PTGS) (Escobar y Dandekar, 2003), donde se ve afectada la expresión de un transgen y su homólogo endógeno, se conoce como co-supresión debido a que tanto los genes endógenos como los transgenes se silencian (Stam *et al.*, 1997). Dos estudios de co-supresión que se asemejan al realizado en este trabajo fueron los realizados por Van der Krol *et al.* (1990), y Napoli *et al.* (1990), quienes utilizaron plantas de petunia transformadas con el gen de la chalcona sintasa (*CHS*), el cual es un gen que pertenece a una pequeña familia multigénica (como la sacarosa sintasa), la cual está relacionada con la ruta de biosíntesis de antocianinas en flores de petunia, entre otros tejidos (Flavell *et al.*, 1994). Ambos trabajos mostraron que un aumento en el número de copias de *CHS* bajo la regulación de un promotor constitutivo fuerte daba origen a una disminución de la abundancia del ARNm de los genes transgénicos e incluso de sus homólogos endógenos, que se manifestó en los pétalos de las flores, los cuales lucían total o parcialmente blancos (Van der Krol *et al.*, 1990; Napoli *et al.*, 1990). Estos resultados concuerdan con lo observado en las plantas “15” y “16” transformadas con *AhSUS2*, que también es un gen endógeno de plantas de amaranto, el que al ser expresado pudo haber provocado una reducción en la abundancia de transcritos.

Además, se sabe que pueden presentarse muchos niveles de co-supresión en la actividad de transgenes debido a la variedad de patrones de pigmentación que presentaban las flores de petunia (Flavell *et al.*, 1994). Lo anterior puede contribuir a explicar el patrón fenotípico variable obtenido en las plantas de amaranto transformadas con genes *AhSUS*, más marcado en una planta que en otra, y las variaciones en la actividad enzimática medida *in vitro*, tan diferente en ambas plantas, a pesar de haber sido transformadas con el mismo gen *AhSUS2*.

Un modelo atractivo que explica el silenciamiento invocado por un efecto de transgenes altamente expresados es el llamado “modelo umbral”, que usualmente aplica para genes que se encuentran sobreexpresados, como los genes de la sacarosa sintasa (*AhSUS2* y *AhSUS3*) utilizados en este trabajo y que se encontraban bajo un promotor constitutivo fuerte, como el CaMV35S (Stam *et al.*, 1997). En este modelo, los transgenes producen tal cantidad de ARN que el nivel excede un umbral crítico, lo que desencadena un mecanismo que elimina específicamente todos los ARN homólogos independientemente de su origen (Stam *et al.*, 1997). Este modelo de umbral de ARN obtuvo apoyo a partir de observaciones mediante las cuales se correlacionó con transgenes altamente expresados (Lindbo *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1994; Goodwin *et al.*, 1996; Elmayan y Vaucheret, 1996), similar a la co-supresión del gen *CHS* en transformantes de petunia (Metzlaff *et al.*, 1996). A pesar de la evidencia, aun no se sabe si la reducción de transcritos resulta de la

inestabilidad del ARN, de la activación de un proceso de degradación del ARN específico de la secuencia o de una combinación de ambos (Stam *et al.*, 1997).

Un mecanismo que explica la posible degradación del ARN puede ser mediante la participación de ARN polimerasas dependientes de ARN (RdRP) (Schiebel *et al.*, 1993; Lindbo *et al.*, 1993; Dougherty y Parks, 1995) que sintetizan ARNc a partir de ARNm diana o blanco (e. g., proveniente del transgen). Se cree que los ARNc producidos hibridizan con los ARNm diana dando origen a ARN de doble cadena (dsRNA), el cual es reconocido y procesado por proteínas de la familia Dicer (Hutvagner, 2001; Xie *et al.*, 2004). Posteriormente, los dsARN puede cargarse en un complejo de silenciamiento que contiene Argonauta (AGO), más un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que darán origen a ARN interferentes pequeños (siARN) que generaran la ruptura del ARNm del transgen y de los ARNm endógenos homólogos o la inhibición traduccional (Vaucheret *et al.*, 2001; Vance y Vaucheret, 2001; Escobar *et al.*, 2003; Sontheimer, 2005; Fabian *et al.*, 2010; Loginova *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015).

7.5 Actividad enzimática

Se podría hipotetizar que una actividad transcripcional de *AhSUS2* reducida sería capaz de afectar el fenotipo de la planta. Al estar reprimidos los transcritos de *AhSUS2*, de las plantas “18” y “15”, sería posible generar algunas suposiciones tomando en cuenta los resultados obtenidos de la actividad enzimática. De modo que la planta “18” presentó un efecto inductivo significativo en la actividad de sacarosa sintasa a pesar de que ésta no fue acompañada por la inducción de *AhSUS2*. Este escenario aparentemente contradictorio sugiere un cambio en el estado metabólico de la planta, que al detectar una disminución en la abundancia de transcritos de *AhSUS2*, posiblemente intentó compensar la función de esta enzima aumentando la actividad del resto de las isoformas de la familia de la sacarosa sintasa, para lograr un desarrollo normal en la planta.

La planta “15”, que también presentó represión en la acumulación de transcritos de *AhSUS2*, pero que, a diferencia de la planta “18”, mostró una actividad enzimática normal, se pudo observar un fenotipo muy contrastante (Fig. 17C), caracterizado por un menor crecimiento vegetativo (en términos de grosor y longitud del tallo, y área foliar) y un retraso en la floración de dos semanas con respecto al control. Este fenotipo podría haberse debido, en cambio, a la ausencia del efecto de compensación por el resto de los genes de la familia de la sacarosa sintasa para lograr un desarrollo normal, como se sugirió en el caso de la planta “18”. Ambos escenarios son contrastantes y la razón para que se presentaran sólo en una de las dos plantas analizadas se desconoce. Sin embargo, en ambos casos sugiere la fuerte participación del gen de *AhSUS2* en procesos importantes del desarrollo y maduración de las plantas de amaranto.

A pesar de que las plantas “15” y “18” fueron transformadas con el mismo gen (*AhSUS2*) bajo las mismas condiciones, éstas presentaron diferentes fenotipos y niveles de expresión génica. Se sabe que la variabilidad en la expresión transgénica en transformantes independientes de un determinado gen podría deberse a varios factores,

incluyendo diferencias con respecto a la ubicación cromosómica de la inserción, el número de copias insertadas y a que el proceso de transformación genética resulte en la generación de plantas quiméricas (Matzke y Matzke 1998; Kooter *et al.*, 1999; Domínguez *et al.*, 2004).

Para concluir el análisis con el gen de la sacarosa sintasa 2, se incluye la descripción de la planta "19" que generó resultados negativos al ser analizada por PCR, pero que presentó un fenotipo contrastante con respecto al control por su maduración temprana y su alto desarrollo vegetativo (i. e., floración prematura, así como longitud y grosor del tallo significativamente mayor con respecto a la planta control). A pesar de lo anterior, presentó un comportamiento normal en cuanto al número de transcritos para el gen *AhSUS2*, lo cual era lo esperado en una planta aparentemente no transformada. Sin embargo, presentó una actividad enzimática que resultó ser casi el doble que la detectada en las plantas control, lo que sugiere que la acción de las otras sacarosas sintasas, no modificadas, haya sido la causante de este fenotipo que podría simplemente representar un efecto de la variabilidad genética y/o plasticidad propia de esta especie.

Finalmente, la planta "12", que fue transformada con el gen *AhSUS3*, mostró, en forma similar a la planta "19", un incremento de casi el doble de la actividad enzimática tipo sacarosa sintasa presente en las plantas control. Como acontece con frecuencia, la alta actividad tipo SUS no coincidió con una acumulación de transcritos del gen *AhSUS3*, los cuales se encontraron dentro de los valores basales. Esta situación podría explicarse mediante la hipótesis de que al haber casi el doble de actividad de la sacarosa sintasa, en comparación con el control, la planta estaría intentando regular la expresión de los transcritos del gen *AhSUS3*, lo que posiblemente involucraría un gasto mayor de energía, y por lo tanto, la aparición de un fenotipo de desarrollo retardado.

Existe información que concuerda con la falta de correlación directa observada entre los niveles de expresión de los genes y la actividad de la sacarosa sintasa observada en este trabajo. Por ejemplo, Klotz *et al.* (2008) reportaron una disparidad semejante a la observada con los niveles de transcritos de *AhSUS2* y *AhSUS3* y la actividad de la sacarosa sintasa en este trabajo. De modo que observaron que en raíces de plantas de betabel sometidas a daño mecánico, anoxia y frío se alteró marcadamente el nivel de transcritos de los genes de sacarosa sintasa *SBSS1* y *SBSS2*, pero, en cambio, no se observó un impacto significativo en la actividad enzimática, cuestión que se atribuyó a mecanismos postranscripcionales de regulación. Asimismo, esta disparidad también se observó en plantas de *A. cruentus* expuestas a defoliación, donde no se encontró concordancia entre los patrones de expresión de los genes de sacarosa sintasa *AhSuS1* y *AhSuS2*, y los niveles de actividad enzimática observada en respuesta a la defoliación parcial. Por otro lado, la expresión de estos genes en hoja disminuyó un día después del daño, pero se incrementó a los 5 días posttratamiento (dpt); la actividad enzimática sufrió cambios drásticamente diferentes, siéndole más alta que en los controles un día después de la defoliación, pero disminuyendo a niveles casi indetectables, a los 5 dpt (Castrillón-Arbeláez *et al.*, 2012). Estos autores también asociaron esta disparidad entre el nivel de transcritos y de

actividad enzimática de SUS a la participación de otras isoformas de la sacarosa sintasa. Estas propuestas tienen sentido considerando que, de forma similar a otras especies de plantas (Barrero-Sicilia *et al.*, 2011), los genes que codifican a enzimas tipo sacarosa sintasa en amaranto conforman una familia de múltiples genes que consiste de 7 isoformas diferentes (Délano-Frier *et al.*, 2004), las cuales podrían, muy posiblemente, estar reguladas diferencialmente (Marino *et al.*, 2008). Hasta el momento no hay evidencia experimental para apoyar esta propuesta, la cual deberá ser explorada con más detalle en el futuro.

Otra hipótesis que pudiera explicar la incongruencia entre resultados de la actividad enzimática SUS y de expresión génica por RT-qPCR incorpora dos factores fundamentales: i) que las enzimas SUS juegan un papel clave en el desarrollo y están altamente reguladas (Pontis *et al.*, 1981; Nakai *et al.*, 1998; Déjardin *et al.*, 1999; Ciereszko y Kleczkowski 2002; Hardin *et al.* 2004), y ii) que las plantas transgénicas sobreexpresantes de *AhSUS*, estaban organizadas en forma de mosaico, donde regiones ricas en células transformadas genéticamente, se encontraban distribuidas entre zonas compuestas por células normales, no transformadas. De modo que ambos factores podrían haber contribuido a crear un desequilibrio metabólico, que al ser detectado por la planta se manifestó en una discordancia entre los patrones de expresión génica y de actividad enzimática. Lo anterior, apoyado por reportes que describen que modificaciones en enzimas clave en el desarrollo o en la defensa de las plantas pueden llegar a tener consecuencias dramáticas para la supervivencia de la planta (Elmayan *et al.*, 1998).

7.6 Análisis de la generación F1

Debido a que era altamente probable que las plantas transgénicas transformadas con el vector vacío pB7WG2D fueran realmente plantas quiméricas, no se observó un patrón de heredabilidad en la siguiente generación, lo cual tuvo congruencia con lo reportado por Wang *et al.* (2008) y Skarjinskaia (2003) que indicaron que las plantas quimera pueden dar lugar a gametos y progenies no transgénicas y, por lo tanto, a la pérdida de los transformantes (Chen, 2011) a través de la propagación de la semilla, que es un fenómeno ampliamente reportado (McHughen y Jordan, 1989; Landgridge *et al.*, 1992; Ulian *et al.*, 1996; Joersbo *et al.*, 1999).

VIII. CONCLUSIONES

- La transfección de ADN en semillas de amaranto escarificadas es posible usando 100 y 200 ondas de choque:
 - La eficiencia de transformación con el vector pB7WG2D (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) fue baja: 3.75% y 1.25% en semillas tratadas con 200 y 100 ondas de choque, respectivamente.
 - La eficiencia de transformación también fue baja al transformar semillas de amaranto con genes de sacarosa sintasa: 1.25% tanto para los genes *AhSUS2* (50 y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADN) y *AhSUS3* (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADN) usando 200 y 100 ondas de choque, respectivamente.
- Se observó una represión de la expresión del gen *AhSUS2* en las líneas transgénicas sobreexpresantes de este gen.
- No se observó una acumulación de transcritos de *AhSUS3* superior al nivel detectado en plantas control en las líneas transgénicas sobreexpresantes de este gen.
- No se encontró una concordancia entre el patrón de expresión de *AhSUS2* y *AhSUS3* y los niveles de actividad enzimática tipo sacarosa sintasa en las plantas transgénicas.
- Todo indica que las plantas transgénicas obtenidas por ondas de choque son quiméricas, formando mosaicos constituidos por regiones ricas en células genéticamente transformadas inmersas en regiones conformadas sólo por células normales.
- El uso de semillas como “explante” para realizar la transformación por ondas de choque no permite que el evento de transformación se transmita a la generación siguiente.

IX. PERSPECTIVAS

Si bien no se obtuvieron plantas completamente transformadas mediante el protocolo basado en el uso de ondas de choque, el éxito de este método en la transformación de plantas podría lograrse mediante el uso de otros explantes o células receptoras, como callos o células en suspensión, para evitar la posible formación de mosaicos/plantas quiméricas. También se abre la posibilidad de utilizar herramientas moleculares adicionales, como vectores de recombinación homóloga o, incluso, junto con la nueva técnica CRISPR/Cas9, que permita una inserción puntual de secuencias génicas en el genoma de la planta.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Akubugwo, I.E., Obasi, N.A., Chinyere, G.C., Ugbogu, A.E. (2007) Nutritional and chemical value of *Amaranthus hybridus* L. leaves from Afikpo, Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 6: 2833-2839.
- Albrecht, G., Muströph, A. (2003) Localization of sucrose synthase in wheat roots: Increased in situ activity of sucrose synthase correlates with cell wall thickening by cellulose deposition under hypoxia. *Planta* 217: 252–260.
- Ángeles-Núñez, J.G., Tiessen, A. (2010) *Arabidopsis* sucrose synthase 2 and 3 modulate metabolic homeostasis and direct carbon towards starch synthesis in developing seeds. *Planta* 232: 701-718.
- Ángeles-Núñez, J.G., Tiessen, A. (2012) Regulation of *AtSUS2* and *AtSUS3* by glucose and transcription factor LEC2 in different tissues and at different stages of *Arabidopsis* seed development. *Plant Molecular Biology* 78: 377-392.
- Ángeles-Núñez, J.G., Herrera-Corredor, C., Martínez-Martínez, T.O. (2014) Importancia de la isoforma-1 de la sacarosa sintasa en el metabolismo del carbono durante el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis thaliana*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5: 727-739
- Arora, M., Junge, L., Ohl, C.D., (2005) Cavitation cluster dynamics in shock-wave lithotripsy: Part 1. Free field. *Ultrasound in Medicine and Biology* 31: 827–839.
- Babst, B. A., Ferrieri, R. A., Gray, D. W., Lerda, M., Schlyer, D. J., Schueller, M., Thorpe, M. R., Orians, C. M. (2005) Jasmonic acid induces rapid changes in carbon transport and partitioning in *Populus*. *New Phytologist* 167: 63–72.
- Bailey, M.R., Pishchalnikov, Y.A., Sapozhnikov, O.A., Cleveland, R.O., McAteer, J.A., Miller, N.A. (2005) Cavitation detection during shock-wave lithotripsy. *Ultrasound in Medicine and Biology* 31: 1245–1256.
- Barratt, D.H.P., Derbyshire, P., Findlay, K., Pike, M., Wellner, N., Lunn, J., Feil, R., Simpson, C., Maule, A.J., Smith, A.M. (2009) Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:13124–13129.
- Barrero-Sicilia, C., Hernando-Amado, S., Gonzalez-Melendi, P., Carbonero, P. (2011) Structure, expression profile and subcellular localisation of four different sucrose synthase genes from barley. *Planta* 234: 391–403.
- Baud, S., Vaultier, M.N., Rochat, C. (2004) Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 396: 397-409.
- Belton P.S., Taylor J.R.N. (2002) Pseudocereals and less common cereals: grain properties and utilization potential, Germany. Ed. Springer.
- Bieniawska Z., Paul Barratt D. H., Garlick A. P., Thole V., Kruger N. J., Martin C., Zrenner R., Smith A. M. (2007) Analysis of the sucrose synthase gene family in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 49: 810–828.
- Birch R. G. (1997) Plant transformation. Problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*

48: 397-326.

- Blee, K.A., Anderson, A.J. (2002) Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose synthase accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules. *Plant Molecular Biology* 50: 197-211.
- Brigulla, M., Wackernagel, W. (2010) Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86: 1027–1041.
- Castrillón-Arbeláez, P.A., Martínez-Gallardo, N., Avilés-Arnaut, H., Tiessen, A., Délano-Frier J. P. (2012) Metabolic and enzymatic changes associated with carbon mobilization, utilization and replenishment triggered in grain amaranth (*Amaranthus cruentus*) in response to partial defoliation by mechanical injury or insect herbivory. *BMC Plant Biology* 12: 163.
- Chen, G.Q. (2011) Effective reduction of chimeric tissue in transgenics for the stable genetic transformation of *Lesquerella fendleri*. *HortScience* 46: 86–90.
- Chourey, P.S., Nelson, O.E. (1976) The enzymatic deficiency conditioned by the *shrunk-1* mutation in maize. *Biochemical Genetics* 14: 1041–1055.
- Ciereszko, I., Kleczkowski, L.A. (2002) Glucose and mannose regulate the expression of a major sucrose synthase gene in *Arabidopsis* via hexokinase-dependent mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 907–911.
- Cisneros-Hernández, I. (2016) Cambios en la expresión génica de reguladores maestros del metabolismo en respuesta a la defoliación severa en amaranto de grano durante el desarrollo. (Tesis de maestría). Cinvestav Unidad Irapuato, México.
- Cleveland, R.O., McAteer, J.A. (2007) The physics of shock wave lithotripsy. In: Smith, A.D., Badlani, G.H., Bagley, D.H., Clayman, R.V., Docimo, S.G. y Jordan, G.H. (eds) *Smith's textbook on endourology*. (pp 317–332). Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker, Inc.
- Clouse, J.W., Adhikary, D., Page, J.T., Ramaraj, T., Deyholos, M.K., Udall, J.A., Fairbanks, D.J., Jellen, E.N., Maughan PJ. (2016) The amaranth genome: Genome, transcriptome, and physical map assembly. *Plant Genome* 9: 1-14.
- Coleman, H.D., Ellis, D.D., Gilbert, M., Mansfield, S.D. (2006) Up-regulation of sucrose synthase and UDP-glucose pyrophosphorylase impacts plant growth and metabolism. *Plant Biotechnology Journal* 4: 87–101.
- Coleman, H.D., Yan, J., Mansfield, S.D. (2009) Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 13118–13123.
- Cogoni, C., Macino, G. (2000) Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Current Opinion in Genetics and Development* 10: 638–643.
- Cruz, A., Campos, J. (2012) Comment: How to get exogenous DNA to cross the cell membrane of plants Comment on “Physical methods for genetic transformation in plants” by Rivera *et al.* *Physics of Life Reviews* 9: 348–349.

- D'Aoust, M.A., Yelle, S., Nguyen-Quoc, B. (1999) Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. *Plant Cell* 11: 2407-2418.
- Darbani, B., Farajnia, S., Toorchi, M., Zakerbostanabad, S., Noeparvar, S., Stewart C.N. (2008) DNA-delivery methods to produce transgenic plants. *Biotechnology* 7: 385–402.
- Das, S. (2016) *Amaranthus: A Promising Crop of Future*. India: Springer
- Déjardin, A. Sokolov, L. N., Kleczkowski, L. (1999) Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. *Biochemical Journal* 344: 503-509.
- Délano-Frier, J.P., Martínez-Gallardo, N.A., Martínez-DelaVega, O., Salas-Araiza, M., Barbosa-Jaramillo, E.R. (2004) The effect of exogenous jasmonic acid on induced resistance and productivity in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) is influenced by environmental conditions. *Journal of Chemical Ecology* 30: 1001–1034.
- Délano-Frier, J.P., Avilés-Arnaut, H., Casarrubias-Castillo, K., Casique-Arroyo, G., Castrillón-Arbeláez, P.A., Herrera-Estrella, L. Massange-Sánchez, J., Martínez-Gallardo, N., Parra-Cota, F.I., Vargas-Ortíz, E., Estrada-Hernández, M.G. (2011) Transcriptomic analysis of grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) using 454 pyrosequencing: comparison with *A. tuberculatus*, expression profiling in stems and in response to biotic and abiotic stress. *BMC Genomics* 12: 363.
- Divya-Prakash, G., Anish, R.V., Jagadeesh, G., Chakravorty, D. (2011) Bacterial transformation using micro-shock waves. *Analytical Biochemistry* 419: 292–301.
- Domínguez, A., Cervera, M., Pérez, R.M., Romero, J., Fagoaga, C., Cubero, J., López, M.M., Juárez, J.A., Navarro, L., Peña, L. (2004) Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. *Molecular Breeding* 14: 171–183.
- Dougherty, W.G., Parks, T.D. (1995) Transgenes and gene suppression: Telling us something new? *Current Opinion in Cell Biology* 7: 399–405.
- Elmayan, T., Vaucheret, H. (1996) A strongly-expressed 35S-driven transgene undergoes post-transcriptional silencing in all tobacco transformants irrespective of the copy number. *Plant Journal* 9: 787–797.
- Elmayan, T., Balzergue, S., Béon, F., Bourdon, V., Daubremet, J., Guénet, Y., Mourrainm, P., Palauqui, J., Vernhettes, S., Vialle, T., Wostrikiff, K., Vaucheret, H. (1998) *Arabidopsis* mutants impaired in cosuppression. *Plant Cell* 10: 1447–1457.
- English, J., Davenport, G., Elmayan, T., Vaucheret, H., Baulcombe, D. (1997) Requirement of sense transcription for homology dependent virus resistance and trans-inactivation. *Plant Journal* 12: 597–603.
- Escobar, M. E., Dandekar, A.M. (2003). Post-transcriptional Gene Silencing in Plants. En: Barciszewski, J. y Erdmann, V.A. (Eds) *Non- Coding RNA*, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

- Escobar-Tovar, L., Magaña-Ortíz, D., Fernández, F., Guzmán-Quesada, M., Sandoval-Fernández, J.A., Ortiz-Vázquez, E. y Loske, A.M. y Gómez-Lim, M.A. (2015) Efficient transformation of *Mycosphaerella fijiensis* by underwater shock waves. *Journal of Microbiological Methods* 119: 98–105.
- Espitia-Rangel, E., Mapes Sánchez, C., Escobedo López, D., De la O Olán, M., Rivas Valencia, P., Martínez Trejo, G., Cortés Espinoza, L., Hernández Casillas, J. M. (2010) Conservación y uso de los recursos genéticos de Amarantho en México. Centro México: INIFAP.
- Espitia-Rangel, E., Mapes-Sánchez, C., Escobedo-López, D., De la O-Olán, M., Rivas-Valencia, P., Martínez-Trejo, G. (2012) Amarantho : ciencia y tecnología. México: INIFAP.
- Esteban-Fuertes, M., Hernández-Ajubita, H., Mohamed-Mohamed, Z., Ramírez-Fernández, J., Resel, L., Samblas-García, R., Senovilla-Pérez, J. (1994) Estado actual de la litotricia extracorpórea mediante ondas de choque. *Clínicas Urológicas de la Complutense* 3: 529-561.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., Filipowicz, W. (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry* 79: 351–379.
- Faize, M., Faize, L., Burgos, L. (2010) Using quantitative real-time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation. *BMC Biotechnology* 10: 53.
- Flavell, R.B. (1994) Inactivation of gene expression in plants as a consequence of novel sequence duplications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 3490–3496.
- Fu, H., Park, W.D. (1995) Sink and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato. *Plant Cell* 7: 1369–1385.
- Gambihler, S., Delius, M., Ellwart, J.W. (1994) Permeabilization of the plasma membrane of L1210 mouse leukemia cells using lithotripter shock waves. *The Journal of Membrane Biology* 141: 267–275.
- García-Canales, Y. (2015) Transformación genética de *Amaranthus* spp. mediada por *Agrobacterium* spp. (Tesis de maestría). Cinvestav Unidad Irapuato, México.
- Gazzani, S. Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D., Sablowski, R. (2004) A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. *Science* 306: 1046–1048.
- González, M.C., Roitsch, T., Cejudo, F.J. (2005) Circadian and developmental regulation of vacuolar invertase expression in petioles of sugar beet plants. *Planta* 222: 386–395.
- González-Rodríguez, A.T. (2016) Estudio de la expresión de genes codificantes de enzimas clave en la síntesis de trealosa y oligosacáridos en amaranto con distintos niveles de tolerancia a estrés hídrico. (Tesis de maestría). Cinvestav Unidad Irapuato, México.
- Goodwin, J., Chapman, K., Swaney, S., Parks, T.D., Wernsman, E.A., Dougherty, W.G. (1996) Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. *Plant Cell* 8: 95–105.

- Gordon, A.J., Minchin, F.R., James, C.L., Komina, O. (1999) Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiology* 120: 867-878.
- Goren, S., Lugassi, N., Stein, O., Yeselson, Y., Schaffer, A.A., David-Schwartz, R., Granot, D. (2017) Suppression of sucrose synthase affects auxin signaling and leaf morphology in tomato. *PLOS ONE* 12: e0182334.
- Griesbach, R.J., Hammond, J. (1994) An improved method for transforming plants through electrophoresis. *Plant Science* 102: 81–9.
- Grubben, G.J.H., Van Sloten, D.H. (1981) Genetic resources of amaranths. *International Board for Plant Genetic Resources* 57.
- Hardin, S.C., Winter, H., Huber, S.C. (2004) Phosphorylation of the amino terminus of maize sucrose synthase in relation to membrane association and enzyme activity. *Plant Physiology* 134: 1427–1438.
- Hévenot, C., Simond-Cote, E., Reyss, A., Manicacci, D., Trouverie, J., Le Guilloux, M., Ginhoux, V., Sidicina, F., Prioul, J.L. (2005) QTLs for enzyme activities and soluble carbohydrates involved in starch accumulation during grain filling in maize. *Journal of Experimental Botany* 56: 945–958.
- Huerta-Ocampo, A.J., Barba de la Rosa, A.P. (2011) Amaranth: A pseudo-cereal with nutraceutical properties. *Current Nutrition & Food Science* 1: 1-9.
- Hutvagner, G. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293: 834–838.
- Iglesias, V.A., Moscone, E.A., Papp, I., Neuhuber, F., Michalowski, S., Phelan, T., Spiker, S., Matzke, M., Matzke, A.J.M. (1997) Molecular and cytogenetic analysis of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. *Plant Cell* 9: 1251–1264.
- Incarbone, M. y Dunoyer, P. (2013) RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses. *Trends in Plant Sciences* 18: 382–392.
- Jagadeesh, G., Nataraja, K.N., Udayakumar, M. (2004) Shock waves can enhance bacterial transformation with plasmid DNA. *Current Science India* 87: 734–735.
- Jang, J.C., Sheen, J. (1997) Sugar sensing in higher plants. *Trends in Plant Science* 2: 208–214.
- Jia, L., Zhang, B., Mao, C. Li, J., Wu, Y., Wu, P., Wu, Z. (2008) OsCYT-INV1 for alkaline/neutral invertase is involved in root cell development and reproductivity in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 228: 51–59.
- Joersbo, M., Brunstedt, J., Marcussen, J., Okkels, F. (1999) Transformation of the endospermous legume guar *Cyamopsis tetragolonoba* L. and analysis of transgene transmission. *Molecular Breeding* 5: 521–529.
- Jofre-Garfias, A., Villegas-Sepúlveda, N., Cabrera-Ponce, J., Adame-Alvarez, R., Herrera-Estrella, L., Simpson, J. (1997) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Amaranthus hypochondriacus*: light-and tissue-specific expression of a pea chlorophyll a/b-binding protein promoter. *Plant Cell Reports* 16: 847-852.
- Klotz, K.L., Haagensohn, D.M. (2008) Wounding, anoxia and cold induce sugarbeet sucrose synthase transcriptional changes that are unrelated to protein expression and activity. *Journal Plant Physiology* 165: 423-34.

- Klaseboer, E. Fong, S.W. Turangan, C.K. Khoo, B.C. Szeri, A.J. Calvisi, M.L. Sankin, M.N., Zhong, P. (2007) Interaction of lithotripter shockwaves with single inertial cavitation bubbles. *Journal of Fluid Mechanics* 593: 37-56.
- Koch, K. (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 509-540.
- Koch, K. (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 235-246.
- Komatsu, A., Moriguchi, T., Koyama, K., Omura, M., Akihama, T. (2002) Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships. *Journal of Experimental Botany* 53: 61-71.
- Kooter, J.M., Matzke, M.A., Meyer, P. (1999) Listening to the silent genes: Transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends in Plant Sciences* 4: 340–347.
- Kulakow, P. A., Hauptli, H. (2018) Genetic characterization of grain amaranth. *En Paredes-López, O. (ed) Amaranth: Biology, Chemistry, and Technology.* (pp 13–40) México: CRC Press.
- Kuluev, B.R., Mikhaylova, E.V., Taipova, R.M., Chemeris, A.V. (2017) Changes in phenotype of transgenic amaranth *Amaranthus retroflexus* L., overexpressing *ARGOS-LIKE* gene. *Russian Journal of Genetics* 1: 67–75.
- Landgridge, P., Brettschneider, R., Lazzeri, P., Lörz, H. (1992) Transformation of cereals via *Agrobacterium* and the pollen pathway: a critical assessment. *Plant Journal* 2: 631–638.
- Lauer, U., Bürgelt, E., Squire, Z., Messmer, K., Hofschneider, P.H., Gregor, M., Delius, M. (1997) Shock wave permeabilization as a new gene transfer method. *Gene Therapy* 4: 710–715.
- Lechtenberg, B., Schubert, D., Forsbach, A., Gils, M., Schmidt, R. (2003) Neither inverted repeat T-DNA configurations nor arrangements of tandemly repeated transgenes are sufficient to trigger transgene silencing. *Plant Journal* 34: 507–517.
- Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.Y., Kim, Y.H. (2012) Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments* 62: e3923.
- Lemoine, R., La Camera, S., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., Bonnemain, J.L., Laloi, M., Coutos-Thévenot, P., Maurousset, L., Faucher, M., Girousse, C., Lemonnier, P., Parrilla, J., Durand, M. (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science* 4: 272.
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M., Dougherty, W.G. (1993) Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5: 1749–1759.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25: 402–408.
- Loginova, D.B., Men'shanov, P.N., Deineko, E.V. (2012) Analysis of mosaic expression of the *nptII* gene in transgenic tobacco plant lines contrasting in mosaicism. *Russian Journal of Genetics* 48: 1280-1286.

- Loske, A.M. (2007) Shock wave physics for urologists. Querétaro, México: Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, UNAM.
- Loske, A.M. (2011) New trends in shock wave applications to medicine and biotechnology. México: Research Signpost.
- Loske, A.M., Campos-Guillen, J., Fernández, F., Castaño-Tostado, E. (2011) Enhanced shock wave-assisted transformation of *Escherichia coli*. *Ultrasound Medical Biology* 37: 502–510.
- Loske, A.M., Fernández, F., Magaña-Ortíz, D., Coconi-Linares, N., Ortiz-Vazquez, E., Gómez-Lim, M.A. (2014) Tandem shock waves to enhance genetic transformation of *Aspergillus niger*. *Ultrasonics* 54: 1656–1662.
- Loske A.M. (2017) Medical and Biomedical Applications of Shock Waves, Shock Wave and High Pressure Phenomena. México: Springer International Publishing.
- Ma, C. y Mitra, A. (2001) Intrinsic direct repeats generate consistent post-transcriptional gene silencing in tobacco. *Plant Journal* 31: 37–49.
- Magaña-Ortíz, D., Coconi-Linares, N., Ortiz-Vazquez, E., Fernández, F., Loske, A.M., Gómez-Lim, M.A. (2013) A novel and highly efficient method for genetic transformation of fungi employing shock waves. *Fungal Genetics and Biology* 56: 9–16.
- Magaña-Ortíz, D. (2010) Desarrollo de un nuevo método de transformación genética en el reino fungi. (Tesis de maestría). Cinvestav Unidad Irapuato, México.
- Maraña, C., García-Olmedo, F., Carbonero, P. (1990) Differential expression of two types of sucrose synthase-encoding genes in wheat in response to anaerobiosis, cold shock and light. *Gene* 88: 167-172.
- Marino, D., Hohnjec, N., Küster, H., Moran, J.F., González, E.M., Arrese-Igor, C. (2008) Evidence for transcriptional and post-translational regulation of sucrose synthase in pea nodules by the cellular redox state. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 622–630.
- Martirosyan, D.M., Miroshnichenko, L.A., Kulakova, S.N., Pogojeva, A.V., Zolodov, V.I. (2007) Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. *Lipids in Health and Disease* 6: 1.
- Matzke, A.J., Matzke, M.A. (1998) Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 142–148.
- Matzke, M.A., Aufsatz, W., Kanno, T., Florian, M., Antonius, M., Matzke, J.M. (2002) Homology-dependent gene silencing and host defense in plants. En: Dunlap, J.C., Wu, C. (eds) *Homology effects*, vol 46. (pp 235-275). USA: Elsevier Science.
- McHughen, A., Jordan, M.C. (1989) Recovery of transgenic plants from 'escape' shoots. *Plant Cell Reports* 7: 611–614.
- Metzloff, M. y O'Dell, M. y Flavell, R.B. (1996) Suppression of chalcone synthase A activities in *Petunia* by the addition of a transgene encoding chalcone synthase A. En: Grierson, D., Lycett, G.W. y Tucker, G.A. (eds) *Mechanisms and applications of gene silencing*. Nottingham: University Press 21–32.

- Meyer, P., Heidmann, I., Niedenhof, I. (1993) Differences in DNA-methylation are associated with a paramutation phenomenon in transgenic petunia. *Plant Journal* 4: 89–100.
- Moreno, A.B., Martínez de Alba, A.E., Bardou, F., Crespi, M.D., Vaucheret, H., Maizel, A., Mallory, A.C. (2013) Cytoplasmic and nuclear quality control and turnover of single-stranded RNA modulate post-transcriptional gene silencing in plants. *Nucleic Acids Research* 41: 4699–4708.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nakai, T., Konishi, T., Zhang, X. Q., Chollet, R., Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Mori, H., Sakai, F., Hayashi, T. (1998) An increase in apparent affinity for sucrose of mung bean sucrose synthase is caused by in vitro phosphorylation or directed mutagenesis of Ser11. *Plant Cell Physiology* 39: 1337–1341.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279–289.
- Ohl, C.D. (2002) Cavitation inception following shock wave passage. *Physics of Fluids* 14: 3512- 3521.
- Ohl, C.D., Ikink, R. (2003) Shock-wave-induced jetting of micron-size bubble. *Physical Review Letters* 90: 214502–214505.
- Qayyum, A., Bakhsh, A., Kiani, S., Shahzad, K., Ali-Shahid, A., Husnain. (2009) The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances* 27: 753–63.
- Pal, A., Swain, S.S., Das, A.B., Mukherjee, A.K., Chand, P.K. (2013) Stable germ line transformation of a leafy vegetable crop amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 49: 114- 128.
- Park, Y.D., Papp, I., Moscone, E.A., Iglesias, V.A., Vaucheret, H., Matzke, A.J., Matzke, M. A. (1996) Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant Journal* 9: 183–194.
- Pickford, A.S., Cogoni, C. (2003) RNA-mediated gene silencing. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 871–882.
- Pontis, H.G., Babio, J.R., Salerno, G. (1981) Reversible unidirectional inhibition of sucrose synthase activity by disulfides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78: 6667–6669.
- Pumplin, N., Voinnet, O. (2013) RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology* 11: 745–760.
- Reyes, M., Gómez-Kosky, R., Bermúdez-Caraballoso, I., Chong-Pérez, B. (2010) Determinación de la concentración mínima letal de glufosinato de amonio en diferentes materiales vegetales de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA). *Bioteología Vegetal* 10: 157-168.

- Rivera, A.L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., Loske, A.M. (2012) Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews* 9: 308-345.
- Ruan, Y.L. (2012) Signaling role of sucrose metabolism in development. *Molecular Plant* 5: 763-765.
- Ruan, Y.L., Llewellyn, D.J., Furbank, R.T. (2003) Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development. *Plant Cell* 15: 952–964.
- Roitsch, T., Bittner, M., Godt, D.E. (1995) Induction of apoplasmic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiology* 108: 285–294.
- Roitsch, T. (1999) Source-sink regulation by sugars and stress. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 198-206.
- Roitsch, T., González, M.C. (2004) Function and regulation of plant invertases: Sweet sensations. *Trends in Plant Science* 9: 606–613.
- Salerno, G.L., Curatti, L. (2003) Origin of sucrose metabolism in higher plants: when, how and why?. *Trends in Plant Science* 8: 63–69.
- Sauer, J.D. (1967) The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 54: 103-137.
- Sauer, J.D. (1950) The grain amaranths: a survey of their history and classification. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 37: 561-632.
- Schiebel, W., Haas, B., Marinkovic, S., Klanner, A., Sanger, H.L. (1993) RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves II catalytic in vitro properties. *Journal of Biological Chemistry* 268: 11858–11867.
- Schwachtje, J., Minchin, P.E.H., Jahnke, S., Van Dongen, J.T., Schittko, U., Baldwin, I.T. (2002) SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *PNAS* 103:12935-12940.
- Se-Kwon, K., Fatih, K. (2012) Biological Importance and Applications of Squalene and Squalane. In: Se-Kwon, K. (ed) *Advances in Food and Nutrition Research* vol. 65. (223-233). Elsevier.
- Selker, E.U. (1999) Gene silencing: Repeats that count. *Cell* 16: 157–160.
- Shure, M., Wessler, S., Federoff, N. (1983) Molecular identification of the *waxy* locus in maize. *Cell* 35: 225-233.
- Skarjinskaia, M., Svab, Z., Maliga, P. (2003) Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed Brassicacea. *Transgenic Research* 12: 115–122.
- Smith, H.A., Swaney, S.L., Parks, T.D., Wernsman, E.A., Dougherty, W.G. (1994) Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: expression, regulation, and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell* 6: 1441–1453.
- Soboleski, M.R., Oaks, J. y Halford, W.P. (2005) Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. *FASEB Journal* 19: 440–442.
- Sontheimer, E.J. (2005) Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 127–138.

- Sood, P., Bhattacharya, A., Sood, A. (2011) Problems and possibilities of monocot transformation. *Biologia Plantarum* 55:1–15.
- Stam, M., Mol, J.N.M., Kooter, J.M. (1997) The silence of genes in transgenic plants. *Annals of Botany* 79: 3–12.
- Steckel, L.E. (2007) The dioecious *Amaranthus* spp.: Here to stay. *Weed Technology* 21: 567-570.
- Sturm, A., Tang, G.Q. (1999) The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science* 4: 401-407.
- Swain, S.S., Sahu, L., Barik, D.P., Chand, P.K. (2010) *Agrobacterium* × plant factors influencing transformation of 'Joseph's coat' (*Amaranthus tricolor* L.). *Scientia Horticulturae* 125: 461-468.
- Tang, G.Q., Sturm, A. (1999) Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affects growth rather than sucrose partitioning. *Plant Molecular Biology* 4: 465–479.
- Ulbricht, C., Abrams, T., Conquer, J., Costa, D., Grimes Serrano, J.M., Taylor, S., Varghese, M. (2009) An evidence-based systematic review of amaranth (*Amaranthus* spp.) by the natural standard research collaboration. *Journal of Dietary Supplements* 6: 390–417.
- Ulian, E.C., Magill, J.M., Magill, C.W. y Smith, R.H. (1996) DNA methylation and expression of NPTII in transgenic petunias and progeny. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 976–981.
- Vaucheret, H., Beclin, C. y Fagard, M. (2001) Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science* 114: 3083–3091.
- Van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N.M., Stuitje, A.R. (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2: 291–299.
- Vance, V., Vaucheret, H. (2001) RNA silencing in plants defense and counter defense. *Science* 292: 2277–2280.
- Wang, W., Wang, C., Huang, B.L., Huang, B. (2008). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Lesquerella fendleri* L., a potential new oil crop with rich lesquerolic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92: 165– 171.
- Wei, Z., Qu, Z., Zhang, L., Zhao, S., Bi, Z., Ji, X., Wang, X., Wei, H. (2015) Overexpression of poplar xylem sucrose synthase in tobacco leads to a thickened cell wall and increased height. *PLoS ONE* 10: e0120669.
- Welham, T., Pike, J., Horst, I., Flemetakis, E., Katinakis, P., Kaneko, T., Sato, S., Tabata, S., Perry, J., Parniske, M., Wang, T.L. (2009) A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany* 60: 3353–3365.
- Wilson, R. C., Doudna, J. A. (2013) Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual Review of Biophysics* 42: 217–239.
- Wind, J., Smeekens, S., Hanson, J. (2010) Sucrose: Metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry* 71: 1610-1614.

- Wright, D. P., Read, D. J., Scholes, J. D. (1998) Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment* 21: 881-89.
- Xie, Z.P., Staehelin, C., Broughton, W.J., Wiemken, A., Boller, T., Muller, J. (2003) Accumulation of soluble carbohydrates, trehalase and sucrose synthase in effective (Fix(R)) and ineffective (Fix(S)) nodules of soybean cultivars that differentially nodulate with *Bradyrhizobium japonicum*. *Functional Plant Biology* 30: 965-971.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., Carrington, J.C. (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology* 2: e104.
- Xu, S.M., Brill, E., Llewellyn, D.J., Furbank, R.T., Ruan, Y.L. (2012) Overexpression of a potato sucrose synthase gene in cotton accelerates leaf expansion, reduces seed abortion, and enhances fiber production. *Molecular Plant* 5: 430-41
- Xu-Gang, L., Song-Biao, C., Zi-Xian, L., Tuan-Jie, C., Qian-Chun, Z., Zhen, Z. (2002) Impact of copy number on transgene expression in tobacco. *Acta Botanica Sinica* 44: 120–123.
- Zarnitsyn, V., Rostad, C.A., Prausnitz, M.R. (2008) Modeling transmembrane transport through cell membrane wounds created by acoustic cavitation. *Biophysical Journal* 95: 4124–38.
- Zhang, X., Zhu, Y., Liu, X., Hong, X., Xu, Y., Zhu, P., Shen, Y., Wu, H., Ji, Y., Wen, X., Zhang, C., Zhao, Q., Wang, Y., Lu, J. y Guo, H. (2015) Suppression of endogenous gene silencing by bidirectional cytoplasmic RNA decay in *Arabidopsis*. *Plant Biology* 348: 120-123.
- Zhou, X., Carranco, R., Vitha, S. y Hall, T.C. (2005) The dark side of green fluorescent protein. *New Phytologist* 168: 313-322.
- Zrenner, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L., Sonnewald, U. (1995) Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 7: 97–107.