



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

CARACTERIZACIÓN DE PROMOTORES DE GENES
 β -GLUCOSIDASA EN *Zea mays* Y SU POTENCIAL EN
LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

Presenta

Mario Rojas Arzaluz

La Paz, Baja California Sur, Noviembre de 2016.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11 horas del día 1 del Mes de Noviembre del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"CARACTERIZACIÓN DE PROMOTORES DE GENES β -GLUCOSIDASA EN *Zea mays* Y SU POTENCIAL EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS"

Presentada por el alumno:

Mario Rojas Arzaluz

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Gracia Gómez Anduro
Co-Director de Tesis


Dr. Felipe Ascencio Valle
Co-Director de Tesis


Dr. Axel Tiessen Favler
Co-Tutor


Dr. Carlos Angulo Valadez
Co-Tutor


Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Co-Tutor


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

RESUMEN

Este estudio está encaminado a entender la diversidad funcional existente en una familia de proteínas β -glucosidasas de *Zea mays*. La familia de genes que codifica para β -glucosidasa (BGLU EC 3.2.1.21) en *Zea mays* cv. B73 se compone de 26 genes parálogos de redundancia funcional desconocida. En otras especies de plantas se ha descrito que las BGLU cumplen diferentes funciones: activando reguladores de crecimiento como el jasmónico, salicílico y abscísico en respuesta a estrés biótico y abiótico; además de actuar en otras moléculas que participan directamente en la defensa contra patógenos, reciclaje de la pared celular, señalización y metabolismo secundario. En este trabajo se realizaron análisis bioinformáticos que permitieron: (1) asociar posibles funciones de los miembros ZmBGLU a partir de la homología con ortólogos de *Arabidopsis* y arroz; (2) revelar la redundancia y los patrones de expresión de estos genes así como los niveles máximos y mínimos de expresión en diferentes tejidos de la planta, al analizar la expresión durante el desarrollo vegetativo y reproductivo del *Z. mays*; (3) el análisis de regiones promotoras de 2000 pb río arriba del codón de inicio en 4 genes ZmBGLU los cuales mostraron posibles sitios de unión a factores de transcripción (TFBS), con afinidad a los siguientes factores de transcripción (TF): DOF, O2, Interlower, DRE, MYB, entre otros; asociados a la respuesta al ataque por patógenos y algunos en respuesta a estrés abiótico. A continuación se evaluó la expresión de 10 miembros ZmBGLU en plántulas de maíz B73 bajo estrés biótico (condiciones biotróficas y necrotroficas) y abiótico (salinidad, sequía y radiación UV). Los TFBS más redundantes en los promotores ZmBGLU analizados fueron AAAG, que son reconocidos por el motivo estructural de un dedo de Zinc de los TF DOF1 y 2. Como parte de la caracterización de proteínas que se unen a las regiones promotoras ZmBGLU, al analizar el genoma de maíz encontramos 45 genes que codifican para proteínas que contienen el motivo DOF, por otra parte bajo experimentos de inmuno-precipitación de la cromatina, específicos para los TF DOF1 y DOF2 mediante qPCR se confirmó la interacción con el TFBS AAAG en los promotores de genes involucrados en la síntesis de carbohidratos. Por último se implementó un protocolo de transformación transitoria en plántulas de maíz, donde se evaluó la funcionalidad de los promotores ZmBGLU2, 5, 7 y 12, mediante el uso del gen reportero udiA. Encontrando que los promotores ZmBGLU2 y 5 mantienen una expresión similar al promotor 35S CaMV, en la etapa de desarrollo estudiada y en las condiciones de co-cultivo. Bajo el mismo esquema de transformación transitoria fué posible producir el antígeno MAP85 de *Mycobacterium avium* susp paratuberculosis.

Palabras Clave: Maíz, Glucosil hidrolasas, Promotores de expresión, Familia multigénica, proteína heteróloga.
Vo. Bo.

Dra. Gracia Gómez Anduro

Co-Directora de tesis

Dr. Felipe Ascencio Valle

Co-Director de tesis

SUMMARY

This study was directed to understand functional diversity in a protein family of the β -Glucosidases in *Zea mays*. The family of genes that codify for β -glucosidase (BGLU EC 3.2.1.21) in *Zea mays* cv. B73 is composed of 26 paralogs genes of unknown functional redundancy. In other plant species, it has been described that BGLU have different functions, such as activating growth regulators as jasmonic, salicylic, and abscisic acids in response to biotic and abiotic stress besides acting in other molecules that participate directly in defense against pathogens, recycling the cellular wall, signaling, and secondary metabolism. Bioinformatic analyses were performed in this work allowing: (1) associating possible functions of ZmBGLU members starting from homology with *Arabidopsis* and rice orthologs; (2) revealing redundancy and expression patterns of these genes as well as maximum and minimum expression levels in different plant tissues by analyzing expression during vegetative and reproductive development stages of *Z. mays*; (3) analyzing promoting regions of 2000 pb above the starting codon in 4 genes of ZmBGLU, which showed the following transcription factors (TF): DOF, O2, Interlower, DRE, MYB, among others, associated to pathogen attack response and some in response to abiotic stress. After that, the expression of 10 members of ZmBGLU was assessed in B73 maize seedlings under biotic stress (biotrophic and necrotrophic conditions) and abiotic (salinity, drought and UV radiation). The most redundant TFBS in the analyzed ZmBGLU promoters were AAAG, which are known by their structural motif of a Zinc finger of TF DOF1 and 2. As part of protein characterization that joins the promoting ZmBGLU units while analyzing the maize genome, 45 genes that codify proteins were found containing the DOF motif. On the other hand, under experiments of immune-precipitation of chromatin specific for TF DOF1 and DOF2, TFBS AAAG was confirmed in the gene promoters involved in the carbohydrate synthesis by qPCR interaction. Finally, a transitory transformation protocol was implemented in maize seedlings where functionality of the ZmBGLU2, 5, 7, and 12 promoters was assessed by using the reporter gene *uidA* gene. The ZmBGLU2 and 5 promoters were found to maintain a similar expression to that of 35S CaMV promoter in the development stage studied and in the conditions of the co-cultivation. Under the same transitory transformation protocols, it was possible to produce the MAP85 antigen of *Mycobacterium avium* susp paratuberculosis.

Key words: Maize, Glycosyl hydrolases, Expression promoters, Multigenic family, Heterolog protein.

Vo. Bo.

Dra. Gracia Gómez Anduro

Co-Director de tesis

Dr. Felipe Ascencio Valle

Co-Director de tesis

DEDICATORIA

A mis abuelos que ya han partido de este mundo

A mis padres que siempre me han acompañado

Y a todas las personas que han creído en mí

¡Que marcan la luz en mi camino!

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada (**236236**) de nivel doctorado.

Al centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR), por todas las facilidades otorgadas para el desarrollo de esta investigación.

Al Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), por las facilidades otorgadas para el desarrollo de esta investigación.

A los proyectos CIBIOGEM 2014 234606 y CB-2010-01-151818, que fueron quienes soportaron el financiamiento de este trabajo.

A mi comité tutorial: Dra. Gracia Gómez Anduro, Dr. Felipe Ascencio Valle, Dr. Axel Tiessen Favier, Dr. Carlos Angulo Valadéz y Dr. Ricardo Vázquez Juárez.

A la Dirección de Estudios de Posgrado del CIBNOR y a todo el personal que en ella labora, por las facilidades prestadas.

Al M.C. Julio Hernández González, por su apoyo técnico en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas.

A la Dra. Martha Reyes Becerril, por su apoyo técnico en el Laboratorio de Patogénesis Microbiana.

Al M.C. Mario Arce Montoya y al M.C. Margarito Rodríguez Álvarez, por su apoyo técnico en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

A la M.C. Delia Rojas Posadas, por su apoyo técnico en el Laboratorio de Genética Molecular.

A Arturo Sierra Beltrán, por su apoyo técnico en el Laboratorio de Proteómica y Genotoxicidad.

A la Dra. Carmen Rodríguez Jaramillo y a Eulalia Meza Chávez, por su apoyo técnico en el Laboratorio de Histología e Histoquímica.

A la M.C. Susana Ávila Álvarez, por su apoyo técnico en el Laboratorio de Genética Acuícola

A Ariel Cruz Villacorta, por su apoyo técnico en el Laboratorio de Microscopía Electrónica.

A Manuel Moreno Legorreta, por su apoyo técnico en el Laboratorio de Microbiología Ambiental.

A Horacio Sandoval Gómez, por su apoyo técnico en el Laboratorio de Cómputo.

Al personal de los talleres de: Mantenimiento Electromecánico, Taller de Servicios, Carpintería y Apoyo técnico. Por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO.....	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Regulación de la expresión en plantas	4
2.2 Las plantas como bio-reactores para la producción de proteínas recombinantes	5
2.3 Importancia del maíz.....	6
2.3.1 Avances biotecnológicos en maíz.....	7
2.4 Uso de promotores de expresión de genes en biotecnología	10
2.5 Promotores de genes β -glucosidasa como objeto de estudio.....	11
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS	13
5.1 Objetivo general.....	13
5.2 Objetivos específicos	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS	14
6.1 Identificación y caracterización de los sitios de unión a factores de transcripción de las regiones promotoras seleccionadas mediante herramientas bioinformáticas.....	14
6.2 Evaluación de la funcionalidad y especificidad de los promotores ante diferentes estímulos.....	15
6.2.1 Diseño de oligonucleótidos, extracción de ARN, evaluación de sensibilidad y especificidad	16

6.2.2 Estimaciones semi-cuantitativas de expresión de genes β -glucosidasa en maíz.....	19
6.3 Identificación de proteínas que se unen a los promotores (2000 pb) β -glucosidasa de maíz seleccionados para este análisis.....	19
6.4 Cuantificación de los niveles de expresión de los factores de transcripción DOF1 y DOF2 bajo condiciones de fotoperiodo y etiolación.....	20
6.5 Desarrollo de anticuerpos específicos para los factores de transcripción DOF1 y DOF2.....	21
6.6 Identificación y cuantificación de los factores de transcripción DOF1 y DOF2 mediante western blot y ELISA indirecta.	21
6.7 Inmunoprecipitación de la cromatina seguida por qPCR específica de los factores de transcripción DOF1 y DOF2.....	22
6.8 Comparación y evaluación molecular de los niveles de expresión y la producción de proteínas heterólogas bajo la regulación de promotores de genes <i>ZmBGlu</i>	23
6.8.1 Evaluación de la germinación y crecimiento de plántulas de maíz en tres híbridos tropicales y la línea parental B73.....	23
6.8.2 Plásmidos utilizados y generación de los arreglos genéticos para evaluar los promotores <i>Zmbglu</i> 2, 4, 7 y 12.	24
6.8.3 Transformación transitoria de germinados de maíz mediada por <i>A. tumefaciens</i>	25
6.8.4 Diseño experimental de susceptibilidad de transformación y evaluación de los promotores <i>ZmBGlu</i> 2, 4, 7 y 12.....	26
6.8.5 Cuantificación fluorométrica de la actividad enzimática β -glucoronidasa en líneas con transformación transitoria.....	26
6.8.6 Análisis estadísticos.....	27
6.9 Producción del antígeno 85B de <i>Micobacterium avium</i> subs. <i>paratuberculosis</i> mediante método de transformación transitoria.....	27
6.10 Transformación transitoria en plántulas de maíz para la producción de una proteína heteróloga de tipo vacunal.....	28
6.10.1 Identificación y cuantificación de la proteína heteróloga en plántulas de maíz.....	28
7. RESULTADOS.....	30
7.1. Identificación de patrones de expresión de β -glucosidasas.....	30
7.2 Comparación filogenética y de motivos estructurales de β -glucosidasas.	32

7.3 Análisis de homología con miembros de β -glucosidasas de <i>Arabidopsis</i> , arroz y maíz.	33
7.4 Identificación de los factores de transcripción y los sitios de unión a factores de transcripción en los promotores de los genes ZmBGlu2, 5, 7 y 12.	36
7.5 Caracterización bioinformática de los factores de transcripción más redundantes en las regiones promotoras analizadas	38
7.6 Evaluación de expresión de genes β -glucosidasas bajo condiciones de estrés biótico y abiótico.....	44
7.6.1 Evaluación de la infección bajo estrés biótico mediante microscopía ...	44
7.6.2 Evaluación de la especificidad y sensibilidad de los oligonucleótidos. ...	45
7.6.3 Evaluación de transcritos mediante PCR semi-cuantitativo.....	46
7.6.4 Evaluación de la infección bajo estrés abiótico: exposición a rayos UV, exposición a polietilenglicol (PEG) y salinidad (NaCl).	48
7.7 Identificación y cuantificación de los factores de transcripción tipo DOF1 y 2 bajo condiciones de fotoperiodo y etiolación	49
7.7.1 Inmuno-detección por western blot y cuantificación mediante ELISA indirecto de los antígenos específicos de los factores de transcripción DOF1 y DPF2	49
7.7.2 Inmunoprecipitación de la cromatina e identificación de elementos cis con interacción a los factores de transcripción tipo DOF mediante qPCR.....	51
7.8 Comparación y evaluación molecular de los niveles de expresión y la producción de proteínas estereologías bajo la regulación de promotores de los genes ZmBGlu2, 5, 7, 12 y 35S CaMV	52
7.9 Producción del antígeno MAP85 mediante el método de transformación transitoria.	55
8. DISCUSIÓN	59
9. CONCLUSIONES	67
10. PERSPECTIVAS.....	68
11. LITERATURA CITADA.....	69
12 ANEXOS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de calor de los niveles de expresión de ZmBGlus en diferentes tejidos de maíz.	31
Figura 2. Análisis filogenético y de sitios conservados en secuencias de aminoácidos de las 25 ZmBGlus de maíz.....	33
Figura 3. Relaciones filogenéticas entre β glus de maíz, arroz y <i>Arabidopsis</i>	35
Figura 4. Secuencia consenso de factores de transcripción tipo DOF identificados en el genoma de maíz.....	38
Figura 5. Mapa de calor de los niveles de expresión de ZmDOFs en diferentes tejidos de maíz.	41
Figura 6. Análisis filogenético y de sitios conservados en secuencias de aminoácidos de 44 posibles factores de transcripción tipo DOF de maíz.	43
Figura 7. Infección de <i>Zea mays</i> B73 con <i>Fusarium proliferatum</i> y <i>Ustilago maydis</i>	44
Figura 8. Micrografía electrónica de barrido células de la hoja de maíz B73	45
Figura 9. Análisis de expresión de genes ZmBGlus 2, 7, 9, 12, 13, 16, 18, 20, 22 y 23 de maíz var. B73 bajo estrés biótico	47
Figura 10. Análisis de expresión de genes ZmBGlus 2, 7, 9, 12, 13 y 20 de maíz var. B73 bajo estrés abiótico.....	48
Figura 11. Análisis de expresión de genes DOF1 y 2 de maíz var. B73 bajo estrés abiótico.....	49
Figura 12. Inmuno-detección de los factores de transcripción DOF1 y 2 de maíz var. B73.....	50
Figura 13. Análisis de ELISA de los factores de transcripción DOF1 y 2 de maíz var. B73.....	51
Figura 14. Sucesión de estados de desarrollo de plántulas de maíz	53
Figura 16. Cuantificación de la actividad de GUS en tres híbridos de maíz co-cultivadas con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV2260 conteniendo el plásmido pCAMBIA2301	54
Figura 17. Cuantificación de la actividad de GUS con los diferentes promotores en maíz C/05.....	55
Figura 18. Construcciones generadas para la producción del antígeno MAP85..	57
Figura 19. Inmuno-análisis de plántulas de maíz con transformación transitoria para producción del antígeno MAP85 durante 4 días de muestreo	57
Figura 20. Inmuno-análisis de 5 lotes de plántulas de maíz con transformación transitoria para producción del antígeno MAP85	58

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Proteínas heterólogas de tipo vacunal desarrolladas en maíz.....	9
Tabla II. Lista de oligonucleótidos diseñados para la evaluación de la expresión de genes β -glucosidasa.	18
Tabla III. Lista de oligonucleótidos para cuantificar la expresión de los factores de transcripción DOF1 y DOF2.....	20
Tabla IV. Lista de oligonucleótidos utilizados para amplificar regiones de promotores de los genes proteína piruvato dikinasa (PPDK) y fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC).....	23
Tabla V. Lista de oligonucleótidos utilizados para amplificar las regiones promotoras de los genes ZmBGlu2, 5, 7 y 12.....	25
Tabla VI. Lista de oligonucleótidos utilizados para generar construcciones para producir el antígeno MAP85B bajo la plataforma Gateway.	28
Tabla VII. Elementos <i>cis</i> (sitios de unión a factores de transcripción) en base de datos de Maíz que fueron identificados en las regiones promotoras de 4 ZmBGlus de maíz analizados en las bases de datos TRANFAC, JASPAR y PLACE	37
Tabla VIII. Lista de genes identificados con la región conservada característica de del FT DOF en maíz, localización, número de intrones y tamaño del marco de lectura.	39

1. INTRODUCCIÓN

Los promotores son secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) que definen la región donde se iniciará la transcripción de un gen, por medio de la polimerasa II de ácido ribonucleico (ARN) (Orphanides y Reinberg, 2002). Estas secuencias se localizan típicamente río-arriba (5') del sitio de inicio de la transcripción. Estos promotores son de gran importancia en los seres vivos debido a que regulan la expresión de miles de genes contenidos en los organismos a lo largo de su ciclo de vida, donde su interacción con el medio ambiente y otros organismos, requiere de complejas redes de genes en respuesta a estímulos a diferentes niveles, ya sea celular, tisular, de órgano o individuo (Butler y Kadonaga, 2002).

Los promotores se han clasificado en base a su tipo de regulación: 1) constitutivos, aquellos que mantienen una expresión estable a lo largo del desarrollo del organismo; 2) regulación positiva aquellos que están promoviendo al expresión que está determinada por una condición durante el desarrollo de un organismo; 3) regulación negativa son promotores que afectan disminuyendo la transcripción de sus genes. De acuerdo a su regulación espacial o temporal también pueden clasificarse como de expresión específica de órgano, tejido o células (Maniatis *et al.*, 1987).

Haciendo uso de estas condiciones mediante ingeniería genética, se han utilizado las regiones promotoras para dirigir la expresión de una gran variedad de genes en sistemas procariontes y eucariontes. Con diferentes usos biotecnológicos haciendo uso de las plantas como plataformas de producción de proteína para diferentes aplicaciones biotecnológicas (Liu *et al.*, 2013).

En el uso de plantas como bio-reactores para la producción de proteínas heterólogas los promotores juegan un papel crucial en el control y eficiencia de la expresión mediante estímulos específicos (Müller y Wassener, 2004; Gurr y Rushton, 2005; Koyama *et al.*, 2005). El promotor del gen la subunidad ribosómica

35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (por sus siglas en inglés: 35S CaMV) ha sido uno de los más utilizados en las construcciones para la transformación de plantas y producción de proteínas recombinantes (Guilley *et al.*, 1982; Odell *et al.*, 1985). A pesar de que los recientes estudios científicos demuestran la seguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) (Giller, 2016), la tendencia es el uso de elementos cisgénicos para la modificación genética de organismos. Con evitamos la generación de organismos transgénicos y obstáculos durante el proceso de análisis de riesgo, generando plataformas que no involucren la introducción de elementos genéticos ajenos al organismo portador. Es necesario además, generación de materiales y/o elementos libres de patente diferentes a los comercialmente disponibles (por ejemplo: 35S CaMV Pat. 5097025 A; Benfei y Chua, 1989; Ubi-1 Pat. EP 2797406 A1, Kumar S. *et al.*, 2014). De ahí la importancia de realizar estudios encaminados al análisis y evaluación de elementos genéticos propios de los cultivos que son los más explotados en el mundo, como en el caso del maíz. Diversas especies de plantas han sido utilizadas para la producción de proteínas heterólogas, algunas plantas modelo como, tabaco para la producción de proteínas de interés biotecnológico (Komarnytsky *et al.*, 2000); *Arabidopsis* para la generación de líneas mutantes y conocer la funcionalidad de genes mediante genética funcional reversa (Krystan *et al.*, 1999; Sessions *et al.*, 2002), así como una gran cantidad de trabajos mediante genética funcional dirigida. Algunas otras por su importancia en la agricultura con diferentes usos biotecnológicos como: la alfalfa, donde se han producido vacunas contra la Influenza, rabia, rotavirus (www.medicago.com 2016), la papa para la generación de cultivos tolerantes a la sequía (Zhang *et al.*, 2011a) y a altas temperaturas (Kim *et al.*, 2010). Y algunos cereales como el arroz para producir una mayor cantidad de β -caroteno (Ye *et al.*, 1999); maíz, con alteraciones para la biosíntesis de lignina y para facilitar la producción de bio-etanol (Fornalé *et al.*, 2012). Para la producción de vacunas orales (Lampher *et al.*, 2004), para la producción de toxinas contra plagas (Koziel *et al.* 1993), entre otros.

Los nuevos enfoques de investigación permiten hacer uso de sistemas de expresión inducibles de la transcripción, ofreciendo la posibilidad de regular los niveles de expresión espacial y temporalmente (Borghini, 2010). Se ha optado además por el uso de secuencias promotoras cisgenicas, evitando la introgresión genética artificial de otras especies ajenas a la hospedera, como sería el caso del promotor 35S CaMV (Hou *et al.*, 2014).

En este sentido, se hace necesaria la caracterización de nuevos promotores específicos a determinados estímulos que puedan ser utilizados como plataforma biotecnológica para la producción de proteínas heterólogas de interés biotecnológico. Siendo el objetivo general del presente proyecto: caracterizar funcionalmente las regiones promotoras de genes modulados por estrés y evaluar su potencial para la producción de transcritos heterólogos. Lo anterior, utilizando las regiones promotoras de algunas β -glucosidasas de *Zea mays* var. B73 para ser utilizadas como mediadores para la producción de proteínas recombinantes.

2. ANTECEDENTES

2.1 Regulación de la expresión en plantas

Las plantas crecen y se reproducen bajo constantes cambios del medio ambiente en donde existen varios factores de estrés (Lata *et al.*, 2011), por lo que las plantas responden realizando cambios a nivel fisiológico, celular y molecular (Akhtar *et al.*, 2012; Kizis *et al.*, 2001). A lo largo del desarrollo de una planta se necesita de la sincronización de la expresión de determinados grupos de genes (Aceituno *et al.*, 2008). Las evidencias demuestran que la regulación de genes opera principalmente a nivel de la transcripción y determina cuales genes específico de tejidos o en respuesta a un estímulo, opera principalmente a nivel de la transcripción y determina cuales genes pueden ser transcritos a ARN (Latchman *et al.*, 2010). Esta regulación se desarrolla en dos niveles, el primer nivel de control corresponde a la cantidad de ARN mensajero que se produce de un gen en particular; el segundo nivel de control es a través de eventos pos-transcripcionales que regulan la traducción de ARN a proteínas (Phillips, 2008). En relación al primer punto, se han descrito dos factores primordiales implicados en determinar la cantidad de transcritos, uno de ellos es conocido como control epigenético. El control epigenético involucra a los organismos eucariontes, incluyendo las plantas, ya que el genoma es compactado dentro de la cromatina, la cual forma una barrera física para la transcripción de genes. Estos mecanismos que alteran la estructura de la cromatina juegan un papel esencial en la regulación de los genes (Lauria y Rossi, 2011), así como la metilación del ADN por las ADN metiltransferasas, y la interacción con ARNs pequeños (Kinoshita y Jacobsen, 2012). El segundo mecanismo se refiere a la interacción entre elementos *trans* (factores de transcripción) y secuencias de elementos *cis* regulatorios (promotores de expresión), presentes en promotores de plantas que juegan un papel muy importante en la regulación de la expresión de genes (Chang *et al.*, 2008). Un promotor típico eucarionte contiene: un promotor mínimo con: una región TATA para la unión de la ARN polimerasa II, proteínas de unión-TATA (por sus siglas en

inglés TPB) y factores asociados a TBP (por sus siglas en inglés TAFs). Además de factores de transcripción específicos del estado de desarrollo o específicos de tejido que se unan a los elementos *cis* de esta región mínima (Xie *et al.*, 2001).

2.2 Las plantas como bio-reactores para la producción de proteínas recombinantes

A partir de la primera planta genéticamente modificada se han logrado obtener avances en ingeniería genética que han resultado en la modificación genética para el mejoramiento de cultivos (Herrera-Estrella *et al.*, 1983). Entre las mejoras que se han realizado están: resistencia a enfermedades, tolerancia a insectos y el mejoramiento en los valores nutricionales (Vain, 2007). Otras modificaciones se han realizado con enfoque a tecnologías encaminadas a procesos industriales como la producción de biocombustibles (Sticklen, 2010), o la producción de proteínas utilizadas como vacunas contra diferentes enfermedades (Pniewski, 2013; Tiwari *et al.*, 2009; Sala *et al.*, 2003). Para el 2011 el número de artículos que reportan el aprovechamiento de plantas como productoras de vacunas fue de 835 Elsevier, 841 Springerlink, 808 en Wiley y 303 en Web of Science (Guan *et al.*, 2013). En estos trabajos se utilizan dos grandes plataformas para la expresión de proteínas heterólogas: 1) transformación y expresión de cloroplastos, que ha demostrado bajos costos de producción y rendimientos hasta del 70% de proteína total soluble (Lossl y Waheed, 2011); 2) transformaciones nucleares, que son en las que se basan la mayoría de las plataformas biotecnológicas. Aunado a ello, el uso de técnicas de cruzamiento pueden aumentar los rendimientos de producción hasta en 70 veces más que los progenitores (Hood *et al.*, 2002). Se puede hablar de una tercera plataforma conocida como transformación transitoria, que permite la expresión de genes y la producción de proteínas en una escala de tiempo de días, lo que posibilita el análisis y la producción de complejos moleculares de nueva generación (Sainsbury y Lomonosoff, 2014), con las ventajas de un sistema procarionte, sin embargo, se requiere de nuevos promotores inducibles

que aumenten la expresión de los genes y de las proteínas de interés. Por ello, el siguiente paso es evaluar si la expresión transitoria de los genes en sistema de maíz produce la cantidad y calidad de genes de interés, lo que permitirá aumentar la eficiencia de la expresión y el rendimiento de las proteínas heterólogas deseadas. Mediante el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva, la cantidad de información generada por instituciones internacionales que mantienen los proyectos de secuenciación de diversos genomas (ejem: The million micro-ecosystem Genomes Project, Genome 10K project, entre otros), representa un amplio número de datos disponibles para su análisis experimental. De ahí la importancia de implementar metodologías eficientes y de corto tiempo para su análisis en laboratorio.

2.3 Importancia del maíz

El maíz es uno de los cereales más cultivados en el mundo. La FAO (FAOSTAT, 2015) reporta una producción de más de mil millones de toneladas en el mundo, donde México contribuyó con más de 22 millones de toneladas en el 2013. El Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), refiere que el maíz es uno de los cereales que contribuyen de un 55 a un 70 por ciento de las calorías en la dieta de las personas que se encuentran en países en vías de desarrollo (<http://www.cimmyt.org/food-security/>). El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) reportó para el 2015 una producción superior a 478 millones de toneladas, donde el 39.1% se destinó para consumo, 30.3% para la producción de biocombustible (etanol), el 8% para su consumo como granos secos destilados (DDGs), 10.1% para otros usos en la industria y 12.5% para exportación (<http://www.worldofcorn.com/pdf/WOC-2016.pdf>). El maíz también es considerado de importancia científica como modelo para estudios de domesticación (Vigouroux *et al.*, 2008), así como en biología del desarrollo, citogenética, genética y mejoramiento (Wusirika, 2016).

2.3.1 Avances biotecnológicos en maíz

Desde su domesticación, el maíz ha estado sujeto a selección genética, destacando atributos deseados para su cultivo y consumo hasta obtener las diferentes variedades que conocemos en nuestros días. Se han logrado obtener cultivos con mayor rendimiento en la producción de granos (Chen *et al.*, 2013) y forraje (Iptas y Acar, 2006), entre otras. Sin embargo, ha sido necesaria la incorporación de nuevas metodologías (como la de ADN recombinante) para desarrollar variedades con características deseadas que beneficien el desarrollo de las plantas. Los intentos de transformación genética de maíz iniciaron desde el año 1966, Coe y Sarkar intentaron transformar meristemos apicales de plántulas de maíz usando ADN de alta calidad, sin éxito. Posteriormente, De Cleene (1985), demostró la transformación de plantas monocotiledónias mediante el uso de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, sin éxito en la transformación en plantas de maíz. Un año después Froom *et al.* (1986) publicó resultados favorables para la transformación estable de protoplastos de maíz mediante electroporación para la introducción del gen *npt-II*. Dos años después, Klein *et al.* (1988) lograron la transformación de células de maíz mediante el uso de microproyectiles pero sin la posibilidad de regenerar una planta a partir de estas células. En el mismo año Rhodes *et al.* (1988) realizaron ensayos de transformación por electroporación en cultivos de células embriogénicas a partir de la línea parental A188 y lograron regenerar plantas de maíz, sin embargo, reportaron infertilidad en las plantas probablemente asociada a las características de la línea celular. Posteriormente, se realizaron eventos de transformación mediante el uso de microproyectiles en cultivos celulares a partir de híbridos (A188) y líneas parentales Elite (como B73 y B84), logrando desarrollar plantas transgénicas fértiles (Gordon-Kamm *et al.*, 1990). En 1996 Ishida *et al.* desarrollaron un protocolo de transformación mediado por *A. tumefaciens* en la línea parental A188 y otras 5 líneas. A partir de estos avances biotecnológicos es como se han logrado desarrollar variedades tolerantes a sequía (Gilbert 2010; Nuccio *et al.*, 2015; Pat. WO2012085806 A1), plagas (Koziel *et al.*, 1993, Pat. US5350689; Mettler *et al.*, 1998, Pat. US5484956; Mettler

et al., 1997), entre otras. Además de su cultivo como alimento el maíz también es cultivado con otros fines, para la producción de biocombustibles (Torney *et al.*, 2007; Barrière *et al.*, 2016), remediación (Malekzadeh *et al.*, 2012; Khan y Bano, 2016) y en la industria farmacéutica (Datta *et al.*, 2015); dentro de esta rama muchas investigaciones se han enfocado en el desarrollo de vacunas como lo que se muestra en la Tabla I.

Tabla I. Proteínas heterólogas de tipo vacunal desarrolladas en maíz.

Enfermedad o patógeno	Antígeno	Plataforma de transformación	Promotor	Cita
<i>E. coli</i> enterotoxigenica	Subunidad B de la enterotoxina termolábil de <i>E. coli</i> (LT-B)	Callos embriogénicos mediante bombardeo de microproyectiles	Promotor de 27kDa γ -zein, para expresión en el endospermo	Chikwamba <i>et al.</i> , 2002
Virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV)	Proteína S	Transformación de embriones mediada por <i>A. tumefaciens</i>	2x 35S CaMV	Lamphear <i>et al.</i> , 2004
Virus del Newcastle	Gen de fusión (gen F)	Transformación mediante bombardeo de callos embriogénicos	Promotor de Ubiquitina	Guerrero-Andrade <i>et al.</i> , 2006
Tuberculosis	Ag85B	Transformación de embriones inmaduros mediada por <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Promotor de la glubulina-1	Pat. CN 101845456 (Lijun, 2010)
Virus de la Hepatitis B	Antígeno de la superficie (HbsAg)	Transformación de embriones inmaduros mediado por <i>A. tumefaciens</i>	Poliubiquitina	Hayden <i>et al.</i> , 2011
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Exotoxina Apx fusionada a CTB	Transformación de embriones mediada por <i>A. tumefaciens</i>	2x 35S CaMV	Shin <i>et al.</i> , 2011
Enfermedad de manos, pies y boca	Proteína estructural VP1 (serotipos viz., O- y Asia tipo-1)	Transformación de callos tipo II mediante bombardeo	Promotor de la Ubiquitina	Zhang <i>et al.</i> , 2011b
Virus de la Hepatitis B	Antígeno de la superficie (HBsAg)	Transformación de embriones inmaduros mediado por <i>A. tumefaciens</i>	3-kb del promotor de la glubulina1	Hayden <i>et al.</i> , 2012
Virus del síndrome de la respiración y reproducción porcina (PRRSV)	Proteína M	Transformación mediante bombardeo de callos	Promotor de Ubiquitina	Hu <i>et al.</i> , 2012
Virus de la Rabia	Glicoproteína del virus de la rabia (proteína G)	Biolística	Ubiquitina	Loza-Rubio <i>et al.</i> , 2012
Virus del dengue	Gen codifica el dominio EIII (scEIII)	Transformación de embriones inmaduros mediado por <i>A. tumefaciens</i>	2X 35S CaMV	Kim <i>et al.</i> , 2014
Virus de la influenza A	Nucleoproteína H3N2	Transformación de Embriones inmaduros mediada por <i>A. tumefaciens</i>	Promotor de 27kDa γ -zein, para expresión en el endospermo	Nahampun <i>et al.</i> , 2015

2.4 Uso de promotores de expresión de genes en biotecnología

Múltiples variantes del promotor 35S CaMV son usadas para dirigir la expresión de genes en plantas genéticamente modificadas tanto para investigación como en aplicaciones comerciales (Podevin y du Jardin, 2012). El 35SCaMV es un promotor constitutivo fuerte, para la expresión en dicotiledóneas, aunque puede ser débilmente activo en células monocotiledóneas (Jang *et al.*, 2002). A pesar de sus amplios usos, éste promotor también representa algunas desventajas, como la inducción del silenciamiento génico (Daxinger *et al.*, 2008, Mlotshwa *et al.*, 2010). Las diversas críticas sobre la introducción de elementos genéticos extraños al fondo genético de una planta conocidos como transgénicos (Schouten *et al.*, 2006), así como las reglamentaciones y regulaciones en materia de OGM, obstaculizan el desarrollo de estas plataformas. A pesar de los resultados obtenidos en el meta-análisis realizado por las academias de ciencias, medicina y física de USA donde no se encontraron evidencias fehacientes sobre los posibles efectos adversos por el consumo de Alimentos transgénicos (Giller, 2016), en últimos años los trabajos de investigación se enfocan en el desarrollo de tecnologías que no impliquen la introducción de material genético extraño en los cultivos de interés. Como ejemplo tenemos los cisgénicos, donde el material genético introducido procede de un organismo con compatibilidad de cruzamiento, o los intragénicos donde el material genético ingenierizado es del mismo cultivo de interés (Holme *et al.*, 2013). Es por ello que la evaluación e identificación de promotores endógenos de plantas, inducibles y específicos de tejido pueden proporcionar alternativas en la producción de proteínas heterólogas. Utilizando organismos modelo como *A. thaliana*, se han logrado avances en la comprensión de la formación de patrones a nivel genético, molecular y celular (Ng y Yanofsky, 2001), por lo que ahora se sabe que las plantas pueden expresar de 25,000 a 50,000 genes, dependiendo del género y la especie. De ese total de genes, cerca del 30 al 35% pueden ser expresados en toda la planta (constitutivos) mientras que el resto puede ser específico de órganos o de eventos (inducibles) (Nath *et al.*, 2006). Muchos sistemas para inducir la expresión de transgenes han sido

descritos recientemente, en sistemas como tabaco, arroz, *Arabidopsis* y maíz, lo que ofrece la posibilidad de regular los niveles de expresión génica en etapas particulares del desarrollo de la planta así como también en los tejidos deseados. Los sistemas inducibles promueven la expresión mediante cambios locales en los niveles de expresión de genes sin causar alteraciones graves en el desarrollo y crecimiento de la planta (Borghini, 2010). Además, permiten comprender la regulación de la expresión génica, lo cual puede servir como elemento esencial en la anotación de genes (Shahmuradov *et al.*, 2003). Aunque existen promotores de plantas usados para la generación de plantas transgénicas, éstos son limitados generalmente por la baja expresión de proteína heteróloga que producen y por las patentes que las protegen. En el portal de WEB OF SCIENCE de Thomson Reuters, en el Derwent Innovation Index, al generar una búsqueda con la palabra “gene promoter in plant” se identifican 4414 resultados, destacan los cesionarios: PIONNER HI-BRED INT INC con el 6.094 %, MONSANTO TECHNOLOGY LLC con 4.288%, DU PONT DE MEMOURS & Co E I con 3.784%, SYNGENTA PARTICIPATIONS AG 2.039%, UNIV.CALIFORNIA 1.744%, BASF OLANT SCI GMBH con 1.405%, ZENECA LTD con 1.337% y BAYER BIOSCIENCE NV con 1.269% de patentes (31 de Mayo 2016). Por lo que aún existe la necesidad, de nuevas secuencias de plantas que funcionen como elementos promotores para altos niveles de expresión de transgénicos (Xiao *et al.*, 2005), además de existir la necesidad de caracterizar nuevos elementos genéticos de cultivos de interés agrícola para ser usados bajo plataformas de cisgénesis e intragénesis sin protección de patente.

2.5 Promotores de genes β -glucosidasa como objeto de estudio

Las β -glucosidasas (BGLU, EC 3.2.1.21) pertenecen a las Glicosil Hidrolasas 1 (por sus siglas en inglés GH1), esta es una familia con un gran número de miembros. Se han descrito para diferentes especies de plantas, por mencionar algunas: arroz con 34 miembros, *Brachypodium* 31, sorgo 28, maíz 26 (Gómez-

Anduro *et al.* 2011, Zhao *et al.*, 2012) y *Arabidopsis* 48 miembros, (Xu *et al.*, 2004). Por otra parte, existen familias de genes multigénicas que han mostrado evidencia de mantener expresión tanto espacial, como temporalmente condicionadas, como lo es el caso de la familia de las β -glucosidasas en maíz (Gómez-Anduro *et al.*, 2011), cuyas regiones promotoras poseen sitios predichos bioinformáticamente para la unión de factores de transcripción de respuesta a factores bióticos y abióticos. Gu *et al.* (2006) obtuvieron resultados que demuestran que el promotor del gen que codifica para la proteína BGLU1 de maíz (ZmGlu1) se encuentra regulado por estrés abiótico y su expresión se da principalmente en raíz. Trabajos más recientes (Zhao *et al.*, 2011) evidencian la presencia de una proteína desconocida que se une a la región promotora de ZmGlu1 y reprime la expresión de β -glucosidasa en semillas. Esto da pauta al estudio de los promotores de β -glucosidasas de *Z. mays* lo que contribuirá a la caracterización de nuevos promotores estímulo-específicos que puedan ser utilizados como plataforma biotecnológica para la producción de proteínas heterólogas.

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de promotores representa uno de los componentes principales y más importantes en la expresión de genes heterólogos, su estudio nos permite conocer a detalle los elementos regulatorios que rigen la expresión de los genes en las plantas. Con base en lo anterior, se propone realizar la caracterización y evaluación de promotores de genes β -glucosidasa de maíz como reguladores de la expresión de cisgénicos y poder generar una plataforma de producción de proteínas heterólogas de bajo costo y rápido desarrollo, con las ventajas de un sistema transitorio. Debido a que las plantas son una alternativa factible para la síntesis de proteínas con alta complejidad, permiten la evaluación de genes para la producción de proteínas con distintas finalidades como la producción de

vacunas a partir de proteínas recombinantes, producción de metabolitos, etc. Uniendo todo esto, proponemos que es posible obtener plántulas con expresión transitoria de proteínas de interés reguladas por promotores de genes β -glucosidasa y de esta manera contribuir en los procedimientos de evaluación de genes o producción de proteínas de interés biotecnológico.

4. HIPÓTESIS

Si la presencia de pequeñas variaciones en los sitios de unión a factores de transcripción en la secuencias de las regiones promotoras de los genes de β -glucosidasas de *Zea mays* regulan la expresión de sus genes espacial y temporalmente, entonces, dichos promotores podrán ser utilizados para la expresión controlada, estable y/o transitoria de proteínas heterólogas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar funcionalmente las regiones promotoras de cinco BGLU de *Z. mays* y evaluar su potencial para la producción de vacunas de subunidades proteicas recombinantes en plantas.

5.2 Objetivos específicos

- Identificar y caracterizar mediante herramientas bioinformáticas los sitios de unión de los factores de transcripción de las regiones promotoras seleccionadas.
- Evaluar la funcionalidad y especificidad de los promotores ante diferentes estímulos.

- Identificar y caracterizar las proteínas que se unen a los promotores (2000 pb) seleccionados.
- Comparar y evaluar molecularmente los niveles de expresión y la producción de proteínas heterólogas bajo la regulación de promotores de genes ZmBGlu.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Identificación y caracterización de los sitios de unión a factores de transcripción de las regiones promotoras seleccionadas mediante herramientas bioinformáticas.

Se realizó una la búsqueda de información sobre la regulación de la expresión de genes β -glucosidasa en la base de datos en línea de universidad de Toronto llamada BAR (Sekhon *et al.*, 2011) (por sus siglas en ingles Bio-Analytical Resource for Plant Biology) eFP Browser ([http://bar.utoronto.ca/efp_maize/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Sekhon et al Atlas](http://bar.utoronto.ca/efp_maize/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Sekhon+et+al+Atlas)) para cada uno de los ID de genes reportados por Gomez-Anduro *et al.* (2009). Se seleccionaron 4 promotores que aumentaran su expresión en etapas tempranos de desarrollo, se ubicaron y descargaron las secuencias de las regiones promotoras 2000 pares de bases (pb) rio arriba del codón de inicio de la transcripción incluyendo la región 5' UTR, del portal de genomas comparativo del Departamento de Energía de los Estados Unidos del Joint Genome Institute (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), posteriormente a estas secuencias se les realizó un análisis para ubicar los sitios de unión a factores de transcripción, así como los factores de transcripción que interactúan con estas secuencias, dentro de la plataforma en línea PlantPAN 2.0 (<http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/>), (Chow *et al.*, 2015) haciendo uso de los datos referenciados para maíz en los servidores de JASPAR, TRANSFAC, PLACE y PlantTFDB. Una vez identificadas las coordenadas de los sitios de unión se generaron diagramas mediante la paquetería de MATLAB 7.11.0 (R2010b) para

localizar cada uno los sitios dentro de la secuencia promotora e identificar posibles islas de regulación.

Una vez identificados los sitios de unión dentro de la región promotora se seleccionaron los factores de transcripción más redundantes dentro los promotores analizados, se descargó el genoma del maíz B73 de la base de datos maizeGDB <http://www.maizegdb.org/> (por sus siglas en inglés Maize Genetics and Genomics Database). Se realizó la búsqueda de los miembros de la familia de factores de transcripción mediante el uso de BLAST usando como plantilla una secuencia consenso generada a partir de otras especies de plantas, y se describió cada uno.

6.2 Evaluación de la funcionalidad y especificidad de los promotores ante diferentes estímulos.

Se analizaron las relaciones filogenéticas para asignar posible funcionalidad de los genes β -glucosidasa de maíz utilizando las secuencias de proteínas β -glucosidasa de *A. thaliana* (una planta dicotiledónea) descritas por Xu *et al.* (2004), de *O. sativa* (una planta monocotiledónea) descritas por Opassiri *et al.* (2006) y se compararon con las de *Z. mays* descritas por Gomez-Anduro *et al.* (2011). Este análisis se realizó usando el software MEGA versión 5.2 (Tamura *et al.*, 2011). El alineamiento de secuencias fue realizado con MUSCLE y se usó el método de neighbor-joining para la construcción del árbol filogenético

Para evaluar los niveles de expresión de diferentes β -glucosidasa bajo diferentes factores bióticos o abióticos, se utilizaron semillas de maíz B73 que fueron desinfectadas con etanol e hipoclorito, y germinadas en lotes de 6 semillas dentro de cajas de policarbonato 3 x 3 x 4" (MAGENTA™ vessel) con papel filtro húmedo estéril. Para los experimentos de estrés biótico se realizó una infección con hongo de hábitos biotróficos y otro con necrotrofos. Para el primero, se infectaron plántulas de 7 días de edad con *Ustilago maydis* cepas SLP1 y SLP2

proporcionado por el Laboratorio de Biología Molecular de Microorganismos Benéficos de Plantas y Biotecnología Molecular de Plantas del Instituto Potosino de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (IPICyT en SLP). Los experimentos de infección con hongo necrotrófico se desarrollaron en plántula de 7 días de edad infectadas con *Fusarium proliferatum* (Medina-Cordova *et al.*, 2016) proporcionadas por el laboratorio de Inmunología y Vacunología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Las infecciones se realizaron mediante punción e inyección de cada hongo por triplicado de cajas MAGENTA™ y se incubaron por 4 días. Adicionalmente, se realizó un tratamiento de daño mecánico mediante punción de las hojas para emular las condiciones de herbivoría. Se cosecharon hoja y raíz por separado tomando muestras para análisis histológicos, el resto se congeló en nitrógeno líquido hasta su posterior uso. Por otra parte, los experimentos de estrés abiótico se desarrollaron en plántulas de 8 días de edad donde se desarrollaron condiciones de estrés osmótico mediante la adición de PEG-6000 al 20% (Zhang *et al.*, 2014), estrés salino con NaCl 200 mM (Zhao *et al.*, 2014) y estrés por rayos UV (Javadmanesh *et al.*, 2012) mediante la exposición al día 5, 6, 7, 8 de edad con exposiciones de 10, 20, 30 y 40 min en luz UV-B al noveno día de edad las plántulas fueron colectadas y congeladas en nitrógeno líquido hasta su extracción de ARN.

6.2.1 Diseño de oligonucleótidos, extracción de ARN, evaluación de sensibilidad y especificidad

Mediante el programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) se realizó el diseño de oligonucleótidos basados en las secuencias codificantes de los 25 genes de β -glucosidasa de maíz, diseñados para distinguir diferencias en una base (Tabla II). Se extrajo ARN total usando Trizol® (Life technologies Cat: 15596026; Carlsbad, CA USA) usando las especificaciones de la casa comercial. Se obtuvo ADN complementario (ADNc), mediante el Kit Improm II™ (Promega Cat: A3803; Madison WI USA) como lo establece el protocolo del producto, a partir de 1 μ g de ARN total tratado con DNasa I (Invitrogen: cat: 18068-015; Carlsbad,

CA, USA) para eliminar ADN genómico. Se evaluó la especificidad de los oligonucleótidos bajo gradientes de temperatura 50°-65° C, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) haciendo uso del Kit GoTaq Flexi (Promega; Cat: M8295; Madison WI USA); y una mezcla de ADNc de todos los tratamientos. Posteriormente, cada amplicon fue clonado en vector PCR2.1 TOPO® TA cloning® (Life technologies; cat: K4500.01; Carlsbad, CA, USA), estos productos fueron secuenciados a GENEWIZ Inc. y analizados para corroborar su identidad en la base de datos de PHYTOZOME. Por último, se estimó el número de ciclos para obtener una amplificación en fase exponencial.

Tabla II. Lista de oligonucleótidos diseñados para la evaluación de la expresión de genes β -glucosidasa.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Amp (pb)
Bglu1F	CCTTAGGAGCCACCTAGTAG	89
Bglu1R	ACCTTCGCTTGCTGCTC	
Bglu2F	TACTGCCTAAGGGAACGGTC	145
Bglu2R	TTCTCTTCTAGTGCTTGAGGG	
Bglu3F	ACTCGTCGCTACTGCCAC	328
Bglu3R	CGCTATCCAATCTGGGAAAG	
Bglu4F	AAGGATAAGCAGTCAGCTGC	256
Bglu4R	CAATCTGACATCCGACGG	
Bglu5F	GGACAACCTTCGAGTGGTGC	180
Bglu5R	TAATAAGCCGACGGCGG	
Bglu6F	AAAATGCGCTAACCCAACC	138
Bglu6R	GCAATCCCTATCTGTGCG	
Bglu7F	CGTTTCGGAACTACAAGAA	234
Bglu7R	CCCGTCCGCTATCAAAGA	
Bglu8F	GATTCGTACCATATGTACCCTGA	427
Bglu8R	ATCCCGTTGGAGTGATTATC	
Bglu9F	CATATGGGAAATGTGATTC	149
Bglu9R	TAGATGTAATGAAATTCCTACA	
Bglu10F	GTGACTATCCGGCCAGC	201
Bglu10R	TACCGGAAAGATTAGCTAAAGAATC	
Bglu11F	TGGTCGTCCCTGGCACC	115
Bglu11R	GAAATCCTGCCTGGTGAATTGA	
Bglu12F	GGAACAAAAAATGTACAGTG	324
Bglu12R	GGCTTCAGATTGAACTTTAC	
Bglu13F	GCGTCACCTGCACCCAC	313
Bglu13R	GAGTCTCGGGCCGTCAGC	
Bglu14F	TACTACTTTCTCCTCCTCTTGG	183
Bglu14R	CTTCCGTCCTCTGCAACTG	
Bglu15F	AGAGGAGAAGGAGAAGGCT	182
Bglu15R	CGTTGTTTGCGATCTCG	
Bglu16F	CCTGGGACATGGAACCTG	196
Bglu16R	CGTTTTTCAGCAAGGATCATTG	
Bglu17F	GCGGGGGAAGGACCTAAC	160
Bglu17R	TTCTGGGGTGTGCACG	
Bglu18F	AGAAGCTGGTCCAGCTGGC	277
Bglu18R	CCGATGTAGCTCCTGTAGAACC	
Bglu19F	CCTGTGATGCTCATCGGA	246
Bglu19R	CCGGACGAACGTGTTCC	
Bglu20F	TCGAAATTAGAGGATGATCTGC	212
Bglu20R	GGTATCCGTGTCAAATTGTTG	
Bglu21F	CCCTTCGACAAGAACGGG	185
Bglu21R	AGGGCGTTCTGGAGGGAG	
Bglu22F	TTGAGCTCATGCACTCTC	180
Bglu22R	ATGTCGTAGTGGGACAGC	
Bglu23F	AAGGGAACGCCTTCGTCTC	165
Bglu23R	CGTTCTCAGTAATATACACAGGC	
Bglu24F	CTCATGCAAAGACGAACAAC	358
Bglu24R	GCTTCAGATGTGTAGGGGTC	
Bglu25F	CAAATAGCCAATATTAGCACTACAAC	270
Bglu25R	TTCATAGCCTTTGATAAACTTGCTAT	

6.2.2 Estimaciones semi-cuantitativas de expresión de genes β -glucosidasa en maíz

Las evaluaciones se realizaron en placas de 96 pozos para PCR en un termociclador Bio Rad. Las mezclas de reacción se realizaron siguiendo las indicaciones del kit GoTaq Flexi. Se realizaron mezclas reacción de 12.5 μ L conteniendo 1 μ L del producto de la síntesis de DNAc, 1X Green buffer, $MgCl_2$ 2.5 mM, dNTPs 0.16 mM, oligonucleótido forward 0.8 μ M, oligonucleótido reverse 0.8 μ M, DMSO 4%, ADN polimerasa 1.25 u. Se usaron las temperaturas optimas de amplificación para cada juego de oligonucleótidos como se describe a continuación: desnaturalización inicial de 95° C/3 min, 29 ciclos de 95° C/30 seg., para EF1 α , β Glu2, BGlu7, BGlu18, BGlu23 57°C; BGlu16, BGlu22 55 °C; BGlu13, BGlu20 59°C; BGlu9, BGlu12 51°C/30 s, y una extensión final de 72°C/20 s.

6.3 Identificación de proteínas que se unen a los promotores (2000 pb) β -glucosidasa de maíz seleccionados para este análisis

Para evaluar los niveles expresión de los factores de transcripción tipo DOF que tienen afinidad por los promotores de genes β -glucosidasa, se desinfectaron semillas de maíz de la línea parental B73 en condiciones de esterilidad mediante el lavado con etanol 75% seguido de un lavado con una solución de hipoclorito comercial 10%, Triton X-100 0.05%, y seis lavados con agua destilada estéril, se hidrataron en oscuridad por 24 h a 4 °C. Posteriormente, dentro de cajas MAGENTA tres lotes de 10 semillas se llevaron a cámara bioclimatica a 28° C, con fotoperiodos largos (8 h luz/16 h oscuridad) y otro grupo de tres lotes se crecieron bajo condiciones de oscuridad total. Ambos grupos se desarrollaron por 7 días. De 5 plantas se tomaron muestras de hoja y raíz se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior uso, el resto de las plantas se disectaron hoja y raíz, y estas fueron utilizadas para el ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina.

6.4 Cuantificación de los niveles de expresión de los factores de transcripción DOF1 y DOF2 bajo condiciones de fotoperiodo y etiolación

200 mg de cada muestra se utilizaron para la extracción de ARN total, los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y se molieron en mortero; la extracción se realizó mediante el uso de Trizol[®]. El ARN fue cuantificado en NanoDrop 1000 (Thermo scientific Wilmington, DE, USA) y purificado con DNase I. La síntesis de ADNc se realizó con el Kit IMPROM II. Posteriormente, se realizó la cuantificación en tipo real por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés qPCR) haciendo uso de SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad; cat: 172-5200; Hercules, CA, USA). La reacción de qPCR se realizó en un termociclador Rotor-Gene 6200-HRM (Corbett research; Mortlake, NSW Australia), con una incubación inicial de 95 °C/2 min, seguida de 40 ciclos de 94 °C/10 seg., 60 °C/10 seg. y 72 °C/15 seg.; la fluorescencia se leyó al final de cada ciclo a los 72 °C. Se realizó curva de disociación para identificar amplificaciones únicas; las reacciones se realizaron por duplicado y los resultados se normalizaron con el factor de elongación 1- α . Los productos fueron clonados en vector PCR 2.1 TOPO TA cloning (Life technologies; cat: K4500.01; Carlsbad, CA, USA) y fueron secuenciados en GENEWIZ Inc. para corroborar su identidad. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo las especificaciones del kit o reactivo en uso, los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes DOF y el gen de referencia EF1 α (Ling *et al.*, 2014), se enlistan en la tabla III.

Tabla III. Lista de oligonucleótidos para cuantificar la expresión de los factores de transcripción DOF1 y DOF2.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Amp (pb)
qPCR-DOF1 F	GTCTACTACGGTGCCCGAGA	118
qPCR-DOF1 R	CCAGTAGGACCCCAGATCG	
qPCR-DOF2 F	AGCAGCTCCTCATCATCCTC	82
qPCR-DOF2 R	AGTTCTTCGACCGCTTCGT	
ZmEF1 α F	TGGGCCTACTGGTCTTACTACTGA	135
ZmEF1 α R	ACATACCCACGCTTCAGATCCT	

6.5 Desarrollo de Anticuerpos específicos para los factores de transcripción DOF1 y DOF2.

A partir de la base de datos de NCBI fueron descargadas las secuencias de DOF1 (ID: X66076) y DOF2 (ID: X79934) reportadas por Yanagisawa *et al.* (1997), se identificaron epítomos específicos para cada secuencia, los anticuerpos se desarrollaron en conejo por la empresa Gene Script (<http://www.genscript.com/>).

6.6 Identificación y cuantificación de los factores de transcripción DOF1 y DOF2 mediante western blot y ELISA indirecta.

A partir de 250 mg de tejido fresco se realizaron extracciones de proteína como lo describe Wu *et al.* (2014), con mínimas modificación que a continuación se describen: dos lavados con ácido tricloroacético (TCA)/acetona al tejido pulverizado, posteriormente las muestras se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente (TA) en un agitador de balancín 2D, y al final el extracto proteico se solubilizó en buffer de salino de fosfatos (PBS) conteniendo inhibidor de proteasas 1X (Sigma; cat: S8820; Saint Louis, MO, USA); se realizó cuantificación de proteína usando el Kit BCA (Thermo scientific; cat: 23225; Rockford, IL, USA). 20 µg de proteína se utilizaron para electroforesis desnaturizante en gel de acrilamida (SDS-PAGE), las proteínas se transfirieron a membrana de fluoróforo de polivinilideno (PVDF) usando un sistema semi-seco. Una dilución 1:500 de un stock con 150 µg de anticuerpo específico para cada factor de transcripción (DOF1 y DOF2) fue utilizada para la detección. Las membranas se incubaron por 1 h a 37 °C, posteriormente una dilución 1:1000 de anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa se utilizó para incubar las membranas por 1 h a 37 °C. Para visualizar las bandas se utilizaron 10 mL de buffer acetato de sodio 50 mM/ 0.03% 3,3'-diaminobenncidina/ 0.03% peróxido de hidrógeno; al final la reacción se bloqueó con metabisulfito de sodio 1M. 50 µg de proteína fue utilizada para realizar el ensayo de ELISA utilizando una dilución 1:1000 de anticuerpo específico para DOF1 y DOF2 respectivamente, posteriormente se hibridó por 1.5 h a 37°C, el anticuerpo secundario con una dilución 1:5000 por 1.5 h a 37 °C utilizando buffer

de citrato/fosfato pH5.4/ 0.32mM de 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina/ 0.03% peróxido de hidrógeno. La reacción fue bloqueada mediante la adición de ácido sulfúrico 2M; finalmente la absorbancia se midió en espectrofotómetro a una longitud de 250 nm.

6.7 Inmunoprecipitación de la cromatina seguida por qPCR específica de los factores de transcripción DOF1 y DOF2.

Para evidenciar la afinidad de los factores de transcripción DOF1 y DOF2, hacia el ADN de regiones promotoras de genes blanco, se realizaron ensayos de ChIP utilizando el método descrito para *A. thaliana* por Yamaguchi *et al.* (2014), con algunas modificaciones que a continuación se describen: los tejidos colectados se fijaron con formaldehído al 1% por 15 min. Se utilizó coctel de inhibidores de proteasas 1X (Sigma; cat: S8820; Saint Louis, MO, USA) en los buffers recomendados, el pre-aclareo se realizó agregando 5 µL de suero de conejo pre-inmunizado y 50 µL de Dynabeads proteína A (Dynabeads® Protein A; cat: 10002D; AS, Norway) incubando a 4 °C por 2 h en un mezclador. Posteriormente, la solución pre-aclareada fue separada, y se continuo con el protocolo descrito. Por otra parte, se utilizaron 5 µg de anticuerpo específico de cada factor de transcripción DOF1 y DOF2 en experimentos separados.

1 µL de producto purificado de la inmunoprecipitación fue utilizado para realizar qPCR utilizando SsoFast EvaGreen Supermix. La reacción de qPCR se realizó en un termociclador Rotor-Gene 6200-HRM, con una incubación inicial de 95 °C/2 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C/20 seg., 63 °C/20 seg. y 72 °C/20 seg.; la fluorescencia se leyó al final de cada ciclo a los 72 °C. Se realizó curva de disociación para identificar amplificaciones únicas; las reacciones se realizaron por duplicado y los resultados se normalizaron con el factor de elongación 1- α . Los productos fueron clonados en vector PCR 2.1 TOPO TA cloning (Life technologies; cat: K4500.01; Carlsbad, CA, USA) y fueron secuenciados en GENEWIZ Inc. para corroborar su identidad. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo las

especificaciones del kit o reactivo en uso, los oligonucleótidos utilizados se enlistan en la tabla IV.

Tabla IV. Lista de oligonucleótidos utilizados para amplificar regiones de promotores de los genes proteína fosfoenolpiruvato dikinasa (PPDK) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC).

Nombre	Secuencia (5´-3´)	Amp (pb)
PPDK-1275Fw	ATG AGT TGA ACC CCA TGG AG	80
PPDK-1195Rv	ATC TAC GTC AGG CCT TCC AC	
PPDK-1588Fw	TGT GAA GTG TCT TTG CGA GGA	111
PPDK-1474Rv	GCA AAC TTT ATG GCA TTC TTA GGC	
PEPC-1087Fw	CAC GAC AAT GCA ACG TCA CA	84
PEPC-1003Rv	CCA TTG CAT CAC CGG GGT AT	
PEPC-1804Fw	GAA ATT CGA ACA CAG CCC ACA	103
PEPC-1701Rv	TCA AGG GAC CTC TAC GAA GG	
PEPC-2343Fw	ACT TCA CGT GTA TCT CGA AGG T	119
PEPC-2462Rv	TGA GTG GCA ACT TGA AGG AAA A	

6.8 Comparación y evaluación molecular de los niveles de expresión y la producción de proteínas heterólogas bajo la regulación de promotores de genes *ZmBGlu*.

Se desarrollaron construcciones genéticas utilizando los promotores de *ZmBGlu2*, 5, 12 y 24 para conocer la eficiencia en la expresión del gen reportero *UdiA* que codifica para la proteína β -glucoronidasa en estadios tempranos de desarrollo de plántulas de maíz, mediante un método de transformación transitoria como se describe a continuación.

6.8.1 Evaluación de la germinación y crecimiento de plántulas de maíz en tres híbridos tropicales y la línea parental B73.

En este experimento se trabajó con los siguientes híbridos: DEKALB 2038, NOVASEM NS9617, Zarco C/05 y la línea parental B73, que fueron proporcionadas por el laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Metabolismo del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV). Las semillas fueron desinfectadas, mediante un lavado como se describe en los experimentos anteriores, posteriormente las semillas

fueron germinadas en 3 grupos de 8 semillas en cajas MAGENTA de 6 cm x 6 cm x 10 cm conteniendo papel filtro húmedo. La germinación se realizó en cámara bioclimática con 16 h luz/8 h oscuridad a 25 °C con una intensidad lumínica de 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La germinación fue considerada al observar la ruptura de la epidermis, y esta fue evaluada por 6 días a partir de la hidratación. De esta manera el porcentaje de germinación fue evaluado estableciendo una escala para describir cuatro estados de desarrollo como se describe a continuación: 1. Ruptura de la epidermis por parte de la radícula, 2. Emergencia del brote apical, 3. Emergencia de la raíz secundaria y reverdecimiento de los coleóptilos y 4. Despliegue de la primera hoja.

6.8.2 Plásmidos utilizados y generación de los arreglos genéticos para evaluar los promotores *ZmBglu2*, 4, 7 y 12.

El plásmido pCAMBIA 2301 que contiene el gen reportero *UdiA* y el intrón de la ubiquitina de maíz que se encuentra dirigido por el promotor 35S CaMV, fue utilizado para establecer las condiciones de transformación en las plántulas de maíz. Para evaluar la eficiencia de los promotores de β -glucosidasa de maíz, a partir de ADN genómico de maíz B73 fueron amplificados con oligonucleótidos específicos (Tabla V) para generar productos de aproximadamente 2000 pb río arriba del codón de inicio de la transcripción de los genes GRMZM2G008247 (*ZmBGlU2*), GRMZM2G077015 (*ZmBGlU5*), GRMZM2G426467 (*ZmBGlU7*), GRMZM2G069024 (*ZmBGlU12*) y el promotor 35S CaMV a partir del vector binario pBI121. Las amplificaciones se realizaron con 12.5 μL de reacción con la polimerasa Phusion High-Fidelity DNA polimerase (Phusion® Master Mix; cat: F-531S; Waltham, MA, USA) con las siguientes condiciones de amplificación: 98 °C/ 30 seg.; seguido de 35 ciclos a 98 °C/30 seg., 62 °C/10 seg. y 72 °C/ 1min.; con una extensión final de 72 °C/5 min. Los productos fueron visualizados en gel agarosa al 1%, usando GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium; cat: 41002; Ayward, CA, USA). Los productos de PCR fueron purificados, clonados y secuenciados en vector pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit (Life technologies; cat: K2500-20;

Carlsbad, CA, USA), a continuación estas secuencias fueron recombinadas mediante tecnología Gateway, en el vector pKGWFS7 (Karimi *et al.*, 2002), estas construcciones fueron clonadas y replicadas en *E. coli* TOP10, y por último se purificaron estas construcciones y se clonaron en *A. tumefaciens* cepa GV2260 mediante electroporación.

Tabla V. Lista de oligonucleótidos utilizados para amplificar las regiones promotoras (≈ 2000 pb río arriba del codón de inicio) de los genes ZmBGlu2, 5, 7 y 12

Nombre	Secuencia (5'-3')	Ampl. (pb)
PromZmBGlu2-2000F	TAC CAC AAG ATT TAT AAG GTT CGT	
PromZmBGlu2-2000R	TTC CCC CCC TGC TAG CTA G	2000
PromZmBglu5-2065F	TTT GGC TCT GCA AGG TGG ACG G	
PromZmBglu5-2065R	TAT TTC TTG CGA GCT AGC TAG CGG	2065
PromZmBglu7-2000F	CCA TAG CAT CAT TGT GAG GGT AAT	
PromZmBglu7-2000R	GCC CGC AAG AAA CTT TTG CGA A	2000
PromZmBglu12-2000F	GGC GGC GCT GTC TTC TTG TCA	
PromZmBglu12-2000R	GTC TAT CCT GAA CGC TCT GCC A	2000

6.8.3 Transformación transitoria de germinados de maíz mediada por *A. tumefaciens*.

Colonias de *A. tumefaciens* cepa GV2260 desarmada o portando el vector pCAMBIA 2301, pKGWFS7 con cada uno de los promotores fueron crecidas por 16 h a 28 °C, en medio de extracto de carne y levadura (YEB: 5g/L extracto de carne, 1g/L extracto de levadura, 5g/L peptona, 5g/L sacarosa y 0.5 g/L de NaCl₂) suplementado con antibióticos (100 µg/mL carbenicilina/ 50 µg/mL de rifampicina para la cepa desarmada; 100 µg/mL carbenicilina, 50 µg/mL de rifampicina, 100 µg/mL de Kanamicina para la cepa portadora de del vector pCAMBIA 2301; 100 µg/mL carbenicilina, 50 µg/mL de rifampicina, 100 µg/mL de espectinomicina para cepa portadora del vector pKGWFS7). A continuación, 2 mL de este cultivo inicial se inoculo en 10 mL de medio YEB para alcanzar una densidad óptica (OD) a 600 nm igual a 0.3, estas fueron cultivadas en las mismas condiciones hasta obtener una OD₆₀₀ no mayor a 1.5. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a

6000 \times g por 5 min. y lavadas con 10 mL de solución de lavado (10 mM MgCl₂, y 10 μ M acetosiringona). El paquete celular fue resuspendido en 1 mL de solución de lavado, posteriormente las células fueron llevadas a una OD_{600 nm} =0.5 en medio de co-cultivo (0.25% medio Murashige y Skoog (MS) pH 6.0, 1% sacarosa, 100 μ M acetosiringona y 0.005% Silwet L-77). Plantas de 4 días de edad fueron co-cultivadas por 4 días a 28 °C bajo condiciones de obscuridad.

6.8.4 Diseño experimental de susceptibilidad de transformación y evaluación de los promotores ZmBGlu2, 4, 7 y 12.

Se evaluó la susceptibilidad de transformación con *A. tumefaciens* cepa GV2260 portadora del vector pCAMBIA 2301 en tres híbridos de maíz DEKALB 2038, NOVASEM NS9617, Zarco C/05. Las semillas fueron desinfectadas y depositadas en 3 grupos de 8 semillas por caja MAGENTA de cada variedad, y un tratamiento con la bacteria desarmada fue tomado como control. En el siguiente experimento se evaluó la expresión del gen reportero en la variedad C/05, que fue el más susceptible de transformación, co-cultivando por separado las cepas de *A. tumefaciens* que acarreaban los vectores: ZmBGlu2::GFP-GUS, ZmBGlu5::GFP-GUS, ZmBGlu7::GFP-GUS, ZmBGlu12::GFP-GUS, 35S CaMV::GFP-GUS y pCAMBIA2301 como control positivo y la cepa GV2260 desarmada como control negativo, una vez desarrollado el procedimiento de transformación transitoria, se disectaron hojas y raíces de las plántulas de maíz, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

6.8.5 Cuantificación fluorométrica de la actividad enzimática β -glucoronidasa en líneas con transformación transitoria.

Extracciones de proteína fueron realizadas a partir de 200 mg de tejido pulverizado en nitrógeno líquido se desarrolló el método de extracción descrito por Wright *et al.* (1998), posteriormente se realizó cuantificación de proteínas, mediante curva patrón con BSA, bajo el método de Bradford (1976). La actividad enzimática se midió en un espectrofluorómetro de microplaca (BioTek® Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Reader Winooski, VT, USA). La longitud de onda de

excitación fue de 365 nm y 455 nm la longitud de emisión, cada ensayo se realizó por triplicado. La concentración de la actividad fue determinada mediante curva patrón de 4-methylumbelliferone como lo describe Kim *et al.* (2006).

6.8.6 Análisis estadísticos.

Todos los análisis se realizaron usando SigmaPlot V11 software (SPSS, Chicago, IL, USA), los resultados de los experimentos fueron analizados por ANADEVa de una vía y posteriormente prueba *post-hoc* de Tukey HSD con un nivel de significancia $P < 0.05$. Las comparaciones entre hoja y raíz se realizaron con mediante prueba T-student con un nivel de significancia $P < 0.05$. Cuando los datos no aprobaron las pruebas de normalidad, se realizó comparación de rangos mediante prueba de Kruskal-Wallis (Kruskal y Wallis, 1952) o de Mann-Whitney (Mann y Whitney, 1947).

6.9 Producción del antígeno 85B de *Micobacterium avium* subs. *paratuberculosis* mediante método de transformación transitoria.

Para producir el antígeno MAP85B, a partir de ADN genómico de *Micobacterium avium* susp. *paratuberculosis*, se utilizaron oligonucleótidos específicos para el marco de lectura y oligonucleótidos específicos para y amplificar el promotor 35S CaMV a partir del vector pCAMBIA 2301 (Tabla VI). Dichos oligonucleótidos se sintetizaron unidos a sitios attR para su posterior recombinación. Las amplificaciones se realizaron con 12.5 μ L de reacción con Phusion[®] Master Mix (Thermo scientific; cat:F-531S; Walthman, MA, USA) con las siguientes condiciones de amplificación: 98 °C/ 30 seg.; seguido de 35 ciclos a 98 °C/30 seg., 60 y 58 °C respectivamente/10 seg. y 72 °C/ 1min. y extensión final de 72 °C/5 min. Los productos fueron visualizados en gel agarosa al 1%, usando GelRed Nucleic Acid Stain, purificados, clonados y secuenciados en vector pDONR221 y pDONR P4P1r del kit MultiSite Gateway[®] ThreeFragment Vector Construction Kit. A continuación estas secuencias fueron recombinadas mediante tecnología Gateway, en el vector pK7M24GW,3 (Karimi *et al.*, 2007), estas construcciones

fueron clonadas y replicadas en *E. coli* TOP10, posteriormente y por último se purificaron estas construcciones y clonaron en *A. tumefaciens* cepa GV2260 mediante electroporación.

Tabla VI. Lista de oligonucleótidos utilizados para generar construcciones para producir el antígeno MAP85B bajo la plataforma Gateway. La secuencia subrayada corresponde a la secuencia de recombinación.

Nombre	Secuencia (5´-3´)	Ampl (pb)
GwORFMAP85BF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGA <u>CAGATCTGAG CGAGAAGGTC</u>	993
GwORFMAP85BR	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCC <u>GCCGCCGCCCGGGGACGCGCC</u>	
GwP35SCaMVF	GGGGACAAGTTTGTATAGAAAAGTTGCATGGAG <u>TCAAAGATTCAAATAGAG</u>	346
GwP35SCaMVR	GGGGACTGCTTTTTTGTACAACTTGAGTCCCCC <u>GTGTTCTCTCC</u>	

6.10 Transformación transitoria en plántulas de maíz para la producción de una proteína heteróloga de tipo vacunal.

Una colonia de *A. tumefaciens* GV2260 portadora el plásmido pK7m24GW,3 35SCaMV::MAP85 fue usada para desarrollar el método de transformación transitoria optimizado para híbrido tropical, descrito por Rojas *et al.* (2015) en semillas C/05 (Zarco semillas), para este experimento. Para determinar el tiempo óptimo de cosecha se colectaron muestras los días 4, 6, 8 y 10 post inoculación de la bacteria, las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido, y posteriormente liofilizadas, molidas en un molino criogénico y almacenado a -20 ° C hasta su posterior uso.

6.10.1 Identificación y cuantificación de la proteína heteróloga en plántulas de maíz.

Para la identificación por western blot, partiendo de 20 mg de tejido fresco se realizaron extracciones de proteína como lo describe Wu *et al.* (2014), con mínimas modificación que a continuación se describen: dos lavados con TCA/acetona se realizaron al tejido pulverizado, posteriormente fue incubada por 1 h a TA en un agitador de balancín 2D, y al final de la extracción el extracto

proteico fue solubilizado en PBS conteniendo inhibidor de proteasas 1X (Sigma), se realizó cuantificación de proteína usando el Kit BCA (PIERCE), 20 µg de proteína se utilizaron para SDS-PAGE, se transfirió en PVDF usando un sistema semi-seco de transferencia. Se utilizó una dilución 1:500 de anticuerpo específico (Anti-MAP85B) para la detección de la proteína recombinante y se incubó por 1 h a 37 °C. Posteriormente, se utilizó una dilución 1:1000 de anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa para incubar la membrana por 1 h a 37 °C. Para visualizar la banda se utilizaron 50 µg de proteína, 10 mL de buffer acetato de sodio 50 mM/0.03% 3,3'-diaminobencidina y 0.03% peróxido de hidrogeno, al final la reacción se bloqueó con metabisulfito de sodio 1M.

Para realizar el ensayo de ELISA se utilizaron 20 mg de material liofilizado y pulverizado que se resuspendió en 300 µl de buffer de extracción (25 mM buffer de fosfatos pH 6.6; 0.5% triton X-100; 1X cocktail de inhibidores de proteasas). Las muestras fueron incubadas por 30 min a 4 °C en agitación de vórtice, posteriormente centrifugadas a 12,000 Xg por 15 min a 4 °C, para posteriormente recuperar el sobrenadante (Chikwamba *et al.*, 2002). Se realizó cuantificación con el kit BCA (PIERCE). 50 µg de proteína, se incubaron por 16 h a 4°C, se bloqueó con durante 2 h a TA con leche descremada al 5% en buffer PBS. Se utilizó una dilución 1:1000 de Anti-MAP85B y se hibridó por 1.5 h a 37°C, el anticuerpo secundario a una dilución 1:5000 por 1.5 h a 37 °C, entre paso de incubación se realizaron 3 lavados con 20-PBS. Se utilizó buffer citrato/fosfato pH5.4/ 0.32mM de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina/ 0.03% peróxido de hidrogeno. La reacción se bloqueó con ácido sulfúrico 2M, la absorbancia fue estimada a una longitud de 450 nm.

7. RESULTADOS

7.1. Identificación de patrones de expresión de β -glucosidasas

Conociendo los números de acceso de los posibles genes que codifican para β -glucosidasas en *Z. mays*, se identificaron los patrones de expresión de estos genes en el portal eFP (Winter *et al.*, 2007) de la Universidad de Toronto. Los resultados obtenidos para cada una de las β -glucosidasas se muestran en la figura 1, en donde en color rojo se encuentran representados las regiones o estadios de desarrollo con mayores niveles de expresión y en tonos más claros los que presentan menores niveles de expresión. Mediante esta búsqueda pudimos observar cómo está siendo regulada la expresión de cada gen, de manera general se observa que la β -glucosidasa 18 mantiene una expresión constitutiva en todos los tejidos durante todo el desarrollo de la planta, se identificó ZmBGlu1 y 18 como los miembros con mayor expresión, ZmBGlu18 mantiene una expresión de carácter constitutiva, y ZmBGlu1 disminuye sus niveles de expresión en algunas hojas, algunos miembros comparten patrones similares como en el caso de ZmBGlu14 y 24, ZmBGlu16 y 15, ZmBglu9 y 25, ZmBGlu5 y 6. Durante la maduración del endospermo todas las β -glucosidasas inician con una mayor expresión y esta disminuye al paso del tiempo hasta los 24 días posteriores a la anthesis a excepción de ZmBGlu16, 21 y 22 que la aumenta; todas presentan expresión durante el desarrollo del embrión, en el resto de la planta las β -glucosidasas mantienen expresiones variables durante el desarrollo vegetativo. ZmBGlu2 mantiene una expresión alta en raíz, coleóptilo y parte a área durante los primeros estados de desarrollo, ZmBGlu5 mantiene una mayor expresión en las hojas pero no en coleóptilo y raíz durante los primeros nueve días posteriores a la siembra, ZmBGlu7 presenta una mayor expresión en raíz y coleóptilo pero no en hoja, y ZmBGlu12 una expresión similar a la de ZmBglu5.

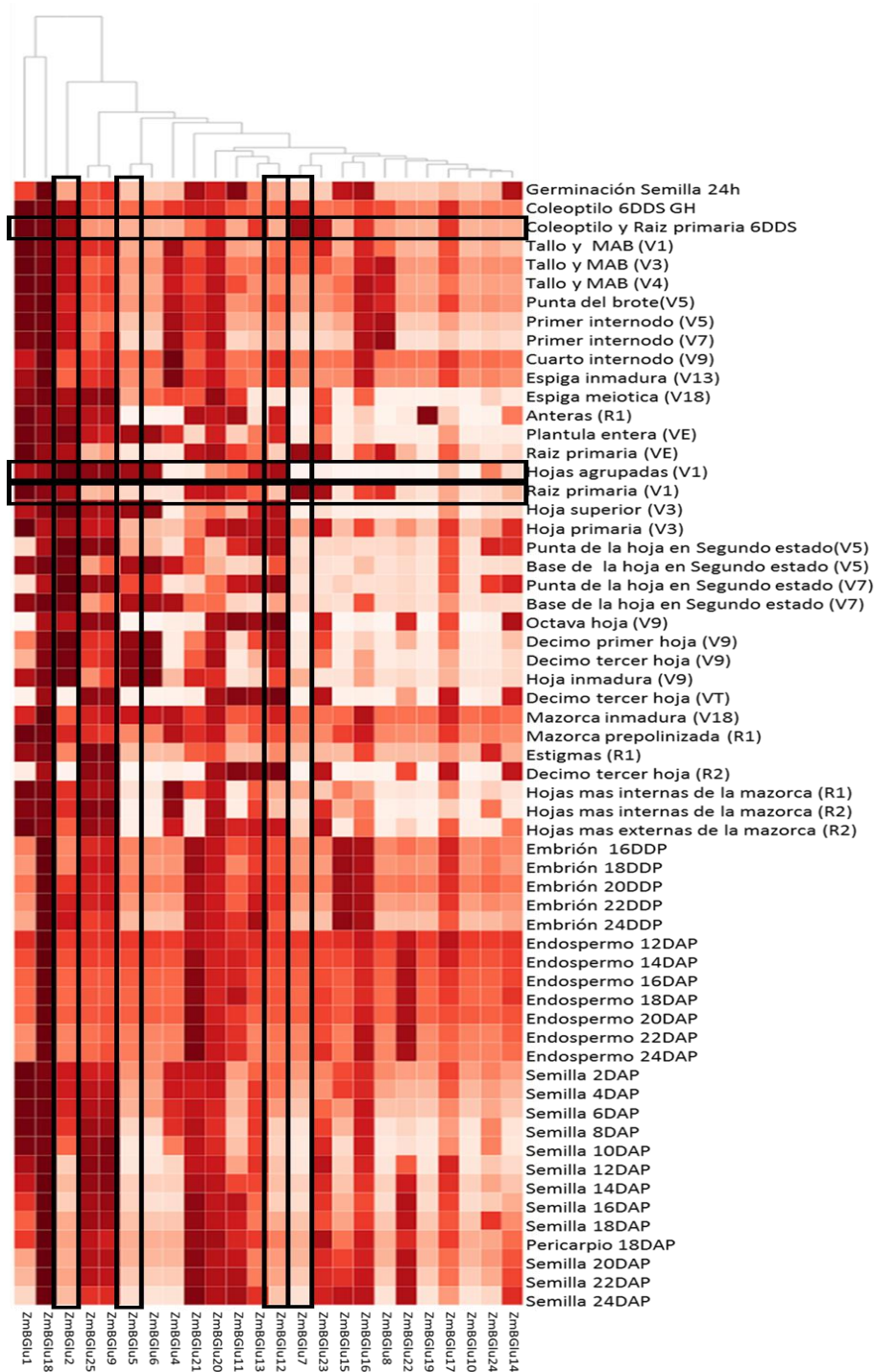


Figura 1. Mapa de calor de los niveles de expresión de ZmBGlu en diferentes tejidos de maíz. Los datos de expresión corresponden al atlas de genes de maíz de la Universidad de Toronto (Sekhon *et al.*, 2011). En tonos claros se muestran los valores con menor expresión y los tonos oscuros con mayor nivel de expresión.

7.2 Comparación filogenética y de motivos estructurales de β -glucosidasas.

Con la finalidad de conocer más acerca de las relaciones evolutivas entre las β -glucosidasas de maíz, se construyó un árbol filogenético con los miembros pertenecientes a este grupo en maíz. Este árbol filogenético se apoya de un análisis comparativo de secuencias de aminoácidos deducidas de la totalidad de las proteínas β -glucosidasa mediante el software MEME (Fig. 2), donde se lograron identificar tres motivos conservados (1, 2, 6, 12) en las 25 β -glucosidasas. El motivo 4 es conservado en todos los miembros a excepción de la ZmBGlu9 y 25; el motivo 5 no se presenta en las Zmbglu9 y 10; el motivo 7 está ausente en las ZmBlu13, 21 y 25; el motivo 8 no fue identificado en ZmBglu9 y 10; el motivo 9 se presentó solamente en 8 de los 9 miembros del grupo I; el motivo 10 no se identificó en las ZmBGlu9, 10, 11 y 12; el motivo 11 no se localizó en las ZmBGlu9, 10, 18 y 21; el motivo 13 no comparte con los miembros del grupo I y las ZmBGlu9 y 10; el motivo 14 solamente está ausente las ZmBGlu8 y 21; el motivo 15 solamente se presenta en los grupos III y en las ZmBGlu22, 24 y 25 del grupo IV; el motivo 16 solo se ubica en el grupo I a excepción de ZmBGlu7, 8 y 10, el motivo 17 solamente se encuentra en el grupo I y reemplaza al motivo 15 que se localiza en otros grupos; el motivo 18 solo se presenta en el grupo a excepción de la ZmBGlu8 y 10; el motivo 19 también solo se encuentra en el grupo I a excepción de la ZmBGlu8, 7 y 10; por último el motivo 20 también es característico del grupo I, sin embargo la ZmBGlu10 carece de este motivo.

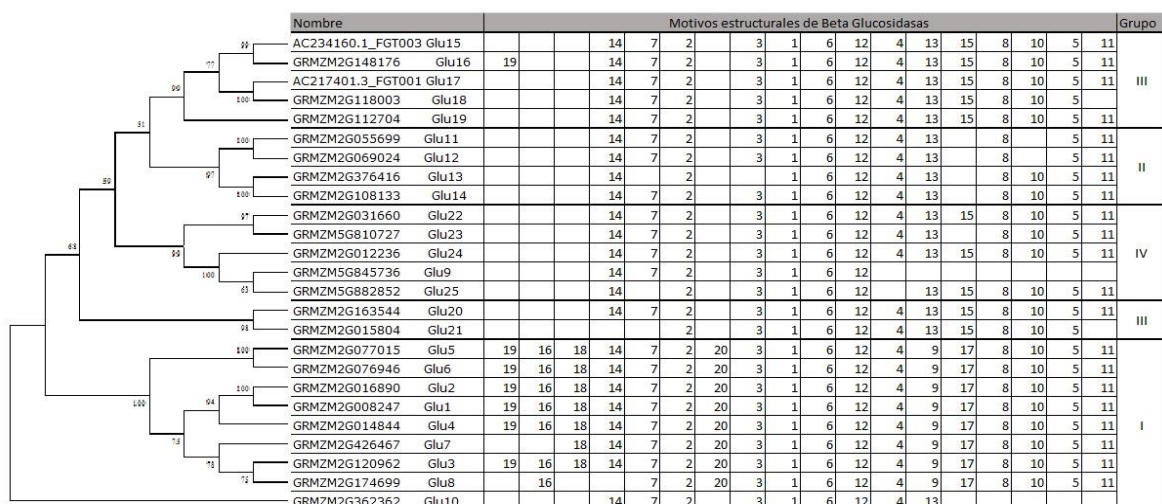


Figura 2. Análisis filogenético y de sitios conservados en secuencias de aminoácidos de las 25 ZmBGlus de maíz. Los sitios conservados que se comparten entre si se muestran con números arábigos y en números romanos los grupos a los que pertenecen. El alineamiento se realizó con MUSCLE y árbol se construyó utilizando el método de neighbor joining

7.3 Análisis de homología con miembros de β -glucosidasas de *Arabidopsis*, arroz y maíz.

Los resultados de homología de 25 β -glucosidasas de maíz, en relación con 47 miembros de *Arabidopsis* y 38 secuencias de arroz, presentó 10 grandes grupos separándose de manera independiente 4 miembros de arroz OsBglu15, 35, 36 y 37 (Fig. 3). El **grupo I** está integrado por los miembros β -glucosidasa 4, 6, 13, 24, 25 y 34 de arroz y 40, 41, 42 y 47 de *Arabidopsis* donde algunas de estas enzimas están involucradas en hidrólisis de disacáridos, remodelación de la pared celular, lignificación y en respuesta por ataque de patógenos y daño mecánico, dentro de este grupo las β -glucosidasas 20 y 21 de maíz fueron agrupadas. El **grupo II** está conformado por las β -glucosidasas 5, 9, 10 y 11 de arroz, 12, 13, 14, 15, 37, 38 y 39 de *Arabidopsis*, donde algunas de ellas están involucradas en respuestas de defensa y algunas otras con actividad mirosinasa, donde también se agrupó la β -glucosidasa 10 de maíz. Dentro del **grupo III** se encuentran las β -glucosidasas 1, 12, 26, 27, 28, 29 y 30 de Arroz, 17, 26, 27, 33, 43 y 44 de *Arabidopsis* donde

algunos de estos miembros se encuentran implicados en la remodelación de la pared celular, daño mecánico, mecanismos de resistencia y pre-invasión, hidrolisis de ácido abscísico glucosilado y con actividad mirosinasa, mismas que se agruparon con las β -glucosidasas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15 y 16 de maíz. En el **grupo IV** se ubicaron exclusivamente las β -glucosidasas 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 32, de *Arabidopsis* donde algunas de ellas participan en respuesta a estrés biótico y abiótico así como la liberación de glucosinolatos. El **grupo V** está conformado por β -Glucosidasas 2, 3, 19, 20, 21, 22 y 23 de arroz, la 11 de *Arabidopsis*, mismas que no se les ha adjudicado alguna función, dentro de este grupo las β -glucosidasa 11 y 12 de maíz fueron agrupadas. Dentro del **grupo VI** se localizaron los miembros β -glucosidasa 31 con actividad transglucosidasa, 32 y 33 de arroz y se agruparon con las β -glucosidasas de 11 y 12 de maíz. El **grupo VII** se está conformado por β -glucosidasa 17 y la 7, 34, 35 y 36 de *Arabidopsis*, se sabe que algunas de estas participan en el proceso de lignificación y presentan actividad mirosinasa. El **grupo VIII** está conformado por las β -glucosidasa 8 y 38 de arroz con actividad manosidasa y se agrupan con la 19 de maíz. El **grupo IX** se encuentran las β -Glucosidasa 7, 16, 17 y 18 de arroz y algunos de estos miembros se encuentran involucrados en la lignificación, estas secuencias mantienen relación con las β -glucosidasas 17, 18, 22, y 23 de maíz. Finalmente el **grupo X** está integrado por β -glucosidasas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 45 de *Arabidopsis* donde algunas de ellas se encuentran participando en lignificación y/o presentan actividad parecida a Glusiltransferasa.

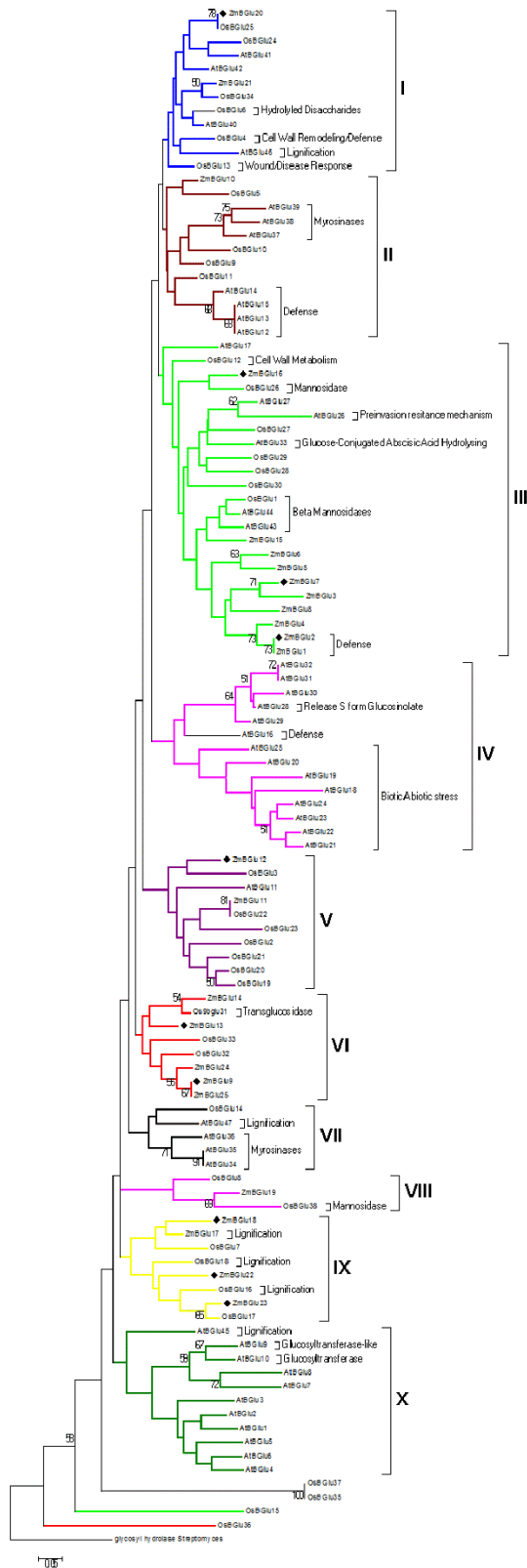


Figura 3. Relaciones filogenéticas entre Bglus de maíz, arroz y *Arabidopsis*. Las secuencias fueron alineadas con MUSCLE y el árbol se construyó usando el método de neighbor joining y 1000 repeticiones; cada grupo se identifica por ramas de diferente color.

7.4 Identificación de los factores de transcripción y los sitios de unión a factores de transcripción en los promotores de los genes ZmBGlu2, 5, 7 y 12.

Se analizaron 2000 pb río arriba a partir del codón de inicio de los genes ZmBGlu2, ZmBGlu5, ZmBGlu7 y ZmBGlu12 para la identificación de los sitios de unión a factores de transcripción así como también de las proteínas que tienen afinidad por esos elementos *cis* logrando identificar 105 sitios de unión a factores de transcripción (TFBS por sus siglas en inglés) para el promotor ZmBGlu2; 115 en el promotor ZmBGlu5; 106 para ZmBGlu7 y 103 dentro del promotor ZmBGlu12.

Las cuatro regiones promotoras compartieron algunos elementos *cis* que reconocen factores de transcripción, por ejemplo: para la base de datos de TRANSFAC se identificaron elementos *cis* reconocidos por los FT tipo DOF y/o PBF que reconocen la secuencia AAAG, AAAGC, elementos *cis* reconocidos por los FT tipo Opaque2 (O2) que reconocen la secuencia TCATTCCACGTAGAT, elementos *cis* reconocidos por el FT llamado P que reconoce el elemento *cis* ACCWACCNN. La base de datos de JASPER identificó también elementos *cis* que reconocen FT tipo DOF y ABI4 que reconocen el elemento *cis* SYGCYYYY. Para base de datos PLACE los elementos *cis* YNAACYA llamado C1MOTIFZMBZ2, AAAG denominado DOFCOREZM, TGCAGG conocido como INTERLOWER, AGGTCA llamado QUELEMENTZMZM13, y algunos otros elementos *cis* que no se encuentran en común entre las 4 regiones promotoras como la secuencia TGTAAG conocida como -300CORE en los promotores ZmBGlu2 y 12; la secuencia AAACAAA conocida como ANAERO1CONSENSUS en los promotores ZmBGlu2, 5 y 7; la secuencia AGCAGC llamada ANAERO2CONSENSUS en los promotores ZmBGlu7 y 12; la secuencia ACCGAGA conocida como DRE1COREZMRAB17 en el promotor ZmBGlu5, La secuencia ACCGAC conocida como DRE2COREZMRAB17 en los promotores ZmBGlu5, 7 y 12; la secuencia RCCGAC conocida como DRECRTCOREAT en los promotores ZmBGlu5, 7 y 12; la región CCWACC llamada MYBPZM en los promotores ZmBGlu2, 7 y 12; y por

último la secuencia AGGTCA denominada QUELEMENTZM13 en los promotores ZmBGlu2, 5 y 7. Dichos elementos se enumeran para cada una de las secuencias en cada uno de los promotores en la tabla VII.

Tabla VII. Elementos *cis* (sitios de unión a factores de transcripción) en base de datos de maíz que fueron identificados en las regiones promotoras de 4 pZmBGlus de maíz analizados en las bases de datos TRANFAC, JASPAR y PLACE.

	Factor de transcripción	pZmBGlu2	pZmBGlu5	pZmBGlu7	pZmBGlu12
TRANFAC	Dof1	5	1	4	7
	Dof2	4	6	4	5
	Dof3	4	6	4	5
	O2	8	1	6	3
	PBF	5	10	9	6
	P	5	1	4	5
JASPER	ABI4	1	7	6	3
	DOF2	4	6	4	5
	DOF3	10	8	5	3
	MNBA1	15	20	16	14
	PBF	10	12	10	9
PLACE	-300CORE	2			1
	ANAERO1CO				
	NSENSUS	1	2	1	
	ANAERO2CO				
	NSENSUS			4	1
	ANAERO3CO				
	NSENSUS				1
	C1MOTIFZMB				
	Z2	8	5	4	6
	DOFCOREZM	17	22	19	18
	DRE1COREZ				
	MRAB17		1		
	DRE2COREZ				
	MRAB17		1	1	2
	DRECRTCOR				
	EAT		3	1	3
	INTERLOWE				
R	3	1	1	1	
MYBPZM	2		1	3	
POLASIG3	1	1	3	4	
QUELEMENT					
ZM 13	2	1		1	

7.5 Caracterización bioinformática de los factores de transcripción más redundantes en las regiones promotoras analizadas

Se identificaron arquitecturas espaciales de los sitios de unión a lo largo de cada uno de los promotores (Anexo 1). Encontrando un alto porcentaje de sitios de unión de factores de transcripción tipo DOF. Los análisis para conocer familias de factores de transcripción implicados en la regulación de las regiones promotoras se enfocó en la caracterización de la familia DOF en maíz. A partir de los motivos estructurales que corresponden a el dedo de zinc compuesto por 55 aminoácidos se realizó la búsqueda de los miembros de esta familia por homología con 30 secuencias *O. sativa*, 26 de *Hordenum vulgare*, 34 de *A. thaliana*, 8 de *Pinus taeda*, 9 de *Physcomitrella patents*, 26 de *Brachypodium distachion* y 1 de *Clamydomonas reinhardtii*. En estos alineamientos se lograron identificar los tres factores de transcripción tipo DOF descritos hasta el momento: GRMZM2G089850 (DOF1), GRMZM2G009406 (DOF2), GRMZM2G179069 (DOF3); además de localizar 42 miembros más que contienen el motivo estructural de un dedo de zinc, característico de vegetales. Se identificó una secuencia de mayor tamaño (2883 pb) y la presencia de 14 intrones; características que no son comunes para estas proteínas, por lo que la catalogamos como posible proteína con un motivo DOF. En el cromosoma 9 no se logró identificar ningún miembro de la familia DOF. A partir de estas secuencias que corresponden al motivo tipo DOF se derivó una secuencia consenso (Fig. 4), la cual presenta regiones conservadas y regiones variables. Los ID, su localización cromosomal, el número de intrones y el tamaño nucleotidico del CDS se muestran en la tabla VIII.



Figura 4. Secuencia consenso de factores de transcripción tipo DOF identificados en el genoma de maíz: en dicha secuencia se identifican los residuos de cisteína característicos de esta familia de factores de transcripción en la posición 3, 6, 28 y 31 los cuales forman el anillo de zinc.

Tabla VIII. Lista de genes identificados con la región conservada característica de del FT DOF en maíz, localización, número de intrones y tamaño del marco de lectura.

Nombre	Localización	Intrón	CDS (pb)
GRMZM2G123900	1: 154314059 - 154316322	0	345
GRMZM2G108865	1: 280342973 - 280344627	0	371
GRMZM2G093725	1: 293409174 - 293410841	1	224
GRMZM2G017470	1: 293328338 - 293330665	1	413
AC233935.1_FG005	1:40917520-40918920	1	387
GRMZM2G137502	1: 72616537 - 72618945	2	351
GRMZM2G011832	1: 246479708 - 246481005	0	360
GRMZM2G138455	1: 242708568 - 242710974	1	450
GRMZM2G131897	1: 164628494 - 164629568	0	268
GRMZM2G045678	1: 254560004 - 254561310	0	314
GRMZM2G158446	1: 166378546 - 166383176	14	≈2883
GRMZM2G162749	1: 14850871 - 14853754	1	432
GRMZM2G064655	2: 202417739 - 202419644	0	351
GRMZM2G146283	2: 153510052 - 153513609	2	325
GRMZM2G009406 (DOF2)	2: 188526058 - 188527888	0	244
GRMZM2G176063	3: 126308453 - 126310838	1	341
GRMZM2G378490	3: 6299506 - 6300810	0	231
GRMZM2G135703	3: 175965418 - 175966848	0	334
GRMZM2G463525	3: 44597336 - 44600651	4	618
GRMZM2G089949	3: 40520670 - 40522138	0	383
GRMZM2G327189	3: 209838358 - 209839735	2	229
GRMZM2G449950	4: 164175253 - 164176468	0	253
GRMZM2G589696	4: 160276889 - 160280031	2	297
GRMZM2G114998	4: 155008618 - 155010960	1	367
GRMZM2G144172	5: 2336204 - 2338578	1	426
GRMZM2G084130	5: 6112811 - 6113957	0	379
GRMZM2G394941	5: 204229037 - 204230736	0	300
GRMZM2G178767	5:19549995-19551017	1	241
GRMZM2G140694	5: 201381499 - 201385596	1	288
GRMZM2G171852	5: 194831436 - 194834269	0	359
GRMZM2G061292	5: 18156330 - 18157779	0	335
GRMZM2G144188	5: 2343761 - 2345249	2	343
GRMZM2G179069 (DOF3)	6: 36946628 - 36948595	1	365
GRMZM2G371058	6: 149124354 - 149125788	0	327
GRMZM2G435475	6: 158480026 - 158481157	0	231
GRMZM6G787651	7:173847830-173853197	0	476
GRMZM2G134545	7: 152063459 - 152065954	0	360
GRMZM2G089850 (DOF1)	7: 130360893 - 130362159	0	274
GRMZM5G880268	8: 133837595 - 133839859	1	375
GRMZM2G042218	8: 166580075 - 166581471	0	338
GRMZM2G082490	8: 173719258 - 173720379	0	223
AC209819.3_FG009	8:122590335-122590955	0	206
GRMZM2G010290	10: 137204858 - 137206460	1	420
GRMZM2G142718	10: 148408926 -148410383	1	211
GRMZM2G451771	10: 88287349 - 88288175	1	245

Se realizó la búsqueda de los nivel de transcripción en la base de datos The Bio-Analytic Resource for Plant Biology, (Sekhon et al., 2011). Para conocer los perfiles de expresión de estos factores de transcripción DOF, se observó que los genes con los ID: GRMZM2G171852, GRMZM2G114998, AC233925.1_FG005, GRMZM2G134545, GRMZM2G010290, GRMZM2G123900, GRMZM2G463525, GRMZM2G144172, GRMZM2G089949, GRMZM2G162749, GRMZM2G158446 y GRMZM2G176063 mantienen mayor expresión durante todo el desarrollo de la planta en la mayoría de los tejidos; GRMZM2G137502 y GRMZM2G146283, GRMZM2G011832 y GRMZM2G178767, AC209819.3_FGT009 y GRMZM2G435475 presentan patrones similares de expresión, así como GRMZM2G093725, GRMZM2G064655, GRMZM2G084130, GRMZM2G017470, GRMZM2G451771, GRMZM2G378490, GRMZM2G144188, GRMZM2G082490, GRMZM2G009406 DOF 2; todos los miembros presentan un menor una mayor expresión en las semillas durante los 20-24 días posteriores a la polinización, en espigas inmaduras en la primera y octava hoja así como en la maduración del embrión durante la maduración del endospermo. En el caso particular de DOF1 presenta mayores niveles de expresión durante todo el desarrollo de la planta a diferencia de DOF2 que presenta menores niveles de expresión en hojas en estadios vegetativos (V3 y V9) así como en espiga inmadura. La expresión del resto de los miembros DOF, se muestran en la figura 5.

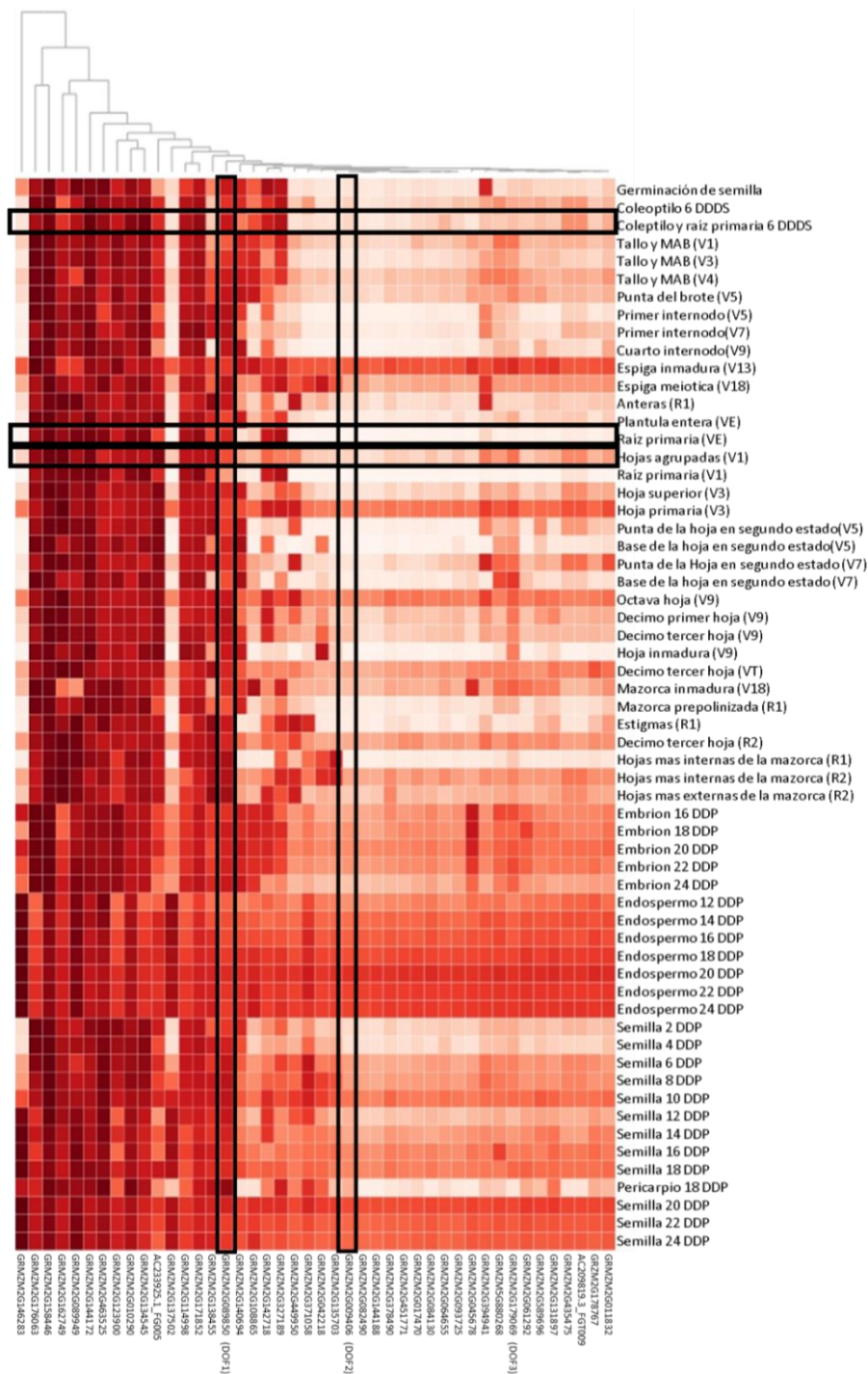


Figura 5. Mapa de calor de los niveles de expresión de ZmDOFs en diferentes tejidos de maíz. Los datos de expresión corresponden al átalas de genes de maíz de la Universidad de Toronto (Sekhon *et al.*, 2011). En tonos claros se muestran los valores con menor expresión y los tonos oscuros con mayor nivel de expresión.

Al realizar análisis de similitud de proteínas entre las diferentes secuencias candidatas a ser FT tipo DOF se lograron identificar 6 diferentes grupos y tres secuencias que se alojan de manera independiente dentro del árbol. Además, el análisis para la búsqueda de motivos estructurales (Fig. 6) mostró algunos motivos específicos dentro de cada grupo. En casi todas las secuencias de aminoácidos seleccionadas, fue posible detectar el motivo DOF y el motivo 2 que juntos constituyen la secuencia consenso antes mencionada en la figura 4 indicando que todos son miembros de la familia DOF. Las secuencias GRMZM2G144188 y GRMZM2G327189 carecen del motivo 2; GRMZM2G451771 y GRMZM2G089949 carecen del motivo DOF, sin embargo, se localizó el motivo 18 en su lugar y la secuencia GRMZM2G158446 no presenta ninguno de estos dos motivos, pero cuenta con el motivo 12 que está presente en otras secuencias. En el **grupo I**, cinco secuencias solo presentan el motivo DOF y 2, cuatro secuencias presentan el motivo 2 seguido del motivo 5, tres de ellas el motivo 17 y dos el motivo 19. Dentro del **grupo II** se mantienen el motivo DOF y 2 y el resto de su secuencia no comparten motivos. En el **grupo III** algunas de sus secuencias muestran al menos dos de los motivos 5, 9 ó 4 antecediendo el motivo DOF, a excepción de la secuencia GRMZM2G142718 que solo mantiene los motivos DOF y 2. Dentro del **grupo IV** se localizan solamente los FT DOF1 y DOF2 que solamente comparten los motivos DOF y 2. En el **grupo V** se alojan 2 secuencias que solamente contienen los motivos DOF y 2 y dos más con el motivo 13, sin embargo, una de ellas el motivo DOF es remplazado por el motivo 18. El **grupo VI** contiene dos secuencias que solamente con los dominios DOF y 2 una de ellas corresponde a *Chlamydomonas reinhardtii*, cuatro secuencias con motivo 10, dos con motivo 20 y dos con motivos 3 y 11.

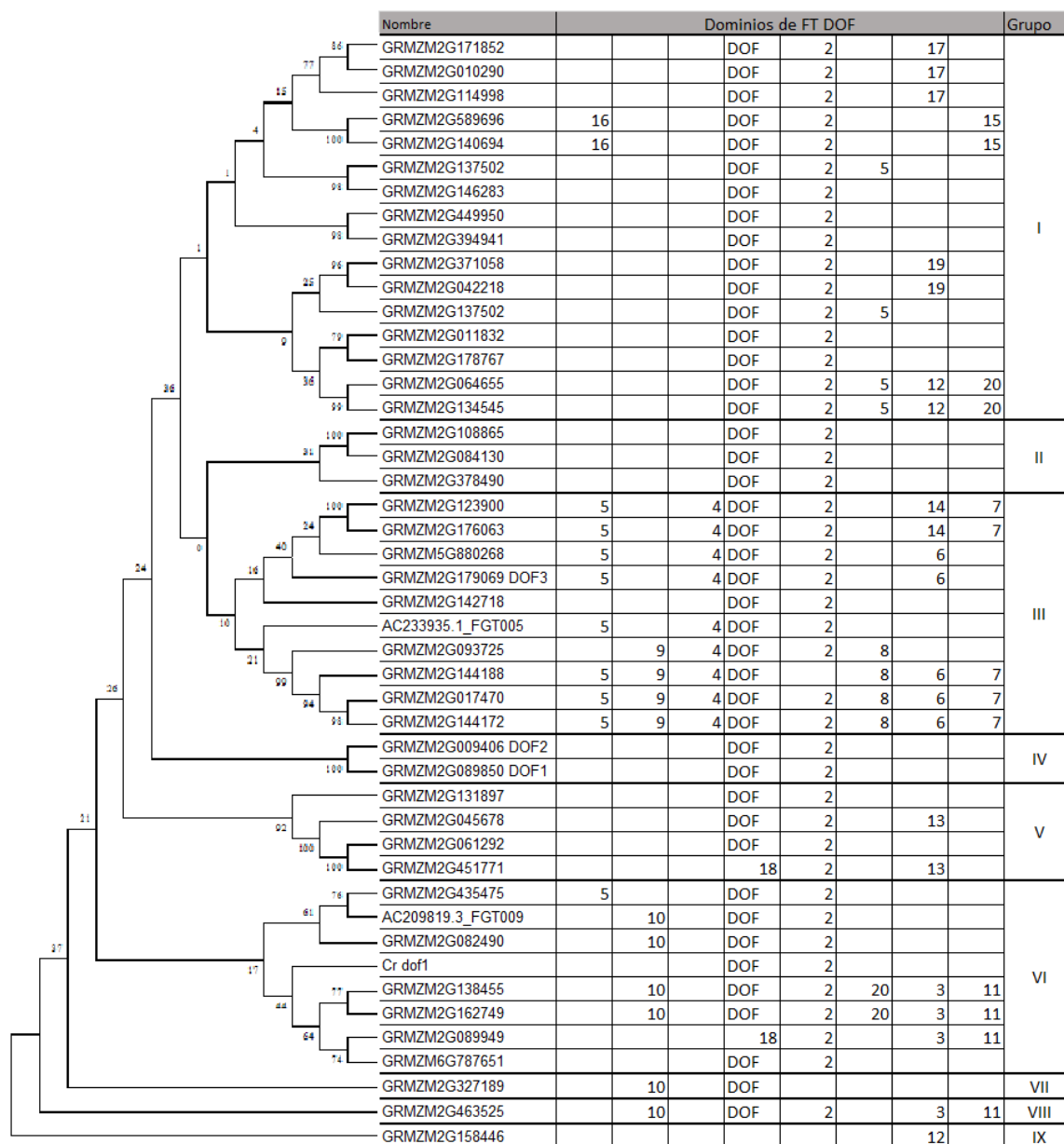


Figura 6. Análisis filogenético y de sitios conservados en secuencias de aminoácidos de 44 posibles factores de transcripción tipo DOF de maíz. Con números arábigos se muestran los sitios conservados que se comparten entre si y con números romanos los grupos a los que pertenecen. El alineamiento se realizó con MUSCLE y árbol se construyó con el método de neighbor joining.

7.6 Evaluación de expresión de genes β -glucosidasas bajo condiciones de estrés biótico y abiótico.

Para evidenciar el efecto del estrés biótico se realizó un análisis histológico de los tejidos infectados con *U. maydis* y *F. proliferatum*, así como la respuesta a estrés abiótico mediante la exposición a rayos UV, polietilenglicol (PEG) y a salinidad (NaCl).

7.6.1 Evaluación de la infección bajo estrés biótico mediante microscopía

Los tejidos infectados con *U. maydis* y *F. proliferatum* se analizaron a los cuatro días post infección (DPI), donde se pudo observar que ambos patógenos lograron colonizar y desarrollarse en el tejido parénquima (Fig. 7D-E y 7G-H), así como en células del coleóptilo (Fig. 7F y 7I). En la infección con *F. proliferatum* se observó un gran daño en el tejido, así como el desarrollo de clamidosporas (Fig. 7D-F) en contraste con el tratamiento de daño mecánico que no presento este daño (Fig. 7A-C).

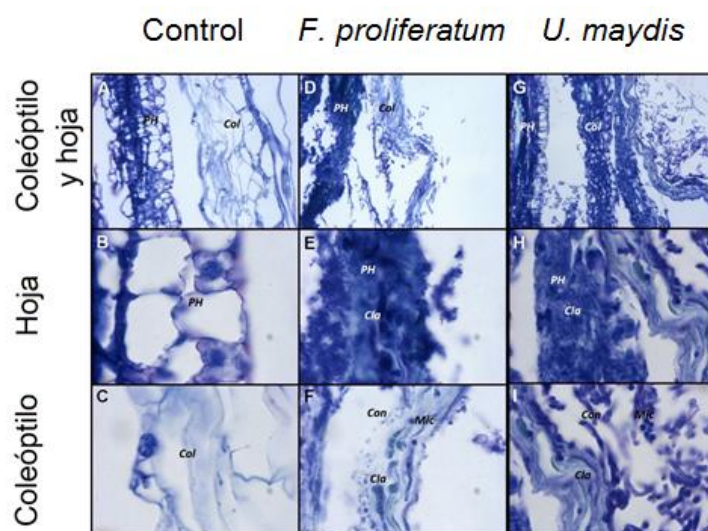


Figura 7. Infección de *Z. mays* B73 con *F. proliferatum* y *U. maydis*. (A) corte longitudinal 600X; (B) corte longitudinal 3000X; (C) corte longitudinal 3000X. D–F: 4 días después de la inoculación, (D) corte longitudinal 600X; (E) corte longitudinal 3000X; (F) corte longitudinal 3000X; G–I: 4 días después de la inoculación: (G) corte longitudinal 600X; (H) Corte longitudinal 3000X; (I) Corte longitudinal 3000X. parénquima de la hoja (PH), coleóptilo (Col), clamidospora (Cla), conidiospora (Con), micelio (Mic).

Mientras que en la área de inoculación en el coleóptilo fue necrosado por ambos patógenos, los análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (por sus siglas en inglés SEM) mostraron desarrollo intercelular de micelio entre las células vivas de la planta infectada con *U. maydis* (Fig. 8a) y en el caso de *F. proliferatum* se evidencio crecimiento intracelular del micelio, así como la formación de clamidosporas (Fig. 8b).

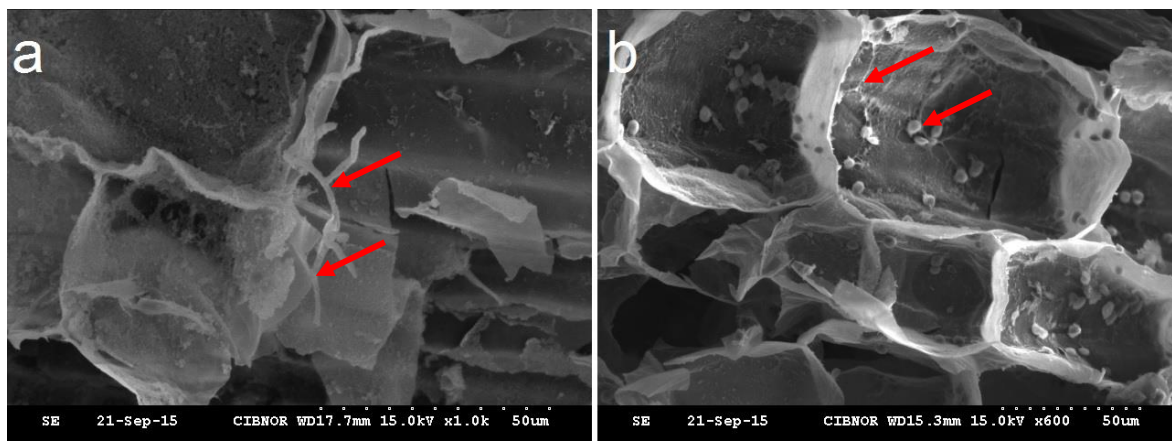


Figura 8. Micrografía electrónica de barrido células de la hoja de maíz B73. a) presencia de micelio de *U. maydis* en la periferia de las células, b) micelio y esporas de *F. proliferatum* dentro de las células de la hoja.

7.6.2 Evaluación de la especificidad y sensibilidad de los oligonucleótidos.

A continuación se evaluó la especificidad y la sensibilidad de los oligonucleótidos para detectar las diferentes β -glucosidasa; debido a que la expresión de estos genes es diferencial en diferentes etapas de desarrollo así como bajo el efecto de factores externos, se realizaron PCRs de gradiente de temperatura, usando como templado mezclas de ADNc provenientes de diferentes tejidos y tratamientos. Los genes ZmBGlu2, 7, 18, 23 a 57 °C; ZmBGlu16 y 22 a 55 °C; ZmBGlu13 y ZmBGlu20 a 59 °C; ZmBGlu9 y ZmBGlu12 a 51 °C, mostrando un solo producto de amplificación. El resto de los oligonucleótidos no promovió la amplificación o esta fue inespecífica. Las secuencias de los productos amplificados mostraron un 100% de identidad con el gene correspondiente; la sensibilidad de los oligonucleótidos fue óptima en todas las amplificaciones a 29 ciclos.

7.6.3 Evaluación de transcritos mediante PCR semi-cuantitativo

Los perfiles de expresión de los genes β -glucosidasa fueron evaluados en hoja, coleóptilo y raíz de plántulas de maíz mediante PCR semi-cuantitativo. Los niveles de expresión de cada gen blanco se compararon con la expresión del gen β -tubulina como gen de referencia en todas las reacciones. Los genes β -glucosidasa fueron evaluados en todos los tejidos, sin embargo, sus patrones de expresión fueron diferentes entre tratamientos (Fig. 9). Con la finalidad de analizar la respuesta de los genes blanco, se utilizaron como tratamientos control plántulas de maíz sin tratamiento ni daño mecánico en los experimentos de infección con *U. maydis* y *F. proliferatum*. ZmBGlu2 mostró una sub-regulación en hoja por la infección de *U. maydis*, y por daño mecánico, la expresión fue similar al control sin tratamiento. Con *F. proliferatum*; en coleóptilo la expresión fue mínima del mismo nivel que en tratamiento control. ZmBGlu7 fue sub-regulada en hoja en todos los tratamientos, pero fue sobre-regulada en presencia de los dos patógenos en coleóptilo y sub-regulada en la raíz por la infección con *U. maydis*. ZmBGlu9 fue sobre-regulada en hojas con infección de *U. maydis*, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el resto de los tejidos y tratamientos. ZmBGlu12 mostró sobre-regulación en el coleóptilo bajo el tratamiento de daño mecánico e infección por *U. maydis* y una sub-regulación en infección con *F. proliferatum* en hojas. ZmBGlu13 fue sobre-regulada en hoja y raíz durante la infección con *U. maydis*, por otro lado en coleóptilo fue sub-regulada con *F. proliferatum*. ZmBGlu16 mostró sobre-regulación en raíz y sub-regulación en hoja en el tratamiento con *F. proliferatum*, mientras que en coleóptilo la expresión no mostró diferencias estadísticamente significativas. ZmBGlu18 fue sobre-regulado en coleóptilo y raíz en el tratamiento con *F. proliferatum*, y con *U. maydis* y daño mecánico fue sub-regulado en la hoja. La expresión de ZmBGlu20 fue detectada únicamente con *U. maydis* en todos los tejidos, mientras que ZmBGlu22 solamente se sobre-regulo en la raíz con el tratamiento de *F. proliferatum*. Por último, ZmBglu23 no mostró diferencias estadísticamente significativas en la expresión bajo ningún tratamiento.

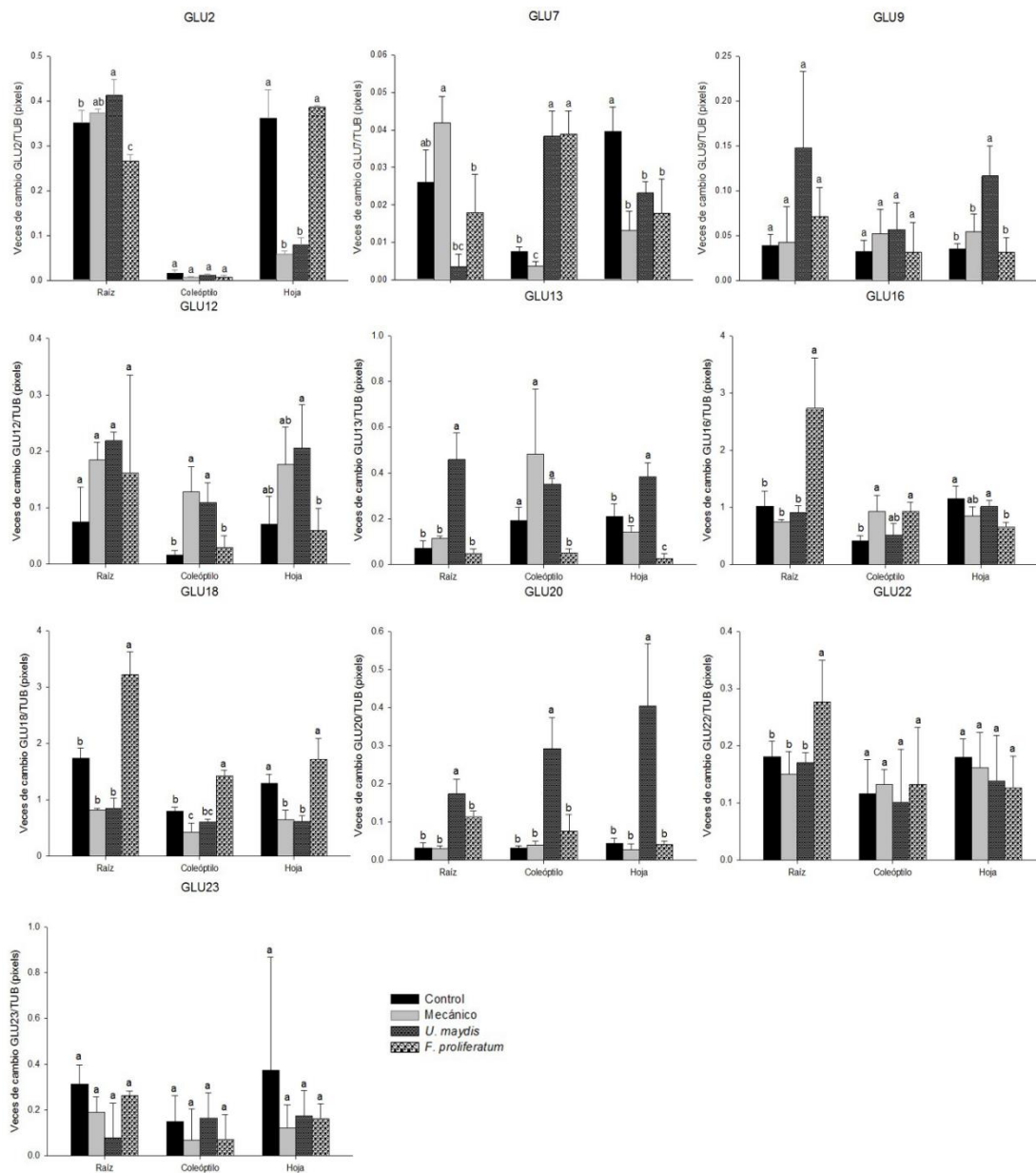


Figura 9. Análisis de expresión de genes ZmBGluc2, 7, 9, 12, 13, 16, 18, 20, 22 y 23 de maíz var. B73 bajo estrés biótico. Nivel de expresión relativa en relación al gen β -tubulina, ANADEVa $p \leq 0.05$ se muestran con letras entre los tratamientos por tejido analizado.

7.6.4 Evaluación de la infección bajo estrés abiótico: exposición a rayos UV, exposición a polietilenglicol (PEG) y salinidad (NaCl).

Los niveles de expresión de cada gen fueron comparados a la expresión del gen β -tubulina como gen de referencia en todas las reacciones. Estos se valoraron en tres tejidos: hoja, coleóptilo y raíz (Fig. 10). Todos los tratamientos se realizaron en tres replicas independientes. ZmBGLu2 y 13 en las hojas, presento aumento en los niveles de expresión en tratamiento con NaCl. ZmBGLu7 no mostró diferencias entre los tratamientos con respecto al control para los tres tejidos, sin embargo, en raíz los niveles de expresión en los tratamientos de estrés por UV y PEG fueron menores que en el tratamiento con NaCl. ZmBGLu9 y 12 no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos siendo la raíz donde se presentaron los niveles más bajos de expresión. ZmBGLu20 presentó una disminución en los niveles de expresión con respecto al control en la raíz cuando fue expuesta a UV y NaCl. ZmBGLu16, 18, 22 y 23 no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en los tres tejidos.

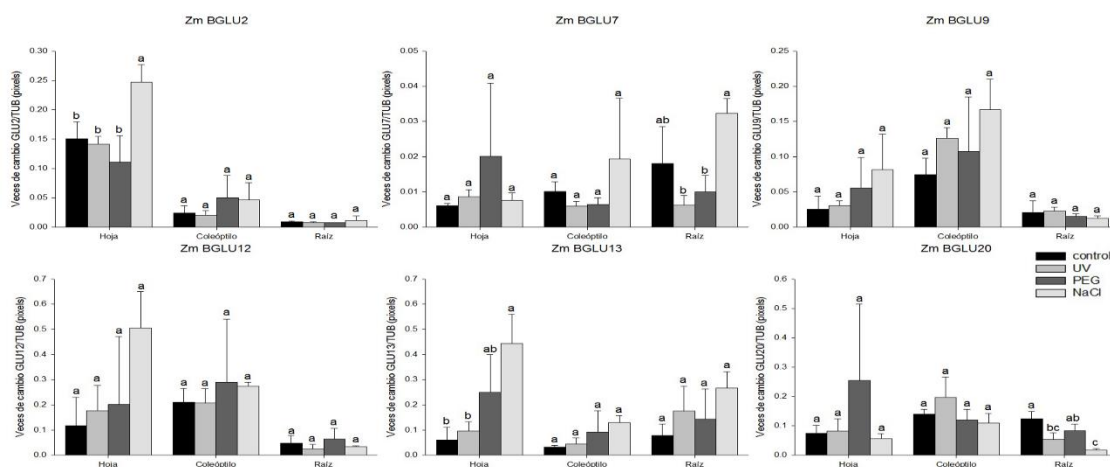


Figura 10. Análisis de expresión de genes ZmBGLu2, 7, 9, 12 13 y 20 de maíz var. B73 bajo estrés abiótico. Nivel de expresión relativa en relación al gen β -tubulina, ANADEVA $p \leq 0.05$ se muestran con letras entre los tratamientos por tejido analizado.

7.7 Identificación y cuantificación de los factores de transcripción tipo DOF1 y 2 bajo condiciones de fotoperiodo y etiolación

Para conocer los niveles de expresión de los factores de transcripción DOF1 y DOF2, y si estos se regulan diferencialmente en el área foliar y radicular por efecto de la luz como lo indica la literatura, se cuantificó la expresión mediante qPCR (Fig. 11). La expresión de ambos factores de transcripción presentó los mismos patrones: en el tratamiento control la expresión en el área foliar fue menor con respecto a la raíz, y de manera contraria la expresión de los dos factores de transcripción fue mayor en hojas que en la raíz (bajo los tratamientos de etiolación y reverdecimiento después de 1h en exposición a luz), Siendo mayor la expresión de DOF2 que DOF1.

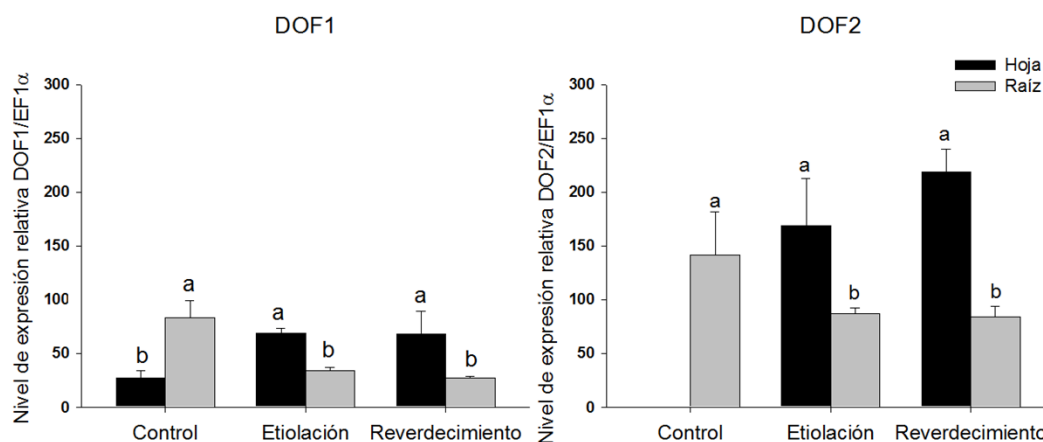


Figura 11. Análisis de expresión de genes DOF1 y 2 de maíz var. B73 bajo estrés abiótico. Nivel de expresión relativa en relación al gen EF1 α , ANADEV A $p \leq 0.05$ se muestran con letras entre los tratamientos por tejido analizado.

7.7.1 Inmuno-detección por western blot y cuantificación mediante ELISA indirecto de los antígenos específicos de los factores de transcripción DOF1 y DPF2

Se predijo el peso molecular de los factores de transcripción mediante análisis in silico resultando en 27.45 kDa para el factor de transcripción DOF1 y 24.5 kDa para el factor de transcripción DOF2 (Fig. 12). Los resultados de western blot

mostraron que el anticuerpo desarrollado para detectar un epítipo específico de DOF1 (anti-DOF1), detectó tres péptidos de diferentes tamaños en tejido con fotoperiodo normal, sin embargo en tejido foliar con fotoperiodo se detectó una solo péptido entre 37 y 25 kDa; el anticuerpo desarrollado para detectar el epítipo específico de DOF2 (anti-DOF2), el western blot detectó un péptido superior a 50 kDa en ambos casos.

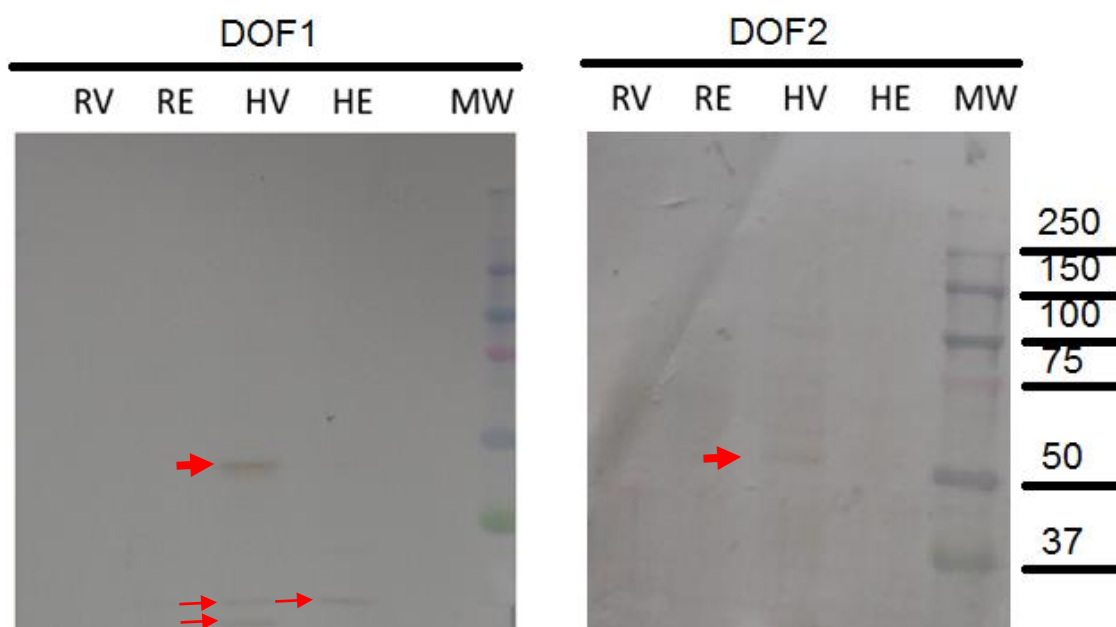


Figura 12. Inmuno-detección de los factores de transcripción DOF1 y 2 de maíz var. B73. RV: raíz verde, RE; raíz etiolada, HV: hoja verde, HE hoja etiolada, MW: marcador de peso molecular.

Estimaciones cuantitativas de los factores de transcripción mediante ELISA indirecta presentan tendencias similares a las que obtuvieron mediante qPCR, donde DOF2 mostró la mayor cantidad que DOF1 y en el tratamiento de fotoperiodo se obtienen la mayor concentración para los dos factores de transcripción en tejido foliar y en los tratamientos de etiolación y reverdecimiento no existen diferencias entre los tejidos (Fig. 13).

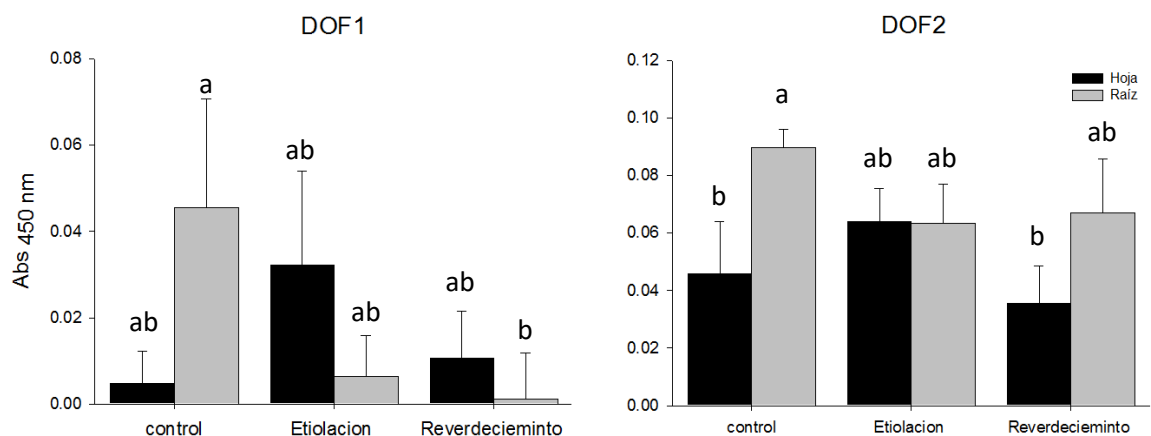


Figura 13. Análisis de ELISA de los factores de transcripción DOF1 y 2 de maíz var. B73. ANADEV A $p \leq 0.05$ se muestran con letras entre los tratamientos por tejido analizado.

7.7.2 Inmunoprecipitación de la cromatina e identificación de elementos cis con interacción a los factores de transcripción tipo DOF mediante qPCR.

Los qPCR realizados a los ensayos de CHIP con anticuerpos dirigidos a secuencias específicas (AAAG) de los factores de transcripción DOF1 y DOF2 de hojas de maíz B73, resultaron 3 experimentos positivos para la región -2343 y -1087 con sitio de unión al factor de transcripción tipo DOF del promotor de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PPC), se identificó una amplificación al ciclo 40 con un solo pico en la temperatura de disociación de 78 °C y en el ciclo 38 con un solo pico en la temperatura de disociación de 79.5 °C, además en la región -1588 con sitio de unión para el factor de transcripción tipo DOF del gen fosfoenolpiruvato dikinasa (PPDK), encontrándose una amplificación en el ciclo 38 y una sola curva de disociación de 80.3 °C, por otra parte no se detectaron amplificaciones a en la región -1804 del promotor del gen *ppc* y en la región -1275 del promotor *ppdk*, los productos amplificados fueron secuenciados mostrando una identidad del 100% con las secuencias para las que fueron diseñados los oligonucleótidos.

7.8 Comparación y evaluación molecular de los niveles de expresión y la producción de proteínas estereológicas bajo la regulación de promotores de los genes ZmBGlu2, 5, 7, 12 y 35S CaMV

Derivado de los análisis bioinformáticos, de las 26 glucosidasas se eligieron 4 regiones promotoras (pZmBGLU2, pZmBGLU5, pZmBGLU7, pZmBGLU12) para usarse en la evaluación por expresión transitoria en maíz. Los criterios de selección fueron: que estén modulando la expresión positiva y sus niveles máximos fueran durante los primeros 9 días después de la siembra. Debido a que la transformación de *A. tumefaciens* es dependiente del genotipo, se evaluaron 3 híbridos tropicales y una línea parental de maíz NS9617, DK2038, C/05 y B73 respectivamente. Además, se determinaron cuatro estadios de germinación (Fig. 14 A-D), previamente descritos en la metodología. La línea parental B73 presentó un bajo porcentaje de germinación (menor al 20%, fig 14E), por lo que fue descartada para su transformación. Los híbridos NS9617 y DK2038 mostraron una rápida y heterogénea transición entre los estados de desarrollo, en donde más del 40% de los germinados llegaron al cuarto estadio en 96 h (Fig. 14E). El híbrido C/05 mostró un desarrollo homogéneo entre el segundo y el tercer estadio al cuarto día de germinación, así como un desarrollo más pausado (menos del 40%) comparado con los otros híbridos, llegando al cuarto estadio al quinto día. Por otra parte, el híbrido C/05 mantuvo más del 90% de las semillas germinadas, además, la C/05 mostró las mejores características de desarrollo para la transformación mediada por *Agrobacterium*.

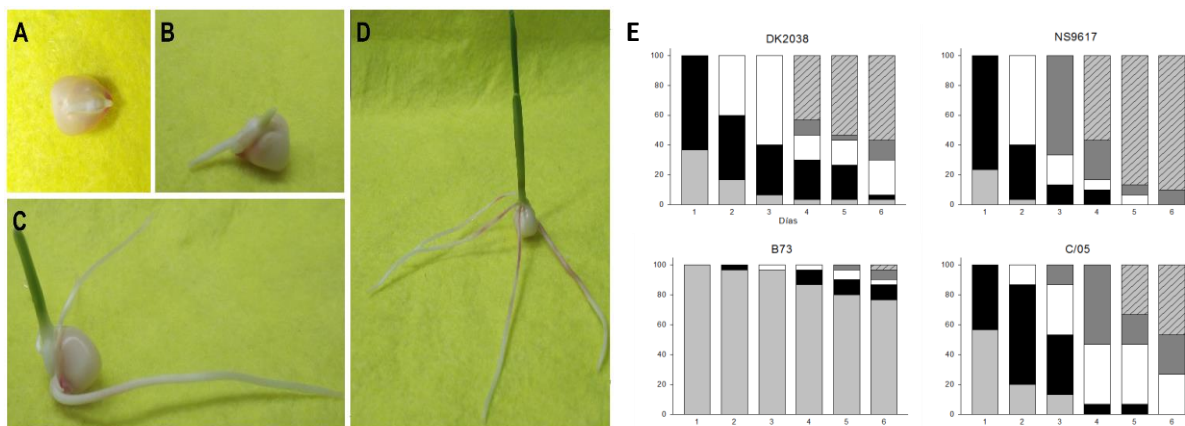


Figura 14. Sucesión de estados de desarrollo de plántulas de maíz. A–D) se muestran imágenes de los cuatro estados de desarrollo en los germinados de maíz; E) porcentajes de los estados de desarrollo durante seis días; en gris semillas no germinadas; negro la raíz rompe la epidermis; blanco emergencia del brote apical; gris oscuro aparición de raíces de secundaria, reverdecimiento y emergencia de coleóptilo; gris enmallado despliegue de las hojas.

En las plántulas de los tres híbridos que fueron co-cultivadas con *A. tumefaciens* cepa GV2260 conteniendo el vector binario pCAMBIA 2301, se observó una considerable variación de la actividad de GUS en tres híbridos, donde no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) en la actividad de GUS entre los tres híbridos, sin embargo, C/05 mostró una mayor eficiencia de transformación, con más homogeneidad en los valores de actividad y se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en la actividad de GUS entre la raíz y la hoja y la hoja. DK2038 y C/05 mostraron similar eficiencia de transformación, sin embargo, la desviación estándar fue muy grande y no mostró diferencias entre los tejidos de las plántulas DK2038 y por último NS9617 mostró menos actividad de GUS (Fig. 16).

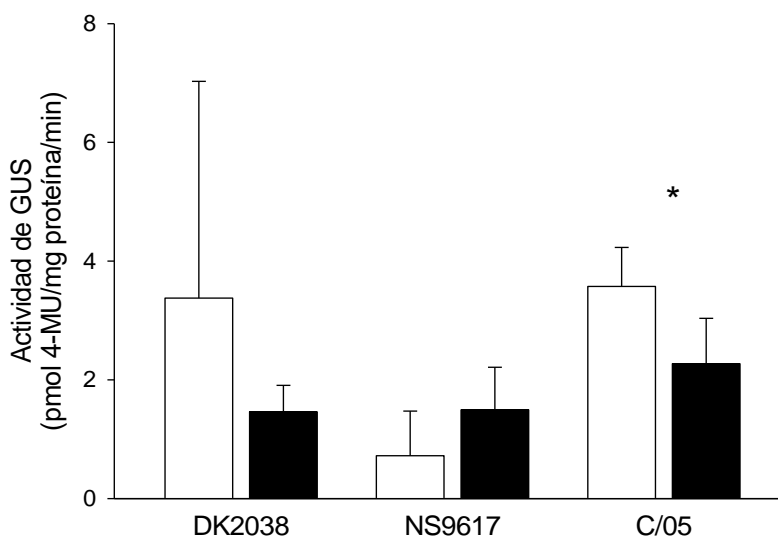


Figura 15. Cuantificación de la actividad de GUS en tres híbridos de maíz co-cultivadas con *A. tumefaciens* GV2260 conteniendo el plásmido pCAMBIA2301. Las líneas representan la desviación estándar, las barras blancas representan la actividad de GUS en las hojas y las barras negras representan la actividad de GUS en las raíces. El asterisco denota diferencias significativas entre los tejidos.

Mediante el protocolo de transformación transitoria fueron evaluados 2000 pb río arriba de los genes ZmBGlu2, 5, 7 y 12, en el híbrido tropical C/05. Se cuantificó la actividad de GUS en hoja y raíz ($\text{pmol 4-MU/mg}^{-1} \text{ proteína/min}^{-1}$). Las construcciones que dirigían la expresión de GUS con los promotores pZmBGlu2, 5 y 35S CaMV en el vector pKGWFS7 junto con pCAMBIA 2301 no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) en la actividad de GUS. Sin embargo las construcciones que dirigían la expresión de GUS con los promotores ZmBGlu7 y 12, mostraron una menor actividad GUS similar a la que presenta el tratamiento control con la cepa desarmada GV2260 (Fig. 16).

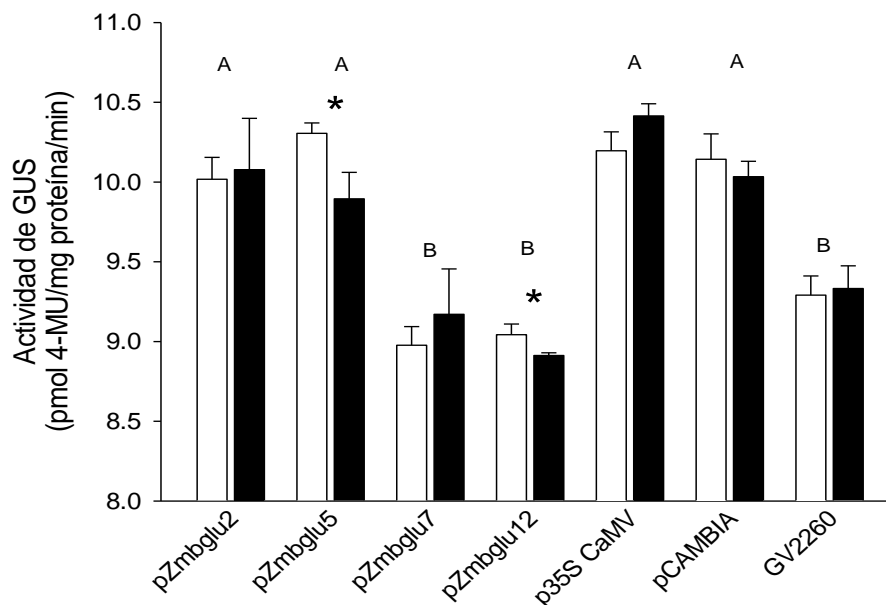


Figura 16. Cuantificación de la actividad de GUS con los diferentes promotores en maíz C/05. Las líneas verticales representan la desviación estándar, las barras blancas representan la actividad de GUS en las hojas, y en barras negras la actividad de GUS en la raíz. El asterisco representa diferencias significativas entre los tejidos.

7.9 Producción del antígeno MAP85 mediante el método de transformación transitoria.

La construcción pDONOR221-Ag85A (Fig. 17A) y pDONR P4P1r-35SCaMV (Fig. 17B) fueron analizadas por secuenciación. El inserto en pDONR221 presento una identidad del 99% con una micolil transferasa Ag85A (2419187..2420179) de *M. avium* subsp. paratuberculosis cepa E93 (GeneBank: CP010114), y el inserto en pDONR P4P1r mostró una identidad de 100% con el promotor 35S CaMV contenido en el vector pCAMBIA-2301 (Genebank: AF234316). Posteriormente, al recombinarse estos dos componentes en el vector pK7m24GW,3 (Fig. 17C) el correcto arreglo fue verificado por secuenciación del extremo 5' del promotor 35SCaMV y el extremo 3' del ORF Ag85A mostrando identidad con cada una de estas secuencias.

Al realizar el ensayo de transformación transitoria se tomaron muestras de germinados 4, 6, 8 y 10 días posteriores a la inoculación con la bacteria que contenía la construcción los a análisis de ELISA indirecta mostraron que al cuarto y sexto día post-inoculación se detectaban las mayores concentraciones del antígeno en las plántulas de maíz, y en los días 8 y 10 un menor contenido del antígeno (Fig. 19A). El análisis de western blot específico para el antígeno MAP85 detectó la presencia de una proteína menor a 37 KDa (Fig. 19B) solamente en la muestra para el cuarto de día de inoculación para el resto de las muestras fue negativo.

En un experimento más se realizó una segunda réplica del experimento por quintuplicado, y los germinados fueron cosechados al cuarto día post-inoculación, los resultados de ELISA (Fig. 20A) mostraron diferentes concentraciones del antígeno, donde el lote de transformación 4 presento la mayor concentración y los lotes 2 y 3 la menor concentración, de igual manera los resultados de western blot (Fig. 20B) evidenciaron un péptido de aproximadamente 31 kDa para los 5 casos a partir de extractos proteicos de plántulas C/05 liofilizadas.

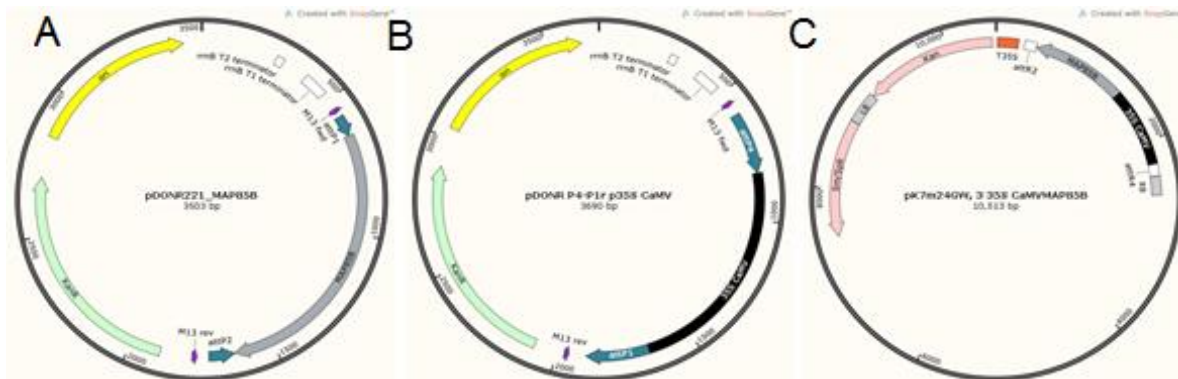


Figura 17. Construcciones generadas para la producción del antígeno MAP85. (A) construcción de pDONR221-MAP85; (B) construcción de pDONR P4-P1r-p35S CaMV; (C) arreglo genético en vector pK7m24GW,3 el cual contiene el promotor 35S que dirige la expresión de MAP85.

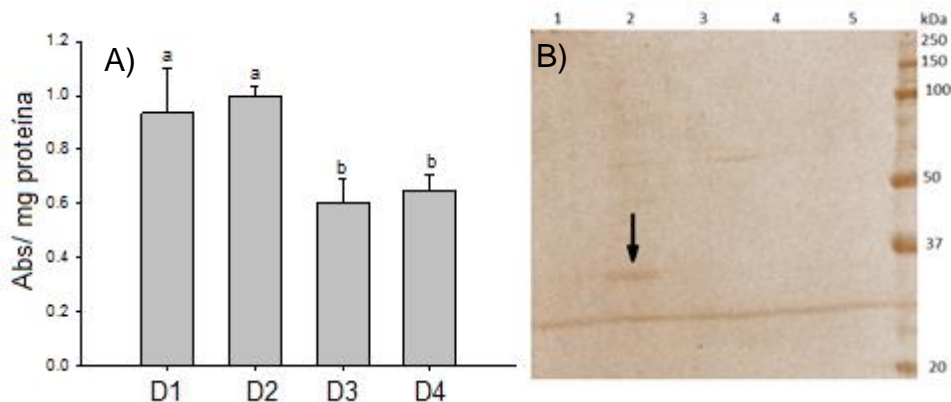


Figura 18. Inmuno-análisis de plántulas de maíz con transformación transitoria para producción del antígeno MAP85 durante 4 días de muestreo. A) cuantificación mediante ELISA indirecto. Las líneas representan la desviación estándar y las barras la absorbancia de las muestras colectadas diferentes días post. Inoculación de. B) western blot, la flecha señala la banda detectada al cuarto día.

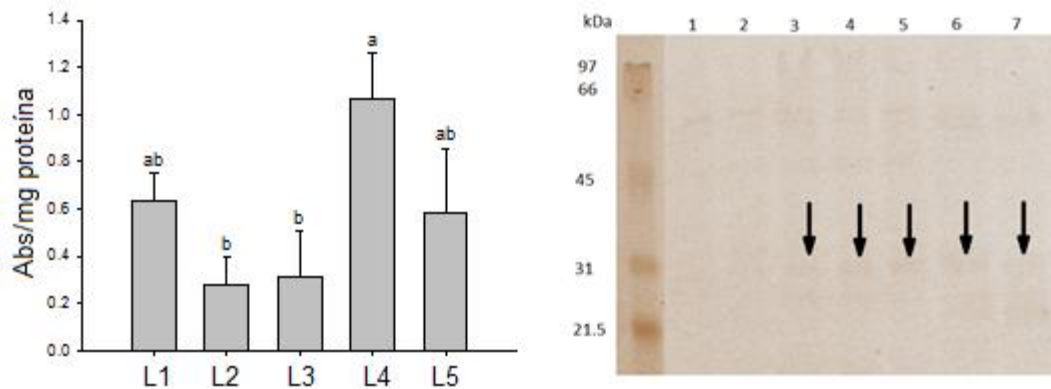


Figura 19. Inmuno-análisis de 5 lotes de plántulas de maíz con transformación transitoria para producción del antígeno MAP85. A) cuantificación mediante ELISA indirecto. Las líneas representan la desviación estándar y las barras la absorbancia de las muestras colectadas diferentes días post Inoculación de *Agrobacterium*. B) western blot, la flecha señala la banda detectada al cuarto día.

8. DISCUSIÓN

Los primeros trabajos en β -glucosidasa de maíz fueron enfocados en la caracterización de ZmBGlu1, donde se describe una enzima con actividad glucosil hidrolasa (EC 3.2.1.21) de aproximadamente 60 kDa en coleóptilos de maíz (Esen y Cokmus, 1990; Esen, 1992). Mediante secuenciación de aminoácidos se identificó un péptido de esta enzima. Con la llegada de las plataformas de NGS, genomas de diferentes especies como *A. thaliana* (Kaul *et al.*, 2000), *O. sativa* (Goff *et al.*, 2002), *Z. mays* (Schnable *et al.*, 2009), se estudiaron relaciones evolutivas entre algunos especímenes adoptados como organismos modelo y se logró predecir la función de algunas secuencias. En este sentido, la bioinformática juega un papel fundamental para el análisis y organización de esta información. Es por ello que en el presente trabajo se enfoca en la asignación de funciones de β -glucosidasas de *Z. mays*, mediante análisis bioinformáticos partiendo de la información previamente descrita en bases de datos de secuencias de ADN y aminoácidos (Goodstein *et al.*, 2012), de expresión (Sekhon *et al.*, 2011), de factores de transcripción y elementos *cis* (Chi-Nga *et al.*, 2015). También se utilizó, la descripción funcional de miembros de familias β -glucosidasas de arroz y *Arabidopsis* consideradas como modelo de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas respectivamente. Mediante los análisis de comparación en expresión se logró identificar que las ZmBGlu14 con 24, 16 con 15, 9 con 25 y 5 con 6, mantienen similitudes de expresión entre algunos miembros, lo que sugiere que probablemente provienen de eventos de duplicación de genes junto con sus regiones promotoras, como se ha reportado para otros casos, por ejemplo: la familia de poligalacturonasas en *Arabidopsis* y arroz (Kim *et al.*, 2006), miosina en diferentes especies de plantas (Peremyslov *et al.*, 2011), entre otros. Análisis de similitud entre las secuencias de aminoácidos, en este trabajo bajo el método de máxima verosimilitud de likelihood, apoya esta teoría, ya que estos miembros mantienen relaciones estrechamente cercanas. Los análisis de motivos identificaron bloques conservados que contienen las regiones catalíticas (motivo 1

y 8) conocidas TFNEP y ITENG (Czjzek *et al.*, 2001) respectivamente. Sin embargo, las ZmBGlu9 y 10 carecen del motivo 8 por que se sugiere que estas enzimas han perdido su actividad biológica. Además de se localizaron regiones conservadas que forman enlaces tipo *cis* entre Ala-Pro y Trp-Ser (Seshadri *et al.*, 2009) característico de glicosil hidrolasas tipo 1, localizándose en el motivo 1 y 5 respectivamente. Por otro lado, en los motivos 2, 3, 5, 7 y 11 se alinearon las regiones de unión al factor de agregación β -glucosidasa (BGAF) previamente descrito por Yu *et al.* (2009) donde dicha región tiene afinidad por lectinas que le proporcionan especificidad a estas enzimas.

Las β -glucosidasas se encuentran ampliamente distribuidas entre las plantas y están involucradas en mecanismos de respuesta tanto a estrés biótico como abiótico. Muchos estudios puntualizan la importancia de las β -glucosidasas en respuesta al ataque por patógenos así como daño mecánico (Morant *et al.*, 2008). Para observar un panorama acerca de la expresión de las β -glucosidasas en maíz, se realizaron experimentos tanto de estrés biótico (infecciones fúngicas con hábitos biotróficos y necrotrofos) comparados con daño mecánico y estrés abiótico (salinidad, sequia, y rayos UV). Para identificar la sensibilidad y especificidad de los oligonucleótidos fueron probados a partir de una mezcla de DNAC de todos los tratamientos y todos los tejidos, detectándose amplificaciones de para los miembros ZmBglu2, 7, 9, 12, 13, 16, 18, 20 y 22; no se lograron amplificaciones específicas para el resto de los miembros. Esto podría atribuirse al bajo número de transcritos, que no fueron sobre-reguladas bajo estos estímulos, o son regulados temporalmente es decir, estos transcritos se regulan en otro estado de desarrollo, como se ha descrito para otras familias de genes (Chen *et al.*, 2002; Yokoyama y Nishitani, 2001). De manera particular, nuestros resultados muestran en el análisis de homología que la ZmBGlu20 y 21 se agrupan con las β -glucosidasas OsBGlu6, 4, AtBglu64 que hidrolizan enlaces disacárido (1 \rightarrow 3) y (1 \rightarrow 2) (Seshadri *et al.*, 2009) involucradas en defensa y la remodelación de la pared celular (Rouyi *et al.*, 2014), lignificación (Escamilla-Treviño *et al.*, 2006) y en

defensa y respuesta que incluye heridas y resistencia sistémica adquirida (Hua *et al.*, 2015) respectivamente. Los análisis de expresión mostraron que ZmBGlu20 bajo estrés biótico fue sobre regulada en todos los tejidos durante la infección de *U. maydis*, mientras que bajo estrés abiótico solamente mostró sub-regulación en raíz (UV y salinidad). Esto sugiere que este miembro probablemente podría actuar como mecanismo de respuesta al ataque por el patógeno biotrófico. Un gran número de miembros fueron alojados en el grupo III, con β -glucosidasas de arroz y *Arabidopsis* involucradas en la remodelación de la pared, mecanismos de resistencia y pre-invasión, hidrólisis de ABA glicosilado y en algunos casos, con actividad manosidasa como en el caso de la OsBGlu26 que está estrechamente cercana a ZmBGlu16 que muestra una sobre-regulación en raíz bajo la infección con *F. proliferatum* así como en coleóptilo en daño mecánico e infección del mismo patógeno; en contraste este fue sub-regulado en la hoja por la infección por *F. proliferatum*. Por otro lado, no mostró diferencias bajo los tratamientos de estrés abiótico; este resultado sugiere una actividad similar durante la infección por *F. proliferatum* en coleóptilo y raíz; ZmBGlu2 que también se encuentra en este grupo, mostró una sobre regulación solamente en la raíz bajo la infección de *U. maydis* en contraste fue sub-regulada en la raíz bajo la infección de *F. proliferatum*. En el trabajo de transformación transitoria en de esta investigación (Rojas *et al.*, 2015) también se observó que el promotor de ZmBGlu2 aumentaba sus niveles de expresión en condiciones de co-cultivo con la bacteria *A. tumefaciens*. En condiciones de estrés salino se observó sobre-regulación en las hojas a pesar se le ha asociado una posible función en defensa por su alta identidad con ZmBGlu1 que está involucrada en la liberación del DIMBOA (Czjzek *et al.*, 2001), sin embargo, este miembro también se agrupó con β -glucosidasas involucradas en la liberación de ABA-glicosilado, que es la hormona encargada de señalar mecanismos de respuesta a estrés abiótico. ZmBGlu7 se encontró sobre-regulada en coleóptilo en estrés biótico durante la infección de ambos patógenos mientras que bajo estrés abiótico no se encontraron diferencias entre los tejidos, lo que sugiere que podría estar participando en mecanismos de

defensa contra el ataque por patógenos en el coleóptilo, mientras que su parólogo ZmBGlu2 lo hace en raíz. En el grupo V los miembros ZmBGlu11 y 12 se agruparon únicamente con miembros de arroz. Al evaluar los niveles de transcripción de ZmBGlu12 se detectó una sobre-regulación en coleóptilo por daño mecánico e infección por *U. maydis*, sin embargo sus posibles ortólogos de arroz no se les han asignado una posible función. ZmBGlu9 y 13 se localizaron en el grupo VI con OsBGlu31, donde se le ha relacionado con actividad transglucosidasa con la capacidad de transferir glucosa entre fenilpropanoides y fitohormonas conjugadas y flavonoides (Luang *et al.*, 2013). ZmBGlu9 fue sobre-regulada en hoja durante la infección con *U. maydis* mientras que bajo estrés abiótico no se mostraron diferencias estadísticamente significativas. ZmBGlu13 también fue sobre regulada en raíz y hoja con el mismo patógeno, sin embargo, bajo estrés abiótico no se encontraron diferencias estadísticas, por lo que se propone que estos miembros podrían estar involucrados en respuesta al ataque por patógenos de hábitos biotróficos en los tejidos mencionados.

Los genes ZmBGlu18, 22 y 23 se localizaron en grupo IX con los miembros OsBlu7, 16, 17 y 18 de arroz, donde alguno de los miembros se encuentran involucrados en la remodelación, metabolismo y lignificación de la pared celular; en el caso particular de OsBGlu16 y 18 mantienen una actividad monoglucosidasa (Baiya *et al.*, 2014; Rouyi *et al.*, 2014).

Cabe señalar que los miembros ZmBGlu16 y 18 mostraron los más altos niveles de expresión en raíz bajo las infecciones con *F. proliferatum*, el resto de los tejidos y genes muestreados, a pesar de que se encuentran en grupos diferentes, los dos miembros mantienen relaciones cercanas con miembros de arroz que se encuentran relacionados con el metabolismo de la pared celular. Como sabemos, la pared celular es la primera barrera de defensa contra el ataque de patógenos y es la que interactúa directamente con los microorganismos (por ejemplo insectos, nematodos, bacterias y hongos fitopatógenos). En infecciones con hongos de hábitos necrotrofos, la integridad de la pared celular en las plantas

se ve afectada (Bellincampi *et al.*, 2014; Lionetti y Metraux, 2014). Además los resultados sugieren que estas β -glucosidasas podrían estar involucradas en la reparación y remodelación de la pared celular debido al daño que generado por la infección. La presencia de sitios de unión a factores de transcripción GCCGCC (elementos *cis*) han sido reportados que participan en la regulación de genes de respuesta a Jasmonato y respuesta a patógenos (Gomez-Anduro *et al.*, 2011), lo que apoya la hipótesis de que se encuentren implicados en respuesta a Jasmónico ya que es una fitohormona que participa en mecanismos de defensa contra patógenos necrotróficos.

Por otra parte, los análisis para la identificación de motivos estructurales en las regiones revelaron que algunos miembros comparten arquitecturas similares entre los motivos encontrados por ejemplo el motivo1 (color rojo) que contiene el elemento *cis* reconocido por el dedo de zinc característico de los factores de transcripción (TF) tipo DOF AAAG se presenta en al menos 17 promotores de genes β -glucosidasa, por lo tanto se sugiere que este tipo de factores de transcripción podría estar estrechamente relacionado con la regulación de la expresión de estas β -glucosidasa. Además, los promotores de 1, 11 y 9 muestran una arquitectura en tándem alternados entre la cadena líder y la cadena retardada de ADN de estas regiones promotoras. Los análisis bioinformáticos de las regiones promotoras de ZmBGlu2, 5, 7 y 12 mostraron diferentes elementos *cis* implicados en la regulación de la expresión. Dentro de estos elementos *cis* los más abundantes fueron los reconocidos por los FT tipo DOF ocupando de un 40.9 a 51.5 % del total de elementos *cis* en 2000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Los factores de transcripción tipo DOF son una familia de FT que regulan la expresión de genes implicados en diferentes procesos específicos de plantas. Estos FT reconocen las secuencias 5'-(T/A)AAA-3' en los promotores de sus genes blanco. A pesar de que los primeros TF tipo DOF fueron descritos en *Z. mays* por Yanawisagua *et al.* 1997, hasta el 2010 se enunciaban 10 miembros de esta familia de FT (Noguero *et al.*, 2010). En este trabajo se identificaron 45

miembros que contiene la región consenso que forma el dedo de zinc, éste amplio número de miembros probablemente puede ser debido a eventos de duplicación, ya que dentro de la historia evolutiva del maíz, éste ha experimentado en dos ocasiones eventos de duplicación del genoma, uno antes de la divergencia del arroz y el maíz y el otro más recientemente, después de la tetraploidización (Wei *et al.*, 2007). Dos de ellos presentan más de 2 intrones y mantiene baja identidad en el dominio DOF, por lo que probablemente se trate de pseudo-genes u otro tipo de péptido ya que no es característico para otras especies como *B. distachyon* (Hernando *et al.*, 2012).

En este trabajo se desarrolló un método de transformación transitoria en plántulas maíz, usando *A. tumefaciens*, como ha sido descrito para otras especies de plantas como soja, *Arabidopsis* y girasol (Chee *et al.*, 1989; Li *et al.*, 2009; Rao y Rohini, 1999). Se encontró que el híbrido C/05 fue el más susceptible a la infección que el resto de los híbridos, probablemente debido a la variación genética que existe entre estos, como lo refieren algunos autores (Marton, 2013; Butron *et al.*, 2010). Además, los híbridos DK2038 y NS9617 muestran ser más vigorosos que C/05 lo que representa una barrera física para el contacto directo de *A. tumefaciens* y los tejidos vegetales debido a la rápida transición entre los estadios de desarrollo. Cabe señalar que el híbrido C/05 mostró ser la semilla de menor tamaño, y el vigor de las semillas ha sido relacionado con el tamaño de la semilla (Panthee *et al.*, 2005) y se atribuye a que existe una mayor cantidad de proteína en la semilla (Saxena *et al.*, 1987). Por lo tanto, consideramos que C/05 (al mostrar un desarrollo más lento) permite que la semilla sea más susceptible a la infección debido a que el tiempo de contacto entre el tejido vegetal y el cultivo bacteriano se lleva por más tiempo. Por todo esto, los resultados sugieren que la eficiencia de transformación se encuentra determinada por el tiempo de contacto en el co-cultivo como ha sido previamente descrito (Ombori *et al.*, 2013). Otras investigaciones han reportado que los días de co-cultivo así como el fondo genético tienen un efecto significativo en la expresión transitoria. Además, el uso

de acetosiringona en el cultivo y el co-cultivo de *A. tumefaciens* activa fuertemente los genes de virulencia durante la infección en plantas monocotiledóneas (Finer y Dhillon, 2008; Komari *et al.*, 1998) y la suplementación con sacarosa y surfactantes (Silwet L-77) aumenta la eficiencia de la transformación durante el co-cultivo (Clough y Bent, 1998). Al evaluar la expresión del gen *udiA* regulado por los promotores ZmBGlu2, 5, 7 y 12 de maíz en plántulas del híbrido C/05, se observó que los promotores ZmBGlu2 y 5 mantuvieron una alta expresión en las plántulas de maíz. Las plántulas co-cultivadas con *A. tumefaciens* conteniendo las construcciones con los promotores ZmBGlu2 y 5 dirigen la expresión de gen *udiA* que codifica para la enzima β -glucoronidasa, mostraron una actividad equiparable a aquellas que fueron co-cultivadas con bacterias que contenían construcciones con el promotor 35S para la expresión del gen *udiA*. En contrastantemente, las plántulas que fueron transformadas con las construcciones con los promotores ZmBGlu7 y 12 mostraron una actividad similar a la que presentan las plántulas control que fueron co-cultivadas con la bacteria desarmada. Esta actividad endógena ya ha sido previamente descrita en plántulas de maíz (Muhitch, 1998) y en otras especies de plantas (Eudes *et al.*, 2008; Fior y Gerola, 2009). Estos resultados de expresión transitoria se asemejan a los resultados bioinformáticos de expresión consultados para estos genes, donde a pesar de que cada uno de estos miembros aumenta su expresión en estadios tempranos de desarrollo, ZmBGlu2 y 5 mantienen mayores niveles de expresión que ZmBGlu7 y 12. Nuestros resultados de análisis de promotores mostró múltiples elementos *cis* reconocidos por los FT DOF, sin embargo, la arquitectura y localización varía entre cada uno de los promotores. Cominelli *et al.* (2011) han mostrado evidencia acerca de la organización de elementos de reconocimiento por los FT DOF y la regulación de la expresión génica, la cual puede verse afectada por cambios en la posición del sitio de unión en la superficie de los nucleosomas, afectando fuertemente la eficiencia en la interacción con FT DOF (Cavalar *et al.*, 2003).

Los sistemas de transformación transitoria han demostrado ser una alternativa rápida, de bajo costo, segura y eficiente para la producción de proteínas heterólogas (Jin *et al.*, 2015; Komarova *et al.*, 2010), por lo tanto, se probó el potencial de la misma plataforma de transformación transitoria para la producción de una proteína heteróloga de tipo vacunal conocida como el antígeno MAP85B de *M. avium* susp. paratuberculosis. Se consideraron 4 tiempos de cosecha post-inoculación de la bacteria (4, 6, 8, 10) encontrando una mayor producción del antígeno durante los 4 y 6 días post-inoculación (DPI) y posteriormente un decaimiento en la concentración en los días 8 y 10; esta disminución en la producción de proteínas bajo métodos de transformación transitoria ya ha sido reportada en plantas dicotiledóneas (tabaco) a los 10 DPI (He *et al.*, 2014) así como en monocotiledóneas (arroz) (Andrieu *et al.*, 2012) donde se presenta evidencia de ser el resultado del silenciamiento génico pos-transcripcional. Para incrementar la cantidad de biomasa con producción del antígeno se realizó un segundo ensayo de transformación en 5 cajas MAGENTA, que se cosecharon a los 4 DPI, obteniéndose diferentes concentraciones del antígeno; estas variaciones podrían ser atribuidas a la alta heterogeneidad en los estados de germinación ya que se presentó una baja eficiencia de germinación en esta semilla, con resultados similares a los obtenidos en los híbridos DK2038 y NS9617 en los que no se observó homogeneidad en estados de desarrollo, probablemente debido a que el vigor y la eficiencia de germinación en semillas de maíz se ve afectada por del tiempo de almacenamiento y/o genotipo (Revilla *et al.*, 2005). Por lo tanto, este método resulta ser una alternativa rápida para la producción de proteínas heterólogas bajo las condiciones antes mencionadas, aunque es susceptible de ser mejorado considerando parámetros que afecten la transformación transitoria como el tiempo de co-cultivo, la preferencia de uso de codones, la variedad de maíz, las cepas de *Agrobacterium*, entre otros más.

9. CONCLUSIONES

La mayoría de elementos *cis* identificados por análisis bioinformáticos se ubican en las 4 regiones promotoras de los genes ZmBGlu2, 5, 7 y 12. Por lo tanto se sugiere que las variaciones en la posición y arquitectura de estos elementos *cis* son las que determinan la regulación de la expresión en estos casos así como también el fondo genético del organismo productor de la proteína heteróloga.

Los genes evaluados que codifican para β -glucosidasas demostraron ser mayoritariamente regulados por estrés biótico, lo cual confirma su participación en mecanismos de respuesta al ataque por patógenos.

Los promotores intragénicos PZmBGlu2 y pZmBGlu5 permiten la expresión del gen *udiA* en estadios tempranos de germinación y bajo las condiciones de co-cultivo, estos niveles son semejantes a los que se presentan con promotor 35S de CaMV, lo que sugiere que tienen potencial para la expresión de proteínas heterólogas, como el antígeno vacunal MAP85 producido con ésta herramienta en el presente trabajo.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este estudio permiten la posibilidad para investigaciones posteriores que permitan:

- Rediseñar los oligonucleótidos no específicos para el gen que fueron diseñados, y evaluar la sensibilidad de los oligonucleótidos que no mostraron amplificación en templados de muestras de procedencia de diferentes condiciones estrés así como de otras etapas fenológicas de la planta.
- Realizar caracterización de afinidad de manera independiente para cada una de estas enzimas haciendo uso de diferentes sustratos (específicos) para poder corroborar sus posibles funciones.
- Hasta el año 2014 que se realizó la identificación de los TF tipo DOF no se habían reportado más de 10 miembros de esta familia para maíz, sin embargo, las recientes evidencias apuntan a que es una familia mucho más grande, lo cual representa una oportunidad para realizar investigaciones encaminadas en dilucidar el papel que desempeñan dentro de las redes de regulación en las plantas de maíz bajo diferentes estímulos, ya que hasta el momento los más estudiados ha sido los miembros 1, 2 y 3, quedando en interrogante la funcionalidad del resto de los miembros.
- Se obtuvieron anticuerpos específicos para el factor de transcripción ZmDOF1 y ZmDOF2, quedando pendiente los análisis de inmuno-precipitación de la cromatina seguida de secuenciación masiva, para poder inferir los posibles TFBS blanco estos TF, realizando comparaciones con diferentes variedades de maíz, tratamientos de estrés o etapas de desarrollo y obtener información de las posibles redes de regulación de estos elementos.

11. LITERATURA CITADA

- Aceituno F.F., N. Moseyko, S.Y. Rhee, R.A. Gutierrez. 2008. The rules of gene expression in plants: Organ identity and gene body methylation are key factors for regulation of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Bmc Genomics*. 9(1): 1.
- Akhtar M., A. Jaiswal, G. Taj, J.P. Jaiswal, M.I. Qureshi, N.K. Singh. 2012. DREB1/CBF transcription factors: their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. *J. Genet*. 91: 385–395.
- Andrieu, A., J.C. Breitler, C. Siré, D. Meynar, P. Gantet, E. Guiderdoni.. 2012. An in planta, *Agrobacterium*-mediated transient gene expression method for inducing gene silencing in rice (*Oryza sativa* L.) leaves. *Rice*. 5(1): 1–12.
- Baiya S., Y. Hua, W. Ekkhara, J.R. Ketudat-Cairns. 2014. Expression and enzymatic properties of rice (*Oryza sativa* L.) monolignol β -glucosidases. *Plant. Sci*. 227: 101–109.
- Barriere Y., A. Courtial, A.L. Chateigner-Boutin, D. Denoue, J. Grima-Pettenati. 2016. Breeding maize for silage and biofuel production, an illustration of a step forward with the genome sequence. *Plant. Sci*. 242:310–329.
- Bellincampi D., F. Cervone, V. Lionetti 2014. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility. *Front. Plant. Sci*. 5(228):1–8
- Benfey P. N., N.M. Chua. 1992. Plant promoters. US 07/444,591. 1 Aug 1989. 21 pp
- Borghi L. 2010. Inducible gene expression systems for plants. *Methods Mol. Biol*. 655:65–75.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72(1–2):248–254.
- Butler J.E., J.T. Kadonaga. 2002. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev*. 16(20):2583–2592.
- Butron A., Y.C. Chen, G.E. Rottinghaus, M.D. McMullen. 2010. Genetic variation at bx1 controls DIMBOA content in maize. *Theor. Appl. Genet*. 120:721–734.
- Cavalar M., C. Moller, S. Offermann, N.M. Krohn, K.D. Grasser, C. Peterhansel. 2003. The interaction of DOF transcription factors with nucleosomes depends on the positioning of the binding site and is facilitated by maize HMGB5. *Biochemistry*. 42:2149–2157.

- Chang W.C., T.Y. Lee, H.D. Huang, H.Y. Huang, R.L. Pan. 2008. PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *Bmc Genomics*. 9(1):1.
- Chee P.P., K.A. Fober, J.L. Slightom. 1989. Transformation of Soybean (*Glycine max*) by Infecting Germinating Seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol*. 91:1212–1218.
- Chen C. N., C.C. Chu, R. Zentella, S.M. Pan, T. H. David Ho. 2002. AtHVA22 gene family in Arabidopsis: phylogenetic relationship, ABA and stress regulation, and tissue-specific expression. *Plant mol. biol*. 49:631–42.
- Chen X.C., F.J. Chen, Y.L. Chen, Q. Gao, X.L. Yang, L.X. Yuan, F.S. Zhang, G.H. Mi. 2013. Modern maize hybrids in Northeast China exhibit increased yield potential and resource use efficiency despite adverse climate change. *Global Change Biol*. 19:923–936.
- Chikwamba R., J. McMurray, H.X. Shou, B. Frame, S.E. Pegg, P. Scott, H. Mason, K. Wang. 2002. Expression of a synthetic *E-coli* heat-labile enterotoxin B sub-unit (LT-B) in maize. *Mol. Breeding*. 10:253–265.
- Chow C.N., H.Q. Zheng, N.Y. Wu, C.H. Chien, H.D. Huang, T.Y. Lee, Y.F. Chiang-Hsieh, P.F. Hou, T.Y. Yang, W.C. Chang. 2016. PlantPAN 2.0: an update of plant promoter analysis navigator for reconstructing transcriptional regulatory networks in plants. *Nucleic Acids Res*. 44:D1154–D1160.
- Clough S.J., A.F. Bent. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 16:735–743
- Coe E.H., K.R. Sarkar. 1966. Preparation of Nucleic Acids and a Genetic Transformation Attempt in Maize1. *Crop Science*. 6(5):432–435.
- Cominelli E., M. Galbiati, A. Albertini, F. Fornara, L. Conti, G. Coupland, C. Tonelli. 2011. DOF-binding sites additively contribute to guard cell-specificity of AtMYB60 promoter. *BMC. Plant. Biol*. 1(1):1
- Czjzek M., M. Cicek, V. Zamboni, W.P. Burmeister, D.R. Bevan, B. Henrissat, A. Esen. 2001. Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGlu1) beta-glucosidase and a model of its complex with p-nitrophenyl beta-D-thioglucoside. *Biochemical J*. 354:37–46.
- Daxinger L., B. Hunter, M. Sheik, V. Jauvion, V. Gascioli, H. Vaucheret, M. Matzke, I. Furrer. 2008. Unexpected silencing effects from T-DNA tags in Arabidopsis. *Trends Plant Sci*. 13:4–6.
- De Cleene M. 1985. The Susceptibility of Monocotyledons to *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Phytopath*. 113:81–89.

- Escamilla-Treviño L.L., W. Chen, M.L. Card, M.C. Shih, C.L. Cheng, J.E. Poulton. 2006. *Arabidopsis thaliana* β -Glucosidases BGLU45 and BGLU46 hydrolyse monolignol glucosides. *Phytochemistry*. 67:1651–60.
- Esen, A. 1992. Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.) β -glucosidase. *Plant Physiol*. 98(1):174–182.
- Esen, A., C. Cokmus. C. 1990. Maize genotypes classified as null at the glu locus have β -glucosidase activity and immunoreactive protein. *Biochem. genet.* 28(7–8):319–336.
- Eudes A., G. Mouille, J. Thevenin, A. Goyallon, Z. Minic, L. Jouanin. 2008. Purification, cloning and functional characterization of an endogenous beta-glucuronidase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 49:1331–1341.
- Finer J., T. Dhillon. 2008. *Transgenic Plant Production* en: Stewart C.N. (ed). *Plant Biotech Genetics. Plant biotechnology and genetics: principles, techniques and applications*. Wiley. New York. pp 245– 255.
- Fior S., P.D. Gerola. 2009. Impact of ubiquitous inhibitors on the GUS gene reporter system: evidence from the model plants *Arabidopsis*, tobacco and rice and correction methods for quantitative assays of transgenic and endogenous GUS. *Plant Meth.* 5:19.
- Fornalé S., M. Capellades, A. Encina, K. Wang, S. Irar, C. Lapierre, K. Ruel, J.P. Joseleau, J. Berenger, P. Puigdomenech, J. Rigau, D. Caparros-Ruiz. 2012. Altered Lignin Biosynthesis Improves Cellulosic Bioethanol Production in Transgenic Maize Plants Down-Regulated for Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase. *Mol. Plant.* 5:817–830.
- Fromm M.E., L.P. Taylor, V. Walbot. 1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature*. 319:791–793.
- Gilbert N. 2010. Food inside the Hothouses of Industry. *Nature*. 466:548–551.
- Giller, K. E. 2016. *Genetically Engineered Crops: Experiences and Prospects*. National Academies of Sciences, Engineering and Medicine.
- Goff, S. A., D. Ricke, T.H. Lan, G. Presting, R. Wang, M. Dunn, D. Hadley. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science*. 296(5565):92–100.
- Gómez-Anduro G., E. Ceniceros-Ojeda, L. Casados-Vázquez, C. Bencivenni, A. Sierra-Beltrán, B. Murillo-Amador, A. Tiessen. 2011. Genome-wide analysis of the β -glucosidase gene family in maize (*Zea mays* L. var B73). *Plant Mol. Biol.* 77:159–183.

- Goodstein, D. M., S. Shu, R. Howson, R. Neupane, R.D. Hayes, J. Fazo, D.S. Rokhsar. 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 40(D1):D1178–D1186.
- Gordon-Kamm W. J., T.M. Spencer, M.L. Mangano, T.R. Adams, R.J. Daines, W.G. Start, T.B. Rice. 1990. Transformation of Maize Cells and Regeneration of Fertile Transgenic Plants. *Plant Cell.* 2:603–618.
- Gu R., Zhao, Y. Zhang, X. Chen, J. Bao, J. Zhao, Z. Wang, J. Fu, T. Liu, J. Wang, G. Wang. 2006. Isolation of a maize beta-glucosidase gene promoter and characterization of its activity in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep.* 25:1157–1165.
- Guan Z.J., B. Guo, Y.L. Huo, Z.P. Guan, J.K. Dai, Y.H. Wei. 2013. Recent advances and safety issues of transgenic plant-derived vaccines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:2817–2840.
- Guerrero-Andrade O., E. Loza-Rubio, T. Olivera-Flores, T. Fehervari-Bone, M.A. Gomez-Lim. 2006. Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies. *Transgenic Res.* 15:455–463.
- Guilley H., R.K. Dudley, G. Jonard, E. Balázs, K.E. Richards. 1982. Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. *Cell.* 30:763–773.
- Gurr S.J., P.J. Rushton. 2005. Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express it?. *Trends Biotechnol.* 23:283–290.
- Hayden C.A., S.J. Streatfield, B.J. Lamphear, G.M. Fake, T.K. Keener, J.H. Walker, J.D. Clements, D.D. Turner, I.R. Tizard, J.A. Howard. 2012. Bioencapsulation of the hepatitis B surface antigen and its use as an effective oral immunogen. *Vaccine.* 30:2937–2942.
- He, J., H. Lai, M. Engle, S. Gorlatov, C. Gruber, H. Steinkellner, Q. Chen. 2014. Generation and analysis of novel plant-derived antibody-based therapeutic molecules against West Nile virus. *PLoS One.* 9(3):e93541.
- Hernando-Amado S., V. González-Calle, P. Carbonero, C. Barrero-Sicilia. 2012. The family of DOF transcription factors in *Brachypodium distachyon*: phylogenetic comparison with rice and barley DOFs and expression profiling. *BMC Plant Biol.* 12:202.
- Herrera-Estrella L., M.D. Block, E. Messens, J.P. Hernalsteens, M.V. Montagu, J. Schell. 1983. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 2:987–995.

- Holme I.B., T. Wendt, P.B. Holm. 2013. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotech. J.* 11(4):395–407.
- Hood E.E., S.L. Woodard, M.E. Horn. 2002. Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants - myths and realities. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:630–635.
- Hou H., N. Atlihan, J. Lu. 2014. New biotechnology enhances the application of cisgenesis in plant breeding. *Front. Plant Sci.* 5:389
- [http://bar.utoronto.ca/efp_maize/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Sekhon et al Atlas](http://bar.utoronto.ca/efp_maize/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Sekhon+et+al+Atlas). 2011. Maize eFP Browser.
- <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>. 2012. Primer 3.
- <http://faostat3.fao.org/home/E>. 2015. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION.
- <http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/> 2015. PlantPAN 2.0.
- <http://www.cimmyt.org/food-security/>. 2016. International Maize and Wheat Improvement.
- <http://www.maizegdb.org/>. Maize GDB Maize Genetics and Genomics Database.
- <http://www.medicago.com>. 2016. Wrowing Inovative Solutions For Better Health
- <http://www.worldofcorn.com/pdf/WOC-2016.pdf>. 2016. National Corn Growers Association.
- <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>. 2015. JGI Phytozome 11 The plant Genomic Resource.
- Hu J.Z., Y.Y. Ni, B.A. Dryman, X.J. Meng, C.M. Zhang. 2012. Immunogenicity study of plant-made oral subunit vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vaccine.* 30:2068–2074.
- Hua Y., W. Ekkhara, S. Sansenya, C. Srisomsap, S. Roytrakul, W. Saburi, R. Takeda, H. Matsuura, H. Mori, J.R. Ketudat-Cairns. 2015. Identification of rice Os4BGlu13 as a β -glucosidase which hydrolyzes gibberellin A4 1-O- β -d-glucosyl ester, in addition to tuberonic acid glucoside and salicylic acid derivative glucosides. *Arch. Biochem. Biophys.* 583:36–46.
- Iptas S., A.A. Acar. 2006. Effects of hybrid and row spacing on maize forage yield and quality. *Plant Soil Environ.* 52:515–522.
- Ishida Y., H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei, T. Komari, T. Kumashiro. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol.* 14:745–750.

- Jang I.-C., W.-B. Choi, K.-H. Lee, S.I. Song, B.H. Nahm, J.-K. Kim. 2002. High-Level and Ubiquitous Expression of the Rice Cytochrome c Gene *OsCc1* and Its Promoter Activity in Transgenic Plants Provides a Useful Promoter for Transgenesis of Monocots. *Plant Physiol.* 129:1473–1481.
- Javadmanesh S., F. Rahmani, L. Pourakbar. 2012. UV-B Radiation, Soil Salinity, Drought Stress and Their Concurrent Effects on Some Physiological Parameters in Mize Plant. *AEJTS.* 4(4):154–146
- Jin T., J. Wang, X. Zhu, Y. Xu, X. Zhou, L. Yang. 2015. A new transient expression system for large-scale production of recombinant proteins in plants based on air-brushing an *Agrobacterium* suspension. *Biotechnol. Rep.* 6:36–40.
- Karimi M., D. Inze, A. Depicker. 2002. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7:193–195.
- Kaul, S., H.L. Koo, J. Jenkins, M. Rizzo, T. Rooney, L.J. Tallon, C.D. Town. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* 408(6814):796–815.
- Khan N, A. Bano. 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria and Ag-nano particle in the bioremediation of heavy metals and maize growth under municipal wastewater irrigation. *Int. J. Phytoremediation.* 18:211–221.
- Kim H.A., Yang M.S. 2014. Expression of dengue virus EIII domain-coding gene in maize as an edible vaccine candidate. *J. Plant. Biotechnol.* 41:50–55.
- Kim K.-W., V.R. Franceschi, L.B. Davin, N.G. Lewis. 2006. B-Glucuronidase as reporter gene. En: Salinas J., J Sanchez-Serrano (eds.). *Arabidopsis protocols.* Springer. Suiza. pp 263–273.
- Kim M.D., Y.-H. Kim, S.-Y. Kwon, D.-J. Yun, S.-S. Kwak, H.-S. Lee. 2010. Enhanced tolerance to methyl viologen-induced oxidative stress and high temperature in transgenic potato plants overexpressing the CuZnSOD, APX and NDPK2 genes. *Physiol. Plant.* 140:153–162.
- Kim, J., S.H. Shiu, S. Thoma, W.H. Li, S.E. Patterson. 2006. Patterns of expansion and expression divergence in the plant polygalacturonase gene family. *Genome Biol.* 7(9):R87.
- Kinoshita T., S.E. Jacobsen. 2012. Opening the Door to Epigenetics in PCP. *Plant Cell Physiol.* 53:763–765.
- Kizis D., V. Lumberras, M. Pagès. 2001. Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Lett.* 498:187–189.
- Klein T.M., M. Fromm, A. Weissinger, D. Tomes, S. Schaaf, M. Sletten, J.C. Sanford. 1988. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:4305–4309.

- Komari T., Y. Hiei, Y. Ishida, T. Kumashiro, T. Kubo. 1998. Advances in cereal gene transfer. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1:161–165.
- Komarnytsky S., N.V. Borisjuk, L.G. Borisjuk, M.Z. Alam, I. Raskin. 2000. Production of Recombinant Proteins in Tobacco Guttation Fluid. *Plant Physiol.* 124:927–934.
- Komarova, T. V., S. Baschieri, M. Donini, C. Marusic, E. Benvenuto, Y.L. Dorokhov. 2010. Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. *Expert. Rev. Vaccines.* 9(8):859–876.
- Koyama T., T. Ono, M. Shimizu, T. Jinbo, R. Mizuno, K. Tomita, N. Mitsukawa, T. Kawazu, T. Kimura, K. Ohmiya, K. Sakka. 2005. Promoter of *Arabidopsis thaliana* phosphate transporter gene drives root-specific expression of transgene in rice. *J. Biosc. Bioeng.* 99:38–42.
- Koziel M.G., G.L. Beland, C. Bowman, N.B. Carozzi, R. Crenshaw, L. Crossland, J. Dawson, N. Desai, M. Hill, S. Kadwell, K. Launis, K. Lewis, D. Maddox, K. McPearson, M.R. Meghji, E. Merlin, R. Rhodes, G.W. Warren, M. Wright, S.V. Evola. 1993. Field Performance of Elite Transgenic Maize Plants Expressing an Insecticidal Protein Derived from *Bacillus thuringiensis*. *Nat. Biotech.* 11:194–200.
- Kruskal W.H., W.A. Wallis. 1952. Use of Ranks in one-criterion variance analysis. *J. Am. Stat. Assoc.* 47(260):583–621.
- Krysan P.J., J.C. Young, M.R. Sussman. 1999. T-DNA as an Insertional Mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 11:2283–2290.
- Kumar S., D. Alabed, T. Wright, M. Gupta. 2014. Construct and method for synthetic bidirectional plant promoter ubi1. EP20120861436. PCT/US2012/064683. 30 Dic. 2012.
- Lamphear B.J., J.M. Jilka, L. Kesl, M. Welter, J.A. Howard, S.J. Streatfield. 2004. A corn-based delivery system for animal vaccines: an oral transmissible gastroenteritis virus vaccine boosts lactogenic immunity in swine. *Vaccine.* 22:2420–2424.
- Lata C., A. Yadav, M. Prasad. 2011. Role of Plant Transcription Factors in Abiotic Stress Tolerance. En: Shanker A., Venkateswarlu B. (ed). *Abiotic stress Response in Plants Physiological. Biochemical and Genetic Perspectives.* INTECH Open Science. pp 269–290.
- Latchman D. 2010. The Process of Transcription. En: Latchman (ed). *Gene Control.* Garland Science. Quinta edición. pp 95–132.
- Lauria M., V. Rossi. 2011. Epigenetic control of gene regulation in plants. *Biochem. Biophys. Acta.* 1809:369–378.

- Li J.F., E. Park, A.G. von Arnim, A. Nebenfuhr. 2009. The FAST technique: a simplified *Agrobacterium*-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Methods*. 5:6.
- Li k., W. Ramakrishna. 2016. Basic Information. En Kole C., Vice-Chancellor (ed). *Genetics, Genomics and Breeding of Maize*. CRC Press. Boca Raton. pp 1–13.
- Lijun W. 2010. Corn expression vector of tubercle Ag85B gene and application thereof. CN101845456 A. A61P31/06, C12N15/31, A61K39/04, C12N15/82. May 30, 2007. 14 p.
- Ling H., Q. Wu, J. Guo, L. Xu, Que Y. 2014. Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real time quantitative RT-PCR. *PLoS one*. 9(5):e97469.
- Lionetti V., J.P. Metraux. 2014. Plant cell wall in pathogenesis, parasitism and symbiosis. *Front. Plant Sci*. 5:612.
- Liu W.S., J.S. Yuan, C.N. Stewart. 2014. Advanced genetic tools for plant biotechnology. *Nat. Rev. Genet*. 15:781–793.
- Lossl A.G., M.T. Waheed. 2011. Chloroplast-derived vaccines against human diseases: achievements, challenges and scopes. *Plant Biotechnol. J*. 9:817–817.
- Loza-Rubio E., E. Rojas-Anaya, J. Lopez, M.T. Olivera-Flores, M. Gomez-Lim, G. Tapia-Perez. 2012. Induction of a protective immune response to rabies virus in sheep after oral immunization with transgenic maize, expressing the rabies virus glycoprotein. *Vaccine*. 30:5551–5556.
- Luang S., J.I. Cho, B. Mahong, R. Opassiri, Akiyama, T., K. Phasai, Y. Ozeki. 2013. Rice Os9BGlu31 is a transglucosidase with the capacity to equilibrate phenylpropanoid, flavonoid, and phytohormone Glycoconjugates. *J. Biol. Chem*. 288:10111–10123.
- Malekzadeh E., H.A. Alikhani, G.R. Savaghebi-Firoozabadi, M. Zarei. 2012. Bioremediation of cadmium-contaminated soil through cultivation of maize inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria. *Bioremediat J*. 16:204–211.
- Maniatis T., S. Goodbourn, J.A. Fischer. 1987. Regulation of inducible and tissue-specific gene-expression. *Science*. 236: 1237–1245.
- Mann H.B., D.R. Whitney. 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Stat*. 18(1):50–60

- Marton L.C. 2013. Hybrid maize in Hungary is 60 years old. En: Marton C., T. Spitzkó (eds.). 60 Years of Hungarian Hybrid Maize. Pannonian Plant Biotechnology Association. pp 10–16.
- Medina-Córdova N., R. López-Aguilar, F. Ascencio, T. Castellanos, A.I. Campa-Córdova, C. Angulo. 2016. Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). *Biol. Control*. 97:70–79.
- Mettler I. J., P.S. Dietrich, R.M. Sinibaldi. 2000. Nucleic acid construct comprising *Bacillus thuringiensis cry1Ab* gene. US6114608 A. Mar 14, 1997. 24 p.
- Mitsuhara I., M. Ugaki, H. Hirochika, M. Ohshima, T. Murakami, Y. Gotoh, Y. Katayose, S. Nakamura, R. Honkura, S. Nishimiya, K. Ueno, A. Mochizuki, H. Tanimoto, H. Tsugawa, Y. Otsuki, Y. Ohashi. 1996. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous Plants. *Plant Cell Physiol*. 37:49–59.
- Mlotshwa S., G.J. Pruss, Z. Gao, N.L. Mgutshini, J. Li, X. Chen, L.H. Bowman, V. Vance. 2010. Transcriptional silencing induced by Arabidopsis T-DNA mutants is associated with 35S promoter siRNAs and requires genes involved in siRNA-mediated chromatin silencing. *Plant J*. 64:699–704.
- Morant A.V., K. Jørgensen, C. Jørgensen, S.M. Paquette, R. Sánchez-Pérez, B.L. Møller, S. Bak. 2008. B-Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochem*. 69:1795–813.
- Muhitch M.J. 1998. Characterization of pedicel β -glucuronidase activity in developing maize (*Zea mays*) kernels. *Physiol. Plantarum*. 104:423–430.
- Müller A.E., M. Wassenegger. 2004. Control and silencing of transgene expression. En: Christou p. (ed.). *Handbook of Plant Biotechnology*, John Wiley & Sons, Ltd. Capítulo 16.
- Nahampun H.N., B. Bosworth, J. Cunnick, M. Mogler, K. Wang. 2015. Expression of H3N2 nucleoprotein in maize seeds and immunogenicity in mice. *Plant Cell Rep*. 34:969–980.
- Nath P., V.A. Sane, A.P. Sane, P.K. Trivedi. 2006. Plant Gene Expression, Regulation of. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, Wiley-VCH. Verlag. pp 307–357.
- Ng M., M.F. Yanofsky. 2001. Activation of the arabidopsis B class homeotic genes by APETALA1. *Plant Cell*. 13:739–753.
- Noguero M., R.M. Atif, S. Ochatt, R.D. Thompson. 2013. The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. *Plant Sci*. 209:32–45.

- Nuccio M.L., J. Wu, R. Mowers, H.P. Zhou, M. Meghji, L.F. Primavesi, M.J. Paul, X. Chen, Y. Gao, E. Haque, S.S. Basu, L.M. Lagrimini. 2015. Expression of trehalose-6-phosphate phosphatase in maize ears improves yield in well-watered and drought conditions. *Nat. Biotechnol.* 33:862–869.
- Odell J.T., F. Nagy, N.-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature.* 313:810–812.
- Ombori O., J.V.O. Muoma, J. Machuka. 2013. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of selected tropical inbred and hybrid maize (*Zea mays* L.) lines. *Plant. Cell. Tiss. Org.* 113:11–23.
- Opassiri R., B. Pomthong, T. Onkoksoong, T. Akiyama, A. Esen, J.R. Ketudat Cairns. 2006. Analysis of rice glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12 beta-glucosidase. *BMC Plant Biol.* 6:33.
- Orphanides G, D. Reinberg. 2002. A Unified Theory of Gene Expression. *Cell.* 108:439–451.
- Panthee D.R., V.R. Pantalone, D.R. West, A.M. Saxton, C.E. Sams. 2005. Quantitative trait loci for seed protein and oil concentration, and seed size in soybean. *Crop. Sci.* 45:2015–2022.
- Peremyslov V. V., T.C. Mockler, S.A. Filichkin, S.E. Fox, P. Jaiswal, K.S. Makarova, V.V. Dolja. 2011. Expression, splicing, and evolution of the myosin gene family in plants. *Plant Physiol.* 155(3):1191–1204.
- Phillips T. 2008. Regulation of transcription and gene expression in eukaryotes. *Nature Educ.* 1(1):199
- Pniewski T. 2013. The Twenty-year story of a plant-based vaccine against hepatitis B: Stagnation or Promising Prospects?. *Int. J. Mol. Sci.* 14:1978–1998.
- Podevin N., P. du Jardin. 2012. Possible consequences of the overlap between the CaMV 35S promoter regions in plant transformation vectors used and the viral gene VI in transgenic plants. *GM Crops and Food.* 3:296–300.
- Rao K.S., V.K. Rohini. 1999. *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): A simple protocol. *Ann. Bot.* 83(4):347–354.
- Revilla P., P. Velasco, R.A. Malvar, M.E. Cartea, A. Ordás. 2006. Variability among maize (*Zea mays* L.) inbred lines for seed longevity. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 53(4):771–777.
- Rhodes D.A. Pierce, I.J. Mettler, D. Mascarenhas, J.J. Detmer. 1988. Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science.* 240:204–207.
- Rojas M., A. Tiessen, F. Ascencio, C. Angulo, G. Gómez-Anduro. 2015. Two promoters of beta-glucosidase paralogs (ZmBGlu2 and ZmBGlu5) highly

- active in tropical young maize hybrid seedlings. *Plant Mol. Biol. Report.* 33(6):1666–1674.
- Rouyi C., S. Baiya, S.K. Lee, B. Mahong, J.S. Jeon, J.R. Ketudat-Cairns, M. Ketudat-Cairns. 2014. Recombinant expression and characterization of the cytoplasmic rice β -glucosidase Os1BGlu4. *PLoS ONE* 9:e96712
- Sainsbury, F., G.P. Lomonossoff. 2014. Transient expressions of synthetic biology in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 19:1–7.
- Sala F., M.M. Rigano, A. Barbante, B. Basso, A.M. Walmsley, S. Castiglione. 2003. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine.* 21:803–808.
- Saxena K.B., D.G. Faris, U. Singh, R.V. Kumar. 1987. Relationship between seed size and protein content in newly developed high protein lines of pigeonpea. *Plant Food Hum. Nutr.* 36:335–340.
- Schnable P. S., D. Ware, R.S. Fulton, J.C. Stein, F. Wei, S. Pasternak, P. Minx. 2009. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science.* 326(5956):1112–1115.
- Schouten H. J., F.A. Krens, E. Jacobsen. 2006. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO rep.* 7(8):750–753.
- Sekhon R.S., H. Lin, K.L. Childs, C.N. Hansey, C.R. Buell, N. de Leon, S.M. Kaeppler. 2011. Genome-wide atlas of transcription during maize development. *Plant J.* 66:553–563.
- Seshadri S., T. Akiyama, R. Opasiri, B. Kuaprasert, J.K. Cairns. 2009. Structural and Enzymatic characterization of Os3BGlu6, a rice β -glucosidase hydrolyzing hydrophobic glycosides and (1→3)- and (1→2)-linked Disaccharides. *Plant Physiol.* 151:47–58.
- Sessions A., E. Burke, G. Presting, G. Aux, J. McElver, D. Patton, J.D. Clarke. 2002. A high-throughput arabidopsis reverse genetics system. *Plant Cell.* 14:2985–2994.
- Shahmuradov I.A., A.J. Gammerman, J.M. Hancock, P.M. Bramley, V.V. Solovyev. 2003. PlantProm: a database of plant promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 31:114–117.
- Shin M.K., M.H. Jung, W.J. Lee, P.S. Choi, Y.S. Jang, H.S. Yoo. 2011. Generation of transgenic corn-derived *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIIA fused with the cholera toxin B subunit as a vaccine candidate. *J. Vet. Sci.* 12:401–403.
- Sticklen M.B. 2010. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nat Rev Genet.* 11:308–308.

- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731–2739.
- Tiwari S., P.C. Verma, P.K. Singh, R. Tuli. 2009. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnol. Adv.* 27:449–467.
- Torney F., L. Moeller, A. Scarpa, K. Wang. 2007. Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18:193–199.
- Vain P. 2007. Thirty years of plant transformation technology development. *Plant Biotechnol J.* 5:221–229.
- Vigouroux Y., J.C. Glaubitz, Y. Matsuoka, M.M. Goodman, S.G. Jesus, J. Doebley. 2008. Population Structure and Genetic Diversity of New World Maize Races Assessed by DNA Microsatellites. *Am. J. Bot.* 95:1240–1253.
- Wei F., E.D. Coe, W. Nelson, A.K. Bharti, F. Engler, E. Butler, G. Fuks. 2007. Physical and genetic structure of the maize genome reflects its complex evolutionary history. *PLoS Genet.* 3(7):e123.
- Winter D., B. Vinegar, H. Nahal, R. Ammar, G.V. Wilson, N.J. Provart. 2007. An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS one.* 2(8):e718.
- Wright D., D. Read, J. Scholes. 1998. Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant. Cell Environment.* 21:881–891.
- Wu X.L., E.H. Xiong, W. Wang, M. Scali, M. Cresti. 2014. Universal sample preparation method integrating trichloroacetic acid/acetone precipitation with phenol extraction for crop proteomic analysis. *Nat. Protoc.* 9:362–374.
- Xiao K., C. Zhang, M. Harrison, Z.Y. Wang. 2005. Isolation and characterization of a novel plant promoter that directs strong constitutive expression of transgenes in plants. *Mol. Breed.* 15:221–231.
- Xie M.T., Y.H. He, S.S. Gan. 2001. Bidirectionalization of polar promoters in plants. *Nat. Biotechnol.* 19:677–679.
- Xu Z., L. Escamilla-Treviño, L. Zeng, M. Lalgondar, D. Bevan, B. Winkel, A. Mohamed, C.-L. Cheng, M.-C. Shih, J. Poulton. 2004. Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant Mol. Biol.* 55:343–367.
- Yamaguchi N., C.M. Winter, M.-F. Wu, C.S. Kwon, D.A. William, D. Wagner. 2014. PROTOCOL: Chromatin Immunoprecipitation from *Arabidopsis* Tissues.

- En: Millan A. (ed.). The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologist. 12:e0170. pp1-9
- Yanagisawa S. 1997. Dof DNA-binding domains of plant transcription factors contribute to multiple protein-protein interactions. *Eur. J. biochem.* 250(2):403–410.
- Ye X., S. Al-Babili, A. Klöti, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer, I. Potrykus. 2000. Engineering the provitamin A (β -Carotene) biosynthetic pathway into (Carotenoid-Free) rice endosperm. *Science.* 287:303–305.
- Yokoyama R., K. Nishitani. 2001. A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict cis-regulatory regions involved in cell-wall construction in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 42(10):1025–1033.
- Yu H.Y., F.S. Kittur, D.R. Bevan, A. Esen. 2009. Determination of β -glucosidase aggregating factor (BGAF) binding and polymerization regions on the maize β -glucosidase isozyme Glu1. *Phytochem.* 70(11) :1355–1365.
- Zhang N., H.-J. Si, G. Wen, H.-H. Du, B.-L. Liu, D. Wang. 2011a. Enhanced drought and salinity tolerance in transgenic potato plants with a BADH gene from spinach. *Plant Biotechnol. Rep.* 5:71–77.
- Zhang S.Z., G.L. Zhang, T.Z. Rong, L. Pan, P. Zhou, Y.G. Zhang. 2011b. Transformation of two VP1 genes of O- and Asia 1-Type Foot-and-Mouth disease virus into maize. *Agric. Sci China.* 10:661–667.
- Zhang Z., Y. Chen, D. Zhao, R. Li, H. Wang, J. Zhang, J. Wei. 2014. X1-homologous genes family as central components in biotic and abiotic stresses response in maize (*Zea mays* L.). *Funct. Integr. Genomics.* 14:101–110.
- Zhao L., T. Liu, X. An, R.L. Gu. 2012. Evolution and expression analysis of the beta-glucosidase (GLU) encoding gene subfamily in maize. *Genes Genom.* 34:179–187.
- Zhao L., P. Wang, H. Hou, H. Zhang, Y. Wang, S. Yan, Y. Huang, H. Li, J. Tan, A. Hu. 2014. Transcriptional regulation of cell cycle genes in response to abiotic stresses correlates with dynamic changes in histone modifications in maize. *PLoS one.* 9:e106070.
- Zhao L., L. Yuan, R. Gu. 2011. A 40-bp A/T-rich repressor element involved in organ-dependent transcriptional regulation of ZmGLU1. *Plant Cell Tiss. Org.* 105: 291–298.