

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN/RESEARCH ARTICLE

DISEÑO DE CASETES DE EXPRESIÓN QUE CONFIERAN TOLERANCIA A SEQUÍA Y A GLUFOSINATO EN MAÍZ (*Zea mays*)

Design of Expression Cassettes that Confer Drought and Glufosinate Tolerance to Maize (*Zea mays*)

Andrea CARREÑO-VENEGAS¹; Alejandro CHAPARRO-GIRALDO².

^{1,2}Grupo de Ingeniería Genética de Plantas. Departamento de Biología & Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Cra. 30 n°. 45-03, edificio 421, oficina 208. Bogotá, Colombia.

For correspondence. afcarreno@unal.edu.co; achaparrog@unal.edu.co

Received: 1st July 2015, **Returned for revision:** 7th April 2016, **Accepted:** 30 June 2016.

Associate Editor: Adriana Almeida.

Citation/Citar este artículo como: Carreño-Venegas A, Chaparro-Giraldo A. Diseño de casetes de expresión que confieran tolerancia a sequía y a glufosinato en maíz (*Zea mays*). Acta biol. Colomb. 2016;21(3):555-570. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v21n3.51170>

RESUMEN

Como primera aproximación en la obtención de una línea transgénica de maíz tolerante a sequía y al herbicida glufosinato de amonio, se seleccionaron genes y elementos reguladores para el diseño *in silico* de casetes de expresión, a través del análisis de literatura científica y bases de datos de genes y patentes. Las secuencias génicas fueron modificadas con base en el criterio de uso codónico del maíz para optimizar su expresión. Los casetes de expresión diseñados con el software DNA 2.0., fueron sintetizados por una empresa especializada. La presencia del transgen y la expresión a nivel de mRNA fue demostrada mediante PCR y RT-PCR en la planta modelo *Nicotiana benthamiana* transformada vía *Agrobacterium tumefaciens*. Un ensayo preliminar *in vitro* en condiciones simuladas de sequía en medio MS con PEG (PM 6000)10 % no demostró incremento notorio en la tolerancia de las plántulas transformantes, posiblemente debido a que el uso codónico del diseño no favorece la expresión génica en la planta modelo.

Palabras clave: estrés abiótico, tolerancia a herbicida, transgénesis, uso codónico.

ABSTRACT

As a first approach in obtaining a transgenic drought and glufosinate ammonium tolerant maize line, genes and regulatory elements for the *in silico* design of the expression cassettes were selected through analysis of scientific literature and databases of genes and patents. Gene sequences were modified based on the criterion of maize codon usage to optimize their expression. The constructs designed with DNA 2.0 Software, were synthesized by a specialized company. The presence of the transgene and the expression of mRNA was demonstrated by PCR and RT-PCR in the model plant *Nicotiana benthamiana* transformed via *Agrobacterium tumefaciens*. A preliminary experiment *in vitro* under simulated drought conditions in MS medium with 10 % PEG (PM 6000) showed no noticeable increase in drought tolerance of the transformants, possibly because the codon usage of the design does not promote gene expression in the model plant.

Keywords: abiotic stress, codon usage, herbicide tolerance, transgenesis.



INTRODUCCIÓN

El cambio climático es un fenómeno global que ha causado pérdidas económicas en la agricultura, ya que disminuye drásticamente el rendimiento de los cultivos. El Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (Change, 2001) plantea que las zonas agrícolas de mayor riesgo a causa del cambio climático son las sub-tropicales y tropicales. En relación con las áreas agrícolas más secas, se esperan fenómenos de salinización y desertificación causando disminuciones importantes en la productividad de cultivos y ganadería, poniendo en riesgo la seguridad alimentaria (Change, 2001).

El estrés por sequía en plantas, se puede definir como una situación ambiental, en la cual el recurso hídrico es escaso, por lo que la tasa de transpiración excede la toma de agua, llevando a la reducción del potencial hídrico y de la turgencia de la planta; interfiriendo con las funciones normales y desencadenando respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares específicas (Schachtman y Goodger, 2008; Shao *et al.*, 2008; Edgerton, 2009; Ashraf, 2010).

El cultivo de maíz (*Zea mays*) es muy sensible al estrés por déficit de hídrico (Boyer y Westgate, 2004), especialmente las etapas de polinización y desarrollo del embrión se ven muy afectadas por el suministro de agua del suelo (Grant *et al.*, 1989; Bolaños y Edmeades, 1996). La sequía en estas etapas del cultivo tiene un efecto multiplicador sobre el rendimiento, al reducir la formación de reservas causada por dificultades en la polinización o por la detención del crecimiento de óvulos fertilizados (Boyer y Westgate, 1994; Lafitte, 2001). Cuando el maíz florece bajo sequía, se presenta un retraso en la floración femenina o en la emisión de estigmas y un incremento en el periodo entre la floración masculina y femenina, dando lugar al intervalo de antesis y emisión de estigmas (Ngugi *et al.*, 2013).

Los principales productores del grano de maíz son Estados Unidos, China y Brasil con una producción de 273,832, 205,600 y 81,000 toneladas métricas para el 2013, que representan cerca del 37 %, 28 % y 11 % de la producción mundial respectivamente (Statista, 2015). La caída en la producción nacional de los Estados Unidos podría impactar la producción mundial. Para el año 2012, en gran parte del medio oeste de este país, la sequía fue responsable de la reducción de un 15 % en la producción y un 21 % en el rendimiento nacional de maíz, en comparación con los niveles medios de los años 2009 al 2011 (Edmeades, 2013).

La ingeniería genética, que permite la introducción de genes específicos, restringiendo la transferencia de genes no deseados del organismo donador, hace posible que un mismo organismo cuente con diferentes características deseadas a través de la piramidación de genes (Gosal *et al.*, 2009). Es una herramienta valiosa para la introducción de características deseables en plantas, que son difíciles de lograr mediante técnicas convencionales, como es el caso de la tolerancia a sequía, debido a la baja heredabilidad

del carácter (Long y Ort, 2010), o a que no se encuentran naturalmente en estos organismos.

Fueron seleccionados tres genes denominados *TaDREB3* AP2 (Lopato *et al.*, 2006; Morran *et al.*, 2011), *AtZAT10* (Meissner y Michael, 1997; Mittler *et al.*, 2006) y *CspB* (Willimsky *et al.*, 1992; Castiglioni *et al.*, 2008), que pueden conferir tolerancia a sequía.

Todos los DREB/CBFs pertenecen a la superfamilia de factores de transcripción (FTs) AP2/ERF, que es específica de plantas, y que son considerados los principales FTs involucrados en la regulación de la expresión de genes inducidos por deshidratación y frío. Sin embargo también cumplen papeles importantes en el desarrollo de semillas, hojas y flores (Long y Ort, 2010; Yang *et al.*, 2010). DREB/CBF hacen parte de los FTs que responden a deshidratación, pero no al ácido abscísico (ABA). Se unen específicamente a elementos *DRE*, identificados por primera vez en el promotor del gen *RD29A* de *Arabidopsis* (Yamaguchi-Shinosaki y Shinosaki, 1994). Seis factores de transcripción DREB que incluyen cuatro genes *DREB1/CBF* y dos genes *DREB2* fueron identificados en *Arabidopsis*. La expresión de *DREB1/CBFs* es inducida por sequía, sal y frío, mientras que la expresión de *DREB2* es únicamente inducida por sequía y sal (Liu *et al.*, 1998; Sakuma *et al.*, 2006b; Morran *et al.*, 2011). Diferentes estudios han informado mejora en la tolerancia a sequía mediante transformación genética en plantas cultivadas con tales factores de transcripción, en tomate (*Solanum lycopersicum*) (Hsieh *et al.*, 2002), trigo (*Triticum aestivum*) (Pellegrineschi *et al.*, 2004; XiaoYan *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006), maíz (Al-Abed *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010) y arroz (*Oriza sativa*) (Oh *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2009); sin embargo, uno de los principales inconvenientes en transformación genética de plantas con *DREB/CBF* han sido los defectos en el crecimiento cuando se expresa constitutivamente, lo cual se ha minimizado mediante el uso de promotores inducibles por estrés.

El gene *ZAT10*, forma parte de un grupo de supresores transcripcionales de la familia génica C_2H_2 de dedos de zinc que se caracteriza por contener un dominio de represión amfifílico (EAR) asociado-ERF, involucrado en la modulación la respuesta de defensa de las plantas al estrés abiótico a través de la regulación transcripcional de diferentes genes reporteros y de defensa (Meissner y Michael, 1997; Ohta *et al.*, 2001; Englbrecht *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2004; Ciftci-Yilmaz y Mittler, 2008). *ZAT10* puede unirse al promotor de *RD29A* (un gen clásico de respuesta a estrés) y reprimir su transcripción (Sakamoto *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002). Se ha asociado estrechamente con respuesta a estrés oxidativo en plantas (Rizhsky *et al.*, 2004; Davletova *et al.*, 2005; Mittler *et al.*, 2006) y se sugiere que juega un papel clave en regulación positiva y negativa de la defensa en plantas a determinados estreses abióticos. Su papel principal involucra la modulación de la respuesta a especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés), ya sea a

través de la activación directa de la transcripción de genes de respuestas de ROS a través de la supresión de represores de estos genes incrementando la tolerancia de las plantas a estrés abiótico (Mittler *et al.*, 2006). La expresión constitutiva de la proteína ZAT10 C2H2-EAR en *Arabidopsis* incrementa la expresión de *FSD1* (ferro-superoxido dismutasa) y *APX2* (ascorbato peroxidasa), pero no parece estar involucrada con la expresión de otros transcritos de respuesta a sal, frío o sequía. Adicionalmente confiere mayor tolerancia a salinidad, calor y estrés osmótico (Mittler *et al.*, 2006).

Genes que codifican para proteínas que actúan como chaperonas moleculares tipo *heat-shock protein* de origen vegetal y *cold shock protein* (Csp) de origen bacteriano (*Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*), han permitido mayor tolerancia a estrés por sequía tanto en plantas cultivadas como en plantas modelo, mediante ingeniería genética. Las Csp son una familia de proteínas pequeñas, altamente conservadas en su estructura, con masa molecular de aproximadamente 7,4 kDa. Son capaces de unirse a una sola cadena del ADN o ARN, a través de los motivos de unión a ácidos nucleicos RNP1 y RNP2. La unidad estructural característica de estas proteínas es el dominio cold shock (CSD) que puede ser hallado en otras proteínas involucradas en regulación transcripcional que se encuentran en una variedad de organismos, desde bacterias a vertebrados (proteínas Y-box) (Horn *et al.*, 2007). CspA y CspB bacterianas han sido expresadas en *Arabidopsis*, arroz (*Oriza sativa*) y maíz (*Zea mays*), confiriendo incremento en la tolerancia a sequía, frío y calor a través de la protección y el favorecimiento del crecimiento vegetativo, fotosíntesis, y desarrollo reproductivo (Castiglioni *et al.*, 2008). El gen *CspB* es el único hasta el momento, con el que se ha logrado el primer cultivo comercial de maíz tolerante a sequía (Droughtgard™ con el evento MON87460). Su papel en la tolerancia en plantas se atribuye principalmente a su actividad como chaperona RNA (Edmeades, 2013; James, 2014). Tal actividad difiere de lo observado con otras proteínas chaperonas que usualmente ayudan a formar correctamente estructuras secundarias y terciarias después de desestabilizar las estructuras secundarias equivocadas, puesto que al parecer las Csp sólo destruyen estructuras secundarias no deseadas (Horn *et al.*, 2007).

La variación en el manejo de la densidad de las plantas y control de malezas, son prácticas agrícolas, que además de la irrigación, pueden alterar substancialmente la cantidad de agua capturada por la planta, determinando la disponibilidad de agua para la transpiración (Edmeades, 2013), dicha disponibilidad podría favorecerse en cultivos tolerantes a herbicidas. La tolerancia a glufosinato de amonio en plantas se ha conseguido por medio de ingeniería genética, transfiriendo el gen bacteriano *pat* o *bar*, que codifican la enzima fosfinotricina *N-acetil-transferasa* (PAT), capaz de inactivar el ingrediente activo del glufosinato de amonio (fosfinotricina), que en plantas no transformadas,

bloquea la enzima glutamina sintetasa, involucrada en el metabolismo del nitrógeno y en la detoxificación de amonio, llevando a la planta a la muerte por intoxicación debido a la acumulación de niveles letales de amonio y deficiencia en la síntesis de proteínas (De Block *et al.*, 1987).

En el presente estudio, se diseñaron *in silico* tres casetes de expresión que contienen un gen que pueden conferir tolerancia a sequía y el gen *bar* que confiere tolerancia a glufosinato de amonio. La integración de los casetes de expresión y la presencia de los transcritos correspondientes (mRNA) a las regiones codificantes fueron evaluados en planta modelo *N. Benthamiana*, transformada vía *A. tumefaciens*. Los resultados de este estudio, son preliminares en el desarrollo y obtención futura de líneas de maíz comerciales con dichas características.

MATERIALES Y MÉTODOS

Búsqueda y selección de genes de tolerancia a sequía y a glufosinato de amonio

Los genes usados en el diseño de los casetes de expresión, fueron seleccionados a partir de literatura científica con base en la pertinencia de los estudios y los resultados obtenidos. Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, fueron obtenidas a partir de la base de datos de patentes *The Lens* (<https://www.lens.org/lens/>) y/o el Centro Nacional de Información sobre Biotecnología de los Estados Unidos (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

Se revisaron 105 artículos científicos de transgénesis sobre tolerancia a sequía en plantas modelo y plantas cultivadas, incluido el maíz (*Zea mays*). Estos estudios fueron consultados en la base de datos de la Universidad Nacional de Colombia, principalmente en: Academic Search Complete, Science Direct, Springer Journal, Journal Storage y Nature.com, entre el periodo 1995 a 2013. En general se tuvo en cuenta el papel del gen en la tolerancia a sequía y los parámetros fisiológicos disponibles con los que se evaluó la tolerancia: capacidad germinativa en condiciones de sequía o condiciones similares (en suelo o *in vitro*), daño celular, actividad fotosintética, potencial osmótico, fenología y rendimiento.

Los genes seleccionados de tolerancia a sequía para el diseño de los casetes de expresión fueron *TaDREB3* AP2 (Lopato *et al.*, 2006) *AtZAT10* (Meissner y Michael, 1997) y *CspB* (Willimsky *et al.*, 1992), que provienen de trigo (*Triticum aestivum*), *Arabidopsis thaliana*, y *Bacillus subtilis*, respectivamente. Teniendo en cuenta como criterios de selección: i) fuerte evidencia empírica sobre tolerancia a sequía, de acuerdo a parámetros fisiológicos evaluados en ensayos *in vitro*, invernadero o campo; ii) valores de rendimiento en campo para el caso de las plantas cultivadas; iii) ausencia de efectos pleiotrópicos no deseados o productos génicos que actúen en partes altas de las vías de señalización de estrés; y iv) estudios más recientes. Por otra parte, el gen *bar* fue elegido debido a que se ha usado como marcador de selección en medio de cultivo, se encuentra en

cultivos comerciales tolerantes a glufosinato y se ha probado en maíz (patente US6395966B1).

Diseño y síntesis de casetes de expresión

Los componentes básicos de los casetes de expresión comprenden una secuencia promotora, un marco de lectura abierto (de las siglas en inglés ORF), y una región terminadora no traducida 3' que en eucariotas, generalmente contiene un sitio de poliadenilación (Cai *et al.*, 2007). Cada uno de los tres casetes de expresión diseñados (*CspB+bar*, *TaDREB3+bar*, *AtZAT10+bar*), contiene dos constructos, uno que confiere tolerancia a sequía y otro a glufosinato de amonio con sus respectiva región promotora y terminadora, además una región no codificante ubicada en el medio (Fig. 1).



Figura 1. Composición general de los casetes de expresión diseñados para tolerancia a sequía y glufosinato de amonio.

Cada una de las secuencias génicas se diseñaron, dirigidas por un promotor constitutivo de la siguiente manera: *i) CspB*, dirigido por CaMV35s potenciado, y una secuencia líder se petunia (E35S+Pleader), *ii) AtZAT10*, dirigido por la región promotora de la Ubiquitina de maíz Ubi-1 y *iii) bar*, dirigido por CaMV 35S. El gen *TaDREB3* fue dirigido por el promotor inducible por sequía rab17. La región terminadora de *CspB* y *TaDREB3* fue el terminador de la RuBisCo (Trub), mientras que la región terminadora de *AtZAT10* y *Bar* fue el de nopalina sintasa (Tnos). En todos los casos, para separar el constructo del gen que confiere tolerancia a sequía del constructo del gen *bar*, se introdujo una región no codificante (intrón) de cloroplasto de *Acer pseudoplatanus* (Taberlet *et al.*, 1991), que cumple el papel de espaciador. A continuación se muestra la composición detallada de cada uno de los constructos: el número de identificación (# ID) en el GenBank de las secuencias nucleotídicas (promotoras-codificantes-terminadoras) y aminoacídicas, el tamaño en pares de bases (completa/ORF) y aminoácidos, respectivamente (Tab. 1, 2, 3 y 4).

El diseño *in silico* se hizo con el programa Gen Designer 2.0, de uso libre (Villalobos *et al.*, 2006; DNA 2.0, Inc.). El

Tabla 1. Composición del constructo BAR, que confiere tolerancia a glufosinato de amonio y está presente en todos los casetes de expresión.

Constructo	Promotor		Gen Tol glufosinato de amonio		Terminador	
	CaMV 35S		bar		Tnos	
Bar	# ID	S51061.1	# ID gen y tamaño	AR372747 (615pb)	# ID y tamaño	HC510454.1
	tamaño	210 pb	Tamaño ORF	552pb		
			# ID proteína y tamaño	CAA35093.1		

Tabla 2. Composición del casete de expresión diseñado CspB que pueden llegar a conferir tolerancia a sequía.

Promotor		Gen Sequia		Terminador	Tamaño total incluyendo casete de expresión bar
E35S+Pleader		CspB			
# ID	HC051893.1,	# ID gen y tamaño	X59715.1 (660pb)	Trub	3232pb
		Tamaño ORF	204 pb		
Tamaño	1156pb	# ID proteína y tamaño	CAA42235.1 (67 A.A)	# ID y tamaño	HC510453 (643pb)

Tabla 3. Composición del casete de expresión diseñado TaDREB3 que pueden llegar a conferir tolerancia a sequía.

Promotor		Gen Sequia		Terminador	Tamaño total incluyendo casete de expresión bar
rab17+Pleader		TaDREB			
# ID	JA780212.1	# ID gen y tamaño	DQ35385. (1004pb)	Trub	3178pb
		Tamaño ORF	675pb		
tamaño	628pb	# ID proteína y tamaño	ABC86564.1 (224 A.A).	# ID y tamaño	HC510453 (643pb)

Tabla 4. Composición del casete de expresión diseñado AtZAT10 que pueden llegar a conferir tolerancia a sequía.

Promotor		Gen Sequia		Terminador	Tamaño total incluyendo casete de expresión <i>bar</i>
Ubi1		AtZat10			
# ID	JX947345.1	# ID gen y tamaño	X98671.1 (1231 pb)	Tnos	4185pb
tamaño	2015pb	Tamaño ORF	684 pb	HC510454.1 (253pb)	
		# ID proteína y tamaño	CAA67229.1 (227A.A)	# ID y tamaño	

diseño incluyó: *i*) Obtención del marco de lectura abierto (ORF) que fue comprobado a través de la herramienta “ORF finder” del NCBI; *ii*) Comparación de la secuencia de aminoácidos que codifica la secuencia ORF diseñada versus la secuencia de aminoácidos correspondiente, obtenida en el NCBI o en la patente (EMBL-EBI, 2015); *iii*) Optimización de la región codificante de acuerdo al uso codónico de *Zea mays*, bajo la opción “DNA/ Guide Random (Puigbo *et al.*, 2007; OPTIMIZER, 2007); *iv*) Adición de sitios de restricción dentro de los casetes de expresión, que permitan aislar secuencias de interés del casete o hacer mapas de restricción; *v*) reconfirmación del ORF, posterior a la adición de los sitios de clonación y *vi*) reconfirmación de la identidad usando la herramienta Blastx (BLAST®). Las secuencias diseñadas mediante bioinformática, fueron sintetizadas químicamente y transferidas al vector de clonación pCAMBIA 1301 por la empresa GENEray Biotechnology en Shanghai, China.

Transformación y caracterización fenotípica/ molecular de cepas recombinantes

La transformación de las cepas bacterianas comerciales DH5A de *E. coli* (One shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli*, de invitrogen), y LBA4404 de *A. tumefaciens*, se realizó a través de electroporación, con el propósito de clonar cada uno de los casetes de expresión y aislar suficiente ADN plasmídico. Se almacenaron muestras de cepas recombinantes de *E. coli* y *A. tumefaciens* a -80 °C, para los ensayos de transformación genética de plantas. Las cepas bacterianas posiblemente transformadas, fueron caracterizadas fenotípicamente. *Escherichia coli*, fue cultivada por agotamiento en medio de LB sólido con el antibiótico de selección kanamicina, teniendo en cuenta que plásmido pCAMBIA 1301 contiene un gen de resistencia a este antibiótico, mientras que *A. tumefaciens* fue seleccionado con kanamicina y estreptomycin (0,05 mg/ml), el uso del segundo antibiótico se estableció teniendo en cuenta la resistencia cromosómica que expresa la bacteria.

La caracterización molecular se llevó a cabo mediante PCR de colonias utilizando pares de cebadores diseñados con el programa Primer3Plus (Rozen y Skaletsky, 2000) de acuerdo a las secuencias nucleotídicas de cada gen. *CspB* cuyo amplicón esperado es de 152 pb (5'-GGGAAGGTCAAGTGGTTCAA-3' y 5'-CCCTCCACAATCTCAAAGGA-3'), *TaDREB3* cuyo amplicón esperado es de 181 pb (5'-GACCCCGCCACTTTAAGAAC-3' y

5'-CCCCGTACATTGCGTAAGAA-3'), *AtZAT10* cuyo amplicón esperado es de 212 pb (5'-TCGTACAAGTGCTCCGTTTG-3' y 5'-TGACCGCTAGGGAACTCTT-3') y *bar* (5'-TTTGCACCA TCGTCAATCAT-3' y 5'-TCGTGCATCCTCACACTAGG-3') cuyo amplicón esperado es de 352 pb. Las colonias que fueron positivas para PCR, se subcultivaron en medio LB y el antibiótico de selección respectivo.

Transformación de plantas

Plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) transformadas independientemente con los casetes de expresión *CspB*, *TaDREB3* y *AtZAT10*, a través de *A. tumefaciens*, de acuerdo con un protocolo básico de transformación que involucra seis pasos principales: *i*) densidad óptica (DO a 600 nm) de la suspensión bacteriana de *A. tumefaciens* entre 0.05-0.1; *ii*) explantes de hoja de 1 cm x 1cm aproximadamente (50 o más explantes por ensayo), sumergidos por dos minutos en el cultivo bacteriano agitando suave y constantemente a 30 rpm; *iii*) secado y siembra de los explantes en medio de cocultivo (Sales Murashige-Skoog (1962) + Bencilaminopurina (BAP) 1 mg/l + acetociringona 200 uM), durante 24 horas en oscuridad en cuarto de crecimiento (70 % de humedad relativa (HR) y 28 °C); *iv*) lavados de los explantes para eliminar *A. tumefaciens* con antibiótico; *v*) siembra de explantes en medio de selección (MS + BAP + carbenicilina 500 mg/l + Fosfotricina (PPT) 0,8 mg/l (Jiménez, 2014) o 2 mg/l (De Block *et al.*, 1987) durante cuatro semanas aproximadamente, con un cambio de medio a la segunda semana; y *vi*) siembra de brotes en medio de elongación (MS); el medio MS se compone de sales MS 4g/l, vitamina Gamborg B-5 1ml/l, sacarosa 30 g/l y gelzan (Gelrite®) 2,5g/l, como agente gelificante.

Tanto la selección como la elongación se llevaron a cabo en cuarto de crecimiento (70 % HR, 28 °C, 16/8 fotoperiodo). Todos los ensayos de transformación contaron con controles de explantes no cocultivados con la bacteria (no transformados) en medio de regeneración sin selección y en medio de regeneración con selección; para un total de 25 explantes control en medio de selección y en medio sin selección, respectivamente. Se realizaron algunas modificaciones al protocolo base, debido a los altos niveles de contaminación por la bacteria. Respecto a los lavados de los explantes para la eliminación de *A. tumefaciens*, el

protocolo inicial sugería tres lavados por 60 minutos cada uno en medio MS líquido con o sin antibiótico; el primero en medio MS, el segundo y tercero en MS + cefotaxime (500mg/ml) y el tercero igual al anterior. Se modificó a cinco lavados consecutivos de diez minutos con MS, 30 minutos con MS, dos lavados de 60 minutos cada uno con MS + cefotaxime 500 mg/l y 30 minutos con MS + cefotaxime 500 mg/l, tales modificaciones permitieron solucionar el problema de contaminación por *A. tumefaciens*. Otra modificación fue el uso de carbenicilina en vez de cefotaxime en el medio de elongación (Horsch *et al.*, 1985; Silva y Fukai, 2001).

Caracterización molecular de *N. benthamiana* mediante PCR y RT-PCR

Plántulas regeneradas en medios de selección con PPT a partir de ensayos de transformación independientes con los casetes de expresión correspondientes a *CspB*, *TaDREB3* y *AtZAT10*, fueron evaluadas mediante PCR con el kit KAPA3G (KAPABIOSYSTEMS) que permite realizar la PCR directamente con el tejido de hoja, con lo que se determinó la presencia o ausencia del transgen. Nuevos cebadores fueron diseñados con el programa Primer3Plus (Rozen y Skaletsky, 2000) de acuerdo a las secuencias nucleotídicas de cada gen. *CspB* cuyo amplicón esperado es de 200 pb (5'-ATGCTCGAAGGGAAGGTC-3' y 5'-GCCTCCTTTGTCACATTAGCA-3'), *TaDREB3* cuyo amplicón esperado es de 459 pb (5'-GACAGCCGAACAAAAAGTCC-3' y 5'-AAAGTGCCACATCTCCTGCT-3'), *AtZAT10* cuyo amplicón esperado es de 674 pb (5'-GGCGCTAGAGGCTCTGACTA-3' y 5'-GCAGTTTCACTGGGAAGTCG-3') y *bar* (5'-TCGTAATGCGTACGACTGGA-3' y 5'-GATCATTAGGCAGCCGATA-3') cuyo amplicón esperado de 158 pb. De las plántulas caracterizadas como PCR positivas, se eligió por casete de expresión, al azar entre cinco a siete, de acuerdo con el material disponible. Con el fin de comprobar o no la expresión a nivel de mRNA, a dichas plántulas se les realizó RT-PCR. Hojas de plantas elongadas de tres semanas de edad contados a partir del paso de los brotes al medio de elongación fueron utilizadas para la extracción de ARN mediante el kit de NORGEN BIOTEK-CORP. El ARN fue sometido a tratamiento con DNase I, RNase-free (Thermo Scientific) y posteriormente se comprobó mediante PCR la ausencia de ADN en las muestras. A continuación se sintetizó cADN con el kit First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) y a partir de este, se realizaron las PCRs correspondientes. Los primers utilizados en la PCR de ARN tratado con DNase I y cADNs son los mencionados anteriormente, correspondientes a cada casete de expresión; a excepción de los cebadores para amplificar un fragmento de 114 pb de actina (5'-TCCTGATGGCAAGTGATTAC-3' y 5'-TTGTATGTGGTCTCGTGGATTC-3'), diseñados por Liu *et al.*, (2012) que fueron usados solamente en la PCR de RNA de las muestras *CspB* (2, 31, 3, 15, 40, 58 y 67) y *DREB* (9, 12, 25, 47 y 48) y para el control de la PCR de los cADNs. Por otra parte, teniendo en cuenta que el casete de expresión *TaDREB3* fue diseñado con un promotor inducible por sequía,

se obtuvo cADN de plantas *TaDREB3* elongadas en medio MS y en medio MS + PEG (PM 6000) 10 %, que simula el estrés por sequía.

Evaluaciones fenotípicas *in vitro*

En el primer ensayo de transformación, la selección se llevó a cabo con 0,8 mg/l de PPT (Jiménez, 2013). En el ensayo con *CSPB* se tomó la mayor cantidad de brotes PPT resistentes, varios por explante. En el ensayo con *TaDREB3* y con *AtZAT10* se tomó un único brote por explante, con el propósito de asegurar eventos de transformación independientes. Para corregir el efecto de escapes por baja presión de selección, se repitió el ensayo de transformación *AtZAT10* incrementando la concentración del PPT a 2 mg/l.

Las pruebas fenotípicas para estrés por sequía *in vitro* se realizaron durante 20 días, con plántulas positivas para PCR y RT-PCR que expresan *CspB*, *TaDREB3* y *AtZAT10* cultivadas en medio MS + PEG10% (PM 6000), al mismo tiempo que plántulas control no transformadas (Shen *et al.*, 2002). Estas plantas se mantuvieron en cuarto de crecimiento en condiciones de 70 % humedad relativa, 28 °C de temperatura y fotoperiodo de 16/8. Cuando hubo necesidad de realizar análisis estadístico se usó el Z-Test ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Diseño de genes semisintéticos

Los casetes de expresión *CspB*, *TaDREB3* y *AtZAT10*, diseñados *in silico* corresponden a un total de 3,232 pb, 3,178 pb y 4,185 pb, respectivamente, incluyendo los sitios de restricción introducidos, la región espaciadora que separa los dos casetes de expresión, y ocho nucleótidos adicionales en ambos extremos de cada uno de los casetes de expresión para facilitar su inserción en el plásmido (Tab.1,2,3 y 4).

Usando la herramienta, marco abierto de lectura (ORF de sus siglas en inglés) del software Gen Designer 2.0, se identificó el ORF respectivo, se eligió la longitud nucleótidos correspondiente a la secuencia de la proteína obtenida en el NCBI o en patentes. A través de la herramienta "ORF finder" del NCBI se corroboró que el ORF de cada uno de los genes fuese el correcto. La comparación de la secuencia de aminoácidos que codifica la secuencia ORF diseñada, denominada como aminoácidos diseñados (AD), versus la secuencia de aminoácidos patrón, a través de un Clustal-W (EMBL-EBI, 2015) demostró un 100 % de identidad y similaridad y 0 % de *gaps* para el casete de expresión *AtZAT10*. Sin embargo, para *CspB* al inicio de la secuencia de la proteína presento una diferencia de ocho aminoácidos adicionales en comparación con la secuencia patrón, identificada en el Gen Bank como CAA42235.1, (con 67 aminoácidos), por lo tanto, se escindieron los primeros ocho codones de la secuencia de ADN, y de esta manera se logró la correspondencia de las secuencias aminoacídicas. De igual manera se escindió el primer codón para de la secuencia de ADN de *TaDREB3*, ya que se presentó

un aminoácido adicional en comparación con la secuencia patrón. Con dichas modificaciones fue posible obtener un 100 % de identidad y similaridad y 0 % de *gaps* en todos los Clustal-W, adicionalmente se reconfirmó que el ORF no se cambiara después de las modificaciones.

La optimización de la región codificante de acuerdo al uso codónico de *Z. mays*, se realizó a través de la herramienta OPTIMIZER (OPTIMIZER, 2007), bajo la opción de criterio de optimización “DNA/ GuideRandom” (Puigbo *et al.*, 2007), teniendo en cuenta el G/C % y A/T %, índice de adaptación codónica (CAI) y número efectivo de codones (ENc). El CAI, mide el sesgo del uso codónico de un gen en relación a un conjunto de codones “óptimos” determinados a partir de un conjunto de referencia de genes de alta expresión, normalmente proteínas ribosomales (Sharp y Li, 1987). Los valores CAI se encuentran entre 0, cuando el uso codónico de una secuencia respecto al conjunto de referencia son muy diferentes, y uno, cuando ambos usos codónicos son iguales, mientras que los valores de ENc se encuentran en un rango de 20 (si solo un codón por aminoácido es usado) a 61 (si todos los codones sinónimos son usados igualmente) (Puigbo *et al.*, 2007). Se les dio prioridad a los valores CAI, teniendo en cuenta que estos no fueran mayores a 0,8 y a los valores G/C % cercanos a 54,98, de acuerdo con la tabla de uso codónico de Kasusa, para *Z. mays* (Nakamura *et al.*, 2000; Codon Usage Data Base, 2007). La secuencia optimizada del gen *CspB* de 204 nucleótidos; tiene 151 coincidencias, 36 transiciones (purina<_>purina/ primidina<_>pirimidina) y 17 transversiones (purinas<_>pirimidinas), respecto a la secuencia no optimizada (*query*). La secuencia optimizada del gen *TaDREB3* de 675 nucleótidos, tiene 517 coincidencias, 62 transiciones y 96 transversiones, respecto a la secuencia no optimizada. La secuencia optimizada del gen *AtZAT10* de 684 nucleótidos, tiene 497 coincidencias, 83 transiciones y 104 transversiones respecto a la secuencia no optimizada. Para todos los casetes de expresión se introdujo la misma secuencia del gen *bar* optimizada.

Tras la adición de sitios de restricción dentro del casete de expresión, que permiten aislar secuencias de interés del casete o hacer mapas de restricción; se realizó la reconfirmación del ORF del casete de expresión completo, que arrojó un marco de lectura correcto, tanto para el gen de tolerancia a sequía como para el gen de tolerancia a glufosinato de amonio. Finalmente la identidad de las secuencias nucleotídicas de los casetes de expresión completos fueron confirmadas a través Blastx (BLAST®), demostrándose 100 % de identidad en correspondencia a la descripción de la función de cada gen.

Caracterización fenotípica y molecular de las cepas recombinantes

Posterior a la transformación de las bacterias *E. coli* y *A. tumefaciens*, se realizó la siembra por agotamiento en el

medio de selección. Las colonias que fueron sometidas al análisis de PCR, se subcultivaron en medio LB sólido, con el antibiótico de selección respectivo. El crecimiento de estas colonias en medio de selección, se considera la prueba fenotípica, puesto que no se evidenció crecimiento de bacterias no transformadas, cultivadas en el mismo medio de selección (control). Colonias de *E. coli* y de *A. tumefaciens* que fueron subcultivadas en medios de selección, resultaron positivas para PCR, amplificando los fragmentos predichos de los genes *CspB* (152 pb), *TaDREB3* (181 pb) y *AtZAT10* (212 pb), contenidos en los vectores de transformación, usados en los experimentos. Se observó que, para ambas cepas recombinantes, se presentó el mismo patrón de bandas en los análisis de electroforesis; las colonias transformadas con cada uno de los plásmidos también fueron PCR positivas para el gen *bar* (Fig. 2). Se consideran colonias positivas, cuando la banda correspondiente a los amplicones visualizada en la electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, corresponde al tamaño predicho de 352 pb para *bar*.

Transformación de plantas de *N. benthamiana*, caracterización molecular y fenotípica

Se obtuvo un alto porcentaje de regeneración a partir de los explantes cocultivados y transferidos a medios de regeneración con selección por PPT, así como a partir de los explantes no cocultivados transferidos a medios de regeneración sin selección (control). De acuerdo con el resultado del Z-Test ($p < 0,05$), se determinó que no hay diferencias significativas en el número de explantes que regeneraron plántulas, entre los dos grupos mencionados anteriormente, para cada uno de los casetes de expresión, correspondientes a ensayos independientes. Todos los explantes no cocultivados transferidos a medios de regeneración con selección, se tornaron blancos y no regeneraron plántulas.

Con el fin de determinar la presencia o la ausencia de los transgenes (*CspB+bar*, *TaDREB3+bary* *AtZAT10+bar*), se realizó la caracterización molecular mediante PCR con el kit KAPA directamente sobre el tejido de hoja, con plántulas obtenidas a partir de explantes cocultivados con *A. tumefaciens*. En el primer ensayo de transformación con selección de 0,8 mg/l de PPT (Jiménez, 2013), con *CSPB* se obtuvieron 52 % de plántulas PCR positivas, a partir de brotes cosechados que no fueron discriminados por explante. Con *TaDREB3* y con *AtZAT10* se obtuvieron 15 % y 0 % de plántulas PCR positivas respectivamente, seleccionando un solo brote por explante. En el segundo ensayo de transformación con *AtZAT10* donde se incrementó la concentración de PPT a 2 mg/l (De Block *et al.*, 1987), se logró incrementar el porcentaje de plántulas PCR positiva (Tab. 5).

De acuerdo con el resultado del Z-Test ($p < 0,05$), hay diferencias significativas entre el número de plantas

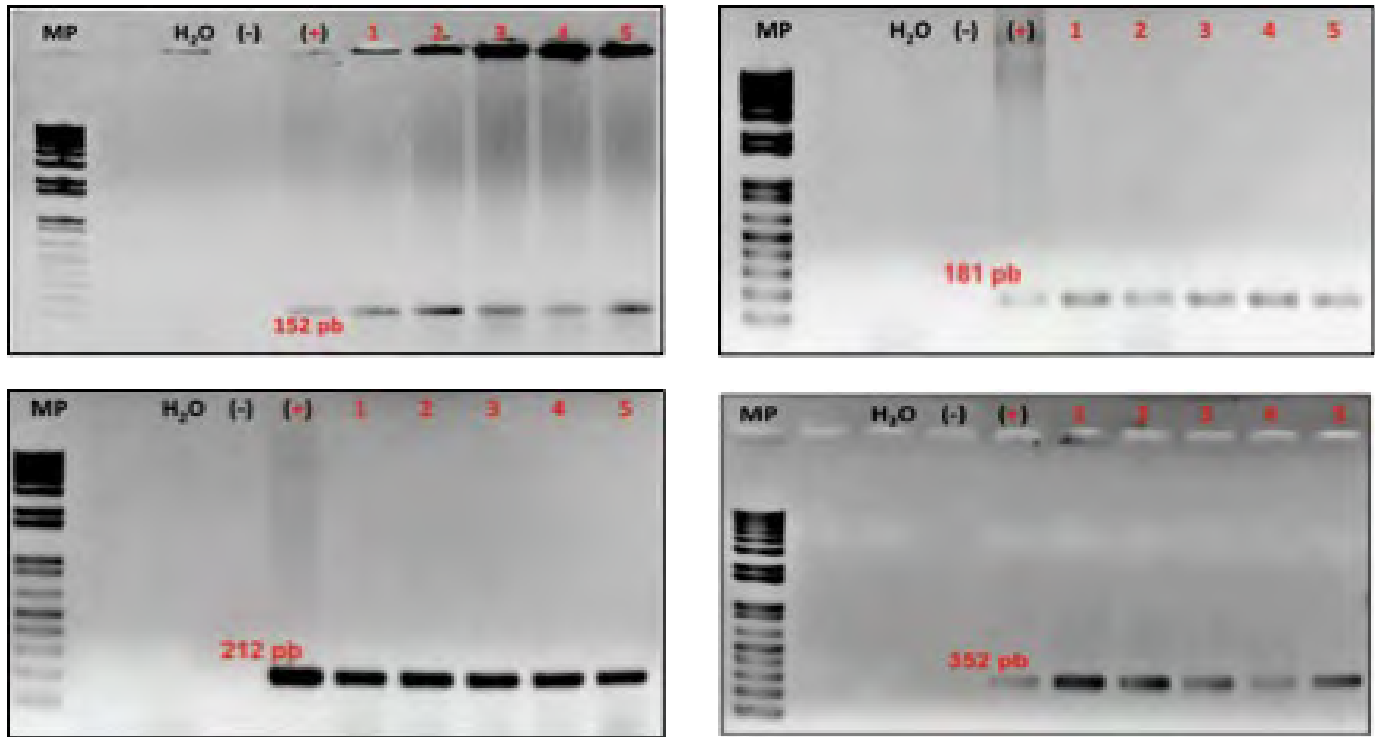


Figura 2. Caracterización molecular de las cepas recombinantes de *E. coli* y *A. tumefaciens*

Tabla 5. Porcentaje de regeneración de explantes de *N. benthamiana* cocultivados con *A. tumefaciens* transformadas con los constructos CspB, TaDREB3 y AtZAT10 independientemente y plantas no transformadas (control).

Plantas	concentración de PPT	# de explantes sembrados	# de explantes con brotes	regeneración
CspB	0.8 mg/l	70	60	86 %
Control /con selección	0.8 mg/l	25	0	0 %
Control /sin selección	0 mg/l	25	18	72 %
DREB	0.8 mg/l	50	49	98 %
Control /con selección	0.8 mg/l	25	0	0 %
Control /sin selección	0 mg/l	25	24	96 %
ZAT10	2 mg/l	55	52	95 %
Control /con selección	2 mg/l	25	0	0 %
Control /sin selección	0 mg/l	25	23	92 %

PCR positivas para DREB y ZAT10 provenientes de explantes seleccionados con 0,8mg/l y 2 mg/l de PPT, respectivamente. El fragmento esperado que resultó de la amplificación por PCR para *CspB*, *TaDREB3* y *AtZAT10*, corresponde a 200 pb (5'-ATGCTCGAAGGGAAGGTC-3' y 5'-GCCTCCTTTGTACATTAGCA-3', 459 pb (5'-GACAGCC GAACAAAAGTCC-3' y 5'-AAAGTGCCACATCTCCTGCT-3') y 674pb (5'-GGCGTAGAGGCTCTGACTA-3' y 5'-GCAGTTCA CTGGGAAGTCG-3), respectivamente. Se muestran los resultados para *AtZAT10* (Fig. 3) resultados similares fueron obtenidos para los otros genes.

A partir de las plántulas PCR positivas, se tomaron al azar entre cinco a siete plantas para la extracción de ARN, tratado con DNase I (Fig. 4), antes de ser sometido a PCR y utilizado posteriormente para la síntesis de cADN.

La amplificación del cADN se realizó con los primers correspondientes para *CspB*, *TaDREB3*, *AtZAT10* y *Bar* (RT-PCR). Se muestran los resultados para *TaDREB3*, obtenidos a partir de plántulas crecidas en medio de cultivo con y sin PEG 10% (Fig. 5). La amplificación mediante RT-PCR correspondiente a los fragmentos de los genes *CspB*, *AtZAT10* y *Bar* fue positiva.

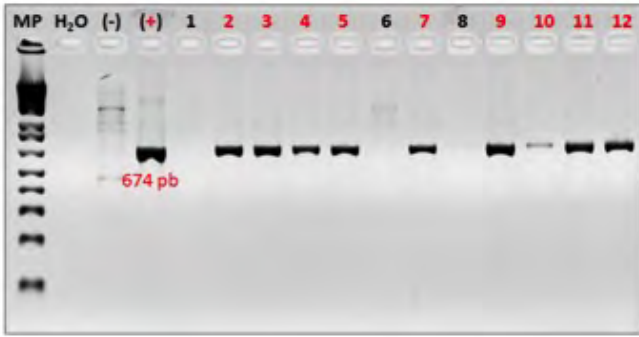


Figura 3. Caracterización molecular mediante PCR, de doce plantas *N. benthamiana* transformadas con el constructo AtZAT10 (fragmento esperado 674 pb).



Figura 4. A. RNA total extraído de plantas PCR positivas, transformadas con *TaDREB3*. Subunidades ribosomales mayor 28S (cerca a las 700b) y menor 18S (cerca a las 450b). Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder. Extracción. **B.** PCR de RNA total post-tratamiento con DNase I, correspondiente al transgen *TaDREB3 TaDREB3* elongadas en medio PEG 10 %. Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder.



Figura 5. Síntesis cDNA-expresión mRNA *TaDREB3*. **A.** Amplificación del cADN correspondiente a *TaDREB3*, a partir de plántulas crecidas en medio de cultivo sin PEG 10%, **B.** Amplificación del cADN correspondiente a *TaDREB3*, a partir de plántulas crecidas en medio de cultivo con PEG 10%.

Los ensayos de caracterización fenotípica bajo simulación del estrés por sequía (PEG 10 %) no muestran ventajas evidentes en las transformantes *CspB*, *TaDREB3* o *AtZAT10* (PCR y RT-PCR positivas) respecto al control, correspondiente a plantas no transformadas en medio de elongación con PEG 10 % (Fig. 6).

DISCUSIÓN

Genes de tolerancia a sequía y glufosinato de amonio en maíz

Los genes seleccionados para el diseño y la obtención de los casetes de expresión que fueron probados en la planta modelo *N. Benthamiana*, corresponden a genes ampliamente

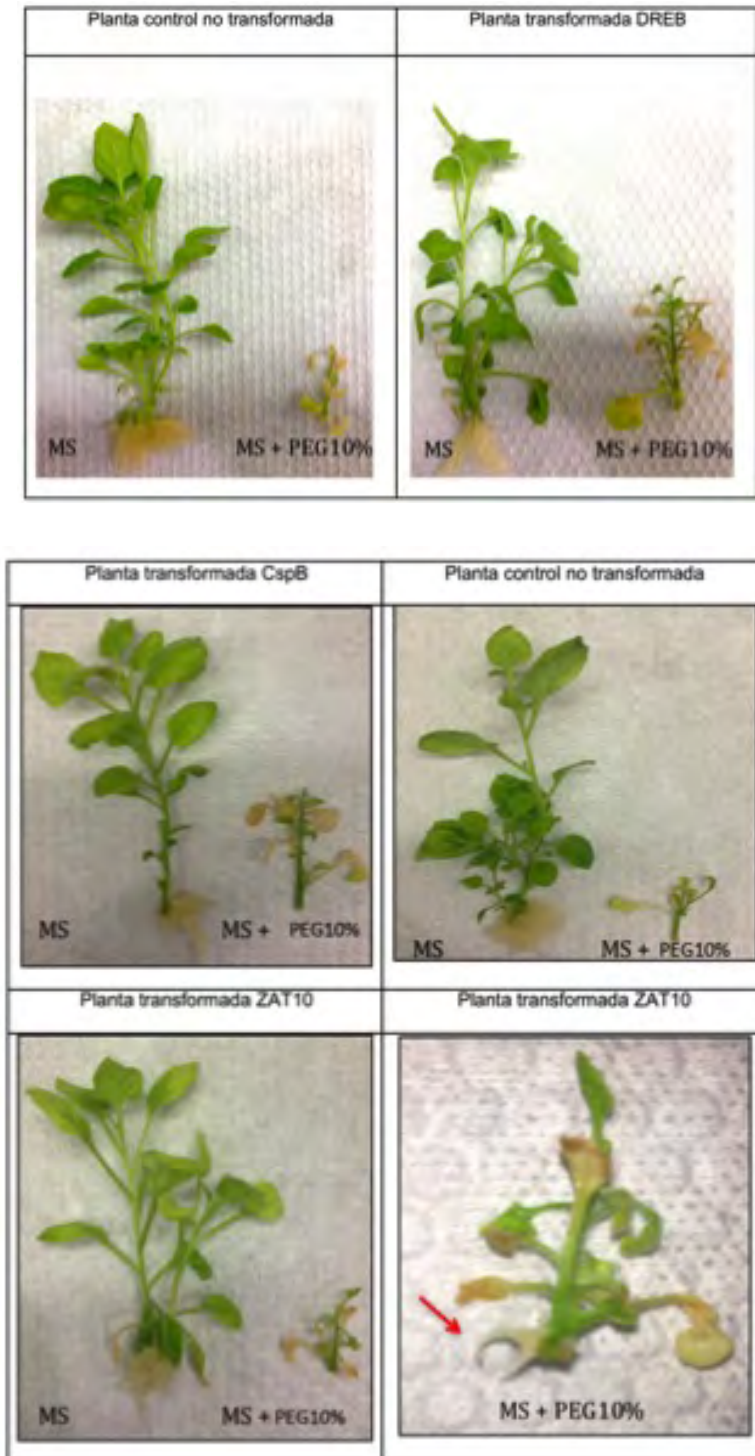


Figura 6. Plantas transformadas con *TaDREB3* y no transformadas en medio de elongación con PEG 10 % durante 20 días.

estudiados, que tiene soporte científico y que pueden llegar a conferir tolerancia a sequía en maíz. La participación de múltiples vías de estreses mediante la manipulación de la expresión de factores de transcripción específicos (FT) ha demostrado ser una estrategia promisoriosa en la mejora de la tolerancia a la sequía.

Los factores de transcripción de la familia DREB/CBF actúan en la modulación de un grupo de genes que definen las principales vías metabólicas de tolerancia a estreses (Long y Ort, 2010). DREB2 juega un papel importante en la expresión génica relacionada con la sequía, pero DREB2A de *Arabidopsis* induce débilmente genes corriente abajo cuando es sobre-expresado, y tiene un efecto mínimo en el incremento de la tolerancia al estrés, debido a posibles modificaciones post-traduccionales o a su rápida degradación por el proteosoma 26S (Qin *et al.*, 2008). Con todo, la proteína DREB2A se hace constitutivamente activa (DREB2A-CA) a través de la delección específica de residuos, demostrando que la sobreexpresión de *DREB2ACA* aumenta significativamente la tolerancia a la sequía en *Arabidopsis*, al costo de retraso del crecimiento, como se ha evidenciado con la expresión constitutiva de otros DREBs (Sakuma *et al.*, 2006a). Nakashima *et al.*, (2014), demostraron que la sobre-expresión de *DREB1A* mejora tolerancia a frío y deshidratación, mientras que la sobreexpresión de *DREB2ACA* mejora la tolerancia a deshidratación, pero levemente al frío en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. En contraste, la expresión ectópica constitutiva o inducible por estrés del *ZmDREB2A* de maíz (Qin *et al.*, 2007) y de *GmDREB2* de soya (*Glycine max*) (Chen *et al.*, 2007) en *Arabidopsis* resulta en mejora en la tolerancia a sequía, calor y estrés salino de plantas transgénicas sin defectos en el crecimiento, se sugiere que ninguna requiere de modificaciones post-traduccionales (Yang *et al.*, 2010). Morran *et al.*, (2011), transformaron cebada (*Hordeum vulgare*) y trigo (*Triticum aestivum*) con *TaDREB3* y *TaDREB2* y evaluaron tolerancia a sequía y heladas con un promotor constitutivo (2X 35S) en cebada e inducible (pRab17) en trigo. La población transgénica de cebada con sobre-expresión constitutiva mostró crecimiento lento, retraso en la floración y menor rendimiento del grano en comparación con las no transgénicas. Sin embargo, ambas líneas transgénicas mostraron mayor supervivencia en condiciones severas de sequía frente al control. Por otra parte, las plantas de trigo transformadas con pRab17-*TaDREB3* y pRab17-*TaDREB2* no mostraron defectos en el fenotipo. Las primeras se recuperaron más rápidamente que las segundas después del periodo de sequía. Pese a que estructuralmente las proteínas TaDREB2 y TaDREB3 son muy diferentes, parecen regular genes similares de respuesta a sequía; el incremento de la supervivencia de las plantas transgénicas de trigo bajo sequía puede ser explicada por la regulación positiva de los genes que codifican para proteínas LEA, dehidrinas (DFN) y proteínas de respuesta

a frío (COR) a niveles más altos de los que normalmente se expresan bajo este estrés (Morran *et al.*, 2011). Por todo esto, *TaDREB3* fue el gen seleccionado en este trabajo para el diseño de uno de los casetes de expresión.

Por otra parte, existe fuerte evidencia que la sobre-expresión de DREB activa genes adicionales no involucrados en tolerancia a sequía, que pueden producir efectos deletéreos en el fenotipo, tanto en el rendimiento, como en el crecimiento, en el número de fruto y semilla, y en el peso fresco de las plantas transgénicas bajo condiciones normales (Wang *et al.*, 2003). Por ello, para el diseño del casete de expresión con el gen DREB, en este trabajo, se utilizó el promotor inducible por sequía rab17, que a diferencia del promotor inducible rd29A ha demostrado tener expresión basal en ausencia de estrés hídrico (patente US20120102592). Los resultados de RT-PCR con plantas transformadas con DREB, crecidas *in vitro* con y sin PEG 10 % confirmaron el papel y la especificidad de este promotor al inducirse por sequía, ya que la expresión a nivel de mRNA de *DREB* solo se evidenció en las plantas sometidas al estrés. Se concluye que a pesar que las condiciones de cultivo *in vitro* involucran un estrés para la planta, no inducen la actividad del promotor rab17, a diferencia de lo informado para plantas de maíz (*Z. mays*) transformadas con *AtCBF3* y el promotor inducible rd29A (Al-Abed *et al.*, 2007).

Por otra parte, algunos estudios indican que la expresión constitutiva del regulador transcripcional ZAT10 no parece causar efectos negativos en el fenotipo de las plantas de *N. benthamiana*, mientras que otros si lo informan. Xiao *et al.*, (2009), realizaron uno de los estudios más completos en arroz transgénico evaluado para resistencia a sequía en condiciones de campo, que involucró plantas transformadas con siete genes documentados en relación a la tolerancia a sequía (*CBF3*, *SOS2*, *NCED2*, *NPK1*, *LOSS*, *ZAT10* y *NHX1*), cada uno bajo el control de promotor constitutivo *Actin 1* y el homólogo inducible por estrés de arroz *HVA22*. El rendimiento relativo y fertilidad relativa de la espiga fueron los criterios principales para evaluar el desempeño de la resistencia a sequía. En general, las familias transgénicas de los constructos *HVA22P:CBF3*, *HVA22P:NPK1*, *Actin1:LOSS*, *HVA22P:LOSS*, *Actin1:ZAT10*, and *HVA22P:ZAT10* mostraron incremento en el rendimiento por planta y fertilidad de la espiga, significativamente mayor en comparación con la no transformadas; mientras que las familias transgénicas de los otros cuatro constructos (*Actin1:SOS2*, *Actin1:NCED2*, *HVA22P:NCED2*, and *HVA22P:NHX1*) no mostraron tolerancia a sequía de acuerdo con los criterios evaluados. Los genes *LOSS* y *ZAT10* mostraron relativamente superiores efectos que los otros cinco, en mejorar la resistencia a sequía de arroz transgénico bajo condiciones de campo. Este estudio no informa efectos negativos en el fenotipo, cuando *ZAT10* es expresado constitutivamente. En el presente trabajo, las plantas de *N. benthamiana* transformadas con el constructo que contiene el gen *AtZAT10* dirigido por el promotor

constitutivo de maíz Ubi1 no mostraron ningún efecto negativo en el fenotipo. Una de las posibles explicaciones es que ZAT10 actúa en partes bajas de la vía de señalización de estrés, corriente abajo de DREB (Yang *et al.*, 2010), al parecer regulando la expresión de genes involucrados en el sistema de defensa de ROS, como ascorbato peroxidasa 2 (APX2) y *ferro-superoxide dismutase* (FSD1) principalmente (Mittler *et al.*, 2006). Sin embargo, estos resultados difieren de informes anteriores en los que se ha evidenciado que la expresión constitutiva de ZAT10 resulta en incremento en la tolerancia a sequía, pero afecta negativamente el crecimiento en plantas transformadas (Sakamoto *et al.*, 2004; Mittler *et al.*, 2006).

Las plantas de *N. benthamiana* transformadas con el casete de expresión *CspB* no mostraron efectos negativos en el fenotipo pese a su expresión constitutiva. El gen *CspB* es el responsable de la tolerancia a sequía en maíz, del primer cultivo GM liberado comercialmente, desarrollado por la compañía Monsanto, el híbrido transgénico Droughtgard™ (evento MON 87460), que fue liberado en el año 2013 en Estados Unidos. El evento MON 87460 fue donado por Monsanto al proyecto público-privado WEMA, diseñado para entregar el primer cultivo transgénico tolerante a sequía en maíz en África para el 2017 (James, 2014).

El gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* que confiere resistencia a glufosinato de amonio, usado en los tres casetes de expresión desarrollados en este trabajo, ha mostrado ser un sistema muy eficiente de selección en los protocolos de transformación genética (White *et al.*, 1990). Tiene una amplia historia de uso como marcador de selección y en cultivos GM tolerantes a este herbicida, incluyendo maíz (Gordom-Kamm *et al.*, 1990), arroz (Christou *et al.*, 1991), trigo (Vasil *et al.*, 1992), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) (D'Halluin *et al.*, 1992), canola (*Brassica napus*) y alfalfa (*Medicago sativa*) (Cobb, 1992), algodón (*Gossypium hirsutum*) (Keller *et al.*, 1997), lechuga (*Lactuca sativa*) (Mohapatra *et al.*, 1999), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Falco *et al.*, 2000), yuca (*Manihot esculenta*) (Sarría *et al.*, 2000) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Aragão *et al.*, 2002). En el mundo los cultivos comerciales aprobados, tolerantes a glufosinato incluyen remolacha azucarera, canola, soya, arroz y maíz. Unas pocas líneas híbridas de maíz resistentes están registradas por Dekalb (adquirida por Monsanto), Mycogen (adquirida por Dow Agrosiences) y Syngenta. Una variedad de achicoria (*Cichorium intybus*) con esterilidad masculina que lleva el gen se registró por Bejo Zaden, NL (PatentLens, 2007).

Transformación y caracterización molecular/ fenotípica de cepas bacterianas y plantas

Se realizaron ensayos de PCR de colonia, sobre cepas resistentes a antibióticos luego de experimentos de transformación, para determinar la presencia de los genes

de interés y de los casetes de expresión. Estos ensayos se hicieron sobre *E. coli* y *A. tumefaciens*. El total de las cepas evaluadas por PCR correspondió a cepas recombinantes en las que parece mantenerse la integridad de los casetes de expresión.

Los ensayos de transformación de plantas de *N. benthamiana* permitieron el establecimiento de un protocolo eficiente, mediante el uso de cefotaxime en los lavados de los explantes cocultivados para eliminar el exceso de bacteria, y el uso de carbenicilina en el medio de regeneración. Fue evidente la reducción de la contaminación por reactivación de la bacteria, posiblemente debida a la exposición a los dos antibióticos (Horsch *et al.*, 1985; Silva y Fukai, 2001). El incremento en la concentración de selección a 2 mg/l de PPT, no afecta la regeneración comparada con explantes seleccionados a 0,8 mg/l, y se obtuvo un incremento en la eficiencia de transformación, debido a la reducción de escapes.

Los genes fueron modificados favoreciendo el uso codónico del maíz. Se espera que la expresión en *N. benthamiana* sea menor y tenga efecto limitado en el fenotipo bajo condiciones de estrés por sequía. Mittler *et al.*, (2006), determinaron que plantas transgénicas con expresión constitutiva de ZAT10 podrían ser más tolerantes a estrés osmótico. Análisis de RNA blot demostraron que ZAT10 es expresado en respuesta a estrés hídrico (Sakamoto *et al.*, 2000); congruentemente un estudio con microarreglos reveló que ZAT10 es regulado positivamente por sequía (Huang *et al.*, 2008). Genes de soya que codifican para los ortólogos de *Arabidopsis* DREB1A y DREB1D de la familia AP2_EREBO y ZAT10/STZ de la familia C2H2_Zn inducidos por estrés por sequía, parecen estar involucrados en la regulación de respuesta a sequía durante crecimiento vegetativo en lugar de crecimiento reproductivo (Le *et al.*, 2012).

Diseño de genes

El diseño de genes *in silico* es una estrategia eficiente para desarrollar casetes de expresión funcionales (Villalobos *et al.*, 2006), puede ser más económica comparada con la clonación de genes en el laboratorio, ya que requiere menos tiempo y reactivos, debido a que no se precisa aislar genes y regiones regulatorias, ni el uso de vectores intermediarios, ni de enzimas de restricción y de modificación. Actualmente, los costos en la contratación de síntesis de genes han disminuido notablemente, dependen de la longitud del casete de expresión y pueden incluir su introducción en el vector de transformación. Otra de las ventajas del diseño de genes *in silico* es la disponibilidad de herramientas en línea, incluso gratuitas, que permiten identificar el ORF del gen, optimizar su uso codónico, traducirlo y compararlo con otras secuencias de bases de datos de genes y proteínas, que minimiza las posibilidades de error en la transcripción y traducción *in vivo*.

CONCLUSIONES

El diseño *in silico* de genes es una herramienta que favorece el desarrollo de casetes de expresión ya que permite modificar y organizar secuencias *in silico* tomadas a partir de bases de datos. Una de los aspectos clave del diseño *in silico* de genes es la posibilidad de modificar el uso codónico para favorecer la expresión de genes foráneos en una especie determinada. Los resultados de este estudio indican que el diseño *in silico* de los casetes de expresión es eficiente ya que se identificaron plantas transgénicas mediante PCR y se demostró que los transgenes correspondientes a *CspB*, *TaDREB3*, *AtZAT10* y *bar* se están expresando. La presencia de plántulas resistentes a PPT es una evidencia indirecta de la expresión del gen *bar*. Los ensayos fenotípicos no muestran resultados contundentes respecto a la tolerancia a sequía al comparar las plantas transformadas con las plantas control en medio de cultivo con PEG 10 %, sin embargo, se debe tener en cuenta que esto puede estar relacionado con que modificación del uso codónico fue diseñada para maíz, por lo que la expresión en *N. benthamiana* puede ser menor, reflejándose en el efecto limitado sobre el fenotipo bajo condiciones de estrés por sequía. Sin embargo, en este mismo ensayo se demostró la eficiencia del promotor inducible por estrés en el caso del constructo *rab17:TaDREB3*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Colombia, a la Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas (FENALCE) y a Colciencias por financiar este proyecto.

REFERENCIAS

- Ashraf M. Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotechnol Adv.* 2010;28:169-183. Doi:10.1016/j.biotechadv.2009.11.005
- Al-Abed D, Madasamy P, Talla R, Goldman S, Rudrabhatia S. Genetic engineering of maize with the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 gene using split-seed explants. *Crop Sciences.* 2007;47(6):2390-2402. Doi: 10.2135/cropsci2006.11.0712
- Aragão FJ, Vianna GR, Albino M, Rech EL. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. *Crop Science.* 2002;42(4):1298-1302. Doi:10.2135/cropsci2002.1298
- BLAST. Blastx. U.S. The National Library of Medicine-National Center of Biotechnology Information 2014. Available at: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
- Bolaños J, Edmeades GO. The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. *Field Crops Res.* 1996;48(1):65-80. Doi:doi:10.1016/0378-4290(96)00036-6
- Boyer JS, Westgate ME. Grain yields with limited water. *J Exp Bot.* 2004;55(407):2385-2394. Doi:10.1093/jxb/erh219
- Cai Y, Hartnett B, Gustafsson C, Peccoud J. A syntactic model to design and verify synthetic genetic constructs derived from standard biological parts. *Bioinformatics.* 2007;23(20):2760-2767. Doi:10.1093/bioinformatics/btm446
- Castiglioni P, Warner D, Bensen RJ, Anstrom DC, Harrison J, Stoecker M, Heard JE. Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Phys.* 2008;147(2):446-455. Doi:10.1104/pp.108.118828
- Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. The zinc finger network of plants. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(7-8):150-1160. Doi:10.1007/s00018-007-7473-4
- Cobb A. The transfer of herbicide resistance to crops. In: *Herbicides and Plant Physiology.* London, New York: Chapman and Hall;1992. p.145-151.
- Codon Usage Data Base. Codon Usage Tabulated. NCBI-GenBank. 2007. Available at: <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4577>
- Change. Intergovernmental Panel on Climate Change. *Climate Change 2007: impacts, adaptation and vulnerability.* New York: Cambridge University Press; 2007. p. 1-10.
- Chen J-Q, Meng X-P, Zhang Y, Xia M, Wang X-P. Over-expression of OsDREB genes lead to enhanced drought tolerance in rice. *Biotechnol Lett.* 2008;30:2191-2198. Doi: 10.1007/s10529-008-9811-5
- Chen M, Wang QY, Cheng XG, Xu ZS, Li LC, Ye XG, Ma YZ. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;353(2):299-305. Doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.027
- Christou P, Ford TL, Kofron M. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Nat Biot.* 1991;9(9):957-962. Doi: 10.1038/nbt1091-957
- Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, Mittler R. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2005;17(1):268-281. Doi:<http://dx.doi.org/10.1105/tpc.104.026971>
- De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gossele V, Leemans J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* 1987;6(9): 2513-2518.
- D'Halluin K, Bossut M, Bonne E, Mazur B, Leemans J, Botterman J. Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. *Nat Biot.* 1992;10(3):309-314. Doi:10.1038/nbt0392-309

- DNA 2.0. Inc. Gene Designer 2.0 Software. 2014. Available at: <https://www.dna20.com/resources/genedesigner>
- Edgerton MD. Increasing crop productivity to meet global needs for feed, food, and fuel. *Plant Phys.* 2009;149(1):7-13. Doi:<http://dx.doi.org/10.1104/pp.108.130195>
- Edmeades GO. Progress in achieving and delivering drought tolerance in maize—An update. Ithaca, NY: ISAAA; 2013. p. 130.
- EMBL-EBI. EMBOSS Needle. European Molecular Biology Laboratory. 2014. Available at: http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/
- Englbrecht CC, Schoof H, Böhm S. Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome. *BMC Genomics.* 2004;5(1):39. Doi:[10.1186/1471-2164-5-39](https://doi.org/10.1186/1471-2164-5-39)
- Falco MC, Neto AT, Ulian EC. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. *Plant Cell Reports.* 2000;19(12):1188-1194. Doi:[10.1007/s002990000253](https://doi.org/10.1007/s002990000253)
- Gordon-Kamm WJ, Spencer TM, Mangano ML, Adams TR, Daines RJ, Start WG, Lemaux PG. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell.* 1990;2(7):603-618. Doi:<http://dx.doi.org/10.1105/tpc.2.7.603>
- Gosal SS, Wani SH, Kang MS. Biotechnology and Drought tolerance. *J Crop Improvement.* 2009; 23:19-54. Doi:[10.1080/15427520802418251](https://doi.org/10.1080/15427520802418251)
- Grant RF, Jackson BS, Kiniry JR, Arkin GF. Water deficit timing effects on yield components in maize. *Agronomy J.* 1989;81(1):61-65. Doi:[10.2134/agronj1989.00021962008100010011x](https://doi.org/10.2134/agronj1989.00021962008100010011x)
- Horn G, Hofweber R, Kremer W, Kalbitzer HR. Structure and function of bacterial cold shock proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(12):1457-1470. Doi:[10.1007/s00018-007-6388-4](https://doi.org/10.1007/s00018-007-6388-4)
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SA, Fraley RT. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science.* 1985;227:1229-1231. Doi:[10.1126/science.227.4691.1229](https://doi.org/10.1126/science.227.4691.1229)
- Hsieh TH, Lee JT, Charng YY, Chan MT. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Phys.* 2002;130(2):618-626. Doi:<http://dx.doi.org/10.1104/pp.006783>
- Huang D, Wu W, Abrams SR, Cutler AJ. The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *J Exp Bot.* 2008;59(11):2991-3007. Doi:[10.1093/jxb/ern155](https://doi.org/10.1093/jxb/ern155)
- James C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. Ithaca: ISAAA; 2014. p. 32.
- Jiménez J. Diseño de genes semi-sintéticos que confieran tolerancia a herbicidas en soya. Tesis de maestría en ciencias-biología. Universidad Nacional de Colombia. 2014. p. 159.
- Keller G, Spatola L, McCabe D. E. N. I. S, Martinell B, Swain W, John ME. Transgenic cotton resistant to herbicide bialaphos. *Transgenic Res.* 1997;6(6):385-392. Doi:[10.1023/A:1018483300902](https://doi.org/10.1023/A:1018483300902)
- Lafitte H. Estreses abióticos que afectan el maíz. In: Paliwal L, Granados G, Laffite H, Violic A, Maratheé J, editors. *El Maíz en los Trópicos: Mejoramiento y Producción.* Roma: FAO; 2001. Available at: <http://www.fao.org/docrep/003/X7650S>
- Le DT, Nishiyama R, Watanabe Y, Tanaka M, Seki M, Yamaguchi-Shinozaki K, Tran LSP, *et al.* Differential gene expression in soybean leaf tissues at late developmental stages under drought stress revealed by genome-wide transcriptome analysis. *PLoS One.* 2012;7(11):e49522. Doi: [10.1371/journal.pone.0049522](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049522)
- Lee H, Guo Y, Ohta M, Xiong L, Stevenson B, Zhu JK. LOS2, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase. *EMBO J.* 2002;21(11):2692-2702. Doi:[10.1093/emboj/21.11.2692](https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2692)
- Liu D, Shi L, Han C, Yu J, Li D, Zhang Y. Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR. *PLoS One.* 2012;7(9):e46451. Doi:[10.1371/journal.pone.0046451](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046451)
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 1998;10(8):1391-1406. Doi:<http://dx.doi.org/10.1105/tpc.10.8.1391>
- Long SP, Ort DR. More than taking the heat: crops and global change. *Curr Opin Plant Biol.* 2010;13(3):240-247. Doi:[10.1016/j.pbi.2010.04.008](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.008)
- Lopato S, Bazanova N, Morran S, Milligan AS, Shirley N, Langridge P. Isolation of plant transcription factors using a modified yeast one-hybrid system. *Plant Methods.* 2006;2(1):3. Doi:[10.1186/1746-4811-2-3](https://doi.org/10.1186/1746-4811-2-3)
- Meissner R, Michael AJ. Isolation and characterisation of a diverse family of *Arabidopsis* two and three-fingered C2H2 zinc finger protein genes and cDNAs. *Plant Mol Biol.* 1997;33(4):615-624. Doi:[10.1023/A:1005746803089](https://doi.org/10.1023/A:1005746803089)
- Mittler R, Kim Y, Song L, Coutu J, Coutu A, Ciftci-Yilmaz S, Zhu JK. Gain-and loss-of-function mutations in Zat10 enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *FEBS letters.* 2006;580(28):6537-6542. Doi:[10.1016/j.febslet.2006.11.002](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.11.002)
- Mohapatra U, McCabe MS, Power JB, Schepers F, Van Der Arend A, Davey MR. Expression of the bar gene confers herbicide resistance in transgenic lettuce. *Transgenic Res.* 1999;8(1):33-44. Doi:[10.1023/A:1008891216134](https://doi.org/10.1023/A:1008891216134)
- Morran S, Eini O, Pyvovarenko T, Parent B, Singh R, Ismagul A, Lopato S. Improvement of stress tolerance

- of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotech J.* 2011;9(2):230-249. Doi:10.1111/j.1467-7652.2010.00547.x
- Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):292-292. Doi:10.1093/nar/28.1.292
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Front Plant Sci.* 2014;5:170. Doi:10.3389/fpls.2014.00170
- Ngugi K, Cheserek J, Muchira C, Chemining'wa G. Anthesis to Silking Interval Usefulness in Developing Drought Tolerant Maize. *J Ren Agriculture.* 2013;84:90. Doi: 10.12966/jra.08.03.2013
- Oh SJ, Kwon CW, Choi DW, Song SI, Kim JK. Expression of barley HvCBF4 enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnol J.* 2007;5(5):646-656. Doi:10.1111/j.1467-7652.2007.00272.x
- Oh SJ, Song SI, Kim YS, Jang HJ, Kim SY, Kim M, Kim JK. *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiology.* 2005;138(1):341-351. Doi:http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.059147
- Ohta M, Matsui K, Hiratsu K, Shinshi H, Ohme-Takagi M. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell.* 2001;3(8):1959-1968. Doi:10.1105/TPC.010127
- OPTIMIZER. Web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. 2007. Universitat Rovira i Virgili. Available at: <http://genomes.urv.cat/OPTIMIZER/optimized.php>
- PatentLens. Chapter 2 Introduction: The bar gene de PatentLens. 2007. Available at: <http://www.cambia.org/daisy/Phosph/g2/710.html>
- Pellegrineschi A, Reynolds M, Pacheco M, Brito RM, Almeraya R, Yamaguchi-Shinozaki K, Hoisington D. Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. *Genome.* 2004;47(3):493-500. Doi:10.1139/g03-140
- Puigbo P, Guzman E, Romeu A, Garcia-Vallve S. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(suppl 2):W126-W131. Doi:10.1093/nar/gkm219
- Qin F, Sakuma Y, Tran LSP, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K. *Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *Plant Cell.* 2008;20:1693-1707. Doi:http://dx.doi.org/10.1105/tpc.107.057380
- Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Tran LSP, Yamaguchi-Shinozaki K. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. *Plant J.* 2007;50(1):54-69. Doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03034.x
- Rizhsky L, Davletova S, Liang H, Mittler R. The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* 2004;279(12):11736-11743.
- Rozen S, Skalestky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, editors. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods Mol Biol.* Totowa: Humana Press; 2000. p. 365-386.
- Sakamoto H, Araki T, Meshi T, Iwabuchi M. Expression of a subset of the *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc-finger protein gene family under water stress. *Gene.* 2000;248(1):23-32. Doi:10.1016/S0378-1119(00)00133-5
- Sakamoto H, Maruyama K, Sakuma Y, Meshi T, Iwabuchi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiol.* 2004;136(1):2734-2746. Doi:http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.046599
- Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell.* 2006a;18(5):1292-1309. Doi:10.1105/tpc.105.035881
- Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006b;103(49):18822-18827. Doi:10.1073/pnas.0605639103
- Sarria R, Torres E, Angel F, Chavarriaga P, Roca WM. Transgenic plants of cassava (*Manihot esculenta*) with resistance to Basta obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep.* 2000;19(4):339-344. Doi:10.1007/s002990050737
- Schachtman DP, Goodger J. Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends Plant Sci.* 2008;13(6):281-287. Doi:10.1016/j.tplants.2008.04.003
- Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Zhao CX. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *C R Biol.* 2008;331: 215-225. Doi:10.1016/j.crv.2008.01.002
- Sharp PM, Li WH. The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(3):1281-1295. Doi:10.1093/nar/15.3.1281
- ShenYG, Du BX, Zhang WK, Zhang JS, Chen S. Y. AhCMO, regulated by stresses in *Atriplex hortensis*, can improve drought tolerance in transgenic tobacco. *Theor App Genet.* 2002;105(6-7):815-821.
- Silva JD, Fukai S. The impact of carbenicillin, cefotaxime and vancomycin on chrysanthemum and tobacco TCL morphogenesis and *Agrobacterium* growth. *J Appl Hort.* 2001;3(1):3-12.

- Statista. Distribution of global corn production in 2013, by country. Statista. 2015. Available at: <http://www.statista.com/statistics/254294/distribution-of-global-corn-production-by-country-2012/>
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol.* 1991;17(5):1105-1109. Doi:10.1007/BF00037152
- Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Nat Biotechnol.* 1992;10(6):667-674. Doi:10.1038/nbt0692-667
- Villalobos A, Ness JE, Gustafsson C, Minshull J, Govindarajan S. Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. *BMC bioinformatics.* 2006;7(1):285. Doi:10.1186/1471-2105-7-285
- Wang JW, Yang FP, Chen XQ, Liang RQ, Zang LQ, Geng DM, Zhang XD, Song YZ, Zhang GS. Induced expression of dreb transcriptional factor and study on its physiological effects of drought tolerance in transgenic wheat. *Acta Genetica Sinica.* 2006;33(5):468-476. Doi:10.1016/S0379-4172(06)60074-7
- Wang W, Vinocur B, Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta.* 2003;218(1):1-14. Doi:10.1007/s00425-003-1105-5
- Willimsky G, Bang H, Fischer G, Marahiel MA. Characterization of cspB, a *Bacillus subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures. *J Bacteriol.* 1992;174(20):6326-6335.
- White J, Chang SY, Bibb MJ, Bibb MJ. A cassette containing the bar gene of *Streptomyces hygroscopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(4):1062
- Xiao BZ, Chen X, Xiang CB, Tang N, Zhang QF, Xiong LZ. Evaluation of seven function-known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under field conditions. *Mol Plant.* 2009;2(1):73-83. Doi:10.1093/mp/ssn068
- XiaoYan H, Ming C, HuiJun X, ShiQing G, XianGuo C, LianCheng L, *et al.* Obtaining of transgenic wheats with GH-DREB gene and their physiological index analysis on drought tolerance. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences.* 2005;18(5):616-620. Doi:20063004178
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell.* 1994;6(2): 251-264. Doi: 10.1105/tpc.6.2.251
- Yang S, Vanderbeld B, Wan J, Huang Y. Narrowing down the targets: towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops. *Mol Plant.* 2010;3(3):469-490. Doi:10.1093/mp/ssq016
- Zhang S, Li N, Gao F, Yang A, Zhang J. Over-expression of TsCBF1 gene confers improved drought tolerance in transgenic maize. *Mol Breed.* 2010;26(3):455-465. Doi:10.1007/s11032-009-9385-5