

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias Agroalimentarias
Escuela de Agronomía

**Capacidad de reparación de ADN en accesiones de
maíz (*Zea mays* L.) morado de América Central**

Carlos Víquez Zamora

**Tesis para optar al grado de licenciado en Ingeniería
Agronómica con énfasis en Fitotecnia**

Tesis ligada al proyecto: **B6602** FONDO ESPECIAL ESTÍMULO A LA INVESTIGACIÓN
2015 VI-1277-2016: ANÁLISIS MOLECULAR Y CELULAR DE LA TOLERANCIA A LA
RADIACIÓN EN MAÍZ COMO HERRAMIENTA DE ADAPTACIÓN AGRÍCOLA AL CAMBIO
CLIMÁTICO (2016-2019).

El artículo está disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.04.29.442045v5>

2020

**Capacidad de reparación de ADN en accesiones de
maíz (*Zea mays* L.) morado de América Central**

Carlos Víquez Zamora

**Tesis para optar al grado de licenciado en Ingeniería
Agronómica con énfasis en Fitotecnia**

**Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias Agroalimentarias
Escuela de Agronomía
2020**

Capacidad de reparación de ADN en accesiones de maíz (*Zea mays* L.) morado de América Central

Carlos Víquez Zamora

Tesis para optar al grado de licenciado en Ingeniería Agronómica con énfasis en Fitotecnia

Pablo Bolaños Villegas Dr

Director de tesis

María Viñas Meneses Dra

Miembro del tribunal

Luis Barboza Barquero Dr

Miembro del tribunal

Walter Barrantes Santamaría Dr

Miembro del tribunal

Luis Gómez Alpizar Dr

Director de escuela

Carlos Víquez Zamora

Sustentante

Dedicatoria

A Dios, a mi familia, a mis profesores y mentores, a mis amigos y todas las fuentes de inspiración que me permitieron salir adelante con este proyecto.

Agradecimientos

A Dios primeramente por darme la oportunidad de estar aquí y guiarme en todo momento. A mi familia por estar conmigo todos estos años de universidad, especialmente a mi hermana María Daisy, no exagero al decir que sin ella no hubiera concluido mi tesis.

A mi comité de tesis: María Viñas por apoyarme con los procedimientos de laboratorio, principalmente todo lo relacionado a expresión de genes y por ser extremadamente atenta a los detalles del documento. A Luis Barboza por aconsejarme pacientemente e indicarme siempre aspectos de mejora en el análisis de expresión de genes. Walter Barrantes por la revisión final y orientarme con el uso del equipo de laboratorio de biología molecular Y mi tutor Pablo Bolaños Villegas, porque a pesar de los contratiempos nunca dudó de mí, me impulsó a hacer las cosas lo mejor posible e hizo lo que estaba a su alcance para ayudarme, como profesor y como amigo.

A Carla Murillo, Alexander Vargas, Alfredo Vásquez por ayudarme a conseguir maíz Pujagua de La Cruz de Guanacaste. A Daniel Fernández, encargado del Banco de Germoplasma de Semillas Ortodoxas del CATIE por entregarnos semillas de maíz morado proveniente de diferentes regiones de Centroamérica.

A Andrés Oviedo, Marcelo Murillo, Sergio Escalante y Jimena Martínez por ayudarme amablemente con la ejecución de las pruebas preliminares. Un agradecimiento especial a Marianne de Bedout por ayudarme a lo largo de todas las repeticiones del ensayo cometa, sin su ayuda, esta tesis no hubiera sido posible. A Sergio Castro, Pedro Chavarría, José Mora y Stefano Albertazzi por todo el trabajo previo realizado en este proyecto, sobre el cual yo continué trabajando.

A Eric Mora y Carlos Luis Loría por prestarme el espacio físico para realizar la multiplicación del maíz y ayudarme con la instalación del riego. A Elodia Sánchez por ayudarme con el uso del equipo del laboratorio de biología celular y molecular. A Juan Ramón Navarro por guiarme en todos los análisis estadísticos A Carlos Echandi, por atender mis dudas y aconsejarme a la hora de reproducir la semilla de maíz y compartir sus conocimientos de genética. Y a la directora del INISA, la Dra. Carolina Santamaría Ulloa, así como a la profesora Luisa Valle Bourrouet, a don Fernando Ortiz y todo el personal administrativo del INISA por permitirme el uso del sistema del microscopio epifluorescente, y por guiarme en su uso.

Índice General

Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Índice General	III
Índice de figuras.....	V
Índice de tablas	VII
Resumen.....	VIII
Introducción.....	1
Objetivos	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos	3
Revisión de literatura.....	4
El maíz	4
Cambio climático y posibles escenarios futuros.....	5
Radiación ionizante (RI) y ultravioleta (UV)	5
Zeocina y agentes imitadores de la radiación	6
Daños en el ADN producidos por RI y UV	6
Reparación de daños en el ADN en plantas	7
Medición de daño en el ADN y capacidad de reparación	8
Regulación de los mecanismos de reparación de daños por rupturas de doble cadena (RDC).....	9
Reportes sobre respuesta de plantas a la radiación	10
Materiales y métodos	12
Material vegetal y tratamientos	12
Medición de la capacidad de reparación de ADN	13
Determinación de la especificidad de los imprimadores	15
Medición de la expresión de genes.....	17
Resultados.....	20
Medición de la capacidad de reparación de ADN	20
Determinación de la especificidad de los imprimadores	23
Medición de la expresión de genes.....	30

Discusión.....	32
Medición de la capacidad de reparación del ADN	32
Determinación de la especificidad de los imprimadores	36
Medición de la expresión de genes.....	36
Conclusiones	37
Referencias	38
Anexos.....	48

Índice de figuras

- Figura 1.** Porcentaje de ADN en la cola de los núcleos de plantas de maíz tratadas o no (control) con zeocina sin reposo posterior (zeocina) en siete accesiones: B73, Congo (C), 8689 (J), Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y 8290 (T). Las barras representan el error estándar y las letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba DGC entre accesiones y tratamientos con una significancia del 0,05 (n=3). 20
- Figura 2.** Porcentaje de ADN en la cola de los núcleos de plantas de maíz tratadas o no (control) con zeocina sin reposo posterior (zeocina) y con una hora de reposo (z+reposo) en las seis accesiones clasificadas como no resistentes: B73, Congo (C), 8689 (J), Mo17, Pujagua2 (P2) y 8290 (T). Las barras de error representan el error Estándar y las letras indican diferencias significativas de acuerdo a una prueba DGC entre tratamiento dentro la misma variedad con una significancia del 0,05 (n=3)..... 21
- Figura 3.** Imágenes de núcleos de plantas de maíz tratadas o no (control) con zeocina sin reposo posterior (zeocina) y con una hora de reposo (z+reposo) en siete accesiones: B73, Congo (C), 8689 (J), Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y 8290 (T). Los colores morado y azul corresponden a áreas con alta densidad de ADN, mientras que el verde y el amarillo corresponden a áreas con baja densidad de ADN y colas de ADN..... 22
- Figura 4.** Curva de amplificación (A) y de disociación (B) en PCR en tiempo real con los imprimadores del gen *EIF4A* en las accesiones B73, Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y el control negativo sin ADN (NTC)..... 24
- Figura 5.** Curva de amplificación (A) y de disociación (B) en PCR en tiempo real con los imprimadores para el gen *ATM* en las accesiones B73, Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y control negativo sin ADN (NTC)..... 24
- Figura 6.** Curva de amplificación (A) y de disociación (B) en PCR en tiempo real para los imprimadores del gen *CDKB2;1* en las accesiones B73, Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y control negativo sin ADN (NTC)..... 25
- Figura 7.** Curva de amplificación (A) y de disociación (B) en PCR en tiempo real para para los imprimadores del gen *BRCA1* en las accesiones B73, Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y control negativo sin ADN (NTC). Nótese la diferencia en la altura de los picos..... 25
- Figura 8.** Curva de amplificación (A,C) y de disociación (B,D) en PCR en tiempo real para el primer par (A y B) y el segundo par de imprimadores (C y D) del gen *SOG1* en las accesiones B73, Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y control negativo sin ADN (NTC). 26
- Figura 9.** Curva de amplificación (A, C) y de disociación (B, D) en PCR en tiempo real para el primer par de imprimadores (A y B) y para el segundo (C y D) del gen *RAD51* en las accesiones B73, Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y control negativo sin ADN (NTC). 27
- Figura 10.** Curva de amplificación (A) y de disociación (B) en PCR en tiempo real para para el par de imprimadores del gen *ATR* en las accesiones B73, Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y control negativo sin ADN (NTC) 28

Figura 11. Curva de amplificación (A) y de disociación (B) en PCR en tiempo real para para los pares de imprimadores del gen *Ku80* en las accesiones B73, Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y control negativo sin ADN (NTC)..... 28

Figura 12. Representación esquemática de cada gen y la localización de los imprimadores utilizados en la accesión B73. Las cajas negras representan los exones, las líneas grises los intrones, las flechas negras mirando hacia abajo el imprimador delantero (forward primer) del primer par de imprimadores, las flechas negras mirando hacia arriba el imprimador reverso (reverse primer) del primer par de imprimadores, las flechas grises mirando hacia abajo el imprimador delantero (forward primer) del segundo par de imprimadores y las flechas grises mirando hacia arriba el imprimador reverso (reverse primer) del segundo par de imprimadores. Simbología: pb=pares de bases, kb= 1000 pares de bases..... 30

Figura 13. Plántulas a los siete días después de la siembra provenientes de las accesiones B73 (A), Mo17 (B), P1 (C), P2 (D), T (E), J (F) y C (G)..... 33

Índice de cuadros

Cuadro 1. Accesiones de maíz utilizadas y su origen incluyendo la latitud, altitud (msnm) y valor anual promedio de radiación directa a la superficie (kWh/m ²). Datos de latitud, altitud y radiación directa obtenidos de (Global Solar Atlas 2020).	12
Cuadro 2 Secuencia de los imprimadores para análisis de expresión génica en <i>Z. mays</i> . Número de las accesiones obtenidas de maizegdb.org	16
Cuadro 3. Clasificación de las accesiones según su sensibilidad a la zeocina y su capacidad de reparación de rupturas de doble cadena (RDC) de ADN	23
Cuadro 4. Temperatura de fusión (T _m) de cada par de imprimadores empleado en los experimentos.....	29

Resumen

Uno de los mayores retos de la humanidad es alimentar a una población cercana a los 9 billones para el 2050 bajo un escenario climático con posibles aumentos de la radiación ultravioleta (UV) de hasta un 5 % en los trópicos. La radiación UV-B puede causar múltiples daños en el ADN, entre ellos rupturas de doble cadena los cuales son altamente dañinos para los organismos. El maíz, además de ser el grano de mayor consumo mundial, posee una alta variabilidad, es originario de los trópicos americanos y particularmente el maíz morado tiene importancia cultural en Mesoamérica por su uso en la alimentación de subsistencia. Lo anterior, hace del maíz una buena planta modelo para buscar rasgos e investigar mecanismos de tolerancia a daños producidos por la radiación UV-B. Por lo tanto en el presente estudio se evaluó la capacidad de reparación de ADN de cinco accesiones de maíz morado centroamericanas y las líneas estadounidenses B73 y Mo17, que poseen los genomas de referencia mejor estudiados. Además se optimizaron las condiciones de los imprimadores para el análisis de la expresión relativa de genes relacionados a la reparación de ADN. Para eso se sumergieron plántulas de siete días de germinadas en una solución de zeocina, un químico radiomimético que causa rupturas de la doble cadena de ADN, de 100 µg/mL por 24 horas. Luego se les realizó electroforesis neutra de núcleos (ensayo cometa) inmediatamente después del tratamiento y después de una hora de reposo a oscuras. Además, se determinó la especificidad de 13 imprimadores para 10 genes relacionados con la reparación de ADN mediante curvas de disociación y se midió el nivel de expresión relativa de dos de esos genes mediante retrotranscripción inversa del ARN extraído en cuatro accesiones y PCR cuantitativo. Se encontró una accesión de maíz morado proveniente de Santa Cruz, Guanacaste, con resistencia a los daños producidos por la zeocina. Además se encontró que una accesión proveniente de La Cruz, Guanacaste, posee capacidad de reparación total de los daños producidos por la zeocina y que la línea Mo17 no tiene la capacidad de reparar los daños en el ADN. Por otro lado, se determinó que la línea B73, además de una accesión proveniente de Talamanca, Limón, otra proveniente de Orotina, Alajuela y otra de San Pedro Jocopilas, Quiche, Guatemala, poseen capacidad parcial de reparación de daños en el ADN. De los imprimadores analizados, cinco no fueron aptos para uso en el análisis de expresión de genes. Por otro lado, no fue posible determinar el nivel de expresión relativa de los genes, debido a que no amplificaron suficientes muestras, lo que indica que es necesario optimizar la concentración de los imprimadores y la temperatura de anillamiento para la reacción.

Introducción

Uno de los retos de la humanidad para las próximas décadas es alimentar una población creciente bajo un escenario de cambio climático incierto. Se pronostica que para 2050 la población mundial será de aproximadamente 9 billones, la mayoría ubicadas en Asia y África (Gerland et al. 2014). Por otro lado, se estima que para alimentar dicha población, el rendimiento de cada uno de estos cultivos, maíz, arroz, trigo y soya debería crecer a un ritmo anual del 2,4%. Sin embargo para el 2013 el crecimiento anual de estos cultivos fue, maíz: 1,6%, arroz: 1%, trigo: 0,9% y soya: 1,3% (Ray et al. 2013), lo que sería insuficiente para cubrir las demandas de la población mundial.

Sumado a lo anterior, el cambio climático y la reducción del grosor de la capa de ozono, han causado alteraciones climáticas, como cambios en las corrientes de los vientos y reducción en la formación de nubes (Zamora-Martinez 2018, McKenzie et al. 2011, Schneider et al. 2019). El aumento en la incidencia de radiación ultravioleta tipo B (UV-B) es una de esas alteraciones y las predicciones apuntan que el aumento podría ser de hasta un 5% en países tropicales como Costa Rica (Williamson et al. 2014). Para entender los posibles efectos de esto, es necesario comprender las consecuencias de esta radiación en los seres vivos, principalmente en las plantas con importancia agrícola.

Tanto la radiación UV-B y la radiación ionizante (RI) provienen del Sol (Fernández et al. 2007) y tienen capacidad de dañar el ADN. Estos daños se clasifican como directos e indirectos. Los daños directos son: rupturas de una cadena o de la doble cadena, inducción de dímeros de pirimidina, sitios sin bases nitrogenadas y enlaces cruzados con proteínas; mientras que los indirectos son causados por especies reactivas de oxígeno producto de la radiólisis del agua en las células (Kim et al. 2019). De todos los daños mencionados anteriormente, las rupturas de doble cadena de ADN son los más peligrosos porque si no se reparan pueden causar destrucción de una parte del cromosoma, mutaciones no sinónimas y muerte celular (Schröpfer et al. 2014, Charbonnel et al. 2011).

Existen sustancias que causan daños muy similares a la radiación solar y se les llama químicos radiomiméticos. Uno de los más conocidos es la zeocina, un antibiótico de la familia de la bleomicina (Hu et al. 2018), que al asociarse con una molécula de hierro, sustrae el hidrógeno ligado al carbono 4 y después de una serie de reacciones, rompen las hebras de ADN de una manera muy similar a la RI (McNeill et al. 1999). Debido a que los químicos radiomiméticos son más fáciles de manipular que la radiación, estos son utilizados con frecuencia en estudios para analizar las respuestas celulares a los daños por rompimiento de doble cadena de ADN (Fulcher y Sablowski 2009).

En cuanto a los efectos de la RI en los cultivos, se ha reportado en *Avena fatua* y *Setaria viridis*, disminución en altura, peso fresco y área foliar bajo exposiciones creciente de radiación UV (Zuk-Golaszewska et al. 2003). Asimismo en *Triticum aestivum* se ha reportado reducción de altura, biomasa total, número y peso de granos (Bacelar et al. 2015). En *Glycine max*, se observó reducción de la producción y germinación de polen así como reducción del tubo polínico (Koti et al. 2005).

En maíz se ha visto disminución en la germinación, altura, la biomasa total y la productividad a dosis y tiempos crecientes de exposición a RI (Killion et al. 1972, Correia et al. 2000, Reddy et al. 2013), reducción de productividad en variedades de maíz con alto contenido proteico y una mayor susceptibilidad al daño en el ADN en los órganos reproductivos (Stapleton et al. 1997). Además, un retraso de entre 2 y 3 días en la floración (Santos et al. 1998).

Para reparar esos daños las plantas utilizan dos tipos de mecanismos: dependientes de la luz e independientes de la luz, o de reparación a oscuras. La reparación dependiente de la luz se da a través de fotoliasas, enzimas que reparan dímeros de pirimidina al recibir radiación ultravioleta A (UV-A) o luz azul (Biever y Gardner 2016). La reparación a oscuras se clasifica en: homóloga (alta fidelidad) o no homóloga (baja fidelidad) (Hollósy 2002). En la segunda, las células unen y pegan los extremos de las hebras de ADN donde hubo ruptura, es un mecanismo eficiente, pero puede causar mutaciones (Fatima et al. 2017, Manova y Gruszka 2015). Por otro lado, la reparación homóloga utiliza como plantilla un cromosoma homólogo para reparar la ruptura en la doble cadena, por tanto no es mutagénica (Knoll et al. 2014).

La regulación genética del proceso de reparación de ADN en plantas se ha caracterizado en *Arabidopsis thaliana* y ocurren secuencialmente. Primeramente, las proteínas quinasas Ataxia Telangiectasia-Mutated (ATM) y Ataxia Telangiectasia-Mutated and RAD3-like protein (ATR) se activan ante la presencia de daños en el ADN, estas fosforilan el factor de transcripción llamado Supresor of Gamma Radiation 1 (SOG1), la cual activa la transcripción y síntesis de otras proteínas involucradas tanto en la detención del ciclo celular, como en la reparación de ADN propiamente (Kim et al. 2019). Entre las proteínas activadas por SOG1 están Cyclin Dependent Kinase B2 (CDKB1;2), Cyclin B1;2 (CYCB1;2) y Cyclin Dependent Kinase B2;1 (CDKB2;1) involucrados en detener el ciclo celular (Yoshiyama et al. 2014). Además, activa también a los genes: *Radiation Sensitive 51 (RAD51)* y *Breast Cancer Susceptibility 1 (BRCA1)* involucrados en procesos de reparación homóloga y los homólogos de los genes *Ku80* y *DNA Ligase 4 (LIG4)* relacionados con la reparación no homóloga (Schröpfer et al. 2014).

Los mecanismos de respuesta a la RI y los de reparación de ADN se han reportado principalmente en *A. thaliana*, pero la información en maíz es escasa. Por tanto, con el presente estudio se busca analizar la reparación de ADN en maíz y la expresión de genes homólogos relacionados con esa reparación en *A. thaliana* con el fin de identificar si los mecanismos se mantienen en maíz. Esta información podría utilizarse en un futuro para elaborar marcadores moleculares para uso en el mejoramiento de líneas tolerantes a altas radiaciones, además de dar dirección a nuevas investigaciones sobre la regulación genética de la reparación de ADN en maíz. Asimismo, ayudaría a identificar accesiones de maíz morado con alta tolerancia a la radiación ionizante, lo que tendría utilidad en programas de mejoramiento clásico.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la capacidad de reparación de ADN en accesiones de maíz morado.

Objetivos específicos

Determinar la capacidad de reparación de ADN en accesiones de maíz morado expuestas a zeocina sin tiempo de reposo y después de un tiempo de reposo.

Determinar la expresión de genes relacionados a la reparación de ADN en accesiones de maíz morado expuesto a zeocina sin tiempo de reposo.

Revisión de literatura

El maíz

El maíz (*Zea mays*), es un grano de la familia *Poaceae* que actualmente se consume en todo el mundo. Inicialmente fue cultivado y consumido por las civilizaciones mesoamericanas, siendo su centro de origen el centro-sur de México (Acosta 2009). Este cultivo fue domesticado a partir de un antecesor llamado *Zea mays* ssp *parviglumis* (Hufford et al. 2012) y de ahí sus semillas fueron acarreadas a otras áreas de la América precolombina donde surgieron centros de variabilidad (Chacón-Sánchez 2010). Pero, no fue hasta después de la conquista europea que el cultivo de esta especie se adoptó en el mundo entero (Smith et al. 2004).

Consecuencia del proceso de domesticación, el maíz pasó de ser una hierba semiperenne a una planta anual erguida. Una vez domesticado, los aborígenes americanos comenzaron un proceso de selección al conservar las mazorcas más grandes para siembras siguientes (Paliwal et al. 2001). Hasta finales del siglo XIX, se utilizaron principalmente variedades de polinización abierta obtenidas a través de selección masal donde se seleccionaba principalmente para tipo de grano, de mazorca, grupo de madurez y adaptación a las condiciones locales, no obstante las ganancias de productividad eran bajas (Hallauer et al. 1988, Troyer 2004). Con el descubrimiento, a inicios del siglo XX, de las líneas puras, los híbridos y el aumento en productividad que produce la heterosis, el mejoramiento de maíz se ha enfocado en desarrollar semillas híbridas con altos rendimientos, pero más susceptibles a estrés biótico y abiótico (Rosenthal y Dirzo 1997). Además, desde 1996 se ha introducido el uso de maíz transgénico, donde se incorporan genes de resistencia a plagas o herbicidas, provenientes de otros organismos, a variedades de alto rendimiento para reducir el uso de agroquímicos (Tabashnik 2010).

Esta planta es de gran importancia para el ser humano, ya que es el grano más producido en el mundo (OECD-FAO 2019). Las zonas donde es consumido mayoritariamente son el sur y este de África, y Mesoamérica (Ranum et al. 2014). A nivel mundial se estima una producción de 1138 millones de toneladas siendo Estados Unidos, China y Brasil los principales productores (FAO 2018). Además de su uso para alimentación humana otros posibles usos son, alimento para ganado, producción de etanol, producción de jarabe de maíz de alta fructosa, polímeros sustitutos del plástico y una amplia gama de productos para diferentes industrias (Paliwal et al. 2001).

En cuanto a su genoma, el maíz posee una alta variabilidad y complejidad. Un ejemplo de esto es la diferencia en el tamaño de genomas entre variedades, la línea de referencia B73 posee 2300 Mb, mientras que líneas de origen tropical poseen alrededor de 2810 Mb, y líneas de origen templado alrededor de 2680 Mb (Jian et al. 2017). A pesar del tamaño de su genoma, solamente 0,6% de su cromatina es activa y solamente 2% de los genes son codificantes (Rodgers-Melnick et al. 2016). Además, 85% de sus genes son transposones (Schnable et al. 2009), secuencias repetitivas que pueden moverse en

el genoma causando mutaciones (SanMiguel et al. 1996). El genoma nuclear se encuentran organizado en 10 pares de cromosomas, lo que hace al maíz una planta diploide (Wei et al. 2007).

Cambio climático y posibles escenarios futuros

El cambio climático se puede definir como una serie de tendencias diferentes en los patrones climáticos de una zona en períodos de décadas o siglos. Este ocurre de forma natural en el tiempo, ya que la atmosfera sufre oscilaciones que modifican los patrones del clima. Igualmente, la Tierra cambia su distancia con respecto al Sol y este último posee períodos con explosiones solares mayores que hacen llegar más radiación al planeta. Los seres vivos pueden causar cambios dentro de la composición atmosférica, modificando esos patrones, por ejemplo: la deforestación y el aumento en las concentraciones de dióxido de carbono en la atmósfera (Pereira et al. 2007).

En las últimas décadas se ha puesto especial atención a los cambios antropogénicos del clima, principalmente al aumento en la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) (Zamora-Martinez 2018). Este incremento de los GEI en la atmosfera aumenta el saldo energético de la tierra, porque la cantidad de radiación infrarroja que se mantiene en la Tierra es mayor a la que sale. Esta radiación sube la temperatura del planeta, lo que se conoce como efecto invernadero (Mora et al. 2018). Estos cambios interactúan con varios factores, por ejemplo la radiación que llega a la Tierra.

Las zonas cercanas al trópico son las que reciben mayor cantidad de radiación a lo largo del año, especialmente radiación UV (Herman et al. 1999). La cantidad de esta que llega al planeta está delimitado por el grosor de la capa de ozono, la nubosidad, presencia de aerosoles y el ángulo solar. La mayoría de las predicciones apuntan que debido al cambio en la circulación del viento, a una reducción en el espesor de la capa de ozono y a una menor nubosidad (McKenzie et al. 2011), existirá un aumento en la radiación incidente en el trópico de alrededor del 5% para el 2100 tomando como año base 1980 (Williamson et al. 2014), lo cual representará grandes desafíos relacionados a la producción de alimentos.

Además de los patrones del clima, se pronostica que la población mundial pasará de 7,2 billones en el 2014, a 9,6 billones en 2050 y a 10,9 para el 2100 (Gerland et al. 2014). Por otro lado, se estima que para alimentar a la población del 2050, el crecimiento anual de la productividad en maíz debería ser de 2,4%, sin embargo, para el 2013 era del 1,6% (Ray et al. 2013). Por tanto es importante entender los efectos de estos cambios y prepararnos para estos escenarios.

Radiación ionizante (RI) y ultravioleta (UV)

Se le llama RI a aquella con la capacidad de quitarle los electrones a una molécula, esta puede dañar de forma directa e indirecta el ADN. Existen varias fuentes de RI entre ellas los rayos gamma, rayos X y radiación UV (Fernández et al. 2007). A pesar de que la mayoría de la radiación UV es no ionizante (Hollósy 2002), esta produce efectos en el ADN muy similares a la RI, por ejemplo alteraciones y rupturas en las cadenas de ADN

(Gill et al. 2015). En términos moleculares la respuesta en plantas y la regulación genética se da mediante los mismos mecanismos (Furukawa et al. 2010), donde se pueden mencionar la activación de mecanismos de reparación del ADN, la detención del ciclo celular en una o varias de sus fases y la muerte celular programada (Kim et al. 2019).

La radiación UV, es una parte del espectro de radiación no visible a los ojos humanos con longitudes de onda menores a los 400 nm (Mai et al. 2005). Esta se puede clasificar en tres tipos: UV-A de 320-400nm, UV-B de 280-320nm y UV-C de 200-280nm. La radiación UV-A equivale al 6,3% de la radiación y es la menos peligrosa de estas. La UV-C es la más peligrosa, pero es filtrada casi en su totalidad por la atmósfera, por lo tanto es poco significativa biológicamente. Por otro lado, la radiación UV-B es filtrada parcialmente por la atmósfera y representa un 1,5% del total de radiación que llega a la tierra (Stapleton et al. 1997, Hollósy 2002).

A pesar de que el porcentaje de radiación UV-B que llega a la tierra es bajo, es importante estudiar sus efectos en los seres vivos, porque un pequeño aumento en sus niveles tendría consecuencias muy pronunciadas en la vida en la tierra (Jansen et al. 1998). Por ejemplo Ballaré *et al* (2011), reportan reducción en la acumulación de biomasa de plantas, alteración en las interacciones planta-insecto y las dinámicas de los microorganismos, tanto los que se encuentran sobre las plantas, como los descomponedores. En el caso de estos últimos, aumentos en la radiación, elevarían la foto degradación de la lignina liberando más carbono a la atmósfera.

Zeocina y agentes imitadores de la radiación

Las sustancias radiomiméticas son aquellas que causan un daño muy similar al que provoca la radiación. Uno de ellos es la zeocina, un antibiótico de la familia de la bleomicina (Hu et al. 2018). Los químicos de esta familia, al asociarse con una molécula de hierro, sustraen el hidrógeno ligado al carbono 4, preferencialmente en sitios del ADN donde existe una guanina seguida de una timina o en sitios donde existe una guanina seguida de una citosina (McNeill et al. 1999, Chabner y Longo 2010). Debido a su practicidad y facilidad para dosificar, son utilizados en experimentos para estudiar el daño y reparación del ADN.

Daños en el ADN producidos por RI y UV

La RI produce tanto daños directos como indirectos en el ADN. Los daños directos son rompimientos de doble cadena o de una cadena, inducción de dímeros de pirimidina, sitios sin bases nitrogenadas y enlaces cruzados con proteínas; mientras que los daños indirectos son causados por especies reactivas del oxígeno producto de la radiólisis del agua en las células (Kim et al. 2019).

Las rupturas de doble cadena (RDC) son las más dañinas para los organismos, ya que si no se reparan correctamente pueden provocar la destrucción de una sección completa de la cromátida (Schröpfer et al. 2014). Sumado a lo anterior, las RDC son altamente mutagénicas, pueden provocar muerte celular y son las más complicadas para

reparar (Charbonnel et al. 2011). Por otro lado, la RI produce dos tipos de dímeros de pirimidina: dímeros de ciclobutano-pirimidina (DCP) y fotoproductos de pirimidina (6-4) pirimidona, donde los primeros corresponden a un 75% del daño en ADN (Gill et al. 2015). Ambos fotoproductos causan dobleces en la cadena de ADN que pueden bloquear la replicación y transcripción porque no permiten trabajar a las polimerasas (Schröpfer et al. 2014, Lacks 2001). Los sitios sin bases son causados por la desestabilización del enlace entre la base nitrogenada y el oxígeno. Dicha desestabilización causa que se rompa ese enlace y que se libere la base nitrogenada (Leadon 1996).

En el caso del daño indirecto causado por RI, también llamado daño oxidativo, este se produce cuando hay más especies reactivas de oxígeno que antioxidantes en la célula (Gill et al. 2015). La RI aumenta la producción de radicales OH^\cdot , superóxido (O_2^\cdot) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estos últimos rompen membranas, cadenas simples y oxidan la guanina a 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG). Dicha oxidación tiene efecto mutagénico, ya que esta nueva molécula puede aparearse incorrectamente con la adenina en la siguiente replicación (Schröpfer et al. 2014). Por tanto, las plantas tienen mecanismos para la reparación de esos daños.

Reparación de daños en el ADN en plantas

En términos generales existen dos tipos de reparación de daño de ADN: la fotodependiente y la independiente de la luz también conocida como reparación a oscuras. Además, los mecanismos de reparación independientes de la luz se clasifican en: mecanismos para reparar daños en una cadena y mecanismos para reparar rupturas de la doble cadena (Schröpfer et al. 2014). La reparación fotodependiente es realizada por enzimas llamadas fotoliasas y criptocromos cryDASH, ambos tipos de enzimas necesitan radiación UV-A para ser activadas (Schröpfer et al. 2014, Biever y Gardner 2016) Estos revierten el ADN a su forma original cuando tiene dímeros de pirimidina y no necesitan realizar incisiones en el ADN (Dalhus et al. 2009). Por otro lado, los mecanismos de reparación a oscuras, sí necesitan realizar incisiones.

Los mecanismos de reparación a oscuras para daños de una sola cadena se clasifican en tres tipos: reparación por incisión de una base (RIB), reparación por incisión de un nucleótido (RIN) y reparación de bases mal alineadas (Gill et al. 2015). La RIB consiste en la remoción de la base dañada por una enzima llamada glicosilasa, (Schröpfer et al. 2014). En el caso de la RIN existen varias proteínas involucradas y estas pueden reconocer distorsiones en la doble hélice de ADN, como dímeros de pirimidina y repararlos. Estas proteínas remueven el nucleótido donde se encuentra el daño y utilizan la hebra complementaria de ADN guía para colocar el nucleótido faltante correcto en el espacio vacío (Fatima et al. 2017).

La reparación de bases mal alineadas se considera un mecanismo de revisión y corrección. En este sistema, proteínas especializadas revisan el ADN para buscar sitios donde existan bases nitrogenadas mal apareadas (Manova y Gruszka 2015). Estos errores pueden fijar mutaciones si se replica el ADN sin que se le corrija antes. Luego de

que el daño se detecta, se elimina un segmento de la hebra donde está el daño y se utiliza el ADN complementario para sintetizar el pedazo que se removió. Este proceso reduce la tasa de errores de 10^{-8} a 10^{-10} (Schröpfer et al. 2014). No obstante, cuando el daño ocurre en ambas hebras de ADN, los mecanismos de reparación son diferentes.

Los mecanismos de reparación de daños por ruptura de doble cadena se clasifican como: a) mecanismos de reparación homóloga o de alta fidelidad y b) mecanismos de reparación no homóloga o de baja fidelidad (Kozak et al. 2009). En el caso de la reparación no homóloga, las cadenas de ADN se acoplan de nuevo en los extremos donde se rompieron (Manova y Gruszka 2015). Cuando esta ruptura no conduce a modificaciones es posible la unión sin mutaciones. Sin embargo, en la mayoría de los casos el extremo de la doble hélice de ADN en donde ocurrió el rompimiento sufre alguna modificación y esto lleva a mutaciones. A pesar de que esta vía es muy ágil, es altamente mutagénica y es la más utilizada en células somáticas (Knoll et al. 2014).

En la vía homóloga se reparan las rupturas en la doble cadena utilizando a los cromosomas homólogos como molde. Este mecanismo requiere la apertura de la doble cadena de ADN, luego la hebra homóloga se alinea con la hebra de ADN dañada formando un bucle, o D-loop en inglés (Zhang et al. 2015). Cuando lo anterior ocurre en células somáticas lo normal es que no ocurra recombinación lo cual es deseado para mantener la integridad genética (Schmidt et al. 2019).

Medición de daño en el ADN y capacidad de reparación

Dentro de los métodos que se pueden utilizar para cuantificar los daños en el ADN y su reparación se encuentra la electroforesis de núcleos individuales conocida como ensayo cometa. Este consiste en el montaje de núcleos individuales en un gel para electroforesis y en utilizar la fluorescencia para ver los fragmentos de ADN, el cual migra en el gel dependiendo de las rupturas que haya acumulado. Mediante el análisis de la imagen se puede determinar el nivel del daño comparando la intensidad del brillo de la cola relativo a la cabeza. La cola se refiere a los fragmentos de ADN que se mueven en el gel, y la cabeza aquellos que se mantienen adheridos al núcleo (Mccarthy et al. 1997, Olive y Banáth 2006). Además, es posible medir la capacidad de reparación al inducir algún daño y después realizar mediciones secuenciales para observar en cuánto se reduce el daño (Collins 2004).

Dependiendo de las necesidades y la sensibilidad requerida, existen diferentes tipos de ensayo cometa. Estos se clasifican según el pH del tratamiento previo a la electroforesis, y según el pH del buffer que se usa durante la electroforesis. Una opción es tratar las células en un medio neutro, entre 7 y 9, y realizar la electroforesis en un buffer neutro (protocolo N/N o ensayo cometa neutral), este método posee una sensibilidad baja, lo cual significa que solamente detecta rupturas de doble cadena (RDC) y no otros tipos de daño como rupturas simples de la cadena de ADN (Menke et al. 2001). Si se busca cuantificar rupturas simples de cadena, puede optarse por tratar previamente las muestras en una solución con pH alcalino, de entre 10 y 13, y luego realizar la electroforesis en un buffer con pH neutro (protocolo A/N) (Angelis et al. 1999).

Por otro lado, puede realizarse el tratamiento previo de las muestras y la electroforesis en medios alcalinos (Ensayo cometa alcalino o protocolo A/A), con el fin de favorecer la cuantificación de sitios lábiles alcalinos junto con las rupturas en el ADN (Mccarthy et al. 1997).

El ensayo cometa se utiliza principalmente para medición de genotoxicidad y biomonitoreo en humanos (Nandhakumar et al. 2011), no obstante ha sido adaptado y utilizado para estudios de reparación de ADN en plantas. En *Vicia faba* se ha utilizado para medir la capacidad de reparación en respuesta de radiación gamma (Koppen y Angelis 1998). En *Hordeum vulgare* para medir daño en ADN en respuesta a diferentes dosis del agente alquilante N-metil-N-nitrosourea (MNU) (Jovtchev et al. 2001). En *Nicotiana tabacum*, se utilizó para generar curvas de respuesta a dosis de diferentes agentes alquilantes (Gichner et al. 1999). En *Arabidopsis thaliana*, se ha utilizado tanto para determinar protocolos adecuados para exposición a químicos genotóxicos (Menke et al. 2001), como para analizar cuál vía de reparación de ADN se emplea preferentemente ante daños por la radiación (Kozak et al. 2009). En maíz, la técnica se ha empleado para cuantificar la genotoxicidad de los herbicidas nicosulfurón y topramezón (Reynoso et al. 2018).

Regulación de los mecanismos de reparación de daños por rupturas de doble cadena (RDC)

A pesar de que los daños ocasionados por la radiación UV y la RI son diferentes, los mecanismos genéticos de respuesta son los mismos y han sido caracterizados principalmente en *A. thaliana* (Furukawa et al. 2010). Primeramente, las proteínas Ku70 y Ku80 son las principales detectoras de las RDC debido a su alta afinidad por los bordes de ADN rotos. El gen *KU80*, es esencial para reparación no homóloga mediante la unión de los extremos de las rupturas en la cadena de ADN mediado por el complejo Ku80/Ku70 (Richter y Jeske 2015, West et al. 2002). Además, se ha identificado al complejo DNA Ligase 4 (LIG4)/ X-Ray Repair Cross-Complementing Protein 4 (XRCC4) como factores que participan de la reparación no homóloga (West et al. 2000, Kozak et al. 2009, Park et al. 2015).

Una vez detectado el daño, el conjunto de proteínas Meiotic Recombination 11 (MRE11), DNA Repair Recombination Protein (RAD50) y Nijmegen Breakage Syndrome 1 (NBS1) se encarga de llevar la quinasa Ataxia Telangiectasia-Mutated (ATM) al sitio donde ocurrió el daño (Waterworth et al. 2011) la cual se activa en simultáneo con la quinasa Ataxia Telangiectasia-Mutated and RAD3-like protein (ATR) (Mannus et al. 2012).

Las quinasas ATM y ATR son las principales moduladoras de la reparación de ADN junto con el factor de transcripción Suppressor of Gamma Response 1 (SOG1). La proteína SOG1 causa un aumento en la expresión de varios genes relacionados con la reparación de ADN, y a su vez SOG1 es activado por hiperfosforilación, la cual es

mediada tanto por ATM y ATR. En las funciones reguladas por SOG1 están: control del ciclo celular, muerte celular programada, modulación transcripcional y mantenimiento de la integridad del genoma, todo lo anterior en respuesta al daño del genoma (Yoshiyama et al. 2014).

Un aspecto importante para que la reparación del ADN se dé correctamente es que las células detengan su división momentáneamente para que no existan errores en la reparación (Weimer et al. 2016). En ese momento varios genes y factores regulatorios relacionados con el ciclo celular disminuyen su expresión, lo cual significa que ayudan a ralentizar o detener el ciclo celular en ciertas fases. Entre ellos están: *Cyclin B1;2* (*CYCB1; 2*) y *Cyclin Dependent Kinase B1;2* (*CDKB1;2*) entre las fases S y G2 del ciclo celular. La *Cyclin Dependent Kinase B2;1* (*CDKB2;1*) en el caso de las fases G2 a M y la *Syntaxin of Plants 111* (*KNOLLE*) en la citoquinesis (Yoshiyama et al. 2014). En el caso específico de *Breast Cancer Susceptibility Gene 1* (*BRCA1*), un aumento de su expresión ante la exposición de rayos gamma se ha asociado con la reparación de ADN y a la detención del ciclo celular (Lafarge y Montane 2003).

Reportes sobre respuesta de plantas a la radiación

Algunos experimentos han investigado los efectos de RI y UV-B en maíz previamente, los resultados obtenidos son muy variados y en algunos casos contradictorios. Killion y Constantin (1972) reportaron reducción en la germinación, altura y productividad de hasta un 50% en plantas irradiadas con radiación gamma, así como recrudescimiento de los efectos negativos durante la etapa reproductiva. Correia *et al* (2000) reportaron una reducción en el rendimiento y en la biomasa de las plantas a dosis crecientes de UV-B, con efectos más marcados en plantas deficientes en nitrógeno. Reddy *et al* (2013) reportaron una reducción en la altura, en el área foliar y la biomasa acumulada para lo cual encontraron que existe una relación lineal inversa que es proporcional a la dosis de radiación UV-B.

Gao *et al* (2004) indicaron que en *Z. mays*, además de la reducción creciente en el rendimiento la cual depende de la dosis, encontraron una reducción en la concentración de clorofila y calidad nutricional de los granos y aumento en la concentración de flavonoides en los tejidos. No obstante, otros estudios reportaron beneficios de la radiación como aumento en la biomasa, la productividad primaria neta (Ambasht et al. 1995), la altura, el área foliar y el número de hojas (Olawuyi et al. 2016).

Igualmente en *Z. mays*, se ha reportado que mayores niveles de radiación UV-B no afectan la germinación del polen, pero sí pueden retrasar la floración entre 2 y 3 días (Santos et al. 1998). Stapleton *et al* (1997) por su parte midieron dímeros de ciclobutano-pirimidina en tejidos de hojas, raíces y anteras de plantas 3, 4, 6, 9 y 10 semanas después de recibir radiación UV-B. Ellos encontraron que las anteras mostraron la mayor cantidad de daño y que no existía diferencia en la cantidad de daño acumulado en un mismo tejido a diferentes fechas.

Por otra parte, en trabajos realizados en *Avena fatua* y *Setaria viridis*, ambas de la familia Poaceae, se ha observado disminución en la altura, peso fresco y área foliar como resultado de exposiciones crecientes a la radiación UV-B (Zuk-Golaszewska et al. 2003). En *Triticum aestivum* se ha reportado reducción de altura, biomasa total, rendimiento de granos, número y peso de granos (Bacelar et al. 2015). Además, en *Glycine max*, se ha encontrado una reducción de la producción y germinación de polen y tamaño del tubo polínico (Koti et al. 2005).

Materiales y métodos

Material vegetal y tratamientos

Se utilizaron cinco accesiones de maíz para la medición de daño en el ADN y dos de las cinco accesiones anteriores para la medición de expresión génica. Se utilizó una línea de maíz morado proveniente de Guatemala (identificada como J), obtenida a través del banco de germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) ubicado en Turrialba, Cartago, Costa Rica y cuatro provenientes de Costa Rica, de las cuales una fue obtenida a través de CATIE (identificada como T), dos fueron obtenidas a través de agricultores (identificadas como P1 y P2 respectivamente) y una fue obtenida a través de Semillas Plantae, una empresa de semillas de polinización abierta (identificada como C) (Cuadro 1). Además, se utilizaron las líneas puras B73 y Mo17 proveniente de los Estados Unidos como controles. El experimento se realizó en la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno en Barrio San José, Alajuela, Costa Rica.

Cuadro 1. Accesiones de maíz utilizadas y su origen incluyendo la latitud, altitud (msnm) y valor anual promedio de radiación directa a la superficie (kWh/m²). Datos de latitud, altitud y radiación directa obtenidos de (Global Solar Atlas 2020).

Código de la accesión	Identificación de la accesión	Origen	Latitud	Altitud (msnm)	Radiación directa (kWh/m ²)
B73	B73	Ohio, E.E.U.U	42	302	1658
Mo17	Mo17	Missouri, E.E.U.U	38,5	261	1704
8689 (morado)	J	Guatemala, Quiché, San Pedro Jocopilas	15,095	2107	1982
Pujagua2 (morado)	P2	Costa Rica, Guanacaste, La Cruz	11,074	232	1741
Pujagua1 (morado)	P1	Costa Rica, Guanacaste, Santa Cruz	10,273	50	1843
Congo	C	Costa Rica, Alajuela, Orotina, Orotina	9,912	235	1703
8290 (morado)	T	Costa Rica, Limón, Talamanca	9,6	23	1083

De cada accesión y para cada tratamiento se germinaron tres grupos de seis semillas cada uno en un plato Petri de 90 mm. Dichos platos Petri se colocaron en cajas plásticas cerradas para mantener la humedad y se mantuvieron con un fotoperíodo de 12 horas por siete días. Posteriormente, se tomaron tres plántulas de forma aleatoria y el hipocótilo y las raíces se sumergieron en platos Petri con una solución de zeocina a una concentración de 100 µg/mL o agua destilada por 24h dependiendo si correspondían a un tratamiento o al control respectivamente.

El tratamiento con zeocina (zeocina) consistió en tomar las plántulas inmediatamente después de sumergirlas por 24 horas en zeocina y cortar la cantidad necesaria del hipocótilo para realizar las pruebas que se describirán más adelante. En el tratamiento de zeocina más reposo (z+reposo) se sumergieron las plántulas por 24 horas en la solución de zeocina, luego se sacaron de la solución de zeocina y se dejaron reposar una hora en un ambiente totalmente oscuro y húmedo con el fin de permitir que la planta repare el ADN y luego se procedió a realizar las pruebas. Finalmente el control consistió en dejar las plántulas 24 horas en agua destilada y luego realizar las pruebas. Cada plato Petri con tres plántulas correspondió a una unidad experimental y se realizaron tres repeticiones biológicas de cada accesión con su respectivo tratamiento.

Medición de la capacidad de reparación de ADN

Se realizó el ensayo cometa neutral (Collins 2004) para medir el daño en el ADN por rupturas de doble cadena. Se utilizó el kit Standard Comet Assay de Trevigen. En cada repetición se tomó tejido del hipocótilo de tres plántulas de maíz en cantidades lo más similar posible hasta sumar entre 200 y 300 mg. Dicho tejido se colocó en un plato Petri con 2 ml de buffer 1X PBS + 20mM EDTA y se picó finamente para liberar los núcleos. Dicha solución se filtró dos veces a través de una malla de tamaño de poro 30 μm modelo CellTrics marca Sysmex (Alemania) y se colocó en un tubo Eppendorf de 2 ml.

Los núcleos extraídos se fijaron en un portaobjetos del kit, manufacturado para mejorar la fijación de núcleos. Se tomaron 3 μg de la solución filtrada anteriormente y se colocaron en un tubo Eppendorf de 0,2 ml con 10 μl de agarosa de bajo punto de fusión (Trevigen), que previamente fue derretida en baño María entre 80 y 90°C y una vez derretida se dejó reposar a 37°C entre 10 y 20 minutos para evitar destruir los núcleos extraídos. Luego, se pipeteó suavemente la mezcla, se tomaron 10 μl y se colocaron en uno de los pozos del portaobjetos especial de forma que cubrió toda la superficie. Estos se dejaron secar a 4°C y a oscuras, una vez secos se sumergieron en la solución de lisis del kit alrededor de 24 horas, con el fin de disolver membranas celulares y remover proteínas. Finalmente se sumergieron por 30 minutos en buffer neutral de electroforesis 1X (Acetato de Sodio 75 μM + Tris base 25 μM), para remover sales y detergentes, antes de llevarlos a electroforesis.

Luego se colocaron las muestras en el tanque de electroforesis con 850 ml de buffer de electroforesis 1X (Acetato de Sodio 75 μM + Tris base 25 μM). Se suministró electricidad por 2 horas a 1V/cm con un lo que sería de 21 V totales y una corriente de 130 mA. Terminado lo anterior, las muestras se sacaron y se les escurrió el exceso de líquido de buffer. Luego, las mismas se introdujeron dos veces en agua destilada para lavar el exceso de buffer. Se sumergieron por 15 minutos en etanol al 70% y 15 minutos en etanol de 95%, con el fin de fijar los núcleos. Posteriormente las muestras se secaron a 37 °C entre 10 y 15 minutos, se agregó 50 μl de SYBR Gold (Thermo Scientific) diluido en cada círculo del portaobjetos y se dejaron teñir por 30 minutos a oscuras. Se escurrió el exceso, se enjuagó y se dejó a 37°C hasta secar completamente.

Preparada la muestra, se colocó el portaobjetos en un microscopio con epifluorescencia Olympus BX53. Se tomaron entre 6 y 8 fotos, con el filtro GFP, y con una cámara digital Olympus DP74 controlada con el software CellSense. Para cada repetición se analizaron entre 13 y 50 núcleos por repetición con el software TriTek Comet score (versión 1,5; TriTek). Dicho software analiza los núcleos de la célula y mediante análisis de imágenes da un valor de porcentaje de ADN en la cola, lo que significa: el porcentaje del área de la imagen que corresponde a la cola en relación al área sumada del núcleo más la cola.

Para determinar si las accesiones fueron resistentes o no al tratamiento con zeocina, se compararon los valores del porcentaje de ADN en la cola de los núcleos provenientes de las plántulas luego de 24 horas de exposición a zeocina (tratamiento zeocina), y de las plántulas expuestas por 24 horas en agua (control). Los datos se sometieron a la prueba de Shapiro-Wilks para determinar si poseían una distribución normal y a la prueba de Levene para determinar si existía homogeneidad de variancias. No obstante, la distribución de los datos no fue normal y se presentó heterocedasticidad de variancias, por lo tanto se analizaron mediante un modelo lineal general y mixto con corrección de heterocedasticidad (producida por el tratamiento). Se utilizó el software Infostat versión 2020 libre. Además, se determinó que existía interacción entre el tratamiento y la accesión ($P < 0,05$), y se comparó dicha interacción a través del método de separación de medias DGC (Di Rienzo et al. 2002) con una significancia del 5%. Las accesiones se clasificaron en: a) no resistentes si su nivel daño era mayor en el tratamiento con zeocina que en el control y b) resistentes si no existían diferencias.

Para determinar si una accesión poseía capacidad de reparación de las RDC, se compararon por separado los valores de porcentaje de ADN en la cola, en los dos tratamientos (Zeocina, Z+reposo) y el control para cada una de las accesiones. Los datos se sometieron a la prueba de Shapiro-Wilks para determinar si poseían una distribución normal y a la prueba de Levene para determinar si existía homogeneidad de variancias. No obstante, la distribución de los datos no fue normal y se presentó heterocedasticidad de variancias, por lo tanto los resultados se analizaron mediante un modelo lineal general y mixto con corrección de heterocedasticidad (producida por el tratamiento), utilizando el software Infostat versión 2020 libre. Además, se determinó que en todas las accesiones el efecto del tratamiento fue significativo ($P < 0,05$), por lo que se compararon los tratamientos dentro de cada accesión con el método DGC (Di Rienzo et al. 2002) con una significancia del 5%.

Se clasificó las accesiones no resistentes como:

- Accesiones con capacidad nula de reparación al no existir diferencias en el porcentaje de ADN de la cola entre el tratamiento con zeocina (zeocina) y el tratamiento de zeocina más reposo (z+reposo), pero ambos tratamientos debían mostrar más daño que el control.

- Accesiones con capacidad parcial de reparación cuando el porcentaje de ADN en la cola en el tratamiento z+reposo era menor que en el tratamiento con zeocina, pero mayor que en el control.
- Accesiones con capacidad total de reparación, cuando el porcentaje de ADN en la cola en el tratamiento z+reposo fue menor que en el tratamiento con zeocina e igual que en el control.

Además, se determinó el porcentaje de ADN reparado (%Reparación) por las accesiones no resistentes y con capacidad de reparación parcial. Con el fin de tomar en consideración el porcentaje basal de ADN en la cola presente en los núcleos de las plántulas sin recibir tratamiento con zeocina, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%Reparación = \left(\frac{\%cola_{z+reposo} - \%cola_{control}}{\%cola_{zeocina} - \%cola_{control}} \right) \times 100$$

Donde:

- %cola_{1h}: porcentaje de ADN en la cola de las muestras con una hora de reposo luego de ser expuestas por 24 horas a la zeocina (tratamiento z+reposo).
- %cola_{control}: porcentaje de ADN en la cola de las muestras sumergidas por 24 horas en agua (control).
- %cola_{0h}: porcentaje de ADN en la cola de las muestras sin reposo luego de ser expuestas por 24 horas a la zeocina (tratamiento zeocina).

Los valores obtenidos se compararon entre accesiones, los datos se sometieron a la prueba de Shapiro-Wilks para determinar si poseían una distribución normal y a la prueba de Levene para determinar si existía homogeneidad de variancias. Se determinó que los resultados poseían una distribución normal y variancias homogéneas, por lo tanto se analizaron mediante un ANOVA con el software Infostat versión 2020 libre. Al final se compararon los tratamientos dentro de cada accesión con el método de separación de medias DGC (Di Rienzo et al. 2002) con una significancia del 5%.

Determinación de la especificidad de los imprimadores

Se determinó la especificidad de un total de 13 imprimadores (Cuadro 2) para 10 genes relacionados con la reparación de ADN, mediante el análisis de las curvas de disociación producto de experimentos del PCR de tiempo real. Las muestras para extracción de ADN para este ensayo se tomaron al momento en que se tomó el material vegetal para el ensayo cometa, aunque también se tomó tejido de los hipocótilos. Se guardó en tubos Eppendorf y se colocó en nitrógeno líquido. Dicho material vegetal se almacenó a -80°C en un refrigerador Eppendorf CryoCube hasta el momento de determinar la especificidad de los imprimadores. Para esta prueba se seleccionaron las

accesiones Pujagua1 (P1) y Pujagua2 (P2), debido a que presentaron evidencia de tolerancia a la radiación ionizante o capacidad de reparación de rupturas de doble cadena (RDC) en el ADN mediante los ensayos cometa. Además, como controles se utilizaron las líneas puras estadounidenses B73 y Mo17, los dos genomas de referencia mejor estudiados.

Cuadro 2 Secuencia de los imprimadores para análisis de expresión génica en *Z. mays*. El número de las accesiones se obtuvo de maizgdb.org.

Nombre del gen	Nomenclatura GenBank del gen	Versión del imprimador	Imprimadores	
			Delantero (5'-3')	Reverso (5'-3')
<i>ATM1</i>	ZEAMMB73_719523	1	ACCTTACGATGGCAACAAGG	CACAACCGATCAACATCCAC
<i>ATR1</i>	ZEAMMB73_001485	1	TAGATCAGCGAGGGCAAGTT	GACGACTCCTGGTCTCTCG
<i>SOG1</i>	GRMZM2G027309	1	GTGGGACGGCAGTGAAGTAT	CAAGCTGATGCAACCAAGAA
		2	CAGGCAACACAAAGCCAGTA	GCCTAGGTGGTACTGGTGGAA
<i>RAD51</i>	ZEAMMB73_415620	1	TGCACATGGCTAAGTTCCTG	AATGGGCTTGAAGTGTGGTC
		2	ATTGGAGGAAACATCATGGC	ATCAACTGGAGGAGGAGCAA
<i>BRCA1</i>	GRMZM2G080314_T01	1	AAAGCCAAACCAGAAGGACA	AGGTGCTTCAATGTCCAACC
<i>KU80</i>	ZEAMMB73_970034	1	AATGGGAGGCAGTCAAGTTC	ATGCATTGCTCTTGCTATCG
<i>LIG4</i>	ZEAMMB73_740813	1	CTACTGGTGGCGATGTTCC	GCGCTGAAGTAGTCATCCCT
<i>CDKB2;1</i>	ZEAMMB73_508670	1	GCACCCGTACTTCAATGAT	TGCTTCAGGGTAGCCATATT
<i>UBQ10</i>	ZEAMMB73_119779	1	CAACATCCAGAAGGAGAGCA	GACTCCACCTCAAGGGTGAT
		2	ATCACCCCTTGAGGTGGAGTC	TGCTCTCCTTCTGGATGTTG
<i>EIF4A</i>	ZEAMMB73_Zm00001d015251	1	CGTCCAGAGGTTCTACAA	CATCCTTCGCCACAATAC

El ADN se extrajo de la siguiente manera: por cada accesión se tomaron entre 50 y 100 mg de tejido y se colocaron en un tubo Eppendorf de 2 ml. A cada muestra se le agregaron 500 µl de una solución compuesta de: 1 M Tris/HCl (pH: 8,0), 5 M NaCl, 0,5 M EDTA (pH: 8,0), CTAB 2% y PVP 2%. Luego se colocó un balón de maceración en cada tubo y se maceraron a 14000 rpm por dos minutos en el macerador de tejidos modelo Geno/Grinder® de la marca Spex® Sample Prep (E.E.U.U). Se dejaron incubar por 20 min a 65°C en un calentador de tubos marca ThermoFisher y se agitaron manualmente por inversión cada 10 minutos. Se agregaron 500 µl de cloroformo:fenol (24:1) y se agitaron por inversión 20 veces. Las muestras se centrifugaron por 6 min a 13000 rpm a temperatura ambiente. Se transfirieron 300 µl del sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1,5 ml, se le agregaron 300 µl de isopropanol a -20°C y se agitaron 10 veces por inversión. Se incubaron por cinco min a temperatura ambiente y se centrifugaron por 6 min a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 µl de etanol 70% frío. Se centrifugaron las muestras por 3 min a 13000 rpm a 4°C y se descartó el etanol. Se dejó secar la muestra por 30 min a 42°C con el fin de evaporar el etanol y dejar solamente el pellet que se precipitó en el paso anterior. EL pellet se resuspendió en 50 µl de buffer TE 1X. Luego, se agregó 1 µl de ARNasa A con concentración de 10 mg/mL (Thermo Scientific), y se incubó por 30 min a 37°C. Finalmente se determinó la concentración y la pureza de las muestras con el Nanodrop One C (Thermo Scientific).

El PCR tiempo real y las curvas de disociación se realizaron con las muestras de ADN diluidas a 50 ng/μl utilizando el kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega). Cada reacción se realizó con un volumen final de 10 μl, una concentración de 0,5 μM de cada imprimador (cuadro 2) y 2 μl de ADN. Además se incluyó un control negativo sin la muestra de ADN (Non Template Control: NTC) y un control absoluto sin los imprimadores. Se utilizó el siguiente perfil térmico: un ciclo de activación de 95°C por un minuto, 40 ciclos con una fase de desnaturalización a 95°C por cinco segundos y una de anillamiento y extensión a 60°C por 30 segundos y un ciclo final de disociación de 60°C a 95°C, con un aumento de 1°C cada 5 segundos. Los gráficos se analizaron para determinar si existió amplificación y confirmar si los imprimadores eran específicos para las cuatro accesiones. El equipo que se usó fue un RotorGene de la marca Qiagen conectado a una PC, y controlado por medio del software QREx (Qiagen).

Con la cuarta versión del genoma de la accesión B73, se elaboraron diagramas de cada gen. Tanto la secuencia de cada gen y del ARN mensajero se obtuvieron de la base de datos Maize GDB (Genética y genómica del maíz, en español) (<https://www.maizegdb.org/>). Tanto las secuencias de ADN genómico, como el ARN mensajero y los imprimadores para cada gen se alinearon con la versión de prueba del software Snapgene. Los diagramas se elaboraron en el servidor de visualización de estructura genética versión 2 (GSDS 2.0 por sus siglas en inglés Gene Structure Display Server) (Hu et al. 2015).

Medición de la expresión de genes

Para dicho experimento se utilizaron las accesiones Pujagua1 (P1) y Pujagua2 (P2) y las líneas homocigotas B73 y Mo17 como control. Se germinó para cada accesión tres grupos de seis semillas por plato Petri. Dichos platos Petri se colocaron en cajas plásticas cerradas para mantener la humedad y se mantuvieron con un fotoperiodo de 12 horas por siete días. Posteriormente, de cada plato Petri, se extrajo 2 plántulas en forma aleatoria y se les sumergió el hipocótilo y las raíces en platos Petri llenos con una solución de zeocina a una concentración de 100 μg/mL o en agua destilada por 24h dependiendo si correspondían al tratamiento o al control respectivamente. Para este experimento solamente se sometieron las plántulas a un tratamiento.

El tratamiento con zeocina consistió en tomar las plántulas inmediatamente después de las 24 horas en el químico. Mientras que el control consistió en dejar las plántulas 24 horas en agua destilada. Inmediatamente después de terminado el tratamiento se tomaron entre 100 y 150 mg del hipocótilo de ambas plántulas, se colocaron en tubos Eppendorf y se les sumergió en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -80°C en un refrigerador Eppendorf CryoCube hasta el momento de la extracción de ARN. Cada plato Petri con 2 plántulas correspondió a una unidad experimental y se realizaron 3 repeticiones biológicas de cada accesión con su respectivo tratamiento.

Posteriormente, de cada tubo Eppendorf con los hipocótilos en -80°C se tomó 20 mg para realizar la extracción de ARN. La misma se realizó utilizando el kit RNeasy

Plant Minikit (Qiagen) siguiendo la metodología del fabricante. A las muestras se les realizó la medición de concentración y pureza por espectrofotometría con el NanoDrop One. Se utilizaron solamente muestras con valores de A260/230 de 1,9 a 2,2 y valores de A260/280 mayores a 1,8. Dichas muestras se trataron con ADNasa I de Invitrogen de la siguiente manera, para 1 µg de ARN se agregó 1 µl de buffer para ADNasas, 1 µl de ADNasa y se agregó agua tratada con DEPC hasta alcanzar un volumen de 10 µl. Luego se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Para desactivar la ADNasa se agregó 1 µl de EDTA a 25 mM y se calentó a 65°C por 10 min.

Luego, con el ARN aislado, se sintetizó el ADN complementario (ADNc) con el kit Access RT-PCR System (Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se utilizaron 2 µl de muestra de ARN a una concentración de 90,9 ng/µl en cada reacción. La retrotranscripción se realizó en un termociclador Rotor-Gene de Qiagen, con el siguiente perfil térmico: un ciclo inicial de 45 minutos a 45°C, un ciclo de 2 minutos a 94°C, 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, un minuto a 60°C y 2 minutos a 68°C, finalmente un ciclo de 7 minutos a 68°C. El ADN complementario resultante se almacenó a -20°C hasta realizar la medición de la expresión génica.

Para medir la expresión génica se realizó un PCR cuantitativo con el kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega) en el aparato Rotor-Gene (Qiagen). Para cada muestra se utilizó un volumen final de 10 µl, una concentración de 0,5 µM de cada imprimador (cuadro 2) y 2 µl de ADN complementario. Se utilizó el siguiente perfil térmico: un ciclo de activación de 95°C por un minuto, 40 ciclos con una fase de desnaturalización a 95°C por cinco segundos y una de anillamiento y extensión a 60°C por 30 segundos, y un ciclo final de disociación de 60°C a 95°C con un aumento de 1°C cada 5 segundos.

En cada repetición se midió la expresión de los genes homólogos a *A. thaliana*: *ATM* (Garcia et al. 2000), *SOG1* (Preuss y Britt 2003), y se utilizó como gen de referencia *EIF4A* (Lin et al. 2014) (Cuadro 1). Se utilizaron dos réplicas técnicas para cada reacción. Y se determinó la eficiencia de la reacción para cada accesión y cada imprimador mediante una serie de cinco diluciones con un factor de dilución de 2 y se utilizaron dos réplicas técnicas en cada dilución.

El cálculo de la tasa de expresión del gen objetivo (R) se calculó mediante la siguiente fórmula $R = \frac{(E_{\text{objetivo}})^{\Delta CP_{\text{objetivo}}(CP_{\text{objetivo}} - CP_{\text{ControlObjetivo}})}}{(E_{\text{GR}})^{\Delta CP_{\text{GR}}(CP_{\text{GR}} - CP_{\text{ControlGR}})}}$ (Pfaffl 2001). Donde

R es la tasa de expresión del gen objetivo; E_{objetivo} es la eficiencia de reacción del par de imprimadores que corresponden al gen objetivo; $\Delta CP_{\text{objetivo}}$ corresponde al diferencia en el ciclo umbral (CP por sus iniciales en inglés: "Crossing Point") del gen objetivo menos el CP de un calibrador ($CP_{\text{ControlObjetivo}}$), que en este caso corresponde al tratamiento control. E_{GR} es la eficiencia de reacción del par de imprimadores que corresponden al gen de referencia; ΔCP_{GR} corresponde a la diferencia en el ciclo umbral del gen de

referencia menos el CP de un calibrador ($CP_{ControlGR}$), que en este caso corresponde al tratamiento control.

Para introducir los valores de CP a la fórmula, se promediaron los valores de CP de las dos replicas técnicas que poseía cada repetición biológica y se determinó la expresión del gen para cada repetición biológica. Los datos resultantes se sometieron a un análisis de homogeneidad de variancias y las comparaciones entre tratamiento se realizaron mediante una prueba de separación de medias DGC con el programa Infostat versión libre.

Resultados

Medición de la capacidad de reparación de ADN

Producto de la exposición a la zeocina, se determinó que en todas las accesiones se indujo rupturas de doble cadena (RDC) de ADN con la excepción de la accesión P1. Las plántulas de la accesión P1, presentaron el menor porcentaje de ADN en la cola luego de 24 horas de exposición a zeocina y su porcentaje de daño fue igual al de las plántulas sin tratar (control) (Figura 1), es decir, fue la única accesión no sensible y, por tanto posiblemente resistente al daño por radiación. Las accesiones B73, Mo17, P2, T, J y C se clasificaron como sensibles a la zeocina y por tanto no resistentes. Por otra parte, los núcleos de los hipocótilos sin tratar con zeocina (control) de la accesión T presentaron el menor porcentaje de ADN en la cola.

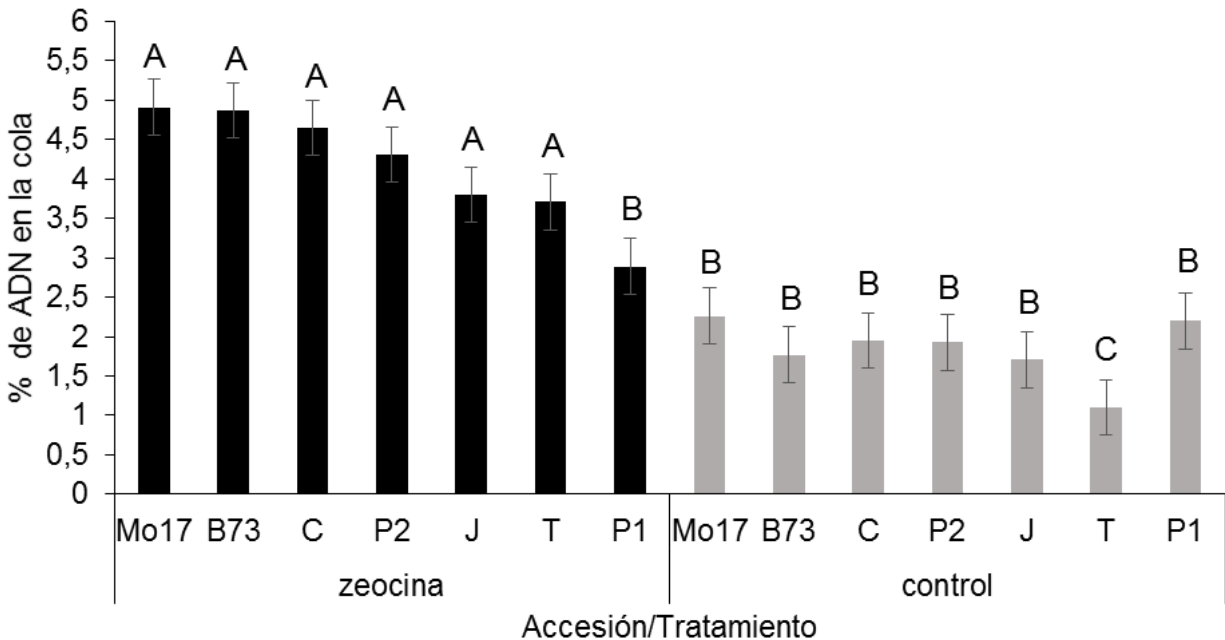


Figura 1. Porcentaje de ADN en la cola de los núcleos de plantas de maíz tratadas o no (control) con zeocina sin reposo posterior (zeocina) en siete accesiones: B73, Congo (C), 8689 (J), Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y 8290 (T). Las barras representan el error estándar y las letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba DGC entre accesiones y tratamientos con una significancia del 0,05 (n=3).

Con respecto a la capacidad de reparación de RDC de ADN, se determinó que existe una accesión con capacidad nula de reparación, cuatro con capacidad de reparación parcial y una con capacidad de reparación total. Como se observa en la figura 2 la accesión Mo17 fue la única con capacidad nula de reparar sus RDC, ya que después de 1 hora de reposo, el porcentaje de ADN en la cola de los núcleos no varió. Por otro

lado, las accesiones B73, C, J y T; repararon parcialmente el daño provocado en su ADN por el tratamiento con zeocina, ya que luego de una hora de reposo el porcentaje de ADN en la cola de los núcleos disminuyó, pero fue mayor al control. La accesión P2 tuvo la capacidad total de reparar las RDC causadas por el tratamiento con zeocina ya que luego de una hora de reposo el porcentaje de ADN en la cola de los núcleos disminuyó hasta llegar a un porcentaje igual al control (Figura 2, Cuadro 3).

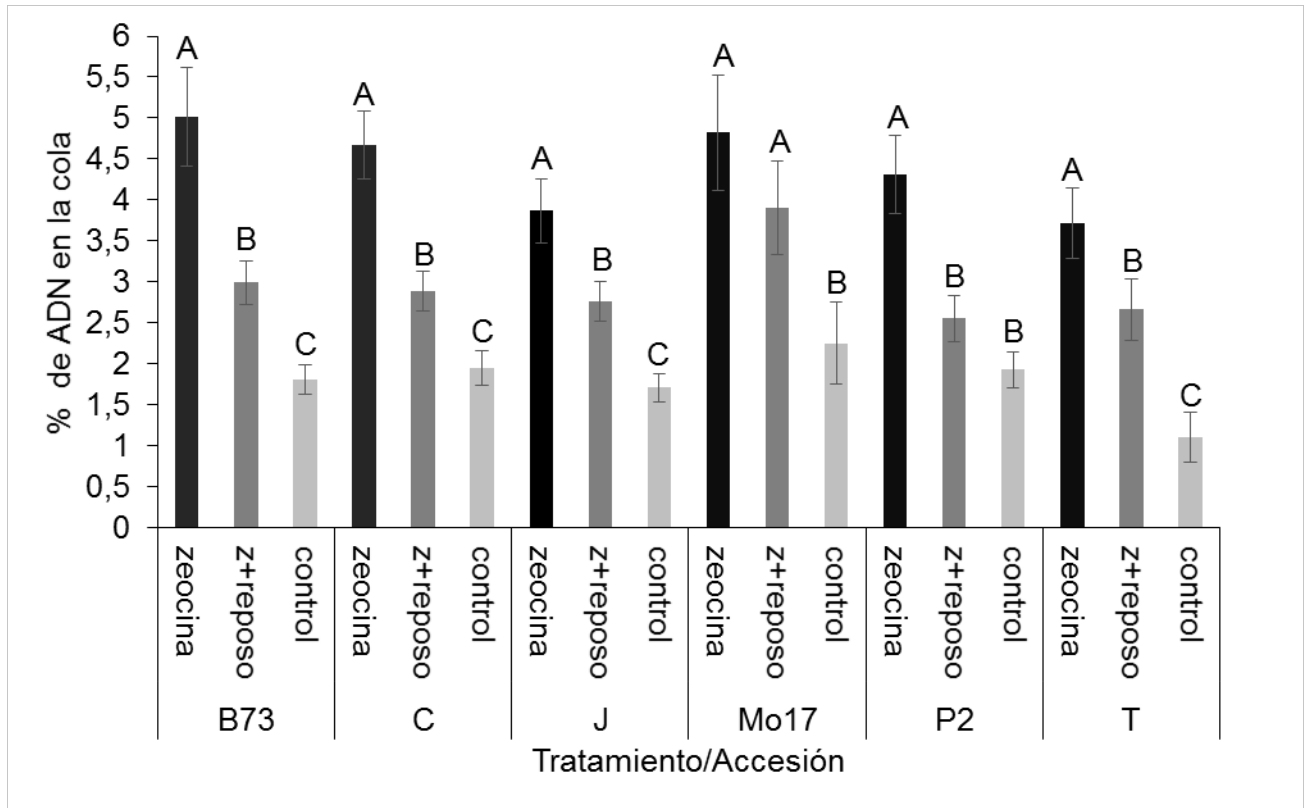


Figura 2. Porcentaje de ADN en la cola de los núcleos de plantas de maíz tratadas o no (control) con zeocina sin reposo posterior (zeocina) y con una hora de reposo (z+reposo) en las seis accesiones clasificadas como no resistentes: B73, Congo (C), 8689 (J), Mo17, Pujagua2 (P2) y 8290 (T). Las barras de error representan el error estándar y las letras indican diferencias significativas de acuerdo a una prueba DGC entre tratamientos dentro la misma variedad con una significancia del 0,05 (n=3).

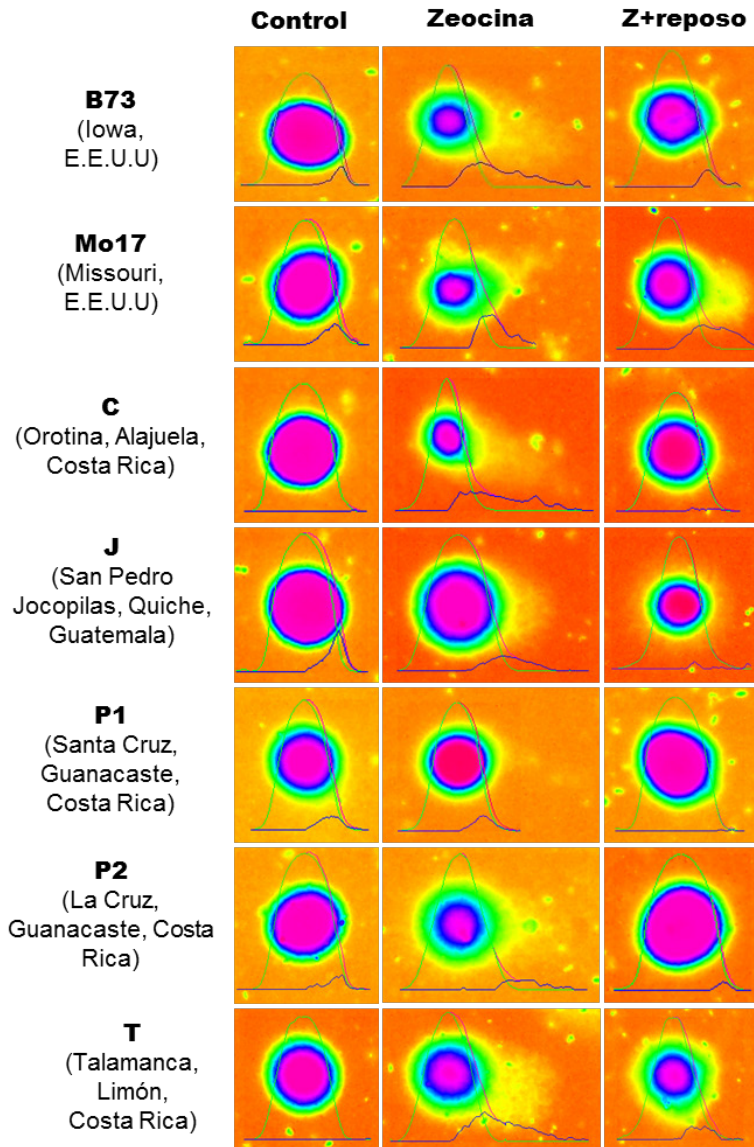


Figura 3. Imágenes de núcleos de plantas de maíz tratadas o no (control) con zeocina sin reposo posterior (zeocina) y con una hora de reposo (z+reposito) en siete accesiones: B73, Congo (C), 8689 (J), Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y 8290 (T). Los colores morado y azul corresponden a áreas con alta densidad de ADN, mientras que el verde y el amarillo corresponden a áreas con baja densidad de ADN y colas de ADN.

En las imágenes de los núcleos se observa que solamente en P1 los núcleos de las plantas tratados con zeocina y los que no fueron tratados son casi idénticos, lo que indica posible ausencia de daño debido al tratamiento. En el resto de accesiones sí se observa una cola o zonas de menor densidad de ADN (Figura 3), lo que sugiere presencia de daños en el ADN debido al tratamiento. Además, se puede observar que solamente en los núcleos de plantas expuestas a zeocina y con una hora de reposo (z+reposito) de la accesión Mo17 aún se observa la cola de ADN y áreas con baja densidad de ADN, lo que sugiere que no hubo reparación. Por otro lado, en el caso de

P2, los núcleos de plantas tratadas con agua (control) y los del tratamiento z+reposo son casi idénticos. En el caso de B73, C, J y T; se pueden observar zonas de baja densidad de ADN en el tratamiento z+reposo, pero no se observa una cola como en el caso de Mo17, lo cual sugiere que sí existió reparación, pero que no es total como en el caso de P2 (Figura 3).

Cuadro 3. Clasificación de las accesiones según su sensibilidad a la zeocina y su capacidad de reparación de rupturas de doble cadena (RDC) de ADN.

Código de la accesión	Identificación	Clasificación según sensibilidad a la zeocina	Clasificación según capacidad de reparación de RDC de ADN
B73	B73	No resistente	Parcial
Mo17	Mo17	No resistente	Nula
8689 (morado)	J	No resistente	Parcial
8290 (morado)	T	No resistente	Parcial
Pujagua1 (morado)	P1	Resistente	No aplica
Pujagua2 (morado)	P2	No resistente	Completa
Congo (morado)	C	No resistente	Parcial

Se compararon los porcentajes de reparación de ADN de las variedades clasificadas como no resistentes y con capacidad de reparación parcial, no obstante el efecto de las accesiones no fue significativo, ya que se obtuvo un valor de p de 0,73 superior al nivel de significancia de 0,05. Por lo tanto, no es posible realizar la comparación.

Determinación de la especificidad de los imprimadores

Con el fin de determinar cuáles imprimadores son aptos para cuantificar la expresión genética, se realizó un PCR en tiempo real y una curva de disociación con cada imprimador en las accesiones P1, P2, y en los genomas de referencia B73 y Mo17. Con respecto a los genes de referencia, en el caso de los imprimadores para el gen *UBQ10* las muestras que correspondían a los controles negativos (Non Template Control= NTC) mostraron amplificación. La amplificación de los NTC sugiere contaminación de los imprimadores, formación de dímeros de imprimadores o que estos estaban generando productos inespecíficos, por tanto no se incluyeron los gráficos de estos imprimadores.

Por otro lado, el par de imprimadores para el gen *EIF4A* mostró amplificación en todas las accesiones y no la mostró en el NTC (Figura 4), por tanto no hubo presencia de contaminación ni formación de dímeros del imprimador ni se generaron productos inespecíficos. Además, las temperaturas de fusión (T_m) en todas las accesiones fueron muy similares, con una diferencia de $0,4^\circ\text{C}$ entre la accesión con menor T_m (B73 con $84,8^\circ\text{C}$) y la que presentó mayor T_m (P2 con $85,2^\circ\text{C}$) (Cuadro 4).

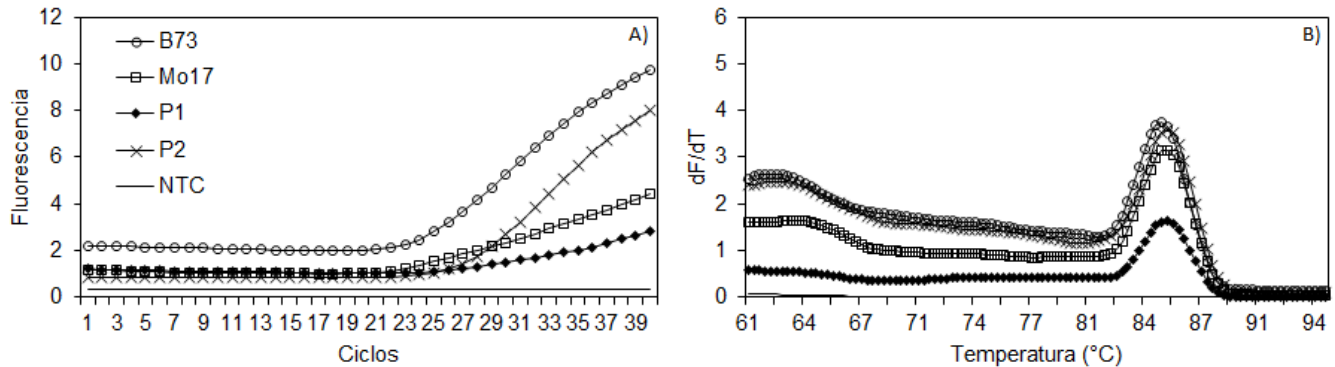


Figura 4. Curva de amplificación (A) y de disociación (B) en PCR en tiempo real con los imprimadores del gen *EIF4A* en las accesiones B73, Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y el control negativo sin ADN (NTC)

En el caso de los genes relacionados a la reparación de ADN, únicamente el imprimador del gen *LIG4*, presentó amplificación en el NTC, por tanto no se muestra su gráfico. Los imprimadores para el gen *ATM* (Figura 5), presentaron amplificación en todas las accesiones. Cada accesión presentó solamente un pico en la curva de disociación, por tanto solamente una T_m . Entre la accesión con menor T_m (B73 con $82,5^\circ\text{C}$) y la de mayor T_m (P1 con $85,3^\circ\text{C}$) existió una diferencia notable de $2,8^\circ\text{C}$ (Cuadro 4) lo que podría sugerir diferencias en los productos de PCR posiblemente debido a polimorfismos.

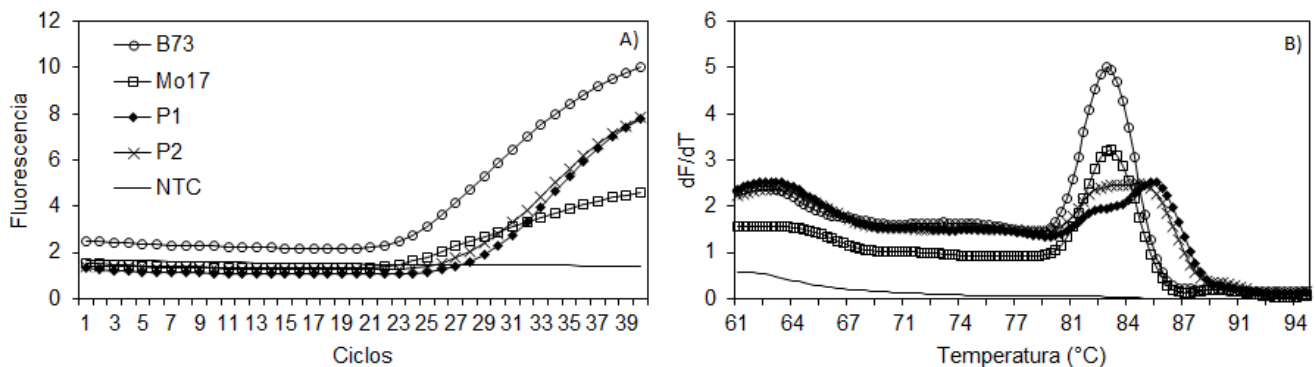


Figura 5. Curva de amplificación (A) y de disociación (B) en PCR en tiempo real con los imprimadores para el gen *ATM* en las accesiones B73, Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y control negativo sin ADN (NTC).

Los imprimadores para el gen *CDKB2;1*, presentaron amplificación en todas las accesiones. Los pares de imprimadores solamente presentaron un pico en la curva de disociación, por tanto solamente una T_m (Figura 6). Entre la accesión que presentó la menor T_m (P1 con 81,5°C) y la que presentó la mayor T_m (P2 con 82,7°C) existió una diferencia de 1,2°C (Cuadro 4).

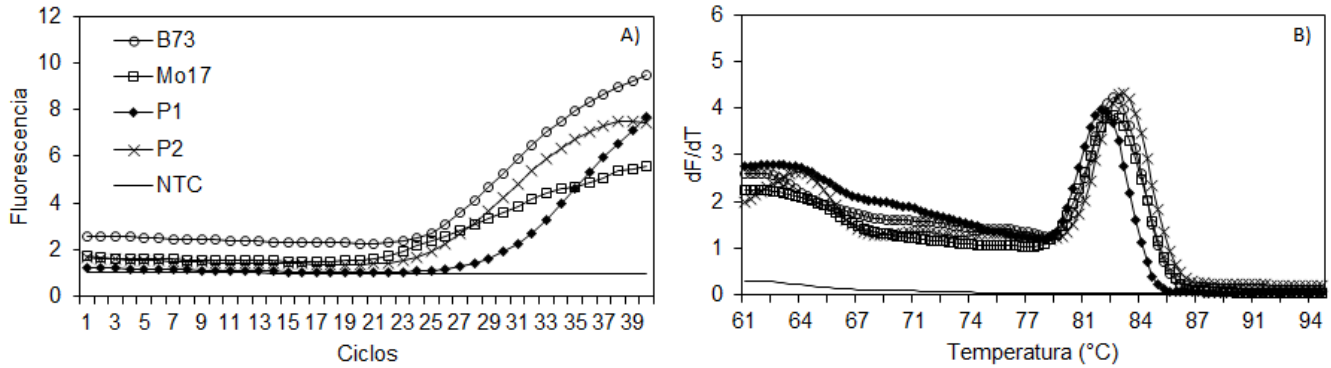


Figura 6. Curva de amplificación (A) y de disociación (B) en PCR en tiempo real para los imprimadores del gen *CDKB2;1* en las accesiones B73, Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y control negativo sin ADN (NTC).

Los imprimadores para el gen *BRCA1*, presentaron amplificación en todas las accesiones. El par de imprimadores solamente presentó un pico en la curva de disociación, por tanto solamente una T_m (Figura 7). Entre la accesión que presentó la menor T_m (P1 con 80,2°C) y la que presentó la mayor T_m (Mo17 con 81°C) existió una diferencia de 0,8°C (Cuadro 4)

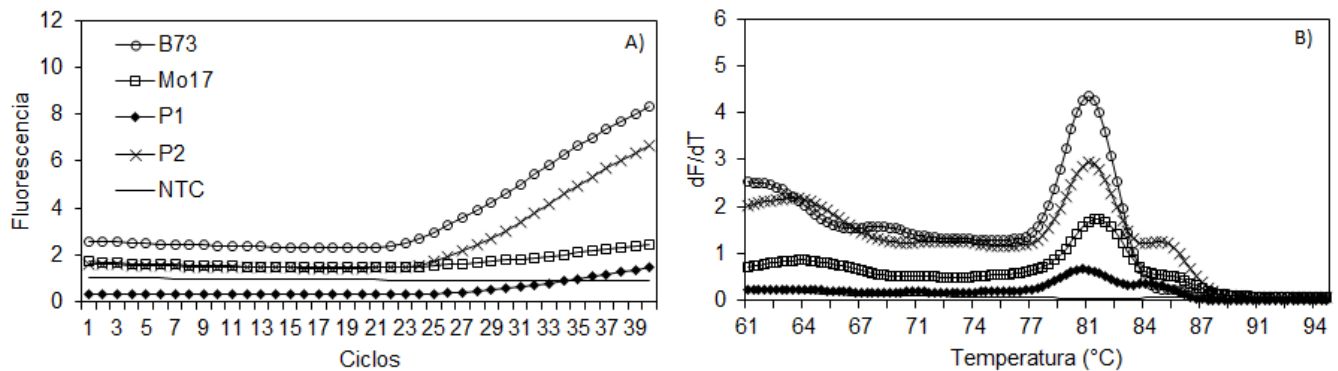


Figura 7. Curva de amplificación (A) y de disociación (B) en PCR en tiempo real para los imprimadores del gen *BRCA1* en las accesiones B73, Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y control negativo sin ADN (NTC). Nótese la diferencia en la altura de los picos

Con respecto a los dos pares de imprimadores para el gen *SOG1*, solamente el segundo presentó amplificación para todas las accesiones, mientras que el primer par de imprimadores no presentó amplificación para la accesión P1. Además, el segundo par de imprimadores presentó dos picos en la curva de disociación para la accesión P2, lo que sugiere que el par de imprimadores no fue específico para dicha accesión o que se formaron heteroduplex debido al PCR (Hatcher et al 1993) (Figura 8). En el primer par de imprimadores la diferencia entre las T_m entre la accesión con el menor valor (P2 con $82,5^{\circ}\text{C}$) y la accesión con el mayor valor (B73 con $83,3^{\circ}\text{C}$) fue de $0,8^{\circ}\text{C}$. En el segundo par de imprimadores fue de $0,6^{\circ}\text{C}$, donde P1 obtuvo la menor T_m ($81,7^{\circ}\text{C}$) y Mo17 y P2 obtuvieron las mayores T_m ($82,3^{\circ}\text{C}$) (Cuadro 4).

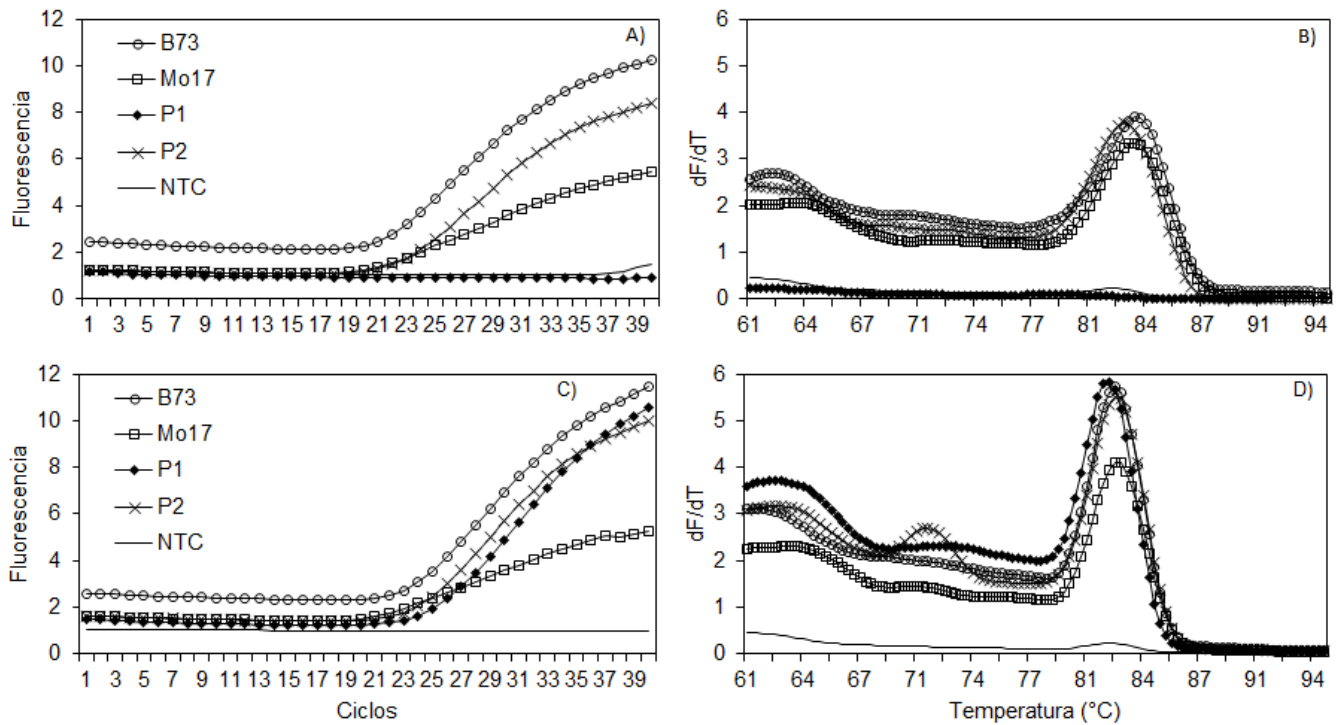


Figura 8. Curva de amplificación (A,C) y de disociación (B,D) en PCR en tiempo real para el primer par (A y B) y el segundo par de imprimadores (C y D) del gen *SOG1* en las accesiones B73, Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y control negativo sin ADN (NTC).

Solamente el segundo par de imprimadores para el gen *RAD51*, presentó amplificación para todas las accesiones, mientras que el primer par de imprimadores no presentó amplificación para la accesión P1. Además el primer par de imprimadores presentó dos picos en la curva de disociación con T_m muy distintas ($64,2^{\circ}\text{C}$ y 82°C) para la accesión B73, lo que podría sugerir que el par de imprimadores no fue específico para dicha accesión o que se formaron heteroduplex debido al PCR (Hatcher et al 1993) (Figura 9, Cuadro 4). No obstante, tanto para el segundo par de imprimadores para *SOG1* y el primer par de imprimadores para *RAD51* es necesario secuenciar los amplicones respectivos para determinar la causa de la presencia de dos T_m en una de las accesiones. En el primer par de imprimadores la diferencia entre las T_m entre la accesión con el menor valor (Mo17 con 82°C) y la accesión con el mayor valor (P2 con $82,2^{\circ}\text{C}$) fue de $0,2^{\circ}\text{C}$. Y en el segundo par de imprimadores fue de $1,9^{\circ}\text{C}$, donde P1 obtuvo la menor T_m ($79,8^{\circ}\text{C}$) y Mo17 obtuvo la mayor T_m ($81,7^{\circ}\text{C}$) (Cuadro 4).

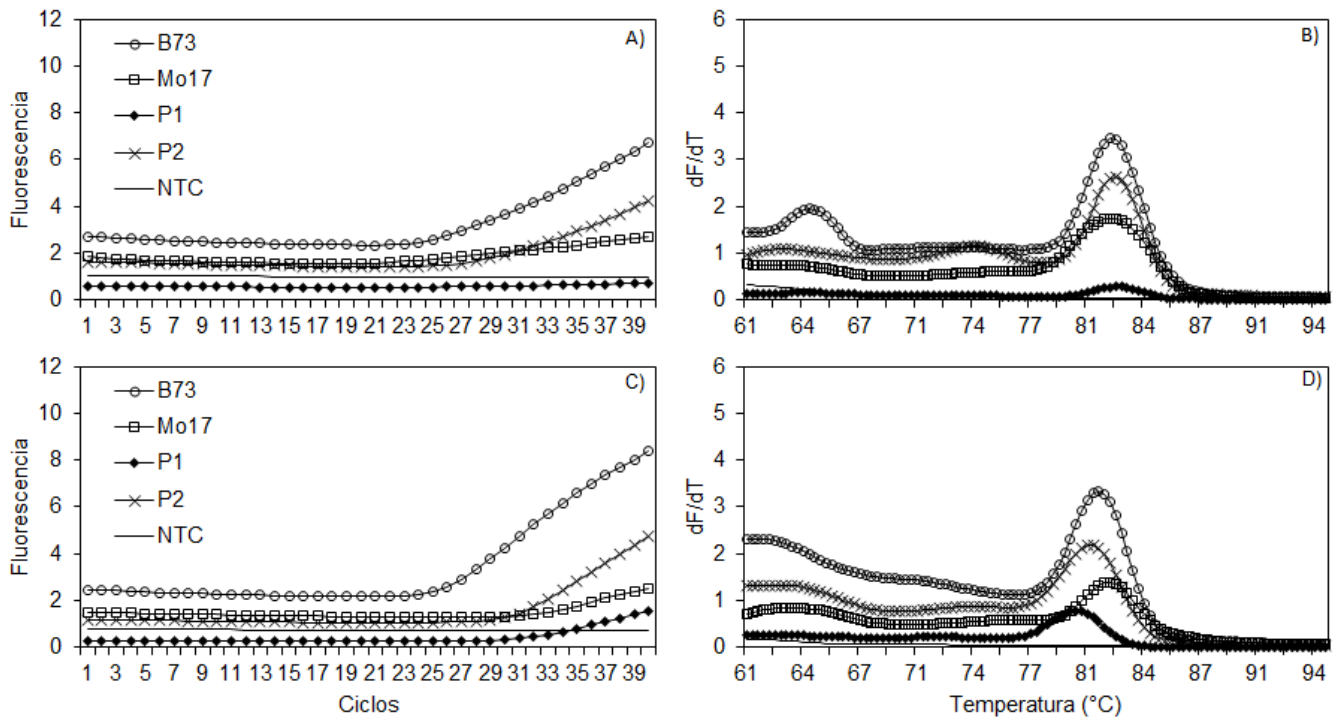


Figura 9. Curva de amplificación (A, C) y de disociación (B, D) en PCR en tiempo real para el primer par de imprimadores (A y B) y para el segundo (C y D) del gen *RAD51* en las accesiones B73, Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y control negativo sin ADN (NTC).

El par de imprimadores para el gen *ATR* no presentó amplificación en todas las accesiones. Solamente no se presentó amplificación para la accesión P1, (Figuras 10). En cuanto a las T_m en el par de imprimadores para el gen *ATR* entre las accesiones con menor T_m (B73 y P2 con $81,7^\circ\text{C}$) y la de mayor T_m (P1 con 82°C) existió una diferencia de $0,3^\circ\text{C}$ (Cuadro 4)

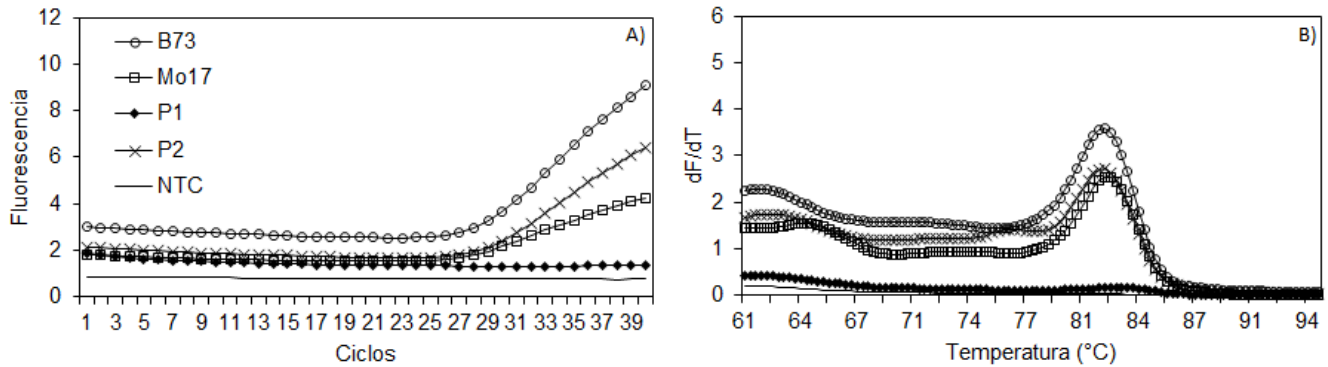


Figura 10. Curva de amplificación (A) y de disociación (B) en PCR en tiempo real para para el par de imprimadores del gen *ATR* en las accesiones B73, Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y control negativo sin ADN (NTC)

El par de imprimadores para el gen *KU80* no presentó amplificación para las accesiones B73, Mo17 y P2 (Figura 11). Solamente se presentó amplificación para la accesión P1 y con niveles de fluorescencia de aproximadamente 4 al llegar al ciclo 40. La T_m presentada para esta accesión fue de $79,5^\circ\text{C}$ (Cuadro 4) y con un pico con un valor menor a 2 dF/dT (tasa de cambio de la fluorescencia con respecto al tiempo).

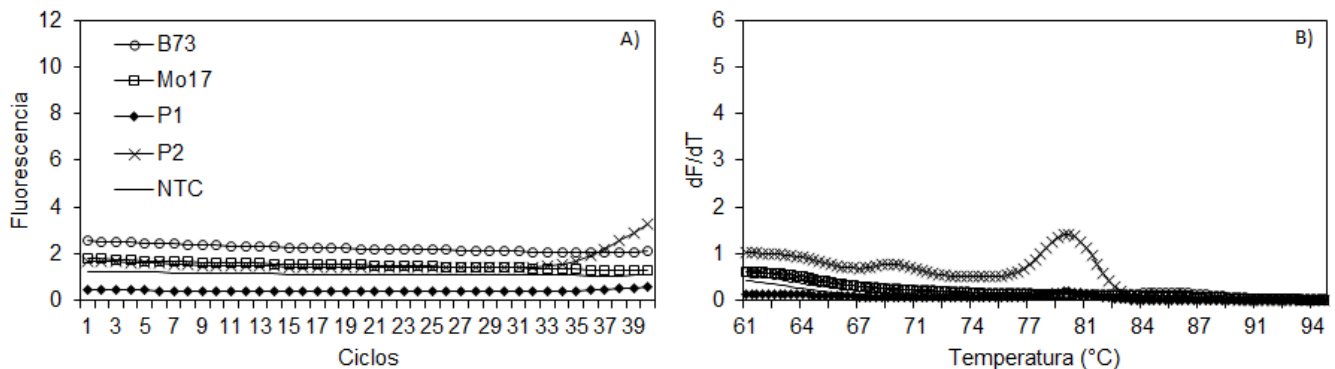


Figura 11. Curva de amplificación (A) y de disociación (B) en PCR en tiempo real para para los pares de imprimadores del gen *KU80* en las accesiones B73, Mo17, Pujagua1 (P1), Pujagua2 (P2) y control negativo sin ADN (NTC).

Cuadro 4. Temperatura de fusión (Tm) de cada par de imprimadores empleado en los experimentos.

Gen	# de imprimador	Tm (°C) del imprimador para cada accesión			
		B73	Mo17	P1	P2
<i>ATM</i>	1	82,5	82,7	85,3	84,3
<i>ATR</i>	1	81,7	82	NA	81,7
<i>SOG1</i>	1	83,3	83	NA	82,5
	2	82,2	82,3	81,7	74/82,3
<i>RAD51</i>	1	64,2/82	82	NA	82,2
	2	81,2	81,7	79,8	80,7
<i>BRCA1</i>	1	80,5	81	80,2	80,5
<i>KU80</i>	1	NA	NA	NA	79,5
<i>CDKB2;1</i>	1	82,3	82,2	81,5	82,7
<i>EIF4A</i>	1	84,8	85	85	85,2

Al realizar la alineación de la secuencia de imprimadores con la secuencia del gen respectivo, solamente el primer par de imprimadores para el gen *SOG1* no mostró alineación, por tanto no se muestra el esquema de dicho par de imprimadores. Solamente el imprimador delantero del primer par de imprimadores para *SOG1* y el imprimador delantero para del gen *EIF4A* mostraron una base nitrogenada que no se alineó. En el caso de *SOG1*, la base no alineada es la octava desde 5' y en el gen *EIF4A* es la segunda base desde 5' (Cuadro 2).

Con respecto a la ubicación del par de imprimadores dentro del gen, en *ATR*, *BRCA1*, *CDKB2;1*, *EIF4A* y *SOG1* tanto el imprimador delantero como el reverso se encontraron dentro del mismo exón. Pero en el caso de *SOG1*, el imprimador pudo haberse acoplado en tres exones, debido a que el gen posee en tres exones diferentes con una longitud y secuencia de bases nitrogenadas idénticas. Para los imprimadores de los genes *ATM*, *KU80* y el primer par de imprimadores para el gen *RAD51* el imprimador delantero y el reverso se encontraron en exones diferentes (Figura 12).

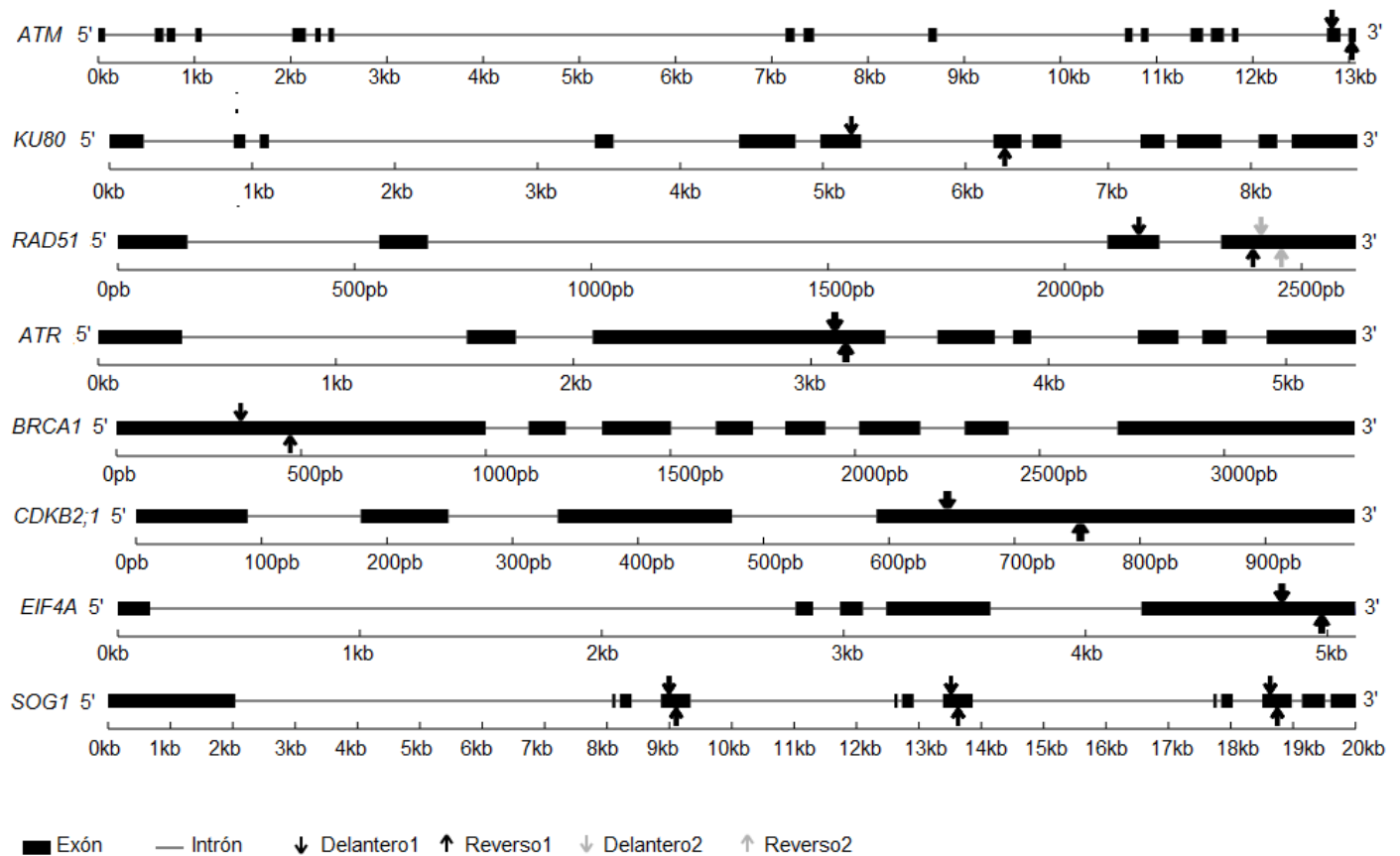


Figura 12. Representación esquemática de cada gen y la localización de los imprimadores respectivos utilizados en la accesión B73. Las cajas negras representan los exones, las líneas grises los intrones, las flechas negras orientadas hacia abajo el imprimador delantero (forward primer) del primer par de imprimadores, las flechas negras orientadas hacia arriba el imprimador reverso (reverse primer) del primer par de imprimadores, las flechas grises orientadas hacia abajo el imprimador delantero (forward primer) del segundo par de imprimadores y las flechas grises orientadas hacia arriba el imprimador reverso (reverse primer) del segundo par de imprimadores. Simbología: pb=pares de bases, kb= 1000 pares de bases.

Medición de la expresión de genes

Pocas muestras mostraron amplificación en los experimentos de qPCR para los genes *ATM* y *SOG1* en las accesiones B73, Mo17, P1 y P2 luego del tratamiento por 24 horas en zeocina. No se pudo realizar el análisis. Para poder realizar el cálculo de expresión relativa en una muestra son necesarios seis datos: 1) la eficiencia de reacción para el gen objetivo, 2) la eficiencia de reacción para el gen de referencia, 3) el valor de ciclo umbral (CP por sus siglas en inglés Crossing Point) para el gen objetivo, 4) el CP para la muestra calibradora del gen objetivo, 5) el CP para el gen de referencia y 6) el

CP para la muestra calibradora del gen de referencia. En todas las muestras falta al menos uno de los datos.

Discusión

Medición de la capacidad de reparación del ADN

La zeocina se ha utilizado previamente en experimentos para provocar rupturas de doble cadena (RDC) de ADN en plantas, por ejemplo en *A. thaliana* (Yoshiyama et al. 2014) y en el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (Chankova et al. 2007). No obstante, a la fecha no existen reportes de su uso en *Z. mays*. En el presente experimento se evidencia la capacidad de la zeocina para generar RDC en maíz con una dosis de 100 µg/ml por 24 horas, ya que en seis de las siete accesiones se obtuvo mayores porcentajes de ADN en la cola en las plantas tratadas con zeocina (tratamiento zeocina), que en las plantas sin tratar (control) (Figura 1).

No obstante, los valores reportados en este experimento son menores que aquellos reportados para *A. thaliana* con radiación ionizante u otros agentes radiomiméticos (Menke et al. 2001, Kozak et al. 2009). En el presente experimento se detectaron valores máximos de porcentaje de ADN en la cola de entre 2,95 a 4,95% (Figura 2) luego 24 horas de exposición a una dosis de zeocina de 100 µg/ml. Mientras que plántulas de *A. thaliana* expuestas a bleomicina a dosis de entre 0,25 y 1 µg/ml, por una hora, presentaron porcentajes de ADN en la cola de entre 15 y 30% (Menke et al. 2001). Plántulas de *A. thaliana*, expuestas por una hora a dosis de entre 10 y 50 µg/ml de bleomicina presentaron porcentajes de ADN en la cola del 30% al 70% (Kozak et al. 2009). La bleomicina es un glicopéptido de la misma familia que la zeocina y con el mismo mecanismo de acción (Hu et al. 2018).

Para lidiar con los daños en el ADN las plantas poseen principalmente dos estrategias, a) acumular sustancias protectoras y/o antioxidantes (Mazza et al. 2000, Stapleton y Walbot 1994), y b) los mecanismos de reparación ADN (Waterworth et al. 2011). En el presente experimento, debido a los valores tan bajos de daño en el ADN reportados se sugiere que, en comparación con *A. thaliana*, las accesiones utilizadas podrían contener mayor concentración intracelular de flavonoides y de ceras cuticulares en la epidermis. Al respecto se ha reportado que estas ayudan a prevenir gran cantidad de los daños al ADN en maíz (Stapleton et al. 1997). No obstante, es necesario realizar experimentos en maíz con tiempos de exposición más cortos, con el fin de descartar una reducción en la actividad genotóxica de la zeocina luego de 24 horas.

Notablemente, la accesión P1 no mostró daños en sus núcleos después de 24 horas de exposición a la zeocina (tratamiento zeocina) (Figura 1 y 3), lo que sugiere una estrategia de protección ante agentes causantes de RDC de ADN. Debido a que sus hipocótilos son morados (Figura 13, C), esta accesión podría tener una mayor concentración de flavonoides de la familia de las antocianinas (Siyuan et al. 2018). No obstante, otras accesiones con coloraciones moradas no presentaron resistencia, por lo tanto otra hipótesis sería que dicha accesión podría poseer altas concentraciones del

flavonoide maysina, el cual se ha detectado en hojas de plántulas de maíz provenientes de accesiones con alta tolerancia a la radiación (Casati y Walbot 2005).

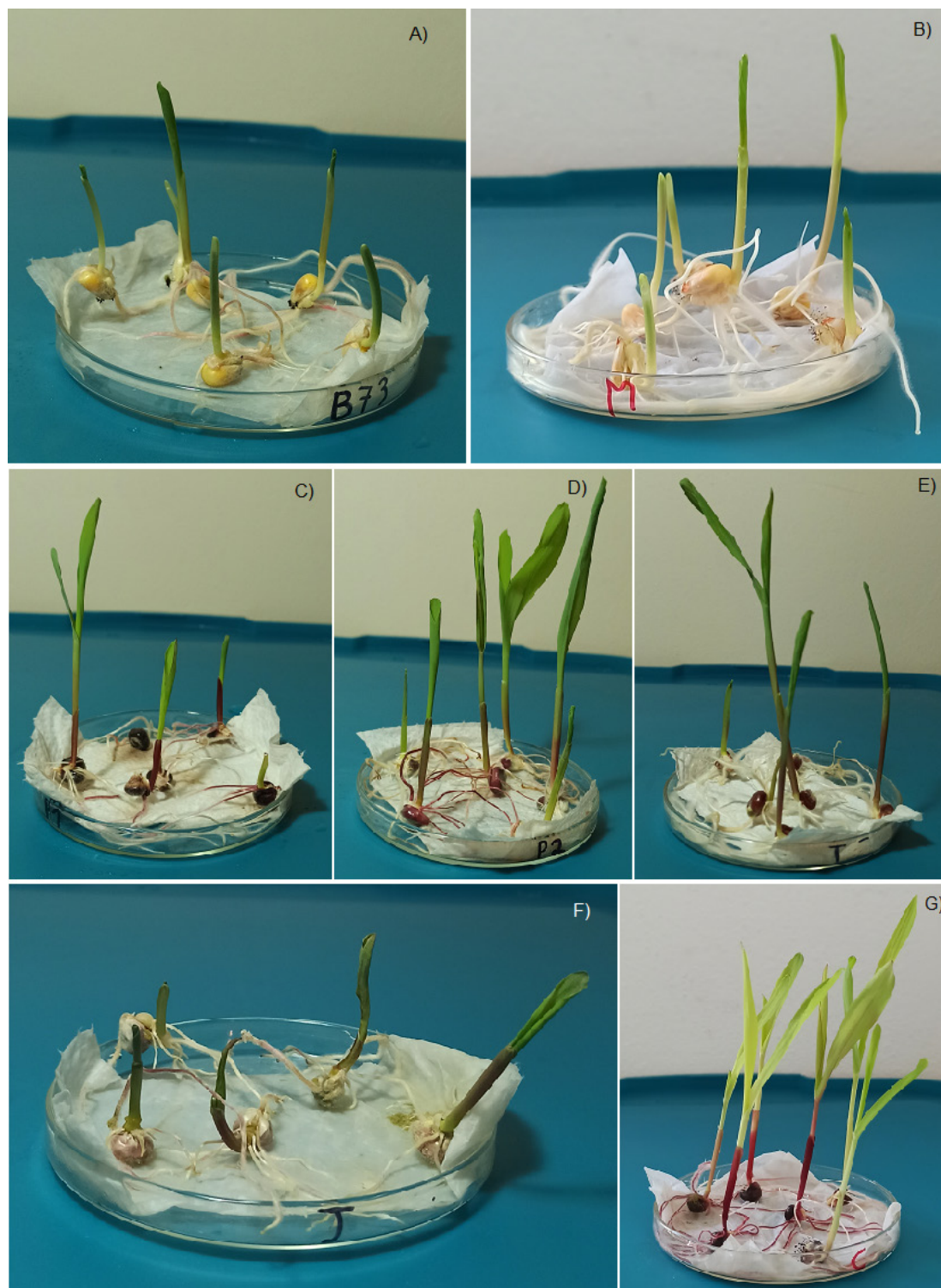


Figura 13. Plántulas a los siete días después de la siembra provenientes de las accesiones B73 (A), Mo17 (B), P1 (C), P2 (D), T (E), J (F) y C (G).

Las variedades comerciales de maíz y en específico las líneas B73 y Mo17 poseen una síntesis reducida de flavonoides (Casati y Walbot 2005, Blum et al. 2004), lo que las hace menos resistentes a los daños producidos por la radiación. No obstante en el presente trabajo, las líneas Mo17 y B73 utilizadas por muchos años en Estados Unidos para generar híbridos comerciales (Sun et al. 2018), presentaron el mismo nivel de resistencia que cuatro de las cinco accesiones de maíz morado analizadas. No obstante, sí se observaron diferencias significativas en la capacidad de reparación de ADN posterior a la exposición al agente genotóxico.

Para identificar si alguna variedad presenta reparación de ADN, debe existir una reducción en el porcentaje de ADN en la cola luego de un período de reposo posterior a la exposición al agente genotóxico (Menke et al. 2001). De las accesiones analizadas, solamente Mo17 no logró reparar su ADN, mientras que P2 reparó la totalidad de daño recibido, el resto de las accesiones repararon parcialmente el daño (Figura 2). Esto sugiere que Mo17 sí podría ser más susceptible que el resto de accesiones, pues su eficiencia de reparación de ADN es menor, lo que podría causar acumulación de daños en el ADN y en consecuencia, mutaciones deletéreas. Este es un asunto de importancia comercial.

Las diferencias en la eficiencia de reparación de las RDC, podrían deberse a diferencias en la expresión y actividad de genes y proteínas relacionadas con las etapas tardías en reparación de RDC. Tal es el caso de los genes involucrados en la reparación no homóloga de las RDC como lo son *Ku80*, *XPF* y *XRCC1*, en *A. thaliana*. Charbonel (2011) reportó una reducción en la capacidad de reparación de las RDC en mutantes de *A. thaliana* carentes de dichos genes, inclusive después de 20, 40 y 90 minutos de recibir el tratamiento inicial con radiación ionizante. Por otro lado, diferencias en la actividad de las proteínas podría explicar las diferencias en la capacidad de reparación de ADN, ya que se ha observado que en plantas de *A. thaliana* defectuosas en la transcripción de los genes *MIM*, y *RAD21,1* del complejo SMC (Structural Maintenance of Chromosomes: mantenimiento estructural de los cromosomas), se presentan deficiencias para reparar las RDC, 20, 40 y 60 minutos luego de recibir tratamiento con bleomicina (Kozak et al. 2009).

Además, Blum et al (2004) en un experimento de expresión génica con tecnología de microarreglos (microarrays) encontraron que la radiación ultravioleta causa que en B73 y Mo17 haya diferencias en expresión de hasta 5376 genes y que Mo17 tuviera más genes regulados negativamente que B73. A pesar de que no se mencionaron genes relacionados con la reparación de ADN, los resultados de este experimento sugieren que la tendencia podría ser la misma. Dichas diferencias podrían ser producto de la influencia ambiental y quizá al proceso de domesticación y mejoramiento en sí.

En ese sentido, se esperaría que accesiones provenientes de zonas con menor radiación UV, presenten menor adaptación a dicho estrés, por no haber presión de selección. A pesar de que la cantidad de radiación varía mucho entre zonas, se ha observado que la irradiación en zonas tropicales es más intensa que en las zonas

templadas del hemisferio norte (Williamson et al. 2014) y, dentro de latitudes similares, a mayor altitud y menor nubosidad, mayor es la dosis de radiación UV-B (Madronich et al. 1998). Lo anterior podría explicar por qué solamente la línea Mo17 presentó deficiencias para reparar su ADN, ya que esta proviene de una latitud (38,5 norte) donde, a pesar de que existe una alta radiación directa (1704 kWh/m²), la proporción de radiación UV-B (290 – 320 nm) es menor que en los trópicos y la altitud es poca (261 msnm). Por otro lado, el proceso de mejora genética de dicha línea se ha enfocado en el aumento de productividad (Troyer 2004), por tanto rasgos asociados a resistencia a estrés pudieron dejarse de lado.

La línea B73, a pesar de haberse desarrollado en condiciones muy parecidas (latitud :42 norte, altitud: 302 msnm, radiación directa: 1658 kWh/m²) y que su proceso de mejora fue enfocado en el aumento de rendimiento, esta es genéticamente distante a Mo17. La B73 pertenece al grupo heterótico “Reid Yellow Dent” y el Mo17 a “Lancaster” (Stojaković et al. 2010). Además, al compararse el genoma de dichas líneas, se ha encontrado que más del 20% de los genes predichos poseen mutaciones o diferencias estructurales, lo que podría generar cambios en la síntesis de proteínas (Sun et al. 2018), y por lo tanto variar en la respuesta a diferentes tipos de estrés, como el daño al ADN.

Por otra parte, en las accesiones tropicales, se esperaría que aquellas que provienen de zonas con mayor radiación UV-B, por ejemplo de zonas más elevadas sean las que presenten mayor adaptación. No obstante, lo anterior no se cumple para la accesión J. A pesar de que no se poseen datos de radiación UV para la zona Quiché de Guatemala, se sabe que está expuesta a una alta radiación directa (1982 kWh/m²) y que la altitud es considerable (2107 msnm), por lo que se esperaría que San Pedro Jocopilas fuera la zona que recibiera mayor radiación UV-B incidente. No obstante, esta accesión fue obtenida de un banco de germoplasma y fue introducida en este en 1978, por lo tanto desde aproximadamente 40 años no ha sido sujeta a presión natural ni a selección artificial, lo cual pudo reducir la acumulación de genes favorables para resistencia a la radiación.

En Costa Rica de acuerdo con los mapas de radiación UV elaborados por Wright (2009), Santa Cruz posee niveles de radiación ligeramente menores a Orotina, Talamanca y La Cruz (43 – 43,5 W/m² vs 44 - 45 W/m²), no obstante la accesión P1, proveniente de Santa Cruz y la P2 proveniente de La Cruz son las que presentan los rasgos más favorables de tolerancia/resistencia al daño en el ADN. Lo anterior podría ser debido a que estas accesiones fueron obtenidas de agricultores de la zona que han reproducido y comercializado el grano por varios años, por tanto podrían haber atravesado un proceso de selección masal que favorecía la tolerancia al estrés producido por la radiación (Casati y Walbot 2005).

En el caso de la accesión T, al igual que la J, proviene de un banco de germoplasma y fue ingresada a este en 1978. Por lo tanto, tampoco ha pasado por un proceso de presión ambiental ni selección artificial que propiciara la acumulación de rasgos favorables. En el caso de la accesión C, la empresa vende dicha semilla desde

2017, pero se desconoce cómo ha sido su proceso de mejora genética y de producción de semilla. No obstante se especula que ha sido en una zona de Orotina con moderada radiación UV, y que esto haya incidido en que no sea resistente a los daños producidos por la zeocina, pero sí que presenta reparación parcial del daño en el ADN.

Determinación de la especificidad de los imprimadores

Mediante el análisis de la curva de disociación se determinó que cinco de los 13 imprimadores no son aptos para utilizar en el PCR cuantitativo. Los imprimadores de los genes *LIG4* y *UBQ10* se descartaron debido a la amplificación de los controles negativos (NTC), lo que sugiere contaminación de estos, formación de dímeros entre los imprimadores o productos inespecíficos. Por otro lado, se descartó el par de imprimadores para el gen *KU80*, porque solamente amplificó en la accesión P2. Además, se descartó el primer par de imprimadores para el gen *RAD51* debido a que no amplificó en la accesión P1 y que presentó dos picos de amplificación en B73. A pesar que su especificidad se corroboró *in silico*, es posible que debido al alto grado de polimorfismos en maíz (Walbot 2009), las muestras podrían presentar alguna mutación estructural/cromosomal o en la secuencia de nucleótidos, que evitó que los imprimadores se alinearan.

Es relevante que, solamente se encontraron diferencias mayores a dos grados Celsius en la T_m entre las accesiones para el gen *ATM*. Variaciones entre las T_m entre accesiones dentro de un gen se observan en todas las muestras, no obstante dichas variaciones podrían ser ocasionadas por variación natural del equipo y el pipeteo y porque no fueron realizadas en una misma corrida (Derveaux et al. 2010). No obstante, variaciones cercanas a los dos grados Celsius o mayores podrían deberse a polimorfismos de un solo nucleótido, inserciones o pérdidas en el amplicón (Dieffenbach et al. 1993). Lo cual sugiere que podría ser factible seleccionar polimorfismos para el gen *ATM*, y que podría existir suficiente variabilidad genética para realizar mejoramiento genético para tolerancia a radiación UV-B en Costa Rica.

Medición de la expresión de genes

Las condiciones para realizar qPCR no fueron las óptimas, y esto se evidenció en que no amplificaron suficientes muestras para cuantificar la expresión relativa de los genes *ATM* y *SOG1*. Inicialmente se consideró que sí era factible trabajar con ADNc ya que la amplificación fue posible con ADN genómico. No obstante, es probable que sea necesario optimizar la reacción variando las concentraciones de ADNc de los imprimadores y la temperatura de anillamiento para obtener resultados de mejor calidad. Además, el hecho de contar con una base nitrogenada no alineada en los imprimadores de *SOG1* y *EIF4A*, pudo afectar la eficiencia de las reacciones (Dieffenbach et al. 1993).

Conclusiones

La zeocina sí puede inducir daños en el ADN de plántulas de maíz cuando estas se sumergen por 24 horas en una solución de 100 µg/mL.

La accesión P1 fue la única que presentó resistencia a daños en el ADN producidos por la zeocina. Mientras que las accesiones B73, Mo17, P2, T, J y C no presentaron resistencia al tratamiento por zeocina.

De las accesiones no resistentes a la zeocina, la P2 presentó capacidad de reparación total de los daños ocasionados por el tratamiento. Las accesiones B73, T, J y C tuvieron una capacidad parcial de reparar el daño de ADN causado por el tratamiento. Y la accesión Mo17 presentó una capacidad nula para reparar los daños en el ADN.

De los 13 pares de imprimadores analizados 5 no resultaron aptos para amplificar el gen respectivo. Dichos imprimadores fueron: los del gen *UBQ10*, los del gen *LIG4*, el primer par para *RAD51* y los del gen *KU80*.

Las condiciones utilizadas en el PCR cuantitativo para determinar la expresión relativa de los genes no fueron las óptimas, debido a que muchas muestras no amplificaron.

Referencias

- Acosta, R. 2009. El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba (en línea). *Cultivos Tropicales* 30(2):113-120. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13199-013-0250-2>.
- Ambasht, K; Agrawal, M; Ambasht, NK. 1995. Physiological responses of field grown *Zea mays* L. plants to enhanced UV-B radiation. *Biotronics* 24:15-23.
- Angelis, KJ; Dusinská, M; Collins, AR. 1999. Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis* 20:2133-2138.
- Bacelar, E; Moutinho-Pereira, J; Ferreira, H; Correia, C. 2015. Enhanced ultraviolet-B radiation affect growth, yield and physiological processes on triticale plants (en línea). *Procedia Environmental Sciences* 29:219-220. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.07.281>.
- Ballaré, CL; Caldwell, M; Flint, S; Robinson, S; Bornman, JF. 2011. Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems: patterns, mechanisms, and interactions with climate change. *Photochemical Photobiology Science* 10:226-241. DOI: <https://doi.org/10.1039/C0PP90040K>.
- Biever, JJ; Gardner, G. 2016. The relationship between multiple UV-B perception mechanisms and DNA repair pathways in plants (en línea). *Environmental and Experimental Botany* 124:89-99. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.12.010>.
- Blum, JE; Casati, P; Walbot, V; Stapleton, AE. 2004. Split-plot microarray design allows sensitive detection of expression differences after ultraviolet radiation in the inbred parental lines of a key maize mapping population. *Plant, Cell and Environment* 27(11):1374-1386. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01230.x>.
- Casati, P; Walbot, V. 2005. Differential accumulation of maysin and rhamnosylisoorientin in leaves of high-altitude landraces of maize after UV-B exposure. *Plant, Cell and Environment* 28(6):788-799. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01329.x>.
- Chabner, BA; Longo, DL. 2010. *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice* (en línea). 5°. Philadelphia, US, Wolters Kluwer Health. 848 p. Disponible en <http://ebookcentral.proquest.com/lib/sibdilibro-ebooks/detail.action?docID=2031972>.
- Chacón-Sánchez, M. 2010. Darwin y la domesticación de plantas en las américas: el caso del maíz y el frijol. *Acta Biológica Colombiana* 14(4s):351-364.
- Chankova, SG; Dimova, E; Dimitrova, M; Bryant, PE. 2007. Induction of DNA double-strand breaks by zeocin in *Chlamydomonas reinhardtii* and the role of increased DNA double-strand breaks rejoining in the formation of an adaptive response. *Radiation and Environmental Biophysics* 46(4):409-416. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00411-007-0123-2>.

- Charbonnel, C; Allain, E; Gallego, ME; White, CI. 2011. Kinetic analysis of DNA double-strand break repair pathways in Arabidopsis (en línea). *DNA Repair* 10(6):611-619. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.04.002>.
- Collins, AR. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology* 26:249-261.
- Correia, CM; Coutinho, JF; Björn, LO; Torres-Pereira, JMG. 2000. Ultraviolet-B radiation and nitrogen effects on growth and yield of maize under Mediterranean field conditions. *European Journal of Agronomy* 12(2):117-125. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(99\)00050-7](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(99)00050-7).
- Dalhus, B; Laerdahl, JK; Backe, PH; Bjørås, M. 2009. DNA base repair - recognition and initiation of catalysis. *FEMS Microbiology Reviews* 33(6):1044-1078. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00188.x>.
- Derveaux, S; Vandesompele, J; Hellemans, J. 2010. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR (en línea). *Methods* 50(4):227-230. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.11.001>.
- Dieffenbach, CW; Lowe, TMJ; Dveksler, GS. 1993. General concepts for PCR primer design (en línea). *Genome Research* 3:30-37. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.3.3.S30>.
- FAO. 2018. FAO Statistics on Worldwide Corn Production (en línea, sitio web). Disponible en <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Fatima, U; Khan, MF; Fatima, J; Shahab, U; Ahmad, S; Yusuf, MA. 2017. DNA damage, response, and repair in plants under genotoxic stress (en línea). In Sarwat, M; Ahmad, A; Abdin, MZ; Ibrahim, MM (eds.). Cham, Springer International Publishing. p. 151-171 DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-42183-4_7.
- Fernández, CB; Uguina, JRM; de la Puebla, A. 2007. Valoración médica y jurídica de la incapacidad laboral (en línea). Madrid, La Ley, (Manuales profesionales La Ley). 1260 p. Disponible en <https://books.google.co.cr/books?id=7R6rEKPfsrkC>.
- Fulcher, N; Sablowski, R. 2009. Hypersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(49):20984-20988. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0909218106>.
- Furukawa, T; Curtis, MJ; Tominey, CM; Duong, YH; Wilcox, BWL; Aggoune, D; Hays, JB; Britt, AB. 2010. A shared DNA-damage-response pathway for induction of stem-cell death by UVB and by gamma irradiation (en línea). *DNA Repair* 9:940-948. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.06.006>.
- Gao, W; Zheng, Y; Slusser, JR; Heisler, GM; Grant, RH; Xu, J; He, D. 2004. Effects of supplementary ultraviolet-B irradiance on maize yield and qualities: a field experiment. *Photochemistry and Photobiology* 80(1):127. DOI: <https://doi.org/10.1562/2004-05-03-ra-156.1>.

Garcia, V; Salanoubat, M; Choisine, N; Tissier, A. 2000. An *ATM* homologue from *Arabidopsis thaliana*: complete genomic organisation and expression analysis. *Nucleic Acids Research* 28(8):1692-1699.

Gerland, P; Raftery, AE; Ševčíková, H; Li, N; Gu, D; Spoorenberg, T; Alkema, L; Fosdick, BK; Chunn, J; Lalic, N; Bay, G; Buettner, T; Heilig, GK; Wilmoth, J. 2014. World population stabilization unlikely this century. *Science* 346(6206).

Gichner, T; Ptáček, O; Stavreva, DA; Plewa, MJ. 1999. Comparison of DNA damage in plants as measured by single cell gel electrophoresis and somatic leaf mutations induced by monofunctional alkylating agents. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 33(4):279-286. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1999\)33:4<279::AID-EM4>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1999)33:4<279::AID-EM4>3.0.CO;2-K).

Gill, SS; Anjum, NA; Gill, R; Jha, M; Tuteja, N. 2015. DNA damage and repair in plants under ultraviolet and ionizing radiations. *Scientific World Journal* 2015:5-16. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/250158>.

Global Solar Atlas. 2020. (en línea, sitio web). Consultado 22 jun. 2020. Disponible en <https://globalsolaratlas.info/map?c=11.523088,8.4375,3>.

Hallauer, AR; Russell, WA; Lamkey, KR. 1988. Corn Breeding. In Haullauer, A; Russell, WA; Lamkey, K (eds.). Wisconsin, American Society of Agronomy. p. 463-564 DOI: <https://doi.org/10.2134/agronmonogr18.3ed.c8>.

Hatcher, S; Lambert QT, Teplitz, RL; Carlson, JR. 1993. Heteroduplex formation: a potential source of genotyping error from PCR products. *Prenatal diagnosis* 13: 171-177.

Herman, JR; Krotkov, N; Celarier, E; Larko, D; Labow, G. 1999. Distribution of UV radiation at the Earth's surface from TOMS-measured UV-backscattered radiances. *Journal of Geophysical Research* 104(D10):12059-12076.

Hollósy, F. 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33(2):179-197. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(01\)00011-7](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(01)00011-7).

Hu, B; Jin, J; Guo, AY; Zhang, H; Luo, J; Gao, G. 2015. GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics* 31(8):1296-1297. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu817>.

Hu, Q; Xie, Y; Ge, Y; Nie, X; Tao, J; Zhao, Y. 2018. Resting T cells are hypersensitive to DNA damage due to defective DNA repair pathway (en línea). *Cell Death and Disease* 9(662):1-11. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0649-z>.

Hufford, MB; Xu, X; Van Heerwaarden, J; Pyhäjärvi, T; Chia, JM; Cartwright, RA; Elshire, RJ; Glaubitz, JC; Guill, KE; Kaeppler, SM; Lai, J; Morrell, PL; Shannon, LM; Song, C; Springer, NM; Swanson-Wagner, RA; Tiffin, P; Wang, J; Zhang, G; Doebley, J; McMullen, MD; Ware, D; Buckler, ES; Yang, S; Ross-Ibarra, J. 2012. Comparative population

genomics of maize domestication and improvement (en línea). *Nature Genetics* 44(7):808-811. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.2309>.

Jansen, MAK; Gaba, V; Greenberg, BM. 1998. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science* 3(4):131-135. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01215-1](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01215-1).

Jian, Y; Xu, C; Guo, Z; Wang, S; Xu, Y; Zou, C. 2017. Maize (*Zea mays* L.) genome size indicated by 180-bp knob abundance is associated with flowering time (en línea). *Scientific Reports* 7(1):1-9. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06153-8>.

Jovtchev, G; Menke, M; Schubert, I. 2001. The comet assay detects adaptation to MNU-induced DNA damage in barley. *Mutation Research* 493(1-2):95-100. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00166-8).

Killion, DD; Constantin, MJ; Ridge, O. 1972. Gamma irradiation of corn plant: effects of exposure, exposure rate and developmental stage on survival, height and grain yield of two cultivars. *Radiation Botany* 12:159-164.

Kim, J-H; Ryu, TH; Lee, SS; Lee, S; Chung, BY. 2019. Ionizing radiation manifesting DNA damage response in plants: an overview of DNA damage signaling and repair mechanisms in plants (en línea). *Plant Science* 278:44-53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.10.013>.

Knoll, A; Fauser, F; Puchta, H. 2014. DNA recombination in somatic plant cells: mechanisms and evolutionary consequences. *Chromosome Research* 22:191-201. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10577-014-9415-y>.

Koppen, G; Angelis, KJ. 1998. Repair of X-ray induced DNA damage measured by the comet assay in roots of *Vicia faba*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 32(3):281-285. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(1998\)32:3<281::aid-em11>3.3.co;2-i](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(1998)32:3<281::aid-em11>3.3.co;2-i).

Koti, S; Reddy, KR; Reddy, VR; Kakani, VG; Zhao, D. 2005. Interactive effects of carbon dioxide, temperature, and ultraviolet-B radiation on soybean (*Glycine max* L.) flower and pollen morphology, pollen production, germination, and tube lengths. *Journal of Experimental Botany* 56(412):725-736. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/eri044>.

Kozak, J; West, CE; White, C; da Costa-Nunes, JA; Angelis, KJ. 2009. Rapid repair of DNA double strand breaks in *Arabidopsis thaliana* is dependent on proteins involved in chromosome structure maintenance. *DNA Repair* 8(3):413-419. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.11.012>.

Lacks, SA. 2001. Repair Mechanisms (en línea). s.l., Elsevier. p. 1661-1669 DOI: <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.1096>.

Lafarge, S; Montane, M. 2003. Characterization of *Arabidopsis thaliana* ortholog of the human breast cancer susceptibility gene 1 : *AtBRCA1* , strongly induced by gamma rays. *Nucleic Acids Research* 31(4):1148-1155. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkg202>.

- Leadon, SA. 1996. Repair of DNA damage produced by ionizing radiation: a minireview. *Seminars in Radiation Oncology* 6(4):295-305. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1053-4296\(96\)80025-7](https://doi.org/10.1016/S1053-4296(96)80025-7).
- Lin, Y; Zhang, C; Lan, H; Gao, S; Liu, H; Liu, J; Cao, M; Pan, G; Rong, T; Zhang, S. 2014. Validation of potential reference genes for qPCR in maize across abiotic stresses, hormone treatments, and tissue types. *PLoS ONE* 9(5):1-11. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095445>.
- Madronich, S; McKenzie, RL; Björn, LO; Caldwell, M. 1998. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochemical and Photobiological Sciences* 46(1):5-15. DOI: <https://doi.org/10.1039/b211155c>.
- Mai, LL; Owl, MY; Kersting, MP. 2005. UV radiation (en línea). In Mai, LL; Owl, MY; Kersting, MP (eds.). Cambridge, s.e. Disponible en http://ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/login?qurl=https%3A%2F%2Fsearch.credoreference.com%2Fcontent%2Fentry%2Fcuphbe%2Fuv_radiation%2F0%3FinstitutionId%3D7919.
- Mannus, A; Trapp, O; Puchta, H. 2012. Gene regulation in response to DNA damage. *Biochimica et Biophysica Acta* (1819):154-165. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.08.003>.
- Manova, V; Gruszka, D. 2015. DNA damage and repair in plants – from models to crops. *Frontiers in Plant Science* 6:1-26. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00885>.
- Mazza, CA; Boccalandro, E; Giordano, C V; Battista, D; Scopel, AL; Ballare, CL. 2000. Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiology* 122:117-125.
- Mccarthy, PJ; Sweetman, SF; Mckenna, PG; McKelvey-Martin, V. 1997. Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. *Mutagenesis* 12(4):209-214.
- McKenzie, R; Aucamp, P; Bais, A; Björn, L; Ilyas, M; Madronich, S. 2011. Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochemical Photobiology Science* 10:182-198. DOI: <https://doi.org/10.1039/C0PP90034f>.
- McNeill, JH; Orvig, C; Thompson, KH; Kelland, LR; Birch, N; Rhodes, P; Weiss, RH; Spinelli, S; Butler, AR; Shaw, CF. 1999. Uses of inorganic chemistry in medicine (en línea). Cambridge, UK, Royal Society of Chemistry. 182 p. Disponible en <http://ebookcentral.proquest.com/lib/sibdilibro-ebooks/detail.action?docID=1186206>.
- Menke, M; Chen, IP; Angelis, KJ; Schubert, I. 2001. DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 493(1-2):87-93. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00165-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00165-6).

- Mora, C; Spirandelli, D; Franklin, EC; Lynham, J; Kantar, MB; Miles, W; Smith, CZ; Freel, K; Moy, J; Louis, L V.; Barba, EW; Bettinger, K; Frazier, AG; Colburn IX, JF; Hanasaki, N; Hawkins, E; Hirabayashi, Y; Knorr, W; Little, CM; Emanuel, K; Sheffield, J; Patz, JA; Hunter, CL. 2018. Broad threat to humanity from cumulative climate hazards intensified by greenhouse gas emissions (en línea). *Nature Climate Change* 8(December):1062-1071. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0315-6>.
- Nandhakumar, S; Parasuraman, S; Shanmugam, MM; Ramachandra Rao, K; Chand, P; Vishnu Bhat, B. 2011. Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay). *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* 2(2):107-111. DOI: <https://doi.org/10.4103/0976-500X.81903>.
- OECD-FAO. 2019. OECD-FAO agricultural outlook 2009-2018 (en línea). Paris, OECD Publishing. 1-327 p. DOI: https://doi.org/dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2012-en.
- Olawuyi, O; Bello, O; Abioye, A. 2016. Mutagenic effects of ultraviolet radiation on growth and agronomic characters in maize cultivars. *Molecular Plant Breeding* 7(1):1-10. DOI: <https://doi.org/10.5376/mpb.2016.07.0001>.
- Olive, PL; Banáth, JP. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* 1(1):23-29. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>.
- Paliwal, R; Lafitte, H; Violic, A; Marathée, J. 2001. El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción (en línea). Roma, Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, (FAO: Producción y protección vegetal). Disponible en <https://books.google.co.cr/books?id=os79dx6BcmsC>.
- Park, SY; Vaghchhipawala, Z; Vasudevan, B; Lee, LY; Shen, Y; Singer, K; Waterworth, WM; Zhang, ZJ; West, CE; Mysore, KS; Gelvin, SB. 2015. Agrobacterium T-DNA integration into the plant genome can occur without the activity of key non-homologous end-joining proteins. *Plant Journal* 81(6):934-946. DOI: <https://doi.org/10.1111/tpj.12779>.
- Pereira, AR; Angelocci, LR; Sentelhas, PC. 2007. *Meteorologia Agricola*. Piracicaba, s.e. 192 p.
- Pfaffl, MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9):16-21.
- Preuss, SB; Britt, AB. 2003. A DNA-damage-induced cell cycle checkpoint in Arabidopsis. *Genetics* 164(May):323-334.
- Ranum, P; Peña-Rosas, JP; Garcia-Casal, MN. 2014. Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1312(1):105-112. DOI: <https://doi.org/10.1111/nyas.12396>.
- Ray, DK; Mueller, ND; West, PC; Foley, JA. 2013. Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS ONE* 8(6):1-8. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066428>.

Reddy, KR; Singh, SK; Koti, S; Kakani, VG; Zhao, D; Gao, W; Reddy, VR. 2013. Quantifying the effects of corn growth and physiological responses to ultraviolet-B radiation for modeling. *Agronomy Journal* 105(5):1367-1377. DOI: <https://doi.org/10.2134/agronj2013.0113>.

Reynoso, MS; Alvarez, CM; De la Cruz, LL; Villalobos, ARA; Landeros, JFG; Sánchez, JJG. 2018. Genetic damage in mexican and south american sweet corn varieties due to the herbicides nicosulfuron and topramezone. *Genetics and Molecular Research* 17(4). DOI: <https://doi.org/10.4238/gmr18159>.

Richter, KS; Jeske, H. 2015. KU80, a key factor for non-homologous end-joining, retards geminivirus multiplication. *Journal of General Virology* 96(9):2913-2918. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000224>.

Di Rienzo, JA; Guzmán, AW; Casanoves, F. 2002. A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* 7(2):129-142. DOI: <https://doi.org/10.1198/10857110260141193>.

Rodgers-Melnick, E; Vera, DL; Bass, HW; Buckler, ES. 2016. Open chromatin reveals the functional maize genome. *PNAS* 113(22):3177-3184. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1525244113>.

Rosenthal, JP; Dirzo, R. 1997. Effects of life history, domestication and agronomic selection on plant defence against insects: evidence from maizes and wild relatives. *Evolutionary Ecology* 11(3):337-355. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1018420504439>.

SanMiguel, P; Tikhonov, A; Jin, Y-K; Motchoulskaia, N; Zakharov, D; Melake-Berhan, A; Springer, PS; Edwards, KJ; Lee, M; Avramova, Z; Bennetzen, JL. 1996. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome (en línea). *Science* 274(5288):765-768. Disponible en <http://www.jstor.org/stable/2891749>.

Santos, A; Almeida, JM; Santos, I; Salema, R. 1998. Biochemical and ultrastructural changes in pollen of *Zea mays* L. grown under enhanced UV-B radiation. *Annals of Botany* 82(5):641-645. DOI: <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0724>.

Schmidt, C; Pacher, M; Puchta, H. 2019. DNA break repair in plants and its application for genome engineering (en línea). s.l., s.e., vol.1864. p. 237-266 DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8778-8_17.

Schnable, PS; Ware, D; Fulton, RS; Stein, JC; Wei, F; Pasternak, S; Liang, C; Zhang, J; Fulton, L; Graves, TA; Minx, P; Reily, AD; Courtney, L; Kruchowski, SS; Tomlinson, C; Strong, C; Delehaunty, K; Fronick, C; Courtney, B; Rock, SM; Belter, E; Du, F; Kim, K; Abbott, RM; Cotton, M; Levy, A; Marchetto, P; Ochoa, K; Jackson, SM; Gillam, B; Chen, W; Yan, L; Higginbotham, J; Cardenas, M; Waligorski, J; Applebaum, E; Phelps, L; Falcone, J; Kanchi, K; Thane, T; Scimone, A; Thane, N; Henke, J; Wang, T; Ruppert, J; Shah, N; Rotter, K; Hodges, J; Ingenthron, E; Cordes, M; Kohlberg, S; Sgro, J; Delgado,

B; Mead, K; Chinwalla, A; Leonard, S; Crouse, K; Collura, K; Kudrna, D; Currie, J; He, R; Angelova, A; Rajasekar, S; Mueller, T; Lomeli, R; Scara, G; Ko, A; Delaney, K; Wissotski, M; Lopez, G; Campos, D; Braidotti, M; Ashley, E; Golser, W; Kim, H; Lee, S; Lin, J; Dujmic, Z; Kim, W; Talag, J; Zuccolo, A; Fan, C; Sebastian, A; Kramer, M; Spiegel, L; Nascimento, L; Zutavern, T; Miller, B; Ambroise, C; Muller, S; Spooner, W; Narechania, A; Ren, L; Wei, S; Kumari, S; Faga, B; Levy, MJ; McMahan, L; Van Buren, P; Vaughn, MW; Ying, K; Yeh, C-T; Emrich, SJ; Jia, Y; Kalyanaraman, A; Hsia, A-P; Barbazuk, WB; Baucom, RS; Brutnell, TP; Carpita, NC; Chaparro, C; Chia, J-M; Deragon, J-M; Estill, JC; Fu, Y; Jeddellouh, JA; Han, Y; Lee, H; Li, P; Lisch, DR; Liu, S; Liu, Z; Nagel, DH; McCann, MC; SanMiguel, P; Myers, AM; Nettleton, D; Nguyen, J; Penning, BW; Ponnala, L; Schneider, KL; Schwartz, DC; Sharma, A; Soderlund, C; Springer, NM; Sun, Q; Wang, H; Waterman, M; Westerman, R; Wolfgruber, TK; Yang, L; Yu, Y; Zhang, L; Zhou, S; Zhu, Q; Bennetzen, JL; Dawe, RK; Jiang, J; Jiang, N; Presting, GG; Wessler, SR; Aluru, S; Martienssen, RA; Clifton, SW; McCombie, WR; Wing, RA; Wilson, RK. 2009. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics (en línea). *Science* 326(5956):1112 LP - 1115. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1178534>.

Schneider, T; Kaul, CM; Pressel, KG. 2019. Possible climate transitions from breakup of stratocumulus decks under greenhouse warming (en línea). *Nature Geoscience* 12(3):164-168. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41561-019-0310-1>.

Schröpfer, S; Knoll, A; Trapp, O; Puchta, H. 2014. DNA repair and recombination in plants. In Howel, S (ed.). s.l., Springer Reference. p. 51-93.

Siyuan, S; Tong, L; Liu, R. 2018. Corn phytochemicals and their health benefits (en línea). *Food Science and Human Wellness* 7(3):185-195. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.09.003>.

Smith, CW; Betran, J; Betrán, J; Runge, ECA; Runge, ECA. 2004. Corn: origin, history, technology, and production (en línea). New Jersey, US, Wiley, (Wiley Series in Crop Science). 968 p. Disponible en <https://books.google.co.cr/books?id=eDJ3NjHh8H8C>.

Stapleton, AE; Thornber, CS; Walbot, V. 1997. UV-B component of sunlight causes measurable damage in field-grown maize (*Zea mays* L.): Developmental and cellular heterogeneity of damage and repair. *Plant, Cell and Environment* 20:279-290. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-81.x>.

Stapleton, E; Walbot, V. 1994. Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiology* 105:881-889.

Stojaković, M; Ivanović, M; Bekavac, G; Stojaković, S. 2010. Grain yield of B73 × Mo17-type maize hybrids from different periods of breeding. *Cereal Research Communications* 38(3):440-448. DOI: <https://doi.org/10.1556/CRC.38.2010.3.14>.

Sun, S; Zhou, Y; Chen, J; Shi, J; Zhao, H; Zhao, H; Song, W; Zhang, M; Cui, Y; Dong, X; Liu, H; Ma, X; Jiao, Y; Wang, B; Wei, X; Stein, JC; Glaubitz, JC; Lu, F; Yu, G; Liang, C; Fengler, K; Li, B; Rafalski, A; Schnable, PS; Ware, DH; Buckler, ES; Lai, J. 2018.

Extensive intraspecific gene order and gene structural variations between Mo17 and other maize genomes (en línea). *Nature Genetics* 50(9):1289-1295. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0182-0>.

Tabashnik, BE. 2010. Communal Benefits of Transgenic Corn (en línea). *Science* 330(6001):189-190. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1196864>.

Troyer, A. 2004. Background of U.S. hybrid corn II: breeding, climate and food (en línea). *Crop Science* 44(2):370-380. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.05.050>.

Walbot, V. 2009. 10 reasons to be tantalized by the B73 maize genome (en línea). *PLoS Genetics* 5(11):e1000723. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000723>.

Waterworth, WM; Drury, GE; Bray, CM; West, CE. 2011. Repairing breaks in the plant genome : the importance of keeping it together. *New Phytologist* 192:805-822. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03926.x>.

Wei, F; Chen, M; Cone, K; Bowers, JE; Coe, E; Schroeder, S; Davis, G; Messing, J; Lee, S; Engler, F; Sanchez-Villeda, H; Fuks, G; Fang, Z; McMullen, M; Goicoechea, JL; Paterson, AH; Nelson, W; Gardiner, J; Soderlund, C; Schaeffer, M; Kim, H; Bharti, AK; Wing, RA; Butler, E. 2007. Physical and genetic structure of the maize genome reflects its complex evolutionary history. *PLoS Genetics* 3(7):e123. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030123>.

Weimer, AK; Biedermann, S; Harashima, H; Roodbarkelari, F; Takanashi, N; Foreman, J; Guan, Y; Pochon, G; Heese, M; Damme, D Van; Sugimoto, K; Koncz, C; Doerner, P; Umeda, M; Schnittger, A. 2016. The plant-specific CDKB 1 -CYCB 1 complex mediates homologous recombination repair in Arabidopsis. *The EMBO Journal* 35(19):2068-2086. DOI: <https://doi.org/10.15252/embj.201593083>.

West, CE; Waterworth, WM; Jiang, Q; Bray, CM. 2000. Arabidopsis *DNA ligase IV* is induced by γ -irradiation and interacts with an Arabidopsis homologue of the double strand break repair protein XRCC4. *Plant Journal* 24(1):67-78. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00856.x>.

West, CE; Waterworth, WM; Story, GW; Sunderland, PA; Jiang, Q; Bray, CM. 2002. Disruption of the Arabidopsis *AtKu80* gene demonstrates an essential role for AtKu80 protein in efficient repair of DNA double-strand breaks in vivo. *Plant Journal* 31(4):517-528. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01370.x>.

Williamson, CE; Zepp, RG; Lucas, RM; Madronich, S; Austin, AT; Ballaré, CL; Norval, M; Sulzberger, B; Bais, AF; McKenzie, RL; Robinson, SA; Häder, DP; Paul, ND; Bornman, JF. 2014. Solar ultraviolet radiation in a changing climate. *Nature Climate Change* 4(6):434-441. DOI: <https://doi.org/10.1038/nclimate2225>.

Wright, J. 2009. Mapas de radiación ultravioleta en Costa Rica. *Uniciencia* 23(1):3-17.

Yoshiyama, KO; Kimura, S; Maki, H; Britt, AB; Umeda, M. 2014. The role of SOG1 , a plant-specific transcriptional regulator , in the DNA damage response. *Plant Signalling and Behavior* 9:1-8. DOI: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4161/psb.28889>.

Zamora-Martinez, M. 2018. Cambio climático. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 6(31):4-7.

Zhang, F; Thomson, JG; Puchta, H. 2015. Advances in new technology for targeted modification of plant genomes (en línea). Zhang, F; Puchta, H; Thomson, JG (eds.). New York, NY, Springer New York. 1-166 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2556-8>.

Zuk-Golaszewska, K; Upadhyaya, M; Gołaszewski, J. 2003. The effect of UV-B radiation on plant growth and development (en línea). *Plant Soil and Environment* 49(3):135-140. DOI: <https://doi.org/10.17221/4103-PSE>.

Anexo 2. Permiso de acceso a los elementos y recursos genéticos y bioquímicos de la biodiversidad otorgado por la Comisión Institucional de Biodiversidad de la Universidad de Costa Rica.



VI Vicerrectoría de
Investigación

15 de mayo de 2020
VI-2681-2020

Dr. Pablo Bolaños Villegas
Docente e Investigador
Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno

Estimado señor:

De conformidad con lo dispuesto en el “Reglamento sobre el Acceso a la Biodiversidad en Actividades de Docencia, Acción Social y de Investigación en la Universidad de Costa Rica”, la Comisión Institucional de Biodiversidad recibió vía correo, y firmada por usted en digital, la nota del 6 de mayo de 2020, en la que solicita acceso a los elementos de la biodiversidad para hacer algunos análisis adicionales a los propuestos originalmente en el proyecto B6602 “Análisis molecular y celular de la tolerancia a la radiación en maíz como herramienta de adaptación agrícola al cambio climático” que finalizó en el 2019.

El proyecto tenía como objetivo verificar si variedades de maíz mesoamericanas presentaban diferencias en su respuesta al daño de ADN con muestras proporcionadas por el CATIE. En esta extensión, se desea incluir muestras de maíz adquirido para el autoconsumo. Los experimentos que se planean son destructivos, y no se pretende realizar ningún proceso comercial con esa semilla, o con los resultados obtenidos.

Le comunico que la Comisión Institucional de Biodiversidad reviso el documento y se le otorga el permiso para hacer esa investigación básica. Por esta razón le envío la Resolución # 236 de la Comisión mediante la cual se le comunican las condiciones con que se aprueba este permiso de acceso. Se le recuerda que para hacer recolecta de material silvestre debe contar con los permisos de ingreso y colecta correspondientes, y que en caso de que cambien los objetivos del proyecto debe volver a solicitar aval de esta comisión.

Le saluda con toda consideración,

ADAM PHILIP
KARREMANS LOK
(FIRMA)

Digitally signed by ADAM PHILIP
KARREMANS LOK (FIRMA)
Date: 2020.05.15 14:32:03 -06'00'

Dr. Adam P. Karremans
Coordinador
Comisión Institucional de Biodiversidad

APK/LFC

C. Consejo Científico, EEAFBM
Licda. Silvia Salazar, Asesora, PROINNOVA
Archivo, Comisión Institucional de Biodiversidad

Nuestra *salud mental* importa

Tel: 2511-1350 | Fax: (506) 2224-9367 | Correo electrónico: vicerectoria.investigacion@ucr.ac.cr
|Portal de Investigación: www.vinv.ucr.ac.cr. Dirección: Cuarto piso de la Biblioteca Luis Demetrio
Tinoco. Sede Rodrigo Facio.



RESOLUCIÓN No. 236

La Comisión Institucional de Biodiversidad de la Universidad de Costa Rica, conoce la solicitud de permiso de acceso a los elementos y recursos genéticos y bioquímicos de la biodiversidad.

RESULTANDO

PRIMERO: Que se presentó para su revisión por parte de la Comisión Institucional de Biodiversidad la nota del 6 de mayo de 2020, en la que solicita acceso a los elementos de la biodiversidad para hacer algunos análisis adicionales a los propuestos originalmente en el proyecto B6602 "Análisis molecular y celular de la tolerancia a la radiación en maíz como herramienta de adaptación agrícola al cambio climático" que finalizó en el 2019, el investigador responsable fue el Dr. Pablo Bolaños Villegas, Docente e Investigador de la Estación Experimental agrícola Fabio Baudrit Moreno.

El proyecto tenía como objetivo verificar si variedades de maíz mesoamericanas presentaban diferencias en su respuesta al daño de ADN con muestras proporcionadas por el CATIE. En esta extensión, se desea incluir muestras de maíz adquirido para el autoconsumo. Los experimentos que se planean son destructivos, y no se pretende realizar ningún proceso comercial con esa semilla, o con los resultados obtenidos.

SEGUNDO: Que la Comisión decidió revisar este proyecto de investigación básica por cuanto se encuentra contemplado en las actividades enumeradas en el Reglamento de Acceso a los Elementos de la Biodiversidad en actividades de Docencia, Acción Social y de Investigación de la Universidad de Costa Rica de conformidad con los artículos 10, 22 a 27 del citado reglamento.

TERCERO: Que de la evaluación de la documentación se concluye que el proyecto tiene acceso al material genético, y que lo utilizará solamente con fines de investigación Básica.

CUARTO: Que para el análisis de este Proyecto y la emisión de la correspondiente Resolución se han tomado en consideración los Principios Generales, Objetivos y Criterios Aplicables contemplados en el Reglamento, así como el marco legal internacional aplicable.

QUINTO: Que el Reglamento de Acceso a los Elementos de la Biodiversidad en actividades de Docencia, Acción Social y de Investigación de la Universidad de Costa Rica otorga a la Comisión Institucional de Biodiversidad las competencias para hacer operativo el Reglamento y, entre otras atribuciones, la de aprobar los proyectos de investigación, docencia y acción social en los que haya acceso a los elementos de la biodiversidad.

Nuestra *salud mental* importa



POR TANTO,

**LA COMISIÓN INSTITUCIONAL DE BIODIVERSIDAD
RESUELVE:**

PRIMERO: Aprobar el acceso a los elementos y recursos genéticos y bioquímicos de la biodiversidad que se indican en la propuesta para el desarrollo de la investigación básica, la nota del 6 de mayo de 2020, en la que solicita acceso a los elementos de la biodiversidad para hacer algunos análisis adicionales a los propuestos originalmente en el proyecto B6602 "Análisis molecular y celular de la tolerancia a la radiación en maíz como herramienta de adaptación agrícola al cambio climático" que finalizó en el 2019, el investigador responsable fue el Dr. Pablo Bolaños Villegas, Docente e Investigador de la Estación Experimental agrícola Fabio Baudrit Moreno.

SEGUNDO: En caso de que el proyecto de investigación cambie por el efecto dinámico de la investigación y se ubique en las categorías de investigación aplicada, bioprospección o comercialización, el investigador deberá comunicarlo por escrito a la Comisión para que esta proceda a determinar lo que corresponda, incluyendo la necesidad de emitir una nueva Resolución de conformidad con el tipo de proyecto.

TERCERO: Este permiso lo es únicamente para el acceso a los recursos genéticos y bioquímicos. El investigador deberá solicitar por su cuenta, cuando corresponda, los permisos de recolecta y autorización para el ingreso a los sitios donde se realicen las recolectas o se materialice el acceso, los cuales deberán ser tramitados ante las instancias correspondientes del Sistema Nacional de Áreas de Conservación. Este permiso solo autoriza el acceso a los recursos genéticos y bioquímicos de conformidad con los términos del proyecto aprobado. La obtención de cualquier otro permiso para la realización del proyecto (CITES, certificado fitosanitario de exportación o de importación, etc.) es responsabilidad de la investigadora.

CUARTO: El material biológico que se requiera para referencia deberá depositarse en una colección institucional de la Universidad de Costa Rica.

QUINTO: Cualquier transferencia de material de origen biológico fuera de la Universidad de Costa Rica debe realizarse mediante un Acuerdo de Transferencia de Material (ATM) entre la institución receptora y la Universidad de Costa Rica. Los términos de este ATM se deben negociar con la participación de PROINNOVA y de la Comisión Institucional de Biodiversidad. Estos términos deben incluir lo relativo a la distribución de posibles beneficios que surjan de la investigación y el acceso al material.

Nuestra *salud mental* importa



SEXTO: El investigador responsable del proyecto comunicará a la Comisión cualquier cambio en el proyecto que implique una modificación sustancial de las actividades con base en las cuales se otorgó el presente permiso.

SETIMO: De conformidad con el cronograma del proyecto aprobado, el presente permiso de acceso se otorga hasta el 31 de diciembre de 2021. Al finalizar el proyecto, el investigador responsable deberá enviar a esta Comisión un informe del acceso que realizó a los recursos genéticos y bioquímicos de la biodiversidad. Este informe debe incluir, cuando corresponda, lo siguiente:

- Nombre científico y cantidad de muestras recolectadas
- Fecha en que se recolectaron las muestras
- Nombre de recolector o recolectora
- Número del permiso de recolecta otorgado por el SINAC con el cual fueron recolectadas las muestras.
- Nombre de la colección donde se depositaron las muestras.
- Información detallada de cualquier transferencia de material biológico realizada a otra institución.
- Breve resumen de los principales resultados científicos obtenidos a partir del estudio de las muestras recolectas.

OCTAVO: La Comisión se reserva el derecho de cancelar este permiso en el caso de que se incumpla con lo establecido en esta Resolución o con la normativa legal vigente. Contra esta Resolución tienen lugar los recursos ordinarios de revocatoria ante la Comisión y la apelación ante la persona que ocupe la Rectoría, dentro de los siete días hábiles siguientes a la notificación de la presente Resolución.

Ciudad Universitaria, "Rodrigo Facio", 15 de mayo de 2020.

COMUNÍQUESE

ADAM PHILIP
KARREMANS LOK
(FIRMA)

Digitally signed by ADAM PHILIP
KARREMANS LOK (FIRMA)
Date: 2020.05.15 14:32:18 -0600

Dr. Adam P. Karremans
Coordinador
Comisión Institucional de Biodiversidad

APK/LFC

Nuestra *salud mental* importa

Anexo 3. Tamaño del producto de amplificación obtenido para cada par imprimadores utilizado en cada gen.

Nombre del gen	Versión del imprimador	Tamaño del amplicón
<i>ATM1</i>	1	144
<i>ATR1</i>	1	66
<i>SOG1</i>	1	No disponible
	2	133
<i>RAD51</i>	1	131
	2	63
<i>BRCA1</i>	1	154
<i>KU80</i>	1	170
<i>LIG4</i>	1	125
<i>CDKB2;1</i>	1	126
<i>UBQ10</i>	1	108
	2	160
<i>EIF4A</i>	1	183