



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Control de la producción de aflatoxinas de *Aspergillus parasiticus* y
Aspergillus flavus en maíz mediante RNA antisentido”**

TESIS

Que Presenta

ISRAEL DAVID RIVAS AVILES

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de Tesis: **Dra. GUADALUPE BEATRIZ XOCONOSTLE CÁZARES**

Ciudad de México

Diciembre del 2016

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería en el Centro de Investigación y Estudios
Avanzados del IPN, unidad Zacatenco.

Bajo la Dirección y Tutoría de La

DRA. BEATRIZ XOCONOSTLE CÁZARES

Para la realización de este trabajo se obtuvo financiamiento de la

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

(Financiamiento No.339549)

Agradecimientos

Estamos aquí para reírnos del destino y vivir tan bien nuestra vida que la muerte temblará al recibirnos”

-Charles Bukowski

Para mi directora de tesis...

Para mis asesores...

Para mis compañeros de laboratorio; técnicos y estudiantes...

Para mis compañeros de generación...

Para mis amigos...

Para mi familia...

Para el que estaba a lado...

Y para todos aquellos otros...

En ocasiones, las palabras parecen ser insuficientes para expresar mi alegría por la ayuda que me brindaron, por los sueños que compartimos, por la tolerancia, comprensión y paciencia que me tuvieron, y por el apoyo invaluable que me dieron. Sólo queda decir-Muchas gracias y de mi parte les deseo éxito-.

Índice

Resumen	8
Abstract	9
Prólogo	10
Un nuevo cambio sin preverlo	10
Marco teórico	12
La importancia de los cereales y el maíz	12
Descripción del maíz	12
Importancia del maíz en México	15
Enfermedad en los cultivos por cepas aflatoxigénicas de <i>Aspergillus</i>	16
Cepas aflatoxigénicas del género <i>Aspergillus</i>	17
Aflatoxinas	17
Mecanismo de RNAi como alternativa para controlar las aflatoxinas	19
Transformación in planta de meristemo apical de maíz	21
Estrategia de control de cepas aflatoxigénicas de <i>Aspergillus</i>	22
Justificación	23
Hipótesis	23
Hipótesis 1	23
Hipótesis 2	23
Objetivo General	23
Objetivos particulares	23
Estrategia experimental	24
Materiales y Métodos	25
Diseño del RNAi contra el RNAm de Ornitina Descarboxilasa de <i>Aspergillus flavus</i>	25
Amplificación de la región RNAi ODC y el cassette de expresión GON	25
Ligación de los PPCR al vector de entrada pCR8/GW/TOPO	25
Selección de clonas con vector de entrada recombinante correctamente orientado	26
Secuenciación de los plásmidos pCR8/ODC y pCR8/GON	26
Ensayo de recombinación con los vectores destino	26
Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>AGL1</i>	26
Transformación de los hospederos con los vectores destino recombinante	27
Ensayo de efectividad biológica del RNAi ODC	27

Ensayo de número de copias de la línea ODC1 _____	28
Extracción de DNA genómico y DNA plasmídico _____	28
Ensayos <i>in silico</i> _____	28
Corte histológico del coleoptilo de maíz _____	28
Resultados _____	29
Diseño de la secuencia RNAi ODC y análisis <i>in silico</i> fuera de blanco _____	29
Ligación de la RNAi ODC y el cassette de expresión GON al vector de entrada pCR8/GW/TOPO respectivamente y selección de la clona correctamente orientada ____	33
Recombinación vector de entrada pCR8/ODC y pCR8/GON con sus respectivos vectores destino _____	38
Transformación de maíz VT-401 y cepas aflatoxigénicas de <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> _____	41
Ensayo de efectividad biológica de la región RNAi ODC _____	45
Discusión _____	49
Conclusiones _____	57
Perspectivas _____	59
Referencias _____	61
Anexo 1 _____	67
Secuencia RNAi ODC _____	67
Cassette de expresión GON _____	68
Secuencia de oligonucleótidos _____	69
Vector de entrada pCR8/GW/TOPO _____	69
Vectores destino de expresión en planta pB2GW7.0 y pB7FWG.0 _____	70
Anexo 2 _____	71
Protocolo general para PCR punto final _____	71
Ligación de los PPCR ODC y GON al vector de entrada pCR8/GW/TOPO _____	72
Transformación por choque térmico de <i>E. coli</i> Mach1 –T1 ^R quimiocompetentes con pCR8/ODC y pCR8/GON _____	72
Ensayo de digestión enzimática de pCR8/ODC y pCR8/GON _____	73
LR Recombinación de los vectores de entrada y los vectores destino _____	74
Transformación por choque eléctrico de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1 electrocompetente con pB2GW7.0/ODC y pB7FWG.0/GON _____	75
Transformación de maíz VT-401 mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1 transgénico _____	75
Transformación de cepas aflatoxigénicas de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1 transgénico _____	77

Extracción de DNA genómico con el método de CTAB	78
Anexo 3	79
Tabla 1 Descripción anatómica de la planta de maíz	13
Tabla 2. Etapas de desarrollo de la planta de maíz.	14
Tabla 3 Alineamiento con una base de RNAm y otras	31
Tabla 4 Análisis in silico fuera de blanco contra secuencias de origen humano.	34
Tabla 5 Análisis in silico fuera de blanco contra especies domésticas.	34
Tabla 6 Comparación de diferentes métodos de transformación	53
Figura 1 Consumo total de maíz a nivel mundial.	15
Figura 2 Aflatoxinas.	18
Figura 3 Fenotipo “fluffy” en diferentes estudios con <i>Aspergillus sp.</i> inhibiendo directamente o indirectamente la esporulación.	19
Figura 4 Esquema de la estrategia diseñada para el control de las infecciones contra cepas aflatoxigénicas de <i>Aspergillus</i> en maíz.	22
Figura 5 Esquema del cassette GON	29
Figura 6 Producto de PCR purificado.	33
Figura 7 Esquema de ligación a vector de entrada.	36
Figura 9 Caracterización de los plásmidos pCR8/GON clonas 1 al 10	37
Figura 8 Caracterización de los plásmidos pCR8/ODC clonas 1 al 10	37
Figura 10 Secuenciación del RNAi ODC en los plásmidos pCR8/ODC y pCR8/GON correctamente orientados.	38
Figura 11 LR recombinación y caracterización de los vectores de expresión.	40
Figura 12 Posición del meristemo apical de tallo (SAM) en maíz VT-401	41
Figura 13 Corte del coleoptilo	42
Figura 14 Selección de líneas transgénicas.	42
Figura 15 Análisis de la línea F1 (wt x OB1).	43
Figura 16 Transformación de líneas aflatoxigénicas de <i>Aspergillus sp.</i>	44
Figura 17 Comparación morfológica entre la línea silvestre y la línea transgénica <i>A. parasiticus</i> H-188 ODC623.	45
Figura 18 Ensayo de efectividad biológica de ODC en <i>A. parasiticus</i> H-188.	46
Figura 19 Ensayo de efectividad biológica de ODC en <i>A. flavus</i> H-617.	47

Figura 20 Ensayo de efectividad biológica de ODC en <i>A. flavus</i> H-167.	48
Figura 21 Ensayo de Reynolds et al., 2004.	50
Figura 22 Ensayo de transformación de <i>Aspergillus parasiticus</i> H-188.	54

Resumen

Los cultivos de maíz son de suma importancia socioeconómica a nivel mundial; en países en desarrollo, como lo es México (aceptado como centro de origen y diversidad), es un alimento base para la población, y en un sentido más idealista pero no menos importante, forma parte de la identidad mexicana. En países desarrollados, como E.U.A., el maíz es utilizado en mayor medida, no como consumo directo, sino como materia prima en la industria de edulcorantes, como alimento para el ganado y, en las últimas décadas, para la fabricación de bioetanol. Los cultivos de maíz no están exentos de plagas, en este estudio nos centramos en la problemática causada por especies aflatoxigénicas de *Aspergillus*, específicamente *A. flavus* y *A. parasiticus*. Estos hongos han tenido una gran relevancia agrícola por causar pérdidas de producto y por representar un riesgo sanitario debido a las micotoxinas que producen, las aflatoxinas. Las aflatoxinas son metabolitos secundarios inducidos por estrés y durante el proceso de esporulación; son micotoxinas muy recalcitrantes con un amplio espectro tóxico para los consumidores, y debido a esto se han establecido normativas muy estrictas para la regulación de sus niveles en producto agrícola resultando en grandes pérdidas económicas por el rechazo del producto. La estrategia de este trabajo consiste en reducir la producción de aflatoxinas retrasando el proceso de esporulación mediante la alteración de los niveles de poliaminas (cuya importancia en el proceso de esporulación ya fue demostrada) utilizando el mecanismo de silenciamiento génico inducida por el hospedero (HIGS por sus siglas en inglés). Se diseñó un RNAi contra la enzima ornitina descarboxilasa, primera enzima en la ruta de síntesis de poliaminas de los hongos e involucrada en la transición dimórfica del hongo de estructura vegetativa a esporulación. Para poder reducir tiempos en la obtención de líneas transgénicas de maíz, también se estableció un método de transformación *in planta* que nos permitió obtener líneas F0 y F1 transgénicas en un menor periodo y con un alto porcentaje de eficiencia comparado con métodos basados en cultivo de tejido. La efectividad biológica de la región RNAi diseñada se demostró transformando las cepas aflatoxigénicas *A. flavus* y *A. parasiticus*, obteniendo el fenotipo “fluffy”, reportado cuando existe predominantemente crecimiento vegetativo, y por ello, alterando la síntesis de aflatoxinas.

Abstract

Maize crops are socioeconomically important worldwide; in developing countries, as is Mexico (considered center of origin and diversity), it is a staple food for the population, and in a more idealistic manner but not less important, it is part of the Mexican identity. In developed countries, like the U.S.A., maize is use mainly, not as direct consumption, but rather as feedstock for the sweetener's industry, as livestock feed and, in the last decades, for bioethanol production. Maize crops are not exempt from pest, in this study we focus on the problems caused by *Aspergillus* aflatoxigenic genus, specifically *A. flavus* and *A. parasiticus*. These fungus have had great agriculture relevance for causing product losses and being a health risk owing to the mycotoxins they produce, called aflatoxins. Aflatoxins are second metabolites induced by stress and during sporulation process; these are very recalcitrant mycotoxins with a wide toxic spectrum for consumers, and due to this, strict levels control regulations have been established in agriculture commodity resulting in economic losses due to product rejection. The work's strategy consisted in altering aflatoxin production by delaying the sporulation process by means of altering polyamines levels (whose importance in the process of sporulation have been demonstrated) using host-induced gene silencing mechanism (HIGS). For this purpose, we designed an iRNA against the ornithine decarboxylase enzyme, first enzyme of the polyamines synthesis path of the fungus and involved in the dimorphic transition of the fungus from vegetative structure to sporulation. To reduce time in obtaining maize transgenic lines, we also established an *in planta* transformation method that allowed us to obtained F0 and F1 transgenic lines in less time and with high percent efficiency compare with tissue culture based methods. The biologic effectiveness of the designed iRNA region was demonstrated by transforming *A. flavus* and *A. parasiticus* aflatoxigenic strains and obtaining the "fluffy" phenotype, reported when predominant vegetative growth exist, and because of that, altering aflatoxins synthesis.

Prólogo

Un nuevo cambio sin preverlo

“Toda la sabiduría del universo se encuentra en una semilla de maíz; esperando a ser cultivado para alimentar al pueblo, y al mundo”

Aunque muchas especies en la naturaleza exhiben diferente grado de conciencia, es el ser humano quien demuestra tener un nivel más profundo; sabe qué acciones lleva a cabo (aunque a veces no sea así), y que éstas tendrán un impacto en el medio que lo rodea, y en él mismo (Monat, 2016). El alto grado de conciencia del hombre es lo que le ha dado gran ventaja sobre otras especies.

La domesticación se pudo desarrollar debido a dos factores principalmente: una presión ambiental adversa al hombre de esa época, y la capacidad cognitiva (conciencia) del hombre para solucionar problemas. Debido a cambios climáticos al final del pleistoceno (hace más de 10,000 años) la fuente primaria de alimento de la especie humana (que eran los grandes mamíferos) comenzó a escasear, y como consecuencia tuvieron que cambiar sus hábitos de alimentación a fuentes secundarias como la recolección de frutos y semillas, aumentando la ingesta de éstos y por ende su importancia (Diamond, 2002). El cambio de dieta, y la capacidad del hombre para comprender de su entorno, permitió la domesticación de cientos de especies de animales y plantas.

La domesticación se puede ver como una pauta del proceso evolutivo inducida por la necesidad del hombre, donde animales y plantas sufrieron modificaciones morfológicas y/o fisiológicas que las llevan a distinguirse, a veces enormemente, de los ancestros progenitores (Doebley *et al.*, 2006). En el caso de la domesticación en plantas, se pueden tomar estos hechos como los inicios del fitomejoramiento. La selección de las plantas dependía de la necesidad de cada grupo que lo cultivaba; la elección podría deberse por cualidades que apelaban a los sentidos organolépticos (el fruto más grande, el más dulce, o menos amargo, el más colorido, etc.) permitiendo una diversificación del cultivo en una región localizada (donde un determinado grupo residía) , o por rasgos que permitían más fácil el labor de cultivo y procesamiento post-cosecha (la no dispersión de semilla para una cosecha más fácil o una semilla menos dura para una fácil manipulación) dando una diversificación en toda la especie sin importa de la región (Diamond, 2002; Purugganan y Fuller, 2009). Las plantas domesticadas muestran rasgos muy contrastantes con sus ancestros progenitores (conocido como síndrome de domesticación); los cultivos domesticados tienen semillas o frutos de mayor tamaño aunque en menor número, son

plantas con mayor robustez, con un crecimiento controlado y con mayor dominancia apical, demuestran una pérdida casi total de la dispersión de su semilla (marca significativa de la domesticación), pérdida de la dormancia en semilla, cambios en la sensibilidad del fotoperiodo y la sincronía floral, entre otros(Doebley *et al.*, 2006).

La domesticación dio cierta seguridad al hombre frente a la escasez de su fuente primaria de alimentación, sustituyendo incertidumbre por un gran esfuerzo para mantener su nuevo sistema de producción, iniciando así todo una serie de eventos que dan origen a lo que llaman la revolución neolítica cuyos efectos aún se pueden observar a través de la historia del hombre hasta nuestros días. La revolución neolítica se caracterizó por el cambio a sedentarismo, y por innovaciones tecnológicas y culturales (como el arado y la escritura) que se inició con la domesticación de plantas y animales (Caffrey, 2016). No era casualidad que los primeros cultivos que domesticó el ser humano fueron aquellos que con mayor frecuencia recolectaba cuando aún era nómada (cereales, semillas y nueces) y que hoy en día son de importancia mundial; encontrándose entre ellos los tres grandes cereales (maíz, trigo y arroz) que forman la base de la seguridad alimentaria de la población humana actualmente (Doebley *et al.*, 2006).

Marco teórico

La importancia de los cereales y el maíz

Mucho del desarrollo heterogéneo cultural humano se le puede deber a la domesticación de los cereales, que ha permitido enfocar su energía e interés en otras actividades en lugar de asegurar constantemente una fuente de alimento. Los cereales aún juegan un importante papel para el progreso y supervivencia de la especie humana (en el libro 'La civilización empática' de Jeremy Rifkin se refiere a ellos como un "motor" para el progreso de la civilización). Los cereales fueron y siguen siendo la fuente de sustento más importante (aunque no es la única) de muchas sociedades y asentamientos (Awika, 2011). Los cereales son plantas de la familia de las gramíneas que contienen un gran contenido energético. Son la fuente principal de energía para humanidad por su alto contenido de almidones (Végh, 2009). Los tres cereales que tienen mayor impacto a nivel mundial son el maíz, el trigo y el arroz.

El consumo de maíz es mayor y de gran importancia en países en desarrollo, proporcionan cerca del 60% de las calorías consumidas; en contraste, el maíz representa sólo el 30% de las calorías consumidas en países desarrollados, sin embargo, forma parte de su vida diaria de una manera indirecta y mucho más extensa; son fuente de edulcorantes, son parte de la alimentación del ganado, y en las últimas décadas, han sido la base para la producción de bioetanol (WHO/FAO Expert Consultation, 2003; Awika, 2011). De los tres cereales que más se producen a nivel mundial el maíz es el que más se cultiva; en el 2015 tuvo una producción de 989 millones de toneladas, que comparado con el trigo (732 millones de toneladas) fueron más de 200 millones de toneladas que éste (Awika, 2011; IGC, 2015). De manera directa o indirecta, el maíz tiene una fuerte influencia en la integridad de la población mundial, ha jugado y sigue jugando un papel en el progreso de civilizaciones; hoy en día extiende su influencia en la economía global de muchos países y en la seguridad alimentaria de muchas poblaciones.

Descripción del maíz

La planta del maíz es un cultivo muy adaptable; se siembra hoy en día en un amplio y variado rango de agro-climas. Pertenece a la familia de las *Poaceas* (pastos) y su nombre científico es *Zea mays L.* Sus usos varían dependiendo la región (Awika, 2011; Ranum *et al.*, 2014; IGC, 2015). Se cultiva en un amplio rango de condiciones: la temperatura óptima es entre 20°C y 30°C, se cultiva a latitudes de 58°N hasta 40°S y en altitudes que van desde el nivel del mar hasta más allá de 3,000m sobre éste. Es una planta monocotiledónea, con metabolismo C4, monoica, alta y de crecimiento determinado; tiene una filogenia característica donde las hojas largas y angostas se generan de manera alternante y opuestas (Ministry of Environment and Forest of India, 2010; Bennetzen y Hake 2012). La tabla 1 y 2 resumen las características

morfológicas del maíz y las etapas fisiológicas de su desarrollo respectivamente (Ministry of Environment and Forest of India, 2010; Bennetzen y Hake 2012; CIMMYT, nd).

Tabla 1 Descripción anatómica de la planta de maíz

Estructura	Descripción
Tallo	Su grosor final es de 3-4 cm por lo general. Compuesta por internodos que son cortos y algo gruesos en la base, que se vuelven más grueso en segmentos más arriba y luego vuelven a adelgazar. El internodo que contiene a la mazorca se encuentra estriado longitudinalmente. Las hojas superiores son responsables de la mayor proporción de fotosintatos a los granos.
Raíz	Crecen aceleradamente tanto en profundidad como de manera radial (60 cm). Tiene 3 tipos de raíces: seminales, adventicias y de anclaje.
Flor	El tallo termina con la aparición de la borla o la inflorescencia masculina que origina al polen. La inflorescencia femenina o mazorca se encuentra cubierta firmemente por varias capas de hojas que la mantiene muy unida al tallo hasta que aparecen los pistilos. La función de los pistilos es captar el polen.
Semilla	Es el fruto (cariopsis) de la planta. Contiene dos estructuras: la plúmula del cual se desarrolla una nueva planta, y el endospermo que provee de nutrientes al embrión hasta que la plántula tenga suficiente área foliar.

La producción anual promedio de maíz es de aproximadamente 750 millones de toneladas, pero su producción se ha ido incrementando debido a la diversificación de su uso (Shiferaw, 2011). Su consumo varía dependiendo del desarrollo económico de un país: en regiones de poco ingreso económicos, como África y América latina, es un alimento base de la población; en México representa la ingesta del 45% de las calorías (se consume cerca de 267 g/persona/día) (Nuss y Tanumihardjo, 2010). En países desarrollados, como E.U.A., su consumo directo es poco, pero su uso como materia prima es alto. Su principal utilización en países desarrollados es para la fabricación de edulcorantes, como alimentación para ganado y en la producción de bioetanol; con la creciente demanda de los cultivos de maíz para la producción de bioetanol, los precios aumentarán comprometiendo a muchos países en

Tabla 2. Etapas de desarrollo de la planta de maíz.

	Etapas	Descripción
Vegetativa	Plántula	1 semana después de la siembra. La planta tiene de 2-4 hojas
	Crecimiento acelerado	Desarrollo vegetativo acelerado (35-45 días después del sembrado).
	Iniciación de la floración	Surgimiento de la borla. Altura final de la planta
Reproductiva	Aparición de los pistilos	Se forma la mazorca de 2-3 días después de que se forma la borla. Los pistilos se asoman fuera de las hojas que envuelven a la mazorca.
	Lechosa	Se desarrollan las semillas pero éstos aún no están endurecidos. Se reconoce esta etapa debido a que las hojas que envuelven a la mazorca y los pistilos se encuentran parcialmente verdes.
	Maduración	Las hojas y los pistilos se vuelven secas y frágiles. Ya se puede cosechar la semilla.

desarrollo (Nuss y Tanumihardjo, 2010; Awika, 2011; Ranum *et al.*, 2014) (**Fig. 1**). Para los países donde el maíz es la fuente principal de sustento, el aumento del costo de este cultivo compromete su seguridad alimentaria.

Debido a que el maíz no es un alimento nutricionalmente completo, la población consumidora no recibe una dote adecuada de nutrientes (Nuss y Tanumihardjo, 2010; Awika, 2011; Shiferaw *et al.*, 2011; Ranum *et al.*, 2014). El maíz aporta vitamina A (dependiendo la variedad es la cantidad que puede aportar), vitamina E, hierro, folatos, triptófano y ciertas proteínas, pero no aporta la mayoría de las vitaminas B, muchas de sus proteínas no se pueden asimilar, sus

proteínas son deficientes de lisina y triptófano y su leucina bloquea la absorción de niacina (Nuss y Tanumihardjo, 2010; Shiferaw *et al.*, 2011).

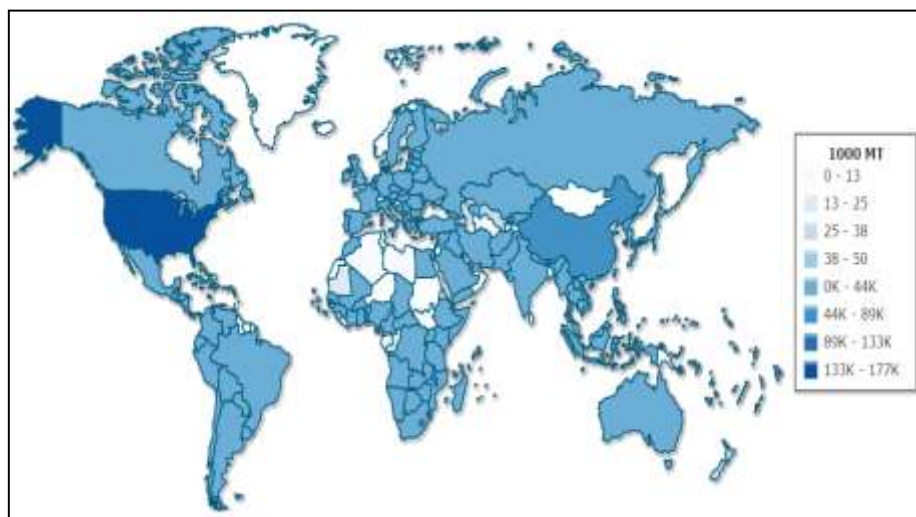


Figura 1 Consumo total de maíz a nivel mundial. Los valores que se observan engloban el consumo en alimento, pienso e industrial (consumo total de maíz). E.U.A. consume entre 133m - 177 K (1000 MT), China consume 44 - 89 K (1000 MT) y la mayoría del mundo consume menos de 44 K (1000 MT). Fuente: IndexMundi/Agriculture/Corn.

A pesar de la deficiencia de micronutrientes esenciales, muchos autores lo han propuesto, y lo han utilizado, como un buen vehículo para combatir problemas de mala nutrición; CIMMYT ha desarrollado un maíz denominado QPM (Quality Protein Maize) que contiene altos niveles de lisina y triptófano, y Hoekenga *et al.* (2011) realizó estudios de biodisponibilidad de hierro con maíz como ensayo de control de fortificación de cultivos (Hoekenga *et al.*, 2011; Shiferaw *et al.*, 2011; Ranum *et al.*, 2014; Nuss y Tanumihardjo, 2010).

Importancia del maíz en México

México es considerado el centro de origen primario, punto de distribución a otras regiones y centro de diversificación del maíz (Ranum *et al.*, 2014). Hay evidencias arqueológicas que indican que la antigua población indígena mexicana ya cultivaba maíz desde hace 7,000-10,000 años; se han encontrado mazorcas en cuevas que datan de 5,000 años atrás (Piperno y Flannery, 2001; Ranum *et al.*, 2014). La planta actual de maíz, y todas sus variedades, fue transformada a partir de la cruce de sus progenitores silvestres *Teocintle* y *Tripsacum*, nativas de la región mesoamericana, ambas pertenecientes a la Tribu *Maydaceae* (a la cual pertenece el

maíz), y que hoy en día aún se pueden encontrar en estado natural (Ministry of Environment and Forest of India, 2010; Ranum *et al.*, 2014). La planta de maíz tuvo gran aceptación como cultivo y se distribuyó a muchas regiones no sólo de Mesoamérica sino también a fuera del continente Americano; consecuencia del intercambio colombino en la “era del descubrimiento”(Khoury *et al.*, 2016).

El maíz forma parte del “tejido” cultural mexicano, es un elemento indispensables desde tiempos prehispánicos de su dieta y alrededor de este se ha desarrollado toda un arte culinario que ha dejado de ser un simple ingrediente y es tratado hoy en día como un simbolismo de una raza; la UNESCO la ha declarado Patrimonio Cultural Inmaterial (Suárez *et al.*, 2013). A pesar de todo lo mencionado, en el 2015 México fue el séptimo productor de maíz a nivel mundial con una producción de 24,000,000 toneladas métricas (IndexMundi, 2016), sin embargo, como forma parte de la dieta poblacional, y debido a que México se desarrolla como productor de carne (México cubre casi la mitad de las importaciones de carne de res para E.U.A) (Peel *et al.*, 2011), importó más de la mitad de maíz de lo que produjo ese mismo año (se importaron 13,000,000 toneladas métricas) (IndexMundi, 2016). Sin importar que la superficie agrícola correspondiente para los cultivos de maíz es de más de la mitad de la superficie agrícola total del país (7,100, 000 de hectáreas) México consume más de lo que produce (el consumo doméstico en el 2015 fue de 36,000,000 toneladas métricas) siendo el quinto país consumidor de maíz, el segundo importador de este mismo producto, y para complicar más el status con respecto al maíz, su rendimiento fue de tres toneladas métricas por hectárea, cifra que lo colocó en la posición cuarenta y dos en rendimiento productivo de maíz (IndexMundi, 2016).

Enfermedad en los cultivos por cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus*

Existe un gran y variado rango de patógenos que afectan los cultivos; considerando que son pocas las plantas que forman parte de la base principal de la alimentación humana (cerca de 14 cultivos a nivel mundial), los diferentes patógenos y plagas que amenazan estos cultivos también amenazan la seguridad alimentaria (Strange y Scott, 2005; Oerke, 2006; 29). El cambio climático es otro factor que desempeña un papel promotor en el desarrollo de enfermedades y plagas, causa muchas alteraciones en las estaciones del año como lo es la desviación de lluvias; los cultivos de secano como el maíz en México son muy susceptibles a los cambios climáticos que se están desencadenando, (Hellin *et al.*, 2014) provocando un estado de estrés hídrico en la planta que facilita el desarrollo de enfermedades.

Existen ciertos factores bióticos asociados a los cultivos de maíz (y en otros cultivos) que podrían causar pérdidas en su rendimiento como lo son las infecciones por hongos. Dentro de

las infecciones por hongos encontramos aquellas especies productoras de aflatoxinas. Las enfermedades por cepas aflotoxigénicas han adquirido importancia por causar no sólo pérdidas económicas, sino por ser también un riesgo sanitario para los consumidores (Urrego y Díaz, 2006). Las especies productoras de aflatoxinas pertenecen al género *Aspergillus*, siendo las especies *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* los más representativos (Chang, 2010).

Cepas aflatoxigénicas del género *Aspergillus*

Aspergillus flavus y *Aspergillus parasiticus* son dos hongos estrechamente relacionados que producen uno de los tipos de micotoxina más estudiada, las aflatoxinas. Se caracterizaron en un principio por ser especies asexuales que sólo se reproducían mediante esporas asexuales (conidio) o mediante la reactivación de un cuerpo fructífero de resistencia denominado esclerocio, sin embargo, su estadio sexual fue descubierto y clasificado en el género *Petromyces* (Horn *et al.*, 2009a; Horn *et al.*, 2009b; Amare y Keller, 2014). Se les conoce por colonizar material en descomposición (saprobios) y causar muchas enfermedades en diversos cultivos: *Aspergillus flavus* infecta con mayor frecuencia cultivos aéreos como maíz, cacahuate y algodón mientras *Aspergillus parasiticus* se limita a cultivos de suelo (Amaike y Keller, 2011). La estructura de resistencia esclerótica es un cuerpo compacto de hifas agregadas que permiten al hongo sobrevivir ambientes adversos, es morfológicamente variable y rica en nutrientes lo que permite permanecer en dormancia por largos periodos (Willetts y Bullock, 1992; Chang, 2010).

Aflatoxinas

Las aflatoxinas son especies químicas furanocumarinas, derivados de policétidos y que forman parte del metabolismo secundario (**Fig. 2a**); la ruta de biosíntesis se encuentra codificada en un clúster que contiene veinticinco genes estructurales junto con otros genes reguladores; son las micotoxinas más estudiadas (Yu *et al.*, 2004; Chang, 2010). Las aflatoxinas son químicamente diversos pero poseen una estructura básica similar, las principales aflatoxinas son la B₁, B₂, G₁ y G₂ y M₁ (Abrar *et al.*, 2013), la más estudiada es la aflatoxina B₁. Son contaminantes en los cultivos (que es arrastrado a almacén) y representa un agente tóxico para la salud de los consumidores; se une de manera covalente a muchas moléculas como proteínas y ácidos nucleicos alterando su función (formando abductos). Tienen un amplio espectro de efectos nocivos; su exposición aguda a niveles altos puede causar edema, daño agudo en hígado y hemorragia (Khlanguiset *et al.*, 2011), y su exposición a largo tiempo puede causar mutagénesis, teratogénesis, carcinogénesis, inmunosupresión y alteración hormonal (Chang, 2010; Abrar *et al.*, 2013). La aflatoxina B₁ es considerado un potente hepatocarcinogénico por la IARC (International Agency for Research on Cancer); su mecanismo de acción (**Fig. 2b**)

consiste en formar un abducto en un residuo guanidil en el codón 249 de la proteína supresora de tumores p53 causando una transversión de G a T (Urrego y Díaz, 2006; Abrar *et al.*, 2013).

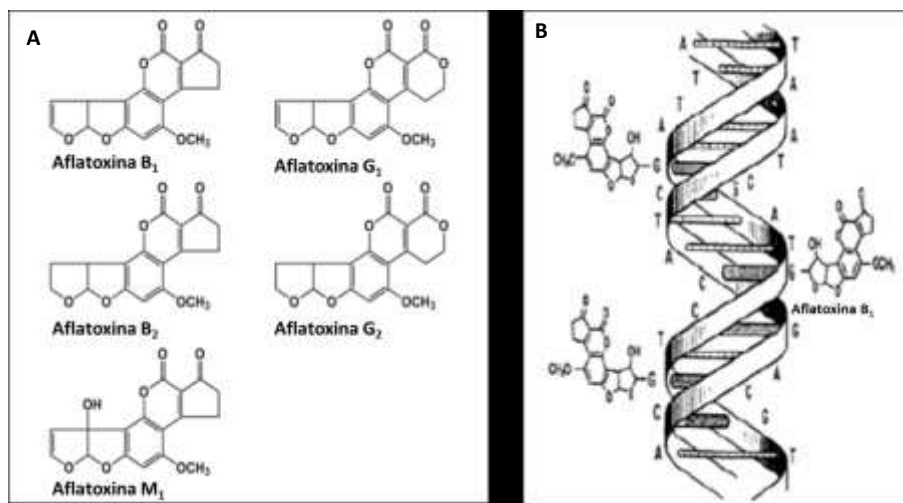


Figura 2 Aflatoxinas A) Estructuras de las aflatoxinas mayormente conocidas; comparten una estructura semejante de furanocoumarina. **B)** Mecanismo de acción de la aflatoxina B₁ consiste en formar abductos en un residuo guanidil del gen para la proteína p53. Fuente: Urrego y Díaz, (2006) y FDA: Bad Bug Book.

La producción de aflatoxinas se ha correlacionado con un estado de estrés oxidativo en la célula, aunque no se sabe qué valor adaptativo tienen, ésta correlación lo coloca dentro de un papel en mecanismos de defensa contra estrés oxidativo (Chang, 2010); Passi *et al.* (1984) demostraron que en *A. flavus* y *A. parasiticus* se inducía la producción de aflatoxinas al agregar un lipoperóxido sintético (producto de reacción entre radicales libres y la membrana celular), y Fanelli y Fabbri (1989) bloquearon en *A. parasiticus* la síntesis de aflatoxinas al agregar butilhidroxianisol y butilhidroxitolueno que son dos antioxidantes que bloquean la acción de los lipoperóxidos. Desde hace tiempo se ha demostrado la acumulación de aflatoxinas con la formación de esclerocio (Arrúa y Arrúa, 2007) y con el proceso biológico de esporulación (conidiación); Guzman y Herrera (1996) inhibieron la esporulación en *A. parasiticus* mediante inhibición química usando 1,4-diamino-2-butanona (un inhibidor competitivo de ornitina descarboxilasa), observando una disminución de los niveles de aflatoxinas. Hicks *et al.* (1997) desarrollaron mutantes de *A. nidulans* que no esporulaban mediante la inactivación de la ruta de señalización mediada por FadA (Fluffy Autolytic Dominant) que es un factor de transcripción regulador negativo de la esporulación, las mutantes no acumulaban aflatoxinas. Todos los

estudios mencionados tenían una característica en común que distinguía a la colonia; como el hongo esporulaba tardíamente, las hifas (estructuras vegetativas) seguían creciendo dando un aspecto plumoso (“fluffy”) a la colonia (**Fig. 3**). (Guzman-de-Peña y Ruiz-Herrera; 1997; Hicks *et al.*, 1997; Yoshinari *et al.*, 2007; Chang, 2010; Abrar, 2013).

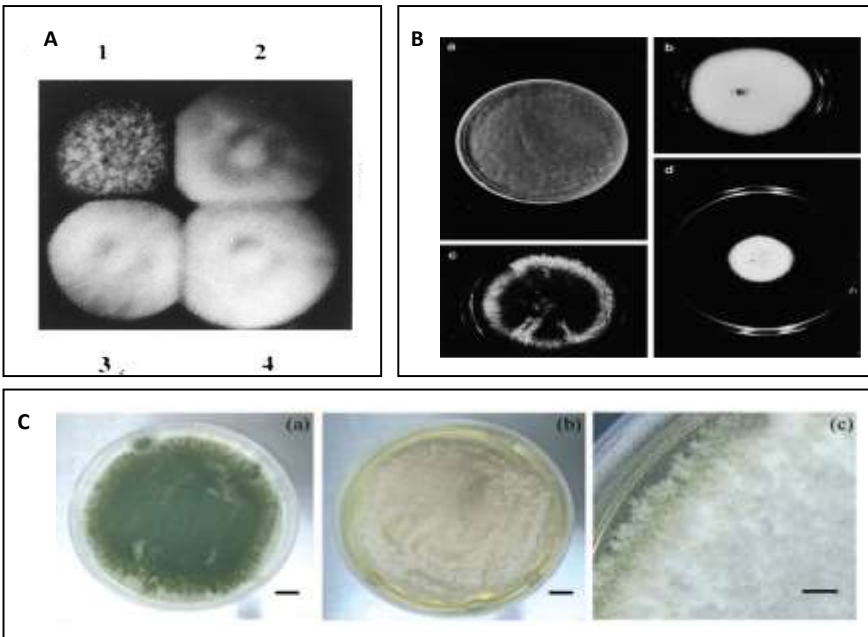


Figura 3 Fenotipo “fluffy” en diferentes estudios con *Aspergillus sp.* inhibiendo directamente o indirectamente la esporulación.A) Hicks *et al.*, 1997 B) Guzman-de-Peña y Ruiz-Herrera, 1997. C) Yoshinari *et al.*, 2007.

Las aflatoxinas son metabolitos muy persistentes que resisten al paso gastrointestinal, son acumulativas llegando a ser detectadas en leche materna de animales expuestos, y el mecanismo de detoxificación del organismos los transforma en especies más reactivas y tóxicas; es por ese motivo que la FDA y la Unión Europea, así como los organismos encargado de cada país, han impuesto medidas preventivas muy estrictas que han causado grandes pérdidas económicas. (Chang, 2010; Khalangwiset *et al.*, 2011; Abrar *et al.*, 2013; Lee y Lee, 2015).

Mecanismo de RNAi como alternativa para controlar las aflatoxinas

Se han descrito varios mecanismos para eliminar las aflatoxinas de los productos almacenados pero muchos afectarían al producto o al cultivo:

- Métodos en campo: Minimizar el contenido de agua (la deshidratación rápida ayuda a mantener protegido a la semilla por un mayor periodo de tiempo), cosecha temprana y un buen almacén (Abrar *et al.*, 2010).
- Métodos físicos: Separación del grano contaminado, humear, lavados con solventes y/o absorbentes y para eliminar la aflatoxina con calor se ocuparían temperaturas de 237°C - 306°C (Abrar *et al.*, 2010).
- Métodos químicos: Se han demostrado la efectividad de algunos reactivos químicos en la prevención contra aflatoxinas como el uso de ozono, bisulfito de sodio, amoníaco, peróxido de hidrógeno, solución suave de hidróxido de calcio, etileno, etc. (Abrar *et al.*, 2010).
- Métodos biológicos: Se propone utilizar cepas no aflatoxigénicas de *Aspergillus flavus* (Abrar *et al.*, 2010).

Aunque muchos de los tratamientos se están implementando, la mayoría de las opciones representa un riesgo para el producto o para sus propiedades agronómicas y/o comerciales. Una opción de control es acudir a la ingeniería genética; dentro de las técnicas que se pueden implementar mediante ingeniería genética se encuentra el RNAi (RNA interferente). El mecanismo de RNAi permite controlar los niveles de expresión de una proteína mediante la degradación del RNAm (RNA mensajero); el RNAi es uno de los mecanismos de silenciamiento postranscripcional, e involucra un siRNA (short interference RNA) como intermediario y el complejo RISC para llevar a cabo su función (Caplen, 2005). Desde el descubrimiento del mecanismo de RNAi se han desarrollado muchos estudios con el fin de establecer un régimen terapéutico de muchos padecimientos en distintos organismos; Khatri y Rajam (2007) silenciaron la expresión de ornitina descarboxilasa de *A. nidulans* adicionando una molécula RNAi de 23 pb en el medio, y Abdel-Hadi *et al.* (2011) silenciaron la expresión de la enzima que cataliza la síntesis del ácido norsolorínico, el primer intermediario de la ruta de biosíntesis de aflatoxinas en *A. flavus* y *A. parasiticus* (Abdel-Hadi *et al.*, 2011; Khatri y Rajam, 2007). Se ha aceptado que el mecanismo de RNAi tiene un papel de defensa inmunológica contra infecciones de virus y elementos transponibles (Obbard, 2009), sin embargo existe una tipo de “comunicación” entre especies de diferente reino mediado por siRNA; esta comunicación tiene como objetivo silenciar ciertos genes involucrados en la inmunidad y virulencia en relaciones de patógenos-hospedero (aunque también funciona en relaciones mutualistas); este movimiento de RNA's a través de reinos nos indica que existe una maquinaria de selección y transporte de moléculas de RNA (Weilberg *et al.*, 2013, Knip *et al.*, 2014; Chaloner *et al.*, 2016).

Transformación *in planta* de meristemo apical de maíz

La ingeniería genética es una buena opción para poder conseguir líneas de maíz resistentes. El número de estrategias que se pueden desarrollar parece ser casi ilimitado, sin embargo está limitado en la aplicación. Una etapa que puede ser un “cuello de botella” es el método de transformación; el cual incluye tanto la selección del tejido a transformar de la cual se obtendrá la planta transgénica, como el método de entrega de DNA y de regeneración. En maíz, las estrategias con mayores casos de éxitos utilizan tejido embrionario o tejido callosos transformados mediante biobalística o *Agrobacterium sp.*, y regenerados en medios altamente nutritivos (con una etapa subsecuente de selección dependiendo del gen reportero) para luego trasplantar la plántula a invernadero donde pasa por un periodo de adaptabilidad antes de realizar ensayos moleculares para verificar la integración del gen de interés (Frame *et al.*, 2000; Frame *et al.*, 2002; Shou *et al.*, 2004). A pesar de poder encontrar en la literatura varios protocolos de transformación, la gran mayoría tienen muy baja eficiencia de éxito o un tiempo muy alargado para obtener resultados (Jan *et al.*, 2016). Con el continuo progreso en el estudio de la relación de *Agrobacterium sp.* y sus hospederos, se han creado líneas de ésta bacteria altamente hipervirulentas, aumentando el rango de hospederos que pueden ser infectados (Hellens *et al.*, 2000; Lee, 2007). Estas nuevas cepas permitieron el desarrollo de diferentes estrategias de transformación *in planta*, incluyendo plantas de interés agronómico. Razzaq *et al.* (2010) probaron la transformación *in planta* antes y después de germinar semilla de trigo transformándolas con sistema binario en *Agrobacterium tumefaciens* que contenía al gen reportero GUS dentro del plásmido pBI121. Shahet *al.* (2014) transformaron tomate perforando el meristemo apical de tallo de la plantas de 3 días de germinación sin interrumpir el desarrollo, semejante al método de Feng *et al.* (2012) donde transformaron meristemo apical de tallo de plantas de maíz de 3-4 días de germinado; ambos acortaron el tiempo para obtener líneas transgénicas (comparadas con protocolos que utilizando cultivo de tejido) pero tuvieron porcentajes de eficiencia menor al 10%.

En este trabajo se desarrolló un método *in planta* para poder transformar meristemo apical de tallo en maíz semejante a Feng *et al.* (2010) pero con ciertas modificaciones. Esto permitiría al grupo de laboratorio trabajar con un protocolo más sencillo de transformación para maíz que no involucra cultivo de tejido.

Estrategia de control de cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus*

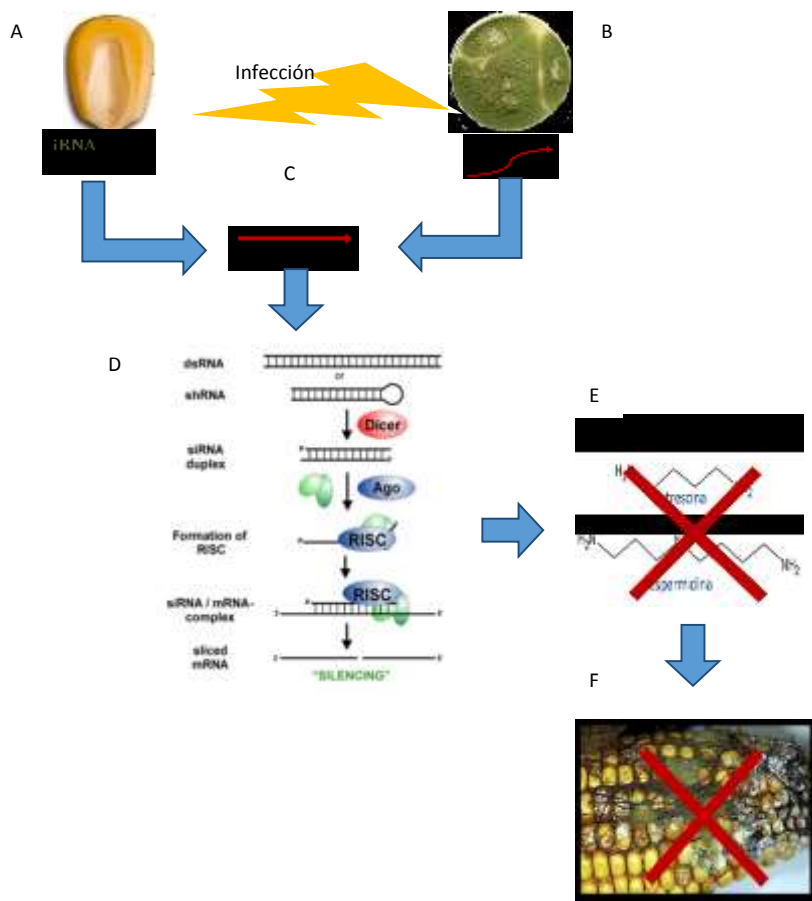


Figura 4 Esquema de la estrategia diseñada para el control de las infecciones contra cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus* en maíz. **A)** El maíz transgénico obtenido mediante transformación mediada por *Agrobacterium* expresa una región antisentido contra **B)** el RNAm de *Aspergillus flavus* que codifica para la proteína ornitina descarboxilasa, necesaria para la síntesis de poliaminas; el hongo al infectar la planta captará el RNAi del maíz que **C)** complementará al RNAm e **D)** iniciará el mecanismo de silenciamiento post-transcripcional en el hongo contra ornitina descarboxilasa lo que provocaría una **E)** alteración en los niveles de poliaminas; las poliaminas participan en muchos procesos celulares que permiten el desarrollo adecuado del hongo. Si las poliaminas se ven afectadas el desarrollo del hongo no se da de manera adecuada lo que **F)** dificultaría la infección en la planta y la producción de aflatoxinas.

Justificación

La infección por cepas aflatoxigénicas como *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* constituyen un riesgo para la productividad de los cultivos de maíz y para la salud de los consumidores. La estrategia basada en RNAi contra ornitina descarboxilasa demuestra ser una herramienta adecuada en el control de plagas de estas cepas.

El desarrollo de un método de transformación *in planta* para el maíz permitirá la obtención de líneas transgénicas en un menor tiempo que las estrategias que involucran cultivo de tejido.

Hipótesis

Hipótesis 1

El silenciamiento de la expresión del mRNA que codifica para ornitina descarboxilasa mediante la técnica de RNA interferente permitirá controlar el desarrollo diferencial de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus*.

Hipótesis 2

La transformación *in planta* del meristemo apical de tallo de la planta de maíz permitirá obtener plantas F0 y F1 transgénicas en un menor tiempo comparadas con métodos que involucran cultivo de tejido.

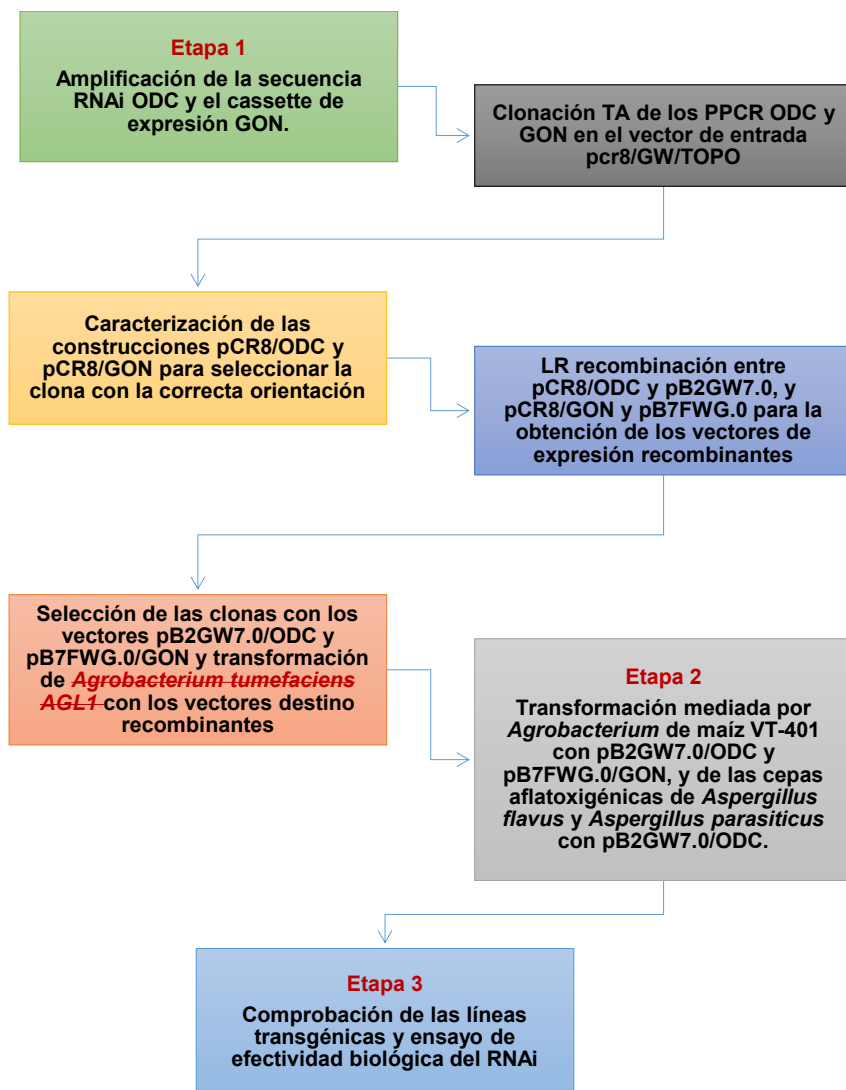
Objetivo General

Obtención de maíz genéticamente modificado mediante un método de transformación *in planta* que exprese una región antisentido contra el mRNA ornitina descarboxilasa de *A. flavus* y *A. parasiticus*, con la finalidad de alterar el desarrollo de estos hongos.

Objetivos particulares

1. Construcción de los vectores con el gen antisentido de ornitina descarboxilasa, para su expresión en maíz y hongo.
2. Transformación génica de maíz VT-401 y cepas fúngicas aflatoxigénicas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* con los vectores recombinantes de expresión utilizando el método *in planta*.
3. Confirmación de las líneas transgénicas mediante PCR punto final y ddPCR.
4. Ensayo de efectividad biológica del RNAi.

Estrategia experimental



Materiales y Métodos

Diseño del RNAi contra el RNAm de Ornitina Descarboxilasa de *Aspergillus flavus*

Se diseñó una región RNAi de 400 pb (276 pb del 5'UTR y 124 pb del ORF) mediante un enfoque racional contra el RNAm de ornitina descarboxilasa de *Aspergillus flavus* (*A. parasiticus* es muy similar a nivel genético y fenotípico con *A. flavus*); se utilizó la secuencia codificante de la proteína que se encuentra en la base de datos de NCBI (RefSeq= XM_002377008.1) para localizar la secuencia codificante completa en el genoma del hongo de dónde se pudo obtener la región 5'UTR (RefSeq= NW_002477240.1). La secuencia RNAi denominada ODC (**Anexo 1**) se sintetizó por la Compañía Genescript y fue clonada en el vector pUC57, bajo la dirección del promotor GLU-1D-1 de expresión inducida en semilla de *Triticum aestivum* obtenida igualmente de la base de datos de NCBI (RefSeq= AJ301618.1), y con el terminador NOS de *Agrobacterium tumefaciens*; al cassette de expresión se le denominó GON (**Anexo 1**).

Amplificación de la región RNAi ODC y el cassette de expresión GON

Para obtener las dos secuencias de trabajo se realizó PCR punto final utilizando la enzima polimerasa Takara Ex Taq de TAKARA BIO INC, y una modificación de su protocolo (**Anexo 2**). Se utilizaron oligonucleótidos específicos (**Anexo 1**) para obtener las dos secuencias: **ODC Fw** y **ODC Rv** para la secuencia RNAi ODC, y **PGLU Fw** y **TNOS Rv** para el cassette de expresión GON; se utilizó pUC57/GON como templado. Los productos de PCR (PPCR) se purificaron utilizando el protocolo de *Zymoclean Gel DNA recovery kit*.

Ligación de los PPCR al vector de entrada pCR8/GW/TOPO

Para la recombinación de los PPCR ODC y GON con el vector de entrada, se utilizó el protocolo modificado (**Anexo 2**) de *pCRTM8/GW/TOPO TA cloning kit*. El vector de entrada pCR8 contiene el gen *aadA* que confiere resistencia al antibiótico espectinomicina para selección en *Escherichia coli*, el sitio de clonación TOPO[®] para la introducción del inserto mediante clonación TA, contiene los sitios de recombinación *attL1* y *attL2* para transferencia del inserto a los vectores destinos Gateway[®] y el origen de replicación *ColE1* para un alto número de copias del plásmido en *Escherichia coli* (**Anexo 1**). El volumen de la reacción se utilizó para la transformación de la cepa one shot *Escherichia coli Mach1TM-T1^R* quimiocompetentes (**Anexo 3**) de Invitrogen. A los vectores se les denominó pCR8/ODC y pCR8/GON respectivamente.

Selección de clonas con vector de entrada recombinante correctamente orientado

La inserción de la región de interés en el vector pCR8 puede ocurrir en antisentido con respecto a los sitios *att*, que son los sitios que permiten la recombinación con el vector destino, independientemente de lo se quiere. Para caracterizar los vectores de entrada recombinantes se realizó una serie de digestiones enzimáticas (**Anexo 2**); se usó la enzima EcoR1 para la liberación del inserto en las clonas, y un par de enzimas para observar orientación: Para las clonas con pCR8/ODC se utilizó XbaI y AscI, y para la construcción GON se utilizaron las enzimas XbaI y NdeI. Para los vectores pcr8/GON no era necesario el análisis de orientación por ser todo un cassette de expresión, sin embargo se le realizó este análisis para su secuenciación. Todas las enzimas fueron obtenidas de la compañía NEB. Las clonas con el plásmido recombinante orientado correctamente fueron seleccionadas para secuenciación y para los ensayos de recombinación con el vector destino.

Secuenciación de los plásmidos pCR8/ODC y pCR8/GON

Los plásmidos correctamente orientados fueron enviados al laboratorio de secuenciación de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se secuenció en ambos plásmidos la secuencia RNAi ODC.

Ensayo de recombinación con los vectores destino

Los vectores destino recombinantes son los sistemas de expresión que introducirán el transgen (RNAi) a los hospederos. Para la construcción pCR8/ODC correctamente orientado se utilizó el vector destino *GATEWAY*TMpB2GW7.0 de Invitrogen, y para la construcción pCR8/GON correctamente orientado se utilizó el vector destino *GATEWAY*TMpB7FWG.0 (**Anexo 1**) de Invitrogen (Karimi *et al.*, 2002). Se utilizó el protocolo modificado del kit *GATEWAY*[®] Technology with Clonase[®] II con referencia a la reacción LR recombinación. El volumen de la reacción se utilizó para la transformación de la cepa one shot *Escherichia coli*Mach1TM -T1^R quimiocompetentes (**Anexo 2**) de Invitrogen. Las clonas fueron verificadas por PCR punto final para la región ODC en ambas construcciones. Las construcciones se denominaron pB2GW7.0/ODC y pB7FWG.0/GON.

Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1

La cepa utilizada de *Agrobacterium* fue una línea hipervirulenta electrocompetente (**Anexo 2**) denominada *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 que contiene el plásmido pTiBo542 Δ T-DNA. Se

realizó transformación independiente con cada vector destino recombinante (pB2GW7.0/ODC y pB7FWG.0/GON) y se evaluaron las clonas con PCR punto final del transgen ODC.

Transformación de los hospederos con los vectores destino recombinante

Para la transformación de maíz se utilizó la línea comercial VT-401 proporcionada por ICAMEX. El método utilizado de transformación (**Anexo 2**) es un método *in planta* desarrollado como parte de este proyecto; se removió 3-4 mm de la punta del coleoptilo de semillas de 2-3 días de germinación (dpg) en cámara de cultivo *in vitro* Percival (**Anexo 3**) con aproximadamente 5 mm de longitud total de coleoptilo; se expuso la herida a una suspensión concentrada pre-tratada y sin tratar (**Anexo 3**) de las líneas recombinante de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 con la finalidad de infectar el meristemo apical de tallo utilizando una punta o aguja. Para la transformación del hongo se utilizó el protocolo modificado (**Anexo 2**) para la transformación de *Trichoderma* mediada por *A. tumefaciens* (Malmierca *et al.*, 2005); se utilizaron dos líneas aflatoxigénicas de *Aspergillus flavus* (H-167 y H-617) y una línea aflatoxigénica de *Aspergillus parasiticus* (H-188), obtenidas de la Colección Microbiana del CINVESTAV Unidad Zacatenco. Las tres líneas fueron transformadas con la construcción caracterizada pB2GW7.0/ODC. Después de la transformación, las líneas de maíz infectadas fueron retadas tópicamente con una solución del herbicida FINALE® (150g/L de ingrediente activo glufosinato de amonio) con una concentración final de glufosinato de amonio del 0.15% (**Anexo 3**) con la finalidad de seleccionar aquellas resistentes al herbicida y realizarles un ensayo subsecuente de PCR punto final para identificar el transgen *RNAi ODC* (usando el gen endógeno HMG-13 como control) (RefSeq: NM_001174179.1). Para seleccionar líneas transgénicas de los hongos transformados, se utilizó un extracto fenol:cloroformo:isoamílico de la marca comercial FINALE® para tener una solución concentrada de glufosinato de amonio (Nayak *et al.*, 2006) el cual se agregó al medio de selección a una concentración (v/v) de 500 µL/mL (**Anexo 3**); las hifas desarrolladas en este medio de cultivo se les comprobó transformación con PCR punto final del gen BAR (usando el gen endógeno para tubulina como control).

Ensayo de efectividad biológica del RNAi ODC

Se llevó a cabo un ensayo de 4 tratamientos (**Anexo 3**) con cada línea recombinante de cada línea aflatoxigénica de *Aspergillus*, y su variante silvestre (**Anexo 2**) con la finalidad de observar la funcionalidad del RNAi para alterar el desarrollo del hongo. El tratamiento 1 es el medio de cultivo sin aditivos, se utilizó para demostrar el efecto real del RNAi en el desarrollo del hongo, el tratamiento 2 se ideó para observar alguna recuperación del fenotipo y un desarrollo normal de la línea transgénica, mientras que el tratamiento 3 contiene sólo glufosinato de amonio y el

tratamiento 4 contiene tanto putrescina como glufosinato de amonio para observar el desarrollo normal de la línea transgénica más no de la línea silvestre.

Ensayo de número de copias de la línea ODC1

Se determinó el número copias del transgen (número de eventos de inserción) en la línea parental madre ODC1 la cual fue polinizada con una línea silvestre. Ésta cruza dio origen a 20 líneas F1 (las cuales se caracterizaron mediante PCR punto final utilizando el transgen ODC). El ensayo se realizó detectando el transgen BAR que confiere resistencia a glufosinato de amonio, utilizando el sistema QX200 Droplet Digital PCR que permite una cuantificación absoluta (**Anexo 2**). Se realizó el ensayo siguiendo las indicaciones del inserto. Se digirió una concentración de 10 ng/μL de DNA genómico con la enzima HindIII y se utilizó 4 μL para la reacción final de 20 μL.

Extracción de DNA genómico y DNA plasmídico

Para las extracciones de DNA plasmídico a partir de los cultivos de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* recombinante se usó el protocolo de *Zymo Research Plasmid miniprep classic kit*. Se utilizó el protocolo de *Zymo Research plant/seed DNA miniprep kit* para la extracción de DNA genómico de maíz. Para la extracción de DNA genómico de hongo se utilizó el método de extracción CTAB modificado (**Anexo 3**). Para la extracción de los PPCR y plásmido linearizado a partir del gel de agarosa, se utilizó *Zymoclean Gel DNA recovery kit*. Para la cuantificación de DNA se hizo uso del espectrofotómetro *NanoDrop 2000*.

Ensayos *in silico*

Para los análisis *in silico* de las secuencias, PCR, digestiones etc. se usó el programa SerialCloner 2.6; herramienta para manipular secuencias muy sencillo de usar para principiantes pero con un formato de imagen poco atractivo.

Corte histológico del coleóptilo de maíz

Se realizó fijación de coleóptilo de maíz de 5 mm de longitud basado el protocolo que se encuentra en el libro "Arabidopsis: a laboratory manual" de *Detlef Weigel* y *Jane Glazebrook*.

Resultados

Diseño de la secuencia RNAi ODC y análisis *in silico* fuera de blanco

A. flavus y *A. parasiticus* comparten características fenotípicas y genotípicas que las relaciona estrechamente; un ejemplo claro es la producción de aflatoxinas (Abar *et al.*, 2013). Usando la datos de NCBI (RefSeq= NW_002477240.1) se localizó la secuencia del marco abierto de lectura para la proteína ornitina descarboxilasa y las secuencias aledañas. Mediante un enfoque racional se decidió por una región interferente de 400 pb contra una región que abarca 276 pb de la región 5'UTR corriente arriba del codón de inicio y los primeros 124 pb del marco abierto de lectura (**Fig. 5**); la región RNAi se denominó ODC y se mandó a sintetizar bajo el control del promotor Glu-1D-1 (de expresión específica en semilla; 1249 pb) y el terminador NOS (285 pb), a este cassette de expresión se le denominó GON (1934 pb) (**Fig. 5**).

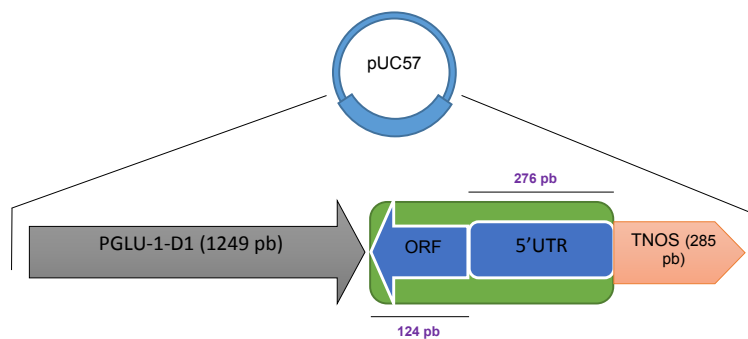


Figura 5 Esquema del cassette GON El cassette de expresión GON (1924 pb) en el plásmido de clonación pUC57. Ésta construcción se tomó como template para aislar, mediante PCR punto final, al fragmento RNAi ODC (276 pb + 124 pb) y al cassette GON (PGLU-1D-1 + ODC + TNOS).

Utilizando la región interferente ODC se realizaron alineamientos globales con cada una de las diferentes bases de datos de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Por ser la molécula blanco de naturaleza RNA, se alineó en primera instancia con la base de RNA y luego con todas las demás bases; se utilizaron diferentes combinaciones paramétricas para obtener la mayoría de los resultados con valor de E menor. En la **Tabla 3** se muestran los resultados más significativos de todos los ensayos de alineamiento, la mayoría resulta ser de naturaleza fúngica (principalmente del género *Aspergillus*). Se realizaron alineamientos contra todas las secuencias de origen humano y alineamientos “específicos” contra organismos de uso

doméstico para el hombre como: maíz (cultivo blanco de este proyecto), *Glomus* sp. (endomycorriza arbuscular de uso agronómico), perro, gato, vaca, cerdo y gallina.

Tabla 3 Análisis in silico de la secuencia RNAi ODC. Se muestran los resultados más significativos (dado por el valor E) del alineamiento utilizando la base entera de RNA que se encuentra en NCBI utilizando un algoritmo laxo para obtener el mayor número de hits.

Descripción	Puntaje máximo	Puntaje total	Cobertura (%)	Longitud (pb)	Valor E	Identidad (%)	Registro
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40 ornithine decarboxylase, mRNA	722	722	100	400	0	100	XM_001821225.2
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 ornithine decarboxylase, mRNA	224	224	31	124	3x10 ⁻⁵⁵	100	XM_002377008.1
<i>Aspergillus nomius</i> NRRL 13137 ornithine decarboxylase mRNA	192	192	31	124	2x10 ⁻⁴⁵	94	XM_015546124.1
<i>Coccidioides immitis</i> RS ornithine decarboxylase mRNA	131	131	28	112	5x10 ⁻²⁷	86	XM_001241614.2
<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 ornithine decarboxylase (NFIA_108190) partial mRNA	123	123	31	124	7x10 ⁻²⁵	82	XM_001267222.1
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293 ornithine decarboxylase (AFUA_4G08010), partial mRNA	114	114	31	124	4x10 ⁻²²	81	XM_746932.1
<i>Penicillium marneffe</i> ATCC 18224 ornithine decarboxylase, mRNA	113	113	27	108	1x10 ⁻²¹	83	XM_002148976.1
<i>Ajellomyces dermatitidis</i> SLH14081 ornithine decarboxylase, mRNA	105	105	27	108	2x10 ⁻¹⁹	81	XM_002627673.1
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4 hypothetical protein AN3846.2 partial mRNA	77	77	30	120	9x10 ⁻¹¹	75	XM_656358.1
<i>Pseudogymnoascus destructans</i> 20631-21 ornithine decarboxylase mRNA	69.8	69.8	22	88	1x10 ⁻⁰⁸	78	XM_012887557.1
<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88 ornithine decarboxylase, mRNA	60.8	60.8	29	116	7x10 ⁻⁰⁶	72	XM_001401573.2
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. lycopersici 4287 ornithine decarboxylase mRNA	57.2	57.2	20	80	8x10 ⁻⁰⁵	77	XM_018386189.1
<i>Fusarium graminearum</i> PH-1 ornithine decarboxylase mRNA	57.2	57.2	16	64	8x10 ⁻⁰⁵	82	XM_011326210.1
<i>Phialocephala scopiformis</i> ornithine decarboxylase mRNA	53.6	53.6	17	68	0.001	77	XM_018205109.1

...Continuación.

Descripción	Puntaje máximo	Puntaje total	Cobertura (%)	Longitud (pb)	Valor E	Identidad (%)	Registro
Aspergillus terreus NIH2624 ornithine decarboxylase (ATEG_05404) partial mRNA	53.6	53.6	13	52	0.001	83	XM_001214582.1
Gaeumannomyces graminis var. tritici R3-111a-1 ornithine decarboxylase mRNA	51.8	51.8	16	64	0.004	79	XM_009224081.1
Penicillium expansum Orn/DAP/Arg decarboxylase 2, C-terminal mRNA	50	50	10	40	0.012	87	XM_016740703.1
Penicillium digitatum Pd1 Ornithine decarboxylase mRNA	50	50	10	40	0.012	87	XM_014674965.1
Magnaporthe oryzae 70-15 ornithine decarboxylase mRNA	50	50	21	84	0.012	76	XM_003709182.1
Neurospora crassa OR74A ornithine decarboxylase (spe-1), mRNA	48.2	48.2	16	64	0.043	76	XM_955656.3
Neurospora tetrasperma FGSC 2508 Ornithine decarboxylase mRNA	48.2	48.2	16	64	0.043	76	XM_009849706.1
Bipolaris maydis ATCC 48331 hypothetical protein mRNA	44.6	44.6	13	52	0.53	79	XM_014224316.1
PREDICTED: Athalia rosae uncharacterized LOC105684205 (LOC105684205), mRNA	44.6	44.6	8	32	0.53	88	XM_012397387.1
Trichoderma reesei QM6a ornithine decarboxylase-like protein (TRIREDRAFT_77119), mRNA	44.6	44.6	16	64	0.53	75	XM_006964630.1
PREDICTED: Malus x domestica uncharacterized LOC103454755 (LOC103454755), transcript variant X2, ncRNA	42.8	42.8	9	36	1.8	85	XR_532053.2
PREDICTED: Malus x domestica uncharacterized LOC103454755 (LOC103454755), transcript variant X1, ncRNA	42.8	42.8	9	36	1.8	85	XR_532052.2
Verruconis gallopava hypothetical protein mRNA	42.8	42.8	26	104	1.8	71	XM_016358977.1
PREDICTED: Camelus ferus potassium channel tetramerization domain containing 3 (KCTD3), mRNA	42.8	42.8	9	36	1.8	86	XM_014562146.1
PREDICTED: Propithecus coquereli potassium channel tetramerization domain containing 3 (KCTD3), mRNA	42.8	42.8	9	36	1.8	86	XM_012638317.1
PREDICTED: Gossypium raimondii mediator-associated protein 1-like (LOC105784056), transcript variant X2, mRNA	42.8	42.8	6	24	1.8	96	XM_012609835.1
PREDICTED: Gossypium raimondii mediator-associated protein 1-like (LOC105784056), transcript variant X1, mRNA	42.8	42.8	6	24	1.8	96	XM_012609834.1

Los resultados obtenidos de los alineamientos contra secuencias humanas (**Tabla 4**) muestran los primeros hits (que tienen mayor significancia) con un valor E ambiguo que dependiendo del rango elegido como significativo podría ser hits que hay que tomar en consideración; sin embargo representan secuencias que no tienen alguna anotación o función relacionada.

En el alineamiento con géneros donde se encuentran las especies domésticas más comunes, el alineamiento con maíz y el alineamiento con el género de micorriza *Glomus* no mostró resultado alarmante o significativo (**Tabla 5**). Aunque con algunas especies se presentó una cobertura del cien por ciento, en todos los casos el porcentaje de identidad es menor al cien, tienen valores de E altos y, en la mayoría, las secuencias no están anotadas.

Ligación de la RNAi ODC y el cassette de expresión GON al vector de entrada pCR8/GW/TOPO respectivamente y selección de la clona correctamente orientada

Mediante amplificación PCR oligonucleótido específica se obtuvieron fragmentos correspondientes a la región RNAi ODC y al cassette de expresión GON. Se realizó una reacción 5x a la descrita en la metodología para cada uno de los fragmentos de interés; el tamaño de las bandas en el gel de agarosa fueron los esperados: 400 pb para la región RNAi ODC y 1934 pb para el cassette de expresión GON. Cada banda purificada del gel de agarosa (**Fig.6**) fue ligada al vector de entrada pCR8/GW/TOPO (**Fig. 7**) y subclonado en *E. coli Mach1*. Se extrajo DNA plasmídico de 10 clonas de cada evento de transformación y se les realizó ensayo de digestión enzimática para observar orientación y liberación de inserto (**Fig. 8 y 9**). El análisis *in silico* de orientación nos indica que pCR8/ODC correctamente orientado debe de arrojar un fragmento 2,927 pb y otro de 290 pb (**Fig. 8a**); sólo la clona 5, 6 y 10 se encuentran correctamente orientada. Para la correcta orientación de pCR8/GON, el análisis *in silico* de orientación (**Fig. 9a**) nos indica que la digestión debe de resultar en dos bandas de 2,927 pb y 2,084 pb respectivamente. En el ensayo de digestión de pCR8/GON clona 1 – 10 con EcoRI origina dos fragmentos cuando debería liberar el inserto.

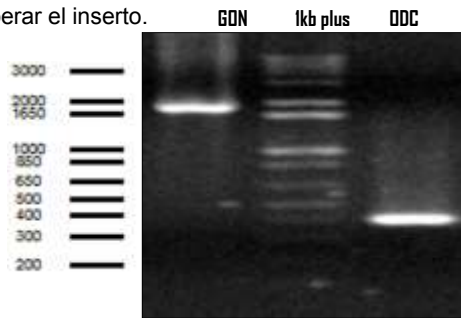


Figura 6 Producto de PCR purificado. Producto de PCR purificado: GON (1934 pb) y ODC (400 pb). Marcador de peso= 1 kb plus.

Tabla 4 Análisis in silico fuera de blanco contra secuencias de origen humano. Se muestran los hits con el valor E más significativos de los diferentes análisis de alineamiento entre la secuencia RNAi ODC y secuencias concernientes al ser humano (NCBI). Los alineamientos fueron resultado de diferentes ajustes paramétricos del

Descripción	Puntaje máximo	Puntaje total	Cobertura (%)	Longitud (pb)	Valor E	Identidad (%)	Registro
Homo sapiens chromosome 5 clone RP11-166A12, complete sequence	41.7	41.7	7	28	0.66	93	AC110003.2
Homo sapiens 3 BAC RP11-481M14 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence	40.5	40.5	9	36	1.2	87	AC108739.8
Homo sapiens chromosome 8, clone RP11-730G20, complete sequence	39.7	39.7	8	32	2	91	AC115837.1
Homo sapiens cystathionine gamma-lyase (CTH), RefSeqGene on chromosome 1 *	39.9	39.9	5	20	2.4	100	NG_008041.1
Homo sapiens chromosome 10 clone RP11-433J20, complete sequence	39.9	39.9	6	24	2.4	96	AC025822.7
Human DNA sequence from clone RP11-42O15 on chromosome 1, complete sequence	39.9	39.9	5	20	2.4	100	AL354872.9
Homo sapiens YME1 like 1 ATPase (YME1L1), RefSeqGene on chromosome 10	39.4	39.4	11	44	2.6	82	NG_047122.1
Homo sapiens microtubule associated serine/threonine kinase like (MASTL), RefSeqGene on chromosome 10 *	39.4	39.4	11	44	2.6	82	NG_016987.1
Human DNA sequence from clone RP11-85G18 on chromosome 10, complete sequence	39.4	39.4	11	44	2.6	82	AL160291.31
Homo sapiens chromosome 3, alternate assembly CHM1_1.1	38.8	38.8	9	36	4.5	87	NC_018914.2
Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p7 Primary Assembly *	38.8	38.8	9	36	4.5	87	NC_000003.12
Homo sapiens glutamate receptor interacting protein 1 (GRIP1), RefSeqGene on chromosome 12 *	34.5	34.5	8	32	7.6	86	NG_021400.1
Homo sapiens myosin light chain kinase (MYLK), RefSeqGene on chromosome 3 *	34.1	34.1	22	88	9.6	69	NG_029111.1

BLAST.

Tabla 5 Análisis in silico fuera de blanco contra especies domésticas. Se muestran los hits con el valor E más significativos de los diferentes análisis de alineamiento entre la secuencia RNAi ODC y las bases de datos concernientes a diferentes especies que se relacionan mayormente con el ser humano (consumo o compañías contratados en las bases de datos de NCBI). Los alineamientos fueron resultado de diferentes ajustes paramétricos del BLAST.

Género	Descripción	Puntaje máximo	Puntaje total	Cobertura (%)	Longitud (pb)	Valor E	Identidad (%)	Registro
Zea sp.	Zea mays uncharacterized LOC100279105 (LOC100279105), mRNA	33.8	33.8	100	400	5.2	81	NM_001152149.1
Glomus sp.	Rhizophagus intraradices clone JGIBTPH-29P12, complete sequence	29.5	29.5	6	24	0.97	88	AC237361.1
	Rhizophagus intraradices clone JGIAHZS-25B19, complete sequence	27.5	27.5	5	20	3.8	95	AC156585.2
Canis sp.	Canis Familiaris, clone XX-107B14, complete sequence	36.1	36.1	11	44	1.2	80	AC187967.6
	Canis Familiaris chromosome X, clone XX-312E24, complete sequence	33.8	33.8	12	48	6.1	78	AC188521.12
	Canis Familiaris chromosome 9, clone XX-306L16, complete sequence	33.8	33.8	10	40	6.1	81	AC186987.5
	Canis Familiaris chromosome 9, clone XX-415N7, complete sequence	33.8	33.8	10	40	6.1	81	AC190108.4
Felis sp.	Felis catus BAC clone FCAB-84H12 from chromosome unknown, complete sequence	38.8	38.8	13	52	0.087	80	AC234297.1
	Felis catus clone BAC 522e10, complete sequence	35.8	35.8	9	36	0.69	85	FJ385778.1
	PREDICTED: Felis catus SRY (sex determining region Y)-box 6 (SOX6), transcript variant X1, mRNA	33.1	33.1	9	36	4.4	84	XM_006937121.2
	Felis catus BAC clone FCAB-11H12 from chromosome unknown, complete sequence	32.5	32.5	21	84	6.9	68	AC235602.1
Bos sp.	PREDICTED: Bos taurus ADP/ATP translocase 1 (LOC787122), mRNA	35.1	35.1	7	28	3.9	90	XM_015464398.1
	PREDICTED: Bos taurus ADP/ATP translocase 1 (LOC787122), mRNA	35.1	35.1	7	28	3.9	90	XM_015472378.1
	PREDICTED: Bos taurus zinc finger protein 570 (ZNF570), transcript variant X1, mRNA	34.5	34.5	23	92	6.2	68	XM_005218896.3
	Bos taurus zinc finger protein 570 (ZNF570), mRNA	34.5	34.5	23	92	6.2	68	NM_001191353.1
Sus sp.	Sus scrofa mRNA, clone: OVRT10045F12, expressed in ovary	35.8	35.8	100	400	2.7	82	AK400595.1
	Pig DNA sequence from clone CH242-511F13 on chromosome X, complete sequence	34.8	34.8	8	32	5.4	88	FP102717.6
	Pig DNA sequence from clone CH242-123B2 on chromosome X, complete sequence	34.5	34.5	9	36	6.8	84	CU861912.7
	Sus scrofa genomic DNA, chromosome 7, BAC clone: L435G20, swine leukocyte antigen(SLA) classical class I region	34.5	34.5	14	56	6.8	75	AP009553.1
Gallus sp.	Gallus gallus BAC clone CH261-54H7 from chromosome z, complete sequence	39.1	39.1	9	36	0.24	89	AC187596.3
	Gallus gallus BAC clone CH261-43B19 from chromosome unknown, complete sequence	39.1	39.1	8	32	0.24	89	AC148919.1
	Gallus gallus BAC clone CH261-85A21 from chromosome z, complete sequence	35.8	35.8	15	60	2.4	76	AC187271.3
	Gallus gallus BAC clone CH261-175O2 from chromosome z, complete sequence	35.1	35.1	11	44	3.7	80	AC186343.2

El comportamiento en la digestión de las clonas de pCR8/GON con la enzima EcoRI se debió al efecto estrella de la enzima. Se digirió el producto de PCR GON en las mismas condiciones que las clonas y se observó el mismo patrón de bandas y al ajustar el ensayo el efecto se perdió. Las clonas correctamente orientadas fueron la clona 2, 3, 4, 6 y 9.

Las clonas correctamente orientadas fueron secuenciadas en su región RNAi ODC para descartar alguna inserción/delección de base (**Fig. 10**). Ninguna clona mostró alteración de la secuencia. Se seleccionaron las clonas pCR8/ODC6 y la clona pCR8/GON4 para los ensayos subsiguientes.

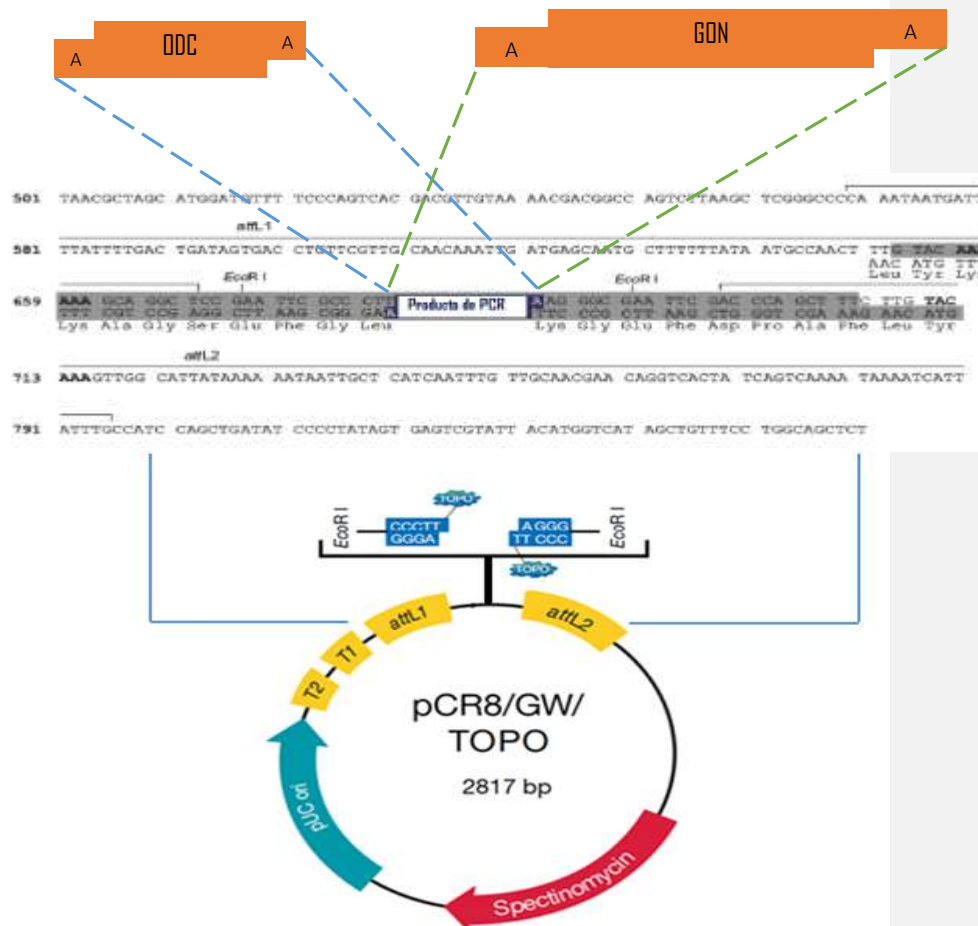


Figura 7 Esquema de ligación a vector de entrada. El producto de PCR purificado se insertó, mediante ligación TA, al vector pCR8/GW/TOPO en los sitios complejo con la Topoisomera (TOPO). El sitio de inserción se encuentran bordeado por dos sitios EcoRI que permiten la caracterización de la recombinación mediante digestión enzimática donde se espera la liberación del inserto. Más allá de los sitios EcoRI se encuentran los sitios de attL1 y attL2 que permiten el traspaso del inserto al vector destino. Los plásmidos recombinantes resultantes son: pCR8/ODC con un peso de 3,217 pb y pCR8/GON con un peso de 4,751 pb.

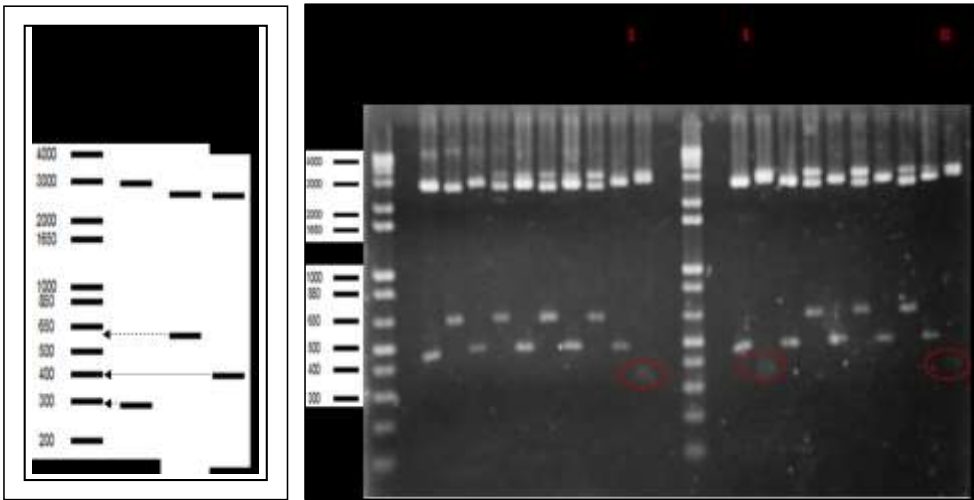


Figura 8 Caracterización de los plásmidos pCR8/ODC clonas 1 al 10. A) Análisis *in silico* de la orientación del inserto ODC dentro del vector pCR8. La orientación correcta (C) libera dos bandas con un peso de 2,927 pb y 290 pb respectivamente, mientras que la orientación incorrecta (I) libera bandas de 2,618 pb y otra de 599 pb. La digestión con EcoRI libera (L) el inserto (400 pb + 18 pb extras). B) El ensayo de digestión muestra que las diez clonas liberan un fragmento cercano a 400 pb digeridas con EcoRI (E) pero sólo las clonas 5, 6 y 10 liberan un fragmento cercana a la banda de 300 pb con XbaI/AscI (X/A) como es de esperar para la orientación correcta. Marcador de peso= 1 kb plus

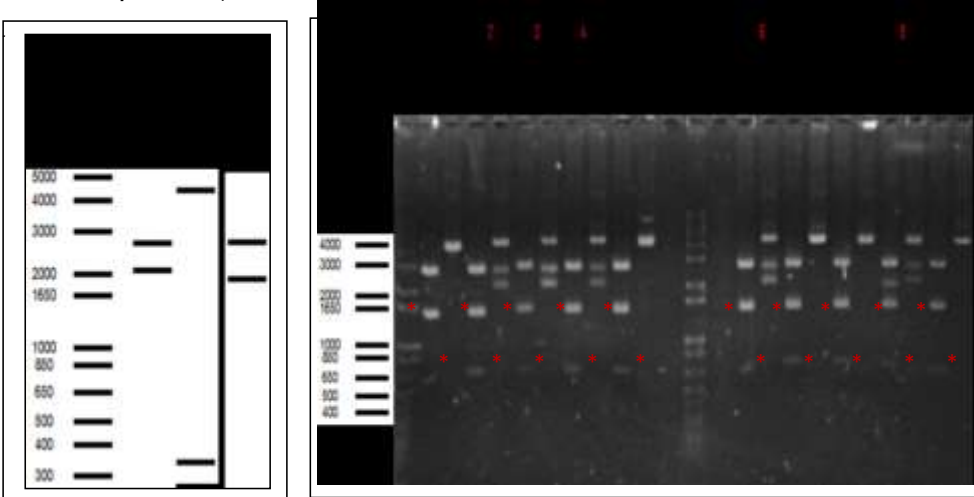


Figura 9 Caracterización de los plásmidos pCR8/GON clonas 1 al 10. A) Análisis *in silico* de la orientación del inserto GON dentro del vector pCR8. La orientación correcta (C) libera dos bandas con un peso de 2,667 pb y 2,084 pb respectivamente, mientras que la orientación incorrecta (I) libera bandas de 4,413 pb y otra de 338 pb. La digestión con EcoRI libera (L) el inserto 1934 pb + 18 pb). B) El ensayo de digestión muestra que las diez clonas liberan dos fragmentos (*), uno cercano a los 1650 pb y otro alrededor de 650 pb al digerir con EcoRI (E), cuando debería liberar el fragmento cercano a 2000 pb. Este comportamiento se le atribuyó al efecto estrella. Sólo las clonas 2, 3, 4, 6 y 9 liberan un fragmento cercano a la banda de 2,000 pb cuando se digieren con XbaI/NdeI (X/N). Marcador de peso= 1 kb plus

```

Secuencia alineada_1:[Resultado de secuenciación (400 nt)] con la
Secuencia_2: [RNAi ODC (400 nt)]
Puntaje = 722 bits (800), Valor E = 0.0
Identidad = 400/400 (100%)

Sec_1 1 GGCATCCCCTCCATTGTTGCTGATTGACTCAAATTATGATTATAATTAAGTCGGATT 60
      |
      |
      |
Sec_2 1 GGCATCCCCTCCATTGTTGCTGATTGACTCAAATTATGATTATAATTAAGTCGGATT 60

Sec_1 61 TGTCTTGACTATGTTTAGTCATGCATATCTCAGCAGGAATACACGCAGTCGGTGCCATAA 120
      |
      |
      |
Sec_2 61 TGTCTTGACTATGTTTAGTCATGCATATCTCAGCAGGAATACACGCAGTCGGTGCCATAA 120

Sec_1 121 CCATGTGCGCTGCGACGATGCACAAAGGTGAAAGATAAGAAGATTAATAAAAAAAAAATTAAG 180
      |
      |
      |
Sec_2 121 CCATGTGCGCTGCGACGATGCACAAAGGTGAAAGATAAGAAGATTAATAAAAAAAAAATTAAG 180

Sec_1 181 TGGAGTTACGCGACTGCGTGTAAAGAGGGCGAAAACCTTCGCAACCGTAGTTGACTGGA 240
      |
      |
      |
Sec_2 181 TGGAGTTACGCGACTGCGTGTAAAGAGGGCGAAAACCTTCGCAACCGTAGTTGACTGGA 240

Sec_1 241 CCAAGTCTCCTAGACCCTTCCCCTCAAGAGGAAGAACCTTTAGAGTAGTCCTATGCGGC 300
      |
      |
      |
Sec_2 241 CCAAGTCTCCTAGACCCTTCCCCTCAAGAGGAAGAACCTTTAGAGTAGTCCTATGCGGC 300

Sec_1 301 AGCTCAAGGGGCGAGGGGATGAATTGGGAGGGCGTCAACGGGTTAATAAATGGCGCGCCG 360
      |
      |
      |
Sec_2 301 AGCTCAAGGGGCGAGGGGATGAATTGGGAGGGCGTCAACGGGTTAATAAATGGCGCGCCG 360

Sec_1 361 GACGAGAACACACGGGGGAAACCAGCAGGAGGTGGAATG 400
      |
      |
      |
Sec_2 361 GACGAGAACACACGGGGGAAACCAGCAGGAGGTGGAATG 400

```

Figura 10 Secuenciación del RNAi ODC en los plásmidos pCR8/ODC y pCR8/GON correctamente orientados. Secuenciación de la región RNAi ODC de pCR8/ODC 5, 6 y 10 y pCR8/GON 2,3, 4, 6.

Recombinación vector de entrada pCR8/ODC y pCR8/GON con sus respectivos vectores destino

Se seleccionó la clona pCR8/ODC 6 y pCR8/GON 4 para llevar a cabo la recombinación con sus respectivos vectores destino (Fig. 11a). Se subclonaron en *E. coli Mach1*, se extrajo DNA plasmídico de 5 clonas de cada evento de transformación y se realizó un ensayo de digestión enzimática con EcoRI para liberar inserto y ensayo de PCR punto final (Fig 11b). Se seleccionaron la clona pB2GW7.0/ODC6 clona 2 y pB7FWG.0/GON4 clona 5 para transformar

A. tumefaciens AGL1 por electroporación. Se extrajo el DNA plasmídico de tres clonas de cada evento de transformación con *Agrobacterium*. Se verificó el inserto con un ensayo de digestión enzimático utilizando EcoRI y con un ensayo de PCR (**No se muestran datos**). Se seleccionaron la clona pB2GW7.0/ODC62 clona 3 y pB7FWG.0/GON45 clona 3.

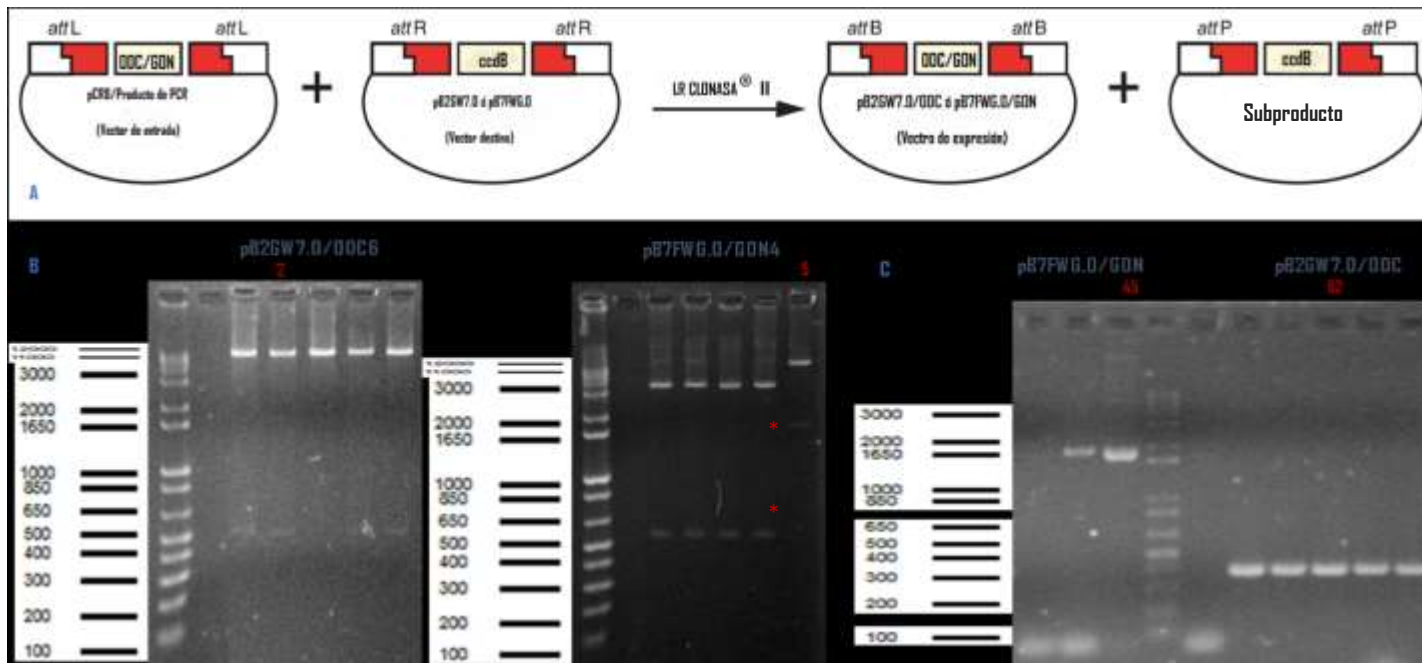


Figura 11 LR recombinación y caracterización de los vectores de expresión. A) Esquema de LR recombinación entre los sitios attL del vector de entrada (pCR8) que contiene el producto de PCR (ODC/GON) y los sitios attR que se encuentran en el vector destino (pB2GW7.0 y pB7FWG.0), el fragmento de PCR se intercambia por el gen tóxico ccdB generando el vector de expresión y un plásmido con el gen tóxico como subproducto. B) Digestión de los plásmidos pB2GW7.0/ODC6 clona 1-5 y pB7FWG.0/GON4 clona 1-5; sólo las clonas 1,2 ,4 y 5 de la construcción pB2GW7.0/ODC6 liberaron un fragmento por encima de 400 pb, que debido al contenido de sales, el fragmento migró cerca de la banda de 500 pero al realizar PCR punto final se confirma la inserción de ODC (400 b) en pB2GW7.0 (10,887 pb). Sólo la clona 5 de la construcción pB7FWG.0/GON4 muestra una banda del tamaño del vector destino pB7FWG.0 (10, 565 pb) y las dos bandas del inserto (efecto estrella); se le realizó PCR punto final a ésta clona y se confirmó el fragmento de GON (1,934 pb). C) Ensayo de PCR de las clonas seleccionadas de la digestión con EcoRI (pB2GW7.0/ODC62 y pB7FWG.0/GON45). CP= Control positivo. NTC= No Template Control. Marcador de peso= 1 kb plus.

Transformación de maíz VT-401 y cepas aflatoxigénicas de *A. flavus* y *A. parasiticus*

Maíz VT-401

Se desarrolló un método más sencillo para transformar maíz. El método nos permitió realizar una transformación *in planta* sin interrumpir el crecimiento normal de la planta. La transformación se basa en exponer el meristemo apical de tallo (SAM) de una semilla germinada e infectarla con una cepa hipervirulenta de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1; el SAM, en etapas tempranas de la planta, se localiza cerca de la base y en su menor extensión (cerca de la unión del tallo-raíz), lo que permite una probabilidad mayor de acertarle a ésta estructura (Jackson, 2012) (Fig. 12a y 12c). En el coleoptilo de una longitud de 5 mm se observa el meristemo apical de tallo a 3-4 mm de la punta aproximadamente (1 mm de la base) (Fig. 12); con ésta longitud se realizaron dos formas de infectar al meristemo (Fig. 13): 1) En la primera se cortó 1 mm del coleoptilo, se introdujo la suspensión bacteriana con una punta o una aguja y luego se cubrió la herida con un pequeño menisco de la misma suspensión, y 2) Se cortó 2/3 del coleoptilo (3 mm) y se trató igual a la forma anterior. Entre mayor sea el coleoptilo la probabilidad de acertar al meristemo disminuye debido al tejido diferenciado alrededor de él (Fig. 13b)

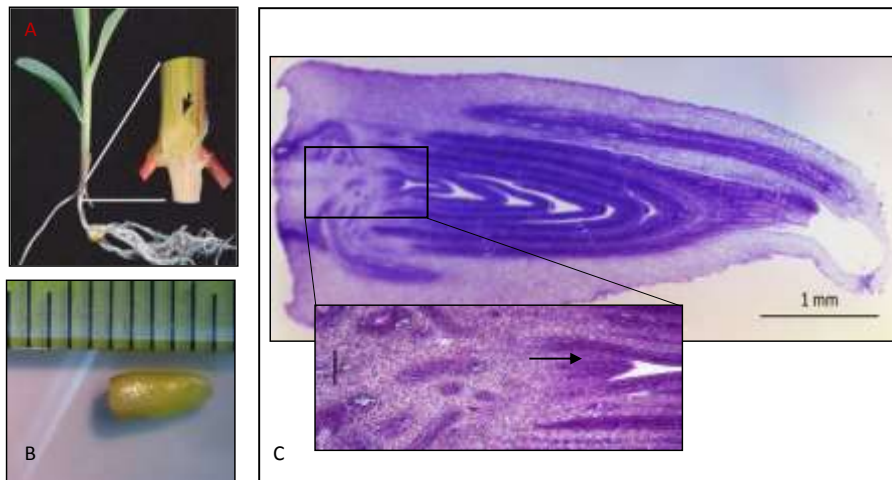


Figura 12 Posición del meristemo apical de tallo (SAM) en maíz VT-401. A) El meristemo apical de tallo se encuentra cerca de la base aún después de 4 días de germinación. Imagen: Jackson and Hake, (1999). B) Coleoptilo de 5 mm de longitud C) Corte longitudinal de un coleoptilo de 5 mm. El SAM (flecha negra) se encuentra a casi 4 mm de distancia de la punta a la base. Barra en zoom= 5 μ m.



Figura 13 Corte del coleóptilo. **A)** Coleóptilo de 5 mm de longitud con un corte de 1 mm del ápice comparado con **B)** Coleóptilo de 8 mm de longitud con un corte de 3mm del ápice. Entre mayor sea la longitud del coleóptilo la probabilidad de acertar al meristemo disminuye debido a la diferenciación del tejido que lo rodea. **C)** La herida es cubierta con una suspensión concentrada (*) de *Agrobacterium* inducida después de haber introducido un poco con una punta. La suspensión contiene nutrientes que ayudaran a la bacteria a permanecer viables por más tiempo. **D y E)** Regeneración del coleóptilo de 5 mm y 8 mm de longitud respectivamente.

Se realizó escrutinio mediante resistencia a glufosinato de amonio; se retaron de 4 a 6 hojas consecutivas con una preparación de FINALE® (**Fig.14a y 14b**). Las plantas que resultaron resistentes se les realizó PCR punto final para el gen endógeno HMG13 y el transgen RNAi ODC (**Fig. 14c**). De las 181 plántulas infectadas con *A. tumefaciens* AGL1 40 resultaron positivas dando una eficiencia del 22.1%.

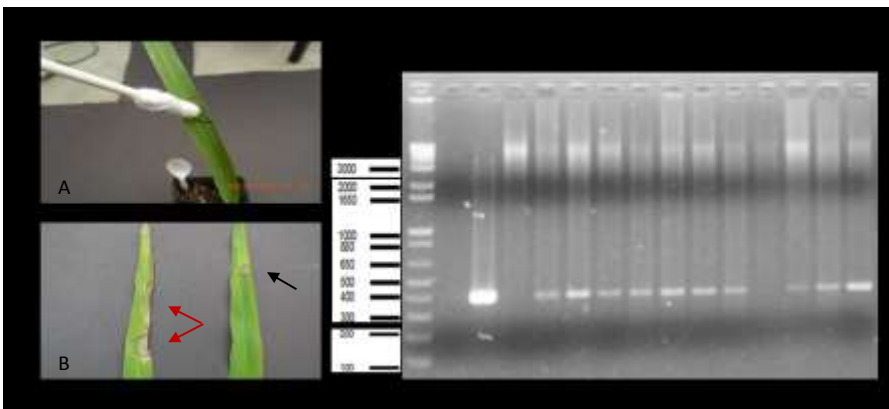


Figura 14 Selección de líneas transgénicas. **A.** Se retaron de 4-6 hojas consecutivas aplicando de manera tópica una solución de FINALE® (glufosinato de amonio) y **B)** después de 5-7 días de monitoreo se observa necrosis (flecha roja) si es susceptible, o una mancha amarilla sin necrosis (flecha negra) si resultó resistente. **C)** A las plantas resistentes a glufosinato de amonio se les realizó PCR punto final para detectar el transgen ODC. En la imagen se muestran 6 plantas transformadas con pB7FWG.0/GON453 positivas y 4 plantas transformadas con pB2GW7.0/ODC623 positivas, de un primer ensayo de PCR. **NTC=** No Template Control. **CP=** Control positivo. **Wt=** línea silvestre. **Marcador de peso=** 1kb plus.

Se realizaron cruza entre líneas transgénica y líneas silvestres pero, por cuestiones climatológicas (desarrollo fuera de temporada), muchos perecieron antes de desarrollar semillas. Una de las cruza sobrevivientes (wt x OB1; **O**= pB2GW7.0/ODC; **B**= lote B; **1**= Línea 1) dio un total de 20 semillas F1, las cuales se germinaron y se les realizó confirmación de transgen mediante PCR punto final resultando en 10 plantas positivas (**Fig. 15a** y **15c**). Se le realizó ensayo de número de copias al parental dando un solo evento de inserción (**Fig. 15b**).

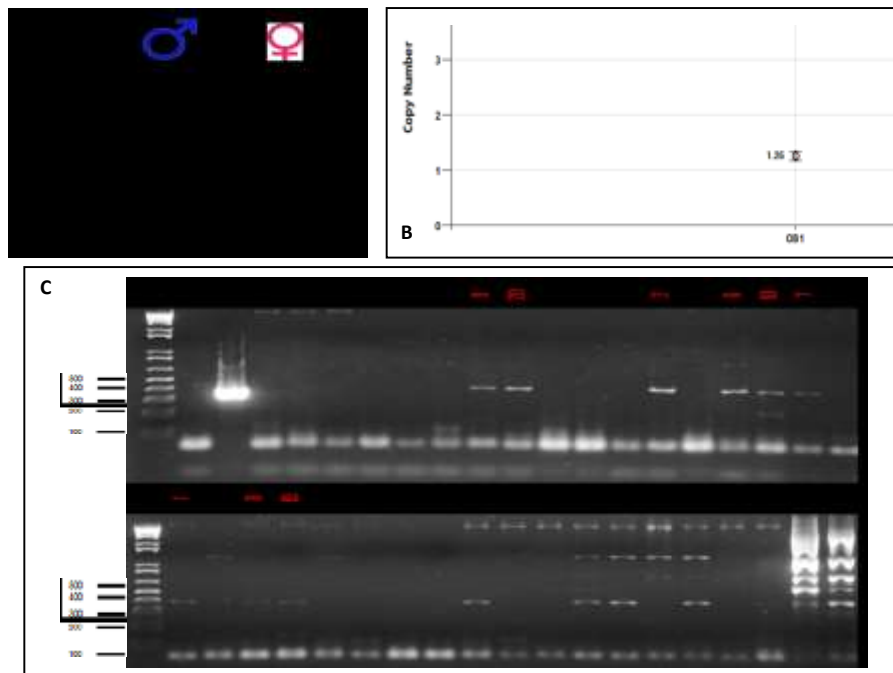


Figura 15 Análisis de la línea F1 (wt x OB1). A) Cruza entre la línea F0 ODC1 y una línea silvestre. Se obtuvieron 20 semillas F1. B) Análisis de número de copias de la línea F0 ODC1 resultando en 1 evento de inserción (1.26 número de copias); el análisis se realizó mediante la detección del gen BAR y HMG13 como gen endógeno regulador. C) PCR punto final del transgen ODC de la línea F1; se obtuvieron 10 líneas positivas (rojo) al transgen ODC. Se analizaron otras líneas F1 (*) productos de diferentes cruza de las cuales se obtuvieron 7 líneas positivas.

Aspergillus sp.

Para poder comprobar el efecto biológico de la secuencia RNAi ODC se transformaron líneas aflatoxigénicas de *A. flavus* y *A. parasiticus* con la construcción pB2GW7.0/ODC623. Las esporas se incubaron en medio de inducción junto con *A. tumefaciens* AGL1 pB2GW7.0/ODC623, después de cuarenta horas de incubación se observan en un primer evento pequeñas colonias que permanecen en un estado de “semi-desarrollo” sin germinar

completamente pero con un forma y tamaño mayor a la de una espora (**Fig. 16a**). En un segundo evento se observa el mismo comportamiento pero el tamaño de las estructuras es menor (datos no mostrados). Los filtros de ambos eventos de transformación se pasaron a medio de selección PDA y a las cajas de inducción se le agregó una capa encima de medio LB suave de selección para obligar a las hifas transformadas a que crecieran atravesando la capa y poder estar con el agente de selección y así identificarlas. Después de tres días de selección, las cajas con el filtro no desarrollaron crecimiento, pero en las cajas con doble capa hubo crecimiento de hifas formando una biopelícula. Se seleccionó de las cajas con doble capa un segmento que se pasó a medio selección PDA con antibiótico para eliminar a la bacteria; este evento se repitió dos veces tomando un fragmento de agar con hifas que crecían por fuera del inóculo de donde, de ésta forma se aseguró la completa eliminación de la bacteria. A la última caja se le extrajo DNA genómico y se le realizó PCR punto final (**Fig. 16b**). Se obtuvieron dos "líneas" transformadas de *A. flavus* H-167 y *A. flavus* H-617 y una de *A. parasiticus* H-188.

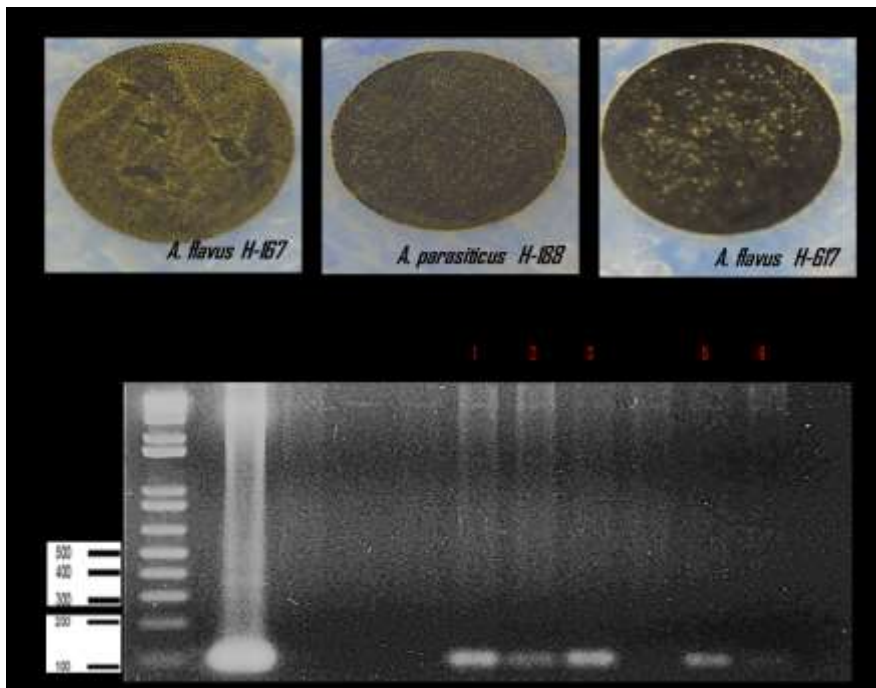


Figura 16 Transformación de líneas aflatoxigénicas de *Aspergillus* sp. A) Primer evento de transformación de las líneas aflatoxigénicas de *Aspergillus*. Las esporas permanecieron en un estado de "semi-desarrollo" durante un mes, sin germinar completamente. Ambos eventos progresaron a las siguientes etapas de selección en PDA para eliminar la bacteria y poder realizar PCR punto final como confirmatorio. B) Ensayo de PCR del gen BAR de los dos eventos de transformación. Sólo la línea 4 no resultó positiva. 1, 2 y 3= Primer evento de transformación. 4, 5 y 6= Segundo evento de transformación. Wt1, 1 y 4= *Aspergillus flavus* H-167. Wt2, 2 y 5= *Aspergillus parasiticus* H-188. Wt3, 3 y 6= *Aspergillus flavus* H-617. Marcador de peso= 1 kb plus.

Ensayo de efectividad biológica de la región RNAi ODC

Se seleccionaron las “líneas” del primer evento para llevar a cabo el ensayo de efectividad biológica creciendo a los hongos transgénicos en cuatro tratamientos e incubándolo a 28°C. Al final del periodo de incubación las líneas ya habían recuperado un desarrollo que se podría considerar normal (t8). En el tratamiento 1 (T1) es el medio sin putrescina y el tratamiento 2 (T2) es con 5 mM de putrescina. El efecto esperado es la presencia de un fenotipo “fluffy” característico de cuando se altera la producción de aflatoxinas y/o se retrasa la esporulación, reportado ya por varios investigadores (Guzmán de Peña y Ruiz Herrera, 1997; Hicks *et al.*, 1997; Chang, 2010). El fenotipo “fluffy” se observa con mayor evidencia en la línea transgénica *A. parasiticus* H-188, en ambos tratamientos (Fig. 18); a partir del tiempo 1(t1) las hifas se desarrollaron por encima del fragmento inóculo y conforme paso del tiempo mantuvieron este desarrollo, sin embargo se puede apreciar esporulación retrasada por debajo de las estructuras vegetativas, y sólo hasta el tiempo ocho se puede apreciar la morfología colonial pulverulenta (aspecto de estar cubierta como polvo) que en tiempos iniciales del ensayo se observa en la línea silvestre y que es característico de estos hongos. En un acercamiento con estereoscopio se puede observar que las hifas de la línea transgénica son más alargadas y cubren a las estructuras asexuales que aún no llegan a una etapa madura denotando un color menos intenso que la línea silvestre (Fig. 17).

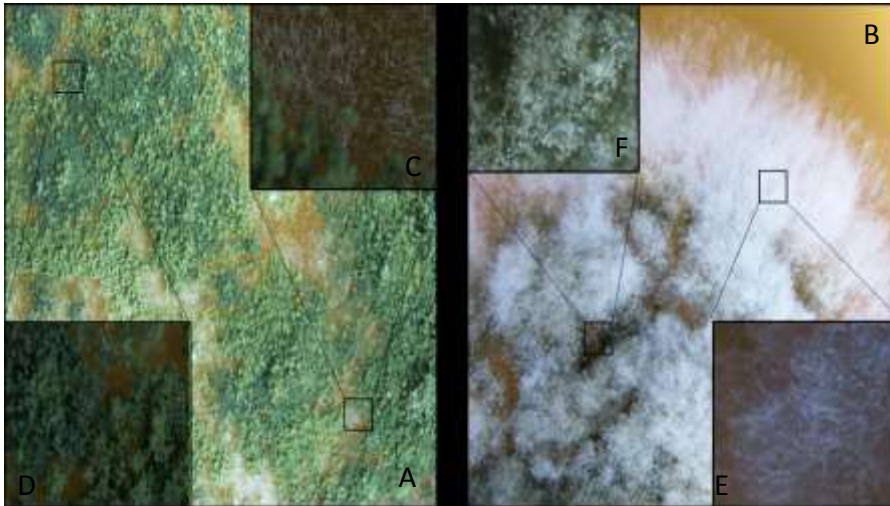


Figura 17 Comparación morfológica entre la línea silvestre y la línea transgénica *A. parasiticus* H-188 ODC623. Se comparó la línea silvestre (A) de *A. parasiticus* H-188 contra la línea transgénica (B), ambas del tiempo 4. Las cabezas conidiales de la línea transgénica (F) se observa de un color menos intenso comparada con las cabezas conidiales de la línea silvestre (D); el color usual de las estructuras asexuales está correlacionada con la presencia de conidias. Las hifas de la línea silvestre (C) son alargadas solamente en la periferia de la colonia, sin embargo esta morfología se observa en toda la colonia de la línea transgénica (E) indicando un posible retraso de la diferenciación celular a estructura asexual.

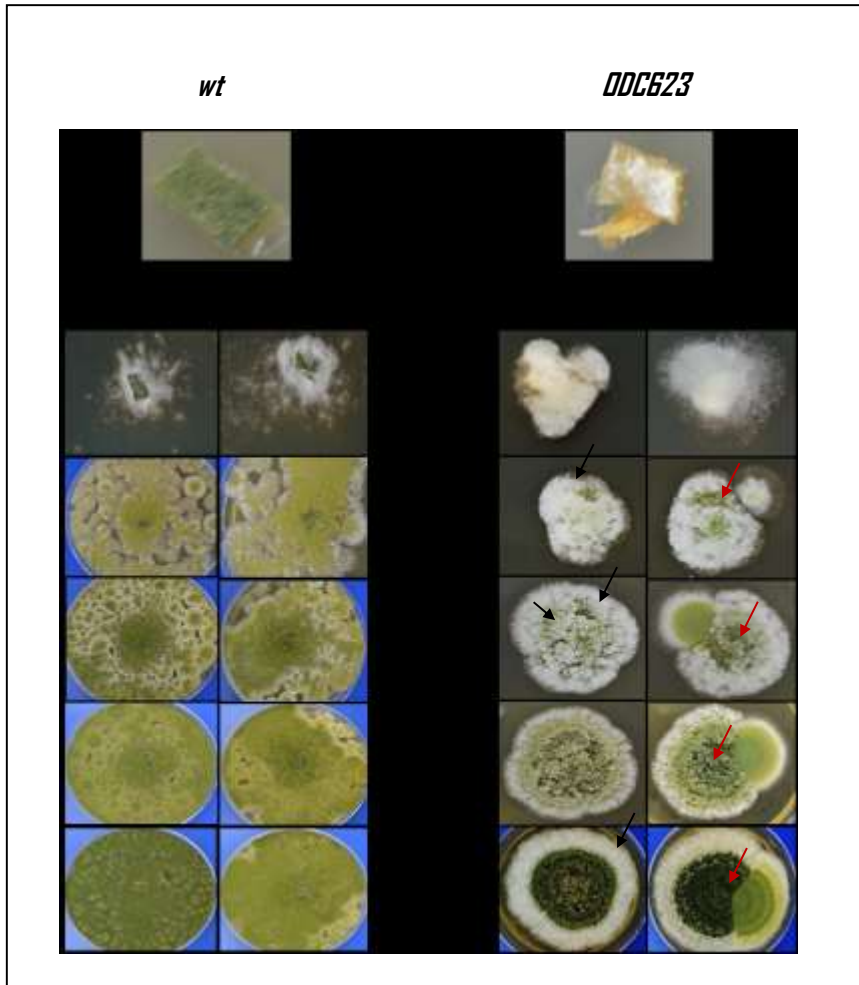


Figura 18 Ensayo de efectividad biológica de ODC en *A. parasiticus* H-188. T1= Sin tratamiento. T2= 5 mM Putrescina. t1= 24 horas. t2= 48 horas. t3= 72 horas. t4= 96 horas. t8= 192 horas (8 días). wt= silvestre. ODC623= Transgénico. Desde el tiempo 1 (t1) se comienza a observar el fenotipo esperado ("fluffy") en ambos tratamientos (T1 y T2) de la línea transgénica (ODC623) comparado con la línea silvestre. También se observa en tratamiento 2 de la línea transgénica un mejor desarrollo de las esporas (flechas rojas) indicado por la proporción y el color comparada con el tratamiento 1 de la misma línea.

La línea transgénica *A. flavus* H-617 muestra a partir del tiempo tres (t3) regiones aisladas de hifas con fenotipo "fluffy" y conforme pasa el tiempo se va extendiendo (Fig.19). El color típico

de la colonia, dado por la presencia de conidios diferenciados, se ve retrasado con respecto a la línea silvestre indicando un retrasado en la diferenciación a producir esporas pigmentadas.

El tratamiento dos (T2) parece no tener un efecto drástico en la recuperación del fenotipo; sólo se puede apreciar que la esporulación en las líneas transgénicas *A. parasiticus H-188* y *A. flavus H-617* progresa más acelerado que en el tratamiento uno (Fig.18 y 19).

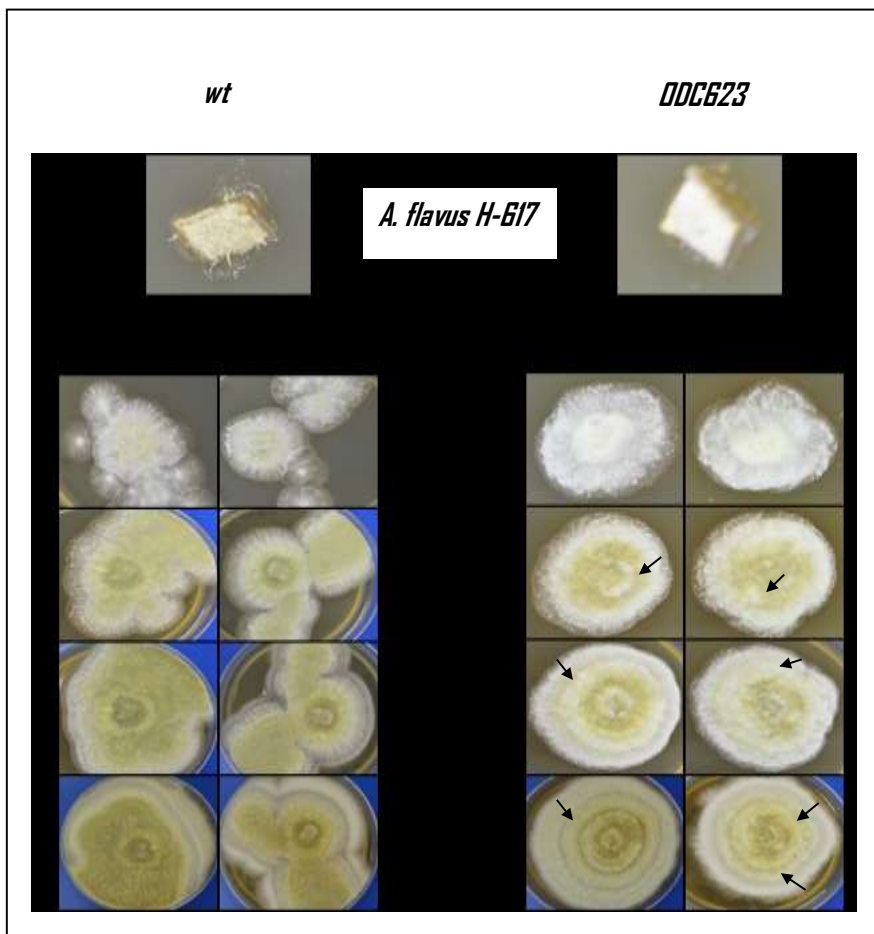


Figura 19 Ensayo de efectividad biológica de ODC en *A. flavus H-617*. T1= Sin tratamiento. T2= 5 mM Putrescina. t2= 48 horas. t3= 72 horas. t4= 96 horas. t8= 192 horas (8 días). wt= silvestre. ODC623= Transgénico. Desde el tiempo 1 (t1) se observa un desarrollo similar entre la línea transgénica (ODC623) y la línea silvestre, sin embargo a partir del tiempo 3 (t3) se comienzan a observar zonas con micelio aéreo profuso y sin pigmentación que no se aprecian en la línea silvestre (flechas) que indican un persistencia de las estructuras vegetativas (hifas) antes de diferenciarse en estructuras sexuales (esporulación).

La línea transgénica *A. flavus* H-167 no muestra indicios del fenotipo esperado si la producción de aflatoxinas; sólo se observa al final del ensayo una persistencia de las hifas para un tiempo donde se esperaría la completa esporulación de la colonia (Fig. 20).

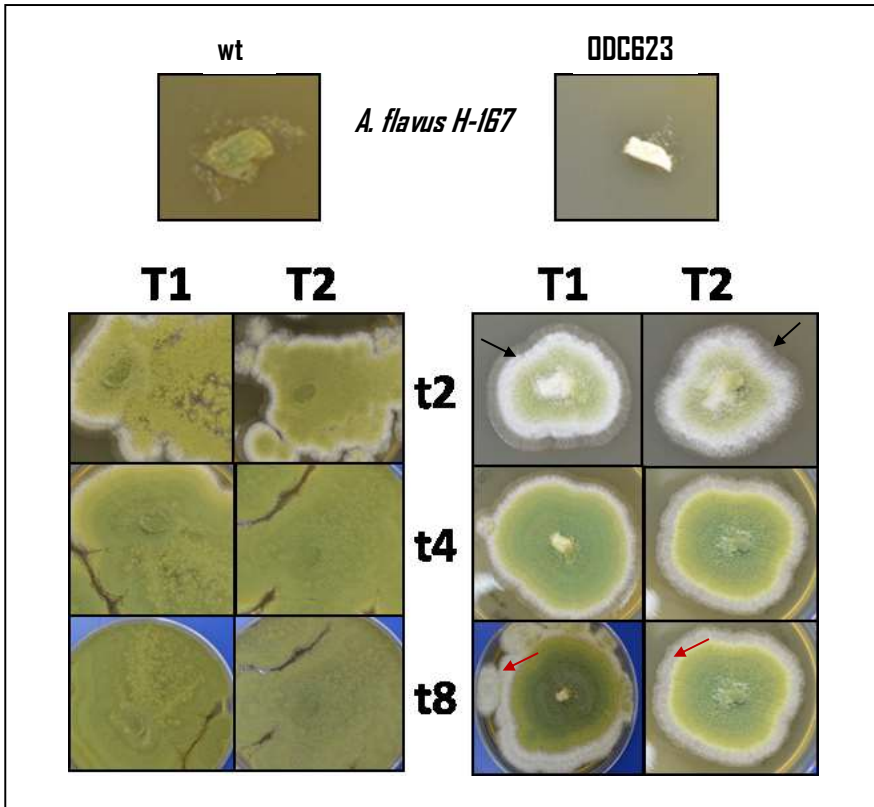


Figura 20 Ensayo de efectividad biológica de ODC en *A. flavus* H-167. T1= Sin tratamiento. T2= 5 mM Putrescina. t2= 48 horas. t4= 96 horas. t8= 192 horas (8 días). wt= silvestre. ODC623= Transgénico. En las primeras 24 horas (datos no mostrados) no hubo diferencias entre la línea transgénica y la línea silvestre, sin embargo a partir del tiempo 2 (t2) se comienza a observar un halo de estructuras vegetativas (hifas) en la línea transgénica (flechas negras) que bien no es tan diferente al halo de la línea silvestre, y que se mantiene en una proporción "normal" en tiempos subsecuentes, pero que al tiempo 8 (t8) el halo no desaparece (hasta éste tiempo es suficiente para que el hongo esporulara completamente) lo que podría indicar un retraso en la diferenciación celular (flechas rojas).

Discusión

La generación de OGM's en cultivos de interés comercial se han clasificado de acuerdo al objetivo de la modificación; esto llevó a que se hablara de primera y segunda generación de organismos genéticamente modificados. Los de primera generación son aquellos cultivos con mejoramiento para la productividad, resistencia a patógenos y/o resistencia a herbicidas, y los de segunda generación incluían mejoramiento no sólo de la productividad sino de la calidad del producto, mejoramiento en la eficiencia del uso de los nutrientes y de la fotosíntesis, resistencia a estrés abiótico como sequía o frío, potencialización nutricional, entre otros. (Bennett *et al.*, 2013). Pero también podríamos clasificar a los OGM's de acuerdo a la estrategia molecular empleada para llevar su a cabo su nueva resistencia "adquirida": A) Agruparíamos en la primera generación a todas aquellas especies cuyas modificaciones involucran la producción de una proteína efectora; esta estrategia fue muy exitosa ya que fue una gran ventaja al organismo que se le introdujo. El caso de la proteína CRY de *Bacillus thuringiensis* en cultivos de maíz, algodón y soya para combatir fases larvales de lepidópteros y coleópteros es un buen ejemplo (Pardo-López *et al.*, 2013). Pero hay algo que se debe considerar con estas estrategias, que la nueva proteína representa ecológicamente una presión de selección, y que ha lugar al surgimiento de plagas resistentes. Por fortuna, es posible disponer de otras proteínas con funciones similares, de manera que siempre habría proteínas resistentes. B) En una segunda generación se podrían clasificar aquellos organismos modificados cuya estrategia no es la producción de proteínas efectoras, sino el uso de mecanismos celulares como RNAi o procesos de inmunidad (basado en el modelo "zigzag"). En este tipo de estrategias, la posibilidad de resistencia por presión de selección es muy poco probable pues involucraría el cambio de todo un proceso. Tomando en cuenta la clasificación propuesta; la estrategia de este trabajo fue generar un OGM de segunda generación, haciendo uso del mecanismo de RNAi; como el blanco de la molécula RNAi es el RNAm que codifica para ornitina descarboxilasa (que ya se ha mencionado que es una proteína con funciones reguladoras para el desarrollo de los hongos de interés), el patógeno tendría que modificar 21 nucleótidos (nt) como mínimo y conservar la funcionalidad de la proteína para conseguir alguna resistencia por presión de selección, evento que resultaría casi imposible.

Una desventaja de usar la técnica de RNAi es que no es cien por ciento efectiva. Esta técnica se utiliza cuando la mutación de un gen es letal; aunque silencia la expresión del gen blanco, el hongo sigue creciendo. Aunque con esta técnica sí puede llegar a reducir casi en su totalidad la expresión de una proteína, los niveles de ésta se vuelven a recuperar después de un tiempo; sin embargo, lo que lo hace funcional es que permite una "ventana" de tiempo para trabajar y que es especie específico (depende de la homología con la secuencia blanco).

Pero, ¿por qué diseñar una secuencia de 400 nt cuando lo necesario para iniciar el silenciamiento son 21; y por qué diseñarla de cadena sencilla, si lo más efectivo reportado son estructuras de doble cadena? Aunque el estudio del mecanismo de silenciamiento, y ensayos por parte de muchos grupos de trabajo, demuestran la efectividad de utilizar 21 nt, Reynolds *et al.* (2004) realizaron un ensayo de eficiencia de silenciamiento utilizando 90 siRNAs (el diseño de los siRNAs se realizó desplazando una base dentro de una región de 197 pb) contra la ciclofilina humana y la luciferasa de luciérnaga (**Fig. 21**), y demostraron que no hay una región determinada fija dentro del RNAm para ser blanco efectivo del silenciamiento (Boese *et al.*, 2005) y si se quisiera una secuencia siRNA, se ocuparía mucho trabajo y dinero para elucidar aquella región efectiva (a pesar de que ya se han reportado ciertas guías para diseñar siRNAs); Barciszewska-Pacak *et al.* (2005), basados en datos experimentales reportados proponen

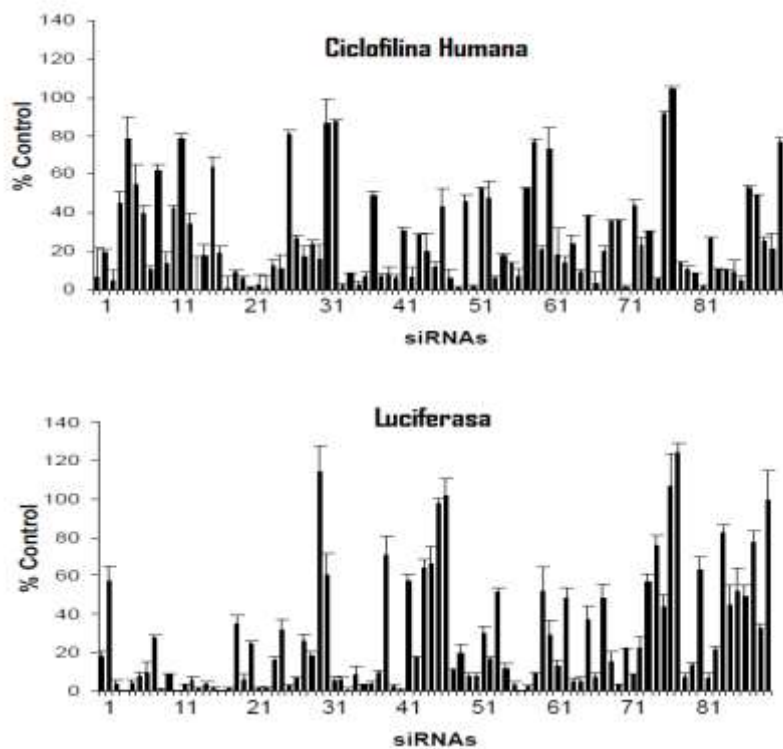


Figura 21 Ensayo de Reynolds *et al.*, 2004. Se puede observar que la eficiencia de silenciamiento varía conforme a la posición de una manera aleatoria.

utilizar una secuencia que cubra cerca de 100 o más nucleótidos del RNAm para una efectiva activación del mecanismo de silenciamiento. Basado en lo anterior, supusimos que, aunque el RNAi fuera degradado, se tendrían fragmentos pequeños que complementarían con el RNAm de interés, una vez que éstos hibridaran, cubriendo una gran longitud. También argumentamos que no habría diferencia entre cadena sencilla y cadena doble ya que ambas se producirían dentro del hospedero donde no habría RNAm que complementar, ni que inactivar; cual sea la naturaleza, mientras estén dentro del hospedero su destino es ser degradado, y una cadena sencilla supondría un gasto menor de recursos para la planta, la cual se quiere para uso comercial.

Para poder determinar si la secuencia seleccionada podría tener algún efecto fuera de blanco, nos basamos en el valor de expectación (Valor de E) de los ensayos de alineamientos, junto con el puntaje. Sin embargo, no hay ningún criterio que permita determinar qué valor de E es significativo para poder concluir que existe homología (Pearson, 2013). Para poder obtener lo mayoría de blancos significativos posibles, se realizaron diferentes alineamientos con diferentes ajustes paramétricos obteniendo de cada búsqueda los hits con el menor valor de E (tomando como medida al primer hit de la Tabla 3, determinando valores de E de 1 o mayores como posibles eventos de aleatoriedad. En la Tabla 3 los resultados significativos son en su mayoría hongos patógenos del género *Aspergillus*. En el ensayo de alineamiento con secuencias humanas, hay hits que parecen ser significativos por la función que desempeñan, por ejemplo: la CHI participa en la síntesis de cisteína, la MASTL interviene en la hidrólisis de ATP en el microtúbulo, la GRIP1 tienen que ver con la interacción con el receptor del neurotransmisor glutamato en el sistema nervioso central de mamíferos y el MYLK participa en la contracción muscular; sin embargo, la mayoría tienen un valor de E que nosotros consideramos alto lo que indica que su interacción con el RNAi ODC no es un evento biológico. Todos los demás ensayos de alineamiento con secuencias de especies domésticas que muestran un valor relativamente significativo, no tienen una función anotada. Hay que tomar en consideración que aunque el valor de E fuera significativo, si el porcentaje de cobertura no es grande (y que el porcentaje de identidad elevado), la probabilidad de que ese hit inicie el mecanismo de silenciamiento es bajo. Pero a pesar de todo, faltaría realizar pruebas bromatológicas para poder demostrar que en efecto, el RNAi diseñado en este trabajo no presenta un riesgo para otras especies.

Con la finalidad de poder reducir tiempos en la obtención de líneas transgénicas de maíz, se desarrolló como parte de este trabajo un método de transformación *in planta* mediada por *Agrobacterium*. Los métodos *in planta* permiten la transformación sin interrumpir el desarrollo fenológico de la planta. Con el desarrollo de cepas hipervirulentas que contienen un sistema

binario para llevar a cabo la transferencia del transgen se han podido desarrollar muchos métodos de este tipo. En este trabajo se hace uso de la cepa *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 que porta el plásmido pTiBo52 con los genes *vir* adicionales que permiten una mayor probabilidad de transferir el transgen. La estrategia consistía en transformar el meristemo de maíz con la idea de que la inflorescencia femenina resultara transformada, y una vez polinizada la planta obtuviéramos líneas F1 transgénicas. Durante el proceso se observó la presencia de plantas F0 quiméricas que mostraban tener un mosaico genético de transformación/no-transformación confirmado por el método de resistencia a glufosinato; para poder determinar resistencia, se evaluaban de 2 a 4 hojas consecutivas. Había plantas que mostraban resistencia en una hoja y en otra no; como en el ensayo de PCR se tomaba la última hoja en ese momento, cuando se volvía a tomar muestra de esa misma planta pero en otra hoja, resultaba negativo a PCR (datos no mostrados). Pero para fines de demostrar si el método funcionaba, se tomó como positivas a las plantas cuya extracción de DNA de la hoja más nueva resultara en PCR positiva. Aun así, aunque fueran plantas quiméricas, la zona transformada podrían funcionar como “dosificador”; en nuestro caso que la estrategia de control contra el hongo es un RNAi, se sabe que existe un movimiento de RNA dentro de la célula que permite la difusión de la señal interferente, y de esta manera podemos tener plantas transformadas en la parte aérea pero no la raíz donde los genes de selección no estarían disponibles a los microorganismos del suelo.

Tomando en cuenta sólo a la generación F0, se determinó la eficiencia de transformación (plantas PCR positivas/plantas infectadas), sin embargo este dato es pre-eliminar ya que la idea era generar una planta completamente transformada. La evaluación de la eficiencia de transformación podría realizarse en la generación F1. La Tabla 6 muestra una comparación con diferentes estudios donde desarrollaron diferentes métodos de transformación; ahí podemos observar que el método desarrollado por Ishida *et al.* (2007) tiene mayor eficiencia, sin embargo, el tiempo que reporta es muy largo ya que incluye el tiempo desde que se tiene que crecer la semilla para poder obtener los embriones. El método desarrollado por Feng *et al.* (2010) es similar al desarrollado en este trabajo, la diferencia radica en que aparte de infectar directamente el meristemo, lo coloca en vacío. A pesar de las similitudes, la eficiencia que ellos reportan es muy baja.

De la cruce reportada en este trabajo se obtuvieron solamente 20 semillas (20 líneas solamente debido a las condiciones ambientales adversas), de las cuales sólo 9 resultaron PCR positivas; lo cual sugiere que: 1) El grado de transformación de las F0 no es total resultando mosaico genético. 2) Tomando en cuenta sólo los datos obtenidos, la eficiencia de transformación es del 45%. Sin embargo, ésta eficiencia es pre-eliminar también; se debe realizar un ensayo donde

se tenga mayor número de cruces con el mayor número de semillas posibles para que sea estadísticamente significativo.

Tabla 6 Comparación de diferentes métodos de transformación.

Protocolos de transformación					
Planta (Tejido)	Técnica	Método	Eficiencia (%)	Periodo (días)	Referencia
Maíz (Callos) ^a	Cultivo de tejido	Biobalística	?/7.1	178	Frame <i>et al.</i> , 2000
Maíz (Embriones) ^{a,b}	Cultivo de tejido	Biobalística	?/7.1	150	Frame <i>et al.</i> , 2000
Maíz (Embriones) ^c	Cultivo de tejido	<i>Agrobacterium</i>	7/ 3.3	76	Frame <i>et al.</i> , 2002
Maíz (Embriones)	Cultivo de tejido	<i>Agrobacterium</i>	50	185	Ishida <i>et al.</i> , 2007
Maíz (Meristemo)	<i>In planta</i> (Presión negativa)	<i>Agrobacterium</i>	4.5	-	Feng <i>et al.</i> , 2010
Trigo (Semilla) ^d	<i>In planta</i>	<i>Agrobacterium</i>	26	6	Razzaq <i>et al.</i> , 2011
Maíz (Inflorescencia femenina)	<i>In planta</i>	<i>Agrobacterium</i>	3.3	-	Mu <i>et al.</i> , 2012
Maíz (Inflorescencia femenina)	<i>In planta</i>	<i>Agrobacterium</i>	2.3	-	Moiseeva <i>et al.</i> , 2014
Jitomate (Meristemo) ^e	<i>In planta</i>	<i>Agrobacterium</i>	8.2	2	Shah <i>et al.</i> , 2015
Maíz (Meristemo)	<i>In planta</i>	<i>Agrobacterium</i>	22.1	1	Grupo de trabajo

^a El porcentaje de eficiencia es el reportado por Shou *et al.* (2003).

? El porcentaje de eficiencia no se encontró en la página del Departamento de Agronomía de la Universidad del Estado de Iowa.

^b El método de biobalística con embriones deriva del método de biobalística con callos, por tal se le colocó la misma referencia.

^cEl porcentaje de eficiencia del 7% se tomó de la página del Departamento de Agronomía de la Universidad del Estado de Iowa, y el del 3.3% es el reportado por Shou *et al.* (2003).

^d En éste grupo de trabajo realizaron diferentes métodos de transformación; transformaron antes y después de germinar la semilla. El porcentaje de eficiencia reportado corresponde a antes de germinar (transformación del embrión en la semilla) y demostrado por PCR.

^e La transformación del jitomate es similar a la del maíz tanto del grupo Feng *et al.* (2010) como de nuestro grupo de trabajo;

Para poder demostrar la efectividad de la secuencia RNAi de controlar el desarrollo del hongo, estos fueron transformados con el plásmido pB7GW7.0/ODC623. Un ensayo de control biológico donde el hongo silvestre infectara líneas transgénicas nos daría mejor información de la efectividad del mecanismo de silenciamiento inducida por el hospedero; no se optó por este ensayo ya que las líneas F0 podría ser líneas quiméricas, y como *Aspergillus* no forma estructuras especializadas para invadir el hospedero (es saprobio), se ocuparía infectar la

mazorca o realizar una extracción de RNA's de las plantas F1, y mejor se decidió polinizarlas para aumentar el número de líneas transgénicas.

Se utilizó un método de transformación para el hongo mediada por *Agrobacterium* (se aprovechó el hecho que se ha reportado el uso de esta bacteria para transformar hongos y de qué contábamos con una cepa hipervirulenta de la misma) y el gen bar como marcador de selección. Sin embargo, hubo muchos contratiempos para obtener un resultado indicativo del control biológico por parte de la molécula interferente. En primer lugar, el protocolo utilizado era sencillo y basado en *Trichoderma* (un hongo ascomiceto del suelo reportado a virulento para las plantas y que incluso ciertas especies forman relaciones mutualistas con ellas), pero la concentración de la bacteria que describía el protocolo para el co-cultivo era muy bajo, *Aspergillus* terminaba creciendo sin aparente efecto dos días después del periodo de selección (Fig. 22). Después de probar diferentes concentraciones, se realizó el co-cultivo con una suspensión concentrada (casi similar a la suspensión que se usó para transformar el meristemo de los coleoptilos de maíz) mostrando un comportamiento inesperado, las esporas se mantuvieron en un estado de post-germinación, o "semi-desarrollo" por un largo periodo (Fig. 16a).



Figura 22 Ensayo de transformación de *Aspergillus parasiticus* H-188. El ensayo de transformación se realizó exactamente como el protocolo de *Trichoderma*. Después de 2 días de incubación a 30 °C después del co-cultivo, el hongo ya presentaba esporulación.

Otro contratiempo fue el hecho de que no se pudo obtener líneas independientes transgénicas de los hongos. Tubajika y Damann, Jr (2001) realizaron un ensayo para observar el efecto de glufosinato de amonio en el desarrollo y producción de aflatoxinas en *Aspergillus flavus*; ellos publican que una concentración de 2 mg/mL del herbicida disminuyó el 80% del tamaño de la colonia y una reducción de los niveles aflatoxina del 97%. Con éste ensayo se muestra que altas concentraciones pueden afectar al hongo de manera significativa pero no eliminarlo, y a pesar de esto, se pensó que la alteración del desarrollo debería ser suficiente para tener selección,

y no fue así. Aunque se realizaron cultivos consecutivos para eliminar *Agrobacterium*, y se confirmó por PCR punto final, el gen bar no resultó ser un marcador de selección ideal. En el ensayo desarrollado para observar efectividad biológica, no sabemos si tenemos líneas mezcladas de transformadas con no transformadas, o si la transformación sí se dio a nivel de spora y no al momento de germinar dando lugar a un mosaico genético donde una colonia podría tener núcleos transformados y núcleos no transformados; en éste caso los núcleos transformados podrían proteger a las hifas no transformadas, y viceversa, los núcleos no transformados podría compensar por el efecto de silenciamiento.

Otro factor por la que el gen bar no fue buen marcador de selección es que se ocupa grandes concentraciones. Se decidió utilizar un extracto de glufosinato de amonio, a partir de una marca comercial (150 g/L); con éste extracto se pensó que volúmenes pequeños serían suficientes para seleccionar, pero en la práctica se tuvo que utilizar volúmenes muy elevados (que si la extracción fuera totalmente eficiente, estaríamos hablando de concentraciones casi 20 veces las reportadas por Tubajika y Damann, Jr.). Por el mismo factor que se tuvo que usar volúmenes muy elevados del extracto de glufosinato para "asegurar" una selección, el hongo no esporuló y el ensayo se inició con estructuras diferentes (hifas para las transformadas y esporas para las silvestres). Por un momento se le atribuyó el efecto del fenotipo al glufosinato pero se descartó ya que el comportamiento en cada evento de transformación fue diferente; las dos cepas de *A. flavus* esporularon más rápido que *A. parasiticus*, y aún entre ellas, el desarrollo fue diferente.

Conclusiones

El método *in planta* desarrollado permitió obtener una alta eficiencia de transformación (20.1%) en un menor periodo de tiempo comparado con otros métodos reportados.

El fenotipo observado en los hongo PCR positivo demuestra la eficiencia del RNAi para controlar su desarrollo, sin embargo, aún falta realizar los ensayos de efectividad biológica para determinar la capacidad del sistema para inhibir la síntesis de aflatoxinas.

El gen *bar* empleado como factor de selección, aunque permitió un grado de discriminación entre las cepas transformadas, no es un buen gen reportero en la identificación de transgénico para *Aspergillus*, ya que se producen escapes y no permite discriminar entre núcleos heterocigotos de homocigotos.

La transformación mediada por *Agrobacterium* resultó ser un eficiente método para *Aspergillus*, cuando se usa en altas concentraciones.

El hecho de que no todas las líneas F1 que surgieron de la cruza OB1 x WT fueran transgénicas nos indica que la inflorescencia femenina de la línea F0 OB1 presentaba mosaico genético.

Perspectivas

Para poder determinar la eficiencia de control del RNAi, se necesitaría determinar el número de copias y el nivel de expresión de líneas transgénicas F1 en adelante, con la finalidad de tener líneas muy bien caracterizadas y poder seleccionar algunas para ser infectadas por líneas silvestres de los hongos y observar *in vivo* el control biológico que el maíz modificado puede mostrar.

Para el método in planta y para la transformación de los hongos, sería conveniente desarrollar un plásmido con un gen reportero más visual como GFP o GUS. En el caso de la planta se podrían hacer cortes histológicos de la inflorescencia femenina (mazorca) y observar si se presenta mosaico genético. Para el hongo el plásmido a parte de GFP se observaría el fenotipo “fluffy” fluorescente lo que permitiría correlacionarlo con el efecto del RNAi.

Es necesario desarrollar un método para eliminar el gen de selección bar de las líneas transgénicas si se quiere comercializar con ellas, aunque la resistencia a herbicida es una característica deseable en plantas ya que su manejo agronómico en cuanto a la reducción de malezas es mejor que el convencional.

Referencias

- Abdel-Hadi, A. M., Caley, D. P., Carter, D. R. F., & Magan, N. (2011). Control of aflatoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* using RNA silencing technology by targeting aflD (nor-1) gene. *Toxins*, *3*(6), 647–659.
- Abrar, M., Anjum, F. M., Butt, M. S., Pasha, I., Randhawa, M. A., Saeed, F., & Waqas, K. (2013). Aflatoxins: Biosynthesis, Occurrence, Toxicity, and Remedies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *53*(8), 862–874.
- Amaiike, S., & Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, *49*(1), 107–133.
- Amare, M. G., & Keller, N. P. (2014). Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genetics and Biology*, *66*, 11–18.
- Arrúa Alvarenga, A. A., & Arrúa Alvarenga, P. D. (2007). Relación entre esclerocio y producción de aflatoxinas en *Aspergillus flavus* aislados de granos de maíz. In *II Congreso Nacional de Ciencias Agrarias: III Seminario Nacional de Energías Renovables* (pp. 411–413).
- Awika, J. M. (2011). Major Cereal Grains Production and Use. *American Chemical Society*, 1–13.
- Bennett, A. B., Chi-Ham, C., Barrows, G., Sexton, S., & Zilberman, D. (2013). Agricultural Biotechnology: Economics, Environment, Ethics, and the Future. *Annual Review of Environment and Resources*, *38*(1), 249–279.
- Bennetzen, J., & Hake, S. (2012). *Handbook of maize: its biology*. (Bennetzen, J. L., & S. C. Hake, Eds.) *Annals of Botany* (Vol. 109).
- Boese, Q., Reynolds, A., & Marshall, W. S. (2005). Chapter 2: Basics of siRNA Design. In S. Muhammad (Ed.), *Gene Silencing by RNA Interference. Technology and Application* (1st ed., pp. 1–21). Boca Raton; London; New York; Washington, D.C.: CRC PRESS.
- Caffrey, C. (2016). Neolithic Revolution. *Salem Press Encyclopedia*.
- Caplen, N. J. (2005). Gene Silencing by RNA Interference and the Role of Small Interfering RNAs. In M. Sohail (Ed.), *Gene Silencing by RNA Interference Technology and Application* (1st ed., pp. 244–248). Florida.
- Chaloner, T., Kan, J. A. L. Van, & Grant-downton, R. T. (2016). RNA “Information Warfare” in Pathogenic and Mutualistic Interactions. *Trends in Plant Science*, *xx*, 1–11.
- Chang, P. (2010). Chapter 6: Aflatoxin Biosynthesis and Sclerotial development in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. In M. Rai & A. Varma (Eds.), *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons* (1ra ed., pp. 367–384). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- CIMMYT, (nd.). Partes de la planta de maíz [recurso electrónico] 06 de septiembre del 2016, <http://maizedoctor.org/es/partes-de-la-planta-de-maiz>.
- CIMMYT, (nd.). Partes de la planta de maiz [recurso electrónico] 06 de septiembre del 2016, <http://maizedoctor.org/es/etapas-de-crecimiento-del-maiz>
- Cline, W. R. (2007). Global warming and agriculture: impact estimates by country. Washington, D.C., USA: Center for Global Development and Peterson Institute for International Economics.
- Diamond, J. (2002). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, *418*(6898), 700–707.

- Doebley, J. F., Gaut, B. S., & Smith, B. D. (2006). The Molecular Genetics of Crop Domestication. *Cell*, 127(7), 1309–1321.
- Fanelli C, Fabbri AA (1989) Relationship between lipids and aflatoxin biosynthesis. *Mycopathologia* 107:115–120
- Feng, F. Y., Sheng, L. Y., Ling, P. Y., Fang, W., Wei, W., Zhao, M. Y., Ning, W. H., (2010). Agrobacterium-mediated transformation of maize shoot apical meristem by introducing fused gene Chi-linker-Glu and bar. *Acta Prataculturee Sinica*, 21(5), 69–76.
- Frame, B. R., Zhang, H., Coccione, S. M., Sidorenko, L. V., Dietrich, C. R., Pegg, S. E., Wang, K. (2000). Production of transgenic maize from bombarded type II callus: effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 36: 21–29.
- Frame, B., Shou, H., Chikwamba, R., & Zhang, Z. (2002). Agrobacterium-mediated transformation of Hi II immature zygotic embryos and recovery of transgenic maize plants. *Plant Physiology*, 129, 1–5.
- Guzmán-de-Peña, D., & Ruiz-Herrera, J. (1997). Relationship between aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genetics and Biology : FG & B*, 21(2), 198–205.
- Hellens, R., Mullineaux, P., & Klee, H. (2000). Technical Focus :A guide to Agrobacterium binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5(10), 446–451.
- Hellin, J., Bellon, M. R., & Hearne, S. J. (2014). Maize Landraces and Adaptation to Climate Change in Mexico. *Journal of Crop Improvement*, 28(4), 484–501.
- Hicks, J. K., Yu, J.-H., Keller, N. P., & Adams, T. H. (1997). *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA Gα protein-dependent signaling pathway. *EMBO Journal*, 16(16), 4916–4923.
- Hoekenga, D. A., Lung'aho, M. G., Tako, E., Kochian, L. V., & Glahn, R. P. (2011). Iron biofortification of maize grain. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*, 9(2), 327–329.
- Horn B. W., Ramirez-Prado J. H., Carbone I. (2009). The sexual state of *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia* 101:275–80.
- Horn, B. W., Moore, G. G., & Carbone, I. (2009). Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 101(3), 423–429.
- ICAMEX. (n.d.). Ficha técnica: Variedad Maiz (*Zea mays* L) VT-401.
- IndexMundi (2016). Agricultural, Production, Supply, and Distribution [recurso electrónico] 06 de septiembre del 2016. <http://www.indexmundi.com/agriculture/>.
- International Grains Council (IGC). (2015). Grain Market Report.
- IPS Correspondents (2000). HEALTH-AFRICA: Toxic Fungus Threatens Health of Consumers of Corn. <http://www.ipsnews.net/2000/08/health-africa-toxic-fungus-threatens-health-of-consumers-of-corn/>
- Ishida, Y., Hiei, Y., & Komari, T. (2007). Agrobacterium-mediated transformation of maize. *Nature Protocols*, 2(7), 1614–1621.
- Jackson, D. (2012). Vegetative Shoot Meristems. In J. L. Bennetzen & S. C. Hake (Eds.), *Handbook of maize: its biology* (1st ed., Vol. 109, pp. vii–viii). New York: Springer.
- Jan, S. A., Shinwari, Z. K., Shah, S. H., Shahzad, A., Zia, M. A., & Ahmad, N. (2016). In-plant transformation: Recent advances. *Romanian Biotechnological Letters*, 21(1), 11085–11091.

- Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A. (2002). Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7(5): 193-195.
- Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A., Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 2002 May;7(5): 193-195.
- Khatiri, M., & Rajam, M. V. (2007). Targeting polyamines of *Aspergillus nidulans* by siRNA specific to fungal ornithine decarboxylase gene. *Medical Mycology*, 45(3), 211-220.
- Khlangwiset, P., Shephard, G. S., & Wu, F. (2011). Aflatoxins and growth impairment: A review. *Critical Reviews in Toxicology*, 41(9), 740-755.
- Khoury, C. K., Achicanoy, H. A., Bjorkman, A. D., Navarro-Racines, C., Guarino, L., Flores-Palacios, X., Struik, P. C. (2016). Origins of food crops connect countries worldwide.
- Knip, M., Constantin, M. E., & Thordal-Christensen, H. (2014). Trans-kingdom Cross-Talk: Small RNAs on the Move. *PLoS Genetics*, 10(9).
- Lee, D., & Lee, K.-G. (2015). Analysis of aflatoxin M1 and M2 in commercial dairy products using high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. *Food Control*, 50, 467-471.
- Lee, L.-Y., & Gelvin, S. B. (2007). T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, 146(2), 325-332.
- Malmierca, M. G., Cardoza, R. E., & Santiago, G. (2015). *Trichoderma* transformation methods. In M. A. van den Berg & K. Maruthachalam (Eds.), *Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 1* (1st ed., Vol. 2, pp. 55-68). Springer.
- MEF. (2010). Biology of Maize, Series of Crop Specific Biology.
- Ministry of Environment and Forest and Department of Biotechnology (2010). Biology of Maize, Series of Crop Specific Biology Documents 1-24.
- Moiseeva, Y. M., Velikov, V. A., Volokhina, I. V., & Gusev, Y. S. (2014). Agrobacterium -Mediated Transformation of Maize with Antisense Suppression of the Proline Dehydrogenase Gene by an In Planta Method. *4(May 2013)*, 116-125.
- Monat, J. P. (2016). THE EMERGENCE OF HUMANITY'S SELF-AWARENESS.
- Mu, G., Chang, N., Xiang, K., Sheng, Y., Zhang, Z., & Pan, G. (2012). Genetic Transformation of Maize Female Inflorescence Following Floral Dip Method Mediated by *Agrobacterium*. *Bio Technology*, 11(3), 178-183.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., Oakley, B. R. (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 172(3), 1557-1566.
- Nuss, E. T., & Tanumihardja, S. A. (2010). Maize: A paramount staple crop in the context of global nutrition. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(4), 417-436
- Obbard, D. J., Gordon, K. H. J., Buck, A. H., & Jiggins, F. M. (2009). The evolution of RNAi as a defense against viruses and transposable elements. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 364(1513), 99-115.
- Orke, E.-C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(01), 31.
- Pardo-López, L., Soberón, M., & Bravo, A. (2013). Bacillus thuringiensis insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1), 3-22.

- Passi S, Nazzaro-Porro M, Fanelli C, Fabbri AA, Fasella P (1984) Role of lipoperoxidation in aflatoxin production. *Appl Microbiol Biotechnol* 19:186-190
- Pearson, W. R. (2013). An introduction to sequence similarity ("homology") searching. *Current Protocols in Bioinformatics*.
- Peel, D. S., Mathews Jr., K. H., & Johnson, R. J. (2011). *A Report from the Economic Research Service Trade. The Expanding Mexican Beef Industry, and Feedlot and Stocker Cattle Production in Mexico. United States Department of Agriculture.*
- Piperno, D.R. & Flannery, K.V.(2001). The earliest archaeological maize (*Zea mays L.*) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98: 2101-2103.
- Purugganan, M. D., & Fuller, D. Q. (2009). The nature of selection during plant domestication. *Nature*, 457(February), 843-848.
- Ranum, P., Peña-Rosas, J. P., & Garcia-Casal, M. N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1312(1), 105-112.
- Razzaq, A., Hafiz, I. A., Mahmood, I., & Hussain, A. (2011). Development of *in planta* transformation protocol for wheat. *African Journal of Biotechnology*, 10(5), 740-750.
- Shah, S. H., Ali, S., Jan, S. A., Jalal-Ud-Din, & Ali, G. M. (2015). Piercing and incubation method of *in planta* transformation producing stable transgenic plants by overexpressing DREB1A gene in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120(3), 1139-1157.
- Shiferaw, B., Prasanna, M., Hellin, J., & Bänziger, M. (2011). Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Security*, 3(3), 307-327.
- Shou, H., Frame, B. R., Whitham, S. A., & Wang, K. (2004). Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding*, 13(2), 201-208.
- Strange, R. N., & Scott, P. R. (2005). PLANT DISEASE: A Threat to Global Food Security. *Annual Review of Phytopathology*, 43(July), 83-116.
- Suárez, R. F., Morales Chavez, L. A., & Gálvez Mariscal, A. (2013). Una Revisión Indispensable Importance of Mexican Maize Landraces in the National Diet .an Essential Review. *Revista Fitotécnica Mexicana*, 36, 275-283.
- Tubajika, K.M. y Damann, Jr.,K.E. (2001). Glufosinate-Ammonium Reduces Growth and Aflatoxin BI Production by *Aspergillus flavus*. *Journal of food protection*, 65(9), 1362-1524.
- Urrego Novoa, J. R., & Diaz, G. J. (2006). Aflatoxinas: Mecanismo de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb*, 108-116.
- Végh, K. R. (2009). Cultivated plants, primarily as a food source. I, 1035-1057.
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.-M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Jin, H. (2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6154).
- WHO/FAO Expert Consultation. (2003)*Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. World Health Organization technical report series* (Vol. 916). Retrieved from
- Willetts, H. J., & Bullock, S. (1992). Developmental biology of sclerotia. *Mycological Research*, 98(10), 801-816.

- Yoshinari, T., Akiyama, T., Nakamura, K., Kondo, T., Takahashi, Y., Muraoka, Y., Sakuda, S. (2007). Diocatin A is a strong inhibitor of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Microbiology*, *153*(8), 2774–2780.
- Yu, J., Chang, P.-K., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Bennett, J. W. (2004). Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(3), 1253–1262.
- Zeder, M. A. (2012). The Broad Spectrum Revolution at 40: Resource diversity, intensification, and an alternative to optimal foraging explanations. *Journal of Anthropological Archaeology*, *31*(3), 241–264.

Anexo 1

Secuencia RNAi ODC

La región en color rojo es complementaria a los primeros 124 pb del marco abierto de lectura del RNAm que codifica para la proteína ornitina descarboxilasa, y la región en color verde es complementaria las 276 pb corriente arriba del codón de inicio que corresponden al extremo 5' UTR del gen

```
GGTCATCCCCTCCATTGTTGCTGATTGACTCAAATTATGATTATAAATTAAAGTCGGATTTGTCTTGACTATGTTAGTCATG  
CATATCTCAGCAGGAATACACGCAGTCGGTGCCATAACCATGTGCGCTGCGACGATGCACAAAGGTGAAAGATAAGAAGATTA  
AAAAAAAAAATTAAGTGGAGTTACGCGACTGCGTGTAAAGGAGGGCGAAAACTTTCGCAACCGTAGTTGACTGGACCAAGTCTC  
CTAGACCCCTCCCCCTCAAGAGGAAGAACCTTTAGAGTAGTCCTATGCGGCAGCTCAAGGGCCGAGGGGATGAATTGGGAGGG  
CGTCAACGGGTTAATAAATGGCGCGCCGGACGAGAACACACGGGGGAAACCAGCAGGAGGTGGAATG
```

Cassette de expresión GON

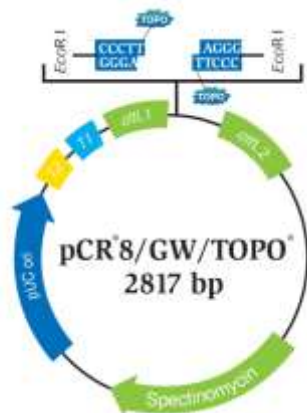
La región en color verde pertenece al promotor Glu-1D-1 de expresión inducida en semilla (1249 pb), la región en rojo pertenece a la región RNAi ODC (400 pb) y la región en azul es el terminador NOS (254 pb).

```
GCATGCAAATATGCAACATAATTTCTTTTTACTTGGCTAATTATATTTGATAAATATTTACAGATATACAATAATCAA
ACACAATAAATCATATGTGTTTTAGTTTTAGTTTCTCATATCCAAATATACAATAGCTAACCAAATCTCATCGGGAAGTT
AGCCATGCCGAGGTAGGTTGTTGCCGGAATGTTTTAGTTTTAGTTTCTCATACAACCAAATCTCATTCAAATATATAAAA
CATTCGGCAACAACCTTGTGGCTACATCTAGTTACAAGGGAATATTAGTGATGGCGTGAGCAAGCGATAAGGCCAAGGA
GAGAAGAAGTGCACTGCTACGGAGGCCAGGAAAGACAATGGACATGCAGAGAGGCCAGGGCGGGGAAGAAACACTTGG
AGATCATAGAAGAAGATAAGAGGTTAAACATAGGAGGAGGATATAATGGACAATTAATCTCGGTTAGTTGAACTCATT
GGGAAGTAAACAAATTTCTATTCTGTGTAAACCAAACATTTGACGCGGATTTCTCTGAAGATCCTATATTAATTTTA
GACATGGTTTGGCTAGTTCATTTGTCGTGAAAAGGTGTTCCATAAGTCCAAATCTACCAACTTTTTGTATGGCAGC
TCATAGCATAGATAGATGTTGTGAGTCACTGGATAGATATTGTGAGTCATAGCATGGATTGCTGTTGCTGGAATCCAAC
TACATGACAAGCAACAAAACCTGAAATGGGCTTTAGGAGTTAACAATTTACTTGTCCATGCAGGCTACCTCCACTACT
CGACATGCTTAGAAGCTTTGAGTGGCCGTAGATTTGCAAAAGCAATGGCTAACAGACACATATTCTGCCAAACCCCAAGA
AGGATAATCACTTTTCTTAGATAAAAAAGAACAGACCAATATACAACATCCACACTTCTGCAAAACAATACATCAGAACT
AGGATTACGCCGATTACGTGGCTTTAGCAGACTGTCCAAAATCTGTTTTCGAAAGCTCCAATTGCTCCTTGCTTATCCA
GCTTCTTTTGTGTTGGCAAACCTGCGCTTTTCCAACCGATTTTGTCTTCTCGCGCTTTCTTCTTAGGCTAAACAAACCTC
ACCGTGCACGCGAGCCATGGTCTGAACCTTCACTCGTCCCTATAAAAGCCTAGCCAACCTTCACAATCTTATCATCACC
CACAAACCCGAGCACCACAACTAGAGATCAATTCACGTAGTCCACCGGTCAATCCCTCCATGTTGCTGATTGACT
CAAATTATGATTATAAATTAAGTCCGATTTGTCTTACTATGTTTAGTCATGCATATCTCAGCAGGAATACACGCACTCG
GTGCCATAACCATGTGCGCTGCGCAGATGCACAAAGGTGAAAGATAAGAAGATTAATAAAAAAAAAAATTAAGTGGATTACGC
GACTGCGTGTAAAGGAGGCGAAAACCTTTCGCAACCGTAGTTGACTGGACCAAGTCTCCTAGACCCCTCCCTCAAGAG
GAAGAACCCTTAGAGTAGTCTATGCGGCAGCTCAAGGGCGAGGGGATGAATTGGGAGGCGTCAACGGGTTAATAAAT
GGCGCGCCGGACGAGAACACCGGGGGAAACCCAGCAGGAGGTGGAATGGAGTGAATATGAGACTCTAATGGATACCGA
GGGGAATTTATGGAACGTGAGTGGAGCATTTTGTGACAAGAAATATTTGCTAGCTGATAGTGACCTTAGGCGACTTTTGAA
CGCGCAATAATGGTTTCTGACGTATGTGCTTAGCTCATTTAACTCCAGAAAACCCGCGCTCAGTGGCTCCTTCAACGTTG
CGGTTCTGTAGTCCAAACGTAAAACGGCTGTGCCGCTCATCGGCGGGGTGATACCGTACTCCCTTAATTCATCAT
GTATGATAGGATCC
```

Secuencia de oligonucleótidos

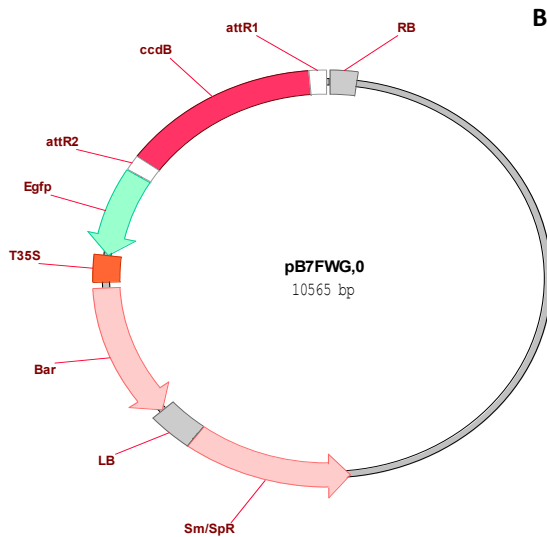
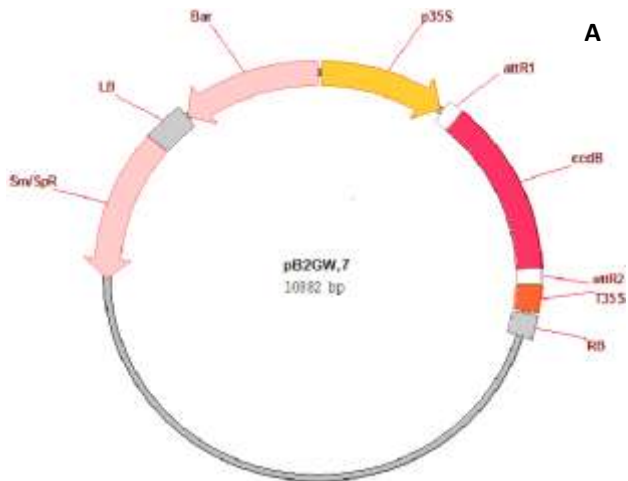
Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
ODC Fw	GGTCATCCCCTCCATTGTTGCTGAT
ODC Rv	CATTCCACCTCCTGCTGGTTTCCC
PGLU Fw	GCATGCAAATATGCAACATAATTTCC
TNOS Rv	GGATCCTATCATACATGAGAATTAAG
HMG-13 Fw	CATTGTCGTCATCATCGGCTAA
HMG-13 Rv	ATGCCAAAGCAACAACAATGG
HMG-13 SONDA	HEX-ATTCTTGTGGTTGCCCTTCTTT -BNQ1
Tubulina Fw	AAGTATGTCCCTCGTGCCGT
Tubulina Rv	GAAGTTGTCGGGACGGAAGAG
BAR Fw	GTGCTTGTCTCGATGTAG
BAR Rv	GAGGGATCTACCATGAG
BAR sonda	FAM-ACATCCGCCGTGCCACC-BNQ1

Vector de entrada pCR8/GW/TOPO



Vector de entrada pCR8/GW/TOPO. pUC ori= Origen de replicación para un alto número de copias. En *Escherichia coli*. T2 T1= Terminador T1 y T2 del operón *rrnB* para prevenir expresión basal del PPCR. **Espectinomicina**= Gen de resistencia a espectinomicina para selección en *Escherichia coli*. **attL1 y attL2**= Secuencia de recombinación (derivado del bacteriófago λ) para clonación del PPCR aun vector de entrada con los sitios complementarios *attR1* y *attR2*. **Sitio TOPO**= Sitios de ligación TA para inserción del PPCR. **EcoRI**= Sitios de corte que flanquean al inserto.

Vectores destino de expresión en planta pB2GW7.0 y pB7FWG.0



Vectores binarios destino. A) pB2GW7.0 y B) pB7FWG.0. **Sm/SpR**= Cassete de resistencia a espectinomicina/ estreptomina para selección en bacteria. **BAR** = Cassete de resistencia a glufosinato de amonio para selección en planta. **ccdB** = Región codificante para la toxina ccdB (inhibidor de la DNA Topoisomerasa en bacteria) que asegura la segregación de cepas con el plásmido recombinante. **LB/RB** = Borde izquierdo (Left Border) y borde derecho (Right Border) que permiten la inserción de todo lo que flanquean a l genoma de la planta. **attR1/attR2**= Sitios de recombinación; interactúan con los sitios attL1/attL2 que se encuentran en el vector de entrada permitiendo el intercambio de la región ccdB con el transgen. **Egfp**= región que codifica para la proteína GFP. **P35S/T35S**= Promotor 35S y Terminador 35S respectivamente.

Anexo 2

Protocolo general para PCR punto final

Protocolo general para los ensayos de PCR punto final; la diferencia depende de los oligonucleótidos, el templado y las condiciones del termociclador.

Componentes	Volumen (µL)
DNA (10-100 ng/µL)	0.5-1
Fw (10 µM)	0.25
Rv (10 µM)	0.25
dNTP's (2.5 mM c/u)	0.8
10x ExTaq Buffer	1.25
Takara pol 5 U/µL	0.05
Agua MilliQ c.b.p	12.5

Amplificación BAR		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
96°C Tapa		
94°C	0:03:00	1
94°C	0:00:45	35
60°C	0:00:35	
72°C	0:00:10	
72°C	0:05:00	1
16°C	Pause	

Amplificación ODC		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
96°C Tapa		
94°C	0:03:00	1
94°C	0:00:45	35
60°C	0:00:35	
72°C	0:00:30	
72°C	0:05:00	1
16°C	Pause	

Amplificación GON		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
96°C Tapa		
94°C	0:03:00	1
94°C	0:00:45	35
60°C	0:00:35	
72°C	0:02:00	
72°C	0:05:00	1
16°C	Pause	

Amplificación Tubulina		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
96°C Tapa		
94°C	0:03:00	1
94°C	0:00:45	35
60°C	0:00:35	
72°C	0:00:10	
72°C	0:05:00	1
16°C	Pause	

Amplificación HMG13		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
96°C Tapa		
94°C	0:03:00	1
94°C	0:00:45	35
60°C	0:00:35	
72°C	0:00:15	
72°C	0:05:00	1
16°C	Pause	

Ligación de los PPCR ODC y GON al vector de entrada pCR8/GW/TOPO

Se utilizó el protocolo modificado de *pCRTM8/GW/TOPO TA Cloning* kit.

Componentes	Volumen (µL)
PPCR (100-150 ng/µL)	1
Solución de sales (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl ₂)	0.5
pCR8/Gw/TOPO (5-10 ng/µL)	0.5
Agua MilliQ c.b.p	4

Transformación por choque térmico de *E. coli Mach1 -T1^R* quimiocompetentes con pCR8/ODC y pCR8/GON

Para la clonación de los vectores pCR8/ODC y pCR8/GON se utilizó cepa comercial One shot *E.coliMach1TM -T1^R* quimiocompetentes

Transformación por choque térmico (quimiocompetentes)

1. Agregar los 6 µL de la reacción de ligación (pCR8/GW/TOPO + PCR) a una alícuota sin descongelar de *E. coli Mach 1 -T1^R*.
2. Incubar en hielo por 20 minutos.
3. Colocar rápidamente a 42°C por 50 segundos.
4. Colocar en hielo rápidamente por 10 minutos.
5. Agregar 250 µL de medio LB líquido (Anexo 3) o medio S.O.C. (proporcionado por el kit).
6. Incubar 1 hora a 37 °C a 180 rpm.
7. Plaquear 100 µL del cultivo en una caja de LB adicionado con el antibiótico espectinomicina a 100 µg/mL y el resto en otra caja.
8. Incubar a 37 °C de 20-24 horas.
9. Picar colonias en medio LB líquido suplementado con espectinomicina a 00 µg/mL.

Eliminado: 1

Ensayo de digestión enzimática de pCR8/ODC y pCR8/GON

Para obtener la orientación correcta de las secuencias ODC y GON dentro del vector pCR8/GW/TOPO con respecto a los sitios de recombinación *att*, se digirieron ambas con la enzima EcoRI que bordea el sitio de inserción permitiendo la liberación del inserto, y con un par de enzimas que permite conocer la orientación del inserto; para pCR8/ODC se utilizó la combinación y Ascl, y para pCR8/GON se utilizó Xbal y Ndel.

Digestión Xbal/Ascl	
Componentes	Volumen (µL)
pCR8/ODC (1µg/µL)	1-2
Xbal (20 U/µL)	0.3
Ascl (20 U/µL)	0.3
10x NEB Buffer 4	3
Agua MilliQ c.b.p.	30
Incubar 1 hora a 37°C	

Digestión Xbal/Ndel	
Componentes	Volumen (µL)
pCR8/ODC (1µg/µL)	1-2
Xbal (20 U/µL)	0.3
Ndel (20 U/µL)	0.3
10x NEB Buffer 4	3
Agua MilliQ c.b.p.	30
Incubar 1 hora a 37°C	

Digestión EcoRI	
Componentes	Volumen (µL)
Plásmido (1µg/µL)	1-2
EcoRI (20 U/µL)	0.3
10x NEB Buffer 4	3
Agua MilliQ c.b.p.	30
Incubar 1 hora a 37°C	

LR Recombinación de los vectores de entrada y los vectores destino

Se utilizó el protocolo modificado de *GATEWAY® Technology with Clonase® II kit* correspondiente a la parte de LR recombinación. Se digirieron los vectores de entrada con la enzima XbaI al 75% de su actividad (NEB Buffer 4) con la finalidad de dejarlos linealizar por 12 horas y que la enzima no fuera a realizar cortes inespecíficos. La proporción del vector de entrada recombinante linealizado debe de ser mayor al vector destino circular para garantizar que la mayoría del vector destino capte el inserto. En la siguiente tabla se muestra las cantidades utilizadas en la práctica:

Vector	Peso molecular teórico (g/mol)	Masa utilizada (g)	moles	Proporción vector entrada : vector destino
pCR8/ODC	322,319.27	2.94×10^{-7}	9.14×10^{-13}	10:1
pB2GW7.0	1,424,554.20	1.32×10^{-7}	9.26×10^{-14}	
pCR8/GON	621,540.19	3.12×10^{-7}	5.02×10^{-13}	5:1
pB7GWG.0	1,382,600.55	1.508×10^{-7}	1.09×10^{-13}	

NOTA: Los pesos moleculares se obtuvieron con la proporción y peso individual de cada nucleótido. El peso teórico puede variar en cierto grado al verdadero.

LR recombinación

- Digerir los plásmidos pCR8/ODC y pCR8/GON con la enzima XbaI para linearizar.
- Correr la digestión en un gel de agarosa al 1% y purificar la banda del plásmido linealizado con *Zymoclean Gel DNA recovery kit*, eluyendo en 20 µL de buffer de elución (para concentrar el extracto).

Digestión XbaI	
Componentes	Volumen (µL)
plásmido (10 µg/µL)	10
XbaI (20 U/µL)	1
10x NEB Buffer 4	5
Agua MilliQ c.b.p.	50

- Preparar una mezcla entre el vector de entrada recombinante linealizado y el vector destino.

- Agregar 2 µL de LR clonasa (150 ng/µL) proporcionada en el kit.
- Incubar 5 horas a 37 °C.
- Transformar con todo el volumen de reacción una alícuota de *E. coli Mach 1 -T1^R* (quimicompetentes) comerciales conforme al protocolo (Anexo 2).

Mezcla de vectores	
Componentes	Volumen (µL)
pCR8/ODC (49.1 g/µL)	6
pB2GW7.0 (132 ng/µL)	1
Agua MilliQ c.b.p.	8

Mezcla de vectores	
Componentes	Volumen (µL)
pCR8/GON (78.1 g/µL)	4
pB7FWG.0 (150 ng/µL)	1
Agua MilliQ c.b.p.	8

Transformación por choque eléctrico de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 electrocompetente con pB2GW7.0/ODC y pB7FWG.0/GON

Para la clonación de los vectores pB2GW7.0/ODC y pB7FWG.0/GON se utilizó la cepa hipervirulenta *Agrobacterium tumefaciens* AGL1.

Transformación por choque eléctrico (electrocompetente)

1. Agregar 1 μL del vector destino recombinante (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a una alícuota sin descongelar de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1.
2. Incubar en hielo por 20 minutos la mezcla y la celda de electropración (0.1 cm brecha del electrodo, pKg= 50).
3. Agregar la mezcla al electrodo y asegurarse que haga contacto con ambas paredes y el fondo (eliminar burbujas).
4. Incubar en hielo por 10 minutos.
5. Preparar el electroporador con las siguientes condiciones: 1800 V, 15 UF, 335 R; para *E. coli* en celdas de 1 mm.
6. Rápidamente eliminar el exceso de humedad de la celda y mientras aún está fría colocar en el electroporador y dar el pulso eléctrico.
7. Inmediatamente pasar la mezcla bacteriana a un tubo con 250 μL de medio LB o S.O.C. (comercial).
8. Incubar a 28 °C a 180 rpm por 3 horas.
9. Plaquear 50 μL en una placa de LB suplementado con espectinomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Transformación de maíz VT-401 mediada por *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 transgénico

Para la transformación de maíz VT-401 se diseñó un método de transformación *in planta* que consiste en infectar el meristemo apical (SAM) a partir de del coleoptilo desarrollado en semilla germinada sin interrumpir el crecimiento de la planta; esto se puede conseguir por el hecho de que la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 es una cepa hipervirulenta que contiene plásmidos accesorios implicados en la mejora y potencialización de la patogenicidad, lo que ocasiona una transferencia más eficiente del T-DNA.

Transformación in planta de maíz VT-401 mediada por *Agrobacterium tumefaciens* AGL1

1. Crecer *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 transgénica en 4 mL LB suplementado con kanamicina 25 µg/mL, carbenicilina 50 µg/mL y espectinomicina 50 µg/mL a 28 °C con 180 rpm de agitación hasta obtener una densidad óptica de 0.3-0.4 a 600 nm (aproximadamente 1.5×10^8 cel/mL). Por lo general la incubación es por 3 días.

2. Inocular con 1 mL del cultivo previo una caja de medio LB suplementado con los mismos antibióticos a las mismas concentraciones.

3. El mismo día que se inocula la caja con *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 transgénica, se debe colocar a germinar las semillas sobre una base de algodón húmedo y se cubren con otra capa de algodón húmedo. Se incuba en cámara de crecimiento in vitro hasta obtener una plántula con un coleóptilo promedio de 5 mm de longitud.

NOTA: Es indispensable coordinar el germinado de la semilla y el crecimiento del cultivo. Las condiciones en cámara de crecimiento in vitro PERCIVAL fueron: 25 °C, 60% de humedad en luz y 50% en oscuridad, y con foto período de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Se obtenían una longitud de coleóptilo de 5 -8 mm (lo ideal fue trabajar con longitudes de 5 mm). Si el coleóptilo era de 5 mm el meristemo se descubre removiendo cerca de 3-4 mm.

4. Raspar el cultivo bacteriano y resuspender en medio de inducción (Anexo 3) suplementado con acetosiringona (100 µM final) y glucosa (10 mM final) a un volumen final 600 µL.

6. Incubar a 28 °C a 200 rpm de agitación por 1 hora.

NOTA: El volumen de la suspensión bacteriana puede variar dependiendo del crecimiento de *Agrobacterium* en la caja. Lo ideal es hacer una suspensión inducida espesa que es casi imposible de pipetear, sin manipular demasiado a las bacterias para no disminuir su viabilidad.

7. Se remueve de 3-4 mm de la punta del coleóptilo (si la longitud es de 5 mm).

NOTA: Se utilizó una puntilla o una aguja para introducir a la bacteria cercas del meristemo.

8. Introducir por el sitio de corte una pequeña cantidad de la suspensión de *Agrobacterium* inducida con una puntilla o una aguja y dejando un menisco sobre la herida.

9. Dejar reposar la plántula máximo 30 minutos a temperatura ambiente. Tapar las plántulas infectadas con una capa de algodón húmedo y volver a incubar en cámara de crecimiento por un día o lo necesario para ser sembradas.

10. Después de 2 semanas retar 4 hojas consecutivas con una solución 0.15% glufosinato de amonio (Anexo 3), marcar la zona de aplicación y ver respuesta en una semana.

11. Las plántulas resistentes se seleccionaron para extracción de DNA y realizar PCR punto final del transgen ODC.

Transformación de cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 transgénico

Se utilizaron 2 cepas de *A. flavus* (H-167 y H-617) y una cepa de *A. parasiticus* (H-188). Para su transformación se utilizó el protocolo de *Malberca et. al* (2015) para transformación de *Trichoderma*, con modificaciones.

Transformación de cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 pB2GW7.0/ODC

1. Diluir esporas hasta una concentración de 10^7 esporas/mL en medio de suspensión de esporas (Anexo3).
2. Crecer *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 pB2GW7.0/ODC en 4 mL LB suplementado con kanamicina 25 µg/mL, carbenicilina 50 µg/mL y espectinomicina 50 µg/mL a 28 °C con 180 rpm de agitación hasta obtener una densidad óptica de 0.3-0.4 a 600 nm (aproximadamente 1×10^8 células).
3. Inocular con 1 mL del cultivo previo una caja de medio LB suplementado con los mismos antibióticos a las mismas concentraciones.
4. Raspar el cultivo bacteriano y resuspenderlo en 1 mL volumen final de medio de inducción suplementado (Anexo 3) con 40 mM de MES, 0.5% de glicerol y 200 µM de acetosiringona.
5. Incubar a 28 °C con 200 rpm de agitación por 1 hora.
6. Mezclar 200 µL de la suspensión bacteriana con 10 µL de la suspensión de esporas e incubar por otra hora a 28 °C con 200 rpm de agitación.
7. Plaquear la mezcla sobre un filtro de celulosa marca MILLIPORE tipo AA (47 mm de diámetro, 0.8 µm de diámetro del poro) sobre una placa de inducción (Anexo 3).
8. Incubar por 40 horas a 18-20 °C.
9. Transferir la placa a medio PDA suplementado con 250 µL/mL extracto FINALE® (Anexo 3) y agregar al resto de la caja de inducción una capa de medio LB suave suplementado con 250 µL/mL extracto FINALE® (Anexo 3).
10. Incubar 72 horas a 28 °C.
11. Pasar un trozo de agar con hifas a medio PDA suplementado con 1 mM de putrescina y 250 µL/mL extracto FINALE®.
12. Incubar 6-8 días a 28 °C.
13. Tomar de las hifas que hayan crecido fuera del trozo del inóculo para realizar PCR punto final para detección del transgen BAR.

Extracción de DNA genómico con el método de CTAB

Extracción de DNA genómico

1. Preparar la solución CTAB en el momento (Anexo 3).
2. Pesar 100 - 150 mg de tejido molido con nitrógeno líquido. No dejar que se descongele.
3. Agregar 600 μ L de CTAB previamente calentado a 65 °C, mezclar e incubar por 20 minutos a la misma temperatura.
4. Agregar 600 μ L de fenol:cloroformo:isoamílico y mezclar perfectamente por 1 minuto (25:24:1).
5. Centrifugar a 13 000 rpm por 10 minutos.
6. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y volver a repetir la extracción con fenol:cloroformo:isoamílico.
7. Agregar 600 μ L de cloroformo:isoamílico (24:1) a la fase acuosa.
8. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y agregar 0.7 volúmenes de isopropanol, mezclar e incubar a -20 °C por 20 minutos.
9. Centrifugar a 13 000 rpm/ 4 °C por 15 minutos para formar la pastilla.
10. Desechar el sobrenadante y lavar la pastilla con 1 mL de 70% etanol.
11. Centrifugar a 13 000 rpm/ 4 °C por 2 minutos. Desechar el sobrenadante.
12. Secar la pastilla a 37 °C y resuspenderla en 50 μ L de agua destilada con RNasa A.
13. Incubar a 37 °C por 15 minutos.
14. Realizar la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para verificar integridad de DNA genómico.

Anexo 3

Medio LB	
Componente	g/L
Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

1. Disolver los componentes en 800 mL de agua destilada.

Nota: Agregar 15 g de agar si es medio sólido.

2. Ajustar a pH= 7.0.

3. Aforar a 1 L y esterilizar por autoclave.

4. Agregar los antibióticos correspondientes cuando el medio haya alcanzado la temperatura apropiada

Medio de inducción	
Componente	Volumen (mL)
Buffer de potasio	10
Solución sodio-magnesio	20
CaCl ₂ ·H ₂ O 1% (w/v)	1
Glucosa 20% (w/v)	10
NH ₄ NO ₃ 20% (w/v)	2.5

1. Agregar 800 mL de agua destilada.

Nota: Agregar 15 g de agar si es medio sólido

2. Ajustar a pH= 7.5.

3. Aforar a 985 mL y esterilizar por autoclave.

4. Agregar 10 mL de FeSO₄ al 0.01% y 5 mL de soluciones trazas cuando el medio esté a la temperatura adecuada.

Solución trazas	
Componente	mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	100
CuSO ₄ ·7H ₂ O	100
H ₃ BO ₃	100
MnSO ₄ ·H ₂ O	100
Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	100
Esterilizar por filtración.	
Solución sodio-magnesio	
Componente	g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	30
NaCl	15
Esterilizar por autoclave.	
Buffer de potasio	
Componente	g/L
KH ₂ PO ₄	145
K ₂ HPO ₄	200
Ajustar pH=7.0 y esterilizar por autoclave.	
Solución suspensión de esporas	
Componente	% (w/v)
Glicerol	10
Tween 20	0.05
Esterilizar por autoclave.	