



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Transformación Genética de Callos
Embriogénicos de Maíz (*Zea mays* L.) con el
Gen de la Glicoproteína G del Virus de Rabia.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A

MARÍA DE JESÚS JIMÉNEZ VILLALOBOS



DIRECTORA DE TESIS:
M. en C. MARÍA TERESA OLIVERA FLORES
CO-DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ELIZABETH LOZA RUBIO

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Datos del Jurado.

Datos del alumno.

Jiménez

Villalobos

María de Jesús.

56-12-51-11

Universidad Nacional Autónoma de México.

Facultad de Ciencias.

Biología.

Datos del tutor.

Maestra en Ciencias.

María Teresa

Olivera

Flores

Datos del Sinodal 1.

Doctora.

Elizabeth

Loza

Rubio

Datos del Sinodal 2.

Maestra en Ciencias.

Josefina

Herrera

Santoyo

Datos del Sinodal 3.

Maestra en Ciencias.

Juana Mabel

Hernández

Altamirano

Datos del Sinodal 4.

Doctora.

Guillermina

Murguía

Sánchez

Datos del Trabajo escrito.

"Transformación Genética de Callos Embriogénicos de Maíz (*Zea mays* L.) con el Gen de la Glicoproteína del Virus de Rabia".

99 páginas

2006.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el financiamiento otorgado a esta investigación a través del proyecto G34635B “Expresión de la proteína G del virus de la rabia en plantas transgénicas de maíz, y su evaluación como inmunógeno oral en bovinos”.

Este trabajo se realizó en las siguientes Instituciones:

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Edificio E del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM bajo la dirección de la M en C María Teresa Olivera Flores y la co-dirección de la Dra. Elizabeth Loza Rubio.

Laboratorio de Plantas Tropicales y Salud Humana del CINVESTAV-Irapuato bajo la asesoría del Dr. Miguel Ángel Gómez Lim y el M en C Octavio Guerrero Andrade.

AGRADECIMIENTOS:

Al que es UN por darme la oportunidad de estar aquí y ofrecerme todas estas maravillas con las cuales puedo entretenerme lo mismo que maravillarme.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron en este trabajo.

A la UNAM mi eterno agradecimiento por la formación recibida, así como todas y cada una de las oportunidades que me brindó.

A mis sinodales por su paciencia, disponibilidad de tiempo y sus acertados comentarios sin los cuales, no hubiera sido posible el presente trabajo.

A mi familia por soportarme y apoyarme siempre.

A la M en C María Teresa Olivera Flores por la segunda oportunidad que me brindó, su guía, su tiempo, su paciencia, su confianza y, sobre todo, su amistad.

A la gente bonita del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (116) por todas las experiencias y apoyo compartidos.

Al Laboratorio 15 del CINVESTAV-Irapuato y a Tavo por compartir su conocimiento, paciencia y apoyo.

A todas mis amistades que saben quienes son y no las nombro a todas y todos porque si se me pasa alguien no deseo que se preste a malos entendidos. Saben que a todos los quiero por igual y que Dios les siga proveyendo de harta paciencia para que sigamos juntos, porque como bien saben soy un hueso duro de roer.

A mis compañeros de generación por los buenos tiempos.

A Tzitzil, Nect, Aries y Marct por toda su ayuda-apoyo espiritual, moral, psicológico, material y económico.

A Y. K. Ishkra K. S., no es que haga menos a tus amigas, pero te agradezco la ayuda en el francés y por que sin ti y tus métodos no estaría esta tesis escrita y mucho menos un examen de estos (seamos honestas, tu conoces bastante bien la historia). Sé que realizaste una excepción conmigo y también sé el motivo por el cual decidiste apoyarme, no soy tan inocente. ¡Ah y lo mismo que lo anterior!

DEDICATORIAS:

Al que es UN

A mi MADRE por todo lo que ella significa para mí.

A María Reyes que siempre esta presente en mí.

A la persona que sé que nunca dejo y no ha dejado de creer en mí pese a todos y todo: Alma.

A mis hermanos por ser mi familia.

A Erika por su paciencia y amistad.

A los hombres de mi vida: Sr. Marcelino Villalobos, Raúl Jiménez, Sr. Sasha G. Ruvanovich, Sr. Basilif Milanko y Sr. I. Andrzej Milankovich D. por enseñarme con su ejemplo lo que es el amor y el honor.

ÍNDICE.

1) Resumen	1
2) Introducción	2
3) Antecedentes	4
3.1) Generalidades del maíz.....	4
3.1.1 Clasificación.....	4
3.1.2 Descripción botánica.....	4
3.1.3 Componentes bioquímicos del maíz.....	5
3.1.4 Distribución	5
3.1.5. Producción del maíz	6
3.1.6 Importancia cultural del maíz	6
3.2) Embriogénesis somática de maíz.....	8
3.2.1) Factores que intervienen en la embriogénesis somática de maíz.....	8
a) Medio de cultivo.....	8
b) Reguladores de crecimiento.....	9
c) Explante y estado fisiológico.....	10
d) Genotipo.....	11
e) Reguladores osmóticos.....	12
f) Incubación.....	13
3.2.2 Genes presentes en la embriogénesis somática del maíz.....	13
3.3) Tipos de callos en maíz.....	14
3.4) Transformación genética.....	15
3.4.1 Promotores.....	15
3.4.2 Genes reporteros.....	15
3.4.3 Genes de selección.....	16
3.4.4 Expresión transitori.....	17
3.4.5 Técnicas de transformación	17
3.5) Transformación en maíz por biobalística.....	20
3.6) Vacunas comestibles	24
3.6.1 Vacunas comestibles en plantas	24
3.6.2 Vacunas comestibles y el sistema inmune de mucosas.....	26
3.6.3 Ventajas y desventajas de las vacunas comestibles.....	27
3.6.4 Ejemplos de diseño de vacunas comestibles.....	28
3.7) Rabia.....	30
3.7.1 Familia Rhabdoviridae.....	30
3.7.2 Distribución del virus de rabia.....	30
3.7.3 Características del virus de rabia.....	30
3.7.4 Biología molecular de las proteínas del virus de rabia	31

3.7.5 Fases de la enfermedad de rabia	32
3.7.6 Rabia bovina parálitica	32
3.7.7 Vacunas antirrábicas	34
3.7.8 Vacunas orales de rabia derivadas de plantas	35
4) Justificación	37
5) Objetivos	38
5.1) Objetivo general	38
5.2) Objetivos particulares	38
6) Hipótesis	39
7) Materiales y métodos	40
8) Resultados y discusión	49
9) Conclusiones	77
10) Anexo.....	78
11) Bibliografía	86
12) Abreviaturas.....	98

RESUMEN.

Se indujo y se proliferó callo embriogénico de maíz mostrando las características típicas de un tipo II (Green y Rhodes, 1982). La transformación se llevó a cabo por el método de biobalística en un co-bombardeo, mostrando en el ensayo histoquímico (Jefferson *et al*, 1987) la expresión del gen reportero. La concentración óptima elegida, para seleccionar callos transformados de los que no lo estuvieron, correspondió a 3 mg/L de Basta® con fuentes de nitrógeno reducido. La regeneración a plantas de maíz se dio a los 6 meses y medio después del co-bombardeo con un total de 382 plantas por parte de las dos construcciones con el transgen de interés (pWR-21/pUB1 y PGHCNS/MARS). De las 15 líneas de maíz regeneradas, a partir de callos transformados, 11 líneas mostraron la banda esperada de 1492 pares de bases correspondiendo a la proteína G del virus de la rabia, lo que represento que un 73.33% de las plantas analizadas, incorporó el gen de la glicoproteína del virus de rabia en su genoma nuclear.

INTRODUCCIÓN.

La rabia en México es transmitida al ganado vacuno principalmente por el murciélago Heratófago *Desmodus rotundus* provocando la enfermedad conocida como rabia parálitica bovina. Actualmente, dicha enfermedad se presenta en 23 entidades federativas (Domínguez, 2004). Las pérdidas económicas se calculan en 50 millones de dólares anualmente (Selem y Chab, 1997).

En los últimos años, se ha tratado de prevenir y controlar la rabia por el empleo de vacunas tradicionales y recombinantes (como la VGR y la basada en adenovirus) y sólo se han aplicado en otros países; éstas son costosas y su manejo se hace difícil en condiciones de campo. Por ello, se han estudiado varias plantas candidatas para fungir como vacunas comestibles, tales como: papa jitomate, plátano, lechuga, zanahoria, alfalfa y maíz. De este último se ha demostrado la expresión de varias proteínas como la avidina (Kusnadi *et al*, 1998), la proteína S del TGEV (Streatfield *et al*, 2001), la proteína LB-T (Chikwamba *et al*, 2002) y la proteína VSP β de soya (Grando *et al*, 2005). Lo anterior indica que el maíz se ha perfilado como un sistema de producción de proteínas heterólogas para vacunas comestibles. Por ser uno de los cultivos utilizados como forraje para ganado vacuno, se ha seleccionado como planta modelo para la obtención de una vacuna comestible contra la rabia.

Lo anterior ha sido posible gracias a que el maíz ha superado la barrera de la recalcitrancia (poca o nula capacidad de regeneración) por medio de la obtención de callo embriogénico tipo II. Por las características propias de este tipo de callo, fue posible llevar a cabo la introducción, integración y expresión de genes foráneos. Sin embargo, el maíz a diferencia de las dicotiledóneas, no es un hospedero exitoso para albergar *Agrobacterium* (Morrish y Fromm, 1992). Por ello, surgió la necesidad de transformar maíz por métodos de transferencia directa del ADN como la biobalística. Esta técnica permitió la introducción del ADN desnudo al interior de células vegetales intactas. La biobalística emplea la aceleración de microparticulas (tungsteno u oro) cubiertas con ADN por un mecanismo de explosión (pistola de presión) o por estallido de gas (dióxido de carbono, nitrógeno o helio) proporcionando suficiente velocidad para penetrar la pared celular (Klein *et al*, 1988a).

Con base en lo anterior, el objetivo general del presente trabajo fué obtener plantas transgénicas de maíz a partir de callos embriogénicos co-bombardeados con el gen de la glicoproteína del virus de la rabia, genes reportero y de selección. Se llevó a cabo en tres etapas. En la primera etapa se realizó el establecimiento y mantenimiento de cultivo de callos embriogénicos de maíz. En esta etapa se estableció como objetivo determinar la concentración del herbicida Basta® (glufosinato de amonio) perjudicial para los callos embriogénicos en tres etapas: (I) inducción de callo embriogénico a partir de embriones inmaduros de maíz (*Zea mays* L.), (II) la proliferación de callo embriogénico y (III) la realización de cinéticas de crecimiento de callos inoculados en medio de cultivo N6p con y sin fuentes de nitrógeno reducido en cuatro distintas concentraciones del herbicida Basta® (0, 1, 2 y 3 mg/L), registrando el peso fresco cada tercer día durante tres semanas con el fin de establecer una concentración de sensibilidad donde afecte el crecimiento del callo embriogénico de maíz.

En la segunda etapa se realizó la transformación de los callos embriogénicos, empleando la técnica de Biobalística, con los siguientes objetivos: a) transformar callos embriogénicos de maíz por medio de la técnica de biobalística con el gen de la glicoproteína del virus de rabia (gen de interés), y los genes *gus* (gen reportero) y *bar* (gen de selección); b) realizar la expresión transitoria por el método histoquímica de GUS (Jefferson, 1987) a callos embriogénicos de maíz transformados y c) seleccionar los callos embriogénicos transformados con la concentración óptima del herbicida Basta® (glufosinato de amonio) y regenerar plantas de maíz.

En la tercera etapa se tuvo como objetivo verificar la inserción del gen de la glicoproteína del virus de rabia por medio de la técnica de PCR y evaluar, a futuro, las plantas de maíz que expresen dicha proteína, para obtener una vacuna comestible contra la rabia en ganado vacuno.

3) ANTECEDENTES.

3.1) GENERALIDADES DEL MAÍZ.

3.1.1 Clasificación.

El maíz es una planta herbácea anual, la cual ha sido clasificada taxonómicamente de la siguiente manera:

Reino	Plantae
<i>Phylum</i>	Antophyta
Clase	Monocotyledones
Orden	Commelinales
Familia	Poaceae
Genero	<i>Zea</i>
Especie	<i>Zea mays</i>

(Internacional Code of Botanical Nomenclature, XV International Botanical Congress, 1993)

3.1.2 Descripción botánica de la planta.

El maíz es una planta anual, herbácea y monoica, cuya células poseen $2n$ cromosomas; con un gran desarrollo vegetativo que puede alcanzar hasta los 5 m de altura (el promedio es de 2 a 2.5 m). Muy robusta, tallo nudoso y macizo y con 15 a 30 hojas alargadas y abrasadoras (4 a 10 cm de ancho por 35 a 50 cm de largo), de borde áspero, finamente ciliado y algo ondulado. Desde el entrenudo inferior pueden nacer tallos secundarios que no suelen dar espiga y en caso de darlas son abortivas (Reyes, 1990). Posee un sistema radicular fasciculado bastante extenso formado por tres tipos de raíces: raíces primarias, raíces secundarias o principales y raíces aéreas o adventicias (C.I.A., 1980).

El maíz posee flores masculinas y femeninas. Las flores masculinas se agrupan en una panícula (penachos o pendones) terminal y las femeninas se reúnen en varias espigas (panojas) que nacen de las axilas de la hojas del tercio medio de la planta (Castañeda, 1990). El fruto de maíz (grano) lo describe Reyes (1980) como una cariósipide formada por la cubierta o pericarpio (6% del peso del grano), el endospermo (80%) y el embrión o germen (14%).

3.1.3 Componentes bioquímicos del maíz.

El grano de maíz como fuente de alimento está constituido por diferentes compuestos como a continuación se menciona: a) almidón (constituido por amilasa y amilopectina conformando un 90% en el endospermo). Es un componente energético de reserva y como fuente principal de energía durante la germinación (Hamaker *et al*, 2002); b) proteína (como Zeínas α , β , γ , δ - y no zeínas, conforman un 90% y 10% respectivamente de proteínas en el endospermo). Funcionan como proteínas de almacenamiento principalmente, en el caso de las Zeínas; las no zeínas participan en diversas funciones a nivel de pared celular y citoplasma (Hamaker *et al*, 2002); c) lípidos (mono, di y triglicéridos, ácido linoleico y oleico, fosfolípidos y esteroides conformando del 3.5 al 5% en grano). Funcionan como fuente energética secundaria (Hamaker *et al*, 2002) y d) componentes menores (como fitato, yodo, zinc, hierro, vitamina E, piridoxina y niacina; el fitato conforma el 90% del escutelo mientras que los restantes se presentan en trazas). Intervienen en varios procesos metabólicos (Voet y Voet, 2001; Hamaker *et al*, 2002).

3.1.4 Distribución.

El maíz debido a su distribución, a modo general, es clasificado en dos tipos distintos: el cultivado en ambientes cálidos conocido como maíz tropical y el que se cultiva en climas más fríos llamado maíz de zona templado. El maíz tropical es a su vez, es clasificado en tres subclases: de tierras bajas, de media altitud y de zonas altas (www.fao.org). La clasificación de los tipos de maíz basada en el ambiente ha sido descrita en detalle por Dowswell *et al* (1996).

En México, la gran diversidad de ambientes ha traído como consecuencia la diversidad de tipos, razas y variedades de maíz adaptados prácticamente a todas las condiciones que se puedan presentar en el país. Debido a esto, se puede encontrar maíz cultivado desde las costas de ambos océanos hasta más de 3000 metros sobre el nivel del mar, con temperaturas medias mensuales, durante su ciclo vegetativo, de 28°C en las zonas más cálidas y de 12°C o menos en las zonas frías (C.I.A., 1980).

Reyes (1990) señala que las razas de maíz, las cuales son ampliamente comerciales, rendidoras de grano y forraje, y que han intervenido de manera notable en los programas nacionales de desarrollo son: a) raza Vandeño, se cultiva en la tierra caliente de la costa del Pacífico Sur; b) raza Tuxpeño, se cultiva en las tierras bajas de la costa del golfo de

México; c) raza Tabloncillo, solamente se cultiva en Jalisco y Nayarit y d) raza Celaya, se cultiva en la zona del Bajío.

3.1.5 Producción de maíz.

La producción mundial de maíz en 2005 se incrementó en 5 millones de toneladas, para situarse en 677 millones de toneladas en el caso de Estados Unidos; también se aumentaron las estimaciones para la Unión Europea. En tanto al consumo mundial, éste se incrementó en 2 millones de toneladas más que el año anterior, es decir, a 672 millones de toneladas. Respecto al comercio mundial de maíz para el período 2006 se estima en 76.7 millones de toneladas mensuales, lo que significará un descenso de 0.3 millones de toneladas.

(www.igc.org.uk/gmr/gmrsumms.htm).

En el caso de México, la producción de maíz fue de 22 millones de toneladas lo que representó el 3.1% de la producción a nivel mundial en el período del 2005, siendo los estados de Jalisco, Estado de México, Guanajuato, Sinaloa y Oaxaca los principales productores. Sin embargo, el consumo de este grano, a nivel nacional, fue de 27.4 millones de toneladas lo que significó un déficit pese a las políticas y programas agropecuarios.

(www.siap.sagarpa.gob.mx).

3.1.6 Importancia cultural del maíz en México.

Es seguro que ninguna planta tuvo para los indígenas precolombinos una importancia igual a la del maíz, importancia que sigue vigente hoy día. El maíz nutrió los orígenes de las grandes civilizaciones de este país y lo sigue haciendo. Referirse a la importancia cultural del maíz es mencionar la comunión indisoluble entre la planta y el hombre.

(www.udlap.mx/palou/discurso.htm).

Como es sabido, México es centro de origen del maíz y su riqueza de razas y variedades es el producto de generaciones que han logrado obtenerlas y preservarlas; pero el maíz no sólo es el grano que ha alimentado, alimenta y alimentará al mexicano, sino que también posee una significación cultural y religiosa, pues el maíz es todavía parte de las creencias religiosas y rituales de los mexicanos. No es de extrañarse que cada cultura

nacida en este país tenga representado al maíz como una deidad y se le atribuyan a esta planta una serie de leyendas y mitos.

Pese a la influencia cultural externa, el maíz sigue siendo el grano sostén de este país y seguirá siendo un factor de identidad inalienable porque posee no sólo el poder cultura-tradición, como se mencionó anteriormente, sino también el nutritivo. Todo esto se puede resumir en la vieja sentencia de que sin maíz no hay país.

(www.correodelmaestro.com/anteriores/1999/noviembre42/artistas42.htm).

3.2) EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN MAÍZ.

3.2.1 Factores que intervienen en la Embriogénesis Somática de Maíz.

a) Medio de Cultivo.

El medio de cultivo es un factor importante para la inducción de callo embriogénico; aunque diferentes formulaciones de medio pueden sostener el crecimiento de callo, dos medios son los más empleados: MS (Murashige & Skoog, 1996) y N6 (Chu *et al*, 1975). Green (1982) obtuvo callo embriogénico de maíz de la línea A188, tanto en medio MS como N6, logrando mantenerlo hasta la etapa de regeneración empleando ambos medios.

Hodges *et al* (1986) señalan que el medio N6 debe jugar un papel crucial en la expresión de genes que, probablemente, participan no solo en la embriogénesis, sino también en la regeneración, pues la diferencia principal entre el medio MS y éste radica en el contenido de nitrógeno. El MS posee 20.6 mM de NH₄ y 39.4 mM de NO₃ mientras que el N6 contiene 7 mM de NH₄ y 28 mM de NO₃ además 20 mM de L-prolina. El índice de relación entre NO₃ y NH₄ es de 1.9 y 4 para MS y N6 respectivamente. Este grupo enfatiza el hecho de que el nitrógeno es importante para la embriogénesis somática y la regeneración.

Wilkinson y Thompson (1986) comprobaron el efecto del medio de cultivo y el genotipo, así como el medio x genotipo en el establecimiento de callo embriogénico de maíz. Probaron diferentes líneas mejoradas en medio MS, N6 y D (propuesto por Duncan *et al*, 1985). Por medio de un análisis estadístico concluyeron que la formación de callo embriogénico y la regeneración a plantas depende tanto de la influencia del genotipo como el medio de cultivo. Estos resultados se pueden considerar un ejemplo de la interacción entre el ambiente y el genotipo. Numéricamente, 33 de los 37 genotipos (o sea el 88%) formaron callo embriogénico en alguno de los tres medios y 18 lo formaron con una frecuencia mayor al 50%.

Armstrong y Green (1985) realizaron un estudio sobre el efecto de la L-prolina en la embriogénesis somática en maíz. Emplearon embriones en diferentes etapas de desarrollo en medio MS y N6 en diferentes concentraciones de L-prolina (de 0 a 9 mM)

y de este aminoácido en combinación con la glutamina (de 0 a 25 mM). Estos autores confirmaron con datos estadísticos, que la L-prolina en combinación con las sales N6 incrementó la formación de embriones en el callo embriogénico en una relación directamente proporcional, es decir, a mayor concentración de L-prolina mayor número de embriones. Con respecto a la relación entre L-prolina y glutamina, se demostró que este segundo aminoácido también incrementa de manera significativa la formación de embriones siendo la concentración más óptima de 25 mM.

Varios investigadores han demostrado el efecto del AgNO₃ en el caso de la producción de callo tipo II y la promoción de la regeneración. Se ha demostrado que el AgNO₃ afecta la acción del etileno por competir con los sitios de unión promoviendo de esta manera el aumento en el callo tipo II y la regeneración. Además, se ha observado que afecta algunos genotipos en combinación con la auxina sintética del 2,4-D (Vain *et al*, 1989; Songstag *et al*, 1991, 1992).

b) Reguladores de crecimiento.

En 1982, Green y Rhodes obtuvieron un nuevo tipo de cultivo en maíz distinguiéndose de otros por su friabilidad, rápido crecimiento y capacidad para regenerar plantas por medio de la embriogénesis somática. Dichos cultivos se iniciaron directamente del escutelo como sectores específicos produciéndose en medio MS o N6 con la auxina 2,4-D en una concentración de 0.5-1 mg/L.

Autores como Lu *et al* (1983) también han realizado estudios con la embriogénesis somática en maíces híbridos empleando diferentes concentraciones de la auxina 2,4-D (0.25-2 mg/L). Estos autores obtuvieron resultados satisfactorios como: un porcentaje alto en la producción de callo, formación de embriones y la regeneración de éstos a plantas.

Carvalho *et al* (1997) probaron maíces adaptados en zonas tropicales para producir callo tipo II y regenerar plantas tomando en cuenta el efecto sinérgico entre DICAMBA y el AgNO₃. Obtuvieron morfotipos de callos: uno de ellos suave, friable y embebido en mucílago con muchos embriones somáticos presentándose en pocos genotipos. El otro morfotipo se presentó más friable, no mucilaginoso con pocos embriones somáticos; ambos tipos se consideraron como del tipo II bajo el argumento de ser variaciones de

callo debido a las diferencias en su etapa de desarrollo. La producción de callo tipo II se incrementó significativamente cuando la concentración de DICAMBA cambió de 15 μM a 30 μM y con la adición de AgNO_3 en el medio. Un efecto sinérgico entre AgNO_3 y DICAMBA (30 μM) se observó, lo que permitió la producción adicional de callo tipo II. El alto porcentaje de plantas regeneradas y el número de éstas por gramo de callo en cada línea mejorada, también se observó en esta combinación.

c) Explante y estado fisiológico.

Wilkinson y Thompson (1986) concluyeron que el explante (embrión inmaduro) respondió a la obtención de callo, sin embargo la regeneración a plantas fue pobre, pues cabe aclarar que solo el 16% del callo produjo plantas. Los autores enfatizaron que las condiciones del ambiente influyeron en la planta donadora haciéndose presentes en la producción del callo así como en las frecuencias de regeneración pues dichas plantas crecieron en un verano seco y caliente lo que pudo afectar la producción del callo.

Autores como Lu *et al* (1983) indican que factores como el estado fisiológico y el desarrollo del embrión son aspectos clave en la embriogénesis somática, pues embriones obtenidos de cultivares que crecieron bajo diferentes condiciones ambientales dieron diferentes respuestas.

Para Armstrong y Green (1985), la etapa de desarrollo del tejido donante constituye un factor importante en la iniciación del cultivo de tejidos regenerables, pues los embriones inmaduros son menos propensos a perder su capacidad para iniciar callos que los embriones en etapas más maduras.

Close y Ludeman (1987) emplearon como explante embriones inmaduros de varias líneas mejoradas crecidas en condiciones de invernadero. En el tejido embriogénico, en presencia de reguladores de crecimiento (auxinas), observaron masas hinchadas derivadas del escutelo con el surgimiento de numerosos embriones somáticos; estas estructuras se encontraban fusionadas en la mayoría de los casos.

Zhong *et al* (1992) propusieron como explante alternativo las puntas de los primordios de las plántulas de maíz para la obtención de primordios adventicios y embriones

somáticos. De las puntas de los primordios formaron grupos múltiples en todas las diferentes concentraciones del regulador de crecimiento. Obtuvieron la formación de 20-25 brotes por cada explante inicial y al término del subcultivo, cada primordio de plántula produjo 500 ápices.

Huang *et al* (2004), desarrollaron un sistema eficiente para regeneración de plantas a partir de embriones inmaduros. Con este sistema obtuvieron una frecuencia de inducción de callo primario desde un 28.5% hasta un 97.6% dependiendo de las concentraciones de 2,4-D, pues los índices de inducción de callo fueron relativamente mínimos a bajas concentraciones del regulador de crecimiento. La concentración de 2 mg/L de 2,4-D y 0.2 mg/L de BA fue la más efectiva con la más alta frecuencia de formación del callo embriogénico y regeneración adecuada.

d) Genotipo.

Green (1975, 1982) señaló que los genotipos A188, WF9 y ND203 fueron los más efectivos en el proceso completo desde la inducción del callo hasta la obtención de plantas a diferencias de los otros genotipos W23 y AG32 que también empleó.

Lu *et al* (1983) enfatizaron que el genotipo es considerado un factor importante en determinar la respuesta *in vitro* pues en su investigación demuestran que de los 11 cultivares que emplearon, todos dieron respuestas óptimas.

Hodges *et al* (1986) emplearon siete diferentes tipos de maíces mejorados cruzándolos con la variedad A188. Obtuvieron que en la mayoría de las líneas mejoradas, el porcentaje de embriones que produjeron plantas fue similar al porcentaje de embriones que produjeron callo. Además, de las 25 líneas mejoradas 21 produjeron plantas en baja cantidad como otras en alta eficiencia. De las cruzas con A188, algunas fueron eficientes en la formación de callo así como la regeneración. Con esos resultados, concluyeron que el genotipo es importante en la regeneración de, pues señalan que la regeneración se incrementó cuando las líneas mejoradas se cruzaron con el genotipo A188.

Tomes y Smith (1985) emplearon las líneas mejoradas B73, 639, 650, B76, 635 y A188. Se presentó una diferencia entre el genotipo A188 (con mayor respuesta) y B73 (con

menor respuesta) muestreada en cuatro diferentes tiempos. Todas las líneas mejoradas produjeron embriones inmaduros con respuesta embriogénica después de 14 días de cultivo. La línea mejorada 635 y el híbrido (entre 635 y B73) produjeron callo tipo II al igual que la línea A188 por su parte, la línea 639 presentó una respuesta intermedia y la B76 solo produjo callo no embriogénico.

Guerrero-Andrade (1998) empleó una raza de maíz mexicano, el Tuxpeño para la transformación genética, comprobando la alta capacidad embriogénica, al inducir y proliferar callo tipo II; dicho callo mostró las características propias descritas por Green (1982) obteniendo la producción de brotes y raíces. Este trabajo demuestra que no sólo las variedades mejoradas tienen capacidad embriogénica pues algunas razas de origen mexicano también lo poseen.

e) Agentes osmóticos.

Lu *et al* (1983) ensayaron diferentes concentraciones de sacarosa (3%, 6% y 12%) en maíces híbridos. Los autores resaltan la importancia de la sacarosa en la inducción del callo, pues al aumentarse la concentración de ésta (12%) incremento la formación de callo embriogénico a diferencia del regulador de crecimiento que no influyó demasiado. La formación de callo se dio en el escutelo y la coleorriza como una agrupación tisular blanca y opaca.

Para el grupo de Hodges (1986), la concentración mas alta de sacarosa influyó en ambos medios que emplearon (MS y N6) induciendo un aumento en la formación de callo embriogénico.

Close y Ludeman (1987) probaron el factor osmótico en varias líneas mejoradas de maíz. En la mayoría de los genotipos la obtención para la máxima frecuencia en la embriogénesis somática se dio con un porcentaje de 9 al 12% de sacarosa.

Emons y Kieff (1995) probaron manitol al 3% en la obtención de callo embriogénico de maíz (genotipo 4C1). El callo sin el 3% de manitol logro proliferar pero perdió su capacidad para regenerar brotes después de 6 meses y dicha capacidad se recuperó cuando se subcultivo en medio con manitol. Para el caso de este genotipo, en particular, el manitol es crucial para su posterior regeneración.

f) Incubación.

Pese a que no hay demasiados trabajos que explícitamente se refieran a este tópico como tal, se tiene que considerar que la incubación es otro factor que interviene en la embriogénesis somática del maíz. Para condiciones *in vitro*, se debe mantener una temperatura de 25-28 ± °C bajo una intensidad lumínica controlada (1.5 W/m²) en un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad (Lu *et al*, 1983).

3.2.2) Genes presentes en la embriogénesis somática de maíz.

Pese a que los mecanismos genéticos y bioquímicos de la embriogénesis somática en maíz son poco conocidos, se ha logrado identificar ciertos genes que intervienen en este proceso.

Cuadro 1. Genes presentes en la embriogénesis somática de maíz.

Nombre del gen	Familia	Sistema expresado/Localización	Referencia
ZmMADS1	MADS box de maíz	-Callo de maíz tipo II: células centrales y periféricas y en estructuras globulares en desarrollo. -Embrión somático: eje embrionario y capas celulares externas.	Heur <i>et al</i> , 2001
ZmMADS3		-Mismo patrón que el anterior pero en menor intensidad.	
ZmSERK1	RKLs	-Callo tipo II: expresión más intensa. -Callo tipo I: expresión variable. -Embrión somático: nula expresión.	Baudino <i>et al</i> , 2001
ZmSERK2		-Callo tipo I y II así como en embrión somático. La expresión es uniforme.	
Kn1	Homeobox	-Callo embriogénico: expresión nula. -Etapa globular: en el interior del embrión. -Etapa escutelar: en meristemo temprano del embrión. -Etapa coleoptilar: en meristemo del primordio.	Zhang <i>et al</i> , 2002
ZmLEC1	LEC1	-En células tempranamente embriogénicas y callo tipo II. -Etapa globular: en el embrión propiamente. -Etapa escutelar y coleoptilar: expresión débil.	

3.3) TIPOS DE CALLOS EN MAÍZ.

El callo embriogénico de maíz ha sido clasificado como tipo I y tipo II. El termino tipo I ha sido usado para describir un callo compacto, nodular y embriogénico el cual, prolifera como una mezcla de tejido complejo exhibiendo estructuras escutelares que generan embriones somáticos. Este callo es blanco y ópaco, dicha apariencia se debe al contenido de almidón (Emons y Kieft, 1995).

Del callo tipo I se pueden regenerar plantas pero, a diferencia del tipo II, no puede mantener la capacidad regenerativa por un año de tal manera que no puede ser propagado por un período de tiempo largo. La regeneración de plantas a partir de este tipo de callo se da por la germinación del embrión (Emons y Kieft, 1995). Este callo se obtiene de manera relativamente fácil a partir de embriones inmaduros y/o brotes (Fransz y Schel, 1990, 1991).

El callo tipo II es friable, embriogénico, de crecimiento rápido con la presencia de numerosos embriones somáticos globulares (cuyo desarrollo es muy similar al cigótico) adheridos al callo por medio del suspensor; de color blanco amarillento, como fue observado por Green y Rhodes (1982), mantiene su capacidad tanto embriogénica como regenerativa por periodos largos. El callo tipo II se inicia directamente del escutelo; el callo puede proliferar en toda la superficie del escutelo o bien, en otras ocasiones, únicamente en pequeños sectores (Emons y Kieft, 1993, 1995).

Desafortunadamente, el callo tipo II tiende a ser iniciado en una baja frecuencia a diferencia del callo tipo I, y sólo se ha obtenido la inducción en ciertos genotipos. La regeneración de este callo suave y de rápido crecimiento es por vía de embriones somáticos nacidos en estructuras conocidas como suspensores (Green, 1983). Se ha observado, en general, que los genotipos de zonas templadas son aptos para regenerar plantas de manera más fácil que los genotipos tropicales, pues son pocos los que han logrado producir callo tipo II y la subsiguiente regeneración a plantas (Prioli y Silva, 1989; Bohorova *et al*, 1995).

3.4) TRANSFORMACIÓN GENÉTICA.

La ingeniería genética de plantas no únicamente acelera el proceso de fitomejoramiento tradicional, sino que también permite la introducción de nuevos genes superando las barreras de la incompatibilidad sexual por la entrada de genes específicos al interior de células vegetales usando diferentes métodos de transformación. Por ello, es necesario considerar los factores que se han incluido en la transformación tanto de especies monocotiledóneas como dicotiledóneas (Vasil, 1994).

3.4.1 Promotores.

Un promotor es una secuencia específica de ADN que, como su nombre lo indica, promueve y controla la transcripción de un gen de interés (López-Meyer *et al*, 2000). Los promotores se clasifican en tres tipos como se muestra en el siguiente cuadro.

Cuadro 2. Tipos de promotores.

Promotor	Expresión	Ejemplos	Referencia
Constitutivo	En cualquier órgano de la planta: hojas, tallos, raíces, etc.	CaMV 35S y Ubiquitina de maíz	Vain <i>et al</i> , 1995
Específico	En sitios particulares (específicos) de la planta como fruto o semilla.	De la Zeína de maíz, FBPasa (cloroplasto) y rab del arroz.	Vain <i>et al</i> , 1995
Inducible	Actúan bajo ciertas condiciones ambientales y por factores fisiológicos de la planta.	α -amilasa regulado por ABA	Christou, 1995

3.4.2 Genes reporteros.

La expresión de genes reporteros puede ser demostrada dentro de las 24-48 horas después de la transferencia de genes por medio de ensayos de expresión transitoria (Fromm *et al*, 1990).

Los siguientes cuatro genes han sido usados, comúnmente, para los ensayos de expresión transitoria en cereales: a) la mayoría de los primeros trabajos se basaron en el uso del gen cloramfenicol acetiltransferasa (*cat*) que involucra radioactividad (Morrish *et al*, 1993); b) el gen de la β -glucoronidasa (*gus*) codificado por el locus *uidA* de *E. coli* que permite ser evaluado por métodos histoquímicos y en ensayos fluorométricos (Russell *et al*, 1992). Este gen es uno de los más ampliamente usados en la transformación a pesar de que el ensayo de GUS es de naturaleza destructiva (Morrish y Fromm, 1992); c) el gen de la luciferasa (*luc*) de la luciérnaga (*Photymus pyralis*) que provee quizás el ensayo más sensitivo para medir la actividad de un gen reportero (Fromm, 1990); d) el gen de la proteína verde fluorescente (*gfp*) que también ofrece una sensibilidad aunque no como el gen anterior y e) el gen R de maíz que regula la biosíntesis de la antocianina (Klein *et al*, 1993).

3.4.3 Genes de selección.

Uno de los aspectos más difíciles en la transformación de plantas es la selección y crecimiento preferencial de las células que contienen no solamente los genes introducidos en el ADN nuclear, sino también la expresión de éstos.

La mayoría de las estrategias para la selección de células transformadas esta basada en la inhibición del crecimiento de células no transformadas o de tipo silvestre sin afectar significativamente a las que sí están transformadas; es decir, se hace uso de un sistema de selección positiva, de ahí que la elección de un correcto gen de selección sea crítico para un sistema eficiente de transformación genética (Klein *et al*, 1993; Vasil, 1993, 1994).

Dos criterios importantes que se consideran en un buen gen de selección incluye: a) selección limpia y b) no tener efectos adversos en la regeneración y fertilidad de las plantas (Vain *et al*, 1995). La combinación de un buen promotor con un gen de selección resulta en un sistema de transformación eficiente en cereales (Russell *et al*, 1992). Generalmente, los genes de selección se dividen en dos grupos como se observa en el cuadro 3.

Cuadro 3. Principales genes de selección.

Gen	Resistencia a:	Procedencia	Acción	Usado en:
<i>eps</i> , <i>nptII</i> , <i>hph</i>	Antibiótico (kanamicina, neomicina, higromicina, etc).	Bacterial	Permite a las células metabolizar el agente selectivo.	Dicotiledóneas.
<i>bar</i> , <i>pat</i>	Herbicida (fosfotricina, glufosinato de amonio)	<i>Streptomyces</i> <i>hygroscopicus</i>	Desintoxicante al herbicida. Evita la acumulación de amonio perjudicial en la célula.	Monocotiledóneas.

Fuentes: Rusell *et al*, 1992; Vasil, 1994 y Christou, 1995.

3.4.4 Expresión transitoria.

Los ensayos de expresión transitoria son usados como un método rápido para demostrar la expresión del gen reportero, con resultados obtenidos entre 1-2 días después de la introducción del gen. Estos ensayos son una herramienta útil para probar la eficiencia de los diferentes promotores, pues en dichos ensayos, la mayoría del ADN transferido aparece por estar libre en el núcleo a diferencia de una transformación estable donde el ADN se encuentra integrado al cromosoma. La combinación entre acortamiento de tiempo y la alta expresión ha hecho útil al ensayo de expresión transitoria en la transformación de cereales (Fromm *et al*, 1990).

3.4.5 Técnicas de transformación.

Las gramíneas no son rutinariamente susceptibles para la transferencia de genes usando *Agrobacterium*, ya que no es un vector natural, pero su potencial agronómico de las gramíneas fue probablemente el principal incentivo para lograr la transformación genética (Morrish y Fromm, 1992). Varias tecnologías se han usado para la introducción de ADN exógeno en especies monocotiledóneas (cuadro 4) con el fin de obtener plantas transformadas y regeneradas.

Cuadro 4. Métodos de transformación genética empleados en maíz.

Método	Descripción	Ventajas	Desventajas
Micro inyección	Inyección de ADN desnudo a células vegetales con un dispositivo similar a una jeringa.	-No es costoso. -No requiere personal altamente capacitado. -Rapidez.	-No es un método confiable. -No se obtuvo la repetibilidad de resultados.
Electroporación	Introducción de material genético a través de "perforaciones" en protoplastos. Las perforaciones se realizan por medios mecánicos (choque eléctrico) o enzimáticos (PEG).	-No es un método caro. -Proceso rápido. -No requiere de un equipo elaborado. -Se puede regenerar plantas.	-Poco sencillo para la obtención de protoplastos. -Limitación de uso solo en protoplastos. -Poca versatilidad.
Silicón Carbabide	Mezcla de células (en suspensión) en medio de cultivo con fibras de silicón carbabide y ADN en constante agitación.	-No es un método caro. -No se requiere personal capacitado. -Proceso rápido y sencillo.	-Es un método impreciso. -Variables poco controladas. -Poco confiables los resultados.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Se aprovecha la capacidad natural de infección de esta bacteria. El gen de interés se liga al plásmido T-ADN permitiendo la inserción en el genoma de la célula huésped.	-Ofrece mayor estabilidad de los genes insertados. -Relativamente un proceso rápido y sencillo.	-Costoso. -Se requiere de personal calificado. -Los cereales no son del todo susceptibles a la agro infección.

Fuentes: Rusell *et al*, 1992; Morrish y Fromm, 1992; Klein *et al*, 1993 ; Christou, 1995 y Frame *et al*, 1994

La transformación genética de las especies cerealeras fue esencialmente llevada a cabo por la transferencia directa del ADN (es decir, la introducción, integración y expresión de genes extraños) al interior de protoplastos o células intactas cultivadas *in vitro* por tratamiento de polietilenglicol y electroporación. Estos métodos presentaron desventajas que los hicieron poco prácticos; de la necesidad de tener un método más óptimo es que surge la biobalística (Klein *et al*, 1993; Christou, 1995).

Esta tecnología (biobalística= biología + balística) fue concebida por Jonh Sanford en 1984. Esta técnica permite la introducción de ADN desnudo (biológicamente activo) al interior de células vegetales intactas. Esto involucra la aceleración de micropartículas cubiertas de ADN (tungsteno u oro) por un mecanismo de explosión (pistola de presión) o por estallido de gas (dióxido de carbono, nitrógeno o helio) dando la suficiente aceleración para penetrar la pared celular; esto constituye el fundamento esencial de la biobalística o bombardeo con micropartículas como también se le conoce (Klein *et al*, 1988a).

A partir de la primera publicación realizada con bombardeo de partículas, la mayoría de los principales cultivos, incluyendo las leguminosas y cereales recalcitrantes, pueden ser ahora transformados eficientemente. La biobalística revolucionó la ingeniería genética de las especies monocotiledóneas, permitiendo que la transformación pueda ser más independiente de requerimientos estrictos de cultivo *in vitro* e incluso, en ciertas situaciones, de la variedad. Hoy en día por lo menos, un genotipo de cada una de las especies principales de cereales pueden ser genéticamente transformadas (Klein *et al*, 1988b; Rusell *et al*, 1992).

Un numero de variables criticas han sido identificadas en el bombardeo de partículas que necesitan ser cuidadosamente consideradas en los ensayos de transformación por este método: estos criterios se refieren específicamente a los siguientes parámetros que se deben tener en cuenta: a) naturaleza, material y forma del proyectil, b) concentración de los proyectiles, c) concentración y adherencia del ADN a los proyectiles, d) velocidad del proyectil, e) vacío, f) aceleración y g) distancia (Klein *et al*, 1988a; Morrish y Fromm, 1992; Vasil, 1994; Christou, 1995; Vain *et al*, 1995 y Southgate *et al*, 1995).

3.5) TRANSFORMACIÓN EN MAÍZ POR BIOBALÍSTICA.

Los primeros trabajos de transformación en maíz que emplearon el bombardeo de micro partículas tuvieron el objetivo de establecer las condiciones más apropiadas para obtener plantas regeneradas, fértiles y de fenotipo normal como a continuación se expondrá.

Klein *et al* (1988a) mencionan la obtención de niveles inducidos de la actividad CAT de 20-200 veces mayor comparado con el control en células de maíz de la variedad BMS (Black Mexican Sweet); siendo detectable dicha expresión 24 horas después del bombardeo permaneciendo aun 96 horas después de la incubación. El efecto de diámetro del proyectil de 1.2 μm produjo niveles significativos de CAT. Los autores señalan que factores como: la distancia del disparador al tejido blanco, la velocidad a la que impactan las micropartículas, el grado de vacío en la cámara, el tamaño y forma de las micropartículas y el protocolo de adsorción del ADN constituyen variables que pueden ser optimizables.

Fromm *et al* (1990) bombardearon células embriogénicas de maíz con el gen *bar*, *ptt* y *gus* y seleccionaron los callos con 0.05 mg/L de PTT. Por medio de la técnica de PCR confirmaron la presencia del fragmento esperado de 490 pb correspondiente a *gus* y con una hibridación del promotor CaMV 35S se reconfirmó la identidad de la banda. La expresión positiva de *gus* se dio en 45 de las 45 plantas analizadas para la hibridación. En la generación R1 se obtuvo un 45% de la expresión del gen esperado.

Gordon-Kam *et al* (1990) transformaron dos líneas de maíz por biobalística, la SC82 y SC716 con el gen *pat*, *bar* y *gus*. Por medio de la actividad de GUS se detecto un total de 1000 focos azules a 48 horas después del bombardeo. De las líneas celulares de SC716, con los genes *pat+gus*, obtuvieron 21 callos resistentes al agente de selección (1 mg/L de bialafos) expresando todas el gen *pat*; trece de esos callos contenían copias intactas del gen. Seleccionaron 19 callos resistentes al bialafos de la línea celular SC82; diecisiete hibridaron con la sonda de *gus* presentando el fragmento esperado de 2.1 kb. Regeneraron un total de 76 plantas de la línea SC82.

Otros investigadores teniendo como base los trabajos que les han precedido, se han interesado por estudiar factores que contribuyan a estabilizar la transformación del maíz.

Vain *et al* (1993) describieron el efecto de un tratamiento osmótico en la expresión transitoria y transformación estable en células de maíz de callos embriogénicos tipo II con manitol y sorbitol. Con el pre y post tratamiento en las células embriogénicas de maíz lograron aumentar la expresión transitoria de *gus* en 2.7 veces, es decir, con un promedio de 9000 focos azules en 100 μ l de PVC (volumen de paquete celular). La concentración más adecuada que más focos azules dio fue en 0.4 y 0.6 M tanto de manitol como sorbitol. La influencia del tratamiento osmótico en la transformación estable se dio en células colocadas en medio sólido con 0.4 M de sorbitol 4 horas antes y 16 horas después del bombardeo con un incremento de 6.8 veces el número de transformantes estables obtenidas por cada 100 μ l de PVC.

Kemper *et al* (1996) propusieron la optimización de factores tanto físicos como biológicos que intervienen en la introducción de las micropartículas. Los parámetros de bombardeo más óptimos se obtuvieron con partículas de 1.0 μ m de diámetro a una distancia de 7.5 cm; sin embargo, el tamaño de la partícula no tuvo un alto índice de penetración, aunque fue menor el daño celular. La mejor presión fue de 1800 psi y el índice de transformación genética se incrementó en 2.3 veces cuando la concentración de manitol varió de 0 a 0.8 M, siendo más óptima esta última concentración.

Otras líneas de investigación se han enfocado en la introducción de genes que pueden fungir como reporteros o de selección, siendo una alternativa a los que comúnmente se emplean.

Walters *et al* (1992) transformaron callos embriogénicos de maíz de la línea A188X73 por bombardeo de partículas usando el gen de la higromicina fosfotransferasa (*hpt*). A las tres semanas de subcultivo en medio con 60 mg/L de higromicina, se observó necrosis e inhibición del crecimiento; de los sectores sanos del callo en selección se designaron como PH1, PH2 y PH3, caracterizándose por presentar un crecimiento alto. En las tres líneas de callos se observó la presencia de la banda esperada de 1.05 kb demostrando que, por lo menos, una copia intacta de la secuencia codificante estuvo presente. La segregación de *hpt* en la progenie R1 fue consistente con el ratio esperado de 1:1; en la progenie de R2 de la línea PH1, muy pocas plantas fueron resistentes a higromicina. El análisis de la progenie de la línea PH3 mostró que 17 de 28 plantas heredaron el gen consistente con el ratio de segregación esperado de 1:1 en la R1.

Spencer *et al* (1992), describieron el análisis de la herencia, expresión y estabilidad de los genes *gus* y *bar* en células de maíz. De 219 plantas se seleccionaron 36 al azar para confirmar la presencia de *bar* exhibiendo en todas estas plantas la presencia de dicho gen. De las plantas R1, a todas a las que se les aplicó el Basta® resultaron tolerantes; posteriormente se demostró la integración de este gen sin embargo, el análisis molecular de la herencia del ADN extraño mostró una transformación con (relativamente) bajo número de copias. Las plantas R2 se les analizó por medio de un ensayo fluorométrico para la detección de *gus* dando negativo en todas y con una segregación del gen *bar* en un radio de 1:1.

Register III *et al* (1994) emplearon callo tipo II del genotipo A188XB73 con los genes *nptII*, *pat* y *gus*. El análisis de Southern blot aplicado a 10 clonas del callo con *nptIII* reveló que cuatro no estaban transformadas a diferencia de los callos que contenían el gen *pat*, pues en este último no hubo escapes. De 95 plantas regeneradas, la expresión del transgen de selección *pat* fue de más del 75%, mientras que el gen *gus* se expresó en un 75% de 41 plantas regeneradas. La herencia del transgen *pat* fue consistente con el radio esperado de 1:1 en la generación T1, y en la T2, aparentemente no se heredó de manera estable, pues los radios de segregación difirieron significativamente del radio esperado.

Zhang *et al* (1996) se enfocaron en la variación de la herencia de la expresión del gen *bar* y *gus* en callo embriogénico (Hi-II). Obtuvieron una colonia que presentó una alta tinción en el ensayo de GUS y resistencia al herbicida; de esta colonia se logró regenerar 188 plantas fértiles designándose como evento BG. De una segunda colonia se regeneraron 98 plantas fértiles denominándose como evento B. El análisis de Southern blot mostró una banda de 1.87 kb (gen *gus*) y una de 0.7 kb (gen *bar*) para el evento BG; en el caso del evento B se observó una banda de 0.9 kb (gen *bar*). En BG de la T1 mostró radios esperados para *gus* (3:1) y *bar* (3:1) y en el evento B se observó el mismo radio para el gen *bar*.

Por medio de la biobalística se ha logrado la introducción de características no sólo de genes reporteros y de selección, sino también de genes que confieren resistencia a plagas y enfermedades, como lo muestra el cuadro 5.

Cuadro 5. Proteínas insecticidiales expresadas en maíz por bio balística.

Gen y/o proteína	Procedencia	Cantidad expresada en tejido	Enfermedad causal	Referencia
CryIA (b)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1000 ng/mg de proteína soluble	Gusano barrenador europeo (ECB)	Koziel <i>et al</i> , 1993
Mdmu-cp	Cepa del virus del mosaico del enanismo del maíz	100-200 ng/mg de peso fresco	Enanismo del maíz	Murry <i>et al</i> , 1993
Cry9C	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-84.8 µg/mg de proteína soluble (medula). -74.2 µg/mg de proteína soluble (epidermis y esclerenquima del tallo).	Gusano barrenador europeo (ECB)	Jansens <i>et al</i> , 1977
cryIA	<i>Bacillus thuringiensis</i>	257-457 ng/mg de proteína soluble	Gusano barrenador del maíz del sudoeste	Williams <i>et al</i> , 1997

Otros autores han propuesto diferentes explantes como blancos para realizar la transformación por medio de biobalística. Por ejemplo, Wan *et al* (1995) describieron un método de transformación de callo tipo I de largo termino; Zhong *et al* (1996) describen la eficiencia en la obtención de plantas transgenicas fértiles de maíz por bombardeo de un sistema vía multiplicación de primordios; Zhang *et al* (2002) menciona la descripción de dos nuevos métodos de transformación en líneas mejoradas y recalcitrantes de maíz. Al primer método lo designan como MPS (Método de Proliferación por Sector) y al segundo como CMPs (cultivos meristemáticos a partir del primordio); O'Connor *et al* (2002) describen el desarrollo de un método simple altamente eficiente para producir maíz de genotipos tropicales y subtropicales, por medio del bombardeo de partículas en callos organogénicos/como embrionogénicos obtenidos a partir de primordios y, por último, el grupo de Aulinger *et al* (2003) se interesaron en determinar si los embriones gaméticos, son un blanco susceptible para la transformación genética por medio de la biobalística.

3.6) VACUNAS COMESTIBLES.

El concepto de vacuna comestible fue referido por Artzen (1997) a los productos comestibles, derivados de plantas, que contienen una subunidad recombinante activa administrada oralmente con la capacidad de proteger al individuo de la enfermedad.

Desde la década de los ochentas, las herramientas de la ingeniería genética han permitido el desarrollo de plantas transgénicas que pueden expresar varias moléculas recombinantes incluyendo antígenos virales y bacterianos, anticuerpos y varias proteínas terapéuticas tanto para animales como humanos (Korban, 2002). Los productos farmacéuticos derivados de plantas pueden ser categorizados en tres tipos: a) anticuerpos, b) biofarmacéuticos y c) vacunas.

3.6.1 Vacunas comestibles en plantas.

Varias estrategias básicas han sido usadas para producir proteínas recombinantes en plantas hospederas como se aprecia en el cuadro 6.

Cuadro 6. Comparación de estrategias para la producción de proteínas heterologas en plantas.

Estrategia	Fundamento	Ventajas	Desventajas	Tipo de expresión
Virus recombinantes	El empleo de virus diseñados como TMV o CPMV	-Producción de cantidades relativamente grandes. -Labor menos intensa. -Menor tiempo de inversión.	-Requiere de inoculación cada vez que se desee expresar la proteína. -No se hereda el transgen de interés. -Se requiere la purificación del virus previa inoculación.	Transitoria.
Transformación en núcleo	Por medio de vectores naturales como <i>Agrobacterium</i> o biobalística	-No requiere inoculación. -Producción de niveles constantes de proteína. -Escalabilidad en la producción. -El transgen se hereda.	-Es una labor intensa. -Requiere de mayor inversión de tiempo (6-8 meses). -Uso de equipo costoso.	Permanente
Transformación en cloroplasto	Integración del transgen de interés en el genoma del cloroplasto.	-Alta producción de proteína. -Se necesita precisar el sitio de integración.	-No provee de muchas de las modificaciones post-traduccionales.	

		-Elimina la variabilidad en la expresión del gen. -Disminuye el silenciamiento.	-Se necesita de la purificación de las proteínas. -Mayor inversión de tiempo y costos.
Magno infección	Combina el uso de virus "desconstruidos" con un vector natural como <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	-Producción rápida. -Ofrece niveles altos de expresión. -Facilidad de mantener y escalar la producción.	-Limitación en la producción de proteínas olido méritas y de proteínas con tamaños superiores a 2,3 kb.

Fuentes: Mason y Artzen, 1995; Artzen, 1997; Miele, 1997; Giddings et al, 2000; Walmsley y Artzen, 2000; Sala et al, 2003; Fisher et al, 2004; Malaga et al, 2004 y Gleba et al, 2005.

La selección del cultivo es punto importante en vacunas comestibles, pues algunos pueden ser consumidos en crudo y otros procesados (Langridge, 2000; Daniell et al, 2001). Además, cabe mencionar que cada tipo de planta posee su propio reto (cuadro 7) ofreciendo ventajas y desventajas para la elaboración de una vacuna comestible (Twyaman et al, 2003).

Cuadro 7. Plantas potenciales para la producción de vacunas comestibles.

Planta	Ventajas	Desventajas
Tabaco	-Suministro de biomasa fácilmente mantenida. -Sistema de transformación eficiente y fácil. -Abundante material para la caracterización proteica.	-Alcaloides tóxicos incompatibles para la liberación oral. -Potencial para el entrecruzamiento en campo.
Papa	-Sistema de transformación eficiente y fácil. -El tubérculo se puede comer crudo. -Disponibilidad de promotores específicos para tubérculo. -Producción de microtubérculos por ensayos rápidos. -Crecimiento en suelo del tubérculo en 6 meses después de la infección con <i>Agrobacterium</i> . -Propagado por clonación y bajo potencial para el entrecruce en campo. -El procesamiento industrial de tubérculos bien establecido.	-Relativamente bajo contenido de proteína en el tubérculo. -Poco agradable si se come crudo y cocinado puede causar la desnaturalización y pobre inmunidad de la proteína recombinante.
Jitomate	-Sistema de transformación relativamente eficiente. -El fruto se come crudo. -Promotores específicos del fruto disponibles. -Bajo potencial de entrecruzamiento en campo, pero cruza posible por apilamiento de genes para antígenos.	-Relativamente bajo contenido de proteína en el fruto. -El fruto ácido puede ser incompatible con algunos antígenos o para el consumo en niños. -No hay sistema <i>in vitro</i> para la prueba de expresión del fruto.

	-Cultivo industrial en invernadero e industrial de alta producción bien establecido.	
Plátano	-Cultivado ampliamente en países en desarrollo donde las vacunas son necesarias. -Se consume crudo por niños y adultos. -Clonalmente propagado, bajo potencial para entrecruza en campo. -Una vez establecido es un fruto abundante y no costoso; disponible en un ciclo de 10-12 meses.	-Sistema de transformación ineficiente. -Pocos datos disponibles en la expresión del gen, especialmente para promotores específicos de fruto. -Se requiere mucho espacio para su cultivo: muy caro en invernadero.
Leguminosas o cereales	-Tecnología de producción ampliamente establecida. -Alto contenido de proteína en semillas. -La proteína está estable almacenada en semilla. -Puede ser el mejor sistema para vacunas animales. -Procesamiento industrial de la semilla bien establecido.	-Para algunas especies el sistema de transformación es ineficiente. -El calor o la cocción para consumo humano puede causar desnaturalización y pobre inmunidad de la proteína recombinante (la harina de maíz es la excepción). -Potencial de entrecruzamiento en campo para algunas especies.
Alfalfa	-Sistema de transformación relativamente eficiente. -Alto contenido de proteína en hojas. -La hoja es comestible sin cocinar. -Procesamiento industrial del fruto bien establecido.	-Potencial de entrecruzamiento en campo. -El sistema de raíces profundas es problemático para la limpieza del campo.

Fuente: Mason *et al*, 2002.

Se deben considerar tres puntos clave para la efectividad de una vacuna comestible: 1) el sistema de expresión debe producir proteínas que sean antigénicas (es decir, que sean reconocidas por los anticuerpos del huésped en respuesta a un desafío); 2) las proteínas deben de ser inmunogénicas (es decir, que puedan inducir la producción de anticuerpos cuando sean empleadas para inmunización) y 3) lo más importante es que las vacunas comestibles deben proteger al huésped de retos subsecuentes con los agentes que causan la enfermedad (Arntzen, 1997).

3.6.2 Vacunas comestibles y el sistema inmune de mucosas.

Las vacunas que son efectivas contra las infecciones deben estimular el sistema inmune de las mucosas para producir IgA en las superficies de mucosas, así como en el epitelio respiratorio y de los intestinos. En general, una respuesta inmune mucosal es llevada mas

efectivamente por vía oral más que parental (Mason *et al*, 2002). Esto indica que las diferentes estrategias de inmunización presentan diversas características (cuadro 8).

Cuadro 8. Comparación entre el sistema de liberación nasal, oral y parental en vacunas.

	Parental	Nasal	Oral
Liberación	Inyección (requiere de personal medico entrenado).	Aparato de liberación.	Simple ingestión.
Riesgo de liberación	Posible transmisión de infección por agujas y jeringas contaminadas.	Mínima, no requiere de agujas y jeringas.	Mínima, no requiere de agujas y jeringas.
Sistema de liberación/adyuvante	Alum es el más usado para una variedad efectiva de sistemas.	Requiere adyuvante mucosal.	Requiere un potente adyuvante mucosal.
Dosis de antígeno requerida	Baja.	Media (la transferencia efectiva a través del epitelio nasal es aumentada por la bioadhesividad).	Alta (digestión y toma ineficiente en el tracto gastrointestinal; parcialmente superada por encapsulación).
Respuesta inmune	Anticuerpos sistémicos y células T.	Anticuerpos sistémicos, mucosales y células T; pueden inducir tolerancia.	Anticuerpos sistémicos, mucosales y células T; pueden inducir tolerancia.
Eficacia protectora	Varias enfermedades virales, bacterianas y parasíticas en animales y humanos.	Varias enfermedades virales y bacterianas en animales.	Un pequeño numero de enfermedades virales y bacterianas (vacunas de subunidad).
Uso clínico	Extensivo.	Limitado.	Limitado a pruebas clínicas de subunidad pero de uso extensivo en vacunas atenuadas.
Seguridad	No hay problemas mayores con las vacunas de subunidad; efecto de medio a serio con vacunas hechas de microorganismos muertos o atenuados.	Desconocido, evidencia de transferencia de antígeno a tejido neuronal vía bulbo olfatorio en ratones.	Considerado por ser la ruta mas segura de un sistema de liberación en vacunas.

Fuente: Ryan *et al*, 2001.

3.6.3 Ventajas y desventajas de las vacunas comestibles.

A continuación se enumeran las ventajas y desventajas más importantes de las vacunas comestibles (cuadro 9).

Cuadro 9. Ventajas y desventajas de las vacunas comestibles.

Ventajas	Desventajas
Administración vía oral.	La posible degradación de los antígenos en el tracto gastro-intestinal.
El alimento puede estar crudo o en polvo. No es necesaria una "cadena fría" para la transportación.	El tamaño de dosis necesario para inducir la respuesta inmune necesaria.
La manipulación genética es fácil. Posee un sistema de expresión optimizada.	El sometimiento del material vegetal a procesos de cocción para poder ser consumido.
Elimina el riesgo de contaminación con patógenos de mamíferos, por lo que ofrece mayor seguridad que las vacunas oficiales.	La pobre respuesta inmunogénica que puedan provocar.
Estimula la respuesta inmune en mucosas.	La posible inducción a la tolerancia.
La producción de exhalación es relativamente fácil y se puede planear. Ofrece una eficiencia en el costo.	La producción de las proteínas recombinantes aún es baja.
Ideal para el uso veterinario.	La aceptación pública por considerar a las vacunas comestibles como Organismos Genéticamente Modificados (OGM).

Fuentes: Artzen, 1997 y 2000; Langridge, 2000; Walmsley y Artzen, 2000; Daniell *et al*, 2001; Sala *et al*, 2003; Rigano *et al*, 2003; Twyman *et al*, 2003; Warzecha y Mason, 2003; y Gleba *et al*, 2005.

3.6.4 Ejemplos de diseño de vacunas comestibles.

El maíz es una planta modelo que se ha probado para el establecimiento de vacunas comestibles y ejemplos de ello están los siguientes:

Guerrero-Andrade (2000) expresó las glicoproteínas antigénicas de la Hemaglutinina-Neuraminidasa y de la proteína de fusión del virus de la enfermedad aviar del Newcastle patotipo La Sota en callo de maíz empleando el bombardeo de partículas. Obtuvo los vectores de expresión en plantas con la proteína de fusión; la expresión transitoria se presentó en un nivel adecuado y, a pesar de que se mantuvieron los callos embriogénicos en selección (con higromicina) no se logró recuperar plantas completas presentándose sólo brotes y raíces.

Streatfield *et al* (2001) expresaron la proteína S del TGEV probándola en lechones alimentados con 50 g de maíz transgénico. Estos autores mencionan que el grupo control (lechones alimentados con maíz silvestre) desarrollaron los síntomas clínicos de la gastroenteritis transmisible de cerdo (TGE) cuando fueron retados con el virus, en cambio, el 50% de aquellos que recibieron maíz transgénico inhibieron los síntomas. Recalcan que el 78% de los lechones que recibieron la vacuna comercial modificada, desarrollaron los síntomas de la enfermedad, enfatizando que la vacuna comestible en maíz transgénico fue más efectiva.

Streatfield *et al* (2003) evaluaron la acumulación del receptor de unión de la subunidad B de la toxina lábil al calor (Lt) de *E. coli* en maíz como un sistema de producción para una vacuna oral. Los resultados más importantes que obtuvieron fueron la acumulación de Lt-B en una producción por arriba del 1.8% de proteína soluble total de las semillas en la primera generación. Las más alta acumulación de Lt-B se semillas T1 la observaron gracias al empleo de una señal blanco para vacuola con niveles que alcanzaron el 12% de la proteína soluble total.

Lamphear *et al* (2004) se enfocaron en el desarrollo de una vacuna comestible contra la enfermedad del TGEV expresada en semillas de maíz. Como resultados más importantes obtuvieron la cantidad de 13 mg/kg del antígeno (S) en semilla; se presentó una diferencia significativa entre el grupo control y el experimental (con 26 mg del antígeno) en cuanto a títulos de neutralización estando aumentados en estos últimos. Los animales que recibieron la vacuna comercial respondieron en niveles casi idénticos a los animales que comieron el maíz transgénico. Por último, el grupo tratado con la vacuna de maíz, con un intensificador, presentaron niveles de anticuerpos de neutralización más altos que los grupos tratados con la vacuna comercial y el placebo, mostrando también, niveles similares de este tipo de anticuerpos en el calostro y la leche de tipo IgA e IgG.

Tacket *et al* (2004) determinaron la respuesta inmune en suero/mucosas en pacientes que consumieron harina de maíz transgénica con el gen de la subunidad B (Lt-B) de *E. coli*. Al grupo control se le administro 21 g de harina de maíz silvestre y al experimental 2.1 mg de harina LT-B. La vacuna de harina de maiz transgénico fue bien tolerada por los voluntarios, pues siete (78%) de los nueve incrementaron, por lo menos, cuatro veces el nivel de IgG en suero anti-LT después de la vacunación (segunda o tercera dosis) y cuatro (44%) de los nueve, incrementaron cuatro veces el nivel de IgA en el suero anti-LT. Aunado a lo anterior, siete (78%) de los voluntarios desarrollaron IgA e IgG específicos de células secretoras de antígenos y, finalmente, cuatro (44%) voluntarios desarrollaron concentraciones con un incremento de cuatro veces de sIgA en las muestras de deposiciones.

3.7) RABIA.

3.7.1 Familia Rhabdoviridae.

La familia Rhabdoviridae, que incluye al virus de la rabia, comprende una centena de virus de mamíferos, peces, crustáceos, reptiles y plantas. Los rhabdovirus que infectan a mamíferos pertenecen a tres géneros: a) Vesiculovirus (prototipo: virus de la estomatitis vesiculosa, VSV); b) Lyssavirus (prototipo: virus de la rabia) y c) Ephemerovirus (prototipo: virus de la fiebre efímera bovina) (Loza *et al*, 1998).

3.7.2 Distribución del virus de rabia.

En el genero Lyssavirus, el análisis de las secuencias del genoma viral ha permitido definir 7 genotipos. El genotipo 1 comprende todas las cepas de virus rabico (rabia silvestre, rabia urbana, las cepas de rabia fijas y las cepas vacunales). Este genotipo es cosmopolita excepto en Reino Unido, Irlanda, Nueva Zelanda, Japón, Hawaii, Antártica y Escandinavia.

Los otros genotipos son considerados como virus emparentados con la rabia como: Lagos Bat (genotipo 2; Nigeria, Republica Centroafricana, Zimbabwe, guinea, Senegal y Etiopia); Mokola (genotipo 3; Nigeria, Republica Centroafricana, Zimbabwe, Camerún y Etiopia); Duvenhage (genotipo 4; África del Sur y Zimbabwe); EBL1 (genotipo 5; Europa); EBL2 (genotipo 6; Europa) y ABLV 7 (genotipo 7; Australia).

www.pasteur.fr/recherche/rage/rhab).

3.7.3 Características del virus de rabia.

El virus de la rabia tiene una longitud promedio de 180 nm (130-250 nm) y el diámetro promedio es de 75 nm (60-110 nm). Su genoma es de ARN de una sola cadena de polaridad negativa con forma de bala, su esqueleto esta constituido por una nucleocapside helicoidal (NC) o centro de ribonucleoproteína (RNP) y cinco proteínas estructurales que son: proteína de la nucleocapside (N), fosfoproteínas (P, M1 o NS), proteínas de la matriz (M o M2), glicoproteína (G) y ARN polimerasa dependiente del ARN o proteína grande (L) (Loza-Rubio *et al*, 1998).

3.7.4 Biología molecular de las proteínas del virus de rabia.

-*Proteína de la Nucleocapside (N)*. Contiene 450 aminoácidos y un peso molecular de 5700 Da aproximadamente. Es el principal componente del virus y la principal proteína del NC interno helicoidal (RNP) siendo la más conservada de los componentes virales. Participa en la encapsidación del genoma de ARN y funge de protección del molde de ARN de la actividad de ribonucleasas. Interviene en la regulación de la transcripción del ARN y modulación de este proceso así como la replicación viral (Kissi *et al*, 1995). La proteína N es la segunda proteína más analizada del virus de rabia (después de G) con respecto a su estructura antigénica e inmunogénica; este interés radica en el hecho de que el centro RNP induce una inmunidad protectora contra un reto letal del virus de rabia en animales (Loza-Rubio, 2003).

-*Fosfoproteínas (P, M1 o NS)*. La proteína P es multifuncional en su interacción con N y un componente clave del complejo ARN polimerasa asociada al virión como una proteína reguladora en la replicación del genoma viral. También participa como un estabilizador de la proteína L y para colocar el complejo de la polimerasa en el molde de ARN (Gigant *et al*, 2000).

-*Proteína grande (L)*. Esta proteína está codificada por el quinto gen con un peso promedio de 244 kDa. La proteína L es el componente catalítico del complejo polimerasa y con el cofactor no catalítico, P es responsable de la mayoría de las actividades catalíticas involucradas en los procesos de transcripción y replicación del ARN viral (Poch *et al*, 1990).

-*Proteína matriz (M)*. La proteína M está codificada por 202 aminoácidos con un peso de 25 kDa formando una vaina alrededor del centro RNP en el virión ensamblado produciendo la estructura del esqueleto mismo. También es una proteína multifuncional que interactúa con proteínas virales y componentes de la membrana celular; otras de sus funciones incluyen la subregulación de la transcripción del ARN viral, condensación del centro NC helicoidal a espirales plegadas fuertemente, asociación de la bicapa lipídica e involucramiento de la citopatogénesis de células infectadas (Ito *et al*, 1996).

-*Glicoproteína (G)*. La proteína madura de todas las cepas del virus de rabia examinadas constan de 505 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 65 kDa. La

proteína G, la cual forma púas triméricas que se extienden a 8.3 nm de la superficie del virus, es la única proteína de superficie del virus. Cada proteína G es anclada de la púa en la envoltura viral por un dominio transmembranal (TM) de 22 amino ácidos (Gaudin *et al*, 1992). La proteína G es una proteína de fusión que media la entrada del virus a la célula huésped; seguido de su unión al receptor(es) blanco(s) de la célula huésped, el virus es internalizado y las púas de la proteína G se fusionan con la membrana endosomal en un proceso dependiente de pH bajo.

La proteína G del virus de rabia es de gran importancia inmunológica para la inducción de la respuesta inmune del hospedero contra la infección viral porque es, probablemente, el antígeno del virus de rabia más extensamente estudiado. La proteína G induce VNA específicos de epitopes lineares y conformacionales además de estimular tanto la actividad de células T citotóxicas como cooperadoras (Benmansour *et al*, 1991).

3.7.5 Fases de la enfermedad de rabia.

a) Sin signos evidentes. La primera fase con frecuencia pasa inadvertida, pero se pueden notar signos sutiles como: cambio de comportamiento, fiebre, reflejos lentos así como lamidas constantes en el sitio de la mordida en caso de mamíferos cuadrúpedos; b) Furiosa. El sistema nervioso central ya es invadido; se presentan signos de comportamiento errático, como irritabilidad, inquietud, agresión por episodios, ataques a objetos inanimados, gruñidos inexplicables, fotofobia y comportamiento sexual anormal. También puede desarrollar desorientación y convulsiones y c) Paralítica. Se desarrolla parálisis que afecta primero a la extremidad mordida, luego la laringe seguido de problemas para respirar y parálisis en la mandíbula que se presenta caída, lo que provocara un exceso de salivación.

www.drscope.com

3.7.6 Rabia bovina paralítica.

-*Distribución de la rabia paralítica bovina en México.* Esta enfermedad se presenta actualmente en 23 entidades federativas, existiendo dos estados más en riesgo por tener poblaciones de vampiros: Querétaro y Guanajuato. La distribución de los brotes de rabia bovina paralítica coincide con el hábitat de las poblaciones de Desmodus rotundus que comprende principalmente: la vertiente del Pacífico desde Sonora y sur de Chihuahua

hasta Chiapas y la costa del Golfo de México y del Caribe, desde el sur de Tamaulipas hasta la Península de Yucatán (Dominguez, 2004).

-*Aspectos del reservorio.* El principal vector es el murciélago hematófago Desmodus rotundus. Esta especie se alimenta principalmente de mamíferos domésticos, como el ganado y ocasionalmente de mamíferos silvestres y aves (Selem y Chab, 1997).

-*Transmisión del virus.* Se transmite en dos modalidades a) de murciélago a murciélago por medio del alimento y la orina y b) del murciélago a otros animales; en este caso, la transmisión se efectúa por la preferencia de beber sangre del ganado bovino mordiendo a sus víctimas en los hombros, espalda, base de los cuernos, orejas, patas, pezuñas y región anal (Escobar, 2004).

-*Síntomas de la enfermedad.* El período de incubación es largo, abarca de 25 a 150 días en donde el animal infectado manifiesta: alteraciones de la conducta como ansiedad, deja de comer y beber, presenta taquicardia, fiebre, sialorrea, se exagera la conducta sexual, trastornos sensoriales como fotofobia, lagrimeo, puede presentar una fase furiosa o embestir a otros bovinos, trastornos esfinterianos, se produce parálisis que inicia en las extremidades posteriores (derrengue). El período sintomático lógico dura de 2 a 5 días y, finalmente, el animal sufre de apnea (parálisis de los músculos respiratorios) y muere.

(www.fmvz.unam.mx).

-*Pérdidas económicas.* El murciélago hematófago, al ser la especie mas abundante de nuestro país (en la región tropical) y al alimentarse preferentemente de animales domésticos, es el responsable de grandes perdidas en la ganadería, ya sea directamente a través de la transmisión de la enfermedad o indirectamente al debilitar al animal por la continua pérdida de sangre y la subsiguiente infección de las heridas que constituyen una puerta de entrada al gusano barrenador (Selem y Chab, 1997). Se estima que anualmente mueren entre 15 y 20 mil bovinos a causa de la enfermedad de la rabia, con una población de bovinos en riesgo superior a los 10 millones de cabezas de ganado (Dominguez, 2004).

-*Control de la enfermedad.* Los procedimientos principales de control consisten en vacunar al ganado en las áreas expuestas y en reducir la población de murciélagos. Se disponen de vacunas producidas con la cepa ERA, Fluir HEP preparada en embrión de

pollo, la CRL y PV-BHK-EL con coadyuvante de hidróxido de aluminio que protegen por más de un año. En México, también, se emplea la vacuna de la cepa Acatlán, preparada en cultivo tisular de células de vampiro.

(www.uanl.mx/html).

3.7.7 Vacunas antirrábicas.

Aunque se ha logrado un progreso considerable en la producción y empleo de las vacunas antirrábicas, en el último decenio sin embargo, la disponibilidad de este tipo de vacunas de un nivel alto de inmunogenicidad e inocuidad sigue siendo un objetivo no alcanzado aún en muchas regiones, pues se desea que las vacunas preparadas en cultivos celulares se remplacen por las de subunidad.

(www.sanofipasteur.com.mx/html).

Para la obtención de vacunas contra la rabia se han reconocido tres grupos de manera general (cuadro 10).

Cuadro 10. Vacunas anti rabicas aplicadas a animales.

Tipo de vacuna	Procedencia
Vacunas de tejido nervioso	Se obtiene a través de encéfalos de ovejas y ratones recién nacidos. Conserva trazas de mielina.
Vacunas de virus vivos modificados	Son obtenidas por variaciones derivadas del virus SAD original: ERA, SAD-BERN, SAD-B-19 y Vnukovo-32. Presentan el riesgo de inducir la enfermedad.
Vacunas recombinantes	Se obtienen por técnicas moleculares donde el gen de la proteína G es empleado como inmunogeno no requiriendo el virus completo. Este tipo de vacunas no contienen la capacidad patogénica residual.

Fuente: www.unm-edu.htm; www.weim.net.htm.

3.7.8 Vacunas orales de rabia derivadas de plantas.

Con respecto a este tópico se expondrán los siguientes trabajos realizados en dicha materia.

Yusibov *et al* (1997) emplearon un péptido antigénico del virus de rabia (epitope Drg24) y el epitope de la célula T de la nucleoproteína de rabia (31D) y del VIH-1 expresados en hojas de tabaco. Obtuvieron la producción de proteínas en las plantas de tabaco. Catorce días después de la última inoculación con CPDrg24, se presentaron altos títulos de anticuerpos específicos de rabia detectados por ELISA en el suero de los ratones inoculados. Demostraron que el antígeno de virus de rabia producido en plantas indujo una respuesta inmune en ratones, pues el suero de los ratones neutralizó el virus de rabia de la cepa CVS-11 en condiciones *in vitro*. En un suero con una dilución de 1:160, la neutralización fue en promedio del 90% comparado con el suero del grupo control que no tuvo ninguna actividad.

Modelska *et al* (1998) inmunizaron ratones vía parental y oral con un péptido quimérico del virus de rabia (CPDrg 24) expresado en hojas de espinaca. Los títulos de anticuerpos específicos de rabia en suero de ratones inmunizados con CPDrg 24 fueron tres veces más altos con respecto al control. Las muestras del presentaron actividad neutralizante contra el virus de rabia (cepa CVS-11; 165 DS±11.7) con respecto al suero control que no demostró tener esta actividad. Estos resultados son en ratones inmunizados vía parental.

En ratones inmunizados por vía gástrica (intubación) se detectó la presencia de IgA e IgG específicos para rabia siendo 2 veces mayor la respuesta en ratones experimentales que en el suero control. En otro grupo inmunizado por vía gástrica (alimentados con hoja de espinaca) produjo una respuesta 2.8 veces más alta de IgA en muestras fecales que el control; además, tuvo una alta respuesta inmune con respecto a la intubación gástrica. Por último, los ratones inmunizados por intubación gástrica y los alimentados con hoja de espinaca se les infectó con virus de rabia (cepa CVS-F3). Todos los ratones de ambos grupos mostraron señales de enfermedad y, en promedio, una pérdida de peso; sin embargo, los que comieron espinaca recuperaron su peso original (90-95%) en comparación al control (79-81%).

Yusibov *et al* (2002) inmunizaron ratones con la proteína G y N expresados en tres sistemas: *N. tabacum*, *N. benthamiana* y espinaca. Los voluntarios fueron alimentados con hoja cruda de espinaca y los ratones se les inmunizó con una dosis de 35 µg del péptido quimérico. Los ratones inmunizados con las partículas, en 9 de 10 muestras de suero, mostraron la presencia de anticuerpos neutralizantes de rabia sobreviviendo al reto con el virus en comparación al grupo control donde sobrevivieron 2 de 10 ratones.

Tres de los cinco voluntarios alimentados con espinaca, mostraron un incremento significativo con niveles altos de anticuerpos específicos a rabia con respecto al grupo control y, presentaron niveles de IgG específicos para rabia en el suero. A 9 voluntarios se les administró 150 g de espinaca cruda y otros 5 voluntarios recibieron espinaca sin antígeno y administrándoseles una dosis de vacuna comercial de rabia (después de la tercera dosis de espinaca); con este ensayo mostraron que 6 de los 9 voluntarios que ingirieron la espinaca transgénica, presentaron elevaciones significativas en anticuerpos específicos para el virus de rabia. Cuatro de los 9 voluntarios produjeron IgG específico de rabia y tres produjeron IgA con la misma especificidad.

4) JUSTIFICACIÓN.

En México, la rabia bovina paralítica es una enfermedad producida por el virus de rabia transmitido por el murciélago vampiro *Desmodus rotundus* causando pérdidas económicas significativas (Selem y Chab, 1997; Domínguez, 2004). La proteína G de este virus ha sido el componente estructural viral mas estudiado (Nakahara *et al*, 2003), siendo responsable de la producción de anticuerpos neutrales a virus (Dietzschold *et al*, 1990) y de estimular las células T del sistema inmune (Gaudin *et al*, 1992). La producción de una vacuna comestible contra esta enfermedad en maíz, ofrecería ventajas económicas, de distribución y administración importantes en comparación a una de tipo tradicional (Artzen, 1997, Langridge, 2000; Walmsley y Artzen, 2000; Sala *et al*, 2003; Rigano *et al*, 2003; Twyaman *et al*, 2003; Warzecha y Mason, 2003 y Warzecha *et al*, 2003) además, el hecho de que la proteína antigénica (proteína G) se exprese en tejido vegetal, que constituye una proporción principal de la dieta en bovinos, la exenta de tratamientos de calor y presión (Daniell *et al*, 2001), administrándose como una fuente directa de alimento (Grando *et al*, 2005).

5) OBJETIVOS.

5.1) OBJETIVO GENERAL.

- Obtener plantas transgénicas de maíz a partir de callos embriogénicos co-bombardeados con el gen de la glicoproteína del virus de la rabia y genes reporteros y de selección.

5.2) OBJETIVOS PARTICULARES.

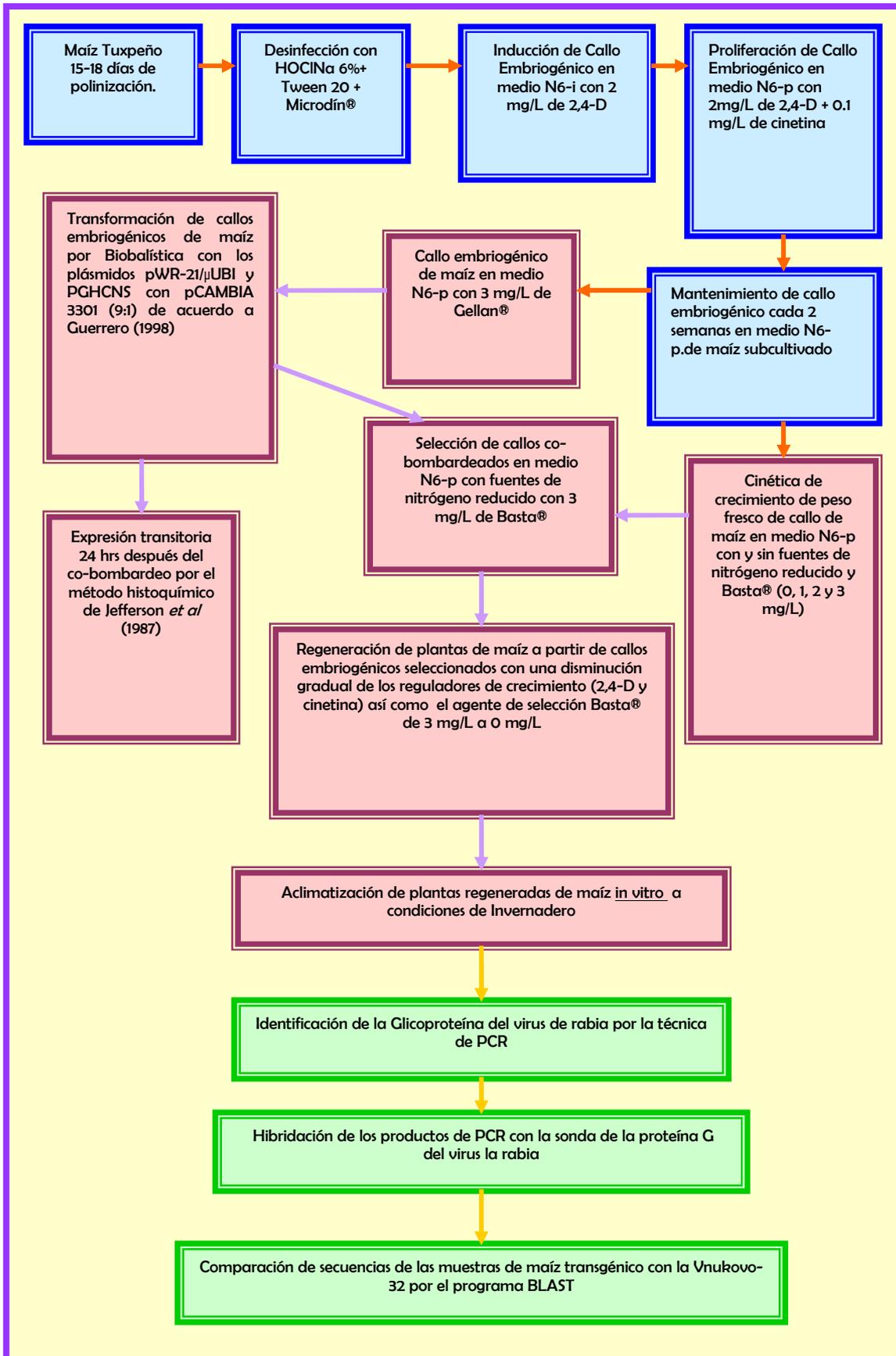
- Establecer la inducción de callos embriogénicos de maíz (*Zea mays* L.) de la raza Tuxpeño a partir de embrión inmaduro así como su proliferación y mantenimiento.
- Seleccionar la concentración óptima del herbicida Basta® (glufosinato de amonio) por medio de la cinética de crecimiento de callos embriogénicos de maíz en medio N6-p con y sin fuentes de nitrógeno reducido para la posterior selección de callos transformados.
- Transformar callos embriogénicos de maíz por co-bombardeo con los genes de la glicoproteína del virus de la rabia (gen de interés), *gus* (gen reportero) y *bar* (gen de selección).
- Realizar expresión transitoria, por el método histoquímico de GUS (Jefferson, 1987), a callos embriogénicos transformados.
- Seleccionar los callos embriogénicos transformados con la concentración óptima del herbicida Basta® (glufosinato de amonio) en medio con y sin fuentes de nitrógeno reducido.
- Regenerar plantas de maíz establecidas bajo condiciones de invernadero.
- Verificar la inserción del gen de la glicoproteína del virus de rabia por medio de la técnica de PCR.

6) HIPÓTESIS.

El bombardeo de partículas permite la penetración de ADN exógeno al interior de la célula por medio de la introducción de partículas cubiertas con material genético. Si la incorporación del ADN exógeno se realiza en callos embriogénicos cuyas células están en constante división mitótica y su ADN se encuentra descondensado, entonces se facilitará la inserción del transgen de interés en el genoma nuclear vegetal y se podrá obtener plantas transgénicas en las que se exprese dicho transgen.

7) MATERIALES Y MÉTODOS.

La metodología para llevar a cabo el objetivo general se llevó de la siguiente manera.



7.1 Material biológico.

Se utilizaron embriones inmaduros de maíz (*Zea mays* L. raza tuxpeño) de 15 a 18 días después de la polinización, proporcionados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) del Campo Experimental "Zacatepec".

7.2 Preparación de medios de cultivo.

Los medios de cultivo de inducción y proliferación se prepararon a partir de soluciones concentradas 100 X de sales inorgánicas del medio N_{6-i} y N_{6-p} (Chu *et al*, 1975); suplementado con 30 gL⁻¹ de sacarosa (Research Organic; Ohio, USA) como fuente de carbono, caseína hidrolizada (Phytotechnology Lab; KS, USA) 200 mgL⁻¹, L-prolina (Research Organic; Ohio, USA) 2.76 gL⁻¹ y adenina sulfatada (Sigma Chemical; MO, USA) así como una mezcla de aminoácidos y vitaminas (patente en trámite). Como reguladores de crecimiento se utilizó la auxina 2,4-D (Sigma Chemical; MO, USA) a una concentración de 2 mgL⁻¹ para el medio de inducción (N_{6-i}) y proliferación (N_{6-p}). En el caso de éste último medio, se mantuvo la misma concentración pero, además, se le adicionó cinetina (Sigma Chemical; MO, USA) a una concentración de 0.1 mgL⁻¹. El pH se ajustó antes de la esterilización con hidróxido de sodio (NaOH) (J. T. Baker, Edo. de México, México) 1 N ó ácido clorhídrico (HCl) (J. T. Baker, Edo. de México, México) 1 N a 5.7; como agente gelificante se utilizó 2.7 gL⁻¹ de gellan (Research Organic; Ohio, USA). Finalmente los medios se esterilizaron en autoclave vertical a una presión de 1.3 Kg/cm² y/o 18 lb/pulg.² durante 18 minutos.

7.3 Método de esterilización.

1. Las mazorcas se dividieron en fragmentos de 6 a 8 cm eliminándose los extremos tanto superior como inferior.
2. Los fragmentos se colocaron en alcohol al 70% durante 1 minuto.
3. Transcurrido este tiempo se enjuagaron 4 veces con agua desionizada estéril.
4. Posteriormente se colocaron en una mezcla desinfectante que consistió de hipoclorito de sodio (blanqueador comercial con 6% de ingrediente activo) al 50% (v/v) mas 5 gotas de un detergente suave (Tween-20) (Research Organic; Ohio, USA) mas 15 gotas de una solución coloidal de plata (Microdín®) por cada 250 ml, respectivamente.
5. Los fragmentos se mantuvieron en dicha mezcla durante 15 minutos en agitación constante.

6. Finalmente, se realizaron 4 enjuagues de 4 minutos cada uno con agua desionizada estéril.

7.4 Inducción de callo embriogénico de maíz.

A partir de los fragmentos de la mazorca desinfectadas se disectaron los embriones inmaduros inoculando frascos de alimento infantil con 30 ml de medio nutritivo N₆-inducción. Los embriones se colocaron con el eje embrionario en contacto al medio y se mantuvieron durante dos semanas en un cuarto de incubación con ambiente controlado en condiciones de oscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$.

7.5 Proliferación de callo embriogénico y mantenimiento.

Los callos se proliferaron en el medio de cultivo N₆ al cual se le agregó 0.1 mgL^{-1} de cinetina (Sigma Chemical; MO, USA). En la auxina al igual que los otros componentes no se cambiaron y se realizaron dos subcultivos. En el primero se eliminó tanto el tejido madre como el oxidado y en el segundo únicamente el callo que presentara oxidación. Los subcultivos se realizaron cada dos semanas.

Para el mantenimiento del callo embriogénico, éste se subcultivó cada dos semanas en medio N₆ de proliferación en condiciones de oscuridad y temperatura controlada.

7.6 Cinética de crecimiento de callo embriogénico de maíz en presencia del herbicida Basta®.

Se realizaron dos ensayos con y sin fuentes de nitrógeno reducido en presencia de cuatro concentraciones de Basta®.

Ensayo 1.

1. Se preparó 800 ml de medio N₆-p conservando la cantidad de adenina y la mezcla de aminoácidos y vitaminas los cuales constituyeron las fuentes de nitrógeno reducido (de acuerdo a lo especificado en el apartado 7.2 de esta sección).

2. El medio se dividió en cuatro recipientes correspondiéndoles la cantidad de 200 ml a cada uno y se esterilizó de acuerdo al apartado 7.2 de esta sección.

3. A cada recipiente, en condiciones de esterilidad, se le adicionó una cantidad específica de glufosinato de amonio (ingrediente activo del Basta®) (Sigma-Aldrich; Frt, Gm) y se designó a cada tratamiento como a continuación se especifica:

TI	TII	TIII	TIV
0 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	3 mg/L

4. Cada uno de los 200 ml de medio mas su respectiva concentración de Basta®, se repartieron en 10 frascos de vidrio estériles con 20 ml del medio cada uno constituyendo cada frasco una repetición.

5. Se inoculó cada frasco con 1 g de callo embriogénico de maíz.

6. Se registró el peso fresco de 5 frascos de cada uno de los tratamientos cada tercer día durante 3 semanas.

Ensayo 2.

1. Se preparó 800 ml de medio N6-p sustituyendo la adenina por glicina y la mezcla de aminoácidos y vitaminas por vitaminas R2 (ver anexo) con lo cual se suprimieron las fuentes de nitrógeno reducido.

2. El medio se dividió en cuatro recipientes correspondiéndoles la cantidad de 200 ml a cada uno y se esterilizó de acuerdo al apartado 7.2 de esta sección.

3. A cada recipiente, en condiciones de esterilidad, se le adicionó una cantidad específica de glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich; Frt, Gm) (ingrediente activo del Basta®) y se designó a cada tratamiento como a continuación se especifica:

T1	T2	T3	T4
0 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	3 mg/L

4. Cada uno de los 200 ml de medio mas su respectiva concentración de Basta®, se repartieron en 10 frascos de vidrio estériles con 20 ml del medio cada uno constituyendo cada frasco una repetición.

5. Se inoculó cada frasco con 1 g de callo embriogénico de maíz.

6. Se registró, simultáneamente con el ensayo 1, el peso fresco de 5 frascos de cada uno de los tratamientos cada tercer día durante 3 semanas para determinar la concentración perjudicial de herbicida en la cual, se disminuye el crecimiento de los callos.

7. Cuando finalizó el período de las tres semanas, los resultados de este ensayo se compararon con los obtenidos en el ensayo 1 para determinar la concentración perjudicial de herbicida en la cual, se disminuye el crecimiento de los callos y la ganancia de peso fresco en ambos.

7.7 Material biológico

Para la transformación se utilizaron dos plásmidos: pWR-21/pUBI con el gen de la proteína "G" del virus de rabia bajo el promotor Ubiquitina y el terminador 35S; el plásmido PGHCNS que contiene el mismo promotor, gen y terminador pero, adicionalmente, con una región de adherencia a membrana conocida como MARS y el plásmido pCAMBIA 3301 con el gen de selección *bar* que codifica para la enzima fosfotricina acetiltransferasa de resistencia al herbicida Basta® y el gen *gus* que codifica para la enzima β -glucoronidasa (ver figura A en anexo). La construcción de los tres plásmidos se realizó en el Laboratorio de Plantas Tropicales y Salud Humana del Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Unidad Irapuato proporcionados por el Dr. Miguel Ángel Gómez Lim.

7.8 Co-bombardeo de callos embriogénicos de maíz con pistola de baja presión.

1. La preparación de partículas de tungsteno así como la adsorción del ADN a las micropartículas se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Guerrero-Andrade, 1998 (ver anexo) con mezclas equimolares (9:1) de los plásmidos: pWR-21/UBI, PGHCNS-MARS y pCAMBIA 3301.
2. Se tomaron callos embriogénicos de 12 días después del subcultivo, los cuales fueron colocados un día antes en cajas Petri de 50 mm x 17 mm con 10 ml de medio N₆-p gelificados con 3.0 mg L⁻¹ de Gellan^{MR}.
3. Se colocó una porción extendida de 1 g de callo embriogénico de 1 cm de diámetro (una capa de aproximadamente de 3 mm de espesor) en el centro de la caja de Petri.
4. Se tomaron 5 μ l de la solución de las partículas cubiertas con el DNA plasmídico (adsorción) y se colocaron en el centro del filtro de bombardeo.
5. El bombardeo se llevó a cabo con una presión de helio de 120 psi a una distancia de 13 cm entre el filtro y el tejido blanco, en un vacío de -20-22 in de Hg.
6. Una vez bombardeados los callos se sellaron las cajas Petri y se mantuvieron en incubación a temperatura controlada de 25 ± 1 °C y fotoperiodo de 16 horas luz (29 μ em/s²) y 8 horas oscuridad.

7.9 Expresión transitoria.

Dos días después del bombardeo (24 horas) se eligieron al azar unos callos combombardeados con la mezcla de plásmidos así como de los controles negativo y positivo, para realizarles la prueba de expresión transitoria por el método histoquímico de la determinación de la actividad de la β -glucoronidasa (Jefferson *et al*, 1987).

La expresión transitoria se realizó de la siguiente manera:

1. Se colocaron los callos bombardeados en la solución de X-gluc (Phytotechnology Lab; KS, USA) (ver anexo) y se incubaron a 25 °C por un periodo de 12 a 16 horas.
2. Se desechó esta solución y se lavaron los callos 2 veces con Buffer "Z" (ver anexo) pH 7.4.
3. Después, se lavaron con etanol (Merck; Edo. de México, México) al 70% 4 veces.
4. La clorofila se eliminó con una mezcla de acetona-metanol Merck; Edo. de México, México (1:3) lavándose con esta solución los tejidos el tiempo necesario haciendo varios cambios de la mezcla.
5. Después de que se observó el color azul, producto de la reacción, el tejido se lavó 4 veces con Buffer "Z".
6. Finalmente, los tejidos se conservaron en glicerol al 50% y se almacenaron a 4 °C.

7.10 Selección positiva de callos transformados con glufosinato de amonio (Basta®).

1. Los callos cobombardeados permanecieron en el medio N₆-p gelificado con 3.0 mg L⁻¹ de Gellan ^{MR} durante una semana.
2. Una vez transcurrido este período, fueron colocados en medio de selección, el cual consistió de medio N₆- p (ver Anexo) + 3 mg L⁻¹ de Basta® (glufosinato de amonio) para la selección de las células transformadas.
3. Los callos se subcultivaron cada dos semanas y se mantuvieron en incubación a temperatura controlada de 25 ± 2 ° C y fotoperiodo de 16 hrs luz (29 μ em/s²) y 8 hrs oscuridad.

4. Los callos permanecieron en selección en las condiciones antes descritas, durante tres meses.

7.11 Regeneración y aclimatización de plantas de maíz a partir de callos embriogénicos co-bombardeados.

1. Para la regeneración de plantas, los callos se subcultivaron en medio N6-p mas 3 mg/L de Basta® pero con la concentración de la auxina sintética 2,4-D y la citocinina cinetina a la mitad. Las condiciones de fotoperiodo y temperatura permanecieron igual.

2. En el siguiente subcultivo se mantuvo las condiciones antes descritas.

3. En el caso del tercer subcultivo, se omitió por completo ambos reguladores de crecimiento manteniendo la misma concentración del agente de selección.

4. La supresión de 2,4-D y cinetina se mantuvo en el cuarto subcultivo y la concentración del agente de selección Basta® se disminuyó a la mitad, es decir, a 1.5 mg/L. En esta etapa se realizó la separación de las plantas con medidas de 4-6 cm del resto del callo.

5. Las plantas de 10-12 cm se mantuvieron en medio N6-p sin reguladores de crecimiento y sin Basta® y se procedió a individualizarlas de entre ellas mismas con el objeto de permitir el desarrollo de raíces.

6. Las plantas de maíz con un sistema radicular vigoroso se transfirieron a una mezcla de sustratos (previamente esterilizados) de acuerdo a la siguiente relación tierra de hoja y peat moss 1:1.

7. Con guantes en ambas manos, se sacaron con cuidado las plantas de los recipientes de vidrio y se procedió a quitarles el exceso de medio de cultivo.

8. Las plantas se sumergieron en agua desionizada estéril para removiendo el medio de cultivo restante así como hojas y raíces viejos.

9. El sustrato se perforó de tal manera que el hoyo hecho permitió que las raíces quedaran a una profundidad adecuada.

10. Se aseguró la fijación de las plantas.

11. Cuando se llegó al cupo de la charola, se rocío el sustrato con agua.

12. Las charolas se introdujeron a una cámara de aclimatización durante 4 meses.

13. Cuando finalizó el período en la cámara de aclimatización, las plantas se transfirieron a macetas con tierra de hoja y permanecieron en invernadero hasta su etapa reproductiva.

7.12 Identificación del transgen de interés por PCR.

1. Se colectaron y pulverizaron muestras de tejido a partir de plantas en invernadero (ver anexo) y se extrajo ADN total de acuerdo al protocolo establecido en el laboratorio 15 de Plantas Tropicales y Salud Humana del Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato (ver anexo).

2. Para la amplificación del transgen de interés se emplearon las siguientes condiciones:

Reactivo	Concentración stock	Concentración final 1X
Buffer PCR	10x	5 µl
dNTPs	10 mM	1 µl
MgCl ₂	50 mM	1.5 µl
Mix Oligos	10 µM de c/u	1.5 µl
Taq. Pol.	20 unidades	2.5 unidades
ADN	3 mg	500 ng
H ₂ O cbp	5 ml	50 µl

3. Los oligonucleótidos que se emplearon para la amplificación de un fragmento de 1492 pb del gen de la proteína G del virus de rabia.

Gen	Longitud (pb)	Secuencia
Proteína "G" del virus de rabia.	Sentido (35-55)	CCCCTTCTGGTTTTCCATT
	Antisentido (1507-1527)	ACGTTTGGGGAGTGACTGAC

4. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Pasos	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización previa	95 °C	72 min	1
Desnaturalización	95 °C	1 min 10 seg	35
Alineamiento	61.9 °C	1 min 30 seg	
Extensión	72 °C	1 min 30 seg	
Extensión adicional	72 °C	10 min	1

5. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% a 60 volts durante 20 minutos.

7.13 Hibridación de membrana de los productos de PCR con sonda radiomarcada con ³²P.

1. La sonda se preparó y purificó previamente (ver anexo) y el marcaje se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de Redprime II Random Prime Labelling Systems (Amersham Biosciences, 1998).

2. Se precalentó el buffer de hibridación a 65 °C.

3. La hoja de nylon se sumergió en el buffer de hibridación y se pre-hibridizó con agitación a una temperatura apropiada durante 15 minutos.

4. Para la preparación de random primed, se desnaturalizó la sonda a una temperatura de 95-100 °C durante 2-5 minutos y colocó inmediatamente en hielo.

5. Se adicionó suficiente volumen de la sonda al buffer de hibridación para llevar a cabo la concentración final de la sonda recomendada* y se mezcló homogéneamente hasta asegurar una distribución uniforme de la sonda.

6. La membrana se dejó en agitación constante durante 1 a 2 horas y media a 65 °C para llevar a cabo la hibridación.

7. Una vez transcurrido el período de hibridación, se lavó la membrana de nylon en las siguientes condiciones:

-50 ml de SSC 5x, 0.1% (w/v) de SDS a temperatura ambiente durante 20 minutos.

-50 ml de SSC 1x , 0.1% (w/v) de SDS a 65 °C durante 15 minutos.

-50 ml de SSC 0.1x , 0.1% (w/v) de SDS a 65 °C durante 15 minutos.

8. La membrana de nylon se colocó en un cassette para autoradiografía en contacto con papel película para rayos X.

9. El cassette de autoradiografía se mantuvo en congelación a – 70 °C durante 48 horas.

10. Se reveló la membrana en un equipo Kodak BioMax.

8) RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Inducción de callos embriogénicos de maíz.

Los callos embriogénicos de maíz se indujeron con éxito en un 90% y sin presentar contaminación a partir de embriones inmaduros de la raza Tuxpeño en medio N6-i siguiendo el protocolo establecido por Guerrero-Andrade (1998). El uso de embriones inmaduros ha sido de gran utilidad tanto en pastos (Gamborg *et al*, 1970) como cereales: Panicum (Lu y Vasil, 1981), trigo (Ozias-Akins y Vasil, 1982) y maíz (Green y Rhodes, 1982; Green y Armstrong, 1985), en todos los casos, el 2,4-D ha demostrado ser un regulador de crecimiento potente para estimular la expresión de totipotencia en cultivos primarios y subsecuentes de la familia gramíneas.

Este factor ha sido reconocido en cultivos embriogénicos de centeno (Deambrogio y Dale, 1980, citados por Vasil, I., 1994), maíz (Green, 1982; Beckert, 1982; Vasil *et al*, 1984 y Torne *et al*, 1990) y arroz (Bajaj y Bidani, 1980). De todos los reguladores de crecimiento, el 2,4-D ha resultado ser de gran utilidad siendo empleado en el 57.1% de los cultivos embriogénicos exitosos (Vasil y Vasil, 1980); aunque altas concentraciones de 2,4-D no son necesarias para inducir la embriogenesis somática, sí lo son para preservar la naturaleza desdiferenciada del cultivo (Emons y Kieft, 1995).

El 2,4-D es una auxina sintética que actúa sobre las peroxidasas de la pared celular ocasionando que pierdan su dirección de división, de esta manera, estimula la organización de las células para formar brotes o embriones (Miesfeld, 1999). En el caso particular de maíz se han descrito los cambios presentes en el embrión. Las células del escutelo comienzan a tener actividad de proliferación, el número de organelos se incrementan y se presentan cambios morfológicos vacuolares y nucleares. Esta reacción se le llama de choque y se presenta en las primeras 24 horas de estar las células en exposición con el regulador de crecimiento. Después de esta respuesta, se presenta una segunda donde se da inicio a la inducción del callo; a esta etapa se le designa como respuesta de crecimiento siendo tanto la primera como esta segunda dependientes de la presencia del 2,4-D caracterizándose por la actividad mitótica en células sensibles a este regulador de crecimiento (Broseman *et al*, 1997).

Las condiciones empleadas para la obtención de callo embriogénico fueron similares a las establecidas por Green y Phillips (1975) en cuanto a la edad del explante y la posición del mismo. Particularmente, la orientación del embrión permitió la proliferación extensiva del escutelo y minimizó la germinación (Green y Rhodes, 1983).

La formación del callo se dio en áreas localizadas en toda la superficie del escutelo presentándose al término de la primera semana de incubación en medio N6-i (figura 1). Este resultado es similar a lo citado por Collins y Grosser (1984) ya que estos autores señalan que en algunas especies de gramíneas, el callo se puede formar sobre la superficie entera del escutelo.

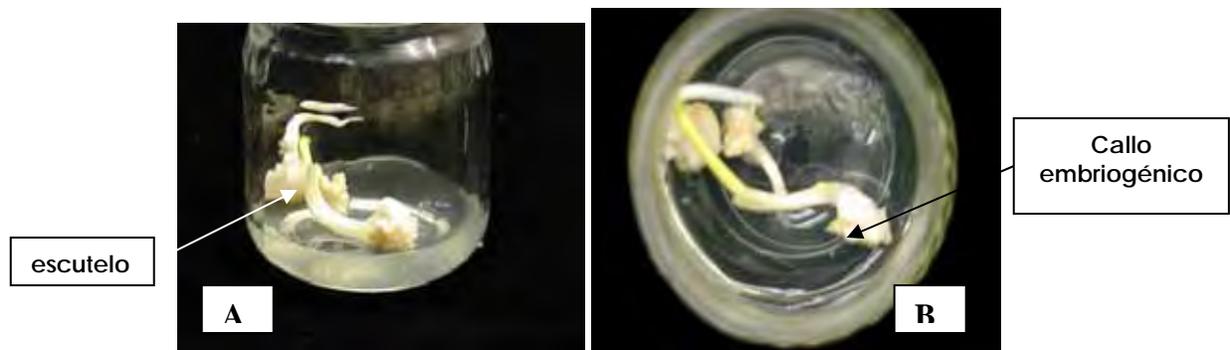


Fig. 1. Formación de callo embriogénico en el escutelo del embrión.
A. Vista lateral y B. Acercamiento.

Proliferación del callo embriogénico y mantenimiento.

Una vez que se observó la presencia de callo embriogénico en toda la superficie del escutelo (aproximadamente al término de la segunda semana), éste se transfirió, separándose el tejido madre (restos del escutelo) a medio de proliferación N6-p fresco (de acuerdo a Guerrero-Andrade, 1998) suplementado con la misma cantidad de la auxina 2,4-D y adicionado con 0.1 mg/L de la citosina cinetina lográndose la proliferación. Se ha enfatizado que la combinación de 2,4-D con una citosina estimula la proliferación de callo embriogénico a que si se empleara únicamente 2,4-D (Ammirato, 1983).

Los callos obtenidos presentaron una consistencia friable (disgregable), textura granular y color de blanco a amarillento (figura 2) características típicas del callo tipo II de maíz (Green, 1982). Como describen varios autores, el callo tipo II es suave, friable, con tasas de

crecimiento rápido y puede mantener su capacidad embriogénica durante largos periodos (Lu *et al*, 1982; Emons y Kieft, 1995).



Fig. 2. Callo embriogénico de maíz exhibiendo las típicas características de tipo II.

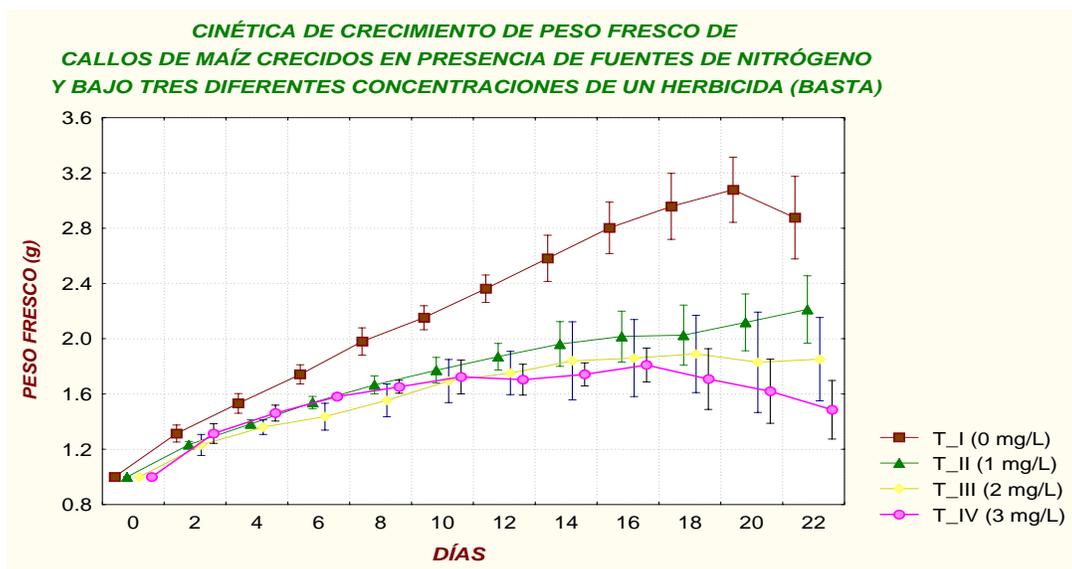
Los callos embriogénicos obtenidos mostraron ser altamente desdiferenciados, con poca organización a simple vista y un alto índice de crecimiento, siendo necesario el subcultivo cada dos semanas a medio fresco N6-p. Estas características son similares a lo observado por Green (1982). En el transcurso de los subcultivos se logró observar los proembriones en la parte superficial del callo (figura 3), en aparte a la acción de la cinetina, pues las citocininas están involucradas en la iniciación y desarrollo del embrión (Ammirato, 1983) y se ha enfatizado que cinetina es efectiva para mantener el potencial de formación de embriones en medio de cultivo sólido por grandes periodos (Halperin, 1966) y ser la responsable de inducir embriones en cultivo de centeno (Hu y Wang, 1986).



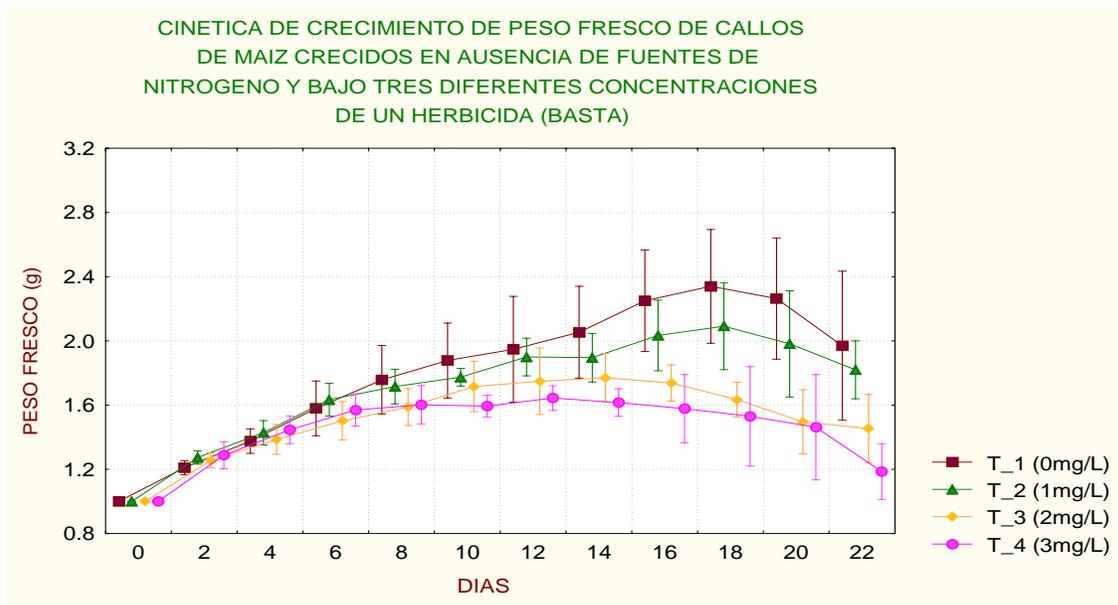
Fig. 3. Callo embriogénico de maíz con embriones en etapa globular en la superficie.

Cinética de crecimiento de callo embriogénico de maíz en presencia del herbicida Basta®.

Se compararon las cinéticas de crecimiento de callos embriogénicos de maíz en presencia o ausencia de fuentes de nitrógeno reducido en cuatro concentraciones del herbicida Basta®. En la gráficas 1 (con fuentes de nitrógeno reducido) y 2 (sin fuentes de nitrógeno reducido) se observa que la etapa exponencial en los tratamientos testigos TII y T1 (0 mg/L de Basta®) se presenta a partir del día 3 manteniendo un crecimiento constante y el punto de máximo incremento de peso fresco en TII (gráfica 1) se da en el día 20; para T1 (gráfica 2) se presenta el día 18. Después de ese día se observa, en ambas gráficas, una etapa de desaceleración teniendo su punto de menor incremento el día 22.



Gráfica 1. Cinética de crecimiento de peso fresco de callos embriogénicos crecidos en cuatro diferentes concentraciones de Basta® con fuentes de nitrógeno reducido.



Gráfica 2. Cinética de crecimiento de peso fresco de callos embriogénicos crecidos en cuatro diferentes concentraciones de Basta® sin fuentes de nitrógeno reducido.

Si bien, las dos cinéticas presentan el aumento mayor de peso fresco, con respecto a los tratamientos restantes, entre éstas se pueden apreciar diferencias: la etapa de desaceleración es más pronunciada y el crecimiento menor a lo largo del tiempo en T1 (gráfica 2) con respecto a T2 (gráfica 1); lo mismo se exhibe en el punto de incremento mayor, pues T2 presenta un peso de 3 g mientras que en T1 es menor a 2.5 g y la oxidación se manifiesta de manera más temprana en este último (figura 4). Esto posiblemente se deba a la presencia de fuentes de nitrógeno reducido que están favoreciendo el crecimiento del callo en el testigo T2.

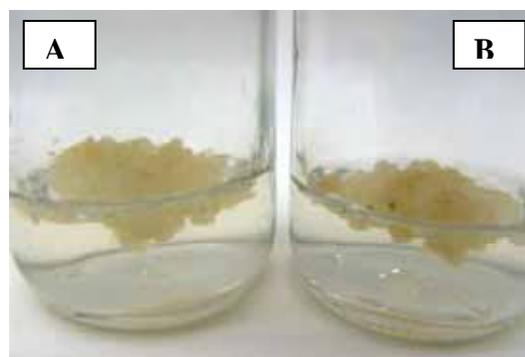


Fig. 4. Comparación entre controles negativos. Se aprecia que el crecimiento es mayor y la oxidación menor en A. (T2) a diferencia de B. (T1).

El nitrógeno reducido interviene, además del nitrato, tanto en la iniciación como maduración de los embriones y ayuda a que el crecimiento sea establecido. La fuente de nitrógeno reducido puede estar en la forma de un complejo, una mezcla de aminoácidos o un simple aminoácido como L-glutamina o L-alanina (Hodges *et al*, 1986).

En los tratamientos TII y T2 (1 mg/L de Basta®) se aprecia un incremento de peso fresco en los primeros días (día 3 al 10) siendo ligeramente mayor en este último (gráfica 2) con respecto a su testigo y homólogo. El punto de mayor incremento de peso fresco para TII tuvo lugar el día 22 (gráfica 1) y para T2 el día 18 (gráfica 2) y su punto de menor incremento para este mismo tratamiento se presentó el día 22 y para TII el día 18. Si se comparan los tratamientos TI y T1 con TII y T2, estos últimos manifiestan un crecimiento menor; este comportamiento se debe a la presencia de Basta®, el cual, está afectando su metabolismo aún cuando la concentración sea la más baja.

El glufosinato de amonio (Basta®) es un compuesto sintético que proviene de la fosfinotricina (obtenida a partir del bialafos producido por *Streptomyces hygroscopicus*). La fosfinotricina (PPT) es un tripéptido conformado por un análogo del ácido L-glutámico y dos residuos de alanina. El PPT es comercializado como un herbicida no selectivo por Hoeschts como glufosinato de amonio (Lea, 1991).

El PPT es un potente inhibidor de la glutamina sintasa (GS); esta enzima juega un papel importante en la asimilación de amonio y la regulación del metabolismo del nitrógeno en las plantas y es la única enzima que puede desintoxicar el amonio liberado producido por la reducción al nitrato, degradación de aminoácidos y fotorespiración (De Block *et al*, 1987).

Para en tratamiento TIII (gráfica 1) y T3 (gráfica 2) con 2 mg/L de Basta®, el día con mayor crecimiento para el primero se presenta el 18 y para el segundo el día 12. Los puntos de menor peso fresco se dan el día 20 tanto para TIII como para T3 manteniéndose de la misma manera hasta el día 22. El peso fresco es menor en ambos tratamientos con respecto a TII y T2 y mucho menor si se comparan con sus testigos respectivamente (TI y T1) mostrando una relación inversamente proporcional, es decir, a mayor concentración de Basta® menor peso fresco.

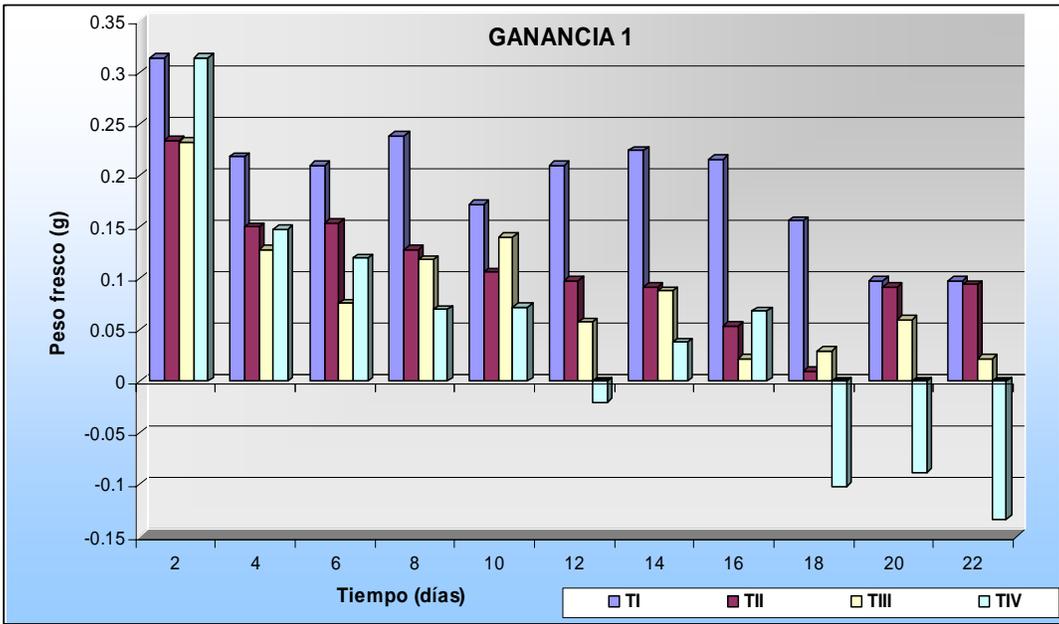
En el caso del tratamiento TIV con 3 mg/L de Basta® (gráfica 1) se observa el punto de mayor peso fresco el día 17 y para T4 el día 13 (gráfica 2). Ambas cinéticas coinciden en el día 22 como el punto con menor peso fresco. Al comparar, individualmente, T1, T2 y T3 contra TIV (gráfica 1) se aprecia que en este último tratamiento el callo embriogénico de maíz está más dañado. Este mismo patrón se manifiesta en la gráfica 2, ya que TIV y T4 tienen la más alta concentración del herbicida. Cabe mencionar que, estadísticamente, hubo diferencias significativas dentro de los tratamientos así como entre ellos, pero el resultado obtenido en TIV y T4 indica que esta concentración de Basta® es la más perjudicial, pues afectó de manera significativa el incremento de peso fresco (ANOVA con una $p=0.05$; ver anexo).

Si se compara exclusivamente TIV con T4 (gráficas 1 y 2) se observa que, el primero presenta un peso fresco superior al segundo (1.5 g y 1 g respectivamente) pese a que ambos tienen la misma concentración del herbicida; esta diferencia puede ser debida a la presencia de fuentes de nitrógeno reducido (que es la única diferencia) y que esté contribuyendo a favorecer el crecimiento en TIV pese a la presencia de Basta®; por consiguiente se estableció que la selección de callos embriogénicos de maíz sería con 3 mg/L de Basta® con fuentes de nitrógeno reducido.

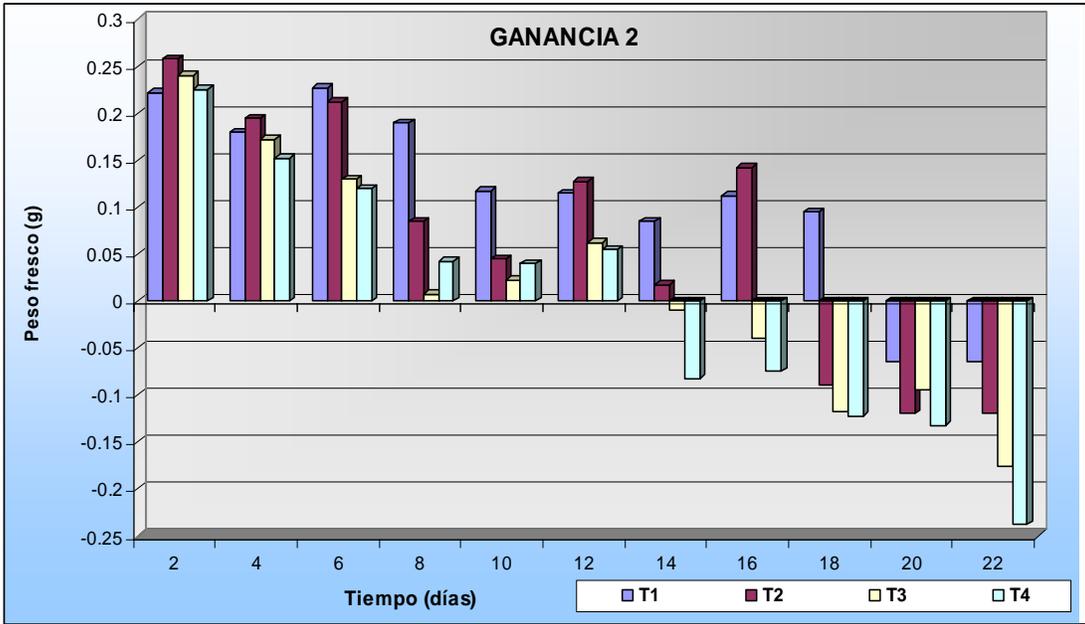
El tratamiento en *Sinapsis alba* con PPT causó un decremento rápido en los niveles de glutamato, glutamina, aspartato, asparagina, glicina y serina (Malcom *et al*, 1993). Además, Lea (1991) encontró que la eliminación de la glutamina causada por el glufosinato sería la causa primaria del cese de la fotosíntesis. Simultáneamente, tratamientos con glufosinato y glutamina resultaron en un efecto reducido del herbicida en la fotosíntesis a pesar de los altos niveles de amonio, de tal manera que la glutamina parece disminuir la toxicidad del amonio acumulado.

Ganancia de peso fresco.

Respecto a la ganancia, se puede observar en la gráfica 3, el tratamiento control T2 presenta la mayor ganancia de peso fresco en el día 2, en cambio el T1 lo exhibe el día 6 (gráfica 4). El punto de menor ganancia para T1 se da en el día 20 (hasta el 22) coincidiendo con el punto de menor peso fresco en la cinética (gráfica 2), mientras que en T2 no hay pérdidas a lo largo del tiempo debido, posiblemente, a la aportación de aminoácidos y vitaminas del cóctel 20.



Gráfica 3. Ganancia de peso fresco de callos embriogénicos de maíz con fuentes de Nitrógeno reducido.



Gráfica 4. Ganancia de peso fresco de callos embriogénicos de maíz sin fuentes de Nitrógeno reducido.

El nitrógeno reducido juega un papel importante en el desarrollo de las células determinadas embriogénicamente en medio con 2,4-D, facilitando la proliferación y mantenimiento del callo tipo II (Ammirato, 1983). Se ha observado que la glutamina y glutamato son parcial o completamente exitosos en reemplazar el amonio. Kamada y Harada (1979a) observaron el efecto de varios aminoácidos en presencia de 2,4-D y 20 mM de nitrato de potasio; el efecto del nitrógeno de los aminoácidos se vio reflejado directamente en el desarrollo de células determinadas embriogénicamente.

Se observó el mismo punto de máxima ganancia de peso fresco tanto para TII (gráfica 3) como T2 (gráfica 4) en el día 2, mientras que el de menor ganancia se presenta en el día 16 para TII y en día 20 para T2. Comparando T2 con TII, en éste primero se observa que las áreas necrosadas (muerte celular) son mas evidentes (figura 5) y la ganancia en general menor. Como se mencionó anteriormente, el herbicida Basta® actúa en las plantas bloqueando la ruta de asimilación del nitrógeno (nitratos) y amonio provocando intoxicación y, por lo tanto, muerte celular (Arteaca, 1996).



Fig. 5. Comparación entre tratamientos homólogos. Se aprecia que el crecimiento en T2 es menor a TII.

En el caso de los tratamientos TIII-T3 y TIV-T4 coinciden en el día 2 como el punto de mayor ganancia de peso fresco (gráficas 3 y 4). En referencia al punto de menor ganancia, TIII (gráfica 3) en el día 16 y T3 en el día 22 (gráfica 4). Para el caso de TIV y T4, también presentaron en el día 22 como el punto de mínima ganancia. Al igual que en el tratamiento anterior, se observa el mismo comportamiento, pues TIII y TIV presentan mayor ganancia y menor oxidación que T3 y T4 (figura 6).



Fig. 6. Comparación entre tratamientos homólogos. Tanto TIII como TIV presentan menos daño y oxidación que T3 y T4 respectivamente.

Cabe señalar que el mismo comportamiento global presente en las cinéticas de crecimiento (gráficas 1 y 2) prevalece, de la misma manera, entre las ganancias (gráficas 3 y 4), pues a nivel general, la menor ganancia de peso fresco se presentó en TIV y T4 en comparación a los demás tratamientos (respectivamente) y de entre ellos, TIV (gráfica 3) presenta menor pérdida en cuanto a cantidad de peso fresco así como en número de días que T4 (gráfica 4) reflejándose también en el aspecto morfológico (figura 7).

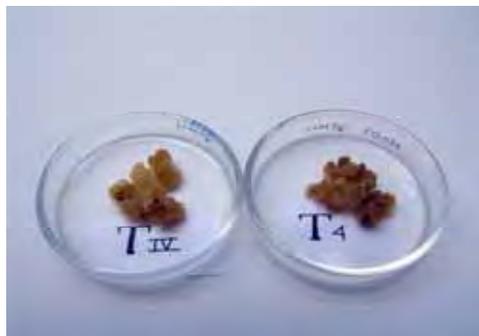


Fig. 7. Comparación entre TIV y T4 en el día 22. Se observa una completa oxidación y muerte celular en el callo T4.

La comparación entre el ensayo con fuentes de nitrógeno reducido y en ensayo carente de éstas, sugieren de manera general, que los callos menos afectados (gráfica 1 y 3) están empleando a los aminoácidos del cóctel 20 como una ruta alternativa de nitrógeno.

El cóctel 20 consiste de una mezcla de aminoácidos y vitaminas que incluye la L-glutamina, L-asparagina y el ácido glutámico. Hu y Wang (1986) concluyeron que la

glutamina fue la más efectiva en la inducción del crecimiento del embrión *in vitro* y la asparagina, también, fue efectiva en *Datura*. Posiblemente por ello, el cóctel 20 al contener esos aminoácidos favorece el crecimiento de los callos embriogénicos y el desarrollo de embriones somáticos.

Aunado a lo anterior, Kamada y Harada (1979a; 1979b) demostraron que de todos los aminoácidos, la L-glutamina parece jugar un papel especial, pues este aminoácido fue el que más rápido produjo embriones somáticos en zanahoria mientras que la α -alanina fue más efectiva en incrementar la frecuencia de desarrollo del embrión. Además, glutamato, prolina, arginina y una combinación de los dos últimos aminoácidos han demostrado que proporcionan una reducción de los efectos adversos en el crecimiento del callo de arroz por parte del glufosinato (Manderscheid y Wild, 1986).

Por último, la bibliografía menciona que las fuentes de nitrógeno importantes para las plantas son los nitritos, nitratos y el amonio, las cuales son fuentes principales e inmediatas considerándoseles como inorgánicas. En el caso de los aminoácidos, estos constituyen también una fuente de nitrógeno pero de tipo orgánico, el cual es utilizado por las plantas para su crecimiento puesto que suministran una aportación de nitrógeno aprovechable para que se lleve a cabo dicho proceso de crecimiento en las plantas (Devlin, 1982). Por todo lo anterior, es entendible la diferencia mostrada entre los callos embriogénicos de maíz crecidos en ausencia de cóctel 20.

Cobombardeo de callos embriogénicos de maíz con pistola de baja presión.

Debido a las dificultades que aún presentan los protocolos para transformar maíz con *Agrobacterium* se decidió emplear la biobalística para lograr el objetivo general de introducir el gen de la proteína G del virus de rabia empleando el protocolo de cobombardeo establecido por Guerrero-Andrade (1998).

Se eligió el grosor de 3 mm de la capa de callo embriogénico a bombardearse debido a que algunos estudios han mostrado que el ADN adsorbido en los microproyectiles generalmente penetran sólo las primeras dos capas celulares (Kausch *et al*, 1995). Guerrero-Andrade (1998), obtuvo la regeneración de plántulas de maíz transgénicas bajo estas condiciones.

Los embriones inmaduros han sido de los explantes mas usados comúnmente para la regeneración de plantas en cereales por ser un sistema particularmente útil para la bio balística y la producción de plantas transgénicas (Vasil, 1994). La elección de callo embriogénico tipo II de maíz que se empleo en este trabajo obedeció a las siguientes razones: este tipo de callo es suave y prolifera en un alto índice más que el callo tipo I, estos constituyen factores que pueden contribuir a una alta densidad de células transformadas y un alto índice de propagación de tejido transgenico (Aulinger *et al*, 2003). Hazel *et al* (1998) estableció que un alto índice de división celular es un requerimiento importante para el éxito de la transformación.

La elección del callo tipo II de maíz cumple con los requisitos necesarios de un sistema celular receptor para lograr una transformación útil, el cual incluye las siguientes consideraciones: (i) las células blanco deben ser accesibles o competentes para la introducción del ADN foráneo; (ii) las células receptoras deben de ser competentes a una transformación integrativa donde aspectos como la oportunidad de la introducción de ADN durante el ciclo celular y/o la capacidad para la recombinación deben de ser importantes; (iii) las células deben de ser capaces de sostener la división celular después de la transformación para permitir el desarrollo de un sector clonal transformado que pueda ser seleccionado y (iv) aquellos sectores clonales deben de retener la capacidad morfogenética para la regeneración de plantas fértiles (Kausch *et al*, 1995).

Aparte de contar con un buen explante que funcione como un sistema celular receptor, es importante considerar que el éxito y la utilidad de un sistema de transformación en plantas dependen, en mucho, de los niveles de expresión de los genes introducidos. Se empleo el promotor de Ubiquitina de maíz (Ubi) para manejar la expresión del gen de la proteína G del virus de rabia, pues se menciona que la construcción del plásmido basado en este promotor ha demostrado dar los niveles más altos en la expresión de genes en varias especies de cereales (Cornejo *et al*, 1993; Gallo-Meagher *et al*, 1993 y Taylor *et al*, 1993) y se ha empleado en la obtención de plantas transgenicas de arroz, trigo y centeno (Vasil, 1994). Por su parte, Christensen *et al* (1992) observaron un incremento de 10 veces en la expresión del gen *cat* cuando estuvo bajo el control de Ubi comparado con el promotor CaMV 35S.

El incremento del agente gelificante (Gellan™)de 2.5 a 3 mg/L en el medio de cultivo, donde se colocaron los callos embriogénicos 24 horas después del bombardeo y seis días

después del mismo, constituyó un tratamiento osmótico para favorecer la transformación. No se observó daño masivo en el callo embriogénico durante el bombardeo ni en los seis días proseguidos a este. Una de las razones por las que se emplea un tratamiento osmótico en el bombardeo de partículas, obedece a que el efecto osmótico en las células bombardeadas proporciona una reducción en la presión de la turgencia, previniéndolas de la ruptura y el entallamiento celular (Kemper *et al*, 1996).

Aunado a lo anterior, Vain *et al* (1993) y O'Connor-Sanchez *et al* (2002) donde prueban diferentes concentraciones de manitol y/o sorbitol para proporcionar el estado plasmolizado en las células, en este caso se observó que el incremento de la concentración de Gellan™ resultó ser suficiente para prevenir el daño celular y, por lo tanto, disminuir el impacto provocado por la entrada de las micropartículas favoreciendo de una manera preeliminar a la transformación.

Expresión transitoria.

La expresión transitoria se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de Jefferson *et al* (1987), 24 horas después del cobombardeo en tres callos seleccionados al azar con el plásmido pWR-21/UB1 y tres con el PGHCNS/MAR. Para los controles positivo y negativo solo se escogió uno de cada uno. Los callos permanecieron 48 horas en presencia del sustrato X-gluc™.

Entre los genes reporteros más disponibles, el gen *gus* es el más ampliamente usado en la transformación de plantas a pesar de que este tipo de ensayo es de naturaleza destructiva (Gordon-Kam *et al*, 1990; Walters *et al*, 1992; Register III *et al*, 1994; Vasil, 1994; Zhong *et al*, 1996 y O'Connor *et al*, 2002). La realización de expresión transitoria en maíz fue tempranamente usada por Klein *et al* (1988a) empleando la biobalística para introducir un gen quimérico de la β -glucoronidasa en células de suspensión de maíz detectando el producto de la reacción de la enzima GUS con un sustrato sintético y determinando el número de células que recibieron el gen foráneo.

Una vez que transcurrió el tiempo de incubación, el control positivo presentó como se esperaba, la característica coloración azul intenso, resultado de la acción enzimática de GUS sobre el sustrato del X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indol glucoronido). En cambio, el control negativo no lo presentó puesto que solo se bombardeó con balas carentes de

ADN. Respecto a los tratamientos con ambos tipos de plásmidos, también se observó la coloración azul intenso en la mayor parte de la superficie del callo lo que indica que si penetraron las balas a la célula y, además, muestra que el cobombardo se llevó a cabo de una manera satisfactoria (figura 8). De acuerdo con Klein *et al* (1993), la mayoría de las células que expresan la β -glucoronidasa contienen una partícula dentro del núcleo pues las células con una partícula en el citoplasma raramente expresan el gen.

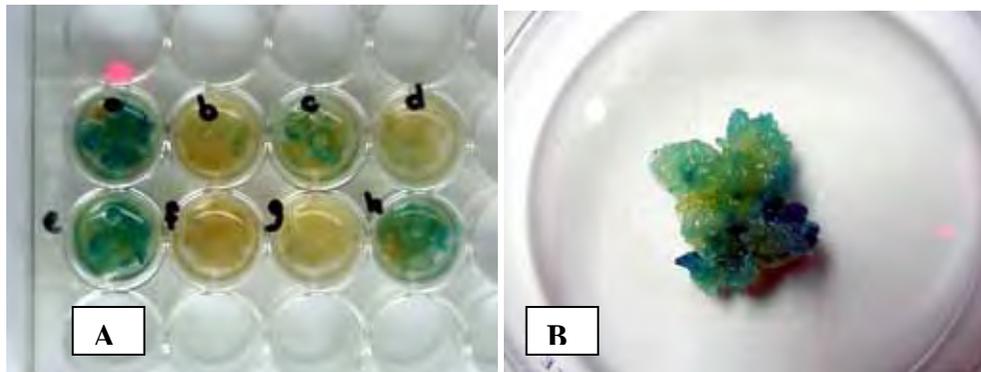


Fig. 8. **A.** Expresión transitoria de callos co-bombardados **a.** pWR-21; **e.** MARS; **c** y **h.** control positivo (C+); **b** y **f.** control negativo (C-); **d** y **g.** ST. **B.** Vista cercana del callo (**a**) delimitando las áreas que presentan la coloración azul intenso.

La combinación entre acortamiento de tiempo y alta expresión que ofrece este método histoquímico ha hecho útil al ensayo de expresión transitoria en cereales por ser un sistema que permite una evidencia visible de la transferencia y expresión del gen foráneo, y las diferencias en la expresión son fácilmente monitoreadas a simple vista o cuantificando por medio de un ensayo fluorométrico (Morrish *et al*, 1993). Cabe mencionar que en este tipo de ensayos, la mayoría del ADN transferido aparece por estar libre en el núcleo, a diferencia de una transformación estable donde el ADN se haya integrado en el cromosoma (Morrish y Fromm, 1992).

Selección positiva de callos transformados con glufosinato de amonio (Basta®).

Los callos cobombardeados se mantuvieron en las cajas Petri durante una semana en condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo. Transcurrido este tiempo, se transfirieron a frascos pequeños (figura 9) en medio N6-p con fuentes de nitrógeno reducido y con 3 mg/L de glufosinato de amonio (ingrediente activo del herbicida Basta®). Esta concentración se eligió de acuerdo al resultado obtenido mediante las cinéticas de peso fresco. Los subcultivos se realizaron cada dos semanas en dicho medio de selección.



Fig. 7. Callo embriogénico de maíz co-bombardeado en medio con 3 mg/L de Gellan® (izq). Callo embriogénico en medio con selección con 3 mg/L de Basta® (der).

La selección con Basta® o bialafos ha sido exitosamente empleada para recuperar líneas transformadas en maíz (Fromm *et al*, 1990; Gordon-Kamm *et al*, 1990) siendo mas efectiva cuando la selección se continua a través de todas las etapas del cultivo hasta la regeneración, pues la estrategia principal para la selección de células transformadas esta basada en la inhibición selectiva del crecimiento de células no transformadas o de tipo silvestre sin afectar de manera significativa a las que si están transformadas (Vasil, 1994). En base a esto, se opto por emplear un herbicida en lugar de un antibiótico como agente de selección.

El finalizar la primera semana de estar los callos en medio de cultivo con el agente de selección, se observaron zonas necrosadas de color café presentando oxidación, lo que indica que en ese sector del callo hay muerte celular ya que las células no expresaron el gen de selección *bar*y, por lo tanto, no lo incorporaron (figura 10). Lo anterior es debido a que la fosfotricina inhibe la enzima glutamina sintasa provocando una acumulación

rápida de amonio en la célula causando intoxicación y muerte celular (Gordon-Kamm *et al*, 1990).

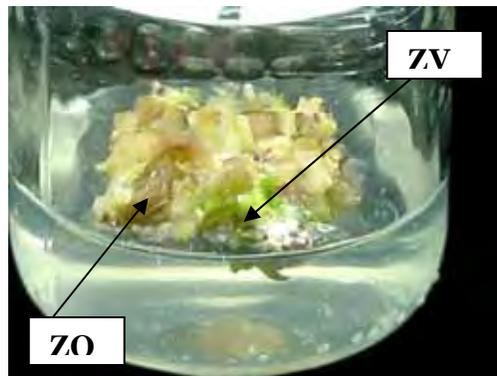


Fig. 10. Callo embriogénico en selección con 3 mg/L de Basta®. ZO indica áreas oxidadas y/o necrosadas y ZV indica áreas viables.

En contraste, en el mismo callo se apreciaron zonas de color blanco amarillento y zonas conformadas por embriones que presentaron un color verde, lo que indica la viabilidad del callo señalando que dichas células sí lograron incorporar el gen de selección *bar* al genoma nuclear vegetal y que, por ende, se expresó pues mantuvo dichos sectores libres de la intoxicación del herbicida y en proliferación constante (figura 10).

El gen *bar*, de *Streptomyces hygroscopicus*, codifica para la enzima fosfinotricina acetil transferasa (PAT) que provee resistencia al herbicida Basta® inactivando el compuesto activo del herbicida por medio de la acetilación (Tompson *et al*, 1987). Por ello, las células transformadas con *bar* son capaces de crecer en índices normales en medio con el agente de selección mientras que las células no transformadas carecen de esta actividad (Wan *et al*, 1994).

Además, este gen ha sido empleado para la selección de las principales especies de cereales como trigo, arroz, maíz, centeno, sorgo y avena. El uso de un gen de resistencia a herbicida tiene la ventaja de contribuir a la producción de una planta transgénica de utilidad agronómica, sin la presencia de un gen marcador de resistencia innecesario como los de resistencia a antibiótico (Vasil, 1994).

Estos resultados obtenidos van de acuerdo con lo mencionado por Fromm *et al* (1990), en donde, la mayoría de los callos de maíz resistentes a PPT permanecieron embriogénicos indicando que ese agente selectivo no destruye la capacidad embriogénica de las células.

En el caso de los controles positivos, estos presentaron condiciones similares a los callos bombardeados con la mezcla de plásmidos, en cambio, el control negativo mostró un grado de necrosis mayor, además de que su permanencia duro sólo hasta el segundo subcultivo, pues al término de éste se oxidó completamente (figura 11).



Fig. 11. Comparación entre control negativo (der) y control positivo con el gen *bar* de la selección (izq). Se observa en el segundofrasco muerte celular y oxidaión.

La selección se mantuvo durante tres meses en las mismas condiciones ya antes descritas y en cada subcultivo, al callo embriogénico se le retiraron los sectores oxidados y/o necrosados.

Regeneración y aclimatización de plantas de maíz a partir de callos embriogénicos cobombardeados.

Para la obtención de plantas de maíz se llevo a cabo la germinación de embriones somáticos de callos cobombardeados, disminuyéndose la concentración de 2,4-D y cinetina a la mitad, y manteniendo la concentración de glufosinato de amonio. Al término de la primera semana, se observaron varios embriones con forma redonda y color verde en la superficie del callo (figura 12). Esto se debe probablemente, a la disminución de 2,4-

D, pues como se indico anteriormente, esta auxina sintética contribuye a evitar la maduración y diferenciación del embrión así como su germinación (Ammirato, 1983; Emons y Kieft, 1995).



Fig. 12. Callo embriogénico de maíz en medio de regeneración. En la zona más superficial se aprecian los embriones somáticos con pigmentación verde.

La germinación de los embriones se hizo evidente con la emergencia de la raíz al finalizar el primer subcultivo (Figura 13A); al término del segundo subcultivo se apreciaron los brotes de las primeras plántulas (figura 13B) manteniendo las mismas condiciones de cultivo. Para evitar la presencia de escapes o mosaicos en las plantas regeneradas, se mantuvieron dichas plántulas en medio de selección y, con base a lo expresado por Morrish *et al* (1993), entre más tiempo permanezcan las plantas transgenicas en selección se asegura una alta probabilidad de obtener plantas que expresen el gen *bar*.



Fig. 13. **A.** Embrión somático germinado. **B.** Brotes de plántulas.

Como se ha mencionado, el herbicida Basta®, de amplio espectro, es un marcador de selección comúnmente usado para obtener plantas de maíz transgénicas y de otros cereales de importancia como arroz, avena, trigo y centeno (Vasil *et al*, 1993). Asimismo, la mayoría de los cereales son regenerados bajo condiciones *in vitro*, vía formación de embriones somáticos, los cuales, se desarrollan directa o indirectamente de una sola célula evitando no únicamente la posibilidad de obtener quimeras sino también plantas con aberraciones genéticas por la fuerte selección durante el desarrollo de embriones somáticos (Vasil, 1994). En este caso cada plántula tuvo su origen en un embrión somático.

Para el tercer subcultivo se omitió la adición de reguladores de crecimiento para permitir, aun más, la maduración y germinación de los embriones; la concentración de glufosinato de amonio se mantuvo con la finalidad de hacer estricta la selección. Las plántulas que expresaron el gen *bar* manifestaron un color verde, el desarrollo de hojas nuevas así como la presencia de un sistema radicular mas definido y desarrollado (figura 14A) a diferencia de algunas pocas plántulas que presentaron un amarillamiento de las hojas con oxidación de otras y un pobre o nulo crecimiento de las raíces (figura 14B).



Fig. 14. **A.** Brotes de plántulas en medio de regeneración.
B. Plántula de maíz necrosada.

La inhibición de la actividad de la GS por el glufosinato de amonio permite la rápida acumulación de altos niveles de amonio bajo condiciones en las que parece ser que el nitrito está siendo reducido en relación con el proceso fotosintético y/o de fotorespiración. Por otra parte, la acumulación de amonio esta acompañada por el cese de la fotosíntesis, disrupción de la estructura del cloroplasto y vesiculación del estroma (Kirkwood, 1987).

En el cuarto subcultivo, se mantuvo la supresión de los reguladores de crecimiento y la concentración de glufosinato de amonio se redujo a 1.5 mg/L, es decir, a la mitad. En esta etapa se observó el crecimiento de las plántulas tanto en tamaño, número de hojas así como en el desarrollo de la raíz (figura 15).



Fig. 15. Planta de maíz regenerada en etapa de 3 hojas.

Las plantas, en condiciones *in vitro*, alcanzaron un tamaño de 4-6 cm en un lapso de 8 semanas a partir de la germinación del embrión; entonces, se procedió a la individualización, lo que significó separarlas del resto del callo y se mantuvieron en medio sin 2,4-D y cinetina con el agente de selección a la mitad. En plantas con más de 10 cm de altura (entre las 10 y 12 semanas a partir de la germinación) se mantuvieron en medio sin reguladores de crecimiento y sin agente de selección; cuando desarrollaron un sistema radicular vigoroso se procedió a su aclimatización en condiciones de invernadero (figura 16) (ver materiales y métodos).



Fig. 16. Plantas de maíz regeneradas (izq) y plantas individualizadas (der).

Se obtuvo un total de 188 plantas regeneradas en condiciones *in vitro* del cobombardeo con la mezcla de plásmidos pWR-21/UB1+ pCAMBIA 3301 y 194 plantas regeneradas del cobombardeo con la mezcla del plásmido PGHCNS-MARS + pCAMBIA 3301 bajo las mismas condición. Autores como Gordon-Kamm *et al* (1990) regeneraron un total de 76 plantas de la línea celular SC82 y 219 plantas de la línea celular SC716 de las cuales, 35 alcanzaron la madurez; Spencer *et al* (1992) regeneraron 219 plantas; Register III *et al* (1994) obtuvieron 95 plantas regeneradas de 75 eventos independientes; Zhong *et al* (1996) regeneraron 5 plantas de cada una de las 10 agrupaciones y O'Connor *et al* (2002) regeneraron 29 líneas. Mientras que en este trabajo, la cantidad obtenida de plantas de maíz regeneradas se considero exitosa de tal manera que el sistema de regeneración empleado fue el adecuado.

La regeneración de plantas a partir de callo tipo II, derivado de embriones inmaduros, ha sido el sistema de transformación/ regeneración más reproducible descrito para maíz (Pesitelli y Sukhanpida, 1995; Rusell y Fromm, 1996; van der Ges y Petolino, 1998; Sidorenko *et al*, 2000; Srivastava y Ow, 2001 y O'Connor *et al*, 2002).

Las plantas en condiciones de climatización crecieron a una altura promedio de 1-1,30 metros (figura 17A) y algunas presentaron una espigación anómala al igual que la formación de la mazorca (figura 17B). Las anomalías presentes en las plantas regeneradas, puede deberse al estrés al que estuvieron sometidos los callos por parte del herbicida y el tiempo en el que permanecieron tanto del agente de selección, como del regulador de crecimiento provocando variación somaclonal.

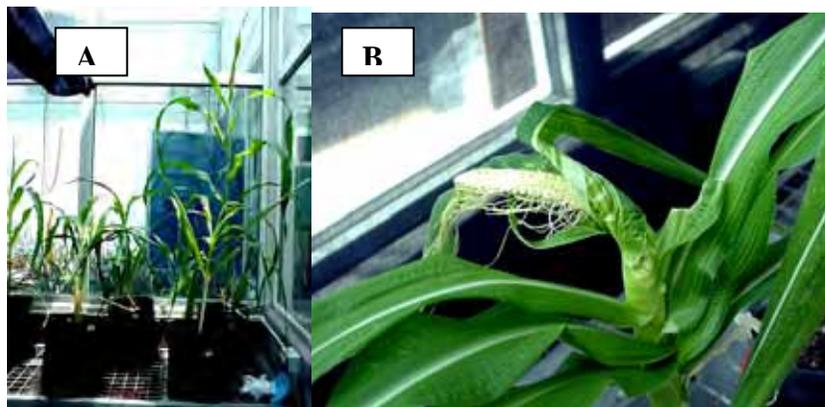


Fig. 17. **A.** Plantas de maíz en condiciones de invernadero. **B.** Planta con anomalía fenotípica.

Anormalidades morfológicas similares en plantas regeneradas de maíz han sido previamente descritas por Lowe *et al* (1985), Rhodes *et al* (1988), Gordon-Kamm *et al* (1990), D'Halluink *et al* (1992), Walters *et al* (1992), Zhong *et al* (1996) y O'Connor *et al* (2002).

La variación entre plantas regeneradas a partir de cultivos de tejidos ha sido denominada como variación somaclonal (Larkin y Acowcroft, 1981). En la variación somaclonal se tienen en cuenta ciertos factores como: el régimen de cultivo (intervalo del subcultivo y condición física del medio) y componentes del medio; especialmente hormonas y reguladores de crecimiento han demostrado su influencia sobre el estatus citológico de las células en cultivo. La variación somaclonal tiende a incrementarse con la duración del

crecimiento *in vitro* y la inestabilidad cromosómica está frecuentemente asociada con el crecimiento del callo desorganizado (Bayliss, 1980; Lee y Phillips, 1988).

La regeneración eficiente de plantas normales y fértiles a partir de cultivos celulares es un requerimiento crítico del mejoramiento molecular y genético en plantas. La notoria naturaleza recalcitrante de las especies gramíneas ha sido superada por el tejido de cultivos inmaduros y desdiferenciados así como explantes de órganos en etapas definidas del desarrollo en medio nutritivo con altas concentraciones de auxinas fuertes así como 2,4-D (Vasil, 1993). El método empleado para regenerar plantas en este trabajo siguió estos lineamientos, de ahí que se logró obtener una cantidad apropiada de plantas *in vitro*.

Identificación del transgen de interés por PCR.

Se extrajo el ADN de 16 plantas adultas de maíz regeneradas (8 correspondientes a la mezcla de plasmidos pWR-21/UB1 + pCAMBIA 3301 y 8 correspondientes a la mezcla de plasmidos pWR-21/UB1-MARS + pCAMBIA 3301) y se analizaron por medio de la técnica de PCR amplificando el gen de la glicoproteína del virus de la rabia mediante el uso de los siguientes primers en sentido: CCCCTTCTGGTTTTCCATT y antisentido: ACGTTTGGGGAGTGACTIONGAC.

Para verificar la introducción y expresión del transgen de interés en una planta dada se ha optado por el empleo de diversas técnicas: Northern blot (a nivel mensajero transcripto), Southern blot (a nivel ADN) o Western blot (a nivel proteína). Varios autores han obtenido resultados empleando una o más de estas técnicas (Gordon-Kamm *et al*, 1990; Spencer *et al*, 1992; Walters *et al*, 1992; Bronwyn *et al*, 1994; Register III *et al*, 1994; Wan *et al*, 1995; Zhang *et al*, 1996 y Aulinger *et al*, 2003).

Otro método también de verificación es por medio de la amplificación directa del ADN usando la PCR. La amplificación del ADN por PCR es un método usual para detectar secuencias que son únicas para genes específicos (Holden *et al*, 2003).

La técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), ha sido usada para demostrar la presencia de ADN foráneo en el genoma de las monocotiledóneas permitiendo un rápido análisis de un gran número de muestras (Morrish *et al*, 1993). Además, es uno de los

métodos mas comúnmente usados para identificar la presencia de organismos genéticamente modificados (GMOs) (Delano *et al*, 2003).

Desde los primeros reportes de transformación en maíz hasta reportes mas recientes, se ha empleado la técnica de PCR para el análisis de las líneas transformadas. Por ejemplo, Fromm *et al* (1990) utilizaron esta técnica para identificar el promotor CaMV 35S y el gen *bary* y Walters *et al* (1992) confirmaron, en callos de maíz, la presencia del gen *gus* al igual que Zhang *et al* (2002). En este caso se empleó la técnica de PCR para verificar la presencia del gen G del virus de rabia. Como se muestra en la figura 18, se logró amplificar las bandas correspondientes al tamaño esperado de 1492 pares de base que es el peso del gen de la glico proteína del virus de rabia, sin embargo, las bandas se muestran apenas perceptibles para las líneas S15, S16, S37, S2 y S11 e imperceptibles en las líneas restantes.

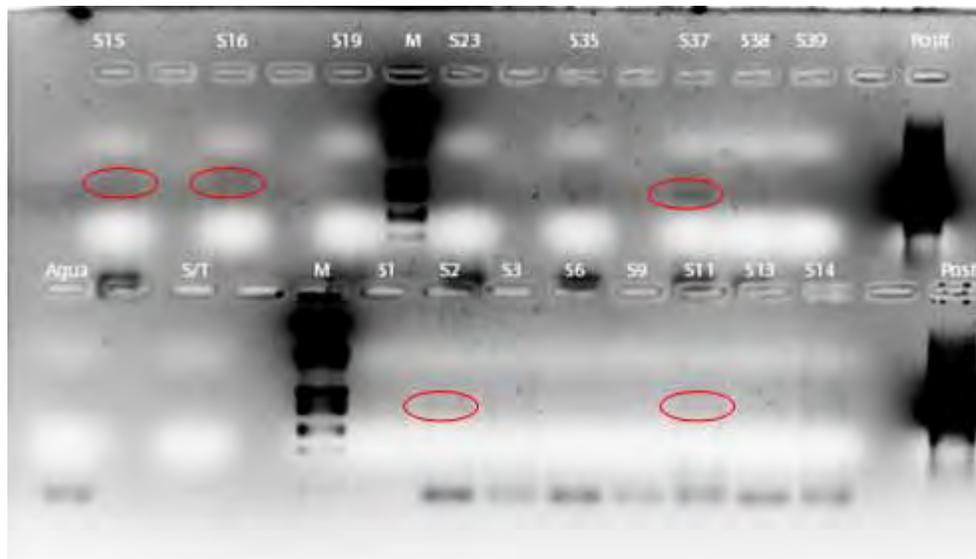


Fig 18. Detección del gen de la proteína G del virus de la rabia por PCR en plantas de maíz transformadas. **M**: marcador DNA λ digerido con *EcoRI*/*HindIII*; **CN**: Agua; **C+**: gen de la glicoproteína del virus de rabia (1492 pb); **S/T**: planta sin transformar; S1, S2, S3, S6, S9, S11, S13, S14, S15, S16, S19, S23, S35, S37, S38 y S39: plantas de maíz transformadas. Los óvalos delimitan las bandas de interés.

Hibridación de membrana de los productos de PCR con sonda radiomarcada con ^{32}P .

Debido a lo anterior, se procedió a transferir los productos de PCR contenidos en el gel de agarosa a una membrana de nylon e hibridarla con la sonda de la glicoproteína para asegurar la presencia de la banda correspondiente al transgen de interés en las muestras. De la hibridación se pudo determinar la presencia de la banda de interés en 12 de las 16 líneas analizadas en total (figura 19), sin embargo se aprecia también la presencia de una segunda banda que se supone, corresponde a los oligos que se están pegando un poco más al interior del gen.

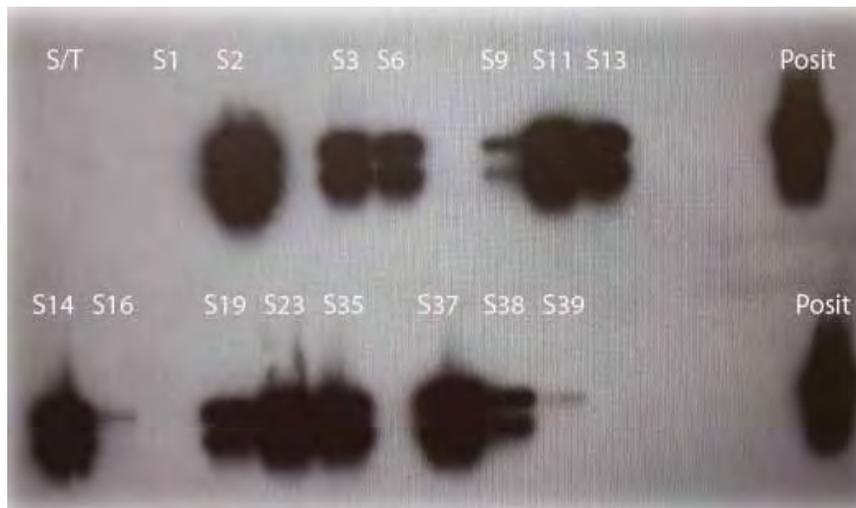
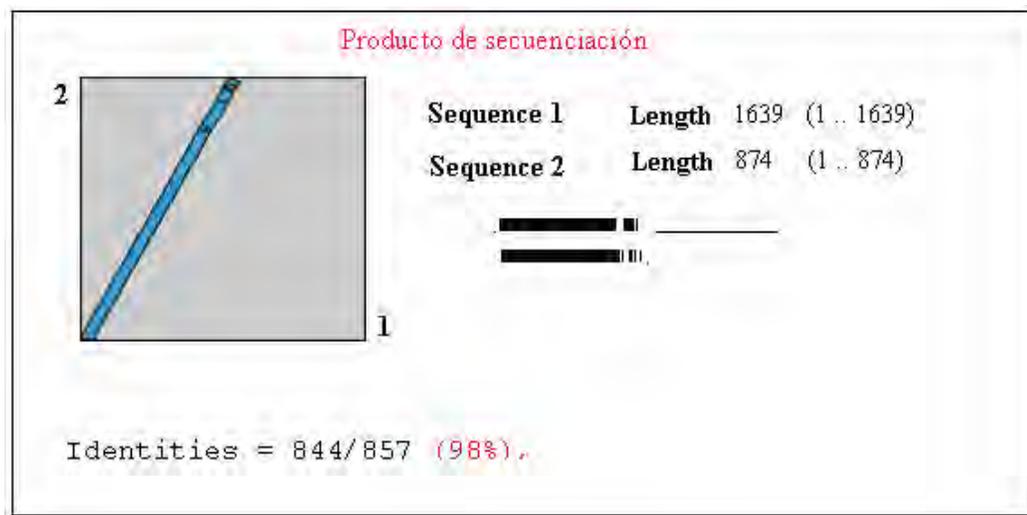


Fig 19. Hibridación de los productos de PCR con la sonda del gen de la proteína G del virus de rabia. **S/T**: planta sin transformar; **C+**: gen de la glicoproteína del virus de rabia (1492 pb); S1, S2, S3, S6, S9, S11, S13, S14, S16, S19, S23, S35, S37, S38 y S39 corresponden a las muestras seleccionadas en base al resultado obtenido por PCR:

En base a este resultado, se procedió a clonar la banda, a partir del producto de PCR, que se observó al mismo nivel respecto al control positivo para asegurar que es, efectivamente, el transgen de interés mandándose a secuenciar. El resultado del alineamiento de secuencias (BLAST) indicó que la banda alineada a la misma altura que la correspondiente al control positivo, pertenece con una identidad del 98% al gen de la glicoproteína del virus de rabia (gráfica 5) indicando, por lo tanto, que las líneas S2, S3, S6, S11, S13, S14, S19, S23, S35, S37 y S38 incorporaron el transgen de la proteína G del virus de rabia en su genoma es decir, el 73.33% de las líneas analizadas confirmando que se logró obtener plantas transgénicas de maíz.



Gráfica 5. Producto de secuenciación indicando el porcentaje de identidad (en rojo) de la comparación entre las bandas de interés (producto de la hibridación) y la secuencia Vnukovo-32 reportada en NCBI con número de acceso X71879.

En el presente trabajo se empleó el cobombardeo. Para este caso, los dos plásmidos son mezclados durante el proceso de cubierta de los proyectiles; conjuntamente, las concentraciones de los plásmidos deben ser ajustados para prevenir la segregación inducida al ADN de los proyectiles. La posibilidad de que dos o más plásmidos adheridos a un simple proyectil y más de un gen estén siendo incorporados dentro del genoma del tejido blanco es, en teoría, considerablemente menor que cuando los genes de interés están siendo acarreados en el mismo plásmido (Southgate *et al*, 1995).

No obstante, se logró obtener, como se mencionó anteriormente, un 73.33% de plantas transgénicas que demostraron poseer el transgen de interés debido a que se ajustaron las concentraciones de los plásmidos de tal manera que, el plásmido con el gen de la glicoproteína del virus de rabia estuvo a una concentración 9 veces mayor con respecto al plásmido que portó el gen de selección y el gen reportero. Autores como Guerrero-Andrade (1998, 2000) y Rojas-Anaya (2005) han empleado el cobombardeo para expresar transgenes en maíz y zanahoria, respectivamente, obteniendo resultados satisfactorios.

La biobalística ha permitido la transformación de cereales importantes como el maíz (Fromm *et al*, 1990; Gordón-Kamm *et al*, 1990), avena (Sommers *et al*, 1992), trigo (Vasil *et al*, 1992), centeno (Wan y Lemaux, 1994) y arroz (Li *et al*, 1993). Asimismo, en la mayoría de las publicaciones de transformación en maíz, las plantas transgénicas fértiles se han

regenerado de células obtenidas en suspensión a partir de callo embriogénico tipo II (Fromm *et al*, 1990; Gordon-Kamm *et al*, 1990; Murry *et al*, 1993; Vain *et al*, 1993) o directamente de este tipo de callo (Genovesi *et al*, 1992; Walters *et al*, 1992).

El maíz ha sido empleado como un sistema de expresión de proteínas con las siguientes finalidades: A) conferirle características de resistencia a plagas: Koziel *et al* (1993) expresaron una versión truncada de un gen sintético que codifica para la proteína CryIA derivada del *Bacillus thuringiensis*; Murry *et al* (1993) mencionan el primer ejemplo de una protección contra el virus del mosaico del enanismo del maíz (cepa MDMV-cp); Jansens *et al* (1997) estudiaron la protección dada por las plantas transgénicas que expresan la proteína Cry9C cuando se expusieron a la larva del barrenador europeo a nivel de campo; Williams *et al* (1997) evaluaron la expresión de la proteína insecticidal Bt δ -endotoxina contra el daño a depredación de hoja por el gusano y el barrenador del maíz del sudoeste en pruebas de campo. B) como productoras de proteínas: Kusnadi *et al* (1998) obtuvieron la expresión de la β -glucuronidasa y la avidina Rascon *et al* (2004) obtuvieron plantas transgénicas de maíz que expresaron la amarantina y Grandó *et al* (2005) lograron acumular de manera diferencial la proteína VSP β de soya y C) como sistemas de expresión de antígenos para vacunas comestibles: Streatfield *et al* (2001) expresaron la proteína S del TGEV en maíz contra la gastroenteritis en cerdo; Lamphear *et al* (2002) expresaron el antígeno de la subunidad B de *E. coli* en granos de maíz; Chikwamba *et al* (2002) expresaron LT-B para la producción de una vacuna en maíz; Streatfield *et al* (2003) evaluaron la acumulación del receptor de unión de la subunidad B de la toxina labil al calor (Lt) de *E. coli*; Lamphear *et al* (2004) evaluaron la vacuna comestible del virus de la gastroenteritis y Ticket *et al* (2004) valoraron la producción de IgA en voluntarios que consumieron maíz transgénico con LT-B.

Las plantas transgénicas como el maíz que expresen antígeno en su tejido comestible podrían ser usadas como un sistema de producción y liberación de vacunas orales accesibles, llevándose a cabo la inmunización a través del consumo de esta "vacuna comestible". La selección de cual antígeno usar en los estudios iniciales, ha sido fuertemente influenciada por el deseo de determinar si la planta transgénica que contienen los antígenos foráneos resultará en una inmunización oral estimulando la respuesta inmune de mucosas (Mason, 2002).

La idea de expresar el gen de la proteína G del virus de la rabia en plantas de maíz, cumple con el requisito anteriormente mencionado. La proteína G ha sido extensamente estudiada desde hace varios años por su participación en la neurovirulencia e inmunogenicidad del virus así como el papel que desempeña en su ciclo de replicación, incluyendo la interacción con las células huésped a través de la molécula receptora de superficie celular (Nakahara *et al*, 2003); pero sobretodo, la glicoproteína del virus de rabia ha sido identificada como el principal antígeno que induce inmunidad protectora contra el virus de la rabia. Así mismo, la protección contra la infección del virus de rabia es, probablemente, el resultado de muchas interacciones entre hospedero-efector: como la producción de anticuerpos neutralizantes de virus (ANV) que son inducidos únicamente por la proteína G y que tienen un papel importante en la inmunoprotección contra la rabia (Diestzschold *et al*, 1990), así como la unión al blanco de VNA y blanco para células T citotóxicas y cooperadores (Gaudin *et al*, 1992).

Autores como Yusibov *et al* (1997), Moldeska *et al* (1998) y, nuevamente, Yusibov *et al* (2002) han obtenido resultados preliminares alentadores de una vacuna comestible para rabia; cabe mencionar que estos autores no emplean el bombardeo de partículas para la expresión de los transgenes de interés por lo que el presente trabajo constituye un ejemplo del empleo de esta técnica para la expresión del principal antígeno de rabia.

Por todo lo anterior, la proteína G del virus de rabia representa una elección lógica para el desarrollo de una vacuna comestible pudiendo ser empleada para la inmunización contra rabia en animales y tal vez en un futuro próximo en humanos; aunque es más probable en animales (Mason, 1995). Otra razón es el hecho de que la proteína relevante al ser expresada en tejido vegetal, que constituye una proporción principal de la dieta, no requiere tratamiento de calor y presión (Daniell *et al*, 2001).

Además, la producción de vacunas tradicionales para animales de importancia económica esta limitada por el costo de fabricación; en cambio, la producción basada en plantas es una alternativa obvia cuando los procesos tradicionales de vacunas no son posibles de llevarse a cabo, por ejemplo, en casos cuando el virus mata al hospedero (Gleba *et al*, 2005). Por último, el objetivo de una planta transgénica no es sólo la capacidad de expresar una característica útil, sino también la de expresar proteínas de valor farmacéutico debido a la necesidad práctica de una nueva tecnología para la producción y liberación de vacunas no caras.

9) CONCLUSIONES.

- Se estableció la inducción, proliferación y mantenimiento de callos embriogénicos de maíz de la raza Tuxpeño exhibiendo las características propias de un tipo II.
- La selección de callos embriogénicos se llevó a cabo en la concentración de 3 mg/L del herbicida Basta®, resultando ser ésta la concentración óptima en medio de cultivo con fuentes de nitrógeno reducido.
- La expresión transitoria dio positiva en los callos co-bombardeados con la mezcla de plásmidos así como en el control positivo, indicando la expresión del gen *gus*.
- Se logró la regeneración de plantas completas de maíz a partir de callos co-bombardeados con las dos mezclas de plásmidos que portaban el transgen de interés: pWR-21/UB1 + pCAMBIA 3301 y PGHCNS + pCAMBIA 3301.
- Se demostró la presencia del gen de la proteína G del virus de la rabia en un 73.33% de las líneas analizadas.

10) ANEXO.

Medio de cultivo N₆ modificado (Chue et al., 1975)

a) Soluciones de macro y micronutrientes.

Solución I.

COMPUESTO	PM (g)	(mgL ⁻¹)	(mgL ⁻¹)	STOCK 10X (mML ⁻¹)
KNO ₃	101.10	2830	28.00	280
CaCl ₂ .7H ₂ O	147.02	166	1.13	11.3
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.48	185	0.75	7.5
KH ₂ PO ₄	136.09	400	2.94	29.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	132.06	463	3.50	35.0

Para 1 litro de medio se toman 100 ml de esta solución.

Solución II.

COMPUESTO	PM (g)	(mgL ⁻¹)	(uML ⁻¹)	STOCK 100X (uML ⁻¹)
MnSO ₄ .H ₂ O	169.01	5.97	35.32	3532
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.54	1.50	5.21	521
H ₃ BO ₃	61.83	1.60	25.87	2587
KI	166.01	0.80	4.82	482

Solución III.

COMPUESTO	PM (g)	(mgL ⁻¹)	(uML ⁻¹)	STOCK 100X (uML ⁻¹)
FeSO ₄ .7H ₂ O	278.03	27.80	100.00	10,000
C ₁₄ H ₄ N ₂ O ₁₀ Na ₂ .H ₂ O	372.30	37.30	100.00	10,000

Para 1 litro de medio tomar 10 ml de cada una de las soluciones II y III.

b) Fuente de Carbono.

COMPUESTO	PM (g)	(gL ⁻¹)	(mML ⁻¹)
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ (sacarosa)	342.31	30	87.63

c) Reguladores de crecimiento.

REGULADOR	PM (g)	(mgL ⁻¹)	(uML ⁻¹)	STOCK 10X(uML ⁻¹)
2,4-D	221.04	1.0	4.52	45.2
Cinetina	215.21	1.0	4.64	46.4

Para agregar 2 mg del regulador correspondiente a 1 litro de medio se toman 20 ml de la solución stock correspondiente; para 1 mg se toman 10 ml.

d) Aminoácidos y otros.

COMPUESTO	PM(g)	(mgL ⁻¹)	(μML ⁻¹)	STOCK10X (uML ⁻¹)
C ₂ H ₅ NO ₂ (Glicina)	75.07	1.0	13.32	133.2
C ₅ H ₅ N ₅ . ½ H ₂ SO ₄ (Adenina)	184.20	10.0	54.30	543.0

Para añadir 1.0 mg de glicina ó 10 mg de adenina al medio de cultivo correspondiente se toman 10 ml de la solución stock por litro de medio.

e) Vitaminas R2.

COMPUESTO	P.M. (g)	(mgL ⁻¹)	(μML ⁻¹)	STOCK (μM)
Inositol	180.160	100	555	5.5X10 ⁻⁴
Ácido nocotínico	123.110	1.0	8.12	812
Tiamina	337.270	2.0	5.93	593
Piridoxina	205.640	1.0	4.90	490

Para preparar un litro de medio se toman 10 ml de cada una de las soluciones.

f) Mezcla de aminoácidos y vitaminas denominada cócktel 20 (Patente en trámite).

Material Biológico (Plásmidos).



(a) PGHCNS



(b) pWR-21/UBI



(c) pCAMBIA 3301

Figura A. Esquemas de los plásmidos empleados para la transformación de callos embriogénicos de maíz por cobombardeo con pistola de baja presión. MARS (región de adherencia a membranas), UBI (promotor de Ubiquitina), pWR-21 (gen de la glicoproteína de la cepa del mismo nombre), TER35S (terminador del 35S), CaMV35S (promotor del virus del mosaico de la coliflor), TER35S (terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor), BAR (gen que codifica para la enzima PAT), GUS (gen que codifica para la enzima β-glucuronidasa) y TERNOS (terminador de la nopalina sintetasa).

Preparación de las partículas de tungsteno de acuerdo a Guerrero-Andrade (1998).

1. Se pesaron 60 mg de partículas de tungsteno de 0.4 μm de diámetro (M5) colocándose en un tubo de centrifuga de 15 ml.
2. Después se añadieron 2 ml de ácido nítrico (HNO_3) 0.1 M y se sónico en hielo durante 20 minutos.
3. Posteriormente se eliminó el ácido nítrico agregándose 1 ml de agua desionizada estéril; la muestra se transfirió a un tubo de 2 ml de capacidad y se sónico brevemente.
4. Las micropartículas se centrifugaron de 10-30 segundos a una velocidad de 10,000 r.p.m.
5. Se eliminó el agua y se agregó 1 ml de etanol absoluto (100%) y se sónico brevemente.
6. Se centrifugaron las micropartículas de 10 a 30 segundos a una velocidad de 10,000 r.p.m.
7. El etanol se eliminó, se agregó 1 ml de agua desionizada estéril y se sonicó brevemente.
8. Se colocaron 200 μl de la suspensión en un tubo eppendorf.
9. Después, se añadieron 750 μl de agua desionizada estéril a cada tubo.
10. finalmente los tubos se almacenaron a -20°C .

Adsorción del DNA a las micropartículas (Klein et al, 1988)

1. En tubos eppendorf se colocaron 50 μl de la suspensión de micropartículas de tungsteno, después se adicionaron los siguientes reactivos uno a uno, agitando bien la suspensión entre cada reactivo.
2. Se adicionaron 5 μl de DNA ($1\ \mu\text{g}\ \mu\text{l}^{-1}$) como volumen final de dos ensayos de co-bombardeo donde se mezclaron las siguientes cantidades 4.5 μl de pWR-21/pUBI (vector con el gen de interés) + 5 μl de pCAMBIA 3201 (vector con el gen de selección y gen reportero) para el primer co-bombardeo. En el segundo co-bombardeo la mezcla consistió en: 4.5 μl de PGHCNS-MARS + 0.5 μl de pCAMBIA 3201.
3. 50 μl de cloruro de calcio (CaCl_2) 2.5 M.
4. 20 μl de espermidina 0.1 M.
5. La mezcla se agitó en vortex (velocidad baja) durante 5 minutos.
6. Posteriormente, se centrifugó en un periodo de 5 a 10 segundos.
7. Se eliminaron 100 μl del sobrenadante.
8. Las micropartículas se resuspendieron en el líquido remanente.
9. Finalmente, se aplicaron 2.5 μl de las micropartículas cubiertas con el DNA en el centro del filtro de bombardeo.

Soluciones para la preparación del sustrato de X-Gluc™

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (mM)	STOCK 10X	CANTIDAD PARA 25 ml DE SUSTRATO (ml)
Amortiguador de fosfatos de sodio (pH 7.0)	100	1M	2.5
EDTA	10	100 mM	2.5
Ferrocianuro de K	0.5	5 mM	2.5
Ferricianuro de K	0.5	5 mM	2.5
Tritón X-100	0.5	5 mM	2.5
X-Gluc*	1 mg		25 mg

*se tiene que disolver en DMSO previamente

La mezcla se afora a 25 ml con agua desionizada estéril y su almacenamiento es a -20°C.

Soluciones para llevar a cabo la expresión transitoria.

a) Buffer "Z"*

REACTIVO	CONCENTRACION (mM)	CANTIDAD EN g PARA 500 ML
Fosfato de sodio (monobásico)	40	2.76
Fosfato de sodio (dibásico)	60	4.26
Cloruro de potasio	10	0.37
Sulfato de magnesio (heptahidratado)	1	0.12

El pH se ajusta a 7.0

b) Etanol al 70%

CANTIDAD DE ETANOL ABSOLUTO (ml)	CANTIDAD DE AGUA DES/EST (ml)
350	150

c) Mezcla Acetona-Metanol (1:3)

CANTIDAD DE ACETONA (ml)	CANTIDAD DE METANOL (ml)
166	498

d) Glicerol al 50%*

CANTIDAD DE GLICEROL ABSOLUTO (ml)	CANTIDAD DE AGUA DES/EST (ml)
250	250

*Esterilizar en autoclave durante 18 minutos a 1.3 kg/cm⁻² o 18 lb/pulg⁻²

Colecta de las muestras de planta.

1. Se etiquetaron tubos eppendorf estériles suficientes para colocar la muestra de planta.
2. Para cada corte de la muestra se limpiaron pinzas y tijeras con alcohol de 96 °C y se seleccionaron hojas sanas, de color homogéneo y tamaño regular.
3. Se cortó un fragmento de hoja de aproximadamente 200 mg dando preferencia al ápice de la misma. La planta no debe tocarse con las manos desnudas.
4. Se colocó con cuidado la muestra en el tubo eppendorf con ayuda de pinzas.
5. Las muestras se guardaron a - 70 °C en caso de no ocuparse inmediatamente.

Procesamiento de las muestras.

1. En un recipiente con nitrógeno líquido, se colocaron los tubos eppendorf con las muestras de hojas y, además, pinzas y espátulas.
2. En un mortero con pistilo de porcelana estéril, se enfrió previamente con nitrógeno líquido.
3. Una vez que el mortero y el pistilo estuvieron lo suficientemente frío, se adicionó más nitrógeno líquido e inmediatamente se vertió, del tubo eppendorf, la muestra de hoja. El tubo se devolvió al recipiente con nitrógeno y se procedió a moler el fragmento de hoja.
4. A medida que se fue moliendo se le agregó mas nitrógeno líquido de tal manera que la muestra nunca se descongeló.
5. Cuando se obtuvo un polvo fino y muy homogéneo se procedió a guardarlo en el tubo eppendorf original con ayuda de una espátula previamente enfriada en el nitrógeno.
6. Las muestras se almacenaron a -70°C en caso de no ocuparse inmediatamente.

Extracción de DNA genómico de plantas regeneradas.

1. En un tubo de centrifuga se peso 200 mg de hoja de maíz.
2. Se molió la muestra con nitrógeno líquido, evitando que se descongelara, hasta obtener un polvo fino y uniforme. Si la muestra no se utilizaría en ese momento se guardó en congelador a -70°C .
3. A la muestra sólida molida se le adicionó 300 μl de buffer de extracción Plant DNAzol® (Invitrogen, USA) mas 1.5 μl de RNAasa A (Invitrogen, USA).
4. Se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 30 minutos.
5. Posteriormente, se le adicionó a la muestra 300 μl de una mezcla de Fenol:Cloroformo (1:1 v/v) a 4°C agitándose vigorosamente durante 5 seg hasta obtener una mezcla uniforme.
6. La muestra se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se agitó cada minuto.
7. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugo a 15,000 r.p.m durante 5 minutos, formándose dos fases.
8. El sobrenadante se paso a un tubo de centrifuga nuevo procurando no llevarse residuos.
9. Se le agregó a la muestra 400 μl de Fenol:Cloroformo (1:1 v/v) a 4°C y se agitó vigorosamente hasta mezclar durante 5 segundos.
10. Se centrifugó nuevamente por 5 minutos a 15,000 r.p.m formándose dos fases.

11. El sobrenadante se transfirió a un tubo de centrifuga nuevo y se repitió lo establecido en el paso 9, 10 y 8.
12. Se adicionó 300 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mezcló vigorosamente.
13. La muestra se centrifugó a 15,000 r.p.m durante 5 minutos formándose dos fases.
14. Se procedió a pasar el sobrenadante a un tubo de centrifuga nuevo procurando no llevarse residuos.
15. Se adicionó 300 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mezcló vigorosamente.
16. La muestra se centrifugó a 15,000 r.p.m durante 5 minutos formándose dos fases.
17. Se pasó el sobrenadante a un tubo de centrifuga nuevo procurando no llevarse residuos.
18. A la muestra se le adicionó 400 μ l de isopropanol (al 100%) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se invirtió de 5 a 8 veces para que la muestra quedara mezclada.
19. Se centrifugó a 8000 r.p.m durante 5 minutos.
20. Una vez que se obtuvo la pastilla se tiró el sobrenadante.
21. Se adicionó a la pastilla 1 ml de etanol (al 70%) y se invirtió vigorosamente de 5 a 8 veces.
22. Nuevamente se centrifugó a 12,000 r.p.m durante 5 minutos.
23. Se eliminó el etanol.
24. A la muestra se le permitió reposar para evaporar el etanol restante.
25. La pastilla, finalmente, se resuspendió en 100 μ l de agua desionizada estéril.
26. Las muestras se guardaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preparación de la sonda.

a) Digestión.

1. La construcción de pUC-pss/ pWR-21 se digirió con las siguientes enzimas: Kpn I/Sac I.
2. La digestión se realizó en la siguiente mezcla respetando el orden:
 - 14 μ l de agua desionizada estéril
 - 2 μ l de buffer 1
 - 1 μ l de Kpn I
 - 1 μ l de Sac I
 - 2 μ l pUC-PSS/pWR-21

3. Se agitó suavemente en el vortex
4. Se centrifugó brevemente por 5 segundos para concentrar la mezcla en el fondo del tubo.
5. Se dejó incubando a 37 °C durante 1 hora.
6. Una vez transcurrido este tiempo, se preparó un gel de agarosa al 1 %.
7. Se cargó el gel con 20 µl de la mezcla mas 5 µl de buffer carga.

Se corrió a 60 Volts durante 20 minutos.

Purificación de DNA a partir de bandas de un gel.

1. Se pesó un tubo eppendorf de 1.5 ml y se registró este dato.
2. Con una navaja limpia se cortó del gel de agarosa la banda que contiene el DNA. Este corte se realizó lo mas cerrado posible a la banda y se colocó en el tubo eppendorf que previamente se peso.
3. Se pesó nuevamente el tubo que contenía la banda y con ese dato se determinó el peso real de la banda.
4. Al tubo se le agregó 10 µl de Buffer de captura por cada 10 mg de gel (la capacidad máxima es de 300 mg).
5. El tubo se mezcló vigorosamente por vortex.
6. Se incubó a 60 °C hasta que la agarosa se disolvió completamente (5-15 minutos).
7. Mientras se llevaba a cabo la incubación, se colocó una columna GFX en un tubo colector (para cada purificación que se vaya llevar a cabo).
8. Una vez que la agarosa estuvo completamente disuelta, el tubo se centrifugó brevemente para coleccionar la muestra en el fondo del tubo.
9. La muestra se transfirió a la columna GFX e incubo a temperatura ambiente durante 1 minuto.
10. Se centrifugo a una velocidad de 10,000 a 16,000 x g durante 30 segundos.
11. El residuo del tubo colector se desecho y se colocó nuevamente la columna GFX en el interior del tubo colector.
12. Se adicionó 500 µl del buffer de lavado a la columna y se centrifugó a una velocidad de 10,000 a 16,000 x g durante 30 segundos.
13. Se desechó el tubo colector y se transfirió la columna GFX a un tubo nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml.
14. Se adicionó 50 µl de buffer de elución (10 mM Tris-HCl pH 8.0, TE pH 8.0 o agua desionizada estéril) directamente al centro de la matriz de la columna.
15. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto.

16. Se centrifugo nuevamente a 10,000 x g durante 1 minuto.

Se guardó la muestra a -20 °C.

Análisis de Varianza (ANOVA) del peso fresco de callos embriogénicos con fuentes de nitrógeno reducido a una $p \leq 0.05000$.

Tratamientos	SS Efecto	gl Efecto	SM Efecto	SS Error	gl Error	SM Error	F	p
T1	26.15178	11	2.377443	1.263120	48	0.026315	90.34555	.00000
TII	7.83470	11	0.712245	0.937200	48	0.019525	36.47863	.00000
TIII	4.28762	11	0.389784	2.421120	48	0.05044	7.72767	.00000
TIV	2.83158	11	0.257416	0.830280	48	0.017297	14.88171	.00000

Análisis de Varianza (ANOVA) del peso fresco de callos embriogénicos sin fuentes de nitrógeno reducido a una $p \leq 0.05000$.

Tratamientos	SS Efecto	gl Efecto	SM Efecto	SS Error	gl Error	SM Error	F	p
T1	10.2438	11	0.931261	3.6468	48	0.075975	12.25747	.00000
T2	5.9561	11	0.541470	1.332960	48	0.02777	19.49836	.00000
T3	2.9058	11	0.264164	0.953640	48	0.019868	13.29627	.00000
T4	2.2184	11	0.201679	1.343320	48	0.27986	7.20648	.00000

11) BIBLIOGRAFÍA.

Ammirato, P. V. (1973). Some Effects of Abscic Acid on the Development of Somatic Embryos From Cells Caraway (*Carum caru* L.) *Bot Gaz* **135**: 328-337.

Ammirato, P. V. (1983). Embryogenesis. In: Handbook of Plant Cell Culture, Vol. I. D.A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato & Y. Yamada (eds) MacMillan, New York; USA. pp. 82-123.

Armstrong, C. L. & C. E. Green (1985). Establishment and Maintenance of Friable Embryogenic Maize Callus and the Involvement of L-Proline. *Planta* **164**: 207-214.

Arntzen, Charles J. (1997). High-Tec Herbal Medicine: Plant-Based Vaccines. *Nature Biotechnol* **15**: 221-222.

Arteaga, N. Richard (1996). Plant Growth Substances: Principles and Applications. 1a ed. Ed. Chapman & Hall, USA. pp. 332.

Aulinger, I. E., S. O. Peter, J. E. Schmid and P. Stamp (2003). Gametic Embryos of Maize as a Target for Biolistic Transformation: Comparison to Immature Zygotic Embryos. *Plant Cell Rep* **21**: 585-591.

Bajaj, Y. & Bidani, P. S. (1980). Enhancement on the *in vitro* Development of Triticale Embryos by the Endosperm of Durum Wheat. *Cereal Res Commun* **8**: 359-364.

Baudino Sylvie, Sussane Hansen, Reinhold Brettschneider, Valerie F. G., Thomas Dresselhars, Horst Lörz, Christian Dumas, Peter M. Rogowsky (2001). Molecular Characterization of Two Novel Maize LRR Receptor-Like Kinases, which Belong to the SERK Gene Family. *Planta* **213**: 1-10.

Bayliss, M. W. (1980). Chromosomal Variation in Plant Tissue Culture. *Int Rev Cytol Suppl* **11A**: 113-124.

Beckert, M. (1982). Importance of the Scutellum in Obtaining *in vitro* Regeneration of Maize. *Agronomie* **2**: 611-615.

Benmansour A., Brahimi M., Tuffereau C., Coulon P., Lafay F., and Flamand A (1992). Rapid Sequence Evolution of Street Rabies Glycoprotein is Related to the Highly Heterogeneous Nature of the viral Population. *Virology* **187**: 33-45.

Bohorova N, Luna B, Brito RM, Huerta LD, Hoisington DA (1995). Regeneration Potencial of Tropical, Subtropical, Midaltitude, and Highland Maize Inbreds. *Maydica* **40**: 275-281.

Broseman, F.B.F., W.J.F. van Oostveen & A.A.M. van Lammeren (1997). Comparative Analysis of Callus Formation and Regeneration on Culture Inmmature Maize Embryos of the Inbred Lines A188 and A632. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **50**: 57-65.

Carvalho, C. H. S., Bohorova, P. N., Bordello, L. L., Abreu, F. H. Valicente, W. Versan & E. Paiva (1997). Type II Callus Production and Plant Regeneration in Tropical Maize Genotypes. *Plant Cell Rep* **17**: 73-76.

Castañedo, F. N. (1990). El Maíz. 4ª ed. Ed. Limusa, México. pp. 76.

Centro de Investigaciones Agrarias C.I.A. (1980). El Cultivo del Maíz en México. 1ª Ed. México, DF. pp 11-42.

- Chikwamba RK, Cunnick J, Hathaway D, McMurray J, Mason H, Wang K (2002). A Functional Antigen in a Practical Crop: LT-B Producing Maize Protect Mice Against *Escherichia coli* Heat Labile Enterotoxin (LT) and Cholera Toxin (CT). *Transgenic Res* **11**: 479-493.
- Christensen, A. H., Sharrock, R. A. and Quail, P. H. (1992). Maize Polyubiquitin Genes: Structure, Thermal Perturbation of Expression and Transcript Splicing and Promoter Activity Following Transfer to Protoplast by Electroporation. *Plant Mol Biol* **18**: 675-689.
- Christou, Paul (1995). Particle Bombardment. In: *Methods in Cell Biology*, Vol. 50. Academic Press, Inc. pp 375-382.
- Chu, CC., CC. Wang, C.S. San, C. Hsu, KC. Yin, CY. Chu & F. Y. B. (1975). Establishment of an Efficient Medium for Anther Culture of Rice Through Comparative Experiments on the Nitrogen Sources. *Scientia Sinica* **18**: 659-668.
- Close, K. R. & L. A. Ludeman (1987). The Effect of Auxin-Like Plant Growth Regulators and Osmotic Regulation on Induction of Somatic Embryogenesis from Elite Maize Inbreds. *Plant Science* **52**: 81-89.
- Collins, G. B. & J. W. Grosser (1984). Culture of Embryos. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 1, Academic Press, Inc., New York; USA. pp 241-257.
- Cornejo M, Luth D, Blankenship KM, Anderson OD & Blenchl, AE (1993). Activity of a Maize Ubiquitin Promotor in Transgenic Rice. *Plant Mol Biol* **23**: 558-567.
- Daniell, Henry, Stephen J. Streatfield and Keith Wycoff (2001). Medical Molecular Farming: Production of Antibodies, Biopharmaceuticals and Edible Vaccines in Plants. *Trends in Plants Science* **6**: 219-225.
- De Block, M., J. Botterman, M. Vandewiele, J. Dockx, C. Thoen, V. Gossele, N. Rao Movva, C. Thompson, M. Van Montagu and J. Leemans (1987). Engineering Herbicide Resistance in Plants by Expression of a Detoxifying Enzyme. *The EMBO Journal* **6**(9): 2513-2518.
- Delano, James, Anna-Mary Schmidt, Erika Wall, Margaret Green and Saad Masri (2003). Reliable Detection and Identification of Genetically Modified Maize, Soybean and Canola by Multiplex PCR Analysis. *J Agric Food Chem* **51**: 5829-5834.
- Devlin, R (1982). *Fisiología Vegetal*. Ed. Omega, Barcelona, España. pp 293.
- D'Halluink, Bonne E, Bossut M, De Beuckeleer M, Leemans J (1992). Transgenic Maize Plants by Electroporation. *Plant Cell* **4**: 1495-1505.
- Dietzschold Bernhard, Milind Gore, Dawn Marchadier, Hong-Shun Niu, Hans M. Bunschoten *et al* (1990). Structural and Immunological Characterization of Linear Virus-Neutralizing Epitope of the Rabies Virus Glycoprotein and Its Possible Use in a Synthetic Vaccine. *J of Virology* **34**: 3804-3809.
- Domínguez, O. J (2004). Comportamiento Epidemiológico de la Rabia en México. *AMMVEPE* **12**(3): 68-72.

Dowswell, C.D., Paliwal, R. L. & Cantrell, R. P. (1996). Maize in the Third World. 2a Ed. Westview Press, Boulder, Co., USA. pp 110.

Duncan D, Williams ME, Zehr BE, Widholm JM (1985). The Production of Callus Capable of Plant Regeneration from Immature Embryos of Numerous *Zea mays* Genotypes. *Planta* **165**: 322-332.

Emons AMC, Syrrallo-Droppers A & Van der Toorn C (1993). The Influence of Sucrose, Mannitol, Abscisic Acid and Gibberellic Acid on the Maturation of Somatic Embryos of *Zea mays* L. From Suspension Cultures. *J Plant Physiol* **142**: 597-604.

Emons, A. M. C & H. Kieft (1995). Somatic Embryogenesis in Maize (*Zea mays* L.). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 31. Y. S. P. Bajaj (ed) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg pp 24-39.

Fisher R, Stoger E, Schillberg S, Christou D, Twyman RM (2004). Plant Based Production of Biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 152-158.

Frame, Bronwyn F., Paul R. Drayton, Susan V. Bagnall, Carol J. Lewnau, W. Paul Bullock *et al* (1994). Production of Fertile Transgenic Maize Plants by Silicon Carbide Whisker-Mediated Transformation. *The Plant Journal* **6**: 941-948.

Franz, P. F. and J. H. N. Schel (1990). An Ultrastructural Study on the Early Development of *Zea mays* Somatic Embryos. *Can J Bot* **69**: 858-865.

Franz, P. F. and J. H. N. Schel (1991). Cytodifferentiation During the Development of Friable Embryogenic Callus of Maize (*Zea mays*). *Can J Bot* **69**: 26-33.

Fromm, M. E., Taylor, L-P. and Walbot, V (1990). Stable Transformation of Maize After Gene Transfer by Electroporation. *Nature* **319**: 791-793.

Fromm, Michael, E., Fionnuala Morrish, Charles Armstrong, Rosalind Williams, John Thomas and Theodore Klein (1990). Inheritance and Expression of Chimeric Genes in the Progeny of Transgenic Maize Plants. *Bio/Technology* **8**: 833-839.

Gallo-Meagher, M. and Irvine, J. E (1993). Effects of Tissue Type and Promoter Strength on Transient GUS Expression in Sugar Cane Following Particle Bombardment. *Plant Cell Rep* **12**: 666-670.

Gamborg O. L., Constabel F., and Miller, R. A. (1970). Embryogenesis and Production of Albino Plants from Cell Cultures of *Bromus inermis*. *Planta* **95**: 355-358.

Gaudin Y, Ruigrok R. W., Tuffereaud C., Kaosson M. & Flamand A (1992). Rabies Virus Glycoprotein is a Trimer. *Virology* **187**: 627-632.

Genovesi D, N. Willetts, S. Zachwieja, M. Mann, T. Spencer, C. Flick and W. Gordon-Kamm (1992). Transformation of an Elite Maize Inbred Through Microprojectile Bombardment of Regenerable Embryogenic Callus. *In Vitro Cell Dev Biol* **28**: 124A.

Giddings Glynis, Gordon Allison, Douglas Brooks and Adrian Carter (2000). Transgenic Plants as Factories for Biopharmaceuticals. *Nature Biotechnol* **18**: 1151-1155.

Gigant B., Iseni F., Gaudin Y., Knossow M., and Blondel B (2000). Neither Phosphorilation for the Amino-Terminal Part of Rabies Virus Phosphoprotein is Required for its Oligomerization. *J Gen Virol* **81**: 1757-1761.

Gleba, Y., Klimyuk and S. Marillonet (2005). Magnificcion: A New Platform for Expressing Recombinant Vaccines in Plants. *Vaccine* **23**: 2042-2048.

Gordon-Kamm, William, J., T. Michael Spencer, Mary Lou Angano, Thomas R. Adams, Richard J. Daines, William G. Start *et al* (1990). Transformation of Maize Cells and Regeneration of Fertile Transgenic Plants. *The Plant Cell* **2**: 603-618.

Grando, Magali F., Rex L. Smith, Cristina Moreira, Brian T. Scully and Robert G. Shatters (2005). Developmental Changes in Abundance of the VSP β Protein Following Nuclear Transformation of Maize with the Soybean vsp β cDNA. *MBC Plant Biology* **5**: 1-9.

Green, C. E. & Phillips, R. L. (1975). Plant Regeneration from Tissues Cultures of Maize. *Crop Sci* **15**: 417-420.

Green, C. E (1982). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from the Friable Callus of *Zea mays*. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture, Tokyo, Japan pp 107-108.

Green, C. E & C. A. Rhodes (1983). Plant Regeneration in Tissue Cultures of Maize. In: Maize and Biology. W. F. Shering (ed) pp 367-372.

Guerrero-Andrade, O. Tesis de Licenciatura: Transformacion de Celulas de Maíz (*Zea mays*, raza Tuxpeña) por medio del Bombardeo de Partículas. Facultad de Ciencias, UNAM., 1998.

Guerrero-Andrade, O. Tesis de Maestría: Construcción de vectores para la transformación de plantas con los genes de las glico proteínas de fusión y de la hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad aviar del Newcastle y optimización de las condiciones del bombardeo. C.I.N.V.E.S.T.A.V., IPN. Irapuato, 2000.

Hamaker, R, Bruce & Brian A. Larkins (2002). Maize Food and Feed: a Current Perspective and Consideration of Future Possibilities. In: Transgenic Plants and Crops. George G. Khachatourians, Alan McHughen, Ralph Scorza, Wai-Kit Nip (eds) Marcel Dekker, Inc., New York; USA. pp 637-654.

Halperin, W (1966). Alternative Morphogenetic Events in Cell Suspensions. *Amer J Bot* **53**: 443-453.

Hazel CB, Klein TM, Anis M, Wilde HD, Parrot WA (1998). Growth Characteristics and Transformability of Soybean Embryogenic Cultures. *Plant Cell Rep* **17**: 765-772.

Heuer Sigrid, Susanne Honsen, Jörg Batin, Reinhold Brettschneider, Erhard Kranz, Horst Lörz and Thomas Dresselhaus (2002). The Maize MADS Box Gene *ZmMADS3* affects Node Number and Spikelet Development and Is Co-Expressed with *ZmMADS1* During Flower Development, in Egg Cells, and Early Embryogenesis. *Plant Physiol* **127**: 33-45.

Hodges, T. K., K. K. Kamo, C. W. Imbrie and M. R. Becwar (1986). Genotype Specificity of Somatic Embryogenesis and Regeneration in Maize. *Bio/Technol* **4**: 219-223.

Holden, Marcia J., Joseph R. Blastic, Jr., Louis Bussjaeger, Chuan Kao, Luke A. Shokere, Donald C. Kendall *et al* (2003). Evaluation of Extraction Methodologies for Corn Kernel (*Zea mays*) DNA for Detection a Trace Amounts of Biotechnology-Derived DNA. *J Agric Food Chem* **51**: 2468-2474.

Hu, C and P. Wang (1986). Embryo Culture: Technique and Applications. In : Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 4. Evans, D. A., R. Sharp and P. V. Ammirato (eds) MacMillan Publishing Company, New York; USA pp 43-96.

Huang, X. Q. and Z. M. Wei (2004). High-Frequency Plant Regeneration Through Callus Initiation from Mature Embryos of Maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep* **22**: 793-800.

Ito Y., Nishizono A., Mannen K., Hiranatsu K., and Mitune K (1996). Rabies Virus M Protein Expressed in *Escherichia coli* and its Regulation Role in Virion-Associated Transcriptase Activity. *Arch Virol* **141**: 671-683.

Jansens, S., Adri van Vliet, Catherine Dickburt, Linda Buysse, Carla Piens, Bernadette Saey *et al* (1997). Transgenic Corn Expressing a Cry9 Insecticidal Protein from *Bacillus thuringiensis* protected from European Corn Borer Damage. *Crop Sci* **37**: 1616-1624.

Jefferson, R. A., Tony A. Kavanagh and Michael W. Bevan (1987). GUS Fusions: β -glucuronidase as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher Plants. *The EMBO journal* **6**: 3901-3907.

Kamada, H & H. Harada (1979a). Studies on the Organogenesis in Carrot Tissue Cultues. I. Effects of Growth Regulations on Somatic Embryogenesis and Root Formation. *Z. Pflanzenphysiol* **91**: 255-266.

Kamada, H & H. Harada (1979b). Studies on the Organogenesis in Carrot Tissue Cultures. II. Effects of Aminoacids and Inorganic Nitrogenous Compounds on Samatic Embryogenesis. *Z. Pflanzenphysiol* **91**: 453-463.

Kausch, A. P., T. R. Adams, M. Mangano, S. J. Zachwieja, W. Gordon-Kamm, Richard Saines, N. G. Willwts, S. A. Cahmbers, W. Adams, Jr., A. Anderson, G. Williams and G. Haines (1995). Effects of Microprojectile Bombardment on Embryogenic Suspension Cell Cultures of Maize (*Zea mays* L.) Used for Genetic Transformation. *Planta* **196**: 501-509.

Kemper, Edson Luis, Márcio José da Silva and Paulo Arruda (1996). Effect of Microprojectile Bombardment Parameters and Osmotic Treatment on Particle Penetration and Tissue Damage in Transiently Transformed Cultured Immature Maize (*Zea mays* L.) Embyos. *Plant Science* **121**: 85-93.

Kirkwood, R. C (1987). Herbicides and Plant Growth Regulators. In: Herbicides Vol. 6. D. H. Houston & T. R. Roberts (eds) Jonh Wiley & Sons, New York; USA. pp

Kissi B., Tordo N., and Bourhy H (1995). Genetic Ploymorphism in the Rabies Virus Nucleoprotein Gene. *Virology* **209**: 526-531.

Klein, T. M., Michael Fromm, Arthur Weissinger, Dwight Tomes, Steve Schaaf, Margit Sletten and Jonh C. Sanford (1988a). Transfer of Foreign Genes Into Intanc Maize Cells with High-Velocity Microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4305-4309.

Klein, T. M., T. Gradziel, M. E. Fromm and J. C. Sanford (1988b). Factors Influencing Gene Delivery Into *Zea mays* Cells by High-Velocity Microprojectiles. *Biotechnology* **6**: 559-563.

Klein, T. M. & Sandra Fitzpatrick-McElligott (1993). Particle Bombardment: a Universal Approach for Gene Transfer to Cells and Tissues. *Curr Opin Biotechnol* **4**: 583-590.

Koprowski, H. and V. Yusibov (2001). The Green Revolution: Plants as Heterologous Expression Vectors. *Vaccine* **19**: 2735-2741.

Korban, Schuyler S (2002). Targeting and Expression of antigenic Proteins in Transgenic Plants for Production of Edible Oral Vaccines. *In vitro Cell Dev Biol.-Plant* **38**: 231-236.

Koziel, M. G., Gary L. Beland, Cindy Bowman, Nadine B. Carozzi, Rebecca Crenshaw, Lyle Crosland, Jonh Dawson *et al* (1993). Field Performance of Elite Transgenic Maize Plants Expressing an Insecticidal Protein Derived from *Bacillus thuringensis*. *Bio/Technology* **11**: 194-200.

Kusnadi Ann R., Elizabeth e. Hood, Derrick R. Witcher, John A. Howard and Zivko L. Nikolov (1998). Production and Purification of Two Recombinant Proteins from Transgenic Corn. *Biotechnol Prog* **14**: 149-155.

Lamphear, Barry J., Stphen J. Streatfield, Joseph M. Jilka, Christopher A. Brooks, Donna K. Barker *et al* (2002). Delivery of subunit Vacines in Maize Seed. *Journal of Controlled Release* **85**: 169-180.

Lamphear, Barry J., Joseph M. Jilka, Lyle Kesl, M;ark Weltwer, Jonh A. Howard and Stephen J. Streatfield (2004). A Corn-Based Delivery System for Animal Vaccines: an Oral Transmissible Gastroenteritis Virus Vaccine Boost Lactogenic Immunity in Swine. *Vaccine* **22**: 2420-2424.

Langridge, William H. R (2000). Edible Vaccines. *Scientific American* **283**: 48-53.

Larkin, P. J. and W. R. Acowcroft (1981). Somaclonal Variation: a Novel Source of Variability From Cell Cultures for Plant Improvement. *Theoretical Appl Genet* **60**: 197-214.

Lea, J. Peter (1991). The Inhibition of Ammonia Assimilation: a Mechanism of Herbicide Action. In: *Herbicides*, Vol. 1. N. R. Baker and M. P. Percival (eds) Elsevier Science Publisher B. V. pp. 267-298.

Lee, Michael and Ronald L. Phillips (1988). The Chromosomal Basis of Somaclonal Variation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **39**: 413-437.

Li, L., Qu, R., de Kochka, A., Fauquet, C., Beachy, R. N (1993). An Improved Rice Transformation Systems Using the Biolistic Method. *Plant Cell Rep* **12**: 250-255.

López-Meyer, Melina, Ignacio E. Maldonado-Mendoza and Craig L. Nessler (2000). Transformation. In: *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. Second Edition, CRC Press, USA. pp. 297-303.

Lowe, Keith, Delia Barnes Taylor, Pat Ryan and Karol E. Paterson (1985). Plant Regeneration Via Organogenesis and Embryogenesis in the Maize Inbred Line B73. *Plant Science* **41**: 125-132.

Loza-Rubio E. Utilización de la proteína N del virus de la Rabia como inmunomodulador en vacunas de influenza aviar, y su evaluación inmunológica. Tesis de Doctorado. FMVZ-UNAM. 2003 p. 105.

Lu, C. and Vasil, I. K (1981). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Tissue Cultures of *Panicum maximum* Jacq. *Am J Bot* **69**: 77-81.

Lu, C., and P. Ozias-Akins (1982). Somatic Embryogenesis in *Zea mays* L. *Theor Appl Genet* **62**: 109-112.

Lu, C., V. Vasil and I. K. Vasil (1983). Improved Efficiency of Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Tissue Cultures of Maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet* **60**: 285-289. CHECAR ESTA BIBLIO XQUE LA CONFUNDI CON VASIL DE 1983.

Malaga P. and Graham, I (2004). Molecular Farming and Metabolic Engineering Promise a New Generation of High-Tec Crops. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 149-151.

Malcom, Devine, Duk O. Stephen & Fedtke Carl (1993) Physiology of Herbicide Action. Prentice Hall, New York. pp 274-279.

Mason, Hugh S. and Charles J. Artzen (1995). Transgenic Plant as Vaccine Production Systems. *Trends in Biotechnol* **13**: 388-392.

Mason, Hugh S (2002). Plant-Based Vaccines: Expression and Oral Immunogenicity. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* **38**: 237-240.

Mason, Hugh S., Heribert Warzecha, Tsafir Mor and Charles J. Artzen (2002). Edible plant Vaccines: Applications for Prophylactic and Therapeutic Molecular Medicine. *Trends in Molecular Medicine* **8**: 324-329.

Miele, Lucio (1997). Plants as Bioreactors for Biopharmaceuticals: Regulatory Considerations. *Trends in Biotechnol* **15**: 45-50.

Miesfeld, L. R (1999). Applied Molecular Genetics. Wiley-Liss, USA. pp. 293.

Moldeska Anna, Bernard Dietzschold, N. Sleysh, Zhen Fang Fu, Klaudia Steplewski, D. Craig Hooper, Hilary Koprowski and Vidadi Yusibov (1998). Immunization Against Rabies Plant-Derived Antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 2481-2485.

Morrish, F. M. and Michael E. Fromm (1992). Cereal Transformation Methods. *Curr Opin Biotechnol* **3**: 141-146.

Morrish, Fionnuala, David D. Songstad, Charles L. Armstrong and Michael Fromm (1993). Microprojectile Bombardment: A Method for the Production of Transgenic Cereal Crop Plants and the Functional Analysis of Genes. In: *Transgenic Plants*. A. Hiatt (ed), Marcel Dekker, Inc., New York; USA. pp. 133-171.

Murashige, T. & F. Skoog (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497.

Murry, L. E., Laurie G. Elliott, Sherry A. Capitant, Joanne A. West, Kimberly K. Hanson, Liliana Scarafia *et al* (1993). Transgenic Corn Plants Expressing MDMV strain B Coat Protein are

Resistant to Mixed Infections of Maize Dwarf Mosaic Virus and Maize Chlorotic Mottle Virus. *Biotechnology* **11**: 1559-1564.

Nakahara Tomomi, Harufusa Toriumi, Takashi Irie, Takuo Takahashi, Satoshi Ameyama, Masami Mizukoshi and Akihiko Kawai (2003). Characterization of a Slow-Migrating Component of the Rabies Virus Matrix Protein Strongly Associated with the Viral Glycoprotein. *Microbiol. Immunol.* **47**: 977-988.

O'Connor-Sánchez, A., J.L. Cabrera-Ponce, M. Valdez-Melara, P. Téllez-Rodríguez, J. L. Pons-Hernández and L. Herrera-Estrella (2002). Transgenic Maize Plants of Tropical and Subtropical Genotypes Obtained from Calluses containing Organogenetic and Embriogenia-Lika Structures derived from Shoot Tips. *Plant Cell Rep* **21**: 302-312.

Ozias-Akins, P and Vasil, I. K (1982). Plant Regeneration from Cultured Immature Embryos and Inflorescences of *Triticum aestivum* (wheat): Evidence for Somatic Embryogenesis. *Protoplasma* **39**: 95-105.

Pescitelli SM & Sukhapinda K (1995). Stable Transformation Via Electroporation into Maize Type II Callus and Regeneration of Fertile Transgenic Plants. *Plant Cell Rep* **14**: 712-716.

Prioli LM & Silva WJ (1989). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration Capacity in Tropical Maize Inbreds. *Rev Bras Genet* **12**: 553-566.

Poch O., Blumberg B. M., Bougueleret L., and Tordo N (1990). Sequence Comparison of Five Polymerases (L Proteins) of Unsegmented Negative-Strand RNA Viruses: Theoretical Assignment of Functional Domains. *J Gen Virol* **71**: 1153-1162.

Ráscon-Cruz, Q., S. Sinagawa-García, J. A. Osuna-Castro, N. Bohorova and O. Paredes-López (2004). Accumulation, Assembly, and Digestibility of Amarantin Expressed in Transgenic Tropical Maize. *Theor Appl Genet* **108**: 335-342.

Register III James, C., David J. Peterson, Philip J. Bell, W. Paul Bullock, Ian J. Evans, Bronwyn Frame, Andrew J. Greenad *et al* (1994). Structure and function of Selectable and Non-Selectable Transgenes in Maize After Introduction by Particle Bombardment. *Plant Mol Biol* **25**: 951-961.

Reyes, C. P (1990). El maíz y su cultivo. AGT Editor, S.A. México, D.F. pp 460.

Rigano, M. Manuela, Francesco Sala, Charles Arntzen and Amanda M. Walmsley (2003). Targeting of Plant-Derived Vaccine Antigens to Immunoresponsive Mucosal Sites. *Vaccine* **21**: 809-811.

Rojas-Anaya, E. Tesis de Maestría: "Expresión e Identificación de la Proteína G del Virus de Rabia en Zanahoria". ENCB, IPN. México, D.F., 2005.

Russell, Julie A., Mihir K. Roy and Jonh C. Sanford (1992). Physical Trauma and Tungsten Toxicity Reduce the Efficiency of Biolistic Transformation. *Plant Physiol* **98**: 1050-1056.

Ryan, J. Elizabeth, Lyn M. Daly and Kinston H. G. Mills (2001). Immunomodulators and Delivery systems for Vaccination by Mucosal Routes. *Trends in Biotech* **19**: 293-302.

Sala Francesco, M. Manuela Rigano, Alessandra Barbante, Barbara Basso, Amanda M. Walsley and Stefani Castiglione (2003). Vaccine Antigen Production in Transgenic Plants: Strategies, Gene Constucts and Perspectives. *Vaccine* **21**: 803-808.

Sanford, Jonh C (1988). The biolistic Process. *Trends in Biotechnol* **6**: 299-302.

Selem-Salas, Celia I. y Chab-Medina, Juan C. Tesis de Licenciatura: "Los Murciélagos Hematófagos como Transmisores de la Rabia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UAY. Mérida, 1997.

Sidorenko LV, Xianggan L, Cocciolone SM, Chopra S, Tagliani L, Bowen B, Daniels M, Peterson, T (2000). Complex Structure of A Maize *Myb* Gene Promoter: Functional Analysis in Trnagenic Plants. *Plant J* **22**: 471-482.

Somers DA, Rines HW, Cu W, Kaeppler HF and Buschnell, WR (1992). Fertile Transgenic Oat Plants. *Biotechnhnology* **10**: 1589-1594.

Songstad DD, Armstrong CL and Peterson, WL (1991). Silver Nitrate Increases Type II Callus Production from Immature Embryos of Maize Inbred B73 and Its Derivates. *Plant Cell Rep* **9**: 699-702.

Songstad DD, Peterson WL and Armstrong CI (1992). Establishment of Friable Embryogenic (Type II) Callus from Immature Tassels of *Zea mays* (Poaceae). *Am J Bot* **79**: 761-764.

Southgate, E. M., M. R. Davey, J. B. Power and R. Marchant (1995). Factors Affecting the Genetic Engineering of Plants by Micrioprojectile Bombardment. *Biotechnology Advances* **13**: 631-651.

Spencer, T. M., Michael, James V., O'Brien, William G., Start, Thomas R., Adams, Williams J., Gordon-Kamm and Peggy G. Lemaux (1992). Segregation of Trangenes in Maize. *Plant Mol Biol* **18**: 201-210.

Srivastava V & Ow DW (2001). Single-Copy Transformant of Maize Obtained Through the Co-Introduction of a Recombinase-Expressing Constuct. *Plant Mol Biol* **46**: 561-566.

Streatfield, Stephen J., Joseph M. Jilka, Elizabeth E. Hood, Debra D. Turner, Michele R. Bailey, Jocelyne M. Mayor *et al* (2001). Plant-Based Vaccines: Unique Advantages. *Vaccine* **19**: 2742-2748.

Streatfield, Stephen J., Jeffrey R. Lane, Christopher a. Brooks, Donna K. Barker, Miranda L. Poage, Jocelyn M. Mayor, Barry J. Lamphear *et al* (2003). Corn as Production Systems for Human and Animal Vaccines. *Vaccine* **21**: 812-815.

Tacket Carol O., Marcela F. Passeti, Robert Edelman, John A. Howard and Stephen Streatfield (2004). Immunogenicity of Recombinant LT-B Delivered Orally to Humans in Transgenic Corn. *Vaccine* **22**: 4385-4389.

Taylor, M. G., Vasil, I. and Vasil, I. K (1993). Enhanced GUS Expression in Cereal/Grass Cell Suspension and Immature Embryos Using the Maiz Ubiquitin-Based Plsmid pAHC25. *Plant Cell Rep* **12**: 491-495.

Thompson, C. J., N. Rao Movva, Richard Tizard, Reto Cramer, Julian E. Davies, Marc Lauwereys and Johan Botterman (1987). Characterization of the Herbicide-Resistance Gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal* **6**: 2519-2523.

Tomes DT & Smith OS (1985). The Effects of Parental Genotype on Initiation of embryogenic Callus from Elite Maize Germoplasm. *Theor Appl Genet* **70**: 505-512.

Torne JM, Santos MA, Ponc A and Blanco M (1990). Regeneration of Plants from Mesocotyl Tissues Cultures of Immature of *Zea mays* L. *Plant Sci Lett* **17**: 339-344.

Twyman, Richard M., Eva Stoger, Stefn Schillberg, Paul Christou and Rainer Fischer (2003). Molecular Farming in Plants: Host Systems and Expression Technology. *Trends in Biotechnol* **21**: 570-578.

Vain P, Yean H, Flament P (1989). Enhancement of Production and Regeneration of Embryogenic Type II Callus in *Zea mays* L. by AgNO₃. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **18**: 143-151.

Vain, Philippe, Michael D. McMullen and Jonh J. Finer (1993). Osmotic Treatment Enhances Particle Bombardment-Mediated Transient and Stable Transformation of Maize. *Plant Cell Reports* **12**: 84-88.

Vain, P., J. De Buyser, V. Buitrang, R. Haicour and Y. Henry (1995). Foreign Gene Delivery Into Monocotyledonous Species. *Biotechnology Advances* **13**: 653-671.

Van der Geest & Petolino JF (1992). Expresión of a Modified Green Fluorescent Protein Gene in Transgenic Maize Plants and Progeny. *Plant Cell Rep* **17**: 760-764.

Vasil, I. K. and Vasil, I (1980). Isolation and Culture of Cereal Protoplast. II. Embryogenesis and Plantlet Formation from Protoplast of *Panisetum americanum*. *Theor Appl Genet* **56**: 97-100.

Vasil, Indra K (1993). Molecular Genetic Improvement of Cereal and Grass Crops. FALTA. CHECAR TODAS LAS REFERENCIAS CON ESTE AUTOR Y AÑO EN EL TEXTO.

Vasil, Indra K (1994). Molecular Improvement of Cereals. *Plant Mol Biol* **25**: 925-937.

Voet, Donald & Judit G. Voet (1995). Biochemistry. 2a. Ed. Jonh Wiley & Sons, New York, USA. pp 1360.

Walmsley, Amanda M. and Charles J. Arntzen (2000). Plants for Delivery of Edible Vaccines. *Curr Opin Biotechnol* **11**: 126-129.

Walmsley, Amanda M. and Charles J. Arntzen (2003). Plant Cell Factories and Mucosal Vaccines. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 145-150.

Walters, David A., Clayton S. Vetsch, Diane E. Potts and Ronald C. Lundquist (1992). Transformation and Inheritance of a hygromycin Phosphotransferase Gene in Maize Plants. *Plant Mol Biol* **18**: 189-200.

Wan, Y and Lemaux, P. G (1994). Generation of Large Numbers of Independently Transformed Fertile Barley Plants. *Plants Physiol* **104**: 37-48.

Wan, Yuehun, Jack M. Widholm and Peggy G. Lemaux (1995). Tipe I Callus as a Bombardment Target for Generating Fertile Transgenic Maize (*Zea mays* L.). *Planta* **196**: 7-14.

Warzecha, H y Mason, S. H (2003). Benefits and Risks of Antibody and Vaccine Production in Transgenic Plants. *J Plant Physiol* **160**: 755-764.

Wilkinson, T. C. and S. A. Thompson (1986). Genotype, Medium and Genotype X Medium Effects on the Establishment of regeneration Maize Callus. *Maydica* **XXXII**: 89-105.

Williams, W. Paul, Jonathan B. Sagers, John A. Hanten, Frank M. Davis and Paul M. Buckley (1997). Trangenic Corn Evaluated for Resistance to Fall Armyworm and Southwestern Corn Borer. *Crop Sci* **37**: 957-962.

Yusibov, Vidadi, Anna Modelska, Klaudia Steplewski, Michail agadjanyan, David Weiner, D. Craig Hooper and Hilary Koprowski (1997). Antigens Produced in Plants by Infection with Quimeric Plant Viruses Immunize Against Rabies Virus and HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. **94**: 5784-5788.

Yusibov, V., D. C. Hooper, S. V. Spitsin, N. Fleysh, R. B. Kean, T. Mikheeva, D. Deka, A. Karasev, S. Cox, J. Randall and H. Koprowski (2002). Expression in Plants and Immunogenicity of Plant Virus-Based Experimental Rabies Vaccine. *Vaccine* **20**: 3155-3164.

Zhang, S., D. Warkentin, B. Sun, H. Zhong and M. Sticklen (1996). Variation in the Inheritance of Expression Among Subclones for Unselected (*uidA*) and Selected (*bar*) Transgenes in Maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet* **92**: 752-761.

Zhang Shibo, Laurie Wong, Ling Meng and Peggy G. Lemaux (2002). Similarity Patterns of *knotted1* and *ZmLEC1* During Somatic and Zigotyc Embryogenesis in Maize (*Zea mays* L.). *Planta* **215**: 191-194.

Zhang, S. R. Willimas-Carrier and P. G. Lemaux (2002). Transformation of Recalcitrant Maize Elite Inbreds Using In vitro shoot Meristematic Cultures Induced from Germinated Seedlings. *Plant Cell Rep* **21**: 263-270.

Zhong, H., C. Srinivasan and Mariam B. Sticklen (1992). In-vitro Morfogenesis of Corn (*Zea mays* L.). *Planta* **187**: 483-489.

Zhong, Heng, Baolin Sun, Donald Warkentin, shibo Zhang, Ray Wu, Tiyun Wu and Mariam B. Sticklen (1996). The Competence of M; maize Shoot Meristems for Integrative Transformation and Inherited Expression of Transgenes. *Plant Physiol* **110**: 1097-1107.

Páginas de Internet.

www.correodelmaestro.com/antiores/1999/noviembre42/artistas42.htm
www.drscope.com
www.fao.org
www.fmvz.unam.mx
hypatia.morelos.gob.mx.htm
www.igc.org.uk/gmr/gmrsumms.htm
www.pasteur.fr/recherche/rage/rhab
www.sanofipasteur.com.mx.html
www.siap.sagarpa.gob.mx/integra/Agrícola/DatsBas/DBmaíz.pdf.MaízSAGARPA04-05
www.uanl.mx.html
www.udlap.mx/palou/discurso.htm
www.unm-edu.htm

12) Abreviaturas.

Medio de Cultivo

MS: Murashige & Skoog (1962)
N6: Chu *et al* (1973)

Reguladores de crecimiento

2,4-D: ácido diclofenoxiacético
BA: benzilaminopurina
DICAMBA: 3,6-dicloro-o-anisico
IBA: ácido indolbutírico
Kin: cinetina

Peso

g: gramo
g/Kg.: gramo sobre kilogramo
Kg: kilogramo
mg: miligramo
ng: nanogramo

Volumen

L: litro
µl: microlitro
ml: mililitro

Longitud

cm: centímetros
m: metro
µm: micrometro
mm: milímetro

Concentración

M: molar
mM: minimolar
N: normal
v/v: volumen sobre volumen
w/v: peso sobre volumen

Tiempo

hr: hora
hrs: horas
min: minuto
seg: segundo

Presión

-in de Hg: pulgada de mercurio
-Kg/cm²: kilogramo sobre centímetro cuadrado.
-Lb/pulg²: libra sobre pulgada cuadrada
-psi: unidad de presión en el sistema inglés de medidas; 14.7 psi o lb/plg=1 atm

Reactivos

-AgNO₃: nitrato de plata
-MgCl₂: cloruro de magnesio
-PEG: polietilenglicol
-SDS: dodecil sulfato de sodio
-PPT: fosfotricina

Elementos

-Ca: calcio
-Mg: magnesio
-Mn: manganeso
-N: nitrógeno
-Zn: zinc

Temperatura

-°C: grados Celsius

Enzimas

-GUS: β-glucoronidasa
-Taq. Pol.: enzima polimerasa de *Thermophilus aquaticus*
-PAT: fosfotricina acetiltransferasa
-GS: glutamina sintasa

Otros

-aa: aminoácido
-ADH: alcohol deshidrogenasa
-ADN: ácido desoxiribonucleico
-Da: dalton
-H₂O: agua
-IgA: inmunoglobulina A
-IgG: inmunoglobulina G
-S-IgA: inmunoglobulina A secretada
-Kb: kilobase
-LT-B: subunidad B de la enterotoxina labil al calor de *E. coli*

-L-prolina: levógiro prolina

- μ E: microEinstein

Otros

-dNTPs: mezcla de dinucleótidos fosfatos

-pb: pares de base

-pH: potencial hidrogeno

-PCR: reacción en cadena de la polimerasa

-RE: retículo endoplasmático

-ARN: ácido ribonucleico

-ARNm: ácido ribonucleico mensajero

-r.p.m.: revoluciones por minuto

-TGEV: virus de la gastroenteritis transmisible de cerdos

-TE: solución amortiguadora de Tris-EDTA

Tris-HCl: Trizma base hidroclicada

-VNA: anticuerpos neutralizantes de virus

-Xg: gravedad