



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

Facultad de Biología

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

**Establecimiento de condiciones para transformar
plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) Morelos A-92
con el gen de la SPS de *Synechocystis***

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

AREA: FISIOLOGÍA Y GENÉTICA VEGETAL

PRESENTA:

BIÓL. GAMALIEL VALDIVIA ROJAS

DIRECTORES DE TESIS:

DR. MIGUEL MARTÍNEZ TRUJILLO

DR. JOSÉ LUIS CABRERA PONCE

MORELIA, MICHOACAN, JUNIO DE 2009

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Microbiología y Genética de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y de Transformación Genética del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, bajo las asesorías del Dr. Miguel Martínez Trujillo y del Dr. José Luis Cabrera Ponce. El trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el proyecto 25508.

INDICE

RESUMEN	<i>i</i>
ABSTRACT	<i>ii</i>
Índice de Figuras	<i>iii</i>
Índice de Cuadros	<i>iv</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Transformación genética de plantas	2
1.1.1 Cultivo de tejidos vegetales	2
1.1.1.1 Medios de cultivo	4
1.1.1.2 Reguladores de crecimiento vegetal	8
1.1.2 Métodos de transformación genética de plantas	14
1.1.2.1 Transformación mediada por <i>Agrobacterium</i>	14
1.1.2.2 Biobalística	15
1.1.2.3 Transformación con PEG	15
1.1.2.4 Electroporación	15
1.1.2.5 Microinyección de ADN	16
1.1.2.6 Fibras de silicón carbonadas	16
1.1.3 Genes y vectores para transformación en plantas	16
1.1.3.1 El transgen	16
1.1.3.2 El vector	17
1.1.3.3 Genes marcadores de selección	18
1.1.3.4 Genes reporteros	19
1.1.3.5 Promotores	22
1.2 El arroz	25
1.2.1 El arroz en México	28
1.2.2 El arroz es un modelo de estudio entre los cereales	29
1.2.3 Transformación genética de arroz	30
1.3 La sacarosa en las plantas	34

1.3.1 La sacarosa es sintetizada por la enzima Sacarosa Fosfato Sintasa	34
1.3.2 La síntesis y degradación de la sacarosa está regulada y acoplada a la síntesis de pared celular	35
1.4 La SPS de <i>Synechocystis</i>	36
1.5 Expresión de genes SPS en plantas	37
II. HIPÓTESIS	40
III. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo General	40
3.2 Objetivos Específicos	40
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	41
4.1 Plásmidos	41
4.2 Secuenciación de los vectores	41
4.3 Ligamiento de los fragmentos obtenidos por PCR en el vector pGEM-Teasy	42
4.4 Preparación de células competentes	42
4.5. Transformación de células competentes	43
4.6 Aislamiento de ADN plasmídico de candidatos (colonias blancas) mediante la técnica de Mini-Prep (Sambrook et al. 1989)	44
4.7. Análisis de candidatos por corte con enzimas	45
4.8. Aislamiento de ADN plasmídico por la técnica de polietilenglicol, para secuenciar los plásmidos y utilizarlos en los bombardeos	45
4.9. Generación de callos	47
4.10. Bombardeo con micro partículas	48
4.11. Selección de callos y regeneración de brotes	48
4.12. Detección del gen SPS de <i>Synechocystis</i>	49

V. RESULTADOS	50
CAPITULO I. Transformación de plantas de arroz (<i>Oryza sativa</i> L. subespecie <i>Indica</i>) de la Variedad Morelos A-92 con el gen de la SPS de <i>Synechocystis</i>	50
CAPITULO II. Diseño de un vector para expresar el gen de la SPS de <i>Synechocystis</i> mediante un promotor específico de tejido fotosintético	68
VI. DISCUSIÓN GENERAL	82
VI. LITERATURA CITADA	86
ANEXOS	104

RESUMEN

Se produjeron plantas transgénicas de arroz *Oryza sativa* L., subespecie *Indica*, variedad Morelos A-92 con el gen de la sacarosa fosfato sintasa de *Synechocystis*. Se utilizó el sistema de producción de callos embriogénicos a partir de semillas maduras y la biobalística como sistema de transformación genética. Semillas de arroz de la variedad Morelos A-92 previamente desinfectadas se cultivaron en el medio de Murashige y Skoog (MS) suplementado con 2,4-D y después de 7 días de cultivo se obtuvieron callos embriogénicos, los cuales fueron utilizados para ensayos de selección en diferentes concentraciones de higromicina y también para ensayos de regeneración de plantas utilizando diferentes concentraciones de ANA y BAP. Los callos embriogénicos se transformaron mediante biobalística, utilizando el plásmido pCAMBIA1301 el cual contiene el gen de higromicina fosfotransferasa que confiere resistencia a higromicina y el gen de la β -glucuronidasa, y el plásmido pUISPSSy el cual contiene el gen de la SPS de *Synechocystis* fusionado al promotor 35S. Se encontró que una concentración de 50 mg/L de higromicina es suficiente para seleccionar eficientemente a los callos embriogénicos. Las condiciones óptimas de regeneración de plantas se obtuvieron con el uso de 2 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de ANA en el medio de regeneración. En los eventos de transformación con el plásmido pCAMBIA1301 se obtuvo una frecuencia de transformación del 3.8% y en los de co-transformación se obtuvo el 3.1%. El análisis molecular por PCR confirmó la integración del transgén del gen reportero *uidA* y del gen SPS de *Synechocystis*. Se inició la construcción de un vector utilizando el gen de la SPS de *Synechocystis*, el promotor de la subunidad pequeña de la ribulosa bi-fosfato carboxilasa de tabaco (*rbcS*) y el terminador de la nopalina sintasa (Ter-nos). Estas secuencias se extrajeron mediante PCR de los plásmidos utilizando oligonucleótidos específicos con sitios de restricción en los extremos y se clonaron cada uno en el vector pGEM®-T Easy, se obtuvieron tres plásmidos con los fragmentos clonados (pGEMrbcS, pGEMSPSSy y pGEMnos). A partir de estos plásmidos se avanzó en la fusión del terminador *nos* al gen de la SPS y la clonación del promotor *rbcS* está en proceso.

ABSTRACT

Rice plants from the variety Morelos A-92 were transformed with the Sucrose Phosphate Synthase gene of *Synechocystis*. The system of production of calli, transformation by biolistic, shoot regeneration and generation of plants, were used to optimize some conditions of the process. Seeds of rice were disinfected and cultivated in MS media added with 2,4-D, for 7 days to obtain calli; these were used for selection assays in different concentrations of hygromycin and for regeneration using different ANA and BAP concentrations. The calli were transformed by biolistic, using the pCAMBIA1301 plasmid which confers hygromycin resistance and harbors the gene that encodes the β -glucuronidase, and the pUISPSSy plasmid which contains the SPS *Synechocystis* gene fused to the CaMV 35S promoter. It was found that a concentration of hygromycin 50 mg/L is sufficient to select effectively the embryogenic calli. There were obtained shoots at 25 days only in the media added with BAP 2 mg/L and ANA 0.5 mg/L, in the regeneration assay. The percentage of transformation with pCAMBIA1301 was 3.8 whereas in the co-transformation assay with pCAMBIA1301 and pUISPSSy it was 3.1%. The molecular analysis by PCR confirmed the integration of the transgenes *uidA* and the SPS of *Synechocystis*. The construction of a vector was begun using the SPS gene of *Synechocystis*, the ribulose bi-phosphate carboxylase small subunit promoter (*rbcS*) and the terminator of nopaline synthase (*nos*). These sequences were extracted by PCR from the plasmids using specific oligonucleotides with restriction sites at the edges. These fragments were cloned separately in the pGEM®-T Easy vector, obtaining three plasmids (pGEMrbcS, pGEMSPSSy y pGEMnos). From these plasmids, the fusion of the *nos* terminator to the SPS gene was performed in the correct orientation. The insertion of the *rbcS* promoter is in process.

Índice de figuras

Figura 1. Estructura básica de un transgén.	17
Figura 2. Alineamiento esquemático de la secuencia de aminoácidos de la SPS de plantas y de <i>Synechocystis</i>	37
Figura 3. Callos de arroz en diferentes concentraciones de BAP	55
Figura 4. Callos embriogénicos sometidos a diferentes concentraciones de higromicina (mg/L).	57
Figura 5. Callos embriogénicos en medio MS con higromicina	58
Figura 6. Detección estable de la expresión del gen <i>uidA</i> (GUS), regeneración y enraizamiento	59
Figura 7. Regeneración de callos co-transformados con pCAMBIA1301 y pUISPSSy.	61
Figura 8. Regeneración de callos embriogénicos con resistencia a higromicina	62
Figura 9. Análisis de la presencia del gen <i>uidA</i> en plantas de arroz	63
Figura 10. Análisis de la presencia de los genes <i>uidA</i> y <i>spssy</i> en plantas transformadas	64
Figura 11. Vector pBSrbcS	72
Figura 12. Digestión de pUISPSSy	73
Figura 13. Productos de PCR	76
Figura 14. Plásmidos que contienen el inserto de los diferentes fragmentos (<i>spssy</i> , <i>rbcS</i> y <i>nos</i>)	76
Figura 15. Selección de candidatos por corte con enzimas de restricción	77
Figura 16. Selección de candidatos	77
Figura 17. Expresión transitoria conferida por los promotores <i>rbcS</i> de tabaco y 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor	79

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Medios de cultivos utilizados en diferentes años para el cultivo de tejidos vegetales	7
Cuadro 2. Genes reporteros comúnmente utilizados en la transformación genética de plantas	20
Cuadro 3. Genes utilizados comúnmente como marcadores de selección	21
Cuadro 4. Promotores comúnmente utilizados en transformación de plantas	24
Cuadro 5. Clasificación científica del arroz. (Cronquist 1981)	27
Cuadro 6. Promotores utilizados en la transformación de arroz	32
Cuadro 7. Genes de interés agronómico introducidos en arroz	33
Cuadro 8. Efecto de la combinación de hormonas sobre la producción de brotes a partir de callos embriogénicos de arroz	56
Cuadro 9. Número y frecuencia de plantas transgénicas obtenidas	64
Cuadro 10. Oligonucleótidos utilizados y sus características	74

1. INTRODUCCIÓN

El mejoramiento genético vegetal se originó hace aproximadamente 10 000 años, cuando el hombre se hizo agricultor y comenzó la domesticación de las plantas. En el siglo XX, con la incorporación de los cruzamientos sexuales, el conocimiento de la biología floral de las especies, los avances de la genética y de la estadística experimental y de la Biología Molecular, se desarrollaron los métodos de mejoramiento actualmente utilizados.

El mejoramiento genético convencional ha sido muy importante pues a él se deben la mayoría de variedades de alto rendimiento actualmente utilizadas además que tiene ventajas importantes ya que se basa en la existencia de variabilidad genética para los caracteres que se desea mejorar y la reproducción sexual para la incorporación de los mismos. Sin embargo el aprovechamiento de la variabilidad por métodos sexuales deriva en un problema debido a las barreras de cruzamiento entre especies aunado al tiempo que se emplea para obtener una nueva variedad (Birch 1997).

La transformación genética de plantas es un conjunto de métodos no sexuales que permite introducir en plantas, genes provenientes no sólo de otras especies vegetales muy alejadas desde el punto de vista evolutivo, sino incluso de hongos, virus, bacterias y animales. La transformación genética de plantas es una tecnología que además de superar la limitación de las barreras de cruzamiento aporta variabilidad genética sin alterar el fondo genético previo y reduce el tiempo en la obtención de nuevas variedades. El uso de la ingeniería genética ha permitido producir variedades con resistencia a plagas y enfermedades (resistencia a virus, insectos, hongos y bacterias), tolerancia a herbicidas y a estrés abiótico (sequia, salinidad y temperaturas), modificación de la calidad nutritiva de los cultivos (contenido de grasa, almidón, proteína, vitaminas y minerales), producción de fármacos y vacunas. Además ha permitido el uso de plantas transformadas en la

limpieza de suelos contaminados con metales. (Herrera-Estrella 1999, Herrera-Estrella 2005, Krämer y Chardonnens 2000, Birch 1997).

1.1 Transformación genética de plantas

La transformación genética de plantas he tenido avances significativos desde sus inicios en 1983, cuando se obtuvieron por primera vez plantas de tabaco con resistencia a kanamicina y metotrexato, desde entonces los avances han sido sorprendentes (Herrera-Estrella et al. 1983).

Para obtener una planta transgénica se requiere de ciertas técnicas biotecnológicas como la ingeniería genética, (vector con gen de interés, marcador de selección y gen reportero), el cultivo de tejidos vegetales (obtención de explante apropiado para la transformación selección y regeneración), técnicas microbiológicas (cepa bacteriana para transformarla con el vector con el fin de obtener cantidades suficientes de plásmidos para la transformación del explante), técnicas de biología molecular (para la identificación de plantas transformadas) como son PCR, hibridación tipo *Southern*, RT-PCR, ELISA y *Western* y las técnicas propiamente dichas para la inserción física del gen de interés en el núcleo de la célula vegetal. (Birch 1997).

1.1.1 Cultivo de tejidos vegetales

La historia del cultivo de tejidos vegetales tiene sus bases en la teoría celular, postulada por Schleiden en 1838 y Schwann en 1839. Sin embargo era el inicio y Schleiden y Schwann no tenían ninguna evidencia experimental para demostrar que las células somáticas de las plantas son capaces de dividirse y formar una planta completa. Fueron muchos los investigadores que realizaron un sin número de experimentos tratando de demostrar la totipotencialidad de la célula. Sachs (1880) resumió los resultados obtenidos en los callos, en la curación de las heridas en plantas y sugirió que las plantas contienen sustancias que ayudan a la formación de órganos. En 1893 Recharging dio un acercamiento importante al cultivo de tejidos

intentando determinar cuál era el límite de proliferación celular, él utilizó diferentes partes de la planta y los puso en arena humedecida, sin embargo no utilizó ningún tipo de nutrimento ni condiciones de asepsia. Los principios del cultivo celular fueron formulados claramente nueve años más tarde por Haberlandt (1902), quien asumió que no había límites de divisibilidad en las células. Él por lo tanto eligió trabajar con las células y la solución Knop (cuadro 1), suplementada con sacarosa, asparagina y peptona. Las células continuaban vivas después de 20 a 27 días, pero sin ninguna división. Los resultados no fueron los esperados y después utilizando pedazos de tubérculo de la papa descubrió que la división celular ocurrió en discos pequeños (Haberlandt 1913). La investigación subsecuente estuvo influenciada por los experimentos de Haberlandt. Ulehla (1928) con tejidos de cactus demostró que el contacto de un medio líquido era tóxico para las células y éstas sólo se multiplicaron cuando los explantes fueron puestos en un medio sólido. Simultáneamente Kotte (1922) en Alemania y Robbins (1922) en los Estados Unidos, publicaron que se podría tener éxito en el cultivo de tejidos usando células meristemáticas. Kotte (1922) tuvo éxito al cultivar extremos pequeños de raíces de maíz utilizando el medio Knop diluido y suplementado con glucosa, algunos aminoácidos y extracto de carne. Las extremidades de la raíz se desarrollaron bien y el crecimiento fue sostenido por largos periodos pero no se subcultivaron. Robbins (1922), logró exitosamente subcultivos y demostró la eficacia del extracto de levadura, sin embargo, los cultivos no sobrevivieron por largos periodos y el crecimiento disminuía gradualmente y al final el tejido se perdía. Blumenthal y Meyer (1924) trabajaron con rebanadas de la zanahoria y observaron la formación de callo cuando las rebanadas fueron expuestas al ácido láctico. White (1934), utilizando el medio de Robbins y trabajando con raíces del tomate, obtuvo cultivos ilimitados. En 1946 Ball demostró que las células meristemáticas podrían dar una planta entera y con este descubrimiento se inició el método de multiplicación vegetativa, por lo que Ball es considerado el padre de la micro propagación.

Algunos cultivos fueron obtenidos por Gautheret (Gautheret 1935, Gautheret 1939) del cambium de *Acer pseudoplatanus* quien también tuvo éxito con explantes

similares de *Ulmus campestre*, *Robinia pseudoacacia* y *Salix capraea*, usando agar y la solución de Knop, adicionado con clorhidrato de glucosa y cisteína, sin embargo, la demostración de la totipotencialidad de las células vegetales aun no se demostraba porque no se obtenían plantas, sólo divisiones celulares. Más adelante, la disponibilidad del ácido indolacético y de la adición de vitamina B permitió obtener demostraciones más o menos simultáneas con tejidos de la raíz de zanahoria (Nobércourt 1939, Gautheret 1939). Caplin y Steward (1948) tomando en cuenta estudios previos, suplementaron el medio de cultivo con agua de coco y utilizando explantes de la zanahoria obtuvieron una proliferación mucho más activa que la que se observó con la auxina. Por lo tanto, estaba claro que la sustancia estimulante no era una auxina sino una citocinina y en ese mismo año los estudios de Skoog y Tsiu (1948) demostraron que con la adición de adenina y fosfatos al medio de cultivo podían proliferar células de tejidos no meristemáticas, cómo la medula de tabaco. Después, usando los ácidos nucleicos, llevaron al descubrimiento de la primera citocinina (cinetina), como el producto de descomposición del ADN de esperma de arenques (Miller et al. 1955). La disponibilidad de cinetina a partir de esperma de arenques aumentó el número de especies que podrían ser cultivadas indefinidamente, pero quizás lo más importante, fue el haber encontrado el equilibrio de la auxina y la cinetina para lograr la morfogénesis a partir de callos de tabaco (Skoog y Miller 1957).

La obtención de embriones somáticos bipolares además de la formación de brotes y raíces a partir de éstos en zanahoria, fueron los primeros resultados que demostraban la totipotencialidad de las células publicados por Steward et al. (1958) y Reinert (1958). El primer cultivo de planta a gran escala fue obtenido de suspensiones de células del Ginkgo y de Lolium (Tulecke et al. 1959).

1.1.1.1 Medios de cultivo

Para crecer, una planta necesita tomar del ambiente los elementos químicos y físicos, que en la nutrición mineral se clasifican en **macro nutrimentos**, que se encuentran en concentraciones de 1000 mg/kg de materia seca mayores, y son: H,

C, O, N, K, Ca, Mg, P y S y **micro nutrientes**, oligoelementos o elementos traza, que se encuentran en concentraciones de 100mg/kg de materia seca o menores, y son: Mo, Ni, Cu, Zn, Mn, B, Fe y Cl. La planta toma de la atmosfera el dióxido de carbono, y del suelo agua y minerales y con estos elementos la genera su propio alimento para crecer y desarrollarse. Los componentes principales de un medio de cultivo son: una fuente de carbono, nutrientes minerales, sustancias vitamínicas, un agente gelificante (en el caso de medios semisólidos) y sustancias reguladoras del crecimiento. El balance de estos componentes permite obtener un método de propagación *in vitro* eficiente para cada especie en particular (Murashige y Skoog 1962).

Varios medios, como la solución de Knop, fueron utilizados inicialmente para mejorar la división celular, sin embargo, el extracto de levadura, los hidrolizados de proteína y el agua de coco, eran requeridos con frecuencia (Heller 1953). Murashige y Skoog (1962), desarrollaron un medio nuevo donde la concentración de algunas sales era 25 veces mayor que la solución de Knop. Particularmente, los niveles de NO_3 y NH_4 eran más elevados y las concentraciones de micro nutrientes fueron aumentadas. La formulación del medio (MS) permitió un aumento posterior en el número de especies que podrían ser cultivadas, por lo que el medio MS es ahora el más ampliamente utilizado en el establecimiento de protocolos de cultivo de tejidos vegetales. Los componentes de algunos medios se presentan en el cuadro 1.

Fuente de carbono: Aunque las plantas son autótrofas, cuando las células vegetales se cultivan *in vitro*, necesitan además de un medio aséptico, una fuente de carbono. La sacarosa, en concentraciones de 2 al 5% es la más utilizada. En algunos medios se la reemplaza por glucosa. En casos particulares, se cita el empleo de maltosa o galactosa. También el myo-inositol (100 mg/L) suele ser incorporado a los medios, resultando un mejor crecimiento de los cultivos (Murashige y Skoog 1962).

Nutrientes minerales: Los medios de cultivo deben suministrar los macro y micro nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas. En general, se

destacan las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio. El nitrógeno es suministrado en forma de amonio y/o nitrato. También se puede utilizar urea, glutamina y caseína hidrolizada. Es fundamental que el hierro sea incorporado conjuntamente con un agente quelante (Na_2EDTA), lo que lo hace disponible en un amplio rango de pH. .

Sustancias vitamínicas: El uso de las vitaminas en los medios de cultivos es variable dependiendo de la especie y entre las que más se emplean destacan la Tiamina (B1) y la Piridoxina (B6) (Murashige y Skoog 1962).

Agentes gelificantes: Los gelificantes son incorporados a los medios de cultivo para formar una matriz que permita la inoculación de los explantes sobre una superficie semi-sólida. El agar (entre 0.6 y 1%) es el compuesto más utilizado. También pueden emplearse Phytigel (0.25-0.40%), agarosa (0.80-0.90%) y Gelrite (0.10-0.20%) (Murashige y Skoog 1962).

Cuadro 1. Medios utilizados en el cultivo de tejidos en plantas

Las cantidades se expresan en mg/L. Modificado de Shrivastava (2007)

Componentes	Murashi ge- Skoog (1962)	White (1963)	Schenk - Hildebrand t (1972)	Knop (1865)	Componentes	Murashige- Skoog (1962)	White (1963)	Schenk - Hildebrand t (1972)	Knop (1865)
MgSO₄ x 7H₂O	370	720	400	250	CuSO₄ x 5H₂O	0.025	-	0.2	-
Na₂SO₄	-	200	-	-	Fe₂(SO₄)₃	-	2.5	-	-
KCl	-	65	-	-	CoCl₂ x 6H₂O	0.025	-	0.1	-
CaCl₂ x 2H₂O	440	-	200	-	KI	0.83	0.75	1.0	-
KNO₃	1900	80	2,500	250	H₃BO₃	6.2	1.5	5	-
Ca(NO₃)₂ x 4H₂O	-	300	-	1,000	Na₂MoO₄ x 2H₂O	0.25	-	0.1	-
NH₄NO₃	1,650	-	-	-	Sacarosa	30,000	20,000	30,000	-
NaH₂PO₄ x H₂O	-	16.5	-	-	Glucosa	-	-	-	-
NH₄H₂PO₄	-	-	300	-	Mio-Inositol	100	-	1,000	-
KH₂PO₄	170	-	-	250	Acido Nicotínico	0.5	0.5	0.5	-
FeSO₄ x 7H₂O	27.8	-	15	-	Piridoxina	0.5	0.1	0.5	-
Na₂EDTA	37.3	-	20	-	Tiamina	0.1-1	0.1	5	-
MnSO₄ x 4H₂O	22.3	7	10	-	Ca- Pantotenato	-	1	-	-
ZnSO₄ x 7H₂O	8.6	3	0.1	-	Glicina	2	3	-	-
					Cisteína	-	1	-	-

1.1.1.2 Reguladores de crecimiento vegetal

Las plantas no sólo necesitan agua para crecer, nutrimentos del suelo, luz solar y bióxido de carbono atmosférico, sino que al igual que los animales, necesitan hormonas para lograr un crecimiento armónico, esto es, pequeñas cantidades de sustancias que se desplazan a través de sus fluidos regulando su crecimiento. Se entiende por hormonas vegetales aquellas sustancias que son sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se translocan a otro, donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo ó metabolismo, a nivel de órgano, tejido o célula en las plantas. (Wareing y Phillips 1973). El término, reguladores del crecimiento vegetal (RCV) es más general y abarca a las sustancias tanto de origen natural como sintetizado en laboratorio, que determinan respuestas a nivel de crecimiento, metabolismo ó desarrollo en la planta. El crecimiento de la planta es un proceso dinámico, complejo que está rigurosamente controlado, en el que los reguladores de crecimiento juegan un papel importante en el control del crecimiento vegetal. La actividad fisiológica está mediada por reguladores, los cuales son sustancias mensajeras, la mayoría de las veces activas en muy pequeñas cantidades, en la que los lugares de síntesis y acción generalmente son distintos siendo en algunos casos, activos en el mismo sitio de formación. Por lo que en general presentan un amplio espectro de acción y además pueden influir en múltiples procesos al mismo tiempo y en diferentes partes de la planta (Delvin 1980, Taiz y Zaiger 2006).

Las hormonas se consideran reguladores de crecimiento que existen de manera natural, sin embargo también existe un grupo de compuestos sintéticos que han demostrado efecto sobre la fisiología de las plantas y son comúnmente usados en el cultivo de tejidos por ser termoestables y más baratos. Se conocen cinco grupos principales de hormonas vegetales: auxinas, citocininas giberelinas, etileno y ácido abscísico. También otros compuestos son considerados como hormonas, como las poliaminas, los jasmonatos, el ácido salicílico, los brasinoesteroides y la sistemina. (Taiz y Zaiger 2006).

En la mayoría de los casos los medios utilizados para el establecimiento de los cultivos contienen auxinas (ANA, 2,4-D, AIA, IBA, NOA, Dicamba, Picloram) y/o citocininas (BA, CIN, ZEA, 2iP, Thidiazurón). Las giberelinas (especialmente GA3) son requeridas en algunas ocasiones para el cultivo de meristemos o para la elongación de brotes. (Taiz y Zaiger 2006).

Auxinas: La auxina es una hormona vital, que regula muchos aspectos del desarrollo de la planta. El nombre de auxina proviene del griego "*auxein*" que quiere decir crecer, la auxina natural más común, es el ácido indol-3-acético (IAA). Los papeles más importantes de la auxina en plantas son la regulación del crecimiento, alargamiento de brotes jóvenes y del coleóptilo, arquitectura y crecimiento de la raíz y modula diversos procesos, tales como respuestas a la luz y la gravedad, así como el desarrollo y crecimiento del tejido vascular en el cultivo de tejidos (Davies 1995, Wareing y Phillips 1973, Woodward y Bartel 2005). Aunque la auxina se encuentra en toda la planta, las concentraciones más altas se localizan en las regiones meristemáticas en crecimiento activo. Se le encuentra tanto como molécula libre o en formas conjugadas inactivas, se une de manera covalente y forma compuestos como el péptido ácido indoacetilaspártico y los ésteres AIA-inosito y AIA-glucosa (Choen y Bandurski 1982, Bandurski 1984, Caruso 1987, Woodward y Bartel 2005).

Los estudios sobre la presencia de compuestos involucrados en algunas respuestas en plantas se remontan hacia 1880, cuando Darwin observó el crecimiento de ápices hacia la luz. Los experimentos de Darwin fueron retomados y ampliados en años posteriores por Theophil Ciesielski (Ciesielski 1872) Tiempo después estos experimentos llevaron a la hipótesis que estos tropismos son regulados por una auxina, que más tarde fue descubierta como el ácido indol-3-acético (IAA). Varios investigadores ampliaron y modificaron los experimentos de Darwin, como Fitting en 1907, Boysen-Jensen en 1913, Paal en 1918 y Soding en 1925. Sin embargo, los trabajos de Went fueron los que determinaron que un compuesto aislado y puesto en un gel y que se producía de manera abundante en las puntas de coleóptilos, era el responsable de la curvatura de éstos hacia la luz (Went 1926). Se sabe que el movimiento de los ápices hacia la luz es porque la

auxina se dirige a la zona oscura de la planta, produciendo que las células de esa zona crezcan más que las correspondientes células que se encuentran en la zona clara. Esto produce una curvatura de la punta de la planta hacia la luz, movimiento que se conoce como fototropismo. En 1934 fue aislada por el investigador Kogl de orina de humanos (Kogl y Haagen 1931).

Las auxinas se emplean en el cultivo de tejido para obtener tejido indiferenciado (callo) a partir de tejido diferenciado. También se emplea junto con una citocinina para obtención de brotes a partir de callo (Skoog y Miller 1957).

Las plantas presentan otros compuestos que son estructuralmente similares al AIA y provocan respuestas homólogas a éste; se les considera hormonas auxínicas. Una de ellas es el ácido 4-cloroindolacético (4-cloro AIA), que se encuentra en semillas jóvenes de varias leguminosas (Engvild 1986). Otra, el ácido fenilacético (PAA) está difundido entre plantas y con frecuencia es más abundante que el IAA, aunque es mucho menos activo para causar las respuestas típicas del IAA (Wightman y Lighty 1982, Leuva y Letorneau 1990). La tercera, el ácido indolbutírico (AIB) se presenta en hojas de maíz y en varias dicotiledóneas (Schneider et al. 1985, Epstein et al. 1989).

Ciertos compuestos químicos sintetizados en el laboratorio también causan efectos fisiológicos similares a las auxinas y son utilizados en el cultivo de tejidos, de ellos, el ácido α -Naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético son los más conocidos. (Taiz y Zaiger 2006).

El triptófano es la principal molécula precursora del AIA. Tres rutas se han sugerido para explicar su síntesis, dos dependientes del triptófano y una dependiente de un precursor del triptófano. En la primera ruta, el triptófano se convierte al ácido indolpirúvico con una reacción de transaminación, luego éste es convertido a indolacetaldehído por una reacción de descarboxilación y el paso final implica la oxidación del indoleacetaldehído dando como resultado el ácido indolacético. La segunda ruta se inicia con la descarboxilación del triptófano dando como resultado la triptamina. La triptamina después se oxida y se desamina para producir

indolacetaldehído, esta molécula se oxida para producir el ácido indolacético. La tercera vía es independiente del triptófano y utiliza al indol-3-glicerol-fosfato, un precursor de éste (Normanly et al. 1993).

Para dar inicio a la expresión de genes que responden a AIA, es necesario destruir proteínas represoras que se unen a factores de transcripción. En presencia de auxinas el factor TIR1 se une al dominio II de Aux/AIA formando un complejo, el cual se despega y se acopla a SCF para que sea marcado mediante ubiquitinas para su posterior destrucción en el proteosoma 26S y de esta manera se induce la expresión de genes regulados por auxinas (Ruegger et al. 1998, Dharmasiri et al. 2005).

Citocininas: Son compuestos con una estructura que se asemeja a la adenina y que promueven la división de célula; en combinación con la auxina estimula la morfogénesis en el cultivo de tejidos, y promueve la conversión de etioplastos en los cloroplastos vía el estímulo de la síntesis de la clorofila. La cinetina fue la primera citocinina descubierta y nombrada así debido a la capacidad de ésta para promover la citocinesis (división de célula). La forma más común de citocinina natural en plantas hoy es la zeatina, que fue aislada del maíz (*Zea mays*). Las citocininas se han encontrado en casi todas las plantas, así como en musgos, hongos, bacterias y también en diversos procariontes. Existen más de 200 citocininas naturales más un grupo de citocininas sintéticas. Las concentraciones más altas de citocininas en plantas se registran en áreas meristemáticas, raíces, hojas jóvenes, frutas y semillas (Arteca 1996, Mauseth 1991, Cuervo 1992, Taiz y Zaiger 2006).

En 1941, Juan van Overbeek descubrió que el endospermo del coco también tenía esta capacidad y demostró que otras especies de plantas tenían compuestos que estimulaban la división celular (van Overbeek 1941). En 1954, Jablonski y Skoog extendieron el trabajo de la demostración de Haberlandt, de que los tejidos vasculares contenían componentes que promovían la división celular. La primera citocinina fue aislada de esperma de los arenques en 1955 por Miller (Miller et al. 1955). Hall y deRopp en 1955 publicaron que la cinetina se podría formar de productos de la degradación del ADN. La primera citocinina natural fue aislada de

maíz en 1961 por Miller y después fue llamada zeatina (Miller 1961). Casi simultáneamente Miller y Letham publicaron investigaciones sobre la zeatina como un factor que inducía la división celular y más adelante describieron sus características químicas (Letham 1963).

El proceso de síntesis de la citocininas se inicia con un compuesto llamado pirofosfato isopentil (ruta del mevalonato), el cual se isomeriza y reacciona con el monofosfato de adenosina con la ayuda de una enzima llamada de isopentenil AMP sintasa y resulta el 5'-fosfato isopentenil de adenosina. Este producto se puede entonces convertir a la isopentenil adenosina por el retiro del fosfato por una fosfatasa y convertirse después en isopentenil adenina por el retiro de la ribosa. La Isopentil adenina se puede convertir en las tres formas principales de citocininas naturales (Chen y Melitz 1978, McGaw 1995, Taiz y Zaiger 2006).

Las citocininas promueven la división de células en el cultivo de tejidos, estimulando la transición de la fase G_2 a mitosis y lo hacen incrementando la síntesis de proteínas estructurales necesarias para la mitosis. La síntesis de esas proteínas podría estimularse aumentando la formación de ARNm, sin embargo, no se ha observado un aumento en la síntesis de éste. Foster et al. en 1981, llegaron a la conclusión de que las citocininas actúan específicamente en la traducción y una de las evidencias que se presentó fue que los ribosomas de las células tratadas con la hormona se agrupaban en forma de poliribosomas grandes mientras que en células no tratadas se presentaban poliribosomas pequeños y monoribosomas libres, estos resultados han sido apoyados por estudios posteriores. (Fosket 1977, Fosket 1981, Chen et al. 1987, Anamiev et al. 1987, Ohya y Suzuki 1988, Housa et al. 1990).

Giberelinas: Las giberelinas se descubrieron por primera vez en Japón en plantas de arroz enfermas que alcanzaban grandes alturas, estas plantas eran incapaces de sostenerse por sí mismas y terminaban por morir debido a la combinación de daños causados por la debilidad y por ataque de parásitos (Phinney 1983). Las funciones principales que se le han atribuido a las giberelinas son la estimulación del alargamiento del vástago por la división y el alargamiento de células. Estimula la floración en respuesta a días largos, rompe la inactividad de las semillas

en algunas plantas que requieren la estratificación. Además, estimula la producción enzimática (amilasa) en los granos de cereal en la germinación, para la movilización de las reservas de la semilla. Puede causar el desarrollo (sin semillas) partenocárpico de las frutas. Puede retrasar la senectud en hojas y frutos. (Taiz y Zaiger 2006).

Se han identificado al menos 136 giberelinas en plantas, hongos y bacterias. Las giberelinas son diterpenos que se sintetizan a partir de unidades de acetato de acetyl CoA, en la ruta del ácido mevalónico. Todas tienen 19 o 20 unidades de carbono agrupadas en cuatro o cinco sistemas del anillo. Las giberelinas pueden ser sintetizadas en tejidos jóvenes y en semilla. Hay también cierta evidencia que las hojas pueden ser la fuente de biosíntesis (Sponsel 1995).

El etileno: Es una hormona gaseosa y es el único miembro de su clase. De todas las sustancias conocidas que intervienen en crecimiento vegetal, el etileno presenta la estructura más simple. Se produce en todas las plantas y se asocia generalmente a la maduración de la fruta, estimula el crecimiento y la diferenciación de brotes y de la raíz, estimula la abscisión de la hoja y de la fruta. Además, estimula la apertura de la flor, así como la senectud de ésta y de la hoja. (Taiz y Zaiger 2006).

En 1901, Dimitry Neljubow demostró que el componente activo de las emisiones del alumbrado era etileno. Doubt, en 1917, descubrió que el etileno estimulaba la abscisión. Fue hasta 1934 que Gane publicó que las plantas sintetizan el etileno. En 1935, Crocker propuso al etileno como la hormona responsable de la maduración de la fruta así como la inhibición de los tejidos vegetativos. El etileno se produce en todas las plantas superiores y deriva de la metionina. La producción de etileno varía con el tipo de tejido, especie de planta, y la etapa del desarrollo de la misma.

1.1.2 Métodos de transformación genética de plantas

1.1.2.1 Transformación mediada por *Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria Gram negativa de la familia Rhizobiaceae, puede vivir saprofiticamente en el suelo durante muchos años o parasitando plantas. Produce en las plantas una enfermedad conocida como agalla de la corona, el rango de huéspedes incluye a más 600 especies, principalmente dicotiledóneas. Chilton et al. (1977) demostraron la capacidad de *Agrobacterium* de transferir ADN entre reinos diferentes al reportar la presencia de un pequeño fragmento de ADN de la bacteria *A. tumefaciens* cuando aislaron tumores axénicos de la agalla de la corona en tabaco. La capacidad patogénica de estas bacterias está asociada a la presencia de megaplásmidos (150-200 Kb) llamados Ti (Zaenen 1974). *Agrobacterium* infecta las células transfiriéndoles parte de su plásmido, logrando de esta manera transformar genéticamente a la célula, induciendo tumoraciones. Este hecho, que ocasiona enfermedades graves a las plantas, ha sido aprovechado por los científicos para transformar plantas de interés comercial utilizando a esta bacteria, en específico a su plásmido para transformar células vegetales con genes foráneos de manera exitosa. La transferencia del DNA de *Agrobacterium* a células eucarióticas es el único ejemplo conocido en la naturaleza de este tipo. (Roy et al. 2000).

La transformación genética de plantas utilizando *Agrobacterium* ha tenido grandes aplicaciones en diversos campos de la biología vegetal, agricultura y biotecnología. *Agrobacterium tumefaciens* y sus especies relacionadas como *A. rhizogenes* y *A. Vitis* son patógenos reconocidos de plantas y tienen la capacidad de integrar establemente parte de su material genético dentro del genoma de su hospedero (Tzfira y Citovsky 2000, Zupan et al. 2000).

1.1.2.2 Biobalística

El bombardeo con micropartículas fue una técnica desarrollada por Sanford et al. (1987). Este sistema fue una respuesta a los problemas que se presentaban al transformar plantas que eran recalcitrantes a la transformación por *Agrobacterium*. La técnica consiste en impregnar partículas de oro o tungsteno con los plásmidos o ADN lineal con el gen o genes de interés, las cuales son aceleradas a alta velocidad para penetrar la pared de la célula vegetal. En el núcleo, el ADN puede separarse de las partículas metálicas e integrarse en el genoma de la célula (Rusel et al. 1992). Este método ha sido ampliamente utilizado para transformar gramíneas (monocotiledóneas), entre ellas el arroz (Potrykus y Spangenberg 1995, Vasil et al. 1994)

1.1.2.3 Transformación con PEG

Para el desarrollo de esta técnica se emplea el polietilenglicol (PEG) y el fosfato de calcio, así como la poli-L-ornitina, compuesto que cambian la permeabilidad de los protoplastos permitiendo la entrada de ADN, esta técnica se empleó en la transformación de gramíneas. Los protoplastos son células desprovistas de pared celular ya sea por medios mecánicos o enzimáticos. No es una técnica muy reproducible y por lo tanto no se ha estandarizado como una técnica rutinaria. Sin embargo para el caso del arroz existen reportes exitosos sobre la transformación con este método (Morgan y Ow 1995, Potrykus 1991).

1.1.2.4 Electroporación

La electroporación es una técnica en la cual se utiliza una descarga eléctrica para hacer permeables las membranas de los protoplastos para que de esta manera pueda el ADN entrar en las células. Un pulso eléctrico de alto voltaje de duración corta causa la formación de poros temporales, que permiten que las células tomen el ADN del plásmido. El método fue aplicado originalmente a los protoplastos, pero se

ha encontrado aplicable a las células íntegras e incluso a tejidos (Newell 2000, Van y Sauders 1992).

1.1.2.5 Microinyección de ADN

Se emplean células inmovilizadas para introducir el ADN directamente al inyectarlo a cada célula blanco de manera individual. Requiere de micro o femtocapilares para su implementación. No ha tenido gran aplicación ya que presenta dificultad para cultivar células individuales y su posterior regeneración a plantas. Esta técnica se ha empleado más ampliamente en medicina. (Potrykus 1991)

1.1.2.6 Método de fibras de silicón carbonadas

Las fibras de silicón carbonadas se adhieren al ADN y penetran directamente al interior de las células al aplicar agitación mediante vortex. Esta técnica es reciente y es no ampliamente utilizada y se está aplicando con poco éxito. Este método es limitado, sin embargo, en el cultivo de células en suspensión las fibras pueden penetrar fácilmente. Este método presenta problemas asociados a la regeneración de las plantas completas. Otra desventaja es que las fibras del silicio tienen características similares al asbesto, por lo que debe de trabajarse con cuidado. (Wang 1995, Newell 2000)

1.1.3 Genes y vectores para transformación en plantas

1.1.3.1 El transgén

Un transgén está compuesto por una secuencia codificante (región comprendida entre los codones de iniciación y terminación de la traducción) y por secuencias reguladoras que determinan el tejido, el momento del desarrollo y el nivel de expresión del transgén en la planta. Es necesario que el transgén disponga de un terminador (región no traducida en el extremo 3' del mismo, que incluye la señal de

corte y poliadenilación), la cual es necesaria para el correcto procesamiento del transcripto correspondiente. (Gelvin 1998) (Figura 1).

La regulación de la expresión del transgén es crítica para obtener el nivel de expresión deseado (Gelvin 1998). El promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, ha sido ampliamente utilizado para expresar proteínas en plantas, debido a que es considerado un promotor fuerte y constitutivo (se expresa de manera abundante en todos los tejidos) (Kamo et al. 2000). Sin embargo, la utilización de promotores específicos es más amplia en los últimos años y la investigación se ha centrado en la búsqueda de promotores específicos que se expresen en un tejido, órgano o en momento determinado del ciclo de vida de la planta. Los promotores más empleados para la transformación genética de plantas se enlistan en el cuadro 2.



Figura 1. Estructura básica de un transgén.

1.1.3.2 El vector

Para diseñar el transgén, es necesario contar con un vector apropiado que sirva de base para su construcción. Los vectores de clonación más utilizados derivan de genomas virales o de plásmidos bacterianos. Un vector de clonación tiene tres componentes esenciales: un origen de replicación, un gen marcador fácilmente seleccionable y sitios de restricción (McCormac et al. 1997, Xiang et al. 1999). Lan et al. (2008) describen alrededor de 30 vectores binarios utilizados en la actualidad en la transformación genética de plantas mediante *Agrobacterium*. Los cósmidos son vectores híbridos, que combinan las características ventajosas de los plásmidos bacterianos y del fago λ . Cos proviene de sitio cohesivo en referencia a las secuencias terminales de cadena simple de 12 bases complementarias en el

cromosoma de λ maduro. El sitio *cos* es reconocido por el sistema de empaquetamiento de ADN de λ , que hace cortes escalonados que originan los extremos cohesivos complementarios en el cromosoma maduro del fago. Poseen la habilidad del plásmido para replicarse autónomamente en las células de *E. coli* y la capacidad de empaquetamiento *in vitro* del cromosoma de λ . Contienen el origen de replicación y los genes de resistencia a los antibióticos de su plásmido parental. La principal ventaja de los cósmidos como vectores, es su habilidad para insertar fragmentos de ADN relativamente grandes (35 a 45 kb).

1.1.3.3 Genes marcadores de selección

Se necesita un gen que sirva para seleccionar el tejido transformado, generalmente de un antibiótico o herbicida, el cual inhibe la división celular de células no transformadas, permitiendo a las células que contienen el gen dividirse debido a que alteran al agente selectivo. El agente selectivo debe ser letal para las células no transformadas pero no debe afectar la fisiología ni la capacidad de regeneración de las células transformadas; debe ser de acción rápida y los nuevos productos fácilmente metabolizados a compuestos inocuos para las células; además, debe ser simple de implementar y relativamente económico (Park et al. 1998). Los genes marcadores de selección utilizados en plantas se enlistan en el cuadro 3.

Los marcadores de selección pueden dividirse en varias categorías dependiendo del tipo de selección que confieran, positiva o negativa, o si la selección es condicional o no a la presencia de sustratos externos (Miki y McHugh 2004). Los primeros marcadores que se desarrollaron fueron los condicionales a la presencia de antibióticos, herbicidas y compuestos químicos, como el que confería resistencia a kanamicina, higromicina y el que confiere resistencia al herbicida bialafos, estos marcadores han tenido tal impacto en la transformación genética de plantas que una revisión publicada por Miki y McHugh (2004) mencionan que el 90% de las publicaciones sobre transformación genética de plantas utilizaban al menos uno de estos tres.

Los genes de la fosfomanosa isomerasa, xilosa isomerasa y el gen de la beta glucoronidasa (*manA*, *xylA* y *uidA*) han sido utilizados como marcadores de selección positivos no tóxicos (Zhang y Puonti-Kaerlas 2000, Joersbo y Okkels 1996, Haldrup et al. 1998). Recientemente, los genes los genes *ipt* y *pga22* que codifican para las isopentiltransferasa, han sido utilizados como marcadores de selección. Estos genes no son condicionales de la presencia de sustratos externos sino que actúan modificando el nivel endógeno de hormonas, alterando los procesos fisiológicos y promueven el desarrollo de una característica observable, en este caso alteran el crecimiento del tallo; estos genes se introducen bajo el control de promotores inducibles, para que se permita su expresión en determinadas condiciones. (Endo et al. 2001, Zuo et al. 2002).

1.1.3.4 Genes reporteros

Para la obtención de tejidos transformados es necesario contar primeramente con un gen reportero, el cual servirá para indicarnos de manera visual en qué tejidos u órganos de la planta transformada se expresa el gen insertado o para medir la expresión transitoria. Los genes reporteros codifican proteínas cuya actividad enzimática se puede detectar fácilmente utilizando los sustratos adecuados. Los más utilizados codifican las enzimas β -glucuronidasa, luciferasa y la proteína verde fluorescente. Los genes reporteros más utilizados en plantas se enlistan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Genes reporteros comúnmente utilizados en la transformación genética de plantas			
Gen reportero	Fuente	Método de detección	Referencia
<i>gus/uidA</i> (β -glucuronidasa)	<i>E. coli</i>	Histoquímico, espectrofotométrico y Fluorométrico	Jefferson et al. (1986)
<i>GFP</i> (Proteína de fluorescencia verde)	<i>Aequorea victoria</i>	Fluorescencia, no destructiva	Haseloff y Amos (1995)
<i>Cat</i> (Cloranfenicol acetiltransferasa)	<i>E. Coli</i>	Ensayo radiactivo sensible, semi cuantitativo	Herrera-Estrella et al. (1983)
<i>Luc</i> (Luciferasa)	<i>Photinus pyralis</i>	Luminiscencia	Ow et al. (1986)
luxA luxB (Luciferasa)	<i>Vibrio harveyi</i>	Luminiscencia	Olsson et al. (1988)

Cuadro 3. Genes utilizados comúnmente como marcadores de selección			
Gen de selección	Agente de selección	Fuente	Referencia
bar Fosfinotricina acetil transferasa	Herbicida Basta Fosfinotricina, bialafos	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	De Block et al. (1987)
EPSP 5-enolpiruvilshikimato-3-Glifosato fosfato sintasa	Glifosato	<i>Petunia hybrida</i>	Armhein et al. (1983)
nptII Kanamicina. Antibióticos aminoglicosados	Kanamicina, G418, paromomicina, neomicina	<i>E. coli</i>	Beck et al. (1982)
aphIV Higromicina fosfotransferasa	Higromicina B	<i>E. coli</i>	Van den Elzen et al. (1985)
dhfr Dihidrofolato reductasa	Metotrexato	Plásmido R67. <i>E. coli</i>	Fling y Elwell (1980)
tdc Triptofano decarboxilasa	4-metil triptófano	<i>Catharanthus roseus</i>	Goddijn et al. (1993)
manA Manosa 6P-isomerasa	Manosa-6P	<i>E. coli</i>	Zhang y Puonti-Kaerlas (2000)
xylA (<i>Xilosa isomerasa</i>)	D-Xilosa	<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes</i>	Haldrup et al (1998)
UidA (β - <i>Glucuronidasa GUS</i>)	Benziladenil-N-3-glucoronido	<i>E. coli</i>	Joersbo y Okkels (1996)
ipt (<i>Isopentenyl Transferasa</i>) y pga22		<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Endo et al. (2001)

1.1.1.5 Promotores

Los promotores son regiones del ADN río-arriba de la región codificante, que contienen secuencias específicas que son reconocidas por proteínas involucradas con el inicio de la transcripción, como activadores o represores, además de la ARN polimerasa. La variabilidad en la expresión génica se debe a la presencia de elementos reguladores presentes en la región reguladora del gen, generalmente situados en el extremo 5', río arriba del sitio de unión de la ARN polimerasa (Roy et al 2000, Teeri et al. 1986).

Los tipos de promotores usados para regular la expresión de un gen pueden ser divididos en:

Promotores constitutivos. Son los que dirigen la expresión en todos los tejidos y en general no están influenciados por factores externos. Este tipo de promotores han sido ampliamente utilizados en la transformación genética de plantas. El más usado es el promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S CaMV), este promotor es capaz de inducir una alta expresión del transgén tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas (Odell et al. 1985). Se ha descrito que el fragmento de 343 pb de este promotor es suficiente para activar en forma constitutiva la transcripción y se utilizan diferentes versiones de éste. Si bien los promotores constitutivos son necesarios para mantener la expresión de los genes esenciales para el funcionamiento correcto de la célula, cuando éstos se utilizan para la expresión de un transgén, puede que la regulación del promotor varíe, debido a que el gen se estaría expresando en tejidos que normalmente no se expresaría o en etapas del desarrollo que no estaría presente en plantas no transformadas, pudiendo provocar aberraciones del fenotipo esperado. (Roy et al. 2000).

Promotores específicos de tejido. Éstos dirigen la expresión de un gen en un tejido en particular o en diferentes etapas del desarrollo. Los elementos que se encuentran en los promotores de genes de plantas, definen la especificidad de la expresión específica de tejido, ya sea en tubérculos, raíces, tejidos vasculares u otros tejidos vegetativos, semillas u otros órganos reproductivos. Este tipo de promotores se ha

empleado con frecuencia en la transformación de plantas debido a que se puede dirigir su expresión a un tejido o a un estadio de la planta. En el cuadro 4. Se enlistan algunos promotores específicos (Kamalay 1980, Teeri et al. 1986)

La tendencia en el uso de promotores en la transformación de plantas tiene dos vertientes: una se inclina hacia el uso de promotores existentes en la naturaleza, que sean vegetales, específicos y estables; la otra vía ha sido la construcción de promotores artificiales híbridos con características especiales. Aunque se han obtenido resultados favorables, el poco conocimiento en los sistemas de regulación limita su aplicación. Los promotores más utilizados en la transformación genética se enlistan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Promotores utilizados en transformación de plantas

Promotores	Tipo	Referencia
35 S (virus del mosaico de la coliflor)	Constitutivo	Odell et al. (1985).
<i>nos</i> (Nopalina sintetasa de <i>Agrobacterium</i>)	Constitutivo	Jefferson et al. (1987)
<i>Act 1</i> (Actina de arroz)	Constitutivo	McElroy et al. (1991), Zhang et al. (1991)
<i>Ubi</i> (Ubiquitina de maíz)	Constitutivo	Christensen et al. (1992)
Patatina (tubérculo de papa)	Específico tubérculo de papa	(Liu et al. (1990)
β -faseolina de poroto	Específico de endospermo y embrión	van der Geest y Hall (1996)
α -globulina de algodón.	Específico de semilla	Sunilkumar et al. (2002)
β -conglucina de soya	Específico de semilla	Lessard et al. (1993)
Heliantinina de girasol	Específico de semilla	Nunberg et al. (1994)

1.2 El arroz

El arroz ocupa el tercer lugar entre los cereales más producidos en el mundo después del maíz y el trigo, representa el cultivo más importante que sirve como fuente de alimentación primaria para la población humana, ocupa el 15% de la superficie cultivada del planeta, de la cual alrededor del 90% se encuentra en Asia. Existen algunos países que incluso atribuyen el desarrollo de su civilización al cultivo del arroz. (FAO 2003).

El arroz proporciona cerca del 20% de la caloría mundial, al ser parte importante de la alimentación de cerca de 3 mil millones de personas tan sólo en Asia, haciéndole el más importante cultivo de plantas comestibles. El consumo del arroz excede 100 kilogramos per cápita anualmente en muchos países asiáticos, en África y América Latina entre 30 y 60, mientras que en los países desarrollados de Europa y Estados Unidos el promedio es de 10 kilogramos (FAO 2003).

La producción de arroz ha venido aumentando cada año en el mundo, en 2008 la producción fue de 683 millones de toneladas de arroz palay (equivalentes a 456 millones de toneladas de arroz elaborado), 23 millones de toneladas (3.5 %) más que en 2007 que fue de 643 millones de toneladas (430 millones de arroz elaborado). El incremento se basaría en un aumento del 2.2% de la superficie, a 159 millones de hectáreas, como reacción positiva a los precios altos y al apoyo de los gobiernos. El pronóstico de la FAO para el 2009 es que se batirá un nuevo record en la producción mundial de arroz y para el año 2025 la producción será de un poco más de 760 millones de toneladas de arroz elaborado, que es 40 % más que el arroz producido en 2007. Sin embargo, se continúa con un déficit ante la demanda creciente de arroz en los países más pobres del planeta. (FAO 1999, FAO 2009).

Los granos están constituidos por 90% de almidón y sólo 10% de proteínas. A pesar del bajo contenido proteico, su importancia nutricional se debe a la calidad, ya que posee un elevado índice de aminoácidos esenciales (60%), superior al de otros

granos de amplio consumo como el maíz y el trigo (40 y 43%, respectivamente) (Eggum et al. 1980).

Las proteínas de reserva en las semillas de arroz están constituidas por albúminas (5%), globulinas (10%), prolaminas (5%) y gluteínas (80%) (Takaiwa et al. 1999).

El arroz (*Oryza sativa* L.) es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia Poaceae, también conocidas como gramíneas, son una familia de plantas herbáceas o muy raramente leñosas del orden Poales (Cuadro 5). Hay veintiuna especies silvestres en el género *Oryza*, nueve de ellas son tetraploides. Las especies silvestres restantes así como las especies cultivadas son diploides. (Klush 1997).

El género *Oryza* se originó probablemente por lo menos hace 130 millones de años como hierba silvestre en Gondwana, el continente que se dividió en partes para convertirse en Asia, África, las Américas, Australia y la Antártida (Chang 1976). Las especies actuales del género *Oryza* se distribuyen en todos estos continentes, excepto en la Antártida. La domesticación de arroces silvestres comenzó hace aproximadamente 9,000 a 10,000 años en los valles ribereños del sur y sureste de Asia y China (Klush 1997, Chang et al. 1976). El arroz asiático cultivado ha evolucionado en tres subespecies: *Indica*, *Japonica* y *Javanica* (Klush 1997).

Cuadro 5. Clasificación científica del arroz. (Cronquist 1981)	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Poales
Familia:	Poaceae
Género:	<i>Oryza</i>
Especie:	<i>O. sativa</i> L.

1.2.1 El arroz en México

Entre los cereales que se utilizan para la alimentación humana en México, el arroz ocupa el tercer lugar después de maíz y trigo, tanto en producción como en consumo. De la superficie sembrada, más del 50% se realiza bajo condiciones de temporal, de ahí la importancia que representa esta modalidad (INIFAP-CIRNO 2003).

En México el programa de mejoramiento genético de arroz emprendido por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) ha tenido buenos resultados, se han liberado variedades importantes de arroz *Indica* cultivadas en condiciones de riego y con un alto rendimiento y calidad culinaria para las diferentes zonas con potencial para la producción de arroz, como la variedad CICA 9, CHIAPAS A-84, Jojutla mejorado, Morelos A70, Zapata A70, Morelos A-83, Morelos A-88, LOMA BONITA A-92, Morelos A-92 y Morelos A-98, entre otras.

La variedad Morelos A-92 proviene de la cruce de la F1 de las líneas Jojutla mejorado/Iguala A-90* Iguala A-70/C4-63/IR-480-5-7-3/Morelos A-70*IR 480-5-7-3/C4-63/Tepep A. La variedad Jojutla mejorado y Morelos A-70 son variedades Indicas Mexicanas y presentan grano con buena calidad molinera y culinaria. El genotipo Iguala A-70 es resistente al Acame y las líneas IR 480-5-7-3, C4-63 y Tepep A son de buen hábito de crecimiento y tolerantes al hongo *P. oryzae*; estas líneas proceden del Instituto Internacional de Investigación en Arroz (IRRI) de Filipinas (Salcedo-Aceves 1993). La variedad Morelos A-92 presenta mejoras con respecto a las variedades antecesoras, su rendimiento se reporta entre 8 y 11 toneladas por hectárea dependiendo de las condiciones, además, es una variedad de riego, presenta excelente calidad molinera hasta el 60 % de grano entero, aceptable calidad culinaria y presenta resistencia al hongo *Pyricularia oryzae* Cav (Salcedo-Aceves 1993).

Los estados productores de arroz en México son: Morelos, Michoacán, Sinaloa, Veracruz, Nayarit, Campeche y Tabasco entre otros, sin embargo, la

producción nacional es ampliamente rebasada por la demanda, lo que ha obligado a importar arroz principalmente de Estados Unidos.

1.2.2 El arroz es un modelo de estudio entre los cereales

Además de ser un cultivo importante para el consumo humano, el arroz juega un papel mayor como modelo en los estudios genómicos, sólo presenta 12 cromosomas y presenta el genoma más pequeño con respecto a los otros cereales. Mientras que el arroz tiene un genoma estimado en 420 a 450 Mb (millones de pares de bases), el sorgo, maíz, cebada y trigo tienen genomas de 1000, 3000, 5000 y 16000 Mb, respectivamente (Kuwada 1910, Goff 1999). La secuencia del arroz *Japonica* cultivar Nipponbare fue reportada por Goff et al. (2002) y por Yu et al. (2002) para una subespecie *Indica*.

Los recursos genéticos del arroz descubiertos hasta ahora son variados y la investigación sobre ellos debe ayudar a desarrollar un futuro sostenible para la raza humana. La información con que se cuenta hoy día sobre las diferentes variedades de arroz está almacenada en diferentes bancos de genes nacionales o internacionales, por ejemplo, en Genbank, http://www.gene.affrc.go.jp/about_en.php del National Institute of Agrobiological Sciences in Japan), Rice Researcher's committee in Japan <http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top/top.jsp>, International Rice Research Institute de Filipinas (<http://www.irri.org/GRC/GRChome/Home.htm>). También existe Información para la investigación de la evolución del genoma entre las especies del genero *Oryza* en la Universidad de Arizona (<http://www.omap.org/>) (Jianzhong et al. 2008). Otro sitio importante es (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) del Rice Genome Annotation Project, en éste se puede encontrar el genoma de la subespecie de Nipponbare y la anotación de los 12 cromosomas.

Sharma et al. (2006) realizaron un estudio comparativo entre el genoma del arroz y gramíneas y encontraron que el 69.8% de los genes del sorgo son

homólogos a genes del arroz, seguidos por la cebada (56%), el maíz (49.0%), y el trigo (33.7%). Una región de 40 kb en el brazo largo de del cromosoma 11 fue identificada como rica en genes de defensa; se encontró que dichos genes se concentran en los cromosomas 1, 2 y 11 y representan el 25% de un total de 37 544 genes presentes en el genoma entero. (Sharma et al. 2006).

1.2.3 Transformación genética del arroz

La transformación genética de arroz y la regeneración es crítica para el desarrollo de nuevas líneas de arroz a través de estrategias biotecnológicas. Estudios previos han demostrado que la frecuencia de regeneración de las variedades tipo *Indica* ha sido baja ya que son muy recalcitrantes en cultivo *in vitro*, lo que limita enormemente la disponibilidad de material (Takeuchi et al. 1997, Valdez et al. 1997). En 1996 Sivamani et al. reportan la transformación de callos embriogénicos de la variedad Indica TN1 mediante bombardeo con partículas, utilizando medios líquidos y obteniendo el 3% de eficiencia de transformación. En el Laboratorio de Transformación Genética de Plantas del CINVESTAV Unidad Irapuato, se utilizaron callos embriogénicos derivados de semillas pero sin pasar por un cultivo en medio líquido previo al bombardeo con el ADN, para reducir tiempos y posibilidades de contaminación. Valdez et al. (1998) transformaron 8 variedades de arroz de importancia agronómica, de Centroamérica, Asia y África, obteniendo los siguientes resultados:

- a) Obtención de callos embriogénicos en 5 días.
- b) Altas frecuencias de la transformación, el porcentaje es diferente para cada variedad. (Entre 1.7- 14.0%).
- c) Capacidad de recuperar el material transgénico.
- d) Se detectó expresión estable de los genes introducidos en los transformantes primarios y en la progenie en todos los cultivares.

Este procedimiento fue optimizado en la variedad Morelos A-92 donde se obtuvo el 14% de los callos embriogénicos bombardeados con expresión del gen

uidA/GUS y el 4.6% de eficiencia de transformación (Martínez-Trujillo et al. 2003).

Los promotores utilizados en la transformación, así como los genes reporteros se presentan en los cuadros 6 y 7.

**Cuadro 6. Promotores utilizados en la transformación de arroz
(Modificado de Vasil 1999)**

Promotor	Origen	Función	Referencias
35S	CaMV	Constitutivo	Terada y Shimamoto (1990), Datta et al. (1990), Batraw y Hall (1991), Mitsuahara et al (1996). Valdez et al. (1998), Lunn et al. (2003)
Emu	Maíz	Constitutivo	Chamberlain et al (1994)
Ubiquitina	Maíz	Constitutivo	Toki et al. (1992), Cornejo et al. (1993)
Actina	Arroz	Constitutivo	McElroy et al. (1990), Zhang et al. (1991)
<i>Adh1</i>	Maíz	Constitutivo	Kyouzuca et al. (1993)
PEPc	Maíz	Tejido verde	Matsuoka et al. (1994), Datta et al. (1996)
<i>Pith</i>	Maíz	Tejido medula	Datta et al. (1998)
<i>Pith 2</i>	Papa	Inducible por herida	Duan et al (1996)
NOD	Legumbre	Expresión selectiva	Reddy et al. (1998)
<i>rolC</i>	Plásmido R1	Tejido vascular y embriogénico	Matsuki et al. (1989)
<i>LHCP</i>	Arroz	Hojas, órganos florales y tallo	Tada et al. (1991)
Histona H3	Trigo	Tejido meristemático	Terada et al. (1993)
<i>Rbc-S</i>	arroz	células del mesófilo	Kyozuka et al. (1993)
<i>RTBV</i>	RTBV	células del floema	Yin y Beachy (1995)
<i>Osg-6B</i>	Arroz	tapetum	Yokoi et al. (1997)

Cuadro 7. Genes de interés agronómico introducidos en arroz.
(Modificada de FAO 1999)

Gen	Método	Referencias
<i>bar</i> resistencia a herbicida	Biobalística PEG	Chistou et al. (1991) Datta et al. (1992), Cao et al. (1992)
Proteína de la cápside del virus de la mancha. Resistencia al virus	Electroporación	Hayakawa et al. (1992)
<i>Bt cryA</i> (b). resistencia a insectos	Electroporación Biobalística PEG	Fujimoto et al. (1993) Wunn et al. (1996) Ghareyazie et al. (1997), Nayak et al. (1997)
Kitinasa Resistencia a la quemadura de la vaina	PEG	Lin et al. (1995)
Corn cystatin (CC)	Eletroporación	Irie et al. (1996)
<i>CpTi</i> resistencia al barrenador del vástago	PEG	Xu et al. (1996)

1.3 La sacarosa en las plantas

La sacarosa ocupa una posición central en el metabolismo de todas las plantas, es el principal producto de la fotosíntesis en la mayoría de las plantas y es exportado de las hojas a todos los tejidos heterotróficos. El carbono fijado en el cloroplasto sale como triosas fosfato al citoplasma, donde entra a la vía de síntesis de sacarosa. (Curatti et al. 1998).

La sacarosa, puede ser utilizada directamente por la glucólisis o desplazarse dentro de la planta como carbohidrato soluble vía floema. Cuando es exportada a los tejidos heterotróficos, la sacarosa se utiliza para el mantenimiento del metabolismo, la biosíntesis de pared celular, la respiración celular o se convierte a almidón para almacenarla como reserva y compuesto señal. (Sturm 1999, Kutschera y Heiderich 2002). Se conoce ampliamente que el frío induce la acumulación rápida de carbohidratos solubles en plantas (Levitt 1980, Pollock 1984, Wanner y Juntilla 1999), lo que reduce la deshidratación celular durante la congelación y puede ayudar directamente a proteger las macromoléculas. Además, puede actuar como fuente alimenticia durante la aclimatación, y puede apoyar la recuperación (Levitt 1980, Trunova 1982, Klotke et al. 2004).

1.3.1 La sacarosa es sintetizada por la enzima Sacarosa Fosfato Sintasa

La síntesis de sacarosa está confinada al citosol debido a la estricta separación en compartimentos de las enzimas implicadas en su síntesis.

La sacarosa fosfato sintasa (SPS, EC 2.4.1.14) cataliza la penúltima reacción en el camino de la biosíntesis de la sacarosa, a partir de UDP-glucosa (UDPGlc) y de fructosa 6 fosfato (Fru6P) obteniendo sacarosa-6-fosfato (Suc6P). (Lunn et al. 1990).

La síntesis de la sacarosa puede ser catalizada por dos enzimas diferentes en las plantas superiores: la sacarosa fosfato sintasa (SPS; EC 2.4.1.14), que cataliza la reacción:



y la sacarosa sintasa (SuSy; EC 2.4.1.13), que cataliza la reacción:



Ambas enzimas son solubles en el citoplasma y catalizan reacciones libremente reversibles. En la reacción donde participa la sacarosa sintasa, ésta se orienta principalmente hacia la degradación de sacarosa (Winter y Huber 2000), mientras que la reacción catalizada por la sacarosa fosfato sintasa, la remoción rápida del fosfato de la sacarosa 6-fosfato por sacarosa fosfatasa (SPP; EC 3.1.3.24), hace que la reacción por SPS sea prácticamente irreversible (Huber y Huber 1996). Existe evidencia que la SPS y SPP se asocian formando un complejo multienzimático, formando un canal metabólico que hace más eficiente la síntesis de sacarosa (Echeverría et al. 1997).

1.3.2 La síntesis y degradación de la sacarosa está regulada y acoplada a la síntesis de pared celular

La UDP-Glucosa junto con la Fructosa 6-fosfato son los sustratos de la SPS en plantas. En la cianobacteria *Anabaena*, se ha determinado que además la GDP-glucosa, TDP-glucosa y ADP-Glucosa son sustratos adecuados para la SPS (Porchia y Salerno 1996). En *Synechocystis* la UDP-Glucosa y la GDP-Glucosa son sustrato de la SPS (Curatti et al. 1998).

La SPS es una enzima altamente regulada en plantas. Además de la regulación alostérica por la glucosa 6-fosfato (Glc6P) y el ortofosfato (pi), en la espinaca (*Spinacia oleracea* L.), la SPS de la hoja se activa por luz y es desactivada en la oscuridad por desfosforilación y fosforilación respectivamente (Siegl et al. 1990, Huber y Huber 1996). La fosforilación de la SPS en plantas se ha reportado que se

da en diferentes sitios de serina: en serina 158 en espinaca (Siegl et al. 1990, Huber y Huber 1996) y serina 162 en el maíz. (Huber y Huber 1996).

Los modelos proponen que el sustrato para la síntesis de la celulosa (UDP-glucosa) está acoplado al complejo de la síntesis de sacarosa vía la enzima Sacarosa Sintasa (SuSy) (EC 2.4.1.13), la cual degrada a la sacarosa para generar la UDP-glucosa y la fructosa (Delmer 1999, Haigler et al. 2001). Este modelo propone que el retiro de la fructosa de la célula es crítico para la síntesis continuada y mantenida de la celulosa, pues es sabido que la fructosa es un inhibidor fuerte de la actividad de Sacarosa Sintasa (SuSy) (Haigler et al. 2001). La SPS proporciona un sustrato continuo para SuSy y a su vez aporta UDP-glucosa para la biosíntesis de celulosa, mientras que la SPS limita las pozas intracelulares de fructosa para evitar la inactivación de la SuSy. (Delmer 1999). En el contexto de la formación de la pared secundaria de célula, la SPS es integral, pues tiene como función contribuir a la síntesis del sustrato (UDP-glucosa) para la síntesis de la celulosa, así como mantener su fuente constante de sustrato reciclando la fructosa (Lunn et al. 2003).

1.4 La SPS de *Synechocystis*

Kaneko et al. (1996) determinaron la secuencia completa del genoma de *Synechocystis* sp PCC 6803. Se ha identificado una proteína de 720 aminoácidos con actividad de SPS presente en *Synechocystis* sp. Esta enzima tiene características bioquímicas reguladoras y estructura molecular distintas en comparación con las de las plantas (Curatti et al. 1998) El gene de la SPS de *Synechocystis* tiene 2163 bp y muestra identidad total baja con regiones codificantes con otros genes de SPS de plantas (35–39%)(figura 2), por ejemplo, identidad del 47% con el maíz y los genes de SPS de la espinaca (Lunn et al. 1999). La SPS de *Synechocystis* sp. PCC 6803 difiere de la enzima de las plantas en ser insensible a Glc-6-P y es inhibida débilmente por Pi (Lunn et al. 1999). Sin embargo, una característica aún más interesante es que la SPS de *Synechocystis* carece de todos los sitios conocidos de fosforilación encontrados en la SPS de

plantas (Lunn et al. 1999). (figura 2). Estas observaciones sugieren que la SPS de cianobacteria no esté sujeta a la regulación o a la inactivación alostérica por la fosforilación de la proteína. Una estrategia importante para la regulación de la expresión genética, implica formas alternativas de una proteína que difieran en su cinética y en sus propiedades reguladoras.

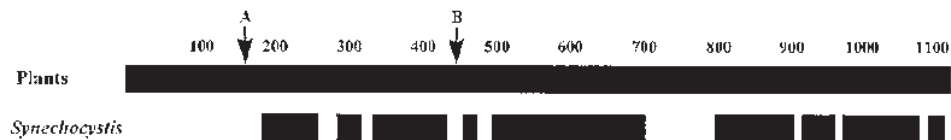


Figura 2. Alineamiento esquemático de la secuencia de aminoácidos de la SPS de plantas y de Synechocystis. Las flechas indican los sitios de fosforilación. (Tomado de Lunn et al. 1999)

1.5 Expresión de genes de SPS en plantas

Ha sido reportada la expresión del SPS de maíz en plantas transgénicas del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), bajo el control del promotor de *RbcS* del tabaco, y se detectó un aumento de la actividad de la SPS en las hojas y además cambió el balance de fotoasimilables de almidón hacia la sacarosa (Worrell et al. 1991). El gen de la SPS del maíz expresado en las plantas de tomate transgénicas no era regulado por luz-obscuridad, probablemente porque las cinasas de la proteína SPS de tomate no podían fosforilar la Ser162 en la enzima del maíz (Worrell et al. 1991). Algunas líneas de éstas, y otras plantas de tomate que expresaban el SPS de la hoja de maíz bajo control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), con luz y altas concentraciones de CO₂, demostraron elevados índices de fotosíntesis, tasas de crecimiento relativas más altas y un fruto más grande (Galtier et al. 1993, Galtier et al. 1995, Murchie et al. 1999, Laporte et al. 2001).

El gen de la SPS de *Arabidopsis thaliana* se ha reportado que mejora el funcionamiento fotosintético en bajas temperaturas y aumenta la tolerancia a las

heladas (Strand et al. 2001, Signora et al. 1998). En plantas de algodón transformadas (*Gossypium hirsutum* L.) con alta actividad de la SPS mejoraron tanto la calidad como el tamaño de la fibra, mostrando con ello un alto rendimiento con respecto a las plantas no transformadas (Haigler et al. 2000). En árboles híbridos del álamo (*Populus tremulata*) con aumento en la actividad de la SPS, se demostró un aumento en la fotosíntesis y altas tasas de crecimiento (Mouillon y Hurry 2001).

En otro reporte se estudiaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transgénicas que sobre expresaban un gen de la SPS del maíz, las que mostraron un aumento en actividad de la SPS, acelerado el desarrollo de flores y mayor número de éstas. (Baxter et al. 2003).

Park et al. (2007) sobre expresaron un gen de SPS de *Arabidopsis* en tabaco y reportaron una altura mayor para las plantas transformadas respecto a las plantas no transformadas, debido a un aumento de la transcripción, un incremento de la actividad enzimática en hoja y en tejido fino del vástago, altura y crecimiento del diámetro, acumulación de la biomasa y aumento en la longitud de la fibra.

Para investigar los efectos de expresar la SPS de cianobacterias en plantas, el gen de la SPS de *Synechocystis* se ha introducido en tabaco y tomate bajo el control del promotor de CaMV 35S y en el arroz subespecie *Japonica* bajo el control del promotor del maíz *Ubi1*; en estos casos no hubo un incremento significativo en la síntesis de sacarosa por razones no conocidas (Lunn et al. 2003).

En la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), la fuente del 70% del azúcar del mundo, la acumulación de sacarosa en los vástagos es dependiente de la actividad de la SPS (Zhu et al. 1997). Varios de estos estudios son correlativos y no prueban que la SPS es un factor que controla el crecimiento y la producción de estas plantas. Sin embargo, parece que la SPS puede ser un marcador bioquímico valioso para entender en qué medida influyen las diferentes isoformas en estos

rasgos complejos; por lo tanto, sería altamente deseable tener una mejor comprensión del control genético de la enzima en plantas de interés alimentario.

En la mayoría de los reportes de plantas transformadas, se encontró que hay un aumento de la actividad de la SPS, así como de aumento en biomasa. Sin embargo, lo anterior no se ve reflejado en un aumento de sacarosa en las hojas y es posible que las líneas transformadas no tuvieran una expresión adecuada por la posición del transgén en el genoma, por lo que se propone en este trabajo de maestría establecer las condiciones para realizar la transformación del arroz, ahora en una variedad de importancia en México (Morelos A92) y además diseñar un vector utilizando un promotor con actividad en tejido fotosintético.

II. HIPÓTESIS

El arroz Morelos A-92 puede ser manipulado para ser transformado con el gen de la sacarosa fosfato sintasa de *Synechocystis*.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Establecer las condiciones para transformar plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) Morelos A-92 con el gen de la SPS de *Synechocystis*.

3.2 Objetivos específicos

- a) Analizar la expresión transitoria conferida por el promotor del gen de la subunidad pequeña de la ribulosa bifosfato carboxilasa de tabaco (*rbcS*) en tejidos de arroz.
- b) Establecer las condiciones óptimas para seleccionar callos embriogénicos derivados de escutelo.
- c) Establecer las condiciones óptimas para regenerar plantas a partir de callos embriogénicos.
- d) Generar callos embriogénicos de arroz con resistencia a higromicina y expresión del gen reportero *uidA*.
- e) Transformar callos embriogénicos de arroz por bombardeo y generar plantas con la integración del gen SPS de *Synechocystis*.
- e) Iniciar el diseño de un vector con el promotor de la subunidad pequeña de la RUBISCO de tabaco y el gen SPS de *Synechocystis*

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Plásmidos

Se utilizaron los siguientes vectores:

- a) Vector que contienen el gen de la SPS de *Synechocystis* fusionado al promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor.

- b) Vector que contiene el promotor del gen de la subunidad pequeña de ribulosa bifosfato carboxilasa de tabaco controlando la expresión del gen *uidA* con el terminador *nos*. Este promotor tiene las siguientes características (Argüello 1996):
 - i) Capacidad de responder a señales luminosas
 - ii) Dependencia funcional del estado de desarrollo del cloroplasto.
 - iii) Expresión restringida a tejidos fotosintéticos, principalmente en células del mesófilo, pero también en el clorénquima del tallo y en partes verdes de los órganos florales (sépalos y gineceo).

- c) Vector con expresión del gen reportero *uidA* (GUS), para dar seguimiento a la expresión transitoria en callos embriogénicos. Plásmido CAMBIA 1301. (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/materials/vectors>).

4.2 Secuenciación de vectores

Los vectores que se utilizaron en el presente trabajo fueron donados por el CIVESTAV Unidad Irapuato. A partir de sus mapas se diseñaron oligonucleótidos específicos para secuenciarlos y de esta manera confirmar cómo estaban contruidos.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para obtener el promotor *rbcS* de tabaco, el gen *SPS* de *Synechocystis* y para obtener el terminador *nos*. Mediante PCR se amplificaron las regiones mencionadas y los fragmentos se clonaron por separado en el vector pGEM-Teasy (PROMEGA).

4.3 Ligamiento de los fragmentos obtenidos por PCR en el vector pGEM-Teasy

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron clonados en el vector pGEM-T-easy (PROMEGA) con las siguientes condiciones de reacción:

3 µl producto de PCR.

1 µl del vector pGEM-T-easy.

2 µl de buffer 5X

3 µl de agua desionizada estéril

1µl de la enzima T4 ADN ligasa

Se incubó la reacción durante 4 h a 16⁰C y después se transfirió a 4°C durante 12 horas aproximadamente. Las mezclas de reacción se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli*.

4.4 Preparación de células competentes

El procedimiento se realizó de acuerdo a Sambrook et al. (1989). Se utilizó la cepa TOP-10 de *E. coli* (INVITROGEN), la cual es complementada con plásmidos que codifican para un fragmento proteico faltante para que se produzca la actividad de la enzima β-galactosidasa.

El método utilizado se describe a continuación:

- i) Usar medio YENB, el cual no lleva NaCl y permite eliminar fácilmente las sales.
- ii) Inocular un litro de medio con un cultivo de *E. coli* de toda la noche (5-10 ml) y cosechar a una D.O. de 0.6 a 600 nm de absorbancia. Enfriar en hielo por 5 minutos.

- iii) Centrifugar a 4 000 g por 15 minutos.
- iv) Remover el medio y resuspender en 100 ml de agua fría estéril. Repetir este paso.
- v) Eliminar el agua y resuspender en 20 ml de glicerol frío al 10%.
- vi) Centrifugar a 4 000 g por 15 minutos.
- vii) Eliminar el sobrenadante y resuspender en un volumen final de 2-3 ml de glicerol frío al 10%. El número de células debe ser de $2-4 \times 10^{10}$ por ml. Alicuotar en tubos de centrifuga de 1 ml y pasar al congelador. Almacenar a -70°C . Descongelar en hielo antes de su uso.

4.5. Transformación de células competentes

Se transformaron células competentes de *E. coli* TOP10 con los plásmidos construidos, utilizando un electroporador Eppendorf 2510 a 1800 V y cubetas de 100 μl . Se transformaron células competentes de *E. coli* TOP10 con las mezclas de ligación, previamente dializadas en membranas millipore de tamaño de poro 0.22 μm . El método utilizado se describe a continuación:

- i) A 40 μl de células competentes adicionar el ADN previamente dializado.
- ii) Dejar en hielo por lo menos un minuto.
- iii) Pasar a la cubeta BIO-RAD pulser de 0.2 ml.
- iv) Dar el pulso eléctrico de acuerdo a las condiciones del electroporador
- v) Adicionar un mililitro de medio LB.
- vi) Resuspender las células y pasar a un tubo de plástico e incubar con o sin agitación a 37°C por 1-3 horas. (Una con agitación y otra sin agitación).
- vii) Plaquear las células en medio selectivo LB con carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), X-Gal (2 mg/ml) e IPTG (100 mM).
- viii) Las cajas se incuban por 20 h a 37°C .

4.6 Aislamiento de ADN plasmídico de candidatos (colonias blancas) mediante la técnica de Mini-Prep (Sambrook et al. 1989)

Para la selección de candidatos se aisló ADN a partir de colonias blancas. Las colonias blancas son las que poseen el inserto debido a que no degradan el X-gal porque ha quedado interrumpido el gen de la β -galactosidasa.

La técnica se describe a continuación:

- i) Inocular una colonia en medio LB con el antibiótico específico, de ser necesario de 2 a 4 ml de medio.
- ii) Incubar toda la noche a 37°C con agitación.
- iii) Vaciar en un tubo eppendorf 1.5 ml y centrifugar a 12 000 g a 4°C por un minuto.
- iv) Eliminar el sobrenadante.
- v) Resuspender la pastilla en 150 μ l de solución fría Birboin 1 (agitar en Vortex o resuspender con pipeta).
- vi) Adicionar 300 μ l de solución Birboin 2 (se prepara al momento), mezclar suavemente con la mano (no usar Vortex) y dejar en hielo por 5 minutos.
- vii) Adicionar 225 μ l de solución Birboin 3, agitar suavemente (no usar Vortex) para disgregar los restos celulares. Si se usa Vortex se libera el ADN cromosomal a la solución y se mezcla con el ADN plasmídico, lo cual no es conveniente. Dejar 10 minutos en hielo.
- viii) Centrifugar a 12 000 g por 10 minutos a 4°C. Pasar a hielo. Recuperar el sobrenadante.
- ix) Adicionar un volumen de fenol-cloroformo, mezclar con Vortex y centrifugar a 12 000 g a 4°C por 2 minutos. Recuperar el sobrenadante.
- x) Adicionar dos volúmenes de etanol absoluto ó uno de isopropanol. Refrigerar a -20°C durante al menos una hora.
- xi) Centrifugar a 12 000 g a 4°C por 20 minutos.
- xii) Lavar la pastilla con un ml de etanol frío al 70%. No romper la pastilla, si se desprende sólo moverla suavemente. Si se rompe la pastilla, centrifugar a 10 000 g a 4°C por 5 minutos.

- xiii) Retirar el etanol con la pipeta evitando arrastrar la pastilla. Dejar secar a temperatura ambiente.
- xiv) Resuspender en 40 μ l de agua desionizada estéril. Correr 2 μ l en un gel de agarosa para verificar el plásmido.

4.7. Análisis de candidatos por corte con enzimas

Se analizaron los plásmidos candidatos por corte con las enzimas de restricción siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La reacción de ligación se realizó bajo las siguientes condiciones:

- 16 μ l de agua destilada estéril
- 2 μ l de buffer 3 (10X)
- 1 μ l de plásmido
- 1 μ l de la enzima.

Se incubaron las reacciones a 37⁰C durante 4 horas y posteriormente se corrieron en un gel de agarosa al 1%. Se colocaron los geles en una cámara de luz ultravioleta y se fotografiaron utilizando una cámara digital SONY Cybershot DSC-S75 de 3.3 Mega pixeles. En las fotografías obtenidas se analizaron los fragmentos obtenidos con base a lo esperado para cada construcción.

4.8. Aislamiento de ADN plasmídico por la técnica de polietilenglicol, para secuenciar los plásmidos y utilizarlos en los bombardeos

De los candidatos positivos por restricción se aisló ADN plasmídico por el método de precipitación con polietilenglicol (Sambrook et al. 1989) para su posterior secuenciación.

La técnica se describe a continuación:

- i) Adicionar una colonia de bacteria con palillo a un matraz con 250 ml de medio LB, con el antibiótico correspondiente. Incubar de 18 a 20 horas a 37°C con agitación.
- ii) Centrifugar a 6 000 rpm por 10 minutos. Eliminar el sobrenadante. La pastilla puede ser almacenada a -20°C ó -70°C.
- iii) La pastilla se resuspende en 5 ml de solución Birboin I. Se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos.
- iv) Se adicionan 10 ml de solución Birboin 2 y se agita con la mano suavemente (no usar vortex) y se deja 10 minutos en hielo. La solución 2 se prepara al momento ya que se precipita (0.2N de NaOH, 1% de SDS).
- v) Se adicionan 7.5 ml de la solución Birboin 3 y se agita suavemente. No agitar con Vortex. Se deja 10 minutos en hielo.
- vi) Centrifugar a 10 000 rpm a 40C por 10 minutos. Se transfiere a tubos Corning limpios.
- vii) Se adiciona un volumen de isopropanol. Se deja 10 minutos a temperatura ambiente y luego al menos una hora a -20°C.
- viii) Centrifugar a 10 000 rpm por 15 minutos.
- ix) Se deja secar la pastilla para eliminar el máximo de isopropanol. La pastilla se puede almacenar a 4°C.
- x) Resuspender la pastilla en 3 a 6 ml de agua.
- xi) Adicionar un volumen de LiCl 5M frío, mezclar bien y después centrifugar a 10 000 rpm a 4°C durante 10 minutos. El LiCl precipita al ARN de alto peso molecular.
- xii) Transferir el sobrenadante a un tubo Corning limpio, adicionar un volumen de isopropanol y mezclar bien. Dejar 10 minutos a temperatura ambiente y una hora a -20°C.
- xiii) Centrifugar a 10 000 rpm por 10 minutos.
- xiv) Disolver la pastilla en 500µ l de TE (pH 8) ó en agua desionizada estéril. Se adiciona ARNasa con una concentración final de 20 µg/ml. La ARNsa debe estar libre de ADNsa.

- xv) Se adicionan 500 µl de una solución de NaCl 1.6 M y 15% de polietilenglicol. Se mezcla bien. Conviene adicionar suavemente para que se formen grumos de ADN. Se deja 15 minutos a temperatura ambiente.
- xvi) Centrifugar a 13 000 rpm a 4°C por 15 minutos. Remover el sobrenadante con una pipeta. Agregar 500µl de TE (pH 8) o agua y resuspender la pastilla.
- xvii) Adicionar un volumen de Fenol-Cloroformo y centrifugar por 2 minutos a 10 000 rpm para separar las fases. Nota: conviene resuspender y separar en dos tubos ya que la solución queda blanquecina al extraer con fenol.
- xviii) La solución acuosa se transfiere a un tubo Eppendorf. Se adiciona ½ volumen de acetato de amonio y dos volúmenes de etanol ó bien un volumen de isopropanol Se mezcla bien. Se refrigera a –20°C durante al menos una hora ó bien toda la noche.
- xix) Se centrifuga a 10 000 rpm a 40C por 15 minutos.
- xx) Se lava la pastilla con etanol frío al 70% y se deja secar.
- xxi) Se resuspende la pastilla en agua desionizada estéril. De preferencia en 200µl para obtener concentraciones mayores a 1 µg/µl de ADN Sólo si se observa que el ADN está muy concentrado se puede adicionar un volumen mayor.

4.9. Generación de callos embriogénicos

Se utilizaron semillas de arroz de la variedad Morelos-A92 (Salcedo-Aceves 1993) obsequiadas por personal del INIFAP del Campo Experimental Zacatepec del Estado de Morelos. Para la desinfección de semillas se hizo un lavado inicial con agua destilada, enseguida se lavaron con etanol al 70% por 3 minutos y cloro comercial Cloralex® (se utiliza sin diluir ya que en la presentación comercial viene al 6%) por 40 minutos y por último se lavaron 3 veces con agua destilada estéril para eliminar el cloro.

Para la generación de callos embriogénicos derivados de semillas se utilizó medio de inducción MS (Phytotechnology Laboratories M519), con sacarosa al 3%, Gelrite (Merck) al 0.2% y 2,4-D (2.5 mg/L). La incubación se llevó a cabo en la oscuridad a 28⁰C durante 7 días. Los callos embriogénicos de tamaño aproximado a 4 mm de diámetro se seleccionaron para ser bombardeados.

4.10. Bombardeo

Previamente al bombardeo, los callos embriogénicos se colocaron en medio de inducción. El protocolo que se utilizó para la preparación de la mezcla de ADN y los proyectiles fue el descrito por Cabrera-Ponce (2001), usando el equipo BioRad Helium PDS-1000/He, a una presión de 900 libras/ pulgada² (psi). El bombardeo se realizó en un primer ensayo con el vector pCAMBIA1301 y otro con dos vectores, uno con el gen SPS de la *Synechocystis* y el otro con el gen reportero GUS y resistencia a higromicina (pCAMBIA1301 y pUISPSsy). La cantidad total de ADN que se utilizó para 5 bombardeos fue de 20 µg.

4.11. Selección de callos embriogénicos y regeneración de plantas

La selección de los callos embriogénicos bombardeados se llevó a cabo utilizando el medio de inducción ya mencionado con diferentes concentraciones de higromicina, tomando como referencia 50 mg/L. La selección en ambos casos se llevó a cabo en la oscuridad a 28⁰C. Para la regeneración de los callos embriogénicos a brotes se probaron diferentes relaciones de ANA y BAP en medio con regeneración (MS, sacarosa 3%, gelrite (Merck) 0.2%, bencilaminopurina y ácido naftalenacético). Se cultivaron a 28⁰C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

4.12. Detección del gen SPS de *Synechocystis*

La extracción de ADN de plantas se realizó mediante el kit DNeasy Plant Maxi kit (6) de QIAGEN siguiendo las Indicaciones del fabricante. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos OP-36 y OP-37 (Martínez-Trujillo 2002) para la detección del gen *uidA* (GUS) mediante PCR. Los fragmentos obtenidos mediante PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1%, se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (0.5 mg/ml); se observó en un transiluminador de luz UV (UPV) y se fotografió con una cámara SONY DCS-730 de 7 Mega pixeles.

V. RESULTADOS

Capítulo I

Transformación de plantas de arroz (*Oryza sativa* L. subespecie *Indica*) de la Variedad Morelos A-92 con el gen de la SPS de *Synechocystis*

Gamaliel Valdivia Rojas,¹ José Luis Cabrera Ponce², Miguel Martínez Trujillo¹

¹ Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria. Morelia, Michoacán. México, 58066.

² Departamento de Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Km 9.6 carretera Irapuato-León, Irapuato, Guanajuato, México, 36500

RESUMEN

Plantas de arroz de la variedad Morelos A-92 fueron transformadas con el gen de la Sacarosa Fosfato Sintasa de *Synechocystis*. Para la transformación de plantas de arroz se utilizó el sistema de producción de callos embriogénicos, biobalística y regeneración a brotes y finalmente plantas, con el propósito de optimizar algunas de las condiciones del proceso. Semillas de arroz de la variedad Morelos A-92 previamente desinfectadas se colocaron en medio MS adicionado con 2,4-D y al término de 7 días se obtuvieron callos embriogénicos, los cuales fueron utilizados para ensayos de selección en diferentes concentraciones de higromicina y también para ensayos de regeneración utilizando diferentes relaciones de ANA y BAP. Los callos embriogénicos se transformaron mediante biobalística, utilizando el plásmido pCAMBIA 1301 el cual confiere resistencia a higromicina y el plásmido pUISPSSy el cual contiene el gen de la SPS de *Synechocystis* fusionado al promotor 35S. Se encontró que una concentración de 50 mg/L de higromicina es suficiente para seleccionar de manera eficiente a los callos embriogénicos. En el ensayo de regeneración sólo se obtuvieron brotes de buen tamaño a los 25 días en el medio adicionado con 2 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de ANA. El análisis molecular por PCR confirmó la integración de los transgénos del gen reportero *uidA* y del gen SPS de *Synechocystis*. En la transformación con el plásmido pCAMBIA1301 se obtuvo un porcentaje de transformación del 3.8, mientras que en la co-transformación con pCAMBIA1301 y pUISPSSy, se obtuvo el 3.1%.

Palabras clave: Arroz, callo embriogénico, regeneración, transformación.

ABSTRACT

Rice plants from the variety Morelos A-92 were transformed with the Sucrose Phosphate Synthase gen of *Synechocystis*. The system of production of calli, biolistic, shoot regeneration and generation of plants, was used to optimize some conditions of the process. Seeds of rice were disinfected and cultivated in MS media added with 2,4-D, for 7 days to obtain calli; these were used for selection assays in different concentrations of hygromycin and for regeneration using different ANA and BAP relations. The calli were transformed with biolistic, using the pCAMBIA1301 plasmid which confers hygromycin resistance and the pUISPSSy plasmid which contains the SPS *Synechocystis* gene fused to the CaMV 35S promoter. It was found that a concentration of hygromycin 50 mg/L is sufficient to select effectively the embryogenic calli. In the regeneration assay there were obtained shoots at 25 days only in the media added with BAP 2 mg/L and NAA 0.5 mg/L. The molecular analysis by PCR confirmed the integration of the transgenes *uidA* and the SPS of *Synechocystis*. The percentage of transformation with pCAMBIA1301 was 3.8, whereas in the co-transformation assay with pCAMBIA1301 and pUISPSSy it was 3.1%.

Key words: rice, embryogenic calli, regeneration, transformation.

INTRODUCCIÓN

El arroz es el cultivo de plantas comestibles más importante del mundo y crece bajo una amplia gama de condiciones ambientales. Para la transformación genética de cualquier especie de planta, es imprescindible contar con un protocolo optimizado para la regeneración de plantas a partir del tejido previamente transformado, por lo que es de suma importancia ajustar adecuadamente las condiciones de manejo *in vitro* de acuerdo a cada especie y variedad. Contar con un sistema eficiente de cultivo de tejidos vegetales es importante antes de transformar cualquier especie vegetal. La regeneración eficiente de la planta depende de varios factores incluyendo la composición de los medios de cultivo y especialmente del genotipo de la planta. En el arroz, otros factores que afectan la regeneración de la planta a partir de callos embriogénicos son: concentración de gelificantes y la combinación específica de reguladores del crecimiento vegetal (Tsukahara y Hirose 1992).

En México las variedades cultivadas son en su mayoría del tipo *Indica* y son más recalcitrantes a la transformación genética con respecto a las variedades de la subespecie *Japonica*. A principios de la década de los 80's se iniciaron los intentos para transformar protoplastos de arroz por el método de polietilenglicol (Toriyama et al. 1988, Zhang et al. 1988, Zhang y Wu 1988, Shimamoto et al. 1989). La transformación del arroz por biobalística utilizando embriones maduros o callos

embriogénicos se ha realizado con éxito tanto para *Japonica* como para *Indica* (Christou et al. 1991, Li et al. 1993, Valdez et al. 1998). Recientemente, la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* ha sido utilizada con éxito (Hiei et al. 1994, Toki 1997), sin embargo, no se ha superado la limitante de la baja eficiencia de transformación en la subespecie *Indica* mediante este sistema (Kumar et al. 2005).

La mayor parte de los genotipos transformados han sido de la subespecie *Japonica* y la fertilidad de las plantas transgénicas ha sido siempre un problema. El éxito temprano en la producción de plantas de arroz transgénicas fue divulgado en 1988 para las variedades de *Japonica* (Zhang y Wu 1988) y en 1990 para una variedad *Indica* (Peng et al. 1990). Se ha utilizado callo embriogénico y la transformación por biobalística en variedades *Indicas* que son difíciles de regenerar obteniendo un porcentaje de entre 1 hasta el 5% (Fauquet et al. 1995). Sivamani et al. (1996) reportan la transformación de callos embriogénicos utilizando medios líquidos, de una variedad *Indica*, TN1, mediante bombardeo con partículas obteniendo el 3% de eficiencia de transformación. Chen et al. (2004), probaron los medios anteriormente utilizados y un medio básico MS buscando encontrar un medio menos elaborado que los ya reportados. El medio básico MS para la inducción de callos embriogénicos fue suplementado con 2 mg/L de 2,4-D y 1.0 a 2.0 mg/L de ABA. El medio básico de regeneración fue adicionado con 2 mg/L de 6-benciladenina (6-BA), 0.5 mg/L de cinetina y 0.5 mg/L de ANA y reportaron que aunque no hubo diferencias significativas entre los medios, recomiendan el medio MS suplementado por ser el más sencillo y barato. Sin embargo, el utilizar medios líquidos aumenta la probabilidad de contaminación. Con el propósito de minimizar el peligro de contaminación en el Laboratorio de Transformación Genética de Plantas del CINVESTAV Unidad Irapuato, se utilizaron callos embriogénicos derivados de semillas pero sin pasar por un cultivo en medio líquido previo al bombardeo con el ADN, para reducir tiempos y posibilidades de contaminación. Valdez et al. (1998) transformaron 8 variedades de importancia agronómica de arroz de Centroamérica, Asia y África con los siguientes resultados: a) Obtención de callos embriogénicos en 5 días. b) Altas frecuencias de transformación (entre 1.7 y 14.0%, dependiendo de la variedad). c) Capacidad de recuperar el material transgénico y se detectó expresión estable de los genes introducidos en los transformantes primarios y en la progenie en todos los cultivares. Este procedimiento fue utilizado en la variedad Morelos A-92 por Martínez-Trujillo et al. (2003) para el estudio de la expresión de un promotor fusionado al gen reportero *uidA*. En los últimos años la transformación de arroz se ha enfocado a la creación de cultivares resistentes a enfermedades, sequía y a aumentar la producción, por ejemplo, se sobre expresó un gen de la proteína de Shock térmico (sHSP17.7) en plantas de arroz y se sugiere que podría aumentar la tolerancia a la sequía (Sato y Yokoya 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron semillas de arroz *Indica*, de la variedad Morelos A-92 (Salcedo-Aceves 1993) obsequiadas por el INIFAP Campo Experimental Zacatepec Morelos.

Plásmidos

Se utilizaron los siguientes vectores: a) pUISPSSy, que contiene el gen de la Sacarosa Fosfato Sintasa (SPS) de *Synechocystis* fusionado al promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor. b) pCAMBIA 1301, vector con expresión del gen reportero *uidA* (GUS), para dar seguimiento a la expresión transitoria en callos embriogénicos y que también confiere resistencia a higromicina para la selección de callos embriogénicos transformados.

Inducción de callos embriogénicos

Para la desinfección de semillas, se hizo un lavado inicial con agua destilada, en seguida se trató con etanol al 70% por 5 minutos, después con hipoclorito de Sodio al 6% (Cloralex®) por 40 minutos y por último se lavó 3 veces con agua destilada estéril para eliminar el cloro. Para la generación de callos embriogénicos derivados de semillas se utilizó el medio MS (Phytotechnology Laboratories M519)(Murashige y Skoog 1962) suplementado con sacarosa al 3%, gelrite (Merck) y 2,4-D (2.5 mg/L); este medio se conoce como de inducción. La incubación se llevó a cabo en la oscuridad a 28⁰C durante 7 días. Los callos embriogénicos de tamaño aproximado a 5 mm de diámetro se seleccionaron para los diferentes tratamientos.

Optimización de la selección de callos embriogénicos en higromicina

Los callos embriogénicos se colocaron en el medio de inducción descrito en el párrafo anterior y fue adicionado con diferentes concentraciones de higromicina, tomando como referencia 30, 40, 50, 60 70 y 80 mg/L. La selección en ambos casos se llevó a cabo en la oscuridad a 28⁰C durante 1.5 meses.

Optimización de la regeneración de callos embriogénicos

Para la regeneración de los callos embriogénicos a brotes se probaron diferentes relaciones de ANA y BAP en medio con regeneración (MS, sacarosa 3%, gelrite 0.25%, (Merck), bencilaminopurina y ácido naftalenacético). Se cultivaron a 28⁰C con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Condiciones de bombardeo

Los callos embriogénicos de aproximadamente 5 milímetros se colocaron en medio MS adicionado con 2.5 mg/L de 2,4-D, 24 horas antes del bombardeo. Se bombardearon los callos embriogénicos siguiendo las condiciones reportadas por Valdez et al. (1998), usando el equipo BioRad Helium PDS-1000/He a 900 psi. Después del bombardeo los callos embriogénicos se mantuvieron durante 3 días en el mismo medio. Posteriormente se les realizó la prueba histoquímica de GUS para verificar la expresión transitoria de acuerdo a Stomp (1992). Los callos se transfirieron a medio de selección (MS suplementado con higromicina) y en éste se mantuvieron durante 1.5 meses; después se realizó la detección estable del gen *uidA/GUS*. Los callos resistentes a higromicina se sometieron a medio de inducción de callos embriogénicos, durante 5 días, y al término de este periodo se colocaron en medio de regeneración (MS adicionado con 0.5 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP). Los brotes de alrededor de 3 cm se pasaron a medio de enraizamiento (MS, 1% de sacarosa), y una vez que tuvieron raíces se pasaron a macetas con tierra.

Detección de transgénés

La extracción de ADN de plantas se realizó mediante el kit DNeasy Plant Maxi kit (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizaran los oligonucleótidos específicos OP-36 y OP-37 (Martínez-Trujillo et al. 2003) para la detección del gen *uidA* (GUS) mediante PCR en un termociclador Mastercycler personal Eppendorf. La reacción consistió en lo siguiente: 25 µL de agua desionizada estéril, 5 µL de Buffer 10X (NH₄)SO₄, 7 µL de MgCl₂ (25 mM), 4 µL de dNTPs (2.5 mM), oligos OP-36 y OP-37 3 µL (10 mM), 2 µL de ADN genómico de planta de arroz transformadas (100 ng). Para la amplificación del gen *SPS* de *Synechocystis* se diseñaron oligonucleótidos específicos hacia ambos extremos del gen. Se utilizaron las siguientes condiciones: 95°C durante 4 minutos, 95°C durante 1 minuto, 60°C durante 45 segundos, 72°C durante 90 segundos, con una extensión de final de 7 minutos a 72°C, con un total de 30 ciclos.

RESULTADOS

Ensayo de regeneración

Las semillas de arroz previamente desinfectadas fueron puestas en medio MS adicionado con 2.5 mg/l de 2,4-D, se mantuvieron en este medio hasta que los callos embriogénicos alcanzaron 5 milímetros (aproximadamente a los 6 días) después fueron transferidos a medio MS adicionado con 0.5 mg/L de ANA y diferentes

concentraciones de BAP. Al final de los 25 días se encontró que los callos embriogénicos que fueron sometidos a la concentración de 2 mg/L de BAP desarrollaron la mayor cantidad de brotes y lo suficientemente grandes para poderlos enraizar; el 12.5% de los callos embriogénicos generaron brotes (figura 3) (cuadro 8).

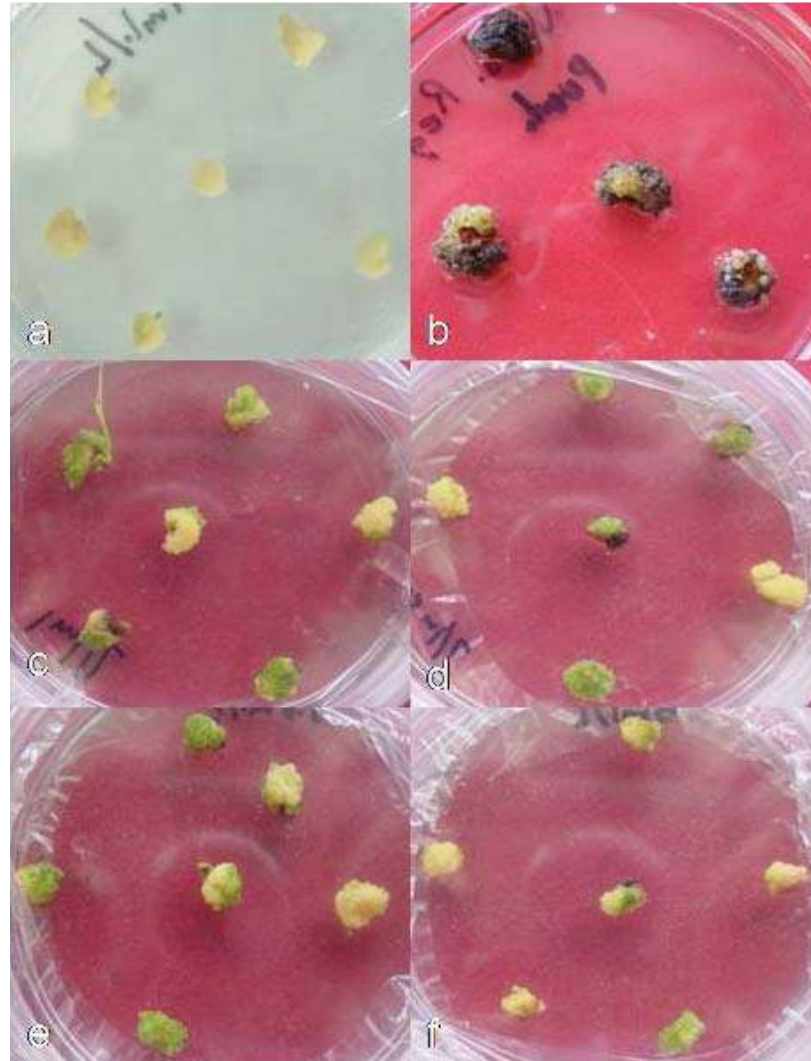


Figura 3. Callos embriogénicos de arroz en diferentes concentraciones de BAP.
a) Callos embriogénicos. **b)** 0 mg/L. **c)** 2 mg/L. **d)** 5 mg/L. **e)** 7.5 mg/L. **f)** 10 mg/L. Sólo se obtuvieron brotes en la concentración de 2 mg/L.

Cuadro 8. Efecto de la combinación de hormonas sobre la producción de brotes a partir de callos embriogénicos de arroz

Combinación de hormonas	No. de callos	% Diferenciación	No. brotes saludables	% Regeneración
ANA 0.5 mg/L + 0 mg/L BAP	40	0	0	0
ANA 0.5 mg/L + 2.0 mg/L BAP	40	60	5	12.5
ANA 0.5 mg/L + 5.0 mg/L BAP	40	40	2	5
ANA 0.5 mg/L + 7.5 mg/L BAP	40	70	1	2.5
ANA 0.5 mg/L + 10 mg/L BAP	40	20	1	2.5

Ensayos de resistencia a higromicina en callos embriogénicos de arroz

Se obtuvieron callos embriogénicos de arroz de 8 días y se sometieron a diferentes concentraciones de higromicina (0, 25, 50, 75 y 100 mg/L) y fueron subcultivados cada dos semanas durante dos meses. En este ensayo se encontró que a una concentración de 50 mg/L de higromicina los callos embriogénicos se morían de una manera eficiente y uniforme; en concentraciones menores, los callos embriogénicos todavía presentaban crecimiento y a concentraciones mayores los callos embriogénicos presentaban una muerte rápida y presentaban un aspecto mucilaginoso (figura 4).

Obtención de callos embriogénicos con expresión transitoria del gen GUS y resistencia a higromicina

Se bombardearon 208 callos embriogénicos derivados de semillas de arroz con el vector pCAMBIA1301, el cual contiene el gen de resistencia a higromicina y el gen reportero *uidA* (GUS). Los lotes bombardeados fueron sometidos a selección con higromicina 50 mg/L en medio MS co-cultivándolos cada 15 días durante mes y medio (figura 5). En este ensayo se observó que a las 36 horas del bombardeo los callos embriogénicos presentaron buena expresión transitoria y que en un tiempo de

1.5 meses en medio de selección con higromicina es suficiente para poder obtener callos embriogénicos resistentes al antibiótico.

Detección de la expresión estable del gen *uidA* (*GUS*), regeneración y obtención de plantas

De los callos embriogénicos resistentes a higromicina se seleccionaron algunos para la tinción con X-Gluc para verificar la expresión estable. Como se observa en la figura 6, el color azul intenso de los callos embriogénicos muestra la expresión estable. Los callos embriogénicos resistentes se transfirieron a medio de regeneración por 25 días y se obtuvieron brotes de 3 cm, los cuales se pasaron a medio de enraizamiento y una vez enraizados fueron pasados a vasos con tierra dentro del laboratorio para su aclimatación; después de este paso se trasladaron a macetas las cuales estaban sumergidas 5 cm en recipientes con agua en un invernadero (figura 6).

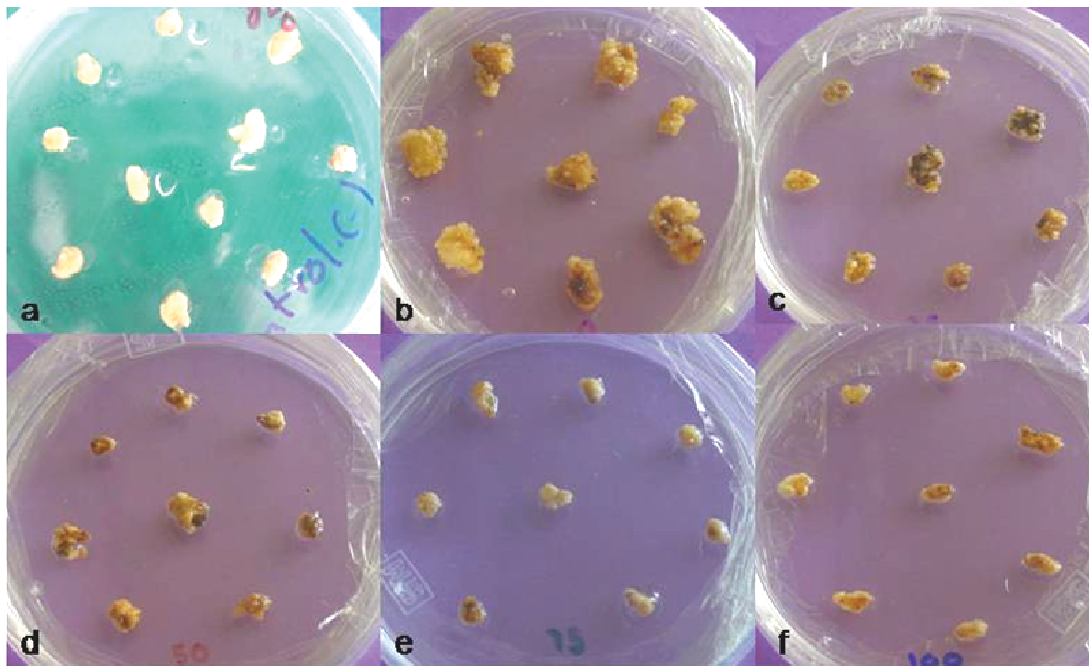


Figura 4. Callos embriogénicos sometidos a diferentes concentraciones de higromicina (mg/L). a) Callos embriogénicos antes de ser pasados a higromicina, b) 0, c) 25, d) 50, e) 75 y f) 100 mg/L. Los callos embriogénicos fueron cultivados durante dos meses y transferidos a medios nuevos cada 3 semanas.

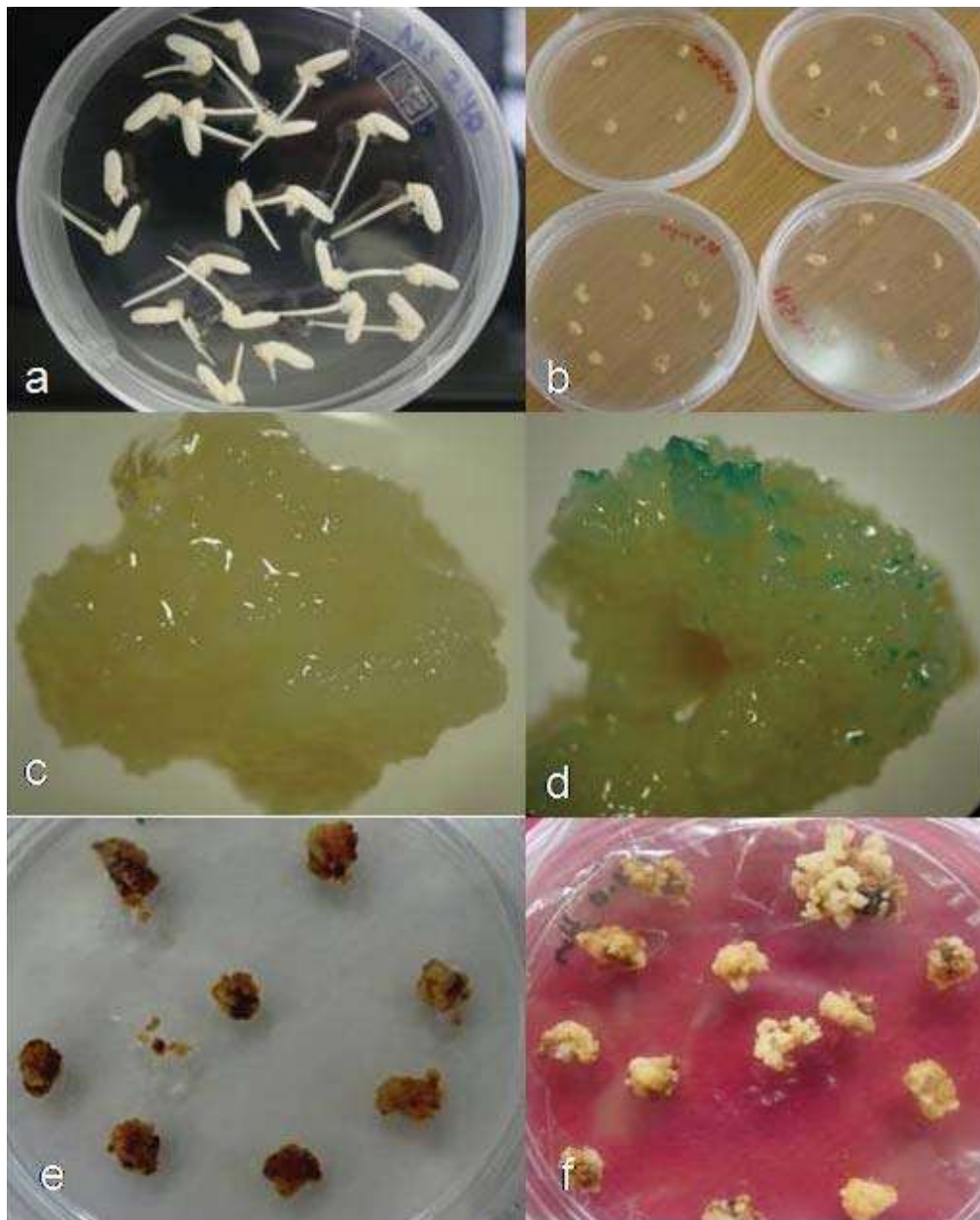


Figura 5. Callos embriogénicos en medio MS con higromicina. A) Semillas de arroz en MS con 2,4-D. **b)** Callos embriogénicos bombardeados en MS con 2,4-D, 7 días. **c)** Callo embriogénico no bombardeado sometido a la tinción con X-Gluc **d)** Callo embriogénico bombardeado sometido a la tinción con X-Gluc **e)** Control de callos embriogénicos sin bombardear sometidos a 1.5 meses en higromicina. **f)** Callos embriogénicos transformados en medio MS con higromicina durante 1.5 meses.



Figura 6. Detección estable de la expresión del gen *uidA* (*GUS*), regeneración y enraizamiento. **A) Callo no transformado teñido con x-gluc. **b)** Callo transformado teñido con x-gluc. **c)** y **d)** Callos embriogénicos resistentes a higromicina en medio de regeneración. **e)** Brote en medio de enraizamiento. **f)** Plantas transformadas en aclimatación. **g)** Plantas en invernadero.**

Obtención de callos embriogénicos con expresión transitoria del gen GUS y resistencia a higromicina, co-bombardeados con pCAMBIA1301 y pUISPSSy

Se bombardearon 50 callos embriogénicos derivados de semillas de arroz con el vector pCAMBIA1301 y pUISPSSy, el primero tiene el gen de resistencia a higromicina y el gen reportero *uidA* (GUS) y el segundo tiene el gen de Sacarosa Fosfato Sintasa de *Synechocystis* hacia abajo del promotor 35S. Los lotes bombardeados fueron sometidos a selección con higromicina 50 mg/L en medio MS subcultivándolos cada 15 días durante mes y medio (figura 7). Los callos embriogénicos resistentes a higromicina se transfirieron a medio de regeneración en el cual permanecieron por 25 días y se obtuvieron brotes de 3 cm, los cuales se pasaron a medio de enraizamiento y una vez enraizados fueron pasados a vasos con tierra dentro del laboratorio para su aclimatación (figura 8).

Análisis de la presencia del gen *uidA* en plantas regeneradas

Se detectó la presencia del transgén *uidA* en plantas de arroz, para lo cual se extrajo ADN de plantas de arroz previamente bombardeadas con pCAMBIA1301, seleccionadas en higromicina y con expresión estable de GUS y regeneradas hasta plantas. Se demuestra por ensayos de PCR que ocho de las nueve plantas amplifican un fragmento de 1100 pb lo que presume con alta probabilidad la presencia del gen *uidA* (Figura 9) (cuadro 9).

Análisis de la presencia de gen *uidA* y SPS de *Synechocystis* (*spssy*) en plantas co-transformadas con los plásmidos pCAMBIA1301 y pUISPSSy

Se extrajo el ADN de plantas de las plantas transformadas, y se analizó la presencia del gen *uidA* y *spssy* en las dos plantas, mediante PCR, amplificando los fragmentos esperados de 1100 pb y 2200 pb, respectivamente (figura 10) (cuadro 9).

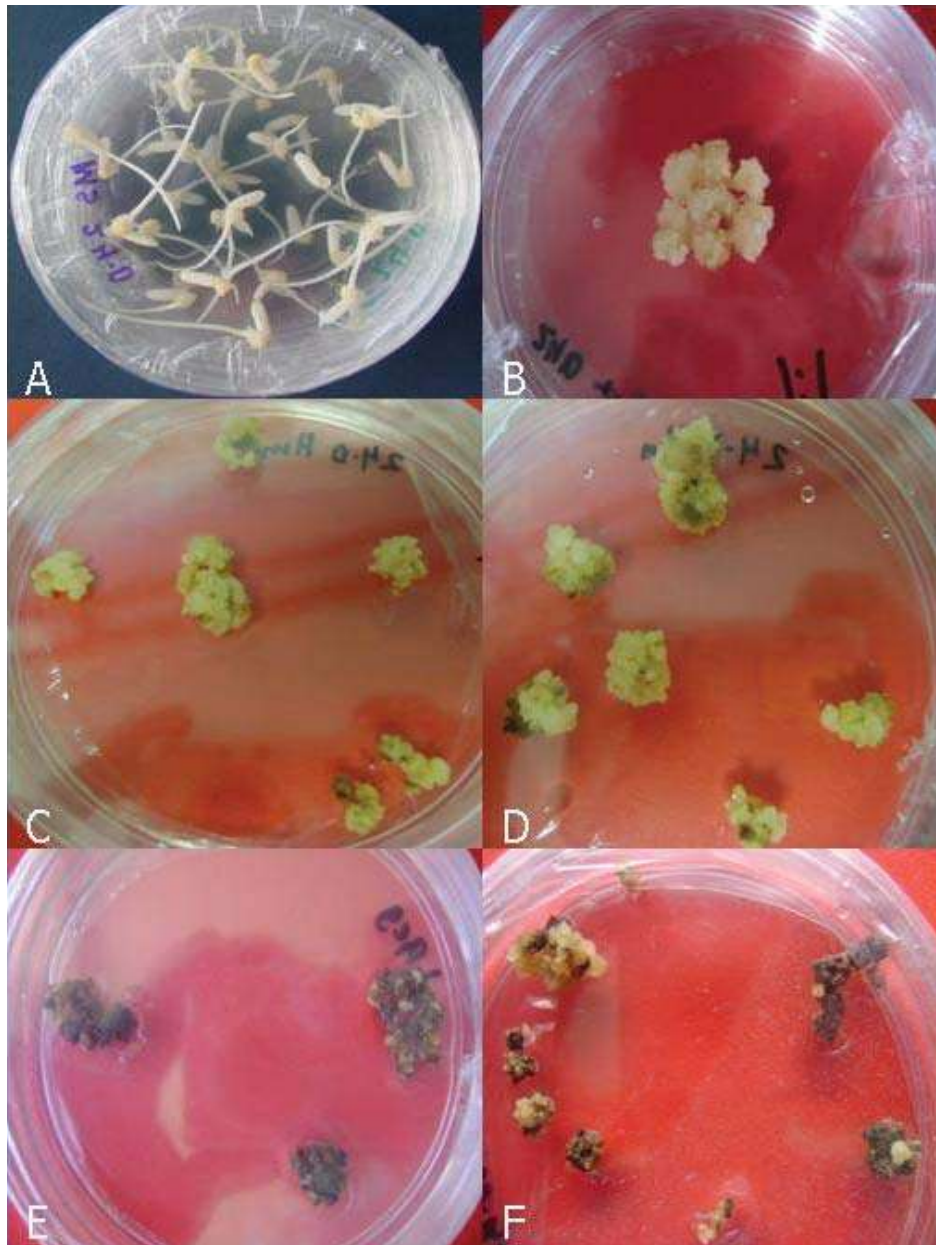


Figura 7. Regeneración de callos embriogénicos co-transformados con pCAMBIA1301 y pUISPSSy. a) Semillas de arroz con callos embriogénicos en MS con 2,4-D (2.5 mg/L). **b)** Callos embriogénicos bombardeados en MS con 2,4-D a los 5 días. **c)** Control en higromicina, 15 días. **d)** Callos embriogénicos en MS con higromicina 50 mg/L a los 15 días. **e)** Callos embriogénicos control sin bombardear por 2 meses en medio MS con higromicina 50 mg/L. **f)** Callos embriogénicos transformados, con 2 meses en medio MS con higromicina 50 mg/L..

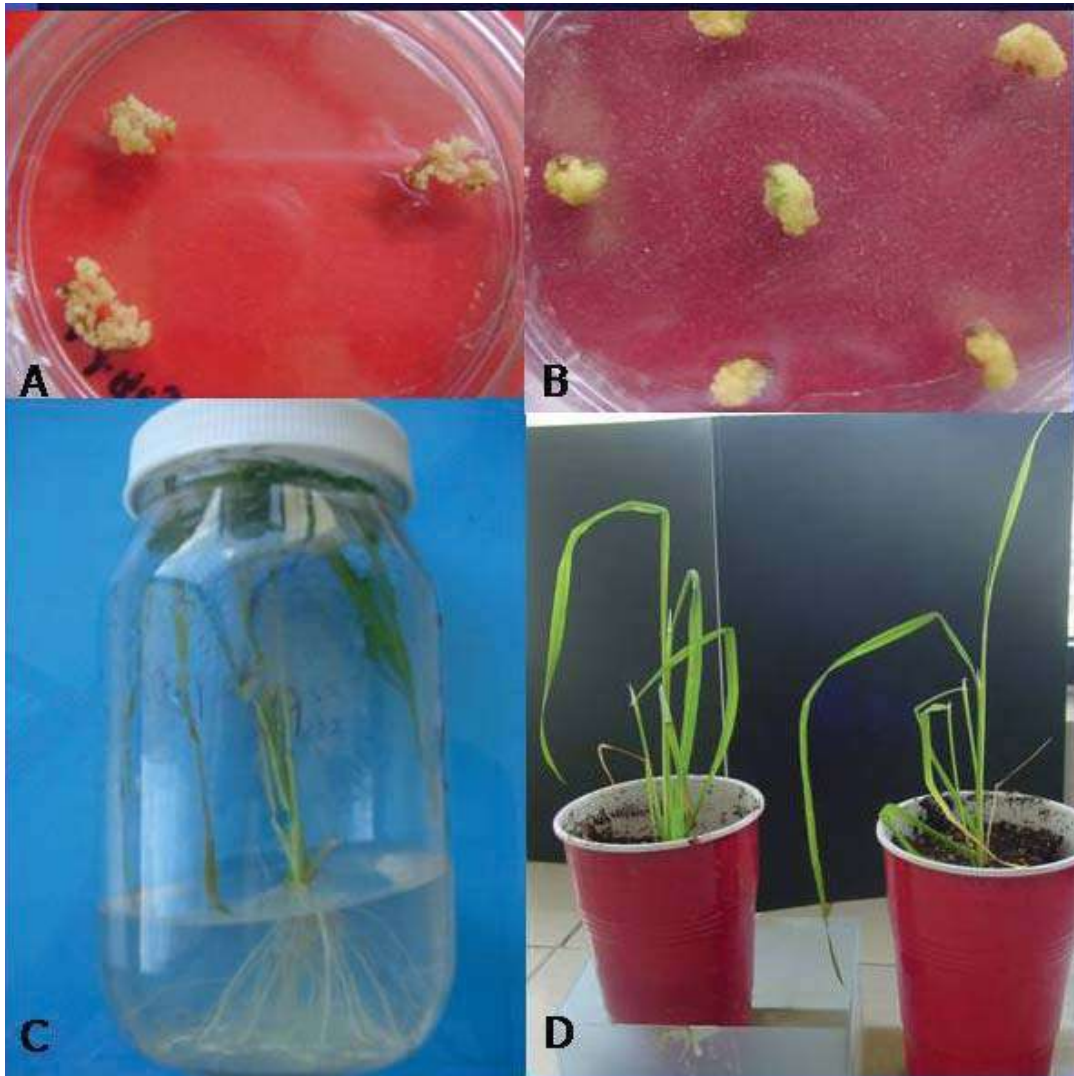


Figura 8. Regeneración de callos embriogénicos con resistencia a higromicina. a) Callo resistente a higromicina en medio de regeneración. **b)** Callo embriogénico regenerando brotes. **c)** Plantas enraizadas. **d)** plantas transformadas en aclimatación.

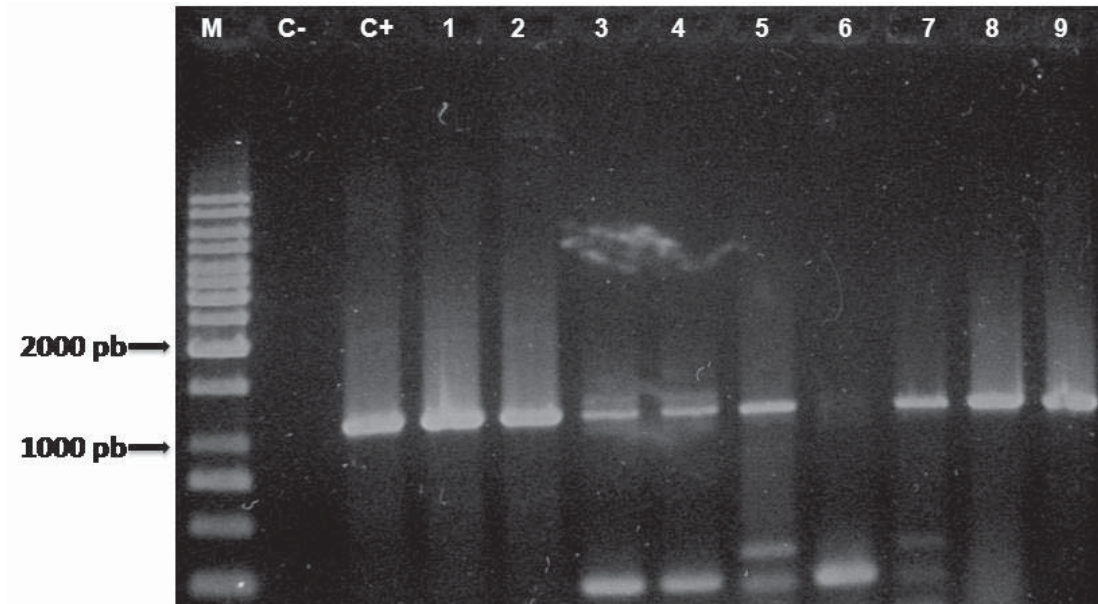


Figura 9. Análisis de la presencia del gen *uidA* en plantas de arroz transformadas con pCAMBIA1301. Se aisló el ADN de plantas de arroz y se realizó una amplificación por PCR para obtener un fragmento específico del gen *uidA* (1100 pb). Los carriles muestran de izquierda a derecha los marcadores (1KB, Fermentas), amplificación a partir de un control negativo (arroz no transformado), amplificación a partir de un control positivo (pCAMBIA1301) y amplificación a partir de ADN de 9 plantas de arroz provenientes de regeneración, de las cuales sólo la número 6 no amplificó el fragmento esperado.

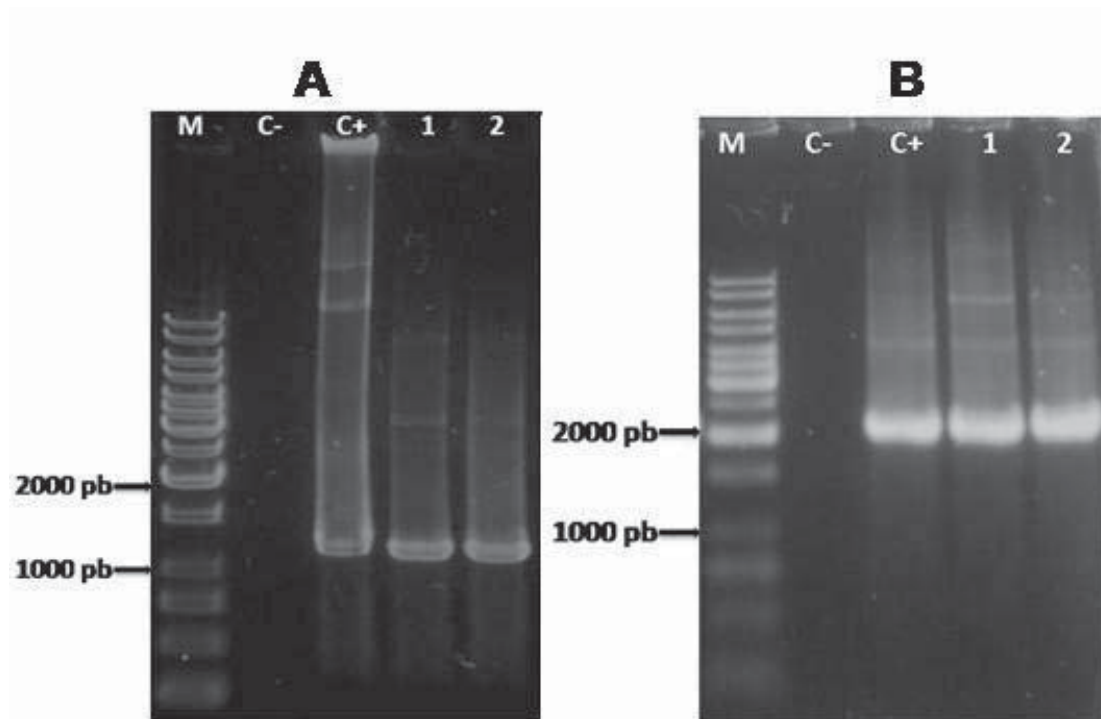


Figura 10. Análisis de la presencia de los genes *uidA* y *spssy* en plantas co-transformadas con pCAMBIA1301 y pUISPSSy. A) Amplificación por PCR del gen *uidA*. B) Amplificación por PCR del gen *spssy*. M, marcador de peso molecular 1 Kb. C- Control negativo (planta no transformada), C+ control positivo. 1 y 2, amplificación a partir de ADN de plantas transformadas.

Cuadro 9. Número y frecuencia de plantas transgénicas obtenidas en el presente trabajo

Cultivar	Plásmido	Callos bombardeados	Callos r-Higromicina	N. plantas obtenidas	Plantas GUS+	Plantas spssy+	Eficiencia de transformación (%)
Morelos A-92	pCAMBIA1301	208	20	9	8		3.8
Morelos A-92	pCAMBIA1301+ pUISPSSy,	64	8	2	2	2	3.1

DISCUSIÓN

La SPS de la *Synechocystis* sp. PCC 6803 no sólo difiere de la enzima de la planta en ser insensible a Glc-6-P y es inhibida débilmente por Pi, sino que además carece de todos los sitios conocidos de fosforilación encontrados en la SPS de plantas, lo que hace que no esté sujeta a la regulación o a la inactivación alostérica por la fosforilación de la proteína. Este gen ya ha sido utilizado para transformar plantas de tabaco, tomate y una variedad de la subespecie *Japonica*, sin un incremento significativo en la síntesis de sacarosa (Lunn et al. 2003). No obstante lo anterior, es conocido que la integración de los genes es al azar y es posible que la expresión obtenida no sea la adecuada, por lo que es conveniente realizar nuevas pruebas al respecto y utilizar incluso nuevas variedades.

El uso de variedades de arroz de la subespecie *Indica* para propósito de transformación con el gen de la SPS de *Synechocystis*, permitió establecer las condiciones del cultivo *in vitro* de la variedad Morelos A-92 adaptada a las condiciones de riego de la República Mexicana y obtener así plantas con la integración del gen. La selección de callos embriogénicos fue eficiente en obtener tejido transformado, ya que más del 90% de las plantas obtenidas tenían integrado ya sea el gen *uidA* o bien ambos. La eficiencia de transformación (3.1%) se encuentra dentro del rango reportado por Valdez et al. (1998), que mencionan eficiencias entre 1.7 al 14%. El principal problema que se tuvo en la producción de plantas co-transformadas, tanto con el gen *uidA* y el gen SPS de *Synechocystis* consistió en la generación de brotes a partir de callos embriogénicos, ya que sólo 2 de los 8 callos embriogénicos con resistencia a higromicina generaron brote (cuadro 7), por lo que se debe eficientizar aún más este paso o bien partir de un número mayor de callos embriogénicos. La integración del gen *spssy* en las plantas de arroz fue posible detectarla mediante la técnica de PCR, sin implicar técnicas de hibridación, lo que permite evaluar de manera más rápida las líneas obtenidas. La transformación de plantas de arroz Morelos A-92 con el gen SPS de *Synechocystis* permitió determinar que las condiciones utilizadas son adecuadas y que esto permitirá con la obtención de más líneas, iniciar una etapa de análisis de las plantas para evaluar sus características agronómicas

Tomados en conjunto, los datos obtenidos permitieron establecer lo siguiente:

- Se comprobó que la generación de callos embriogénicos en medio MS con 2,4-D es una forma rápida de generar tejido indiferenciado susceptible de ser transformado.
- La producción de brotes a partir de callos embriogénicos requiere ANA y BAP en concentraciones de 0.5 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP, respectivamente.
- La expresión estable del gen *uidA* es posible obtenerla en callos embriogénicos y,
- Fue posible obtener plantas con la integración de los genes *uidA* y *spssy*.

REFERENCIAS

- Chen E, Zhang P, Zuo S, Li A, Zhang Y, Chen Z, Pan X** (2004) Factors Affecting *Agrobacterium*-Mediated Transformation Efficiency in Rice. *Rice Science* 11(4): 181–185.
- Christou P, Ford TL, Kofron M** (1991) Production of transg enic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology* 9: 957-962.
- Fauquet CM, Zhang S, Chen L, Marmey P, de Kochko A, Beachy RN** (1995) Biolistic transformation of rice: now efficient and routine for Japonica and Indica rices. In: RICE GENETICS III. Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium, pp 153-165.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T** (1994) Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* 6 (2): 271-282.
- Kumar KK, Maruthasalam S, Loganathan M, Sudhakar D, Balasubramanian P** (2005) An Improved *Agrobacterium*-Mediated Transformation Protocol for Recalcitrant Elite Indica Rice Cultivars. *Plant Molecular Biology Reporter* 23: 67–73.
- Li LC, Rongda QU, de Kochko A, Fauquet CM, Beachy RN** (1993) An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Reports* 12: 250–255.
- Lunn JE, Gillespie VJ, Furbank RT** (2003) Expression of a cyanobacterial sucrose-phosphate synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in transg enic plants. *Journal of Experimental Botany* 54: 223-237.
- Martinez-Trujillo M, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L** (2003) Improvement of Rice Transformation Using Bombardment of Scutellum-Derived Calli. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 429-437.
- Murashige T, Skoog FA** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Portrykus I, Harms CT, Lorz H** (1979) Callus formation from cell culture protoplasts of corn. *Thero Appl Genet* 54: 209–214.
- Peng J, Lyznik L, Lee L, Hodges TK** (1990) Co-transformation of Indica rice protoplasts with *gusA* and *neo* genes. *Plant Cell Reports* 9: 168-172.
- Sato Y, Yokoya S** (2008) Enhanced tolerance to drought stress in transg enic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Reports* 27: 329–334.
- Salcedo-Aceves J** (1993) Morelos A-92 variedad de arroz para el Estado de Morelos. SARH-INIF, Folleto T ecnico No. 9. M xico.

- Shimamoto K, Terada R, Izawa T, Fujimoto H** (1989) Fertile transg enic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338: 274-276.
- Sivamani E, Shen P, Opalka N, Beachy RN, Fauquet CM** (1996) Selection of large quantities of embryogenic calli from Indica rice seeds for production of fertile transg enic plants using the biolistic method. *Plant Cell Reports* 15: 322-327.
- Stomp AM** (1992) Histochemical localization of β -glucuronidase. In: Gallagher SR (ed), *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*, pp 103-113, Academic Press, San Diego, CA.
- Toki S** (1997) Rapid and Efficient *Agrobacterium*-Mediated Transformation in Rice. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 16-21.
- Tsukahara M, Hirosawa T** (1992) Simple dehydration treatment promotes plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus. *Plant Cell Reports* 11: 550-553.
- Toriyama K, Arimoto Y, Uchimiya H, Hinata K** (1988) Transg enic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Bio/Tech* 6: 1072-1074.
- Valdez M, Cabrera-Pouce JL, Sudhakar D, Herrera-Estrella L, Christou P** (1998) Transg enic Central America, West African and Asian elite rice varieties resulting from particle bombardment of foreign DNA into mature seed-derived explants utilizing three different bombardment devices. *Annals of Botany* 82: 795-801.
- Zhang HM, Yang H, Rech T, Golds TJ, Davis AS, Mulligan BJ, Cocking EC, Davey MR** (1988a) Transg enic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. *Plant Cell Reports* 7: 379-384.
- Zhang W, Wu R** (1988b) Efficient regeneration of transg enic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. *Theor Appl Gen* 76: 835-840.

CAPITULO II

Diseño de un vector para expresar el gen de la SPS de *Synechocystis* mediante un promotor específico de tejido fotosintético

Gamaliel Valdivia Rojas¹, José Luis Cabrera Ponce², Miguel Martínez Trujillo¹

¹ Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria. Morelia, Michoacán. México, 58066.

² Departamento de Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Km 9.6 carretera Irapuato-León, Irapuato, Guanajuato, México, 36500

RESUMEN

En el presente trabajo se inicio la construcción de un vector utilizando el gen de la SPS de *Synechocystis*, el promotor de la subunidad pequeña de la ribulosa bifosfato carboxilasa de tabaco (*rbcS*) y el terminador de la nopalina sintasa (*Ter-nos*). Estas secuencias se extrajeron mediante PCR de los plásmidos utilizando oligonucleótidos específicos con sitios de restricción en los extremos y se clonaron cada uno en el vector pGEM®-T Easy. Se obtuvieron tres plásmidos con los fragmentos clonados (pGEM*rbcS*, pGEMSPSSy y pGEMnos). A partir de estos plásmidos se avanzó en la fusión del terminador *nos* al gen de la SPS y la clonación del promotor *rbcS* está en proceso.

Palabras clave: promotor *rbcS*, SPS, *Synechocystis*, vector

ABSTRACT

The construction of a vector was begun using the SPS gen of *Synechocystis*, the ribulose bi-phosphate carboxilase small subunit promoter (*rbcS*) and the terminator of nopaline synthase (*nos*). These sequences were extracted by PCR from the plasmids using specific oligonucleotides with restriction sites at the edges. These fragments were cloned separately in the pGEM®-T Easy vector, obtaining three plasmids (pGEM*rbcS*, pGEMSPSSy y pGEMnos). From these plasmids, the fusion of the *nos* terminator to the SPS gene was performed in the correct orientation. The insertion of the *rbcS* promoter is in process.

Key words: Promoter *rbcS*, SPS, *Synechocystis*, vector

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se ha utilizado un número importante de genes para transformar plantas, siendo los más usados los genes reporteros, de resistencia a antibióticos y por último los genes que confieren alguna característica agronómica importante como resistencia a patógenos. La regulación de la expresión del transgén es crítica pues del promotor depende en buena parte la fuerza y los sitios específicos donde se expresará el gen de interés. Un gen del interés se debe expresar en un tejido vegetal específico y en un nivel conveniente para su propósito previsto. (Kamo et al. 2000).

La regulación de la expresión del gen en plantas monocotiledóneas se ha estudiado en el maíz y en el arroz y los estudios de expresión transitoria de *uidA* (Jefferson et al. 1987) han demostrado que las monocotiledóneas que pertenecen a los cereales exhiben niveles perceptiblemente más altos de actividad de *GUS* con promotores derivados de monocotiledóneas; por ejemplo, el gen de la actina del arroz (*Act1*) o ubiquitina del maíz (*Ubi1*) con respecto al promotor de CaMV 35S (virus del mosaico de la coliflor). Lo anterior podría indicar que en los cereales los sistemas de regulación de la expresión están conservados (McElroy et al. 1991, Zhang et al. 1991, Christensen et al. 1992, Odell et al. 1985).

Se ha sobre expresado un gen de la SPS de *Arabidopsis* en tabaco y se reporta una altura mayor para las plantas transformadas respecto a las plantas no transformadas, debido a un aumento de la transcripción, un incremento de la actividad enzimática en hoja y en tejido fino del vástago; además hubo mayor altura y crecimiento del diámetro, acumulación de la biomasa y aumento en la longitud de la fibra (Park et al. 2007). El gen de la SPS de *Synechocystis* se ha introducido en tabaco y tomate bajo el control del promotor de CaMV 35S y en el arroz subespecie *Japonica* bajo el control del promotor del maíz *Ubi1*; en estos casos no hubo un incremento significativo en la síntesis de sacarosa por razones no conocidas (Lunn et al. 2003.). El promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) ha sido ampliamente utilizado en la transformación genética de plantas, sin embargo, debido a los efectos indeseables que pudiera causar en el fenotipo de la planta se ha optado por utilizar promotores que tengan un origen vegetal, de preferencia de la misma familia de plantas y que sea específico. En la actualidad se cuenta con varios promotores específicos para la utilización en la transformación de cereales (Kamo et al. 2000). En el presente trabajo se utilizó el gen de la SPS de *Synechocystis*, el promotor del gen *rbcS* de tabaco y el terminador *nos*, para construir un casete que podrá ser utilizado en la transformación de plantas, con la finalidad de aumentar significativamente la producción de sacarosa y elevar la productividad en el arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y plásmidos

En el presente trabajo se utilizó la cepa TOP-10 de *E. coli* (INVITROGEN). Se utilizaron los siguientes vectores: a) Vector que contienen el gen de la SPS de *Synechocystis* fusionado al promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (pUISPSSy), b) Vector que contiene el promotor del gen de la subunidad pequeña de ribulosa bifosfato carboxilasa de Tabaco (*rbcS*) controlando la expresión del gen *uidA* con el terminador *nos* (Argüello 1996).

Amplificación de los fragmentos de ADN por PCR

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para obtener el promotor *rbcS* de tabaco, el gen SPS de *Synechocystis* y el terminador *nos*. Mediante PCR se amplificaron los fragmentos utilizando el kit de Taq Polymerase High Fidelity (INVITROGEN). Los fragmentos amplificados fueron utilizados para su clonación en el vector pGEM-Teasy (PROMEGA).

Ligamiento de los fragmentos obtenidos por PCR en el vector pGEM-Teasy

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron clonados en el vector pGEM-T-easy (PROMEGA), en las siguientes condiciones de reacción: 3 µl de producto de PCR, 1 µl del vector pGEM-T-easy, 2 µl de buffer 5X, 3 µl de agua desionizada estéril y 1µl de la enzima T4 ADN ligasa. La reacción Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y después a 4°C durante 12 horas aproximadamente. Las mezclas de ligación se utilizaron para transformar células competentes.

Preparación de células competentes

El procedimiento se realizó de acuerdo a Sambrook et al. (1989). Se utilizó la cepa TOP-10 de *E. coli* (INVITROGEN), la cual es complementada con plásmidos que codifican para un fragmento proteico faltante para que se dé la actividad de la enzima β-galactosidasa.

Transformación de células competentes

Se transformaron células competentes de *E. coli* TOP10 con los plásmidos construidos, utilizando un electroporador Eppendorf 2510 a 1800 V y cubetas de 100 µl, dializando previamente las mezclas de ligación en membranas millipore de tamaño de poro 0.25 µm. Se plaquearon las células en medio selectivo LB con

carbenicilina (100 µg/ml), X-Gal (2 mg/ml) e IPTG (100 mM). Las cajas se incubaron por 21 h a 37°C.

Selección de candidatos con los insertos en pGEM-Teasy

Para la selección de candidatos se aisló ADN a partir de colonias blancas. Las colonias blancas son las que poseen el inserto debido a que no degradan el X-gal porque ha quedado interrumpido el gen de la β-galactosidasa. Se analizaron los plásmidos candidatos por corte con las enzimas de restricción con la técnica anteriormente descrita. De los candidatos positivos por restricción se aisló ADN plasmídico por el método de precipitación con polietilenglicol (Sambrook et al. 1989).

Construcciones en pGEM Teasy

Se obtuvieron tres construcciones, pGEMrbcS con extremos *HindIII*, pGEMSPSsy hacia el extremo 5' un sitio *HindIII* y hacia 3' un sitio *BglII* y pGEMnos con sus sitios *BglII*. Los plásmidos pGEMrbcS, y pGEMnos fueron digeridos utilizando las enzimas *HindIII* y *BglII*, respectivamente, las digestiones fueron corridas en un gel de agarosa y recuperadas mediante el Kit DNA Gel Extraction (MILLIPORE). El plásmido pGEMSPSsy fue linerizado con la enzima *BglII*, en seguida fue desfosforilado mediante el Kit Calf Intestinal Alkaline phosphatase (INVITROGEN) para evitar que el plásmido se religara. Para la ligación del vector pGEMSPSsy linerizado y el fragmento del terminador *nos* se siguieron las siguientes condiciones: 3 µl de producto de PCR, 1 µl del vector pGEM-T-easy, 2 µl de buffer 5X, 3 µl de agua desionizada estéril y 1µl de la enzima T4 ADN ligasa. La ligación fue dializada en membranas de 0.025 µm (MILLIPORE). Se transformaron células de *E. coli* TOP-10 de acuerdo a lo descrito anteriormente (INVITROGEN) y se sembraron las colonias en medio LB con carbenicilina, se incubaron durante 20 h a 37°C. De las colonias se realizó la extracción de DNA por la técnica de Miniprep (Sambrook et al. 1989). En seguida se hizo la digestión con *BglII* con las condiciones anteriormente descritas, y se corrió la digestión en un gel de agarosa al 1.5%; de los candidatos que presentaron el fragmento esperado se hizo la extracción de Maxiprep (Sambrook et al. 1989) y se mandó secuenciar para verificar la posición del inserto. El candidato que presentó el inserto en la posición correcta se digirió con la enzima *HindIII*, se desfosforiló y se ligó el fragmento del promotor *rbcS* de acuerdo a las condiciones antes descritas.

Condiciones de bombardeo

Los callos embriogénicos de arroz, hojas de arroz, raíces de arroz y hojas de tabaco se bombardearon usando el equipo BioRad Helium PDS-1000/He a 900 psi

siguiendo las Indicaciones de Cabrera-Ponce et al. (1995, 2001). Después del bombardeo los tejidos se mantuvieron durante 3 días en el mismo medio y después se les realizó la prueba histoquímica de GUS para verificar la expresión transitoria de acuerdo a Stomp (1992).

RESULTADOS

Caracterización de los vectores

Para la obtención del promotor de la sub-unidad pequeña de la RUBISCO (*rbcS*) se partió del plásmido pBSrbcS que contiene el promotor de la subunidad pequeña de la RUBISCO de tabaco (1kb) controlando la expresión el gen reportero *uidA* (GUS) (1.8 kb) y al terminador *nos* (0.270 Kb). Al digerir el plásmido se encontró que con *EcoRI* y *HindIII* se liberó un fragmento de aproximadamente 3.2 kb. Para corroborar la identidad del fragmento se mandó secuenciar con los oligos universal y reverso. Al alinear la secuencia en BLAST en la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI), se encontró que corresponde al promotor de la subunidad pequeña de la RUBISCO de tabaco (1 kb) controlando la expresión del gen *uidA* (GUS) (1.8 kb) y el terminador *nos* (0.265 kb). (Figura 11).

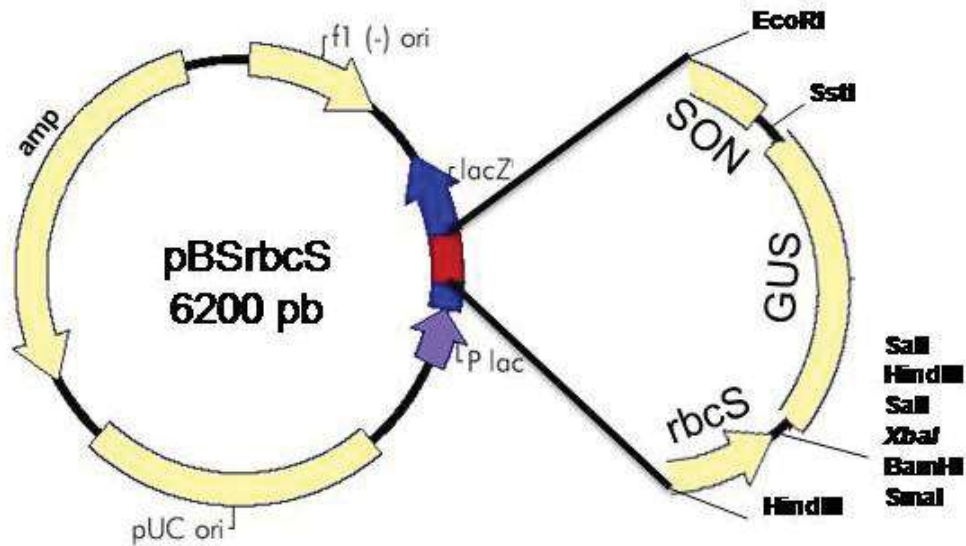


Figura 11. Vector pBSrbcS. Contiene el promotor de la ribulosa bifosfato carboxilasa de tabaco fusionado al gen reportero *uidA* y al terminador *nos*. Es un derivado del vector comercial pBSKS (STRATAGENE).

Para la obtención del gen de la sacarosa fosfato sintasa de *Synechocystis* (*spssy*) se partió del plásmido pUIPSSy, el cual tiene como base el vector de expresión pUI235-5.1 y tiene inserto al gen *sps* de *Synechocystis*. Este plásmido se digirió con diferentes enzimas de restricción y se encontró que al cortar con *EcoRI* y con *HindIII* así como *KpnI/SphI* se libera un fragmento de 2.6 kb (Figura 12). Al comparar el tamaño del fragmento liberado y el tamaño de la secuencia obtenida del genoma del gen *sps* de *Synechocystis* previamente reportada, no corresponden ya que la secuencia previamente reportada tiene un tamaño aproximado de 2.2 kb.

Para saber si el vector pUIPSSy contenía el gen *sps* de *Synechocystis* se diseñaron cuatro oligonucleótidos, dos a partir del sitio múltiple de clonación del vector pUIPSSy (cuadro 10) y dos a partir de la secuencia obtenida del genoma de *Synechocystis* de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=47118304&db=Nucleotide&from=3140713&to=3142875&view=gbwithparts&RID=VKBX49M8013>)

Se secuenció el vector pUIPSSy con estos oligos y se alinearon las secuencias en BLAST encontrando que la secuencia corresponde al gen de la sacarosa fosfato sintasa de *Synechocystis* pero además está flanqueado por regiones hacia el extremo 5' por 67 pb y hacia el extremo 3' por 409 pb.

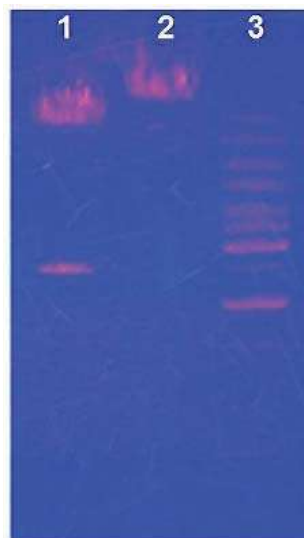


Figura 12. Digestión de pUIPSSy. Carril 1, digestión con *EcoRI/ HindIII*. Carril 2, digestión con *EcoRI*. En el carril 1 se muestra una banda de aproximadamente 2.6 kb que corresponde al gen de la SPS de *Synechocystis*.

Integración del promotor *rbcS*, al gen *sps* de *Synechocystis* y al terminador *nos*

A partir de las secuencias obtenidas del promotor *rbcS* se diseñaron oligonucleótidos para el promotor del gen *rbcS* con extremos *Hind*III (Cuadro 10), los cuales se utilizaron para amplificar la región de ADN por PCR y después clonarlo en el vector pGEM-T Easy (PROMEGA). Después se transformaron células de *Escherichia coli* TOP10 y se obtuvieron colonias blancas las cuales presentaron el inserto; de éstas se seleccionaron 5 y se extrajo ADN por Mini-Prep (figura 14). Se verificaron por corte con la enzima *Eco*RI y se observaron varios candidatos con las bandas esperadas (figura 15).

Cuadro 10. Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo y sus características

Nombre	Oligonucleótido	Tamaño o	Tm °C	% GC	Característica
Sy1	5'- ATG AGC TAT TCA TCA AAA TAC AT -3'	23	57.0	26.1	Diseñado a partir de la secuencia del gen <i>sps</i> de <i>Synechocystis</i>
Sy2	5'- TTA AAC GGG GTC TAA CAA C - 3'	19	57.2 °C	42.1	Diseñado a partir de la secuencia del gen <i>sps</i> de <i>Synechocystis</i> .
pUI1	- GAT CAC CCG GGA ATT C -3'	16	55.9	56.3	Diseñado a partir de la secuencia del sitio múltiple de clonación pUISPSy
pUI2	5'- GAC GGT ATC GAT AAG CTT -3'	18	56.0	44.4	Diseñado a partir de la secuencia del sitio múltiple de clonación pUISPSy
Sy3	5'- ATG AGC TAT TCA TCA AAA TAC AT -3'	23	57.0	26.1	Extremo <i>Hind</i> III
Sy4	5'- TTA AAC GGG GTC TAA CAA C - 3'	19	57.2	42.1	Extremo <i>Bgl</i> II
Rb1	5'- GTG GGA ACG AGA TAA GGG -3'	18	58.6	55.6	Extremo <i>Hind</i> III
Rb2	5'- GAC CTC GCT CTT TTC TCT -3'	18	58.3	50.0	Extremo <i>Hind</i> III
nos1	5'- GAA TTT CCC CGA TCG TTC A - 3'	19	59.8	47.4	Extremo <i>Bgl</i> II
nos2	5'- CCG ATC TAG TAA CAT AGA TGA CAC -3'	24	60.0	41.7	Extremo <i>Bgl</i> II

Para eliminar las regiones que flanquean al gen SPS de *Synechocystis*, se diseñaron dos oligos, uno con el extremo *Hind*III y otro con extremo *Bgl*II (cuadro 8). Se amplificó el gen mediante PCR (figura 13) y se clonó en el vector pGEM-T Easy (PROMEGA). Después se transformaron células de *Escherichia coli* TOP10 y se obtuvieron colonias blancas las cuales presentaban el inserto; de éstas se seleccionaron 5 y se extrajo el ADN por Mini-Prep (figura 14). Se verificaron las construcciones por corte con la enzima *Eco*RI y se observaron varios candidatos con las bandas esperadas (figura 15).

Para la obtención del terminador *nos*, se diseñaron oligonucleótidos específicos a partir de la secuencia obtenida del plásmido pBSrbcS. Se amplificó por medio de PCR (figura 13) y se clonó en el vector pGEM-T Easy (PROMEGA). Después se transformaron células de *Escherichia coli* TOP10 y se obtuvieron colonias blancas las cuales presentaban el inserto; de éstas se seccionaron 5 y se extrajo el ADN por Mini-Prep (figura 14). Se verificaron por corte con la enzima *Eco*RI y se observaron varios candidatos con la banda esperada (figura 15).

A partir de las diferentes versiones de los plásmidos pGEM-T Easy se inició la construcción del vector con el gen *sps* de *Synechocystis*. El plásmido pGEMSPSSy fue digerido con la enzima *Bgl*II para linearizarlo y en seguida fue sometido a la desfosforilación de extremos mediante la enzima fosfatasa (CIAP) de Invitrogen en las condiciones recomendadas por el fabricante. Una vez desfosforilado el plásmido se inactivó la fosfatasa con fenol-cloroformo. Este vector desfosforilado se utilizó para la reacción de ligación con el fragmento del terminador *nos* previamente extraído mediante digestión con la enzima *Bgl*II del plásmido pGEMNOS. Para la ligación se utilizó la enzima ligasa T4 de Promega.

La mezcla de ligación fue dializada en membranas de 0.025µm (MILIPORE) durante 40 minutos, después de la diálisis se transformaron células de *Escherichia coli* TOP10 y se obtuvieron colonias blancas de las cuales se extrajo ADN por Mini-Prep (figura 16a). Los plásmidos se verificaron por corte con la enzima *Bgl*II y se observó la banda de 360 pb en 4 candidatos (figura 16b). Los candidatos se mandaron secuenciar para verificar la posición del inserto con respecto al gen *sps*. Con esto se confirmó que el gen *sps* de *Synechocystis* quedó fusionado al terminador *nos* en la posición correcta en uno de los candidatos.

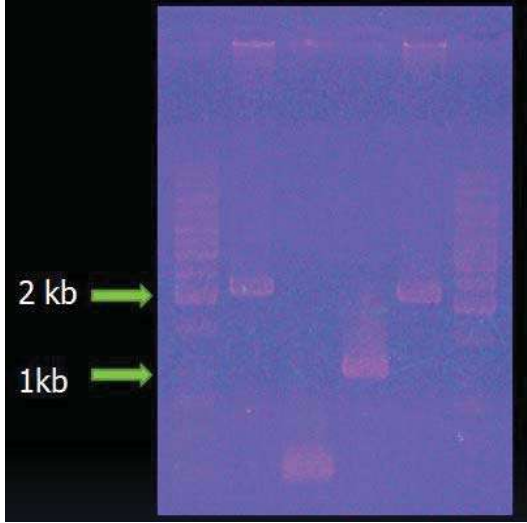


Figura 13. Productos de PCR. A partir de los plásmidos pUISPSSy y pBSrbcS utilizando los oligonucleótidos específicos, se amplificó el gen de la SPS de *Synechocystis* (2.1 kb) y el promotor de la *rbcS* de tabaco (1 kb) y el terminador *nos* (365 pb).

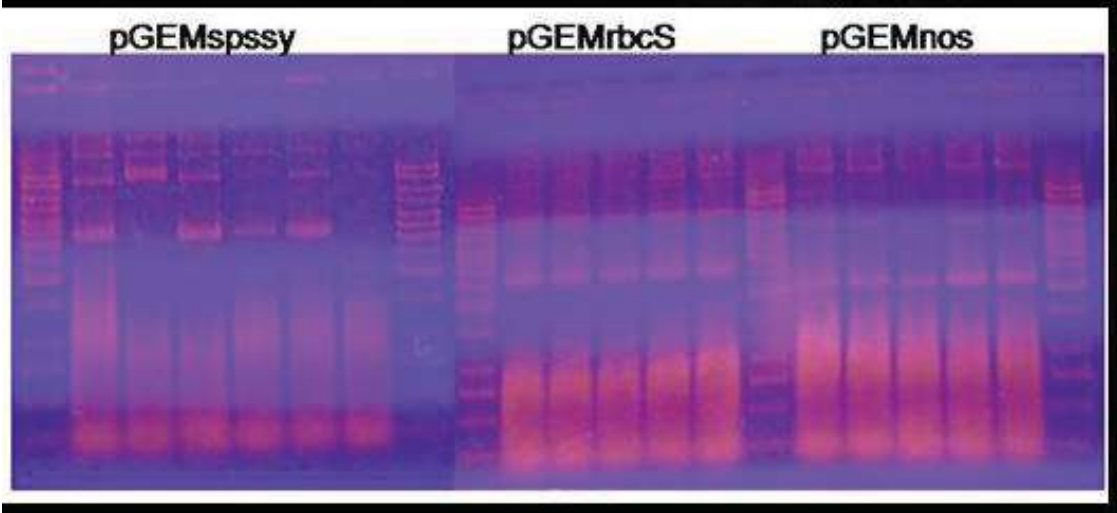


Figura 14. Plásmidos que contienen el inserto de los diferentes fragmentos (*spssy*, *rbcS* y *nos*). Los fragmentos fueron clonados en el vector pGEM-T Easy y posteriormente fueron transformadas células de *E. coli* TOP10. El ADN se extrajo de colonias blancas, las cuales tienen una alta posibilidad de portar el inserto.

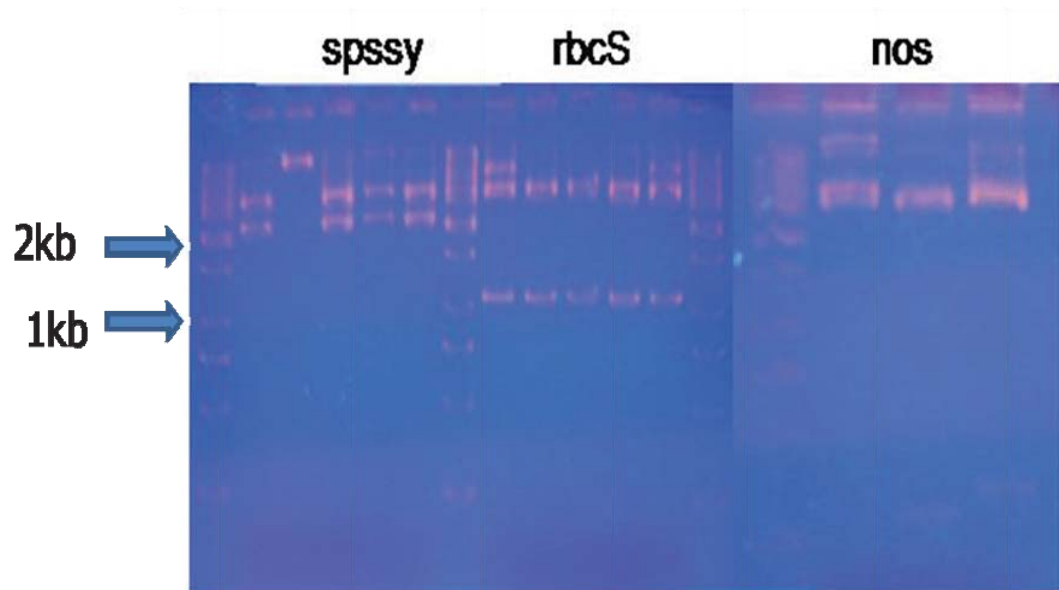


Figura 15. Selección de candidatos por corte con enzimas de restricción. El ADN fue digerido con la enzima *EcoRI* para liberar el fragmento. La digestión se corrió en un gel de agarosa al 2% y se observó en luz UV mostrando varios candidatos de cada construcción.

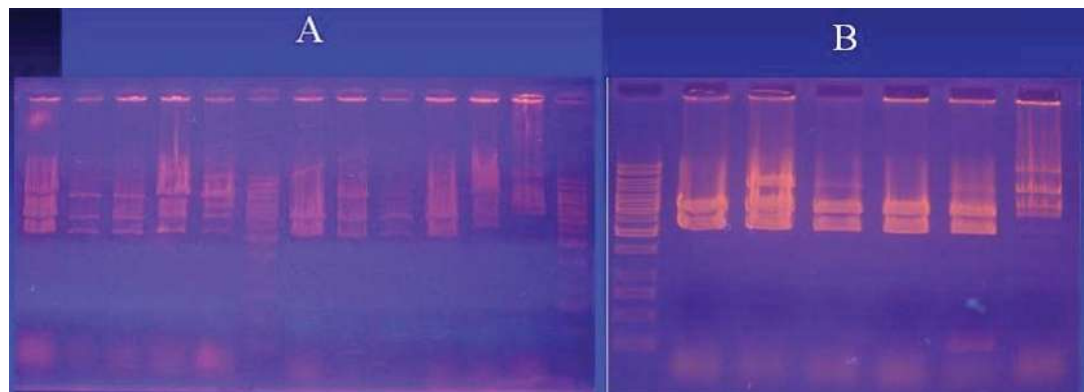


Figura 16. Selección de candidatos con el gen *sps* de *Synechocystis* fusionado al terminador *nos*. a. ADN plasmídico de colonias transformadas. b. búsqueda de candidatos por digestión de enzimas de restricción, los candidatos liberan un fragmento de 360 pb al digerir el ADN con la enzima *Bgl* II.

Expresión del gen *uidA* en tejidos de arroz

El vector pBSrbcS fue introducido por biobalística en diferentes tejidos de arroz y en hojas de tabaco; este vector contiene el promotor del gen *rbcS* de tabaco controlando la expresión del gen *uidA*. También se bombardearon los mismos tejidos con pCAMBIA1301; este vector contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor controlando la expresión del gen *uidA*. A las 36 horas después del bombardeo se tiñeron los diferentes tejidos con x-gluc y se incubaron a temperatura ambiente por 12 horas, se les retiró la solución de x-gluc y en seguida se decoloraron con metanol-acetona. Se colocaron en glicerol al 50% y se fotografiaron los tejidos con una cámara digital SONY Cybershot DSC-S75 de 3.3. Mega píxeles (figura 17). La expresión transitoria conferida por el promotor de la *rbcS* de tabaco, en tejidos de arroz, sólo se detectó en hoja y callos embriogénicos, aunque fue baja en comparación con la expresión del promotor 35S. En raíz, el promotor *rbcS* no generó expresión. En las hojas de tabaco la expresión conferida por *rbcS* fue del 5%, comparada con la conferida por el promotor 35S. Estos resultados confirman que *rbcS* es un promotor específico de tejido y la expresión en callos embriogénicos podría entenderse al considerar que contiene células totipotenciales. Estos resultados coinciden con los reportados por Jefferson en 1987, quien transformó plantas de tabaco con el promotor del gen *RbcS* y GUS y encontró expresión en los tricomas, la epidermis, las células vasculares, pero la mayor expresión se localizó en las células corticales del parénquima y cloroplastos y coloración débil y variable en la médula.

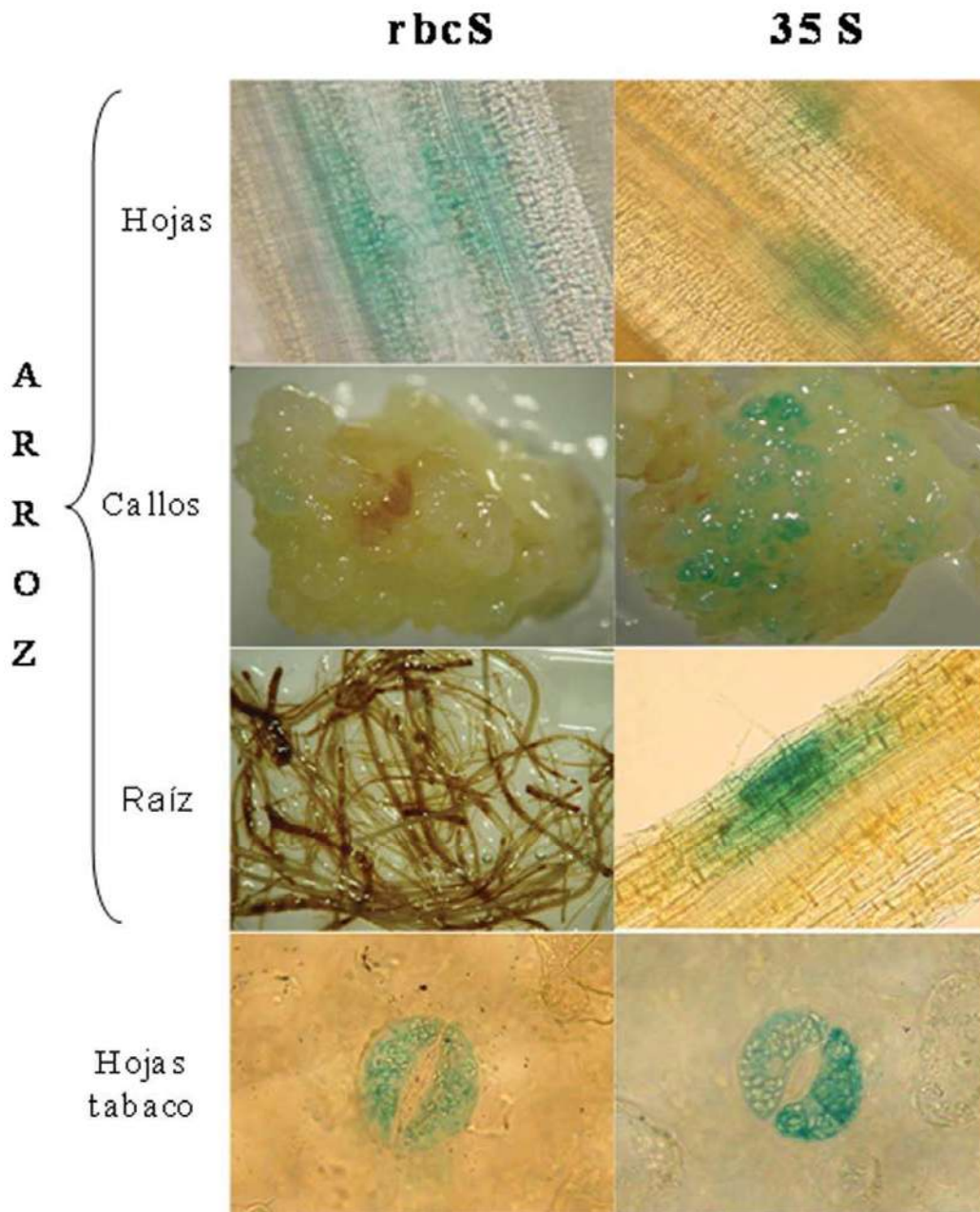


Figura 17. Expresión transitoria conferida por los promotores *rbcS* de tabaco y 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor. La expresión fue detectada mediante tinción con x-gluc como se describe en materiales y métodos.

DISCUSIÓN

El gene de la SPS de *Synechocystis* se ha introducido en tabaco y tomate bajo el control del promotor CaMV 35S y en el arroz subespecie *Japonica* bajo el control del promotor del maíz *Ubi1*; en estos casos no hubo un incremento significativo en la síntesis de sacarosa por razones no conocidas (Lunn et al. 2003), por lo que es conveniente utilizar promotores que expresen al gen en la manera en que ocurre naturalmente.

El diseño del vector planteado en este trabajo se orientó a expresar el gen SPS de *Synechocystis* en tejido fotosintético. La expresión conferida por el promotor *rbcS* fue primeramente confirmada mediante la expresión transitoria en diferentes tejidos, para asegurar que en las plantas transformadas la expresión fuera conducida a tejido fotosintético (figura 17).

La caracterización previa del gen SPS de *Synechocystis* a partir de un vector del que no se disponían datos muy precisos (pUISPSSy) hizo necesario partir de la secuencia genómica y eliminar una región que no era precisamente de este gen. La amplificación de los fragmentos del promotor *rbcS*, el terminador *nos* y el gen *spssy* y su clonación en el vector pGEM-Teasy se logró con éxito, lo que permitió avanzar en la fusión del terminador *nos* y el gen *spssy* en la orientación correcta. Este último plásmido se completará colocando el promotor *rbcS* arriba del gen *spssy*, lo que permitirá tener un casete que se podrá clonar como una unidad en otros vectores generales para incluir la resistencia a antibiótico. Una posibilidad es la de integrarlo a pCAMBIA1300, que ya tiene la resistencia a higromicina, que es el antibiótico que permite seleccionar los callos embriogénicos de arroz transformados.

Finalmente, se puede concluir que el avance en el diseño y construcción de un vector para expresar el gen *sps* de *Synechocystis* en tejido fotosintético se avanzó satisfactoriamente

REFERENCIAS

- Argüello Astorga GR** (1996) Delimitación teórica y experimental de módulos de control transcripcional y replicativo en plantas: Identificación de unidades mínimas de fotorespuesta. Tesis de doctorado. Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto politécnico nacional. Unidad Irapuato, Guanajuato, México.
- Cabrera-Ponce JL, Vegas-García A, Herrera-Estrella L** (1995) Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Reports* 15:1-7.

- Cabrera-Ponce JL** (2001) Desarrollo de un método para la transformación genética del maíz (*Zea mays* L.) de interés agronómico mediante la ingeniería genética. Tesis de doctorado. Universidad de Colima. Colima México. pp 142.
- Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH** (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript slicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol* 18: 675–689.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS-fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901–3907.
- Kamo K, Blowers A, McElroy D** (2000) Effect of the cauliflower mosaic virus 35s, actin, and ubiquitin promoters on *uida* expression from a *bar-uida* fusion gene in transgénic *gladiolus* plants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36:13–20.
- Lunn JE, Gillespie VJ, Furbank RT** (2003) Expression of a cyanobacterial sucrose-phosphate synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in transgénic plants. *Journal of Experimental Botany* 54: 223-237.
- McElroy D, Blowers AD, Jenés B, Wu R** (1991). Construction of expression vectors based on the rice actin (*Act1*) 50 region for use in monocot transformation. *Mol Gen Genet* 23:150–160.
- Odell JR, Nagy F, Chua N** (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 170–173.
- Park Ji-Young, Canam T, Kang Kyu-Young, Ellis D, Mansfield SD** (2007) Over-expression of an *Arabidopsis* family A sucrose phosphate synthase (SPS) gene alters plant growth and fibre development. *Transgénic Res* 17: (2)181-192.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Stomp AM** (1992) Histochemical localization of β -glucuronidase. In S.R. Gallagher (Ed), GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression. Academic Press, San Diego CA, pp 103-113.
- Zhang W, McElroy D, Wu R** (1991) Analysis of the rice Act1 50 region activity in transgénic rice plants. *Plant Cell* 3: 1155–1165.

VI. DISCUSIÓN GENERAL

La transformación genética de plantas es una alternativa con relación al mejoramiento genético tradicional y se justifica cuando las fuentes de variación genética dentro de la especie no son suficientes para generar los fenotipos deseables y con la consideración de que la población mundial se encuentra aumentando y los alimentos y otros productos derivados de las plantas pueden llegar a escasear (Herrera-Estrella et al. 2005). El arroz, como uno de las tres cereales principales que son utilizados en la alimentación en el mundo, es una de las plantas a las cuales se le ha dedicado atención, tanto en la secuenciación de su genoma en las dos subespecies conocidas (Goff et al. 2002, Yu et al. 2002), como en el desarrollo de técnicas de cultivo y de introducción de genes para su transformación (Valdez et al. 1998).

Siendo la sacarosa el principal azúcar de transporte en las plantas, se ha establecido como una estrategia interesante el incrementar la síntesis de esta molécula para aumentar variables de interés agronómicas, como son la producción de semillas y frutos. Una de las estrategias para modificar la síntesis de sacarosa ha sido la de sobre expresar genes que codifican para las enzimas sacarosa fosfato sintasas (SPS) de una especie en otra para evadir las respuestas de regulación, lo que fue realizado por Worrell et al. (1991) en tomate a partir de la SPS de maíz, sin embargo, los resultados no tuvieron una repercusión importante debido posiblemente a otros mecanismos de regulación post-transcripcionales. Resultados más alentadores son los reportados para el algodón, *Populus* y Tabaco en el incremento ya sea en la calidad de la fibra, mayor crecimiento o aumento del número de flores, respectivamente (Haigler et al. 2000, Mouillon y Hurry 2001, Baxter et al. 2003).

En el arroz fue reportado primeramente un gen de sacarosa fosfato sintasa por Valdez-Alarcón (1996), el cual fue denominado como *sps1*, y ha sido estudiada su región reguladora, determinando que hay expresión en el escutelo de semillas en germinación y en el parénquima fotosintético de las hojas; asimismo, hay una tasa baja de transcripción y existen mecanismos de regulación post-transcripcionales que potencian la traducción (Martínez-Trujillo et al. 2003, Martínez-Trujillo et al. 2004). Con la secuenciación del genoma del arroz, tanto en la subespecie *Japonica* como *Indica*, se encontró que existen 5 genes que codifican para SPS, entre ellos *sps1*, sin embargo, sólo se conoce información sobre su expresión para este último, por lo que pudiera haber diferentes actividades de SPS para diferentes propósitos específicos de tejido, del desarrollo o afectadas por diferentes condiciones ambientales.

Como una alternativa a la de sobre expresar genes de SPS de una planta en otra, ha llamado la atención las propiedades de la enzima SPS de *Synechocystis* sp. PCC 6803, ya que difiere de las enzimas de la planta en ser insensible a Glc-6-P y

en ser inhibida débilmente por Pi (Lunn et al. 1999), sino que además carece de todos los sitios conocidos de fosforilación encontrados en el SPS de plantas, lo que hace que no esté sujeta a la regulación o a la inactivación alostérica por la fosforilación de la proteína, lo que supuestamente permitiría incrementar la síntesis de sacarosa, que se canalizaría para la síntesis de otros carbohidratos complejos, entre ellos el almacenamiento de almidón en las semillas. Este gen ya ha sido utilizado para transformar plantas de tabaco, tomate y una variedad de la subespecie *Japonica*, sin un incremento significativo en la síntesis de sacarosa (Lunn et al. 2003). No obstante lo anterior, es conocido que la integración de los genes es al azar y es posible que la expresión obtenida no sea la adecuada, por lo que es conveniente realizar nuevas pruebas al respecto y utilizar incluso nuevas variedades.

En este trabajo, el uso de una variedad de arroz de la subespecie *Indica* para propósito de transformación con el gen de la SPS de *Synechocystis*, permitió establecer las condiciones del cultivo *in vitro* de la variedad Morelos A-92 adaptada a las condiciones de riego de la República Mexicana y obtener plantas con la integración del gen. La selección de callos embriogénicos fue eficiente en obtener tejido transformado, ya que más del 90% de las plantas obtenidas tenían integrado ya sea el gen *uidA* o bien ambos. La eficiencia de transformación (3.1%) se encuentra dentro del rango reportado por Valdez et al. (1998) que mencionan eficiencias entre 1.7 al 14%. El principal problema que se tuvo en la producción de plantas co-transformadas, tanto con el gen *uidA* y el gen SPS de *Synechocystis* consistió en la generación de brotes a partir de callos embriogénicos, ya que sólo 2 de los 8 callos embriogénicos con resistencia a higromicina generaron brote (cuadro 9), por lo que se debe eficientizar aún más este paso o bien partir de un número mayor de callos embriogénicos. La integración del gen *spssy* en las plantas de arroz fue posible detectarla mediante la técnica de PCR, sin implicar técnicas de hibridación, lo que permite evaluar de manera más rápida las líneas obtenidas. La transformación de plantas de arroz Morelos A-92 con el gen SPS de *Synechocystis* permitió determinar que las condiciones utilizadas son adecuadas y que esto permitirá con la obtención de más líneas, iniciar una etapa de análisis de las plantas para evaluar sus características agronómicas

El diseño de vectores ha representado una herramienta que permite colocar los genes y las regiones reguladoras de acuerdo al propósito que se quiere lograr. Los vectores generales para transformar plantas han sido diseñados por laboratorios de investigación y principalmente por la empresa CAMBIA (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/home.html>), que tiene la particularidad de presentar vectores de tipo binario para transformar utilizando *Agrobacterium tumefaciens* como una opción a la biobalística. Además, se cuenta con la inclusión de genes reporteros que permiten seguir la integración mediante el análisis de la

expresión de manera relativamente sencilla. Sin embargo, es necesario construir previamente los casetes específicos para integrarlos al vector general y generar un vector con los propósitos específicos.

En lo que respecta a las regiones reguladoras utilizadas para sobre expresar el gene de la SPS de *Synechocystis*, en tabaco y tomate se ha utilizado el promotor CaMV 35S y en el arroz subespecie *Japonica* también se utilizó un promotor constitutivo, particularmente el promotor del maíz *Ubi1*. En estos casos no hubo un incremento significativo en la síntesis de sacarosa por razones no conocidas (Lunn et al. 2003), por lo que es necesario explorar otras alternativas en la expresión, siendo una de ellas el uso de promotores específicos.

En el arroz, en una variedad de la subespecie *Indica* (Morelos A-92) se ha demostrado que el promotor de uno de los 5 genes de SPS confiere expresión en el parénquima fotosintético (Martínez-Trujillo et al. 2004), lo que sugiere que una expresión del gen SPS de *Synechocystis* orientada al tejido fotosintético generará una condición más natural con la posibilidad de tener un mejor resultado en la producción de sacarosa y en el mejoramiento de las variables agronómicas de las plantas, particularmente la producción de semillas.

Los genes regulados por luz se encuentran relacionados con la arquitectura de sus promotores, que contienen los elementos que regulan su expresión tanto cualitativa como cuantitativa. Los promotores de los genes de subunidad pequeña de la ribulosa bi fosfato carboxilasa (*rbcS*) reúnen el criterio de ser inducidos por luz y de expresarse en tejido fotosintético, ya que contienen elementos de respuesta en unidades de ADN de aproximadamente 50 bases (Argüello y Herrera-Estrella 1995). El promotor del gen *rbcS* de *Nicotiana tabacum* fue reportado por Mazur y Chui (1985) como una región reguladora que confiere expresión en tejido fotosintético, por lo que fue seleccionado para el inicio de la construcción de un vector en este trabajo.

La construcción de vectores si bien es una tarea rutinaria en los laboratorios de biología molecular requiere de un tiempo relativamente largo con relación a otro tipo de técnicas de laboratorio. El diseño del vector planteado en este trabajo se orientó a expresar el gen SPS de *Synechocystis* en tejido fotosintético por las razones mencionadas en el párrafo anterior. La expresión conferida por el promotor *rbcS* fue primeramente confirmada mediante la expresión transitoria en diferentes tejidos, para asegurar que en las plantas transformadas la expresión fuera conducida a tejido fotosintético (figura 17). La caracterización previa de este gen a partir de un vector del que no se disponían datos muy precisos (pUISPSSy) hizo necesario partir de la secuencia genómica y eliminar una región de más de 400 bases que no era precisamente de este gen. La amplificación de los fragmentos del promotor *rbcS*, el terminador *nos* y el gen *spssy* y su clonación en el vector pGEM-Teasy se logró con

éxito, obteniendo las secuencias mencionadas sin mutaciones, ya que se utilizó una polimerasa de alta fidelidad. Al gen *spssy* fue posible fusionarle el terminador *nos* en la orientación correcta, no obstante la dificultad de no contar con un marcador de color para determinar la presencia del inserto en los plásmidos usados para transformar las colonias. La secuenciación de varios candidatos que tuvieron el inserto permitió corroborar la orientación correcta en algunos candidatos, del cual se escogió uno. Este último plásmido se completará colocando el promotor *rbcS* arriba del gen *spssy*, lo que permitirá tener un casete que se podrá clonar como una unidad en otros vectores generales para incluir la resistencia a antibiótico. Una posibilidad es la de integrarlo a pCAMBIA1300, que ya tiene la resistencia a higromicina, que es el antibiótico que permite seleccionar los callos embriogénicos de arroz transformados.

Tomados en conjunto, los datos obtenidos permitieron establecer lo siguiente:

- a) Se comprobó que la generación de callos embriogénicos en medio MS con 2,4-D es una forma rápida de generar tejido indiferenciado susceptible de ser transformado.
- b) La producción de brotes a partir de callos embriogénicos requiere ANA y BAP en concentraciones de 0.5 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP, respectivamente.
- c) La expresión estable del gen *uidA* es posible obtenerla en callos embriogénicos y,
- d) Fue posible obtener plantas con la integración de los genes *uidA* y *spssy*,
- e) El avance en el diseño y construcción de un vector para expresar el gen *sps* de *Synechocystis* en tejido fotosintético avanzó satisfactoriamente.

VII. LITERATURA CITADA

- Abdelnour A, Escalant J** (1994) Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. CATIE. 38pp.
- Amrhein N, Johänning D, Schab J, Schulz A** (1983) Biochemical basis for glyphosate-tolerance in a bacterium and a plant tissue culture. FEBS-Letters 157:191–196.
- Ananiev ED, Karagyzov LK, Karanov EN** (1987) Effect of cytokinins on ribosomal RNA gene expression in excised cotyledons of *Cucurbita pepo* L. Planta. 170: 370-378.
- Argüello Astorga GR** (1996) Delimitación teórica y experimental de módulos de control transcripcional y replicativo en plantas: Identificación de unidades mínimas de fotorespuesta. Tesis de doctorado. Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto politécnico nacional. Unidad Irapuato, Guanajuato, México.
- Argüello Astorga GR, Herrera-Estrella L** (1996) Ancestral multipartite units in light responsive plant promoters have structures correlating with specific phototransduction pathways. Plant Physiology 112: 1151-1166.
- Arteca R** (1996) Plant Growth Substances: Principles and Applications. New York: Chapman y Hall.
- Ball E** (1946) Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and of *Lupinus albus* L. Amer. J. Bot. 33: 301-318.
- Bandurski RS** (1984) Metabolism of indole-3-acetic acid. 183-200. In: Crozier A. y Hillman JR. (eds.), The biosynthesis and metabolism of plant hormones. Cambridge University Press, Cambridge.
- Battraw M, Hall TC** (1991) Stable transformation of Sorghum bicolor protoplasts with chimeric neomycin phosphotransferase II and-glucuronidase genes. Theor Applied Genet 82 161-168.
- Baxter JC, Foyer HC, Turner J, Rolfe AS, Quick W P** (2003) Elevated sucrose-phosphate synthase activity in transgenic tobacco sustains photosynthesis in older leaves and alters development. Journal of Experimental Botany, Vol. 54, No. 389, pp. 1813-1820.
- Beck E, Ludwig G, Auerswald EA, Reiss B, Schaller H** (1982) Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. Gene 19: 327-336.
- Birch R** (1997). Plant transformation: Problems and strategies for practical applications. Annu. Rev.Plant Physiol. Plant Mol.Biol. 48: 297-326.
- Blumenthal F, Meyer P** (1924) Über durch *Acidum lacticum* erzeugte Tumoren auf Mohrrübenscheiben. Z. f. Krebsg. 21: 250-252.
- Boysen-Jensen P** (1913) "Über die Leitung des phototropischen Reizes in der Avena koleoptile". Ber Deut Bot Ges 31: 559-566.

- Brian PW, Elson GW, Hemming HG, Radley M** (1954) "The plant-growth promoting properties of gibberellic acid, a metabolic product of the fungus *Gibberella fujikuroi*". *J Sci Food Agr* 5: 602-612.
- Cabrera-Ponce JL** (2001) Desarrollo de un método para la transformación genética del maíz (*Zea mays* L.) de interés agronómico mediante la ingeniería genética. Tesis de doctorado. Universidad de Colima. Colima México. pp 142.
- Cabrera-Ponce JL, Vegas-García A, Herrera-Estrella L** (1995) Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Reports* 15:1-7.
- Cañón Guidetti P** (2004) Expresión génica en Plantas es regulada por la identidad de sus promotores. Seminario Departamental. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Genética Molecular y Microbiología. http://protein.bio.puc.cl/cardex/local/puc/seminarios/deptoGMM2004_2/informe_paola_canon.pdf Accesada: junio 2009.
- Cao J, Duan X, McElroy DM, Wu R** (1992) Generation of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Reports* 11: 586-591.
- Caplin SM, Steward F** (1948) Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. *Science* 108: 655.
- Caruso JL** (1987) The auxin conjugates. *Hort Science* 22: 1201-1207.
- Ciesielski T** (1872) Untersuchungen über die Abwärtskrümmung der Wurzel. *Beitrage zur Biologie der Pflanzen* 1: 1-30.
- Cohen JD, Bandurski RS** (1982) Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 403-430.
- Cornejo MJ, Diane L, Kathleen M, Blankenship O, Anderson D, Blechl AN** (1993) Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Molecular Biology* 23 (3): 567 – 581.
- Crocker W, Hitchcock AE, y Zimmerman PW** (1935) "Similarities in the effects of ethylene and the plant auxins". *Contrib. Boyce Thompson Inst* 7:231-248.
- Curatti L, Folco E, Desplants P, Abratti G, Limones V, Herrera-Estrella L, Salerno G** (1998) Sucrose-Phosphate Synthase from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: Identification of the *spsA* gene and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180: 6776-6779.
- Chamberlain, DA, Brettel, RIS, Last DI, Witrzens B, McElroy D, Dolferus R Dennis ES** (1994) The use of the Emu promoter with antibiotic and herbicide resistance genes for the selection of transgenic wheat callus and rice plants. *Aust J Plant Physiol* 21: 95-112.
- Chang TT** (1976) The origin, evolution, cultivation dissemination and diversification of Asian and African rices. *Euphytica* 25: 425-441.

- Chen CM, Melitz DK** (1979) Cytokinin Biosynthesis in a cell-free system from cytokinin-autotrophic tobacco tissue cultures. *FBS Letters* 107: 15-20.
- Chen CM, Ertl JR, Yan MS y Chang CC** (1987) Cytikinin-induced changes in the population of translatable RNAm excised pumpkin cotyledons. *Plant Science* 52:169-174.
- Chen E, Zhang P, Zuo S, Li A, Zhang Y, Chen Z, Pan X** (2004) Factors Affecting Agrobacterium-Mediated Transformation Efficiency in Rice. *Rice Science* 11(4): 181–185.
- Chilton MD, Drummond MH, Merio DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW** (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11: 263–271.
- Chrispeels M, Sadava DE** (2003) *Plants, Genes and Crop Biotechnology*, second edition. America Society of Plant. Jones and Bartlett Publishers, Salisbury, Massachusetts. USA.
- Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH** (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript slicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol* 18:675–689.
- Christou P, Ford TL, Kofron M** (1991) Production of transg enic rice (*Oriza sativa* L.) plants for agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio Technology* 9: 957-962.
- Cronquist A** (1981) *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, Nueva York.
- Darwin CA, Darwin F** (1880) *The Power of Movement in Plants*. John Murray, London.
- Datta K, Oliva N, Torrizo L, Abrigo E, Khush GS, Datta SK** (1996) Genetic transformation of Indica and Japonica rice by *Agrobacterium tumefaciens*. *Rice Genet Newsl* 13: 136–139.
- Datta K, Vasquez A, Tu J, Torrizo L, Alam MF, Oliva N, Abrigo E, Khush GS, Datta SK** (1998) Constitutive and tissue-specific differential expression of *cryIA(b)* gene in transg enic rice plants conferring resistance to rice insect pest. *Theor Appl. Genet* 7: 20–30.
- Datta K, Velazhahan R, Oliva N, Ona I, Mew T, Kush GS, Muthukrishnan S, Datta SK** (1999) Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transg enic rice plants enhances environmental friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease. *Theor Appl Genet* 98: 1138-1145.
- Datta SK, Peterhans A, Datta K, Potrykus I** (1990) Genetically engineered fertile Indica-rice recovered from protoplasts. *Bio/Technology* 8: 736–740.

- Datta, SK, Datta K, Soltanifar N, Donn G, Potrykus I** (1992) Herbicide-resistant *Indica* rice plants from IRRI breeding line IR72 after PEG mediated transformation of protoplasts. *Plant Molecular Biology* 20: 619-629.
- Davies PJ** (1995) *Plant hormones*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gossele V, Rao N, Thompson C, Van Montagu M, Leemans J** (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J* 6: 2513-2518.
- Delmer DP** (1999) Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 245-276.
- Devlin RM** (1980) *Fisiología Vegetal*. Tercera Edición. Traducido por X. Llimosa. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España. 517 p.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M** (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441-445.
- Doubt, SL** (1917). "The response of plants to illuminating gas". *Bot Gaz* 63: 209-224.
- Duan X, Li X, Xue Q, Abo el Saad, M, Xu D, Wu R** (1996) Transgenic rice plants harbouring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotechnology* 14: 494-498.
- Echeverría E, Salvacci ME, González P, Paria G, Salerno G** (1997) Physical and kinetic evidence for an association between Sucrose-Phosphate Synthase and Sucrose-Phosphate Phosphatase. *Plant Physiology* 115: 223-227.
- Eggum** (1980) .Food and Nutrition Research Institute. In: *Rice Human Nutrition*, (eds.). IRRI-FAO. Rome; 1993.
- Endo S, Kasahara T, Sugita K, Matsunaga E, Ebinuma** (2001) The isopentyl transferase gene is effective as a selectable marker gene for plant transformation in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Petite HavanaSRI). *Plant Cell Reports* 20: 60-66.
- Engvild KC** (1986) Chlorine-containing natural compounds in higher plants. *Biochemistry*. 25:781-791.
- Epstein E, Chen KH, Cohen JD** (1989) Identification of indole-3butyric acid as an endogenous constituent of maize kernels and leaves. *Plant Growth regulatio*. 8: 215-223.
- FAO** (2003) Documento base del año internacional del arroz. FAO. <http://www.fao.org/rice2004/es/f-sheet/concept.pdf>. Accesada: junio 2009.
- FAO** (1999) International Rice Commission Newsletter. <http://www.fao.org/docrep/003/x2243t/x2243t00.htm#TopOfPage>. Accesada: junio 2009.
- FAO** (2009) Seguimiento del Mercado del Arroz, febrero de 2009 http://www.fao.org/es/ESC/es/15/70/highlight_71_p.html. Accesada: junio 2009.

- Fauquet CM, Zhang S, Chen L, Marmey P, de Kochko A, Beachy RN** (1995) Biolistic transformation of rice: now efficient and routine for Japonica and Indica rices. In: RICE GENETICS III. Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium, pp 153-165.
- Fitting H** (1907) "Die Leitung Tropischer Reize in parallelotropen Pflanzenteilen", Jahrb Wiss Bot 44: 177-253.
- Fling ME, Elwell LP** (1980) Protein Expression in Escherichia coli Minicells Containing Recombinant Plasmids Specifying Trimethoprim-Resistant Dihydrofolate Reductases Journal of Bacteriology. 141 (2): 779-785.
- Flores D, Abdelnour A** (2000) Manual de Laboratorio de Cultivo de Tejidos II. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. p.11.
- Fosket DE** (1977) The regulation of the plant cell cycle by cytokinin. In: Salisbury, F. B., and Ross, C. W. (1992). Plant Physiology. Belmont, CA: Wadsworth. pp. 357-407, 531-548.
- Fosket DE, Morejohn LC, Westerling KE** (1981) Control of growth by cytokinin: An examination of tubulin synthesis during cytokinin-induced growth in cultured cells of paul's scarlet rose. In: Salisbury, F. B., and Ross, C. W. (1992). Plant Physiology. Belmont, CA: Wadsworth. pp. 357-407, 531-548.
- Fujimoto H, Itoh K, Yamamoto M, Kyojuka J, Shimamoto K** (1993) Insect resistant rice generated by introduction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. Bio/Technology 11: 1151-1155.
- Galtier N, Foyer CH, Huber J, Voelker TA, Huber SC** (1993) Effects of elevated sucrose-phosphate synthase activity on photosynthesis, assimilate partitioning, and growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* var. UC82B). Plant Physiology 101: 535-543.
- Galtier N, Foyer CH, Murchie E, Alred R, Quick P, Voelker TA, Thepenier C, Lasceve G, Betsche T** (1995) Effects of light and atmospheric carbon dioxide enrichment on photosynthesis and carbon partitioning in the leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants over-expressing sucrose phosphate synthase. Journal of Experimental Botany 46: 1335-1344.
- Gane R** (1934) "Production of ethylene by some ripening fruits". Nature 134:1008.
- Ganeshan S, Baga M, Harvey BL, Rossnagel BG, Scoles GJ, Chibbar RN** (2003) Production of multiple shoots from thidiazuron-treated mature embryos and leaf-base/apical meristems of barley (*Hordeum vulgare*). Plant Cell Tissue and Organ Culture 73(1): 57-64.
- Gautheret RJ** (1934) Culture du tissu cambial. Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de Academie des Sciences 198: 2195-2196.
- Gautheret RJ** (1939) Sur la possibilité de réaliser la cultura indefinie des tissus de tubercules de carotte. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de Académie des Sciences 208:118-120.

- Gelvin SB** (1998) The introduction and expression of transgenes in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 9: 227–232.
- Ghareyazie B, Alinia F, Menguito CA, Rubia L, de Palma JM, Liwanag EA, Cohen MB, Khush GS, Bennett J** (1997) Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic *CryIA(b)* gene. *Molecular Breeding* 3: 401-414.
- Goddijn OJM, Schouten PMV, Schilperoort RA, Hoge JHC** (1993) A chimeric tryptophan decarboxylase gene as a novel selectable marker in plant cells. *Plant Molecular Biology* 22: 907-912.
- Goff SA** (1999) Rice as a model for cereal genomics. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 86-89.
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F,¹ Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J,¹ Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun W, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A y Briggs S** (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296:92-100.
- Haberlandt G** (1913) "Zur Physiologie der Zellteilung". *Sitzber. K. Preuss. Akad. Wiss.* 318.
- Haberlandt G** (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitz. Akad. Wiss. Wien* 111 : 69-92.
- Haberlandt G** (1913) "Zur Physiologie der Zellteilung". *Sitzber. K. Preuss. Akad. Wiss.* 318. En: Woodward WA. y Bartel B. (2005). *Auxin: Regulation, Action, and Interaction. Annals of Botany* 95: 707–735.
- Haigler CH, Ivanova-Datcheva M, Hogan PS, Salnikov VV, Hwang S, Martin K, Delmer DP** (2001) Carbon partitioning to cellulose synthesis. *Plant Mol Biol* 47: 29–51
- Haldrup A, Petersen SG, Okkels FT** (1998) The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent. *Plant Mol. Biol.* 37, 287–296.
- Hall RH, deRopp RS** (1955) "Formation of 6-furfurylaminopurine from DNA breakdown products". *J Am Chem Soc* 77: 6400.
- Haseloff J, Amos B** (1995) GFP in plants. *Trends Genet* 11: 328-329.
- Hayakawa T, Zhu Y, Itoh K, Kimura Y** (1992) Genetically engineered rice resistant to rice stripe virus, an insect-transmitted virus. *Proc Nat Acad Sci USA* 89: 9865-9869.

- Heller R** (1953) Recherches sur la nutrition minerale des tissus vegetaux cultivate' in vitro. *Annales des Sciences Naturelles-Botanique et Biologie Vegetale*, 14: 1–223.
- Herrera-Estrella L** (1999) Transgenic plants for tropical regions: Some considerations about their development and their transfer to the small farmer *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 5978–5981.
- Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montague M, Schell J** (1983) Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303: 209-213.
- Herrera-Estrella L, Simpson J, Martínez-Trujillo M** (2005) Transgenic plants, an historical perspective. *Methods in Molecular Biology* 286: 3-31.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T** (1994) Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal* 6 (2): 271-282.
- Houssa C, Jacquard A, Bernier G** (1990) Activation of replicon origins as a possible target for cytokinins in shoot meristems of *sinapis*. *Planta* 181: 324-326.
- Huber SC, Huber JL** (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 431-444.
- INIFAP-CIRNO** (2003) Guía para la Asistencia Técnica Agrícola para el Área de Influencia del Campo Experimental Valle del Fuerte. Agenda Técnica, Sexta Edición. 208 p.
- Irie K, Hosoyama H, Takeuchi T, Iwabuchi K, Watanabe H, Abe M, Abe K, Arai S** (1996) Transgenic rice established to express corn cystatin exhibits strong inhibitory activity against gut proteinases. *Plant Molecular Biology*: 30: 149-157.
- Jablonski JR, Skoog F** (1954) "Cell enlargement and cell division in excised tobacco pith tissue". *Physiol Plant* 7:16.
- Jain R** (1997) Effect of some factors on plant regeneration from Indica rice cells and protoplast –A review. *Indian Journal of Experimental Biology* 35: 323-331.
- Jefferson R A, Burgess SM, Hirsch D** (1986) β -glucuronidase from *E. coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8447-8451.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan M** (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3910-3907
- Jianzhong W, Mizuno H, Sasaki T, Matsumoto T** (2008) Analysis of Rice Genome Sequence to Understand the Molecular Basis of Genome Evolution. *Rice* 1: 119–126.
- Joersbo M, Okkels FT** (1996) A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. *Plant Cell Reports* 16: 219-221.

- Kamalay JC Goldberg RB** (1980) Regulation of Structural Gene Expression in Tobacco. *Cell* 19: 935-946.
- Kamo K, Blowers A, Mcelroy D** (2000) Effect of the cauliflower mosaic virus 35s, actin, and ubiquitin promoters on *uida* expression from a *bar-uidA* fusion gene in transgenic *gladiolus* plants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36: 13–20.
- Kaneko Takakazu, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S** (1996) Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II. Sequence Determination of the Entire Genome and Assignment of Potential Protein-coding Regions. *DNA Research* 3:109–136.
- Klotke J, Kopka J, Gatzke N, Heyer AG** (2004) Impact of soluble sugar concentration on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation: evidence for a role of raffinose in cold acclimation. *Plant Cell and Environment* 27: 1395-1404.
- Klush G** (1997) Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Mol Biol* 35: 25-34.
- Knop W** (1865) Quantitative Untersuchung über die Ernährungsprozesse der Pflanzen. *Landwirtsch Vers Stn* 30:292–294.
- Kogl F, Haagen Smit AJ** (1931) Über die Chemie des Wuchsstoffs. *K. Akad. Wetenschap. Amsterdam Proceedings*. . En: Woodward WA. y Bartel B. (2005). Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* 95: 707–735.
- Kotte W** (1922) Kulturversuche mit isolierten Wurzelspitzen. *Bcitr. z. Allgem Bot* 2: 413-434.
- Krämer U, Chardonnens AN** (2001) The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:661–672
- Kumar KS, Maruthasalam M, Loganathan D, Sudhakar Y, Balasubramanian P** (2005) An Improved *Agrobacterium*-Mediated Transformation Protocol for Recalcitrant Elite Indica Rice Cultivars. *Plant Molecular Biology Reporter* 23: 67–73.
- Kutschera U, Heiderich A** (2002) Sucrose metabolism and cellulose biosynthesis in sunflower hypocotyls. *Physiologia Plantarum* 114: 372–379.
- Kuwada Y** (1910) A cytological study of *Oryza sativa* L. *Bot Mag* 24: 267-280.
- Kyozuka J, McElroy D, Hayakawa T, Xie Y, Wu R, Shimamoto K** (1993) Light-regulated and cell-specific expression of tomato *rbcS-gusA* and rice

- rbcS-gusA* fusion gene in transgenic rice. *Plant Physiology* 102: 991–1000.
- Lan YL, Stanton BG** (2008) T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology* 146: 325–332
- Laporte MM, Galagan JA, Prasch AL, Vanderveer PJ, Hanson DT, Shewmaker CK, Sharkey TD** (2001) Promoter strength and tissue specificity effects on growth of tomato plants transformed with maize sucrose-phosphate synthase. *Planta* 212: 817-822.
- Lessard PA, Allen RD, Fujiwara T, Beachy RN** (1993) Upstream regulatory sequences from two beta-conglycinin genes. *Plant Mol. Biol.* 5:873–885.
- Letham D S** (1963) "Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*". *Life Sci* 2: 569-573.
- Leuva V, LeTorneau D** (1990) Auxin activity of phenylacetic acid in tissue cultura. *J. of Plant Growth regulatio.* 9: 71-76.
- Levitt J** (1980) Responses of plants to environmental stresses, Vol. I. New York: Academic Press.
- Li LC, Rongda QU, de Kochko A, Fauquet CM, Beachy RN** (1993) An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Rep* 12: 250–255.
- Lin W, Anuratha CS, Datta K, Potrykus I, Muthukrishnan S, Datta SK** (1995) Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Biol Tech* 13: 686-691.
- Liu XJ, Prat S, Willmitzer L, Frommer WB** (1990) Cis regulatory elements directing tuber-specific and sucrose-inducible expression of a chimeric class I patatin promoter/GUS-gene fusion. *Mol Gen Genet* 223: 401–406.
- Lunn JE, Furbank RT** (1999) Sucrose biosynthesis in C4 plants. *New Phytologist* 143: 221-237.
- Lunn JE, Gillespie VJ, Furbank RT** (2003) Expression of a cyanobacterial sucrose-phosphate synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* 54: 223-237.
- Lunn JE, Rees T** (1990) Apparent equilibrium constant and mass-action ratio for sucrose-phosphate synthase from seeds of *Pisum sativum*. *The Biochemical Journal* 267: 739-743.
- Ma JK, Barros E, Bock R, Christou P, Dale P, Dix PJ, Fischer R, Irwin J, Mahoney R, Pezzotti M, Schillberg S, Sparrow P, Stoger E, Twyman RM** (2005) Molecular Farming for new drugs and vaccines. *Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants.* *EMBO Rep* 6(7): 593-599.
- Martínez-Trujillo M, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L** (2003) Improvement of Rice Transformation Using Bombardment of Scutellum-Derived Calli. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 49-437.

- Martínez-Trujillo M** (2002) Análisis funcional de regiones involucradas en la expresión del gen de Sacarosa-Fosfato Sintasa de arroz (*Oryza sativa* L.) Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Guanajuato, México. 112 pp.
- Martínez-Trujillo M, Chávez-Bárceñas T, Limones-Briones V, Simpson J, Herrera-Estrella L** (2004) Functional analysis of the promoter of the rice sucrose phosphate synthase gene (*sps1*). *Plant Science* 166: 131-140.
- Matsuki R, Onodera H, Yamauchi T, Uchimiya H** (1989) Tissue-specific expression of the rolC promoter of the Ri plasmid in transgenic rice plants. *Mol Gen Genet* 220: 12–16
- Matsuoka M, Kyojuka J, Shimamoto K, Kano-Murakami Y** (1994) The promoters of two carboxylases in a C4 plant (maize) direct cell-specific, light-regulated expression in a C3 plant (rice). *Plant J* 6: 311–319.
- Mauseth JD** (1991) *Botany: An Introduction to Plant Biology*. Philadelphia: Saunders. pp. 348-415.
- Mazur BJ, Chui CF** (1985) Sequence of a genomic DNA clone for the small subunit of ribulose bis-phosphate carboxylase-oxygenase from tobacco. *Nucleic Acids Research*. 13:(7) 2373-2386
- McCormac AC, Elliott MC, Chen DF** (1997) pBECKS. A flexible series of binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Biotechnol* 8:199–213.
- McElroy D, Blowers AD, Jenes B, Wu R** (1991) Construction of expression vectors based on the rice actin 1(Act1) 5_region for use in monocot transformation. *Mol Gen Genet* 231: 150-160.
- McElroy D, Zhang W G, Cao J, Wu R** (1990) Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell* 2: 163–171.
- McGaw BA** (1995). "Cytokinin biosynthesis and metabolism". *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht: Kluwer. pp.98-117.
- Miki B, McHugh S** (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotech* 107:139-232.
- Miller CO** (1961) "A kinetin-like compound in maize". *Proc Natl Acad Sci USA* 47: 170-174.
- Miller CO, Skoog, von Saltza MH, Strong FM** (1955) "Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid". *J Am Chem Soc* 77: 1392.
- Mitsuhara I, Ugaki M, Hirochika H, Ohshima M, Murakami T, Gotoh Y, Katayose Y, Nakamura S, Honkura R, Nishimiya S, Ueno K, Mochizuki A, Tanimoto H, Tsugawa H, Otsuki Y, Ohashi Y** (1996) Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol* 37: 49–59.

- Morgan MK, Ow DW** (1995) Polyethylene glycol-mediated transformation of tobacco leaf mesophyll protoplasts: an experiment in the study of Cre-Lox recombination, in *Methods in Plant Molecular Biology: A Laboratory Course Manual* (Maliga, P., Klessig, D. F., Cashmore, A. R., Grissem, W., and Varner, J. E. eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 1-17.
- Mouillon JM, Hurry V** (2001) Effects of elevated sucrose-phosphate synthase activity on photosynthesis, carbohydrate partitioning and growth rate in hybrid aspen (*Populus tremula* sp. *tremuloides*). En: Lunn JE, Gillespie VJ, Furbank RT. (2003) Expression of a cyanobacterial sucrose-phosphate synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* 54: 223-237.
- Mroginski L, Sansberro P, Flaschland E** (2004) Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Echenique V. Rubinstein C. y Mroginski L. *Biología y Mejoramiento Vegetal*. Ediciones INTA. Pp. 109-124.
- Murashige T, Skoog FA** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Murchie EH, Sarrobert C, Contard P, Betsche T, Foyer CH, Galtier N** (1999) Overexpression of sucrose-phosphate synthase in tomato plants grown with CO₂ enrichment leads to decreased foliar carbohydrate accumulation relative to untransformed controls. *Plant Physiology and Biochemistry* 3: 251-260.
- Nayak P, Basu D, Das S, Basu A, Ghosh D, Ramakrishnan NA, Ghosh M, Sen SK** (1997) Transgenic elite *Indica* rice plants expressing *CryIA(c)* δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proc Nat Acad Sci USA* 94: 2111-2116.
- Neljubow DN** (1901) "Über die horizontale nutation der stengel von *Pisum sativum* und einiger anderen". *Pflanzen Beitrage und Botanik Zentralblatt* 10:128-139.
- Newell CA** (2000) Plant Transformation Technology. *Developments and Applications. Molecular Biotechnology* 16: 53-65.
- Nobécourt P** (1939) Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales* 130:1270-1271.
- Nobécourt P** (1939) Sur les radicules naissant des cultures de tissus végétaux. *Comptes Rendus Des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales* 130: 1271-1272.
- Normanly J, Cohen JD, Fink GR** (1993) *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 90: 10355-10359.
- Nunberg AN, Li Z, Bogue MA, Vivekananda J, Reddy AS, Thomas TL** (1994) Developmental and hormonal regulation of sunflower helianthinin genes:

- proximal promoter sequences confer regionalized seed expression. *Plant Cell* 6: 473–486.
- Odell JT, Nagy F, Chua NH** (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810–812.
- Ohya T, Suzuki H** (1988) Cytokinin promoted polyribosome formation in excised *Cucuber cotyledns*. *J Plant Physiology* 133: 295-298.
- Olsson O, Koncz C, Szalay AA** (1988) The use of the *luxA* gene of the bacterial luciferase operon as a reporter gene. *Mol Gen Genet* 215: 1-9.
- Ow DW, Wood KV, DeLuca M, DeWet JR, Helinski DR, Howell SH** (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells. *Science* 234: 856-859.
- Paal A** (1918) "Über phototropische Reizleitung". *Jahrb Wiss Bot* 58:406-458
- Park Ji-Young, Canam T, Kang Kyu-Young, Ellis D, Mansfield SD** (2007) Over-expression of an *Arabidopsis* family A sucrose phosphate synthase (SPS) gene alters plant growth and fibre development. *Transgenic Res* 17:(2)181-192.
- Park SH, Rose SC, Zapata C, Srivatanakul M, Smith RH** (1998) Cross-protection and selectable marker genes in plant transformation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 34: 117–121.
- Peng J, Lyznik L, Lee L, Hodges TK** (1990) Co-transformation of Indica rice protoplasts with *gusA* and *neo* genes. *Plant Cell Reports* 9: 168-172.
- Phinney B** (1983). The history of the gibberellins. 19-52p. In: Crozier A. (ed.), *The biochemistry and physiology of the gibberellins*, Vol. I. Praeger. New York.
- Pollock CJ** (1984) Sucrose accumulation and the initiation of fructan biosynthesis in *Lolium temulentum* L. *New Phytologist* 96: 527–534.
- Porchia AC, Salerno GL** (1996) Sucrose biosynthesis in a prokariotic organism: presence of two sucrose-phosphate synthases in *Anabaena* with remarkable differences compared with the plant enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13600-13604.
- Portrykus I, Harms CT, Lorz H** (1979) Callus formation from cell culture protoplasts of corn. *Thero Appl Genet* 54: 209–214.
- Potrykus I** (1991) Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 205-255.
- Potrykus I, Spangenberg C** (1995) *Gene transfer to plants*. Springer.
- Pua EC, Mehra-Palta A, Nagy F, Chua NH** (1987) Transgenic plants of *Brassica napus* L. *Biotechnology* 5: 815-817.
- Rechinger C** (1893) Untersuchungen über die Grenzen der Teilbarkeit im Pflanzenreich. *Abh Zool Bot Ges Wien* 43: 310-334.
- Reddy PM, Ladha JK, Ramos MC, Maillet F, Hernandez RJ, Torrizo LB, Oliva NP, Datta SK, Datta K** (1998) Rhizobial lipochitooligosaccharide nodulation

factors activate expression of the legume early nodulin gene ENOD12 in rice. *Plant J* 14: 693-702.

- Reinert J** (1958) Untersuchungen die Morphogenese an Gewebekulturen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 71: 15.
- Robbins WJ** (1922) Cultivation of excised root-tips and stem tips under sterile conditions. *Bot Gaz* 73: 376-390.
- Rocha P, Christou P, Leech M** (1998) Triptófano decarboxilasa y 5-fluorotriptófano Un sistema de selección efectivo en tabaco transgénico. www.geocities.com/pedrojrocha/pr/5ftpr.pdf Accesada: junio de 2009.
- Roy M, Kumar R, Singh RJ, Wu R** (2000) Production of agronomically superior transgénic rice plants using *Agrobacterium* transformation methods: Present status and future perspectives. *Current Science* 79(7): 954-960.
- Salcedo-Aceves J** (1993) Morelos A-92 variedad de arroz para el Estado de Morelos. SARH-INIF, Folleto Técnico No. 9. México.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanford JC, TM, Klein ED, Wolf, Allen N** (1987) Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Journal of Particulate Science and Technology* 5: 27-37.
- Sato Y, Yokoya S** (2008) Enhanced tolerance to drought stress in transgénic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Reports* 27: 329–334.
- Scheiden MJ** (1838) Beitrage zur Phylogenesis. *Mfiller Arch Anat und Physiol* 12:137-176.
- Schenk RU, Hildebrandt AC** (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199–204.
- Schneider EA, Cazacoff CW y Wightman F** (1885) Gas chromatography-mass spectrometry evidence for several endogenous auxins in pea seedling organs. *Planta* 1965: 232-241.
- Schwann TH** (1839) *Mikroskopische Untersuchungen fiber die tJbereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Thiere und Pflanzen*. N. 170: Oswalds Berlin.
- Sharma TR, Dalal V, Singh S, Kumar SP, Madhav MS, Singh NK** (2006) Computational analysis and exploration of rice genome sequence data. *Proceedings of the Second International Rice Congress*. <http://www.irri.org/science/abstracts/030.asp>. Accesada: junio 2009.
- Shimamoto K, Terada R, Izawa T, Fujimoto H** (1989) Fertile transgénic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338: 274-276.
- Shrivastava S** (2007) *Plant Tissue Culture: An Overview*. Latest Reviews. 5 (1). Accesada: Julio 2009. <http://www.pharmainfo.net/reviews/plant-tissue-culture-overview>.

- Siegl G, MacKintosh C, Stitt M** (1990) Sucrose-phosphate synthase is dephosphorylated by protein phosphatase 2A in spinach leaves. *FEBS Letters* 270: 198-202.
- Signora L, Galtier N, Skùt L, Lucas H, Foyer CH** (1998) Overexpression of sucrose phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana* results in increased foliar sucrose/starch ratios and favours decreased foliar carbohydrate accumulation in plants after prolonged growth with CO₂ enrichment. *Journal of Experimental Botany* 49: 669-680.
- Sivamani E, Shen P, Opalka N, Beachy RN, Fauquet CM** (1996) Selection of large quantities of embryogenic calli from *Indica* rice seeds for production of fertile transgenic plants using the biolistic method. *Plant Cell Reports* 15: 322-327.
- Skoog F, Tsui C** (1948) Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured in vitro. *American Journal of Botany* 35: 782-787.
- Skoog F, Miller CO** (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*: 11:118-131.
- Skoog F, Miller CO** (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11: 118-131.
- Soding H** (1925) "Zur kenntnis der wuchshormone in der haferkoleoptile". *Jahrb. Wiss Bot* 64: 587-603.
- Sponsel VM** (1995) "Gibberellin biosynthesis and metabolism". *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht: Kluwer. pp. 66-97.
- Steward FC, Mapes MO, Mears K** (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany* 45: 705-708.
- Stomp AM** (1992) Histochemical localization of β -glucuronidase. In S.R. Gallagher (Ed), *GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression*. Academic Press, San Diego CA, pp 103-113.
- Strand AÊ , Foyer CH, GardestroÈm P, Hurry V** (2001) Increased expression of sucrose-phosphate synthase in transgenic *Arabidopsis thaliana* results in improved photosynthetic performance and increased freezing tolerance at low temperatures. En: Lunn JE, Gillespie VJ, Furbank RT. (2003) Expression of a cyanobacterial sucrose-phosphate synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* 54: 223-237.
- Sturm A** (1999) Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology* 121: 1-7.

- Sunilkumar G, Connell JP, Smith CW, Reddy AS, Rathore KS** (2002) Cotton α -globulin promoter: isolation and functional characterization in transg enic cotton, Arabidopsis, and tobacco. *Transg enic research*. 11: (4) 347-359.
- Tada Y, Sakamloto M, Matsuoka M, Fujimura T** (1991) Expression of a monocot LHCP promoter in transg enic rice. *EMBO J* 10: 1803-1808.
- Taiz L, Zaiger E** (2006) *Plant Physiology*, Cuarta edici n. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland Massachusetts. 764 pp.
- Takaiwa F, Ogawa M, Okita TW** (1999) Rice Glutelins. In: *Seed Proteins*. Ed. by Shewry PR, Casey R. Kluwer Academic Publishers. Norwell MA, USA.
- Takeuchi Y, Abe T, Sashara T** (1997) Genetic analysis of plant regeneration from seed-derived calli in rice (*Oryza sativa* L.). *Crop Science* 37 (3): 963-965.
- Teeri TH, Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montagu M, Palval ET** (1986) Identification of plant promoters in situ by T-DNA-mediated transcriptional fusions to the npt-H gene. *The EMBO Journal* 5 (8): 1755-1760,
- Terada R, Shimamoto K** (1990) Expression of CaMV35S-GUS gene in transg enic rice plants. *Mol Gen Genet* 220: 389-392.
- Terada R, Takuya N, Iwabuchi M, Shimamoto K** (1993) A wheat histone H3 promoter confers cell division-dependent and independent expression of the *gus* A gene in transg enic rice plants. *Plant J* 3: 241-252.
- Toki S** (1997) Rapid and Efficient *Agrobacterium*-Mediated Transformation in Rice. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 16-21.
- Toki S, Takamatsu S, Nojiri C, Ooba S, Anzai H, Iwata, Alan M, Christensen H, Quail H, Uchimiya H** (1992) Expression of a Maize Ubiquitin Gene Promoter-bar Chimeric Gene in Transg enic Rice Plants. *Plant Physiology* 100: 1503-1507.
- Toriyama K, Arimoto Y, Uchimiya H, Hinata K** (1988) Transg enic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Bio/Tech* 6: 1072-1074.
- Trunova T** (1982) Mechanisms of winter wheat hardening at low temperature. In: Li PH, Sakai A, eds. *Plant cold hardiness and freezing stress*, Vol. 2. Academic Press, 41-54.
- Tsukahara M, Hirosawa T** (1992) Simple dehydration treatment promotes plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus. *Plant Cell Reports* 11: 550-553
- Tulecke W, Nickell LG** (1959) Production of large amounts of plant tissue by submerged culture. *Science* 130:863-864.
- Tzfira T, Rhee Y, Chen M-H, Citovsky V** (2000) Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. *Annu Rev Microbiol* 54: 187-219.

- Ulehla V** (1928) Versuche zur Kultur des Pflanzengewebes I. Das Wasser als Factor der Gewebekultur. Arch Exp Zellf 6: 370-417.
- Valdez M, Cabrera-Ponce JL, Sudhakar D, Herrera-Estrella L, Christou P** (1998) Transgénic Central America, West African and Asian elite rice varieties resulting from particle bombardment of foreign DNA into mature seed-derived explants utilizing three different bombardment devices. Annals of Botany 82: 795-801.
- Valdez M, Muñoz M, Vega JR, Espinoza AM** (1997) Plant regeneration of Indica rice (*Oryza sativa*) cultivars from mature embryo-derived calli. Revista de Biología Tropical 44-45 (3-1):13-21.
- Valdez-Alarcón JJ, Ferrando M, Salerno G, Jiménez-Moraila B, Herrera-Estrella L** (1996) Characterization of a rice sucrosephosphate synthase-encoding gene. Gene 170: 217-222.
- Van den Elzen P, Townsend J, Lee K, Bedbrook J** (1985) A quimeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. Plant Mol Biol 5: 299-302.
- Van der Geest AHM, Hall TC** (1996) A 68 bp element of the b-phaseolin promoter functions as a seed-specific enhancer. Plant Mol Biol 32: 579–588.
- van Overbeek J, Conklin ME, Blakeslee AF** (1941) "Factors in coconut milk essential for growth and development of *Datura* embryos". Science 94:350.
- Van Wert sally L, Saunders JA** (1992) Electrofusion and Electroporation of plants. Plant Physiology 99: 365-367.
- Vasil IK** (1999) Molecular improvement of cereal crops. Edición: ilustrada. Springer. 402 páginas.
- Vasil IK** (1994) Molecular improvement of cereals. Plant Mol Biol 25: 925-937.
- Vega J** (1996) Embriogénesis somática en arroz (*Oryza sativa* L. Cultivar CR 5272): Anatomía e histología de los procesos embriogénicos. Tesis de Maestría. Sistema de Estudios de Posgrado. Escuela de Biología UCR. 98p
- von Sachs J** (1880) "Stoff und Form der Pflanzenorgane I". Arb Bot Inst Wurzburg 2: 452-488.
- Wang K, Drayton P, Frame B, Dunwell J, Thompson J** (1995) Whisker mediated plant transformation: an alternative technology. In Vitro Cell Dev Biol 31: 101–104.
- Wanner LA, Juntilla O** (1999) Cold-induced freezing tolerance in Arabidopsis. Plant Physiology 120: 391–400.
- Wareing PF, Phillips DJ** (1972) The control of Growth and Differentiation in Plants. Pergamon Press, L. T. D. Gran Bretaña.
- Went FW** (1926) "On growth-accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*". Proc Kon Ned Akad Wet 30:10-19.
- White PR** (1934) Potentially unlimited growth of excised tomato root-tips in a liquid medium. Plant Physiology 9: 585-600.

- White PR** (1939) Controlled differentiation in a plant tissue culture. *Bulletin of Torrey Botanical Club* 66: 507–513.
- White PR** (1939) Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *American Journal of Botany* 26: 59–64.
- White PR** (1963) *The Cultivation of Animal and Plant Cells*. Ronald Press, New York. 17 p.
- Wightman F Lighty DL** (1982) Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in the shoot of higher plants. *Physiologia Plantarum* 55: 17-24.
- Winter H, Huber SC** (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Plant Science* 19: 31-67.
- Woodward WA, Bartel B** (2005) Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* 95: 707–735.
- Worrell AC, Bruneau JM, Summerfelt K, Boersig M, Voelker TA** (1991) Expression of a maize sucrose-phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *The Plant Cell* 3: 1121-1130.
- Wunn J, Kloti A, Burkhardt PK, Ghosh BGC, Launis K, Iglesias VA, Potrykus I** (1996) Transg enic *Indica* rice breeding line IR58 expressing a synthetic *Cry1A(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Biol Tech* 14: 171-176.
- Xiang C, Han P, Lutziger I, Wang K, Oliver DJ** (1999) A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol Biol* 40: 711–717.
- Xu D, Xue Q, McElroy D, Mawal Y, Hilder VA, Wu R** (1996) Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene *Cpti*, in transg enic rice plants confers resistance to two major rice insect pests. *Molecular Breeding* 2: 167-173.
- Yin YH, Beachy RN** (1995) The regulatory regions of the rice tungro bacilliform virus promoter and interacting nuclear factors in rice (*Oryza sativa* L). *Plant J* 7: 969–980.
- Yokoi S, Tsuchiya T, Toriyama K, Hinata K** (1997) Tapetum-specific expression of the Osg6B promoter- β -glucuronidase gene in transg enic rice. *Plant Cell Reports* 16: 6. 363-367
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao M, Liu J, Sun J, Tang J, Chen Y, Huang X, Lin W, Ye C, Tong W, Cong L, Geng J, Han Y, Li L, Li W, Hu G, Huang X, Li W, Li J, Liu Z, Li L, Liu J, Qi Q, Liu J, Li L, Li T, Wang X, Lu H, Wu T, Zhu M, Ni P, Han H, Dong W, Ren X, Feng X, Cui P, Li X, Wang H, Xu X, Zhai W, Xu Z, Zhang J, He S, Zhang J, Xu J, Zhang K, Zheng X, Dong J, Zeng W, Tao L, Ye J, Tan J, Ren X, Chen X, He J, Liu D, Tian W, Tian C, Xia H, Bao Q, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao W, Li P, Chen W, Wang X, Zhang Y, Hu J, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang G, Xiong Y, Li Z,¹ Mao L, Zhou C, Zhu Z, Chen R, Hao B, Zheng W,**

- Chen S, Guo W, Li G, Liu S, Tao M, Wang J, Zhu L, Yuan L y Yang H** (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Indica*). *Science* 296: 79-92.
- Zaenen I, van Larebeke N, Touchy H, Van Montagu M, Schell J** (1974) Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *Journal of Molecular Biology* 86: 109–127.
- Zhan W, McElroy D, Wu R** (1991) Analysis of the rice Act1 50 region activity in transgenic rice plants. *Plant Cell* 3: 1155–1165.
- Zhang HM, Yang H, Rech T, Golds TJ, Davis AS, Mulligan B J, Cocking EC, Davey MR** (1988) Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. *Plant Cell Rep* 7: 379-384.
- Zhang P, Puonti-Kaerlas J** (2000) PIG-mediated cassava transformation using positive and negative selection. *Plant Cell Rep* 19:1041–1048.
- Zhang W, Wu R** (1988) Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. *Theor Appl Gen* 76: 835-840.
- Zhu YJ, Komor E, Moore PH** (1997) Sucrose Accumulation in the Sugarcane Stem Is Regulated by the Difference between the Activities of Soluble Acid Invertase and Sucrose Phosphate Synthase. *Plant Physiology* 115: (2) 609-616.
- Zuo J, Niu Q-W, Frugis G, Chua N-H** (2002) The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J* 30: 349–359.
- Zupan JR, Muth TR, Draper O, Zambryski P** (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J* 23: 11-28.

ANEXOS

Full Length Research Paper

A 22-bp sequence of the core promoter from the *Indica* rice sucrose-phosphate synthase gene (*sps1*) is sufficient to confer basal transcription activity

Miguel Martínez-Trujillo¹, Gamaliel Valdivia-Rojas¹, Gloria Solís Guzmán¹, José Luis Cabrera-Ponce²

¹Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México

²Departamento de Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Irapuato, Guanajuato, México.

Accepted 29 July 2008

The 5' region of the sucrose-phosphate synthase gene (*sps1*) of the *Indica* rice consists of an atypical promoter which lacks TATA box but has a putative initiator sequence overriding a second transcription initiation site. Analysis of the transient expression of truncated versions of the *sps1* promoter (from -148 to +21) fused to the *uidA* reporter gene was performed. The results showed that a stretch of 22 bp (GTGTCACCCGCCAGCCTCCCT), from -1 to +21, is sufficient to confer basal transcription activity. These data suggest that an initiator-like sequence (TCACCC) is the responsible of this basal activity.

Key words: Core promoter, *sps1* gene, expression analysis.

INTRODUCTION

Transcription of structural genes is directed by the corresponding promoters whose DNA sequence determines timing, strength, direction and position of transcriptional initiation. In eukaryotic cells, the promoter elements from protein-coding genes are classified into two categories: common core promoter elements, which are needed for basal transcription initiation, and gene-specific regulatory elements located upstream and necessary to regulate the strength and specificity of the expression (Roeder, 1996). The core promoter is located at or near the transcription initiation site and a TATA box is essential in most cases, with the TATAa/tAa/t consensus sequence located 25 to 30 bp upstream of the transcription initiation site (Nikolov and Burley, 1997). However, an increasing number of genes lacking a TATA box-like sequence at the expected positions have been described in *Drosophila* and human genomes (FitzGerald et al., 2006). The initiator element (INR) is a sequence that overlaps the transcription initiation site and may compensate the absence of a TATA box (Roeder, 1991); however, when the TATA box and the INR motif are both present, the second element de-

termines the position of the transcription initiation site (Zhu et al., 1995). The consensus sequence of INR in mammals is a motif pyrimidine-rich (PyPyAN(t/a)PyPy), where A is at +1 (Smale and Baltimore, 1989). A genome comparison of humans, mouse, rice and *Arabidopsis thaliana* showed that INR is more represented in the promoters of mammals than those from plants, and that the consensus sequence is restricted to the positions -1/+1 (the YR rule) with Y (C or T) at the -1 position and R (A or G) at +1 (Yamamoto et al., 2007). This INR consensus sequence suggests an origin in the early evolving eukaryotes, and has also been reported in protists (Liston and Johnson, 1999).

RNA polymerase II is assembled in the promoter after several general factors are recruited (Orphanides, 1996), being the first a complex of 8 - 12 proteins associated to the TATA binding protein (TBP), named collectively as TFIID (Burke and Kadonaga, 1996). The primary function, either of the TATA box or the INR is to locate TFIID in the core promoter resulting in formation of the TFIID/DNA complex; whereas the TATA box is recognized directly by the TBP (Hernández, 1993), the INR motif is recognized by factors associated to TBP (TAF_{II}150-TAF_{II}250) (Chalkey and Verrijzer, 1999). Some promoters lacking TATA box have substitutes known as downstream promoter elements (DPEs) around

*Corresponding author: E-mail: codigogenetico@gmail.com.
Tel-Fax: +52 (443) 3166973

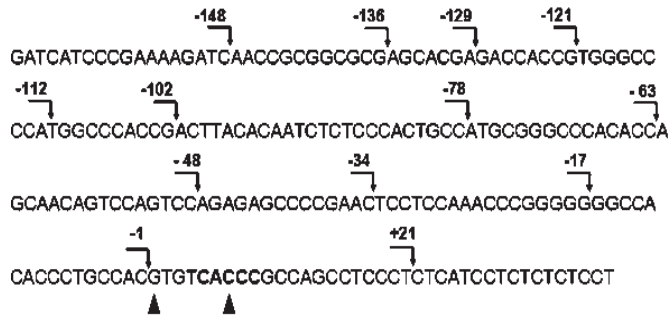


Figure 1. Deletions at the *Sps1* core promoter gene. The arrows indicate the 5' deletions generated in the promoter. The transcription initiation sites (*tis*) are indicated with arrowheads; the first *tis* is considered as +1 for convenience. A typical initiator motif is highlighted in bold nucleotides. The pSPS1 plasmid (Martinez-Trujillo et al., 2004) with the -2196 *sps1* promoter fused to the *uidA* gene (Jefferson et al., 1987) was used as a template to amplify DNA fragments by PCR and to generate the different truncated promoter versions. PCR fragments were cloned into the pGEM-T-easy vector (PROMEGA) and the constructs were verified by sequencing with the dideoxynucleotide chain termination method (Sanger et al., 1977) using fluorescent nucleotides (ABI) and an ABI PRISM™ DNA sequencer.

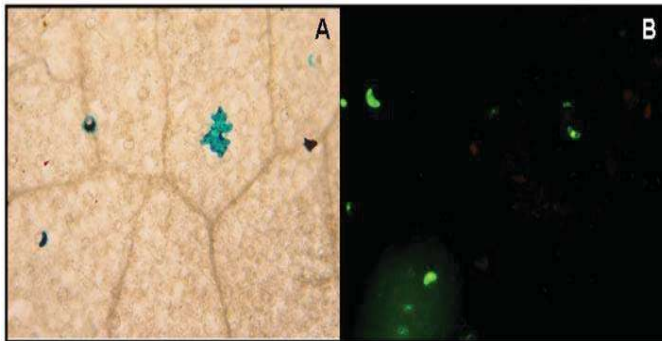


Figure 2. Expression of *uidA* and green fluorescent protein genes in tobacco bombarded leaves. Tobacco leaves in MS medium (Murashige and Skoog, 1962), were bombarded with a mix of the plasmids containing the *sps1* promoter versions fused to the *uidA* gene, and the plasmid pCKGFPS65C (Reichel et al., 1996) with the gene encoding the green fluorescent protein under the control of the CaMV 35S promoter. A BioRad particle bombardment device Helium-driven PDS-1000/He, at 900 psi, was used. (A) Expression of the *uidA* reporter gene was visualized as blue cells after staining the tobacco leaves with x-gluc, according to Stomp (1992). (B) Expression of the green fluorescent protein gene was visualized as green fluorescent cells by using a fluorescence microscope Leica DMRE with a filter I3 (blue light exciter BP 450 - 490 nm; beamsplitter RKP 510 nm; emitter LP 515 nm). Images were photographed at 400X.

+30 with the consensus sequence a/gGa/tCGTG. These elements were described first in *Drosophila* and are recognized by TAF_{II}40 (Burke and Kadonaga, 1997). This DPE motif has been reported in plants but at a lower frequency than in *Drosophila* and mammals (Yamamoto et al., 2007). In plants, the majority of photosynthesis

nuclear genes have TATA-less promoters suggesting that their core promoters are activated in a better way by light (Nakamura et al., 2002).

Sucrose is synthesized in plants by the action of sucrose-6-phosphate synthase (SPS; EC 2.3.1.14), an enzyme which transfers the glucosyl moiety from UDP-glucose to fructose-6-P to produce sucrose-6-P, which is in turn dephosphorylated by a sucrose-6-phosphate phosphatase (SPP; EC 3.1.3.00) yielding sucrose as the final product and making the reaction practically irreversible (Huber and Huber, 1996). The sucrose phosphate synthase gene (*sps1*) of the *Indica* rice has a TATA-less promoter with GC-rich regions and two transcription initiation sites (Valdez-Alarcón et al., 1996). This gene encodes for the major SPS isoform in leaves (Castleden et al., 2004). When the *sps1* promoter region from -2196 fused to the *uidA* reporter gene was used to transform rice plants, there was expression in the mesophyll of leaves, seed scutellum and pollen grains, and its expression in leaves was increased by light (Chávez-Barcenas et al., 2000). Afterwards, Martinez-Trujillo et al. (2004) generated 5' deletions in the *sps1* promoter fused to the *uidA* reporter gene and the constructs were used to bombard tobacco leaves; transient expression was determined in the -148 truncated promoter and it was similar to the expression conferred by the complete promoter. In this work, the purpose was to determine the importance of the sequences downstream -148 in the basal expression conferred by the *sps1* promoter and to define the minimal sequence that still confers this basal expression.

RESULTS AND DISCUSSION

To determine the essential sequences of the core promoter involved in expression of the *sps1* gene, twelve 5' deletions were generated from -148 to +21 (Figure 1). These deleted promoters were fused to the *uidA* gene and the expression level conferred by these regions was determined by a transient expression assay. We observed that the *sps1* promoter region directs a tissue-specific and light-regulated expression in leaves of transgenic tobacco plants; this finding was similar to that observed in rice plants (data not shown). We have previously used this system to determine the strength of the *sps1* promoter as compared with the CaMV 35S promoter (Martínez-Trujillo et al., 2004).

The bombarded tobacco leaves with the different *sps1* constructs were analyzed to determine the transient expression, visualized as blue cells due to the expression of the β -glucuronidase enzyme (Figure 2A). A construct with the 35S constitutive promoter fused to the green fluorescent protein gene, was also transferred to the tobacco leaves and the expression was visualized as green cells (Figure 2B). The ratio of blue/green fluorescent cells was determined to normalize the results. The transient expression obtained for the different *sps1* constructs are shown in Figure 3. The constructs from -148 to -1 showed

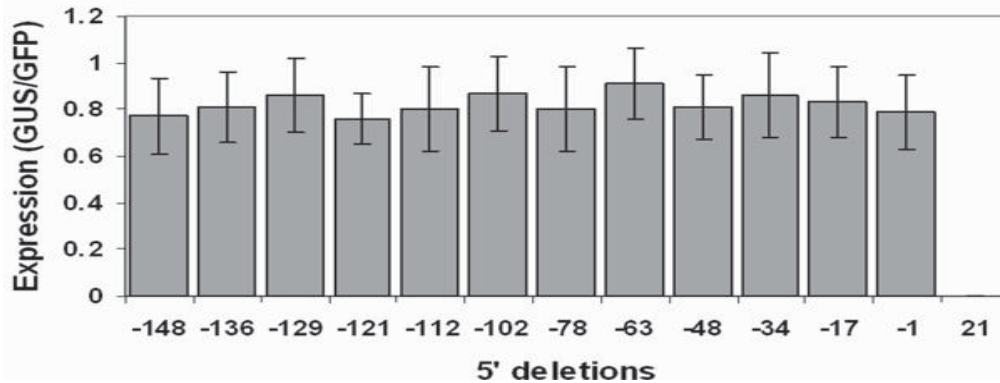


Figure 3. Level of expression conferred by the *sps1* promoter versions. Plasmids containing the *sps1* promoter deletions fused to the *uidA* gene, mixed with the plasmid containing the GFP gene fused to the 35S promoter, were delivered into tobacco leaves as described in the legend of figure 2. Ten leaf samples were bombarded with each plasmid mixture. The ratio of blue cells/fluorescent cells was determined for each *uidA* construct. The standard errors are shown as bars.

similar expression levels, but the +21 construct had no expression; two additional bombardment repetitions were made with similar results.

The elimination of the *sps1* GC-rich motifs (from -148 to -1), reported in mammals as sites for the Sp1 recognition factor, did not modify the level of expression conferred by the *sps1* promoter (Figure 3), in agreement with the finding that the Sp1 element is not associated with plant promoters (Yamamoto et al., 2007).

It has been previously demonstrated that elimination of the downstream region beyond +23 conserves the *sps1* promoter expression (Martínez-Trujillo et al., 2003), which combined with the present results, show that the minimal region of the *sps1* promoter capable to confer activity is delimited between -1 to +21 (GTGTCACCCGCCAGCCTCCCT). As two transcription initiation sites have been determined previously (Valdez-Alarcón et al., 1996) (Figure 1), the observed transient expression in the shorter construct (-1) can derive from the second site. Taking this second site as +1, the sequence would be -6 to +15 and the interactions of general transcription factors as well as further binding of the RNA polymerase II would be possible. The precise sequence or sequences responsible for the activity of the -1 to +21 *sps1* promoter construct might be considered as an initiator, since the second transcription initiation site is overlapped by pyrimidines and is a typical initiator motif (TCACCC) following the rule of a purine at +1 and a pyrimidine at -1. Another rice gene with a similar initiator (TCCAAG) is that reported for the phenylalanine ammonia-lyase enzyme (PAL) with a function in determining the precise transcription initiation site (Zhu et al., 1995).

The 22-bp sequence (-1 to +21 or -6 to +15) capable to confer basal transcription activity in the *sps1* promoter is not an isolated case, since a 15-bp sequence of the hepatitis B virus gene, without a TATA box, was reported to direct precise transcription initiation (Chen et al.,

1995). The possibility that a DPE may be involved in the basal activity of the *sps1* promoter is low, since the reported consensus sequence (g/aGt/aCGTG) (Burke and Kadonaga, 1996) is not present downstream of the second transcription initiation site.

Our results demonstrate that a 22-bp sequence is sufficient to confer basal expression by the *sps1* promoter, and that the consensus initiator sequence in this stretch possibly determines this basal activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants from the Coordinación de Investigación Científica (UMSNH) and CONACYT. We are grateful to Dr. Carlos Cervantes for revision of the manuscript.

REFERENCES

- Burke TW, Kadonaga JT (1996). *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev.* 10: 711-724.
- Burke TW, Kadonaga JT (1997). The downstream promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAF_{II}60 of *Drosophila*. *Genes Dev.* 11: 3020-3031.
- Castleden CK, Auki N, Gillespie VJ, McRae EA, Quick WP, Buchner P, Foyer CH, Furbank RT, Lunn J (2004). Evolution and function of the Sucrose-Phosphate Synthase gene families in wheat and other grasses. *Plant Physiol.* 135: 1753-1764.
- Chalkey G, Verrijzer CP (1999). DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAK₁250-TAF₁150 complex recognizes the Initiator. *EMBO J.* 18: 4835-4845.
- Chávez-Bárcenas AT, Valdez-Alarcón JJ, Martínez-Trujillo M, Chen L, Xocostle-Cázares B, Lucas WJ, Herrera-Estrella L (2000). Tissue-specific and developmental pattern of expression of the rice *sps1* gene. *Plant Physiol.* 124: 641-653.
- Chen IH, Huang CJ, Ting LP (1995). Overlapping initiator and TATA box functions in the basal core promoter of Hepatitis B Virus. *J. Virol.* 69: 3647-3657.
- FitzGerald PC, Sturgill D, Shyakhtenko A, Oliver B, Vinson Ch (2006). Comparative genomics of *Drosophila* and human core promoters. *Genome Biol.* 7: R53.

- Hernández N (1993) TBP, a universal eukaryotic transcription factor. *Genes Dev.* 7: 1291-1308.
- Huber SC, Huber JL (1996). Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 431-444.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- Kriwacki RW, Schultz SC, Steitz TA, Caradonna JP (1992) Sequence-specific recognition of DDA by zinc-finger peptides derived from the transcription factor Sp1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9759-9763.
- Liston DR, Johnson PJ (1999). Analysis of a ubiquitous promoter element in a primitive eukaryote: early evolution of the initiator element. *Mol. Cell Biol.* 19: 2380-2388.
- Martínez-Trujillo M, Chávez-Bárceñas T, Limones-Briones V, Simpson J, Herrera-Estrella L (2004). Functional analysis of the promoter of the rice sucrose phosphate synthase gene (*sps1*). *Plant Sci.* 166: 131-140.
- Martínez-Trujillo, M., Limones-Briones, V., Chávez-Bárceñas, T., Herrera-Estrella L. (2003). Functional analysis of the 5' untranslated region of the sucrose phosphate synthase rice gene (*sps1*). *Plant Sci.* 165: 9-20.
- Murashige T, Skoog K (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 15: 473-497.
- Nakamura M, Tsunoda T, Obokata J (2002). Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA-boxes: a tobacco photosystem I gene responds to light through an initiator. *Plant J.* 29: 1-10.
- Nikolov DV, Burley SK (1997). RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 15-22.
- Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 10: 2657-2683.
- Reichel C, Mathur J, Eckes P, Langenkemper K, Koncz C, Schell J, Reiss B, Maas C (1996). Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aquorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono and dicotyledonous plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5888-5893.
- Roeder RG (1991). The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem. Sci.* 16: 402-407.
- Roeder RG (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 21: 327-335.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Smale ST, Baltimore D (1989). The "initiator" as a transcriptional control element. *Cell* 57: 103-113.
- Stomp AM (1992). Histochemical localization of β -glucuronidase. In Gallagher SR (ed), *GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression*. Academic Press, San Diego CA, pp 103-113.
- Valdez-Alarcón JJ, Ferrando M, Salerno G, Jiménez-Morilla B, Herrera-Estrella L (1996). Characterization of a rice sucrose-phosphate synthase-encoding gene. *Gene* 170: 217-222.
- Yamamoto YY, Ichida H, Abe T, Susuki Y, Sugano S, Obokata J (2007) Differentiation of core promoter architecture between plants and mammals revealed by LDSS analysis. *Nucleic Ac. Res.* 35: 6219-6226.
- Zhu Q, Dabi T, Lamb C (1995). TATA box and Initiator functions in the accurate transcription of a plant minimal promoter in vitro. *Plant Cell* 7: 1681-1689.