

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Biología Celular y Genética



Transformación genética en trigo común (*Triticum aestivum* L.) y triticales (*xTriticosecale* Wittmack) mediante biolística y *Agrobacterium tumefaciens*.

TESIS DOCTORAL

SILVIA RUBIO DÍAZ

2005

**NICOLÁS JOUVE DE LA BARREDA, CATEDRÁTICO DE GENÉTICA Y
JUAN M. GONZÁLEZ TRIGUERO PROFESOR TITULAR DE GENÉTICA
DE LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ,**

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: "**Transformación genética en trigo común (*Triticum aestivum* L.) y triticale (*xTriticosecale* Wittmack) mediante biolística y *Agrobacterium tumefaciens***" realizada bajo su dirección por **Dña. Silvia Rubio Díaz** en el Departamento de Biología Celular y Genética de la Universidad de Alcalá, se considera ya finalizada y puede ser presentada para su exposición y defensa.

Y para que conste, firman en Alcalá de Henares, a veintiséis de septiembre de dos mil cinco.

Nicolás Jouve de la Barreda

Juan M. González Triguero

NICOLÁS JOUVE DE LA BARREDA, CATEDRÁTICO DE GENÉTICA Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA,

CERTIFICA:

Que **Dña. Silvia Rubio Díaz**, Licenciada en Biología por la Universidad de Alcalá, ha realizado la Tesis Doctoral titulada: **”Transformación genética en trigo común (*Triticum aestivum* L.) y triticale (*xTriticosecale* Wittmack) mediante biolística y *Agrobacterium tumefaciens*”** en el Departamento de Biología Celular y Genética de la Universidad de Alcalá, y reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que así conste, firma en Alcalá de Henares, a veintiséis de septiembre de dos mil cinco.

Nicolás Jouve de la Barreda

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación concedida por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (AGL2000-0762-C02) y por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2003-08128-C02); así como a la beca FPI concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (2001-2005) y a las becas concedidas para la inicialización (2001) y finalización (2005) de este trabajo por la Universidad de Alcalá.

A mis padres,

Pienso, luego existo.

René Descartes, 1596-1650.

AGRADECIMIENTOS

Es cierto. Es complicado el resumir en unas líneas mi agradecimiento a todos, pero tan satisfactorio escribirlo como haber realizado este trabajo; muchísimas gracias por vuestra ayuda y apoyo en estos casi cinco años.

Ante todo, al Prof. Nicolás Jouve por la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral trabajando en sus proyectos y por todo su esfuerzo, sobre todo al final cuando el tiempo apremiaba. Al Dr. Juan Manuel González por su conocimiento, dedicación y paciencia, además de enseñarme e introducirme en el mundo de la ciencia de la manera más humana posible.

Agradecer al Dr. Huw Jones su acogida y mi formación en la transformación de trigo mediante Agrobacterium, en su laboratorio del departamento Crop Performace Improvement en Rothamsted Research (UK). No olvidaré la simpatía de todos (Paul, Julia, Huixia, Rob, Gabi, Sue, Marlon, Marcela...) y por supuesto, a Caroline Sparks, porque me enseñó la mejor y además me llevé una amiga.

Sin duda, donde más tiempo he pasado ha sido en el departamento, luego a todos los que están y a los que estuvieron, gracias. Especialmente a:

- Yolanda, por saber escuchar, tu motivación positiva y voluntad por enseñarme todos los días. Alfredo por tu ánimo y ejemplo de constancia. Esther porque no sólo he tenido la suerte de aprender contigo lo que más me gustó durante la carrera sino también durante la tesis. Angelines C. sinceramente no conozco a nadie igual y nunca podré olvidar lo bien que lo pasamos en Brasil. Luís, aún recuerdo sus gustos musicales, el frío que nos hacía pasar y su pasión por el laboratorio. Angelines B. por tu ilusión; Rosa por tu buen humor y cariño diario; Pilar por tener una tesis tan bien escrita y Araceli porque puedo asegurar que no he olvidado la “Mejora Genética Vegetal” desde que estudié la asignatura. Chelo e Isabel las mejores secretarias del mundo! Eva, Marisa, Maribel y Ruth afortunadamente hemos compartido buenos ratos dentro y fuera del laboratorio. Yoli, Vero, Goyo, Elisa, Joaquín, Diego ambos dos, Guille, Elpidio, Maria Inés, Ana, Silvia, Ana Emilia y con cariño a Maite, gracias por el recuerdo del día a día. Además a la Dra. Consuelo Soler por permitirnos recoger de sus campos, más de una vez, trigo de la variedad ‘Anza’.

Muchas gracias a mis amigos, creo que ahora todos ellos tienen cierta idea a cerca del mundo del bombardeo y las plantas transgénicas. Objetivo cumplido si he captado algunas mentes a favor: Natalia, Silvia, Bea, Paty e Isa. Y como no, otra Isa, otra Bea, Iván, Almu, Laura, Dani, Jose, Eva, Graciela, M^a Carmen... Al Dr. Silvio Meneses, a Georgina, un beso y a Gleida de la Universidad de Granma (Cuba); a los niños de Shalom Christian Community (Australia) en especial a Maggie. A Cris y Javi porque hemos luchado mucho, pipetas y portátil en mano, en muy distintos sitios.

A Alcalá de Henares, la Virgen de Guadalupe, Santa Gema, U2 y Ghandi. A Faye, Yvonne y Patrick, gracias por demostrarme como se vive en paz.

A M^a Toñi, Fernando, Andrés, Javier y Marina; a mis primos, primas, tíos y tías por estar siempre conmigo. A mis abuelos y abuelas por ser como fueron y son, esta pequeña aportación al mundo científico es totalmente para vosotros.

A mi familia, porque verdaderamente mis padres, Juan y Paqui, han hecho "otra tesis" conmigo, mil gracias por todo y en particular por vuestra comprensión; a mi hermano Juan que ha padecido mis sufrimientos muchas veces, lo sé, lo sé y su esposa, seguro que también.

Finalmente, me siento muy afortunada e infinitamente agradecida a la ciencia, por cruzarse en mi camino y permitirme conocer mucho más de lo que nunca imaginé... Gracias por hacerme tan feliz, Paul Gareth Dennis.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.

RESUMEN DE LA MEMORIA-SUMMARY.

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. TRIGO Y TRITICALE. IMPORTANCIA Y CONSIDERACIONES AGRÍCOLAS.	1
1.2. TRANSFORMACIÓN.	5
1.2.1. Métodos de transformación	6
1.2.1.1. Biolística	6
1.2.1.2. Transformación mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
1.2.2. Factores que influyen en la transformación	15
1.2.2.1. Condiciones de la planta madre de embriones	15
1.2.2.2. Vectores de expresión génica: Importancia del promotor	15
1.2.2.3. Parámetros empleados en biolística	16
1.2.2.3.1. Preparación de los microproyectiles	17
1.2.2.3.2. Parámetros físicos en el bombardeo de partículas	18
1.2.2.3.3. Parámetros del cultivo de tejidos	19
1.2.2.4. Parámetros empleados en la transformación mediante <i>A. tumefaciens</i>	20
1.2.2.5. Marcadores para la selección de la planta	22
1.2.2.6. Regeneración de la planta	23
1.2.2.7. Silenciamiento	24
1.3. LA ANDROGÉNESIS, IMPORTANCIA E INTENCIÓN DE UTILIZARLA PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS. MATERIAL HAPLOIDE.	25

1.4. PROTEÍNAS DE RESERVA DEL ENDOSPERMO DEL GRANO DE TRIGO. ALELOS IMPLICADOS EN LA CALIDAD HARINO-PANADERA.	26
1.5. OBJETIVOS.	31
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	32
2.1. MATERIAL VEGETAL.	32
2.1.1. Obtención de embriones cigóticos inmaduros de trigo y de triticale	32
2.1.2. Obtención de embriones haploides de triticale por cultivo <i>in vitro</i> de microesporas	33
2.2. VECTORES DE TRANSFORMACIÓN.	36
2.2.1. Vectores utilizados en el bombardeo de embriones: pAHGUS, pAHDx5-BAR, pAHBx7-BAR y pAHDy10-BAR	37
2.2.1.1. Vector pAHGUS	37
2.2.1.2. Vectores pAHDx5-BAR, pAHBx7-BAR y pAHDy10-BAR	38
2.2.1.2.1. Obtención del vector pAHDx5-BAR	38
2.2.1.2.2. Obtención del vector pAHBx7-BAR	41
2.2.1.2.3. Obtención del vector pAHDy10-BAR	42
2.2.2. Vectores utilizados en la transformación mediante <i>A. tumefaciens</i> : pAL154 y pAL156	43
2.3. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN.	44
2.3.1. Transformación mediante biolística	44
2.3.1.1. Expresión transitoria del gen <i>uidA</i>	44
2.3.1.2. Obtención de plantas transgénicas	46
2.3.1.2.1. Selección temprana	46
2.3.1.2.2. Selección tardía	46
2.3.2. Transformación mediante <i>A. tumefaciens</i>	47
2.3.2.1. Cultivo y preparación de <i>A. tumefaciens</i>	47

2.3.2.2. Precultivo, inoculación, co-cultivo e inducción de los embriones cigóticos inmaduros de las variedades ‘Anza’ y ‘Craklin’ de trigo y la línea ‘ATOPE-22’ de triticales y de embriones haploides de la línea ‘ATOPE-22’ de triticales	48
2.3.2.3. Regeneración, selección y desarrollo de las plántulas	50
2.3.3. Análisis molecular de las plantas seleccionadas con fosfinotricina	50
2.3.3.1. PCR	50
2.3.3.2. Southern-blot	51
2.3.3.3. Marcaje de las sondas de ADN	52
2.3.3.3.1. Random priming	52
2.3.3.3.2. Marcaje con DIG	53
2.3.3.4. Prehibridación e hibridación	54
2.3.3.5. Detección de la hibridación	54
2.3.3.5.1. Detección radioactiva	54
2.3.3.5.2. Detección quimioluminiscente	55
3. RESULTADOS.	56
3.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES A UTILIZAR EN LA TRANSFORMACIÓN	56
3.1.1. Construcción del vector pAHGUS	56
3.1.2. Construcción de los vectores pAHDx5-BAR, pAHBx7-BAR y pAHDy10-BAR	58
3.1.2.1. Elección de promotores y aislamiento de los genes <i>Glu-D1x5</i> , <i>GluD1y10</i> y <i>Glu-B1x7</i>	58
3.1.2.2. Obtención de los vectores para la transformación	60
3.2. TRANSFORMACIÓN EN TRITICALE.	62
3.2.1. Biolística	62
3.2.1.1. Embriones haploides	63
3.2.1.1.1. Análisis de la expresión transitoria del gen <i>uidA</i> en embriones haploides de triticales	63

3.2.1.1.2. Obtención de plantas transgénicas de la línea ‘ATOPE-22’ de triticales	67
3.2.1.2. Embriones cigóticos inmaduros	68
3.2.1.2.1. Análisis de la expresión transitoria del gen <i>uidA</i> en embriones cigóticos inmaduros de la línea ‘ATOPE-22’ de triticales	68
3.2.2. Transformación mediante <i>A. tumefaciens</i>	71
3.2.2.1. Embriones haploides	71
3.2.2.1.1. Análisis de la expresión transitoria del gen <i>uidA</i> en embriones haploides de la línea ‘ATOPE-22’ de triticales	71
3.2.2.2. Embriones cigóticos inmaduros	71
3.2.2.2.1. Análisis de la expresión transitoria del gen <i>uidA</i> en embriones inmaduros de la línea ‘ATOPE-22’ de triticales	71
3.2.2.2.2. Obtención de plantas transgénicas de la línea ‘ATOPE-22’ de triticales	73
3.3. TRANSFORMACIÓN DE VARIEDADES DE TRIGO.	74
3.3.1. Biolística	74
3.3.1.1. Obtención de plantas transgénicas de las variedades ‘Anza’ y ‘Craklin’ mediante biolística	74
3.3.1.1.1. Transformación de la variedad ‘Anza’	75
3.3.1.1.2. Transformación de la variedad ‘Craklin’	77
3.3.2. Transformación mediante <i>A. tumefaciens</i>	77
3.3.2.1. Análisis de la expresión transitoria del gen <i>uidA</i> en embriones cigóticos inmaduros de trigo	77
3.3.2.2. Obtención de plantas transgénicas de las variedades ‘Anza’ y ‘Craklin’	80
3.3.2.2.1. Transformación de la variedad ‘Anza’	80
3.3.2.2.2. Transformación de la variedad ‘Craklin’	81
4. DISCUSIÓN.	85
4.1. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES Y EFICACIA DE UTILIZACIÓN	85

4.1.1. Acercamiento genético al estudio del desarrollo del grano y su composición	89
4.2. INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS IMPLICADOS Y EFICACIA DE LA TRANSFORMACIÓN MEDIANTE BIOLÍSTICA y <i>A. tumefaciens</i>	90
4.2.1. El bombardeo de partículas facilita un gran rango de estrategias de transformación	90
4.2.2. Entrada de ADN mediante <i>A. tumefaciens</i>	96
4.2.3. Distinta distribución de foci con ambos métodos	100
4.3. LA IMPORTANCIA DEL MATERIAL TRANSFORMANTE. ESPECIE, GENOTIPO Y TEJIDO.	101
4.3.1. Elección del explante	101
4.3.2. Eficacia de trnasferencia de ADN mediante biolística y <i>Agrobacterium</i> en triticales y trigo	103
4.3.3. Selección y mosaicismo	104
4.3.3.1. Control de <i>Agrobacterium</i> , regeneración y selección	104
4.3.3.2. Selección temprana y tardía	105
4.3.3.3. Mosaicismo	106
4.4. LA OBTENCIÓN DE TRIGO Y TRITICALE TRANSGÉNICO.	107
4.4.1. ¿ <i>Agrobacterium</i> o biolística?	109
4.4.2. Destino de los transgenes	111
5. RESUMEN Y CONCLUSIONES.	114
6. BIBLIOGRAFÍA.	116

ANEXO en el CD adjunto.

ABREVIATURAS

Act: actina

Adh: Alcohol deshidrogenasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Acido ribonucleico

AzaC: 5-Azacytidina

BAR: acetiltransferasa fosfinotricinali

BSA: Albúmina sérica bovina

°C: Grado centígrado

CaMV: Virus del mosaico de la coliflor

cm: Centímetros

cpm: cuentas por minuto

dNTPs: 2' -deoxinucleósido-5' -trifosfato

2,4 D: Ácido 2,4- Dicloro-Fenoxiacético

DIG: Digoxigenina

EDTA: Sal sódica del ácido etilendinitrilotetra-acético

EMBL: European Molecular Biology Laboratory

GFP: green fluroscent protein

GUS: β -glucuronidasa

g: aceleración de la gravedad

IE: Embriones inmaduros

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranósido

KB: Kilobases

KDa: Kilodaltons

KV: Kilovoltio

LB: Luria-Bertani

M: Molar

MS: Murashigue y Skoog

mg: Miligramos

min: Minutos

ml: Mililitros

mM: Milimolar

mm: Milímetros

nm: Nanómetros

nos: terminador de la nopalina

OMG: organismos modificados genéticamente

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEG: polietilenglicol

PAT: enzima fosfinotricina acetiltransferasa

PMI: isomerasa fosfomanosa

psi: una libra por pulgada al cuadrado = 6 894.75729 pascales

PPT: Fosfinotricina

rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: Amplificación de secuencias de ARN por retrotranscripción y PCR

seg: Segundos

TAE: Tris-acetato 0,8 mM, EDTA 0,02 mM.

U: Unidades

UA: Universidad de Alcalá

Ubi: Ubiquitina

UV: ultravioleta

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-tiogalactopiranosido

X-GlcA: sal ciclohexilamonio, 5-bromo-4cloro-3indoly1- β -D-glucuronido

[α^{32} P]-dCTP: Citosina trifosfato marcada con 32 P en la posición α

μ Ci: Microcurio

μ g: Microgramo

μ l: Microlitro

RESUMEN DE LA MEMORIA - SUMMARY

Antecedents

Transformation of cereal crops is a powerful research tool that facilitates the discovery of genes and their functions, and is rapidly becoming a key element in varietal improvement (Jones et al., 2005).

The first fertile transgenic plants was produced more than a decade ago using particle bombardment (Vasil et al., 1992, 1993; Weeks et al., 1993; Becker et al., 1994; Nehra et al., 1994; Zimny et al., 1995). However, genetic transformation of recalcitrant species such as wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (*xTriticosecale* Wittmack) was not achieved until more recently.

Triticale is a 'man-made' cereal produced by hybridising wheat (*Triticum aestivum* or *T. turgidum*) and rye (*Secale cereale*) prior to chromosome doubling. It has a high protein content, is tolerant to adverse environmental conditions (dry and cold environment and acid soils), and is resistant to a range of diseases and pests; it is therefore, a good alternative to wheat. However, the cultivated surface of the world presently under triticale is 3.04 million hectares (FAO,2005) which is very little when compared to wheat which is grown on more than 200 million hectares (over 17 % of the world's cultivable land).

A key target for the application of transgene technology is the grain quality enhancement. This can be achieved by increasing the content of high molecular weight (HMW) glutenins that are associated with superior bread making. The development of a transformation protocol for wheat and triticale by particle bombardment or *Agrobacterium* mediated systems requires identification and optimisation of factors that affect DNA delivery into tissue from which whole plants can be regenerated.

The most commonly used explant for wheat and triticale transformation is the immature scutellum, a specialised tissue that forms part of the seed embryo. It is amenable to both biolistics and *Agrobacterium*-mediated DNA delivery methods and can be readily induced to form embryogenic callus (Jones, 2005). *Agrobacterium*-based transformation is perceived to exhibit several advantages over other forms of direct transformation including the ability to transfer large segments of DNA with

minimal rearrangement, the precise insertion of fewer copies of transgenes with lower cost than other methods (Amoah *et al.*, 2001).

Our research group has successfully developed *in vitro* culture technics in anthers to obtain double haploid lines by androgenesis and a protocol for development of plantlets from *in vitro* culture of immature embryos. The aim of this work was to investigate the physical and biological factors affecting DNA transfer by biolistic and *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat and triticale in order to introduce genes that result in nutritional improvement of grain.

Methodology

We used two different explants for triticale transformation: haploid embryo-like structures (ELS) obtained by *in vitro* androgenesis in two lines of triticale ‘ATOPE-22’ and ‘ATOPE-6’ proceeding from the intervarietal hybrid ‘Torote’×‘Presto’ (González y col., 1997, 2000) and immature zygotic embryos of ‘ATOPE-22’ line. Wheat transformation was done with immature zygotic embryos of the varieties ‘Anza’ and ‘Craklin’.

The cassette containing the promoter CaMV 35S+ *uidA*+terminator 35S was extracted from the plasmid pJIT61 (John Innes Centre, Norwich) and cloned in pBluescript IISK. The resultant 5482 bp plasmid was named pAHGUS and was used for transitory expression assays. In addition, we constructed the plasmids pAHDx5-BAR, pAHDy10 and pAHBx7 which carried some HMW-glutenin genes: *Glu-D1x5*, *Glu-D1y10* and *Glu-Bx7* and the selection marker *bar* gene (bialaphos resistance gene) for introduction into wheat and triticale using the biolistic approach.

Particle bombardment experiments were applied following the method of Rubio *et al* (2004), using an equipment Biolistic® PDS-1000/He (BioRad). *Agrobacterium*-mediated transformations were carried out using *A. tumefaciens* strain AGL1 (Lazo *et al.*, 1991) harbouring the binary vectors pAL154/pAL156 (Hellens *et al.*, 2000) following the method reported by Wu *et al.*, (2003). The embryos were kept on induction medium containing timentin for 2 days and the selection was carried out in regeneration medium with 4mg/l of phosphinotricine.

In transitory expression assays all of embryos were incubated at 37°C overnight in GUS substrate mixture as described by Jefferson (1987). Statistical analyses were performed using the Statgraphics Plus (version 7.1) software package.

Conclusions

-The vector pAHGUS got better results than the original pJIT61 after transitory expression experiments of gene *uidA*.

-The variation of the preculture time in ELS or immature zygotic embryos of triticale to transform by the biolistic method, does not affect significantly the transitory expression. The analysis of other parameters intervening in particle bombardment demonstrated that the helium pressure has more influence in the number of foci than the shooting distance, the best combination being 1100 psi and 6 cm.

-The distribution of foci was different using both methods of transformation. In *Agrobacterium*-mediated transformation the foci appear as confluent spots instead of points when the time in contact between embryos and bacteria was more than two or three hours in the inoculation and more than three days about co-culture.

-The application of *Agrobacterium*-mediated transformation in ELS did not gave good results, probably due to the influence of hormones like 2,4D in the medium where the embryos were developed, what could alter the conditions of the bacterial infection. Regarding immature zygotic embryos of triticale and wheat, the best condition was a time of preculture of 0.5 hours. No significative differences were observed about of the different times of inoculation.

-The best results were got with immature zygotic embryos whose size was 0.8-1.5 mm in triticale and wheat so much biolistic as *Agrobacterium*-mediated transformation.

-The results about *Agrobacterium*-mediated transformation prove the possibility of apply this biotechnology not only in triticale but also to transform the commercial varieties of wheat tested in the present work. This result completes the previous studies using biolistic and model genotypes.

- We obtained some transgenic T0 plants of the wheat variety 'Craklin' using *Agrobacterium*-mediated transformation, incorporating the genes *uidA* and *bar* and

T0 plants of the variety 'Anza' using biolistic, carrying *Glu-D1x5*, *Glu-D1y10* and *bar* gene. T1 plants were also obtained in 'Craklin'. We discuss that one of the big problems in getting results for both methods is the high number of scapes. It is estimated that the modification of wheat, by biolistic and *Agrobacterium*, needs 12-16 weeks since original explants until the transfer of the young plants to soil. However, the transformation through *Agrobacterium* looks like recommendable about its low cost comparing with particle bombardment.

- The success of the transformation is very dependent of genotype and *in vitro* culture. Despite the varieties of wheat 'Craklin' and 'Anza' can not be considered good ones to *in vitro* culture, in a global regeneration-transformation process, they offer possibilities of transformation inside the range of the model varieties used previously in other experiments.

1. INTRODUCCIÓN.

1. INTRODUCCIÓN.

Los cereales incluyen las especies cultivadas de mayor importancia mundial en términos de superficie de cultivo, producción y distribución geográfica. En su conjunto tienen una gran importancia agroalimentaria, principalmente para la producción del pan, pastas, galletas, piensos y otros derivados de interés industrial. En los países desarrollados se llevan a cabo programas de obtención de nuevas variedades para satisfacer la demanda de un mercado cada vez más exigente en los criterios de calidad de los derivados de los cultivos, sin abandonar los de producción que permitan mantener su abastecimiento. Mediante el presente trabajo se trata de estudiar las posibilidades de los métodos de transformación para la mejora genética de dos cereales de interés económico, el trigo común (*Triticum aestivum* L.) y el triticale (*xTriticosecale* Wittmack).

1.1. TRIGO Y TRITICALE. IMPORTANCIA Y CONSIDERACIONES AGRÍCOLAS.

La tribu *Triticeae* Dumort (*Hordeae* Benth) está incluida dentro de la familia *Poaceae* (Gramineae) que engloba a los mayores cultivos de cereales del mundo como son el maíz, el trigo y el arroz. Entre los cultivos dedicados a la alimentación, el trigo es una de las fuentes más abundantes de energía y proteínas para la población mundial. Dentro de esta tribu se encuentra el género *Triticum* que comprende especies diploides, tetraploides y hexaploides. En el caso de las Triticeas el número básico de cromosomas de cada genomio es de siete. De esta forma los cromosomas de los genomios presentes en todas las Triticeas se clasifican en 7 grupos de homeología, entendiendo por tal los que corresponden a los cromosomas con homología ancestral, es decir los relacionados evolutivamente. Así, la especie tetraploide *Triticum turgidum* (L.) Thell. ($2n=4x=28$), tiene 2 genomios: A y B, y la especie hexaploide *Triticum aestivum* L. ($2n=6x=42$) tiene 3 genomios: A, B y D (Mackey, 1966). A cada cromosoma se le asigna un número, correspondiente al grupo de homeología seguido del símbolo del genomio: 1A al 7A, 1B al 7B y 1D al 7D.

El noventa y cinco por ciento del trigo cultivado hoy en día es hexaploide (*T. aestivum* L.), usualmente denominado trigo común, blando o panadero ya que se

utiliza para la producción de pan y otros derivados panaderos. El cinco por ciento restante corresponde al trigo tetraploide (*T. aestivum* L.), también denominado trigo duro ya que principalmente se utiliza para la obtención de pastas y galletas.

La evolución de la poliploidía de los trigos ha sido un tema de debate en los últimos años. Hoy se acepta que los donadores diploides de los genomios A y D fueron *T. urartu* Thumanjan ex Gandilyan y *T. tauschii* (Coss.) Schmal. (*Aegilops squarrosa* L.), respectivamente (Kihara, 1924; McFadden y Sears, 1946; Provan y col., 2004). La identidad del genomio B está por resolver. Se han propuesto muchas especies como donadoras originales de este genomio. Se cree que el progenitor fue alguna especie del género *Aegilops* L. como *Ae. Bicornis* Jaub. & Spach, *Ae. longissima* Schweinf. & Muschl. o más probablemente *Ae. speltoides*. Tausch. El genomio D de *T. aestivum* L. es un genomio no modificado respecto al que posee *Ae. squarrosa* L. y se añadió después de la unión de los genomios A y B en las formas tetraploides. Por lo tanto los trigos hexaploides son el resultado de la alopoliploidía entre formas tetraploides de genomios AABB y el diploide *T. tauschii* (Coss.) Schmal. donante del genomio D. Datos arqueológicos evidencian la distribución geográfica coincidente, hace unos 7.000 años, de dicha especie diploide y formas tetraploides de *T. dicoccum*. (Schrank) (Hillman, 1972).

Feldman (1976) opina que la domesticación del trigo debió tener lugar a partir de especies silvestres en el “Creciente Fértil”, en las cadenas montañosas que flanquean la planicie de Mesopotamia y el desierto de Siria, Anatolia y los Balcanes. Esto pudo ocurrir hacia los 7.500-6.500 años antes de Cristo. Así, los trigos consiguieron entrar en Europa por Grecia y desde aquí, en el periodo Neolítico y coincidiendo con el desarrollo de la industria de la cerámica, se produciría la rápida expansión de su cultivo, conducida por las culturas colonizadoras de la época. De acuerdo con Bell (1987) la distribución de los trigos debió seguir dos rutas, una por el Mediterráneo hasta España y otra hacia el centro de Europa a través de las regiones marginales del Danubio y del Rin. Esta expansión llevaría consigo la diversificación de tipos y el incremento de la variabilidad de los trigos cultivados.

El proceso de introducción de genes o fragmentos cromosómicos de unas especies en otras es genéricamente conocido como introgresión y ha sido importante durante la evolución de las especies de la tribu de *Triticeae*, debido a su capacidad de cruzamiento. El método tradicional es el de la hibridación interespecífica, seguido de

la introducción de genes de una especie donante en otra receptora, y la recuperación posterior de las características genéticas de la receptora mediante retrocruzamientos por ésta. Una alternativa es el uso directo del anfiploide derivado de la duplicación cromosómica del híbrido interespecífico.

A finales de los años treinta, los mejoradores de plantas emplearon el descubrimiento de las propiedades poliplodizantes del alcaloide colchicina que se extrae de la liliacea *Colchicum autumnale* L. (Blakeslee, 1937; Eigsti, 1938), para la obtención artificial de aloploides, mediante la duplicación cromosómica de los híbridos interespecíficos. Desde entonces las hibridaciones interespecíficas e intergenéricas han dado paso al desarrollo de numerosos anfiploides sintéticos. El mejor ejemplo de anfiploide artificial es el triticales (*xTriticosecale* Wittmack), término acuñado por Lindschau y Oehler (1935) para designar el anfiploide de 56 cromosomas obtenido tras el cruzamiento entre un trigo hexaploide, *T. aestivum* L. y el centeno, *Secale cereale* L. ($2n=2x=14$). Estas formas fueron creadas para unir la rusticidad del centeno con la capacidad productiva del trigo. Con posterioridad se obtendrían también triticales a partir de trigos tetraploides *T. turgidum* L. Así, el triticales es una especie vegetal de origen sintético (*Triticum turgidum* L. x *Secale cereale* L.: $2n=6x=42$, AABBRR; ó *Triticum aestivum* L. x *Secale cereale* L.: $2n=8x=56$, AABBDDRR). En 1875, Wilson en Escocia ya lo había descrito como un híbrido infértil. Müntzing (1936) decidió aplicar el nombre triticales como denominación común del aloploide artificial resultante del híbrido entre trigo y centeno y así se ha venido utilizando desde entonces por los citogenéticos y mejoradores. Baum en 1971 sugirió la denominación *Triticosecale* Wittmack como género, que fue aceptada y utilizada desde entonces. Aunque hay numerosos anfiploides sintéticos desarrollados en los últimos cincuenta años, de acuerdo con Gupta y Reddy (1991), el triticales puede considerarse como el único ejemplo de interés comercial de planta sintética obtenida por hibridación.

O'Mara (1948) en EE.UU., Sánchez-Monge (1958) en España, Nakajima (1958) en Japón, Kiss (1966) en Hungría y Larter (1968) en Canadá obtuvieron los primeros triticales hexaploides. El impulso definitivo a favor de este nivel ploídico tuvo lugar en España, por parte de Enrique Sánchez-Monge. En 1954 se inició el programa de síntesis y mejora de triticales en la Estación Agronómica de Aula Dei en Zaragoza. En 1958 Sánchez-Monge presentó los resultados de su programa de

obtención y mejora de triticales hexaploides en el First International Wheat Genetic Symposium, celebrado en Winnipeg (Canadá) destacando las ventajas de las formas de 42 cromosomas frente a las de 56 (Sánchez-Monge y Tijo, 1954; Sánchez-Monge, 1956a, b y c, 1958, 1968, 1969, 1973, 1974, 1975; Sánchez-Monge y Soler, 1973). En 1969 Sánchez-Monge obtuvo la primera variedad de triticales hexaploide comercializada en el mundo, a la que se denominó 'Cachirulo'. Esta variedad ha sido considerada un prototipo del nuevo cereal sintético triticales, y ha sido utilizada desde entonces en numerosos programas de mejora en el mundo (Jouve y Soler, 1996). El triticales hexaploide recibió un importante impulso como especie preferente desde los inicios del Centro Internacional de Mejora del Maíz y Trigo (CIMMYT) de México, a partir de 1964. En este centro se obtuvieron los primeros triticales secundarios, fruto de la hibridación entre triticales "primarios" y *T. aestivum* L. (Kiss y Videki, 1971; Scoles y Kaltsikes, 1974; Merker, 1976). De esta manera se obtuvieron diversas formas, entre ellas la variedad 'Armadillo', que aportaban las sustituciones favorables de alguno de los cromosomas del centeno por sus homólogos del genomio D del trigo común. Es importante destacar también la labor de Wolski en Polonia, que simultáneamente produjo una serie de variedades de triticales hexaploide de gran importancia por la extensión de su cultivo en Europa, como la variedad denominada 'Lasko' (Wolski y col. 1985, 1991).

Los aspectos citogenéticos relacionados con el comportamiento cromosómico del triticales y de sus híbridos por trigo y centeno han sido objeto de numerosos estudios por su interés en la consecución de los triticales secundarios (Thomas y Kaltsikes, 1972; Jouve y col. 1977, 1984, 1985, 1988; Soler y col., 1980; Gustafson, 1982; Lukaszewski y Gustafson, 1987; Bernardo y col., 1988a y b; Galindo y Jouve, 1989; Soler y col. 1990; Cuadrado y Jouve, 1994; Jouve y Soler, 1996).

El triticales tiene un contenido en almidón muy parecido al de las especies parentales, un alto contenido proteico y un mejor balance de los aminoácidos esenciales, como la lisina (Villegas y col., 1980). También tiene una buena digestibilidad proteica y una composición de minerales y vitaminas equilibrada. Todo esto permite que el triticales se use en algunos casos para reemplazar o complementar a otros cereales en la alimentación humana y animal. Además posee tolerancia a condiciones ambientales adversas: sequía, suelos ácidos, frío y resistencia a enfermedades y plagas, por lo que puede ser un cereal alternativo al

trigo. A pesar de su reciente origen, la superficie mundial cultivada de triticale es de 3,04 millones de hectáreas en el año 2004 (FAO, 2005) mientras que el trigo es de 217,60 millones de hectáreas en el año 2004 (FAO, 2005).

Las dos formas cultivadas objeto de experimentación de este trabajo han sido tradicionalmente mejoradas por técnicas convencionales, basadas en cruzamientos entre parentales adecuados y selección en las generaciones segregantes, siguiendo diversos métodos en cuanto al diseño experimental y ensayos (Sánchez-Monge, 1974). Por otra parte, para determinados objetivos de mejora de un cultivo como los cereales, se puede recurrir a la utilización de las nuevas tecnologías emanadas de la biotecnología. Los métodos biotecnológicos pueden ahorrar mucho tiempo, y pueden ser de gran utilidad para caracteres como la calidad, resistencia a royas, etc., que dependen de un número limitado de genes. La mejora por procedimientos biotecnológicos ofrece hoy diversas posibilidades, tanto en lo que se refiere al manejo de los sistemas de reproducción, para la producción de líneas homocigóticas mediante el cultivo *in vitro* de microsporas o anteras, como en el manejo directo de las secuencias de los genes responsables de los caracteres cualitativos que se desean mejorar, mediante la utilización de diferentes sistemas de transformación.

1.2. TRANSFORMACIÓN.

El trigo tiene un tamaño de genoma grande (17.000 millones de pares de bases) lo cual hace que los procesos de mejora por cualquier método sean genéticamente complicados (Patnaik y Khurana, 2001). Los trigos, tanto tetraploides como hexaploides tienen un sistema autógeno de reproducción, lo que supone la conservación del genotipo de generación en generación y la tendencia a la fijación en homocigosis de todos los genes. Debido a ello, los métodos tradicionales de mejora para la obtención de nuevas variedades suelen consistir en cruzamientos entre variedades que presentan características complementarias, o en un retrocruzamiento por una variedad donante potencial de alguna característica deseada, a lo que sigue un lento proceso de autofecundación y selección durante varias generaciones. En este proceso es exigible el manejo de poblaciones segregantes amplias y la posterior selección de aquellos genotipos que muestren las características más interesantes, de los que se derivarán un número limitado de líneas de potencial interés comercial. Sin

embargo, cuando se dispone de una variedad bien adaptada a unas condiciones de cultivo y con buenos rendimientos, puede resultar interesante modificar o introducir un nuevo carácter, sin cambiar el resto del genotipo.

A esta finalidad pueden contribuir las técnicas actuales de biotecnología, que tratan de obtener organismos modificados genéticamente (OMG), mediante la introducción del gen o genes deseados en el genoma receptor por técnicas de biología molecular, procurando no modificar el resto del genotipo y esperando que la variación genética introducida se exprese en el momento apropiado y a un nivel adecuado. Se pretende que los trigos transgénicos sean una realidad a pesar de la naturaleza génica compleja del cultivo, siendo necesario avanzar en el estudio de la integración y heredabilidad de los transgenes (Nehra y col., 1994). Los factores cruciales para una transformación eficiente son la eficacia de la embriogénesis, el propio método de transformación y la capacidad de regeneración (Zimny y col., 1995).

La biotecnología tiene un amplio rango de métodos a su disposición para integrar el ADN foráneo dentro de las células vegetales. Las técnicas se pueden clasificar según se trate de sistemas de transferencia directa o indirecta mediada por *Agrobacterium* sp. Entre las primeras se encuentra la electroporación, el uso de polietilenglicol (PEG) para facilitar la introducción de ADN en suspensión, la microinyección, la macroinyección y el bombardeo con micropartículas (Taylor y Fauquet, 2002). En la última década, se han desarrollado sistemas de transformación eficientes para casi todos los cultivos de plantas agrónomicamente importantes.

1.2.1. Métodos de transformación

1.2.1.1. BIOLÍSTICA

La técnica más empleada para transformar monocotiledóneas es la biolística, que consiste en el bombardeo de tejidos, embriones inmaduros o células embriogénicas con microproyectiles cubiertos de ADN a una velocidad suficiente como para atravesar la pared celular sin causar un daño letal a las células. El primer sistema liberador de partículas fue desarrollado a mediados de los años 80 por Sanford y colaboradores (Sanford y col., 1987; Sanford, 1988).

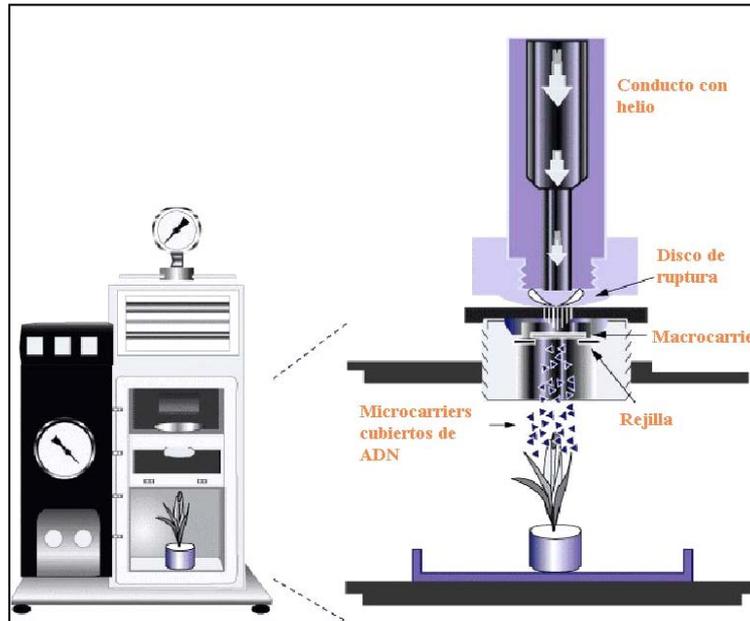


Figura 1.1.- Sistema liberador de partículas PDS-1000/He Biolistic® (Biorad)

A principios de los años 90 este sistema fue ampliamente modificado. Se creó el sistema liberador de partículas PDS-1000/He (Figura 1.1.), registrado con el nombre de sistema biolístico, cuya licencia pertenece a la firma DuPont y cuya comercialización se debe a BioRad (Hércules, CA). Los detalles de este sistema son accesibles en la página Web de la firma BioRad (www.bio-rad.com). Se utiliza gas helio a presión que entra continuamente en una cabina que se encuentra en la parte superior del aparato. El gas es retenido por un disco que tras su ruptura hace que se impulsen unas partículas de un metal pesado. Hay una gran variedad de discos de ruptura diseñados para romperse como respuesta a un amplio rango de presiones (450 a 2.200 psi). El ADN transformante se deposita por precipitación sobre la superficie de unas partículas de oro o tungsteno (microproyectiles o micropartículas) de aproximadamente 1 μm de diámetro, que se expanden en una película de plástico circular (macroproyectil) situado debajo del disco de ruptura en la cámara de vacío, la más importante del sistema. Esta cámara de vacío evita que los microproyectiles se desaceleren debido al rozamiento con el aire antes del impacto con el tejido diana (Kikkert, 1993). Cuando se rompe el disco de ruptura, se produce una onda fuerte que impacta con el macroproyectil provocando que vuele a una corta distancia hasta una rejilla metálica que actúa como pantalla de parada. El macroproyectil es retenido y los microproyectiles son lanzados a través de la malla de la rejilla introduciéndose

en el tejido vegetal diana, situado en un nivel inferior en la cámara de vacío. Las partículas de oro o tungsteno se proyectan siguiendo un patrón circular de uno a varios centímetros de diámetro al nivel de la superficie del impacto sobre el tejido a transformar, cubriendo una zona de mayor o menor extensión dependiendo de la distancia a la cual los tejidos están colocados por debajo de la pantalla de parada (Taylor y Fauquet, 2002). El ADN de interés, una vez introducido en el interior celular, puede integrarse dentro del genoma nuclear, o en las mitocondrias o plastos.

La transformación génica mediante bombardeo de partículas es el método inicialmente utilizado para la modificación genética del trigo siendo varios los grupos que han desarrollado métodos de expresión estable de los transgenes con anterioridad (Vasil y col., 1992; Weeks y col., 1993; Becker y col., 1994; Nehra y col., 1994; Altpeter y col., 1996; Ortiz y col., 1996; Barro y col., 1997). Sin embargo, la aplicación a gran escala de esta tecnología está limitada por una eficiencia de transformación baja e irregular, debido a la baja eficacia del cultivo *in vitro* para la regeneración de las plántulas tras el tratamiento, muy dependiente de los genotipos utilizados, o por la baja tasa de integración del transgén en el genoma de la planta, fenómenos de silenciamiento, etc. Por ello, este método se ha limitado a genotipos “modelo” como ‘Bobwhite’ y ‘Florida’ que agrónicamente son poco interesantes pero que ofrecen la ventaja de su facilidad de regeneración *in vitro* (Rasco-Gaunt y col., 1999). Las primeras formas transformadas de trigo (Vasil y col., 1993; Weeks y col., 1993; Becker y col., 1994) se obtuvieron mediante el bombardeo directo de embriones inmaduros, utilizando diversos plásmidos portadores del gen *bar* y el gen delator *uidA* o *gus*. El gen de selección *bar* confiere resistencia al herbicida Basta™ o Bialaphos™, ya que codifica para la enzima fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) que inactiva la fosfinotricina (PPT) por acetilación, que es el agente activo del herbicida. El gen delator *uidA* codifica para la enzima β -glucuronidasa (GUS) que cataliza una reacción histoquímica consiguiendo que el sustrato X-GlcA muestre un color azul en cada una de las células donde ha habido expresión de dicho gen. También se han obtenido plantas transgénicas en otros cereales como centeno (Castillo y col. 1994), cebada (Jähne y col. 1994; Ritala y col. 1995; Koprek y col. 1996; Choi y col., 2000) y triticale (Zimny y col., 1995). En trigo se han empleado distintos tejidos diana, como embriones inmaduros (Vasil y col., 1993; Weeks y col., 1993; Becker y col., 1994; Altpeter y col., 1996a; Ortiz y col., 1996; Srivastava y

col., 1996, 1999; Takumi y Shimada, 1996; Huber y col., 2002), escutelos aislados de embriones inmaduros (Nehra y col., 1994; Barro y col., 1997; Rasco-Gaunt y col., 1999b; Pastori y col., 2001) y callos embriogénicos derivados de escutelos (Vasil y col., 1992; Fetting y Hess, 1999; Iser y col., 1999).

En general, la biolística ha dado resultados positivos en casi todos los cereales ensayados. Sin embargo, debido a la baja eficiencia de la transformación estable obtenida, cifrada en un 0.1-3% en monocotiledóneas mediante este método (Nehra y col., 1994; Vain y col., 1995), se están poniendo a punto nuevos protocolos de transformación con *Agrobacterium tumefaciens* (Wu y col., 2003).

1.2.1.2. TRANSFORMACIÓN MEDIANTE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

La agro-infección fue el primer método de transformación eficaz en plantas que se desarrolló a principio de la década de los ochenta, mediante la utilización del sistema de *Agrobacterium tumefaciens* (Herrera-Estrella y col., 1983; Deblock y col., 1984; Horch y col., 1984, 1985; Dale y col., 1989). Las primeras plantas transgénicas derivadas de este procedimiento se obtuvieron en la familia de las solanáceas, en particular en el tabaco, *Nicotiana tabacum* L., aunque muchas de las características del proceso eran desconocidas en aquel momento. En los años noventa fue posible obtener formas transgénicas de bastantes especies vegetales dicotiledóneas de interés.

A. tumefaciens es una bacteria del suelo patógena para determinadas plantas. Infecta de forma natural a las zonas de herida de plantas dicotiledóneas y produce la formación de un proceso tumoral en el cuello del tallo conocido como “agalla de la corona”. Las primeras evidencias de que esta bacteria causa este tipo de enfermedad, data de 1907 gracias a Smith y Townsend y desde entonces se ha realizado un gran número de investigaciones para conocer cómo y porqué se produce el tumor. El interés inicial en estos estudios se debió al intento de conocer los mecanismos de oncogénesis en general, con el fin de aplicar estos conocimientos para desarrollar drogas que permitieran combatir el cáncer en personas y animales. Con posterioridad el interés se desvió hacia el fenómeno de la transferencia génica desde *A. tumefaciens* hacia la célula vegetal infectada (De la Riva y col., 1998).

Las cepas virulentas de *A. tumefaciens* tienen un gran plásmido con más de 200 Kb de longitud, cuyo papel es clave en la inducción del tumor y por esta razón se le denomina plásmido Ti. Durante la infección, un segmento móvil del plásmido denominado ADN-T se transfiere al núcleo de la célula vegetal integrándose en el genoma de la planta, dando lugar a la enfermedad mencionada anteriormente como agalla de la corona (Nester y col., 1984; Binns y Thomashow, 1988). El fragmento de ADN-T está flanqueado por repeticiones directas de 25 pb que actúan en cis como una señal para el mecanismo de transferencia. El ADN-T contiene dos tipos de genes: los genes oncogénicos, que codifican para enzimas implicadas en la síntesis de auxinas y citoquininas, que son responsables de la formación del tumor, y los genes que codifican para la síntesis de unos compuestos denominados opinas. Estos compuestos se producen por la condensación de aminoácidos y azúcares, son excretados por las células de la agalla de la corona y finalmente son consumidos por *A. tumefaciens* como fuente de carbono y nitrógeno. Los plásmidos Ti se clasifican en función de las opinas que se producen y se excretan desde el tumor inducido. Fuera del ADN-T, el plásmido Ti también contiene los genes para el catabolismo de las opinas, regiones para la transferencia conjugativa y para su propia integridad y estabilidad (Hooykaas y Schilperoort, 1992; Zupan y Zambrysky, 2000; De la Riva y col., 1998). El proceso de transferencia del ADN-T está mediado por la acción cooperante de proteínas codificadas por genes situados en la región de virulencia del plásmido Ti (genes *vir*) y por genes del cromosoma bacteriano. El proceso de transferencia del ADN-T mediante *A. tumefaciens* implica varios pasos:

- Colonización bacteriana de la célula vegetal
- Inducción del sistema de virulencia de la bacteria
- Generación del complejo de transferencia del ADN-T
- Transferencia del ADN-T
- Integración del ADN-T en el genoma de la planta

Colonización bacteriana de la célula vegetal

La colonización bacteriana de la célula vegetal ocurre cuando *A. tumefaciens* se une a la superficie celular. Hay estudios de mutagénesis que indican que mutantes que

han perdido la capacidad de unión también pierden la capacidad para inducir tumores (Douglas y col., 1982; Thomashow y col., 1987). Se ha propuesto que los polisacáridos de la superficie celular de *A. tumefaciens* juegan un papel importante en el proceso de colonización (Whatley y Spres, 1977; Bradley y col., 1997).

Inducción del sistema de virulencia de la bacteria

La transferencia del ADN-T está mediada por los productos codificados por la región *vir* (30-40 Kb) del plásmido Ti. Esta región está constituida por al menos seis operones esenciales (*vir A*, *vir B*, *vir C*, *vir D*, *vir E*, *vir G*) y dos no esenciales (*vir F* y *vir H*). En su conjunto algunos son esenciales para la transferencia del ADN-T (*vir A*, *vir B*, *vir D* y *vir G*) y otros son responsables de la eficacia de transferencia (*vir C* y *vir E*) (Hooykaas y Schilperoort, 1992; Jeon y col., 1998; Zupan y Zambruski, 2000).

El número de genes por operón difiere de unos operones a otros. Mientras la región del *vir A*, *vir G* y *vir F* tienen un sólo gen; *vir C*, *vir E* y *vir H* tienen dos genes y *vir B* y *vir D* tienen siete y cuatro genes, respectivamente. Los únicos operones constitutivos son *vir A* y *vir G*, que codifican para dos componentes (VirA y VirG) del sistema de activación de la transcripción de los otros genes *vir*. El sistema de dos componentes VirA-VirG tiene similitudes estructurales y funcionales a otros sistemas celulares descritos previamente (Nixon, 1986; Iuchi, 1993).

Vir A es un sensor proteico transmembrana dimérico que detecta moléculas señal, principalmente pequeños componentes fenólicos relacionados con las heridas en las plantas (Pan y col., 1993). Las señales para la activación de VirA tienen pH ácido e incluyen compuestos fenólicos como la acetosiringona (Winans y col., 1992) y ciertas clases de monosacáridos que actúan sinérgicamente con los compuestos fenólicos. La proteína VirA puede diferenciarse estructuralmente en tres dominios: el periplásmico o dominio de entrada y dos dominios de transmembrana denominados TM1 y TM2. Estos dos últimos actúan como un transmisor (emisor) y un receptor (sensor). El dominio periplásmico es importante para la detección de monosacáridos, dentro del cual y adyacente a un dominio de TM2 hay una hélice anfipática, con unas regiones fuertemente hidrofílicas e hidrofóbicas. Esta estructura es característica para otras proteínas sensoras de membrana. De este modo, la alineación y el anclaje a la

membrana celular interna se produce mediante el pliegue de la proteína. El dominio TM2 tiene una actividad quinasa y juega un papel crucial en la activación VirA, fosforilándose a sí misma en un residuo muy conservado de His-474 en respuesta a las señales moleculares procedentes de tejidos vegetales heridos. La detección de monosacáridos por VirA es un sistema importante de amplificación para responder a niveles bajos de compuestos fenólicos. La inducción de este sistema sólo es posible a través del azúcar periplásmico (glucosa/galactosa) uniendo la proteína ChvE la cual interactúa con Vir A (Doty y col., 1996).

Cuando se activa VirA tiene la capacidad para transferir su fosfato a un residuo conservado de aspartato de la proteína citoplasmática de transducción de la señal VirG, que tiene capacidad para unirse al ADN. VirG actúa como un activador transcripcional regulando la expresión de otros genes *vir* cuando ha sido fosforilada por VirA. La región C-terminal es responsable de la unión al ADN, mientras que el dominio N-terminal, que es el lugar donde se produce la fosforilación, tiene homología con el dominio receptor (sensor) de VirA (Pan y col., 1993).

La activación del sistema *vir* depende también de factores externos como la temperatura y el pH. A temperaturas superiores a los 32°C, los genes *vir* no se expresan debido a un cambio conformacional en el plegamiento de VirA induciendo la inactivación de sus propiedades (Jin y col., 1993).

Generación del complejo de transferencia del ADN-T

La activación de los genes *vir* genera la producción de moléculas simplejas del ADN-T. Cualquier ADN colocado entre los bordes del ADN-T será transferido a la célula vegetal como una copia simpleja de ADN y se integrará en su genoma. Las proteínas VirD1 y VirD2 tienen un papel esencial en este paso, al reconocer las secuencias que bordean el ADN-T y cortar los extremos de la hebra simpleja, por su actividad endonucleásica. Tras la rotura, VirD2 permanece unido covalentemente al extremo 5' constituyendo el complejo de transferencia del ADN-T. Se produce además una restauración simultánea de la cadena simpleja en el plásmido, lo cual está evolutivamente relacionado con el proceso de conjugación bacteriana que también incluye la restauración de la copia simpleja (Zupan y Zambryski, 2000).

Cuando se producen mutaciones o deleciones en el borde derecho del ADN-T se pierde casi completamente la capacidad del ADN-T para transferirse, mientras que en el borde izquierdo sólo se produce una bajada en la eficacia de transferencia.

La transferencia del ADN-T. Dos modelos para la translocación del complejo ADN-T-proteína VirD2

El vehículo de transferencia hacia el núcleo de la planta es un complejo que consiste en una cadena simplexa del ADN-T junto con una proteína. Este debe ser translocado al núcleo de la planta pasando a través de membranas, la pared celular de la célula vegetal y espacios celulares. Según el modelo más aceptado el complejo ssADN-T-VirD2 queda envuelto por la proteína VirE2 de 69Kd, que es una proteína de unión a ADN de cadena sencilla. Esto impide el ataque de nucleasas y además estira la cadena ssADN-T, reduciendo el diámetro del complejo a 2nm, haciendo la translocación a través de los canales de la membrana más fácil. VirE2 contiene dos señales de localización nuclear de plantas y VirD2 una. Este hecho indica que ambas proteínas jueguen un papel importante una vez que el complejo está en la célula vegetal para que el complejo sea llevado al núcleo.

Se ha propuesto un modelo alternativo, que propone que el complejo de transferencia se forma por la unión covalente del ADN en su extremo 5' con la proteína VirD2, pero sin ser recubierta por VirE2. Esta proteína se exportaría de forma independiente a la célula vegetal y una vez que el complejo ssADN-T-Vir D2 entra en la célula es cuando es recubierto por VirE2. El operón *virB* está implicado en la formación del canal de unión entre la bacteria y la célula vegetal (De la Riva y col., 1998).

Integración del ADN-T en el genoma de la planta

Dentro de la célula vegetal, el complejo ssADN-T es dirigido hacia el núcleo, tras cruzar la membrana nuclear, mediando las proteínas VirD2 y VirE2, aunque también parece que contribuye la proteína VirF. El complejo ssADN-T unido covalentemente a la proteína VirD2, está recubierto por un gran número de proteínas VirE2 (unas 600 por cada 20 Kb de ADN-T) y cada una de estas proteínas tiene dos dominios de localización nuclear.

El paso final de la transferencia del ADN-T es su integración en el genoma de la planta. No está bien caracterizado el mecanismo implicado. Se cree que ocurre por recombinación ilegítima. Según este modelo, se necesita un apareamiento de pocas bases, para un pre-anillamiento entre el ADN-T acoplado a VirD2 y el ADN de la planta, mediante un mecanismo de reconocimiento conocido como microhomología. Posteriormente se produce el corte y desplazamiento de una de las cadenas del ADN de la planta. Luego se elimina la otra cadena y la activación de los sistemas de reparación dan lugar a una hebra complementaria a la del ADN-T (Tinland y col., 1995).

Los resultados iniciales de los estudios del proceso de transferencia del ADN-T a las células vegetales demostraron que hay tres hechos importantes para el uso práctico de este proceso en la transformación de las plantas. Primero, se ha de formar el tumor, como un proceso de transformación de la célula vegetal resultante de la transferencia e integración del ADN-T y la posterior expresión de los genes del ADN-T. Segundo, los genes de ADN-T se han de transcribir sólo en las células de la planta huésped, sin que tengan ningún papel durante el proceso de transferencia. Tercero, cualquier ADN exógeno colocado entre los bordes del ADN-T ha de ser transferido a la célula vegetal, independientemente de su procedencia. Estos tres hechos han permitido la construcción de vectores y de cepas bacterianas de utilidad para la transformación vegetal (De la Riva y col., 1998).

El usar como vector *A. tumefaciens* para la transformación confiere ventajas frente a otras técnicas de liberación directa de ADN, como es una alta frecuencia de integración genómica estable y un único o bajo número de copias del transgén o transgenes intactos (McCormac y col., 1998). Estas características de transformación mediante *Agrobacterium* han hecho que se potencie su aplicación incluso en especies recalcitrantes, utilizándose así en especies de monocotiledóneas como el arroz *Oryza sativa* L. (Hiei y col., 1994), el maíz *Zea mays* L. (Ishida y col., 1996), la cebada *Hordeum vulgare* L. (Tingay y col., 1997), el centeno *Secale cereale* L. (Popelka y col., 2004) y el trigo *Triticum aestivum* L. (Hess y col., 1990; Cheng y col., 1997; McCormac y col., 1998; Amoah y col., 2001; Khanna y Daggard, 2003; Wu y col., 2003; Mitic y col., 2004).

1.2.2. Factores que influyen en la transformación

1.2.2.1. CONDICIONES DE LA PLANTA MADRE DE EMBRIONES

El estado de desarrollo de las plantas productoras de los embriones inmaduros en que se van a realizar los intentos de transformación constituye un factor esencial para determinar el éxito de la operación. De este modo, la concentración de hormonas endógenas en el momento del bombardeo pueden ser crucial a la hora de determinar el potencial de transformación (Hess y Carman, 1998). La concentración de hormonas endógenas a la edad crítica de 70 días puede influenciar el control del ciclo celular, la co-ordinación de la división celular, la replicación del ADN en embriones inmaduros y por tanto la eficiencia de la transformación. La liberación de señales relacionadas con la senescencia en un estadio de desarrollo tardío, como raíces primarias, vástagos primarios y el total de la planta entrando en senescencia, puede contribuir a bloquear estos mecanismos y disminuir la capacidad de las células en embriones inmaduros a integrar los genes foráneos (Pastori y col., 2001).

1.2.2.2. VECTORES DE EXPRESIÓN GÉNICA: IMPORTANCIA DEL PROMOTOR

La expresión de un gen foráneo en una célula de la planta está bajo la influencia de varios factores: el sitio de integración de la construcción génica en el genoma de la planta hospedadora, el número de copias de la construcción del gen introducido y las secuencias reguladoras del gen. Es difícil controlar la posición de integración y el número de copias en los estudios de transformación (McElroy y Brettell, 1994).

Se ha conseguido un nivel alto de expresión de transgenes en células de trigo gracias al aislamiento de promotores de genes de monocotiledóneas (Vasil y col., 1993), como el promotor de la actina del arroz (Act-1) (McElroy y col., 1991) y el promotor de la ubiquitina del maíz (Ubi-1) (Christensen y col., 1992; McElroy y Brettell, 1994), siendo el Ubi-1 más potente que el Act-I cuando se compararon directamente (Cornejo y col., 1993).

Los promotores de la actina del arroz (Act-1) y el de la ubiquitina del maíz (Ubi-1) se han estudiado como una alternativa potencialmente útil en los métodos de transformación, respecto a las secuencias promotoras 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y de la alcohol deshidrogenasa (Adh1), debido a su implicación en procesos fundamentales en todos los tipos celulares. Aunque el promotor 35S del

CaMV ha sido ampliamente utilizado y es funcional al introducirse en células de monocotiledóneas, su actividad es sustancialmente menor que en células de dicotiledóneas y es inactivo en algunos tipos celulares como el polen. El promotor Adh1 ha sido también usado en los estudios de transformación de monocotiledóneas, pero su actividad se restringe a raíz, zonas meristemáticas del tallo, endospermo y polen (Christensen y Quail, 1996).

El promotor Ubi-1 ha sido fusionado a un gran rango de genes marcadores, habiéndose usado estas construcciones tanto en expresión transitoria como estable para los estudios de transformación en cereales (Christensen y col., 1992; Christensen y Quail, 1996).

1.2.2.3. PARÁMETROS EMPLEADOS EN BIOLÍSTICA

El bombardeo de partículas para la obtención de plantas transgénicas requiere el desarrollo y la optimización de numerosas variables, de las que las más importantes son los parámetros físicos implicados en el proceso de bombardeo y los requerimientos biológicos de los tejidos de la planta previos y tras la inserción del transgén. Un paso previo a la obtención de una planta transgénica es la puesta a punto de la expresión transitoria de un gen delator en las células diana, disponiendo así de un procedimiento adecuado para la introducción de un gen donde las células no quedan dañadas en exceso (Nehra y col., 1994; Becker y col., 1994; Rasco Gaunt y col., 2001; Huber y col., 2002; Rubio y col., 2004). Para optimizar los parámetros del proceso de bombardeo se utilizan los niveles de expresión del gen *uidA* (Rasco Gaunt y col. 1999; Taylor y Fauquet, 2002), siendo los siguientes los que se podrían considerar más importantes:

- Preparación de los microproyectiles.
- Parámetros físicos en el bombardeo de los microproyectiles.
- Parámetros del cultivo de tejidos.

En la tabla 1.1 se resumen los distintos parámetros y condiciones ensayadas por Rasco Gaunt y col. (1999).

Tabla 1.1.- Parámetros empleados en el bombardeo de partículas independientemente de sus efectos en la liberación del ADN dentro del trigo (Rasco Gaunt y col., 1999)

PARÁMETROS	CONDICIONES PROBADAS
A. ADN/precipitación del oro	
1. Cantidad de ADN plasmídico (µg)	0,5; 2,5; 5 ^{a,b} ; 10; 20
2. Concentración final de CaCl ₂ (M)	0; 0,2; 0,6; 1 ^{a,b} ; 1,5; 2
3. Concentración final de espermidina (mM)	0, 8, 16 ^{a,b} , 81
4. Fuentes alternativas de iones para precipitación (1M concentración final)	MgCl ₂ pH 5,5; CaCl ₂ pH 5,5; CaCl ₂ pH10; Ca(NO ₃) ₂ pH 10
5. Componentes adicionales a la mezcla	0,7% PEG MW 1500, 22 % glicerol
6. Cantidad de partículas de oro (mg)	0,25; 0,5; 1 ^b ; 2 ^a ; 4
7. Distintas fuentes y tamaños de las partículas de oro	Heraeus (0,4-1,2 µm) ^a , Bio-Rad (1,0 µm), Bio-Rad submicron (0,6 µm) ^b
B. Parámetros de bombardeo	
1. Cantidad de ADN por bombardeo (ng) (ver A.1)	29, 147, 294 ^{a,b} , 588, 1176
2. Cantidad de oro en el macroproyectil por bombardeo (µg) (ver A.6)	15, 29, 59 ^b , 118 ^a , 235
3. Presión de disparo (psi)	650 ^b , 900, 1100 ^a , 1300, 1550
4. Presión vacío en la cámara (inches Hg)	5, 10, 15, 20, 27 ^a , 28 ^b
5. Distancia de bombardeo	
Distancia entre el disco de ruptura y el macroproyectil (cm)	2,5 ^{a,b} , 5,5; 8,5
Distancia entre la rejilla y las células diana (cm)	5,5 ^{a,b} , 8,5; 11,5
Distancia de vuelo del macroproyectil hasta la rejilla de parada) (cm)	0,8 ^{a,b}
6. Número de bombardeos	1 ^{a,b} , 2, 3
C. Parámetros del cultivo de tejidos	
1. Tipo de explantes	Escutelos ^{a,b} , inflorescencias ^{a,b}
2. Condiciones osmóticas de los explantes	Escutelos (3 ^a , 6, 9% ^b sacarosa) Inflorescencias (3 ^a , 6, 9% maltosa)

^aCondiciones en procedimientos estándar para variedades modelo de trigo (Barceló y Lazzeri 1995)

^bCondiciones en proceso de optimización para variedades elite de trigo (Rasco Gaunt y col., 1999)

1.2.2.3.1. Preparación de los microproyectiles

La precipitación del ADN sobre partículas de oro u otro metal pesado constituye el primer paso a llevar a cabo. El éxito de la precipitación del ADN determinará la cantidad potencial de ADN que se podrá liberar dentro de la célula.

Se ha de tener en cuenta la cantidad de ADN plasmídico, aunque no se han visto diferencias significativas en los niveles de expresión GUS en embriones de trigo al precipitar 2,5; 5; 10 o 20 µg de ADN con 2 mg de partículas de oro (Rasco Gaunt y col., 1999).

También es necesario controlar la concentración de CaCl₂ y espermidina. El CaCl₂ es imprescindible para la precipitación del ADN y en su ausencia se pierde la mayoría del ADN en los múltiples lavados. Rasco Gaunt y col. (1999) consideraron un rango óptimo de CaCl₂ entre 1,2-1,5 M ya que una concentración 2,0 M provoca una disminución de la expresión la transitoria del gen *uidA*. La espermidina es una

poliamina necesaria para la precipitación del ADN con el oro y evitar la pérdida del ADN en los distintos lavados. Rasco Gaunt y col. (1999) encontraron que los niveles óptimos de espermidina para trigos *elite* fueron entre 8 y 16 mM. Otros autores como Vasil (1993) obtuvieron mayor expresión GUS con niveles entre 100 y 500 mM en embriones de mijo, *Setaria italica* (L.) Beauv.

También es importante minimizar la cantidad de partículas de oro para reducir el daño en los tejidos diana. Rasco Gaunt y col. (1999) observaron que aquellos tejidos bombardeados con menor cantidad de oro y presión de aceleración mostraron mejor regeneración de raíces que aquellos bombardeados con gran cantidad de partículas y alta presión, demostrando que 59 µg/bombardeo eran los que daban los mejores resultados de expresión transitoria del gen *uidA*.

También tienen importancia los distintos tipos y tamaños de partículas de oro, que muestran cierta variación entre las que ofrecen diferentes firmas comerciales. De este modo, las de 1,0 µm por unidad de peso comercializadas por Bio-Rad llevan menor cantidad de ADN que las de la firma Heraeus, entre 0,4 a 1,2 µm, o las partículas de 0,6 µm de Bio-Rad. Esto puede ser debido a la menor superficie total del área para la precipitación del ADN que presentan las partículas más grandes o por las características de la superficie de las partículas. Aunque no se han observado diferencias significativas en la expresión transitoria GUS al comparar los tres tipos, sí se ha observado que la agregación de las partículas de 0,6 µm durante la precipitación es mucho menor que entre partículas mayores, consiguiendo así minimizar los daños en los tejidos (Rasco Gaunt y col., 1999).

1.2.2.3.2. Parámetros físicos en el bombardeo de partículas

Un primer aspecto de interés es el de la presión de aceleración y disco de ruptura. La aceleración de las partículas no sólo es importante por el efecto producido a la hora de penetrar en las células sino también por la distribución de las mismas. No se han encontrado diferencias significativas en la expresión de GUS en un rango de presiones entre 650-1.100 psi. Gracias a los análisis microscópicos se ha comprobado que presiones más bajas consiguen una distribución más homogénea y una densidad relativamente menor de las partículas, reduciendo el impacto del bombardeo y el daño al tejido (Rasco Gaunt y col., 1999). Se han conseguido plantas transgénicas a

partir de embriones inmaduros de trigo o de cebada, empleando presiones entre 1.100 y 1.200 psi, mientras que con presiones superiores a estos valores o no se han obtenido resultados o éstos han sido muy bajos (Koprek y col., 1996; Rasco-Gaunt y col., 2000; Manoharan y Dahleen, 2002).

Otro aspecto a contemplar es el de la presión de vacío, que debe ser superior a 27 o 28 pulgadas para que las partículas alcancen el tejido diana.

Respecto a la *distancia de bombardeo*, hay tres distancias modificables en el sistema PDS-100 He Biolystic de Bio-Rad. La distancia entre el disco de ruptura y el macroproyectil, la distancia de vuelo del macroproyectil hasta la rejilla de parada y la distancia al tejido diana (entre la rejilla y el plato donde se encuentra situada la diana). Los diferentes resultados ensayados en distintos materiales hacen que las distancias óptimas sean objeto de múltiples pruebas para fijar las condiciones para cada tipo de material.

1.2.2.3.3. Parámetros del cultivo de tejidos

En 1995 Zhou y col. usaron por primera vez los *tratamientos osmóticos* (plasmólisis) con manitol, unas 4 a 6 horas antes del bombardeo, para embriones inmaduros de trigo. Estos tratamientos fueron optimizados por Altpeter y col. (1996a) para la variedad 'Bobwhite'. Las frecuencias más altas de regeneración (8,2 raíces por callos) y los rendimientos de la transformación (0,6%) se obtuvieron con pretratamientos de 4 a 6 horas antes del bombardeo y 16 horas después del mismo en medios con manitol 0,4 M (Huber y col., 2002). Los efectos de condiciones osmóticas durante cortos períodos de tiempo antes y/o después del bombardeo consiguen minimizar la pérdida del líquido citoplasmático de las células diana. Los compuestos osmóticos como el manitol, el sorbitol y el PEG, o combinaciones entre ellos, se usan en rangos de 0,25 a 0,5 M (Perl y col., 1992; Zhou y col., 1995; Altpeter y col., 1996; Ortiz y col., 1996).

1.2.2.4. PARÁMETROS EMPLEADOS EN LA TRANSFORMACIÓN MENDIANTE *A. TUMEFACIENS*

Se están realizando actualmente importantes esfuerzos para obtener plantas de trigo transgénicas utilizando *A. tumefaciens*, debido a las ventajas potenciales que ofrece por el bajo número de copias que se integran, el menor número de reordenaciones y la mejor estabilidad génica obtenida (Smith y Hood, 1995; Dai y col., 2001), respecto a los métodos de transformación directa. Sin embargo, aún son pocos los trabajos en los que se informa de la obtención de plantas transgénicas adultas que contengan y expresen el gen de interés que se ha introducido y que puedan integrarse en programas de mejora de esta especie (Cheng y col., 1997; Amoah y col., 2001; Hu y col., 2003; Wu y col., 2003). El desarrollo de un protocolo de transformación mediante *Agrobacterium*, en una especie como es el trigo blando, requiere la identificación y optimización de los factores que afectan a la liberación del ADN-T y la regeneración de la planta. Entre estos se encuentran el tipo de explante que se emplea en la transformación, la utilización y tiempo de precultivo del explante, el tipo de inoculación, el tiempo de co-cultivo con *A. tumefaciens*, presencia de compuestos como la acetosiringona, la concentración de Silwett-77 y la continuidad y concentración del agente de selección.

Los explantes que han dado los mejores resultados de transformación por este método en el trigo han sido los embriones inmaduros de pequeño tamaño (Wu y col., 2003). Los intentos con otros explantes no produjeron plantas estables y fértiles, como es el caso de los callos embriogénicos (McCormac y col., 1998), callos maduros (Xia y col., 1999), suspensiones celulares (Weir y col., 2001) e inflorescencias inmaduras (Amoah y col., 2001).

Se ha utilizado la expresión del gen delator *uidA* como un indicador de la liberación del ADN-T dentro de los embriones inmaduros (Wu y col., 2003). Wu y col. (2003), a la vista de la regeneración y eficiencia de la transformación de los embriones, estudiaron la importancia del tamaño de éstos para su transformación con *Agrobacterium*, coincidiendo con los resultados de biolística obtenidos por Rasco-Gaunt y col. (2001). Demostraron que los embriones de 0,5-1,5 mm de tamaño son más embriogénicos, regeneran mayor número de raíces y tienen un porcentaje mayor de expresión transitoria, consiguiéndose un mayor número de plantas transgénicas de trigo.

Los compuestos fenólicos, como la acetosiringona, actúan como inductores, que junto con una temperatura y un ambiente ácido adecuado promueve la expresión de los genes *vir* de *Agrobacterium*, cuyos productos median en la liberación del ADN-T. En muchos trabajos se ha demostrado que la adición de acetosiringona durante el precultivo y co-cultivo aumenta el número de células transformadas en los tejidos diana. Esto ha sido evidenciado en la zanahoria, *Daucus carota* L. (Guivarch y col., 1993), el manzano, *Pyrus malus* L. (James y col., 1993), el tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill. (Joao y Brown, 1993) y el trigo blando (Weir y col. 2001, Wu y col. 2003). Wu y col. (2003) concluyeron que una concentración de 200 μ M de acetosiringona en el medio daba lugar a una liberación mejor del ADN-T, sin pérdida del potencial de regeneración de los embriones inmaduros en las cuatro variedades de trigo hexaploide que estudiaron.

Se ha comprobado que el surfactante Silwet L-77 mejora la eficiencia de transformación con *Agrobacterium* en la inoculación de flores de *Arabidopsis* (Clough y Bent, 1998) y en embriones inmaduros de la variedad de trigo blando 'Bobwhite' (Cheng y col. 1997). Tanto los trabajos de Cheng y col. (1997), como los de Wu y col. (2003) demostraron que concentraciones de Silwet L-77, en un rango de 0,01-0,5%, daban lugar a una mayor expresión del gen *uidA* en embriones inmaduros de trigo, manteniendo la capacidad de las células para sobrevivir y formar callos y llegaron a la conclusión de que la concentración óptima de Silwet L-77 es 0,01%.

Otro factor que influye en la transformación de trigo mediante *Agrobacterium* es el tiempo de precultivo de los explantes (embriones inmaduros) antes de ser inoculados con *Agrobacterium*. Wu y col. (2003) y Cheng y col. (1997) coincidieron en que el aumento del tiempo de pre-cultivo disminuye la supervivencia y la expresión del gen *uidA*. Sin embargo, Weir y col. (2001) informaron que sería necesario un mínimo de 3 días de precultivo para ver expresión transitoria de GFP en embriones inmaduros.

Finalmente, hay estudios que demuestran la capacidad de diferentes vectores para introducir el ADN-T dentro de tejidos usando las mismas cepas de *Agrobacterium* (Amoah y col., 2001). Los mecanismos de liberación del ADN-T en la planta pueden estar afectados por el tamaño y/u organización de la región del ADN-T (Steck, 1997), obteniéndose formas de cadena doble o simple, lo cual podría

tener efectos en la movilización y liberación del ADN-T dentro de los tejidos de la planta.

1.2.2.5. MARCADORES PARA LA SELECCIÓN DE LA PLANTA

En cereales, las células meristemáticas competentes para la regeneración y transformación son muy pocas y a menudo restringidas a ciertas áreas localizadas de los tejidos dianas. Así, en un buen sistema de selección, además de un alto nivel de expresión de los genes marcadores para la selección, es necesario que las plantas adultas transgénicas procedan de la regeneración de unas pocas células transformadas. Los marcadores seleccionables a menudo son genes que confieren resistencia a antibióticos ó herbicidas. En monocotiledóneas se utilizan genes que confieren resistencia a la kanamicina, geneticina e higromicina para la selección. La kanamicina no ha resultado ser efectiva para la selección de células de trigo transformadas debido a dos razones. En primer lugar, las células y tejidos del trigo tienen un alto nivel de tolerancia endógena a la kanamicina y, en segundo lugar, este antibiótico interfiere en la regeneración de células transformadas (Nehra y col., 1994). Sin embargo, se ha empleado con éxito en la producción de plantas de trigo transgénico la geneticina (G418), otro miembro del grupo de antibióticos de los aminoglicósidos (Nehra y col., 1994). Hauptmann y col. en 1988 propusieron la higromicina como el agente selectivo de mayor efectividad en cereales. Sin embargo, este agente induce la formación de raíces cuando se emplea a baja concentración e interfiere en el crecimiento a alta concentración. Como alternativa a los antibióticos, en muchos protocolos para la transformación del trigo se ha utilizado con éxito el herbicida Bialaphos™ o Basta™ y su agente activo L-fosfotricina (L-PPT). La fosfotricina actúa como un inhibidor irreversible de la glutamina sintetasa, una enzima clave para la asimilación del amonio y el metabolismo del nitrógeno en plantas (Deblock y col., 1987). Cuando el PPT inhibe a la glutamina sintetasa se produce un aumento de los niveles de amonio que es tóxico para las células de la planta (Tachibana y col., 1986). Se han empleado distintos microorganismos del suelo para aislar dos genes, *bar* (resistencia a Basta) (Murakami y col., 1986; Thompson y col., 1987) y *pat* (Wohlleben y col., 1988), que codifican para la enzima fosfotricina acetil transferasa (PAT). Esta enzima convierte el PPT en su forma acetilada no tóxica y permite el crecimiento de células transformadas en la presencia

de PPT o glufosinato amónico comercial en los cuales se basan los herbicidas conocidos como Basta™, Bialaphos™, Challenge™, Finale™ y todo el rango de Liberty-Link™ (Jones, 2005).

1.2.2.6. REGENERACIÓN DE LA PLANTA

La regeneración de plantas a partir de las células meristemáticas es un requerimiento esencial para el desarrollo de un método eficaz de transformación. Para la transformación genética de cereales se han utilizado tejidos diploides como los embriones inmaduros (Christou y col., 1990; Vasil y col., 1993; Weeks y col., 1993; Becker y col., 1994; Altpeter y col., 1996a, 1996b; Koprek y col., 1996; Barro y col., 1997; He y col., 1998; Rasco-Gaunt y col., 1999, 2001; Pastori y col., 2001; Huber y col., 2002; Manoharan y Dahleen, 2002). También se han utilizado en experimentos de transformación células o tejidos haploides como microsporas, polen maduro y cultivos de tejidos derivados de microsporas, que pueden servir para conseguir la homocigosis del transgén introducido por duplicación cromosómica (Rubio y col., 2004). Sin embargo, los principales problemas que plantea el cultivo de anteras y microsporas en trigo son la baja frecuencia de regeneración y la aparición de una alta frecuencia de plantas albinas entre las regenerantes.

Se ha investigado la regeneración de plantas en trigo a partir de diferentes tipos de explantes vía organogénesis y embriogénesis somática (Nehra y col., 1995). De esta manera, los embriones cigóticos inmaduros y los segmentos de inflorescencias han resultado ser los explantes de mayor respuesta para la iniciación de los callos embriogénicos y regeneración de la planta. Sin embargo, el éxito en la regeneración de la planta es a menudo dependiente de un proceso subjetivo de identificación, selección y mantenimiento de los callos embriogénicos (Redway y col., 1990a y b). Los procesos de regeneración a partir de embriones cigóticos inmaduros son bastante lentos y a menudo complicados por la germinación precoz de los ejes embrionarios. Se han realizado estudios donde los ejes embrionarios se han separado mecánicamente del tejido escutelar, consiguiendo aumentar la regeneración de varios genotipos de trigo (Nehra y col., 1994). El sistema ensayado por Nehra y col. (1994) fue tan rápido que en dos o tres semanas se obtenía una embriogénesis somática del 80-100% con 10-15 embriones somáticos por explante. Estudios

histológicos revelaron que los distintos embriones somáticos se desarrollaron a partir de células epidérmicas únicas del escutelo.

1.2.2.7. SILENCIAMIENTO

La eficiencia de la transformación vegetal depende de la expresión estable y predecible de los genes introducidos. El mayor obstáculo para los cultivos genéticamente modificados parece ser el silenciamiento de los genes introducidos (Muller y col., 1996; Demeke y col., 1999; Álvarez y col., 2000). Mientras que el silenciamiento de los transgenes en plantas dicotiledóneas ha sido estudiado ampliamente, no es muy conocido en monocotiledóneas, aunque se sabe que ocurre tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Iyer y col., 2000; Hueros y Jouve, 2002).

El silenciamiento de genes foráneos después de la integración dentro del genoma al cabo de unas pocas generaciones, ilustra los mecanismos de defensa propios de plantas contra los mecanismos de invasión y de expresión de ADN extraño. Así, la sobreexpresión de genes homólogos en plantas transgénicas a menudo se dirige al silenciamiento, dependiente de la homología tanto del gen endógeno como de los transgenes (Anand y col., 2003). También se relaciona a menudo la expresión del gen de manera no estable con la integración de múltiples copias del transgén (Muller y col., 1996), o se achaca a efectos de posición, o de la extensión de la metilación en la región en la que se ha integrado el transgén (Srivastava y col., 1996). La metilación del ADN está implicada en el establecimiento y mantenimiento del estado inactivo de los genes al impedir el acceso de la maquinaria de transcripción (Razin, 1998), por falta de unión de los factores transcripcionales a las regiones reguladoras (Kass y col., 1997).

Anand y col., (2003) estudiaron patrones de metilación del ADN usando dos líneas transgénicas diferentes, pero provenientes del mismo callo, que se suponían genéticamente idénticas pero diferentes en la expresión de los transgenes. El análisis reveló que a mayor grado de metilación en las secuencias CCGG se produce una menor expresión del transgén. Medidas de ARN por RT-PCR indicaron que el silenciamiento del gen es más probable a nivel transcripcional. De este modo ni en arroz ni en trigo se pudo revertir el silenciamiento transcripcional del transgén,

asociado a la potente metilación de las secuencias CCGG del promotor de la ubiquitina, mediante la aplicación de azaC (azacitidina).

En el silenciamiento de los transgenes parece que el promotor juega un papel importante. El promotor Ubi-1 no es inmune al silenciamiento de genes en trigo transgénico aunque lo es en menor frecuencia que el promotor 35S del CaMV (Chen y col., 1998, 1999).

1.3. LA ANDROGÉNESIS, IMPORTANCIA E INTENCIÓN DE UTILIZARLA PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS. MATERIAL HAPLOIDE.

La androgénesis consiste en la obtención de formas vegetales por regeneración a partir de microsporas (aisladas o no de las anteras) durante las fases tempranas de maduración del polen. El cultivo de anteras o de microsporas induce la formación de embriones haploides, también llamados embrioides. El posterior desarrollo de éstos, normalmente en un medio secundario, induce la producción de una plántula de dotación cromosómica haploide. Si estas plántulas se someten a una duplicación cromosómica se produce la fijación en homocigosis de la combinación genotípica completa de que era portadora la microspora de la cual procede la planta androgenética. Mediante este procedimiento, se puede inducir la fijación en homocigosis de plantas androgenéticas diferentes si la planta madre estaba segregando para diversos genes. Esta metodología puede resultar de utilidad cuando se aplica a materiales segregantes procedentes de cruzamientos realizados con fines de mejora para reunir genes de diferentes variedades. Esto supone una ventaja considerable de tiempo respecto a la obtención de formas homocigotas por autofecundaciones sucesivas de los procedimientos de mejora por la vía sexual normal (González y col., 1997, 2000).

Normalmente para la obtención de plantas transgénicas se parte de células diploides que tras la incorporación del gen o genes de interés, son capaces de regenerar una planta adulta y fértil. Sin embargo, no es posible controlar ni el lugar de inserción ni el número de copias que se insertan. De ahí que, en la progenie de la planta transgénica, haya descendientes que no porten el gen introducido y otros que resulten portadores de un número variable de copias. Una alternativa que evita esta

segregación, es la utilización de células haploides como diana para la introducción del gen de interés. A partir de estas células es posible regenerar una planta haploide que tras la duplicación de sus cromosomas daría lugar a una planta haploide duplicada y por tanto homocigota para todos sus genes (Rubio y col., 2004).

1.4. PROTEÍNAS DE RESERVA DEL ENDOSPERMO DEL GRANO DE TRIGO. ALELOS IMPLICADOS EN LA CALIDAD HARINO-PANADERA.

Las proteínas del endospermo constituyen el grupo de proteínas más estudiadas, desde que en 1745 Beccari describió el gluten. En 1810 Taddei denominó gliadinas a la fracción de proteínas del gluten solubles en alcohol y gluteninas a las fracciones insolubles en alcohol. La clasificación más antigua de las proteínas del trigo se basa en las propiedades de dilución en diferentes solventes (Osborne, 1907). Desde entonces se mantiene dicha clasificación (Bushuk y Wrigley, 1974). Los dos grupos mayoritarios de proteínas del endospermo del trigo son las gluteninas y las gliadinas, que en conjunto han sido denominadas prolaminas por su elevado contenido en prolina y glutamina (Shewry y col., 1986) y suponen alrededor del 80% de las proteínas totales del grano. Ambos tipos de proteínas son pobres en aminoácidos ionizables y en lisina. Se sintetizan en el retículo endoplasmático en las últimas etapas de maduración del grano y se depositan en el citoplasma en forma de "cuerpos proteicos", para su movilización y utilización durante la germinación como principal reserva de nitrógeno (Shewry y Mifflin, 1985).

En trigo y centeno se han localizado diferentes loci en los cromosomas de los grupos de homeología 1 y 6, que codifican estos tipos de proteínas. Las gluteninas están compuestas por complejos heterogéneos de carácter polimérico los cuales están formados por unas 25 subunidades diferentes, que se asocian por medio de puentes disulfuro e interacciones hidrofóbicas (Payne y col., 1981). Tienen una gran importancia en la determinación de las propiedades de elasticidad de la masa en el proceso de la panificación (Mifflin y col., 1983). El tratamiento de estas proteínas con agentes reductores, como el β -mercaptoetanol produce la disociación de las subunidades en componentes elementales que pueden separarse mediante SDS-PAGE en dos grupos: uno de alto peso molecular (HMW) y otro de bajo peso molecular (LMW) (Payne y Corfield, 1979). Las gluteninas HMW tienen unos pesos

moleculares de unos 90 a 150 kDa, y los genes que las codifican se han localizado en el brazo largo del grupo de homeología 1 en el trigo. Los loci de los cromosomas 1A, 1B y 1D son responsables de las gluteninas HMW *Glu-A1*, *Glu-B1* y *Glu-D1*, respectivamente. Existe una gran diversidad alélica, de la que dependen diferentes combinaciones de subunidades peptídicas, de las que a su vez depende la calidad harino-panadera de los diferentes cultivares (Carrillo y col., 1988, 1990; Peña, 2004; Peña y col., 2005).

Cada locus de las gluteninas HMW contiene dos genes estrechamente ligados los cuales codifican para dos polipéptidos: x e y (Payne y col., 1981), siendo las y las más pequeñas y por tanto las de mayor movilidad electroforética. Están presentes en los cromosomas 1A, 1B y 1D de trigo hexaploide. Por lo tanto, esta especie tiene 6 genes de gluteninas HMW, pero sólo dan lugar a 3, 4 o 5 subunidades. El gen *Glu-A1y* está silenciado en todas las variedades de trigo panadero (Altpeter y col., 1996). La mayoría de las variedades de trigo tienen de 3 a 5 subunidades entre los dos tipos, distribuidas de diferente manera: 1 o ninguna de tipo x codificadas por el locus *Glu-A1*, 1 de tipo x o 2 de ambos tipos codificadas por el locus *Glu-B1* y 2 de ambos tipos codificadas por el locus *Glu-D1* (Werner y col., 1992). Así un buen amasado está asociado a la presencia de los alelos activos *Glu-A1x* (1 ó 2*) y la de los alelos *Glu-D1x5* y *Glu-D1y10*, teniendo como antagónicos el alelo nulo de *Glu-A1x* y los alelos *Glu-D1x2* y *Glu-D1y12* (Payne, 1987; Randall y col., 1993).

También se han identificado genes que modifican la expresión de las gluteninas HMW, localizados en brazos cromosómicos específicos (Wanous y col., 2003). Desde que Payne (1987) determinara que la presencia o ausencia de determinadas subunidades de las gluteninas HMW están correlacionadas con las diferencias en la calidad del amasado en trigos europeos, se han llevado a cabo estudios a escala molecular para comprender las propiedades viscoelásticas del gluten, enfocados principalmente al conocimiento de la intervención de las gluteninas HMW en la red del gluten (Shewry y col., 2001; Peña y col., 2005).

Las gluteninas LMW se subdividen en dos grupos denominados B y C, de menor y mayor movilidad electroforética respectivamente (Jackson y col., 1983). El otro gran componente de las proteínas de reserva del endospermo son las gliadinas, cuya importancia se ha asociado más a la extensibilidad que a la elasticidad de la masa del gluten durante la panificación (Hoseney, 1985). La cantidad relativa de los

tipos de proteínas monoméricas, las gliadinas y las gluteninas LMW frente a las gluteninas HMW, intervienen de forma decisiva en las propiedades reológicas de la harina del trigo, al actuar como solventes durante la formación de la red del gluten durante la panificación (Peña y col., 2005).

Los genes de gluteninas *Glu-D1x5* y *Glu-D1y10* son conocidos como los principales determinantes de la extensibilidad y elasticidad del gluten (Shewry y col., 1992). Los polímeros de las gluteninas de HMW junto con las subunidades de bajo peso molecular LMW, dan a la harina de trigo su superioridad para hacer pan, pasta y otros productos alimenticios (Altpeter y col., 2004). Mientras que las gluteninas son sólo el 5-10% del total de las proteínas del trigo, diferencias en pares alélicos pueden dar cuenta de más de un 50% de variación en la calidad harino-panadera del trigo (Payne y col., 1987; De Bustos y col., 2000). Un análisis de buenos cultivares comercializados confirmó que la subunidad *Glu-D1x5*, que tiene un residuo adicional de cisteína, es uno de los componentes más importantes de la alta calidad del trigo (Wieser y Zimmermann, 2000).

En los últimos años se están realizando trabajos con el objetivo de mejorar la calidad harino-panadera del trigo mediante transformación, en algunos casos dirigida a la expresión estable de gluteninas transgénicas (Altpeter y col., 1996b; Blech y Anderson, 1996) cuyas propiedades funcionales se ven mejoradas tanto en condiciones de invernadero (Barro y col., 1997) como de campo (Vasil y col., 2001). De este modo, se ha estudiado el efecto de los transgenes que codifican para las subunidades *Glu-A1x1* y *Glu-D1x5* en dos líneas de trigo casi-isogénicas que se diferenciaban en su composición de las subunidades de HMW y las propiedades de mezcla. Se obtuvo sobre-expresión de las subunidades codificadas por los transgenes en las líneas transformadas. La sobreexpresión de *Glu-A1x1* y *Glu-D1x5* modificó la agregación de las gluteninas, pero las propiedades de las gluteninas estuvieron más afectadas por la expresión del transgén *Glu-D1x5*, que dio lugar al aumento de enlaces cruzados para la formación de los agregados de polímeros entre las gluteninas. Se apreció un efecto en el comportamiento reológico, consistente en la elevación de la fuerza del gluten de la harina del trigo transformado con *Glu-D1x5* (Popineau y col., 2001).

Blech y Anderson (1996) demostraron que el promotor de un gen de gluteninas de HMW puede usarse para obtener niveles de expresión altos, para el

almacenamiento de gluteninas en semilla y potencialmente de otras proteínas en endospermos de trigo transgénico. Para ello, crearon una nueva subunidad híbrida x5-y10 bajo el control de las secuencias reguladoras originales de las gluteninas HMW y lo introdujeron en trigo. Identificaron 26 líneas transgénicas independientes que seleccionaron mediante el herbicida Bialaphos™. Dieciocho de ellas expresaron el transgén en sus semillas. La subunidad híbrida acumuló niveles comparables a los obtenidos con las gluteninas HMW nativas. La expresión del transgén fue estable durante al menos tres generaciones en la mayoría de las líneas.

Altpeter y col., (1996) consideraron que la calidad de los trigos cultivados depende del número y composición de las gluteninas HMW presentes, e introdujeron el gen de las gluteninas HMW *Glu-A1x1*, que se asocia a buena calidad harinopanadera (Payne, 1987). Llevaron a cabo la transformación de embriones inmaduros del cultivar de trigo blando 'Bobwhite' mediante biolística, que tiene en su endospermo los cinco genes de gluteninas *Glu-A1x2**, *Glu-B1x7*, *Glu-B1y9*, *Glu-D1x5* y *Glu-D1y10* pero no el *Glu-A1x1*. De las 21 líneas independientes transformadas y seleccionadas que obtuvieron, 20 expresaron el gen selectivo *bar* y 9 el gen *Glu-A1x1*. La cantidad de proteína HMW *Glu-A1x1* producida en las líneas transgénicas varió desde 0,6 % a 2,3% del total de proteínas, dando lugar a un aumento de hasta un 71% en el total de proteínas HMW. Las plantas transgénicas fueron normales, fértiles y mostraron segregación mendeliana de los transgenes. La acumulación de la glutenina HMW *Glu-A1x1* fue consistente y estable hasta la tercera generación de autofecundación.

Un resultado frecuente en plantas modificadas genéticamente es el del silenciamiento de los genes endógenos. Las líneas de trigo que presentan deficiencias en la expresión de las gluteninas HMW suponen un material interesante para abordar el estudio de las causas de la alteración de la funcionalidad de los genes implicados. Una causa que a menudo se asocia al silenciamiento es la del elevado número de copias de los transgenes (Uthayakumaran y col., 2003). De este modo se ha demostrado el silenciamiento parcial o total de genes de las subunidades de gluteninas HMW después de la transformación de trigo hexaploide con copias apropiadas de la subunidad *Glu-A1x1* (Álvarez y col., 2000). Las líneas nulas o parcialmente nulas ofrecen la oportunidad de investigar la funcionalidad de las

gluteninas HMW, LMW, la importancia de la proporción de gluteninas a gliadinas y el papel de las subunidades de las gluteninas HMW (Uthayakumaran y col., 2003).

También se ha conseguido la expresión estable de genes de las subunidades *Glu-D1x5* y *Glu-D1y10* en centeno transgénico, aumentando mucho la fracción polimérica de las gluteninas en harina de centeno (Altpeter y col., 2004). Además se han realizado estudios de las propiedades funcionales y rendimiento agronómico de tritordeum hexaploide (*xTritordeum* Ascherson et Graebner) expresando los genes *Glu-A1x1* y *Glu-D1x5* de las subunidades HMW de las gluteninas (Barro y col., 2003).

1.5. OBJETIVOS.

A la vista de los antecedentes experimentales expuestos y dado que el grupo de investigación, en cuyo marco se ha realizado este trabajo, había desarrollado las técnicas de obtención de haploides duplicados por androgénesis y de plántulas a partir del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros, el siguiente paso debía consistir en su utilización para ensayar su transformación. Por ello en el presente trabajo se plantea la puesta a punto de dos tecnologías de transformación, biolística y agroinfección y el análisis de los parámetros óptimos de su utilización para transformar dos especies de cereales, el trigo común y el triticale. Los objetivos concretos son los siguientes:

1. Construcción de un vector para el análisis de la expresión transitoria del gen *uidA* y de vectores portadores del gen *bar* que confieren resistencia a la fosfotricina junto con los genes de gluteninas HMW para la transformación de trigos y triticales mediante la técnica biolística.

2.- Estudio de la influencia de los parámetros implicados en la transferencia de vectores mediante el análisis de la expresión transitoria del gen *uidA*, introducido por biolística y *Agrobacterium tumefaciens*, en embriones haploides y cigóticos inmaduros de triticale y en embriones cigóticos inmaduros de trigo.

3.- Estudio comparativo de la transformación en triticale, mediante la utilización de embriones haploides y cigóticos inmaduros utilizando ambos métodos de transformación.

4.- Estudio comparativo de la transformación en trigo, mediante la utilización de embriones cigóticos inmaduros utilizando ambos métodos de transformación.

5.- Utilidad del método biolístico para la obtención de plantas transgénicas en trigos comerciales tolerantes a la fosfotricina y portadoras de los alelos de las gluteninas HMW *Glu-D1x5*, *Glu-D1y10* y *Glu-B1x7* que influyen en la calidad harinopañadera.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. MATERIAL VEGETAL.

Los explantes utilizados en los experimentos de transformación proceden de dos variedades comerciales de trigo blando denominadas 'Anza' y 'Craklin'. Así mismo, se han utilizado dos líneas haploides duplicadas de triticale hexaploide, denominadas 'ATOPE-6' y 'ATOPE-22' obtenidas por androgénesis *in vitro* a partir del híbrido intervarietal 'Torote' x 'Presto'. La línea 'ATOPE-22' se caracteriza por la elevada tasa de regeneración de plantas verdes y la línea 'ATOPE-6' por sus buenos resultados de producción de embriones haploides. Estas líneas fueron obtenidas en la unidad de Genética de la UA (González y col., 1997, 2000, 2002).

Para la construcción de los vectores a utilizar en los experimentos de transformación se utilizaron diversas variedades de trigo común, a partir de cuyo ADN genómico se amplificaron las secuencias de interés. De este modo, se han aislado genes que codifican para subunidades de gluteninas HMW con sus correspondientes promotores. Con una u otra finalidad se han utilizado las siguientes variedades de trigo común: 'Hope', 'Pané-247' y '48-136', la última de las cuales es portadora de la sustitución del brazo corto 1BS por el 1RS de centeno. Estas líneas fueron caracterizadas genéticamente por Rubio (Rubio, 1998; Rubio y col. 1999; De Bustos y col. 2000, 2001).

2.1.1. Obtención de embriones cigóticos inmaduros de trigo y de triticale

Al principio de cada temporada (octubre) se pusieron a germinar semillas pertenecientes a las distintas líneas y variedades de trigo y de triticale en placas de Petri, sobre papel de filtro humedecido. Las plántulas desarrolladas se transplantaron a jarrones y posteriormente a macetas y se mantuvieron en invernadero hasta la floración. Entre 12 y 15 días después de la antesis se extrajeron los granos, se procedió a su desinfección con alcohol al 70% (v/v) durante un minuto y a continuación se mantuvieron en agitación suave en una solución de Domestos™ al 10% (v/v) durante 15 minutos. Después se aclararon 3 o 4 veces con agua destilada estéril.

Se disectaron los granos en condiciones estériles para extraer los embriones inmaduros (entre 0.8 y 1.5 mm de longitud). Para ello se utilizó una lupa binocular, unas pinzas y una aguja enmangada.

2.1.2. Obtención de embriones haploides de triticales por cultivo in vitro de microesporas

Siembra de plantas madre y recolección de espigas

Al principio de cada temporada (octubre) se pusieron a germinar las semillas de las líneas de triticales ‘ATOPE-6’ y ‘ATOPE-22’. Las plántulas desarrolladas se transplantaron a jirafita y después a maceta y se mantuvieron en invernadero hasta la floración.

Durante los meses de abril y mayo se recolectaron espigas que contenían anteras con microsporas en estado uninuclear medio. Para ello se estudió la relación entre el estado citológico de las microesporas y el estado morfológico de las espigas tiñendo las anteras de algunas espigas con carmín acético (2%) y observando al microscopio las microsporas.

Pretratamiento de las espigas

Una vez recolectadas las espigas en el estado de desarrollo adecuado, se guardaron en bolsas de plástico y se sometieron a un pretratamiento a 4°C, en oscuridad durante 15 días.

Desinfección de las espigas y siembra de anteras

Las espigas se desinfectaron en una solución (1:8) de Domestos™ durante 15 minutos después del pretratamiento. La desinfección de las espigas y todas las manipulaciones posteriores se realizaron en una cabina de flujo laminar para garantizar la asepsia de los cultivos. Una vez desinfectadas, las espigas se enjuagaron 3 o 4 veces con agua destilada estéril. A continuación, se llevó a cabo la disección de las espigas sobre un papel de filtro estéril. Se recogieron las tres anteras de cada una de las flores a lo largo de la espiga, se sembraron de 60 a 80 anteras por placa de

Petri en el medio de inducción de embriones haploides (Tablas 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4) y se incubaron en oscuridad a una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 30 días.

Tabla 2.1.- Composición de Macro- y Microelementos utilizados en la preparación de los medios de cultivo (*: Chu y col. 1975; **: Miller, 1963; *: Murashige y Skoog, 1962)**

MACROELEMENTOS	Miller (**) (g/l)	N6(*) (g/l)	MS (***) 20 x (g/l)
KH₂PO₄ (Merck)	6	8	3,4
KNO₃ (SIGMA)	20	56	38
MgSO₄.7H₂O (Panreac)	1,43	3,7	7,4
(NH₄)₂SO₄ (Merck)	-	9,26	
CaCl₂.2H₂O* (Merck)	-	3,32	8
NH₄NO₃ (Merck)	20	-	33
Ca(NO₃).4H₂O (Merck)	10	-	-
KCl (Merck)	1,3	-	-
Todos los componentes se disuelven en H ₂ O ultrapura			

MICROELEMENTOS	Miller (**) (mg/l)	N6 (*) (mg/l)	MS (***) 100x (g/l)	L7 1000x (g/l)
MnSO₄.4H₂O (Merck)	490	440	2,23	15,0
ZnSO₄.7H₂O (Merck)	270	150	0,86	7,5
H₃BO₃ (Merck)	160	160	0,62	5,0
KI (Merck)	75	80	0,083	0,75
CuSO₄. 5H₂O (Merck)	-	-	0,0025	0,025
Na₂MoO₄.2H₂O (Merck)	-	-	0,025	0,25
CoCl₂.6H₂O (Merck)	-	-	0,0025	0,025
Todos los componentes se disuelven en H ₂ O ultrapura				

Tabla 2.2.- Composición de las soluciones stock de vitaminas

COMPONENTES	Solución medio N6 (*) (mg/l)	Solución medio Miller (**) (mg/l)	Solución medio MS (***) (mg/l)
Glicina (SIGMA)	2	1	2
Ácido nicotínico (SIGMA)	0,5	2,5	0,5
Piridoxina (SIGMA)	0,5	5	0,5
Tiamina HCl (SIGMA)	1	0,5	0,1
Inositol (SIGMA)	100	50	100
Todos los componentes se disuelven en H ₂ O ultrapura			

Tabla 2.3.- Composición de la solución stock FeNa-EDTA 10⁻⁴ M

COMPONENTES	Concentración final 200 x (mg/l)
Na ₂ EDTA	37,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Todos los componentes disuelven en H ₂ O ultrapura	

Tabla 2.4.- Composición de los medios de cultivo para androgénesis

MEDIOS	Inducción de embriones (N6)	Germinación de embriones (Miller)	Desarrollo de plántulas (Miller)
COMPONENTES			
Macroelementos	5% (v/v) (N6)	5% (v/v) (Miller)	5% (v/v) (Miller)
Microelementos	1% (v/v) (N6)	1% (v/v) (Miller)	1% (v/v) (Miller)
Fe-EDTA 10 ⁻⁴ M 200x	0,5% (v/v)	0,5 % (v/v)	0,5% (v/v)
Vitaminas	0,2% (v/v) (N6)	0,2% (v/v) (Miller)	0,2% (v/v) (Miller)
Glutamina (Merck)	0,05% (p/v)	0,05 % (p/v)	0,05% (p/v)
Sacarosa (Duchefa)	10% (p/v)	2% (p/v)	2% (p/v)
2,4-D 4,5 M (SIGMA)	0,2% (v/v)	-	-
A.N.A. 1M (SIGMA)	-	-	0,1% (v/v)
Agarosa (Pronadisa)	-	-	0,2% (p/v)
Phytigel (SIGMA)	-	-	0,25% (p/v)
Todos los componentes se disuelven en H ₂ O ultrapura. Ajuste de pH a 5,8 y esterilización en autoclave			

Formación y germinación de los embriones haploides

A partir de los 30 días de cultivo, comenzaron a aparecer en la superficie de las anteras estructuras similares a embriones. Estos embriones haploides fueron recolectados para llevar a cabo diferentes experimentos de transformación mediante *A. tumefaciens* y biolística. Tras los ensayos de transformación los embriones haploides se sembraron en un medio de germinación (Tablas 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4), manteniéndose en una cámara a 22°C, con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los embriones haploides que germinaron dieron lugar a plántulas albinas y verdes. Las plántulas albinas fueron eliminadas y las verdes fueron transplantadas de manera individual cuando alcanzaron un tamaño entre 5 y 8 cm (Tablas 2.1, 2.2, 2.3, 2.5 y 2.8) y seleccionadas con PPT (fosfinotricina) en el medio de cultivo.

Transplante a ji-ffis y tratamiento con colchicina

Las plántulas que sobrevivieron a la selección, se traspasaron a ji-ffis y se mantuvieron en una cámara de cultivo en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Después de un mes del transplante de plántulas a tierra y cuando tenían de 3 a 4 hojas, se procedió a lavar y recortar las raíces. Tras el corte se sumergieron las plántulas en una solución de colchicina al 0,2%, durante 4-5 horas a temperatura ambiente. Después se lavaron con agua abundante y se transplantaron de nuevo a ji-ffis. Transcurrido un mes, las plántulas supervivientes se transplantaron a maceta y se mantuvieron en invernadero hasta la floración. Las espigas de cada planta se cubrieron con bolsas de celofán, cuando aún no habían emergido de la vaina, con el fin de asegurar la autofecundación.

2.2. VECTORES DE TRANSFORMACIÓN.

Para la transformación por biolística, tanto de embriones haploides de triticales como de embriones inmaduros de triticales y trigo, se han diseñado unos vectores específicos para estos materiales, que combinan secuencias procedentes de otros vectores utilizados por otros autores en trabajos previos. En lo que sigue se expone la metodología utilizada para la realización de las construcciones.

2.2.1. Vectores utilizados en el bombardeo de embriones: pAHGUS, pAHDx5-BAR, pAHBx7-BAR y pAHDy10-BAR

2.2.1.1. VECTOR pAHGUS

Para la puesta a punto del método biolístico se utilizó un vector denominado pAHGUS que fue construido siguiendo los siguientes pasos:

-Digestión de los vectores pJIT61 (John Innes Center, Norwich) y Bluescript II (Stratagene) con la enzima *EcoRV* (Amersham) empleando 2 unidades de enzima por cada µg de vector durante al menos 2 horas a 37° C.

-El vector Bluescript II una vez cortado se defosforiló en su extremo 3' con la enzima fosfatasa alcalina (USB-Amersham) durante 1 hora a 37°C para evitar así su cierre. A continuación, se purificó con un volumen de fenol-cloroformo y se centrifugó 3 min a 13.000 rpm. Tras recoger la fase acuosa, se añadió un volumen de cloroformo y se realizó una nueva centrifugación. A continuación se recogió la fase acuosa y se precipitó con 1/10 de volumen de acetato sódico 3M pH 5,2 y dos volúmenes de etanol absoluto frío, manteniéndolo a -80°C durante una hora. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min y a 4° C, se lavó el precipitado con etanol al 70% centrifugando otros 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar al aire. Finalmente el precipitado se resuspendió en agua.

-En el caso del vector pJIT61, el producto de su digestión se mezcló con tampón de carga: azul bromofenol 0,10%, xilen cianol 0,10%, Ficoll 15% (Sambrook y col., 1989) y se separó en un gel de agarosa al 1 % por electroforesis a 5V/cm en tampón TAE. Se empleó el marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen) que contiene fragmentos desde 100 hasta 12.000 pb. El gel se tiñó por inmersión en bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml durante 20 minutos. Se visualizó y fotografió bajo luz ultravioleta usando un sistema de documentación de geles (Gel Doc, Bio Rad) y el fragmento liberado de un tamaño aproximadamente de 2400 pb que contenía el promotor 35 S del CaMV, el gen *uidA* y el terminador 35S se recortó usando un cubreobjetos. Para la extracción del ADN del gel se siguió el protocolo del kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

-La ligación entre el fragmento liberado procedente de pJIT61 y el vector Bluescript II defosforilado y purificado se llevó a cabo a 14°C durante 16-24 horas utilizando una unidad/µl de la enzima T4 ADN ligasa (Invitrogen) y en una

proporción entre ambas moléculas de 3:1. Se realizó una nueva purificación empleando el procedimiento descrito anteriormente y se resuspendió en 10 µl.

- Una vez obtenido, el vector pAHGUS se utilizó para transformar la cepa *Escherichia coli* DH10β mediante electroporación, siguiendo el protocolo y las recomendaciones de uso del aparato de transformación *E.coli* Pulser™ de BIO-RAD. Tras la transformación, las bacterias se resuspendieron en 1 ml de medio LB y se cultivaron durante una hora a 37°C en agitación. A continuación se sembraron aproximadamente 200 µl en una placa de agar/LB con X-gal/IPTG/Ampicilina para seleccionar las bacterias transformadas. Se sembraron muestras de las colonias desarrolladas en 5 ml de LB con 50 µl de ampicilina, a 37°C con agitación durante toda la noche. Se llevó a cabo el aislamiento del ADN plasmídico portador del inserto siguiendo el protocolo del kit QIAprep spin Miniprep (Qiagen).

2.2.1.2. VECTORES PAHDx5-BAR, PAHBx7-BAR Y PAHDy10-BAR

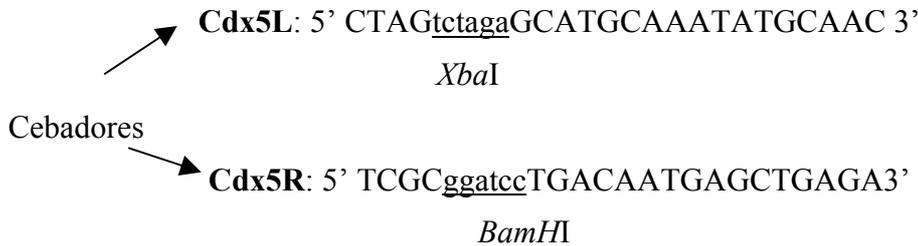
Con el fin de transformar los materiales vegetales objeto de este estudio se obtuvieron una serie de vectores específicos portadores del gen *bar* que confiere resistencia a la fosfotricina más un gen correspondiente a las gluteninas HMW de mayor interés, como son las codificadas por los genes *Glu-B1x7*, *Glu-D1x5* y *Glu-D1x10*.

Para la obtención de los tres vectores se partió del conocimiento de las secuencias de los genes de gluteninas y se procedió a la amplificación a partir de ADN genómico utilizando cebadores que incluyesen el promotor de expresión.

2.2.1.2.1. Obtención del vector pAHDx5-BAR

Se aisló la secuencia del gen *Glu-D1x5* a partir de ADN genómico de la variedad de trigo blando 'Hope' utilizando cebadores que permitieron amplificar este gen junto con una secuencia en la que se incluye su promotor. El tamaño total de este fragmento fue de 4.229 pb. Se diseñaron los cebadores a partir de la secuencia de este gen registrada en la base de datos del EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*), con nº de registro X12928.

Se incluyeron las dianas para las enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI* que se utilizaron para clonar con extremos cohesivos en el vector Bluescript II, como se muestra a continuación:



-La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl en tampón 100mM KCl; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 200mM Tris-Cl pH 8,75; 20mM MgSO₄; 1 % Triton® X-100 y 1mg/ml BSA, conteniendo 0,4 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada cebador, 100 ng de ADN y 2,5 U de la enzima de alta fidelidad de copia *Pfu* Turbo ADN polimerasa (Stratagene). La amplificación se realizó en un termociclador *T3Thermocycler* (Biometra®). El programa empleado consistió en un ciclo de desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 min seguido de 35 ciclos que consistieron en 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 4 min a 72°C y una extensión final a 72°C durante 10 min.

-Una vez amplificado el fragmento, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE 1x, se recortó la banda y purificó mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

-La clonación del fragmento amplificado en los blancos *XbaI* y *BamHI* del vector Bluescript II, se llevó a cabo digiriendo tanto el fragmento como el vector con las enzimas *XbaI* y *BamHI* (Amersham). Las digestiones se llevaron a cabo en volúmenes de 20 µl con el tampón correspondiente a cada enzima durante 3 horas a 37°C. En el caso del vector tras las digestiones se purificó usando el kit QIAquick Nucleotide Removal (Qiagen).

-En el caso del fragmento, primero se cortó con *BamHI* y a continuación se inactivó dicha enzima manteniendo la reacción a 60°C durante 15 min. Se purificó el ADN sin fenol para eliminar sales. Así, se precipitó con un 1/10 de volumen de acetato sódico 3M pH 5,2 y dos volúmenes de etanol absoluto frío durante 30 min a –20°C, se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min y a 4° C, después se lavó el precipitado con etanol al 70% centrifugando otros 10 min a 4° C, se eliminó el

sobrenadante y se dejó secar al aire. Se resuspendió en un volumen de 10 µl de agua. Tras los pasos anteriores se cortó con *XbaI*, e igual que en el caso anterior, se inactivó la enzima y se llevó a cabo la purificación de la reacción.

-El fragmento y el vector se ligaron utilizando la enzima T4 ADN ligasa en las mismas condiciones que se detalló en la clonación del fragmento para el vector pAHGUS.

-Tras la transformación bacteriana con el vector se analizaron 20 colonias blancas y se reamplificaron los insertos empleando los cebadores **Cdx5L** y **Cdx5R** con los que había sido obtenido el fragmento. La amplificación se llevó a cabo en un volumen de 12,5 µl en tampón Tris-HCl pH 8,3 10mM; MgCl₂ 1,5 mM y KCl 50 mM, conteniendo 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada cebador y 0,5 U de *Taq* polimerasa (SIGMA). El programa de PCR empleado fue el mismo que para la amplificación de la secuencia original desde el trigo ‘Hope’. Se eligieron cuatro clones de los empleados para la amplificación y se inoculó en 5ml de medio LB con 50 µl de ampicilina a 37° C. El aislamiento del ADN plasmídico portador del inserto se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit QIAprep spin Miniprep (Qiagen).

-A continuación se procedió al subclonaje de la secuencia mediante la utilización del Kit “Erase a base” (Promega) para obtener la secuencia completa del fragmento y comprobarla con la secuencia publicada (De Bustos y col., 2000). Se utilizó un secuenciador automático ABI Prism 377 (Applied Biosystem) del Centro de Apoyo a la Investigación, Unidad de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá. Todas las secuencias se analizaron y ensamblaron empleando el programa Sequence Navigator 1.0.1 para Macintosh.

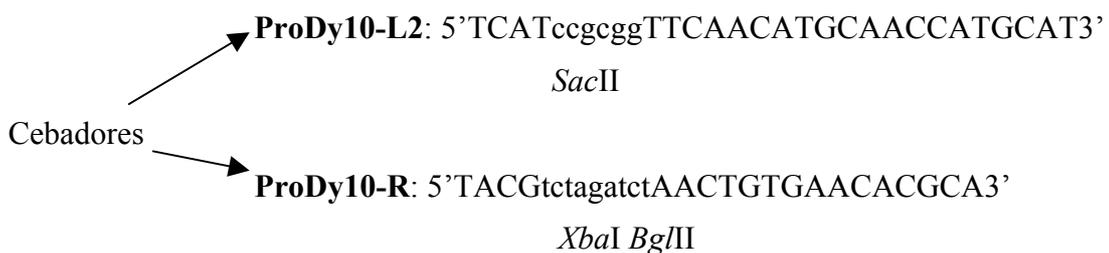
El resto de los elementos de la construcción para el vector pAHDx5-BAR se obtuvieron a partir del vector 35Spro-GUS/UBI-BAR (Figura 2.1). En una primera etapa se digirió con *BamHI* el vector 35Spro-GUS/UBI-BAR obteniéndose un fragmento que abarcaba el segmento de poly-A del gen *uidA* y el promotor de la ubiquitina junto con el intrón I de este gen. También se digirió la construcción del vector Bluescript II donde se había clonado el gen *Dx5* (pAHDx5). A continuación se defosforiló con la enzima fosfatasa alcalina (USB-Amersham) en las condiciones indicadas anteriormente.

-En este caso también se procedió al subclonaje mediante la utilización del Kit “Erase a base” (Promega) para obtener la secuencia completa del fragmento (De Bustos y col., 2000).

-El resto de los elementos de la construcción se obtuvieron a partir de la construcción 35Spro-GUS/UBI-BAR (Figura 2.1) como en el caso del vector pAHDx5-BAR. En una primera etapa se digirió con *Bam*HI obteniéndose un fragmento que abarcaba el poly-A del gen *uidA* y el promotor de la ubiquitina junto con el intrón I de este gen. Este fragmento se clonó entre los blancos *Bgl*III (creado gracias al cebador **ProBx7-R**) y el blanco *Bam*HI de Bluescript II. A continuación se digirieron ambas construcciones con *Eco*RI, clonándose el fragmento que incluía una parte del intrón del gen de la ubiquitina (que es eliminado del fragmento *Bam*HI anterior al digerir con *Eco*RI), el gen *bar* y terminador nos3’.

2.2.1.2.3. Obtención del vector pAHDy10-BAR

Para el aislamiento del gen de gluteninas *Glu-D1y10* se partió de ADN genómico de la línea de trigo blando ‘48-136’. Se diseñaron los cebadores a partir de la secuencia de este gen registrada en la base de datos del EMBL con nº de registro X12929, caracterizado en la Unidad de Genética de la Universidad de Alcalá (De Bustos y col. 2001). Los cebadores incluían las dianas para las enzimas de restricción *Sac*II, *Xba*I y *Bgl*III que posteriormente se utilizarían para clonar en el vector Bluescript II:



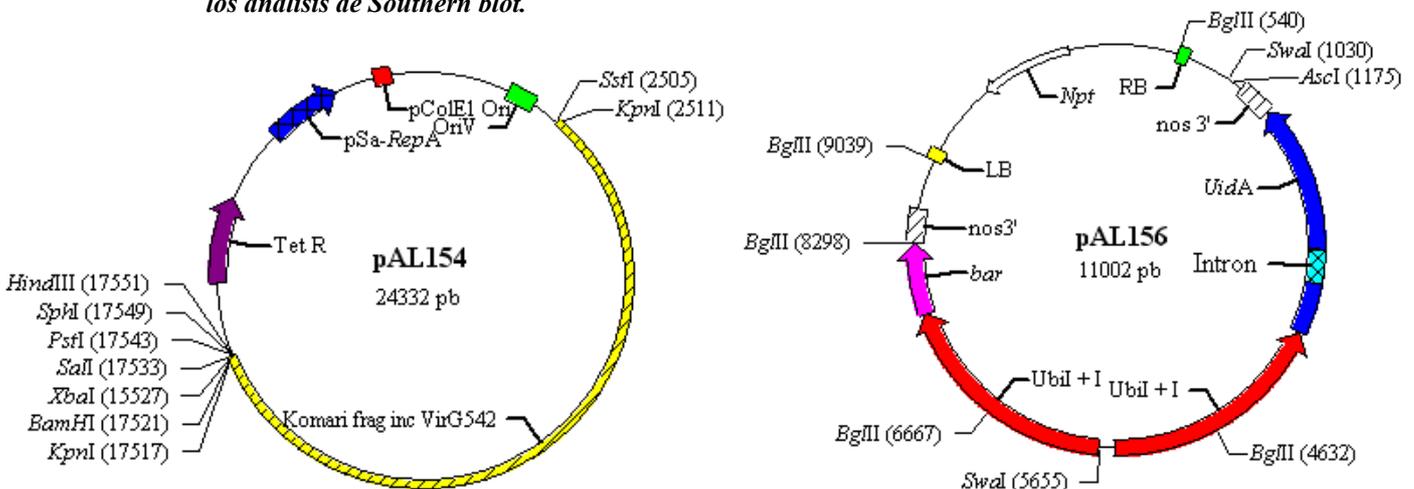
Una vez amplificado el fragmento utilizando la misma enzima de alta fidelidad de copia (*Pfu* Turbo, Stratagene) que en los casos anteriores, se digirió con *Sac*II y *Xba*I, clonándose en estos blancos en Bluescript II. A continuación se procedió al subclonaje mediante la utilización del Kit “Erase a base”(Promega) para obtener la secuencia completa del fragmento (De Bustos y col., 2000).

El resto de los elementos de la construcción se obtuvieron a partir del vector 35Spro-GUS/UBI-BAR (Figura 2.1) como en los anteriores casos. En una primera etapa se digirió con *Bam*HI obteniéndose un fragmento que abarcaba el fragmento de poli-A del gen *uidA* y el promotor de la ubiquitina junto con el intrón I de este gen. Este fragmento se clonó entre los blancos *Bgl*III (creado con el cebador **ProDy10-R**) y el blanco *Bam*HI de Bluescript II. A continuación se digirieron ambas construcciones con *Eco*RI, clonándose el fragmento que incluía una parte del intrón del gen de la ubiquitina (que es eliminado del fragmento *Bam*HI anterior al digerir con *Eco*RI), el gen *bar* y terminador nos3’.

2.2.2. Vectores utilizados en la transformación mediante *A. tumefaciens*: pAL154 y pAL156

Los vectores plasmídicos pAL154/156 provienen de los vectores pSoup y pGreen respectivamente (Hellens y col., 2000). El plásmido derivado de pSoup es pAL154 y además contiene el fragmento de Komari 15 Kb. Este plásmido funciona como plásmido ayudante realizando las funciones de replicación en trans para pAL156. El plásmido pAL156 basado en pGreen tiene el ADN-T que incorpora el gen *bar* y el gen *uidA* modificado que codifica para una β -glucuronidasa (GUS), el cual tiene un intrón en el marco abierto de lectura para prevenir la expresión en *A. tumefaciens* (Figura 2.2).

Figura 2.2.- Mapas de los plásmidos pAL154/156 utilizados en la transformación mediante *A. tumefaciens*. El ADN-T del plásmido pAL156 contiene el gen *bar* y un gen *uidA* (GUS) modificado con un intrón en el marco abierto de lectura para prevenir su expresión en *Agrobacterium*. Ambos genes están dirigidos por el promotor del gen de la ubiquitina del maíz incluyendo el intrón I de dicho gen. La posición de algunas de las enzimas de restricción marcadas en pAL156 se usaron en los análisis de Southern blot.



Los genes *bar* y *uidA* están dirigidos por el promotor del gen de la ubiquitina del maíz con el intrón I de dicho gen (Christensen y Quail, 1996). El gen *bar* se encuentra al lado izquierdo del ADN-T y el gen *uidA* al lado derecho.

2.3. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN.

2.3.1. Transformación mediante biolística

2.3.1.1. EXPRESIÓN TRANSITORIA DEL GEN UIDA

Precultivo y tratamiento osmótico de los embriones

Los embriones fueron precultivados en un medio MS (Tabla 5), ensayándose diferentes tiempos: 0, 24, 48 o 72 horas. Después del precultivo se transfirieron a un medio de plasmólisis (Tabla 2.5) hiperosmótico (medio MS suplementado con manitol 0,4M y sorbitol 0,4M) durante 4 horas antes del bombardeo.

Disparo de microproyectiles

Los disparos se llevaron a cabo usando el cañón de partículas Biolistic® PDS-1000/He de BioRad, donde se combinaron dos discos de ruptura (1.100 y 1.800 psi) con dos distancias entre el disco de ruptura y los embriones (6 o 9 cm), bajo una presión de vacío en la cámara de disparo de 27 pulgadas de mercurio.

Para la preparación de las partículas, se precipitaron 5 µg/µl de ADN del plásmido pAHGUS con 3 mg de partículas de oro (1 µm, BioRad). Se resuspendió en 50 µl de agua destilada y se añadieron 20µl de 0,1 M de espermidina y 50 µl de 2.5M de CaCl₂. Las partículas cubiertas de ADN fueron lavadas en etanol y resuspendidas en 56 µl de etanol manteniéndose en hielo hasta que se llevó a cabo el bombardeo. Se tomaron 8 µl de las partículas en suspensión y se situaron sobre cada uno de los macroproyectiles (Ferrer y col., 2000).

Ensayos de actividad GUS

Tras el bombardeo los embriones se mantuvieron en el medio de plasmólisis durante 24 horas y a continuación se transfirieron a un medio MS durante otras 24 horas.

Finalmente se realizó la detección de la expresión del gen *uidA* según el protocolo descrito por Jefferson (1987).

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando la versión 7.1 del programa Statgraphics.

Tabla 2.5.- Composición de los medios de cultivo para los embriones bombardeados

MEDIOS	Precultivo (MS)	Plasmólisis	Inducción de callos	Regeneración de callos	Selección de explantes	Desarrollo de plántulas
COMPONENTES						
Macroelementos MS 20x	5% (v/v)	5% (v/v)	5% (v/v)	5% (v/v)	5% (v/v)	5% (v/v)
Microelementos MS 100 x	1% (v/v)	1% (v/v)	1% (v/v)	1% (v/v)	1% (v/v)	1% (v/v)
Fe-EDTA 10⁻⁴M 200 x	0,5 % (v/v)	0,5% (v/v)	0,5 % (v/v)	0,5% (v/v)	0,5% (v/v)	0,5% (v/v)
Vitaminas MS	0,2% (v/v)	0,2% (v/v)	0,2% (v/v)	0,2% (v/v)	0,2% (v/v)	0,2% (v/v)
Glutamina (Merck)	0,05 % (p/v)	0,05% (p/v)	-	-	-	0,05% (p/v)
Sacarosa (Duchefa)	3% (p/v)	3% (p/v)	3% (p/v)	2% (p/v)	2% (p/v)	2% (p/v)
2,4-D 1mg/ml (SIGMA)	0,2% (v/v)	-	0,2% (v/v)	-	-	-
A.N.A. 0,2 mg/ml (SIGMA)	-	-	-	0,25% (v/v)	0,25% (v/v)	0,1% (v/v)
Bencilaminopurina 0,5 mg/ml (SIGMA)	-	-	-	0,1% (v/v)	0,1% (v/v)	-
Manitol (Panreac)	-	7,3 % (p/v)	-	-	-	-
Sorbitol (SIGMA)	-	7,3% (p/v)	-	-	-	-
Agarosa (Pronadisa)	-	-	-	-	-	0,2% (p/v)
Phytigel (SIGMA)	0,3% (p/v)	0,3% (p/v)	0,3% (p/v)	0,3% (p/v)	0,3% (p/v)	0,25% (p/v)
Todos los componente anteriores se disuelven en H ₂ O ultrapura. Ajuste de pH a 5,8 y esterilización en autoclave						
PPT (Duchefa)	-	-	-	-	4mg/l	-

2.3.1.2. OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

Tras la puesta a punto de la expresión transitoria del gen *uidA* se seleccionaron las mejores condiciones de precultivo de los embriones (24 horas) y de disparo (1.100 psi y 6 cm) para lo experimentos de transformación permanente.

En el caso de los embriones haploides de triticales se utilizaron 2,5µg/µl de ADN de cada uno de los plásmidos pAHDx5-BAR y pAHDy10-BAR. En los experimentos que fueron llevados a cabo en trigo, se emplearon distintos plásmidos, dependiendo de la variedad de trigo 'Anza' o 'Craklin'. Así en el caso del trigo 'Anza' se precipitaron 2,5µg/µl de ADN de cada uno de los plásmidos pAHDx5-BAR y pAHDy10-BAR mientras que el trigo 'Craklin' fueron 5µg/µl de ADN del plásmido pAHBx7-BAR.

Tras mantener los embriones bombardeados en un medio de plasmólisis durante 24 horas, se les pasó a un medio MS con 2 mg/l de 2,4 D y sin glutamina durante 96 horas.

2.3.1.2.1. Selección temprana

Los embriones cigóticos inmaduros de trigo y los embriones haploides de triticales se repicaron en un medio MS de selección que contenía 2 mg/l de PPT durante un mes. Aquellos que desarrollaron callos se pasaron a un medio de regeneración (Tabla 2.5) al cual se añadieron 5 mg/l de PPT. Tras permanecer de 4 a 5 semanas en el medio anterior, se pasaron las plántulas desarrolladas a un nuevo medio que contenía la mitad de macroelementos y sin PPT. En este medio permanecieron las plántulas 4 semanas y tras el desarrollo de raíces se transplantaron a ji-ffi.

2.3.1.2.2. Selección tardía

Los embriones cigóticos inmaduros de trigo y de triticales se pasaron a un medio MS de inducción de callos (Tabla 2.5) donde permanecieron 4 semanas. Los embriones que desarrollaron callos se repicaron en un medio de regeneración (Tabla 2.5) en el que se mantuvieron 4 semanas. Las plántulas regeneradas se repicaron en un medio de selección que contenía 4mg/l de PPT (Tabla 2.5) durante 4 semanas. Las plántulas

que sobrevivieron se transfirieron a un medio de desarrollo y posteriormente se transplantaron en *ji-ffis*.

2.3.2. Transformación mediante *A. tumefaciens*

2.3.2.1. Cultivo y preparación de *A. tumefaciens*

Todos los experimentos fueron llevados a cabo usando la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* (Lazo y col., 1991) que contiene la combinación de los vectores pAL154/156. Los cultivos de *A. tumefaciens* se desarrollaron a partir de los stocks de glicerol en un medio líquido MG/L (Tabla 2.6) (Tingay y col., 1997) al cual fue añadido 1 µg/l de biotina (Duchefa), 100 mg/l de kanamicina y 200 mg/l de carbenicilina. La carbenicilina permitió seleccionar la cepa AGL1 y la kanamicina aquellas que además llevan los plásmidos pAL154/156. Se incubaron a 27-29°C con agitación de 250 rpm. Se midió la densidad óptica de los cultivos de *Agrobacterium* a una longitud de onda de 600 nm previo a su uso. Cuando la densidad óptica alcanzó un valor entre 0.8 y 1, los cultivos se centrifugaron a 2500g durante 20 minutos. El precipitado celular se resuspendió en el medio de inoculación en estado líquido (Tabla 2.7).

Tabla 2.6.- Composición del medio MG/L* para el crecimiento de *A. tumefaciens*

MEDIO	MG/L
COMPONENTES	
Manitol (Panreac)	0,5% (p/v)
Ácido L-glutámico (Merck)	0,1% (p/v)
KH₂PO₄ (Merck)	250 mg/l
NaCl (Duchefa)	100 mg/l
MgSO₄. 7H₂O (Panreac)	100 mg/l
Triptona (Pronadisa)	0,5% (p/v)
Extracto de levadura (Pronadisa)	0,25% (p/v)
Todos los componentes anteriores se disuelven en H ₂ O ultrapura. Ajuste de pH a 7,0 y esterilización en autoclave	

*MG/L: Garfinkel y Nester, 1980

Tabla 2.7.- Composición de los medios de cultivo para la transformación de embriones mediante *A. tumefaciens*

MEDIOS	Medio de inoculación	Medio de co-cultivo	Medio de inducción
COMPONENTES			
Macroelementos MS (x 10)	10% (v/v)	10% (v/v)	10% (v/v)
Microelementos L7 (x 1000)	0,2% (v/v)	0,2% (v/v)	0,2% (v/v)
FeNa-EDTA 10⁻⁴ M (x 100)	1% (v/v)	1% (v/v)	1% (v/v)
Vitaminas MS	0,1% (v/v)	0,1% (v/v)	0,1% (v/v)
Myo-Inositol (SIGMA)	0,01% (p/v)	0,01% (p/v)	0,01% (p/v)
Glutamina (SIGMA)	0,05% (p/v)	0,05% (p/v)	0,05% (p/v)
Hidrosilato de caseína(SIGMA)	0,01% (p/v)	0,01% (p/v)	0,01% (p/v)
MES (SIGMA)	0,195% (p/v)	0,195% (p/v)	0,195% (p/v)
Glucosa (Duchefa)	1% (p/v)	1% (p/v)	-
Maltosa (Duchefa)	4% (p/v)	4% (p/v)	4% (p/v)
Todos los componentes anteriores se disuelven en H ₂ O ultrapura. Ajuste de pH a 5,8 y esterilización en autoclave			
Picloram (SIGMA)	2,2 mg/l	2,2 mg/l	2,2 mg/l
Ácido ascórbico (SIGMA)	100 mg/l	100 mg/l	100 mg/l
2,4-D (SIGMA)	2 mg/l	2 mg/l	0,5 mg/l
Acetosiringona (SIGMA)	200 µM	200 µM	-
Silwet-L77 (Lehle Seeds)	0,01-0,02%	-	-
Ticarclina (Duchefa)	-	-	160 mg/l

2.3.2.2. Precultivo, inoculación, co-cultivo e inducción de los embriones cigóticos inmaduros de las variedades ‘Anza’ y ‘Craklin’ de trigo y la línea ‘ATOPE-22’ de triticale y de embriones haploides de la línea ‘ATOPE-22’ de triticale

Los embriones cigóticos inmaduros fueron precultivados con el escutelo hacia arriba en el medio de inoculación (Tabla 2.7) durante 0,5; 1; 3 o 24 horas. Los embrioides haploides se recolectaron de las anteras en cultivo y se precultivaron en las mismas condiciones anteriores.

Tras el precultivo de los embriones cigóticos o haploides se procedió a la inoculación con *A. tumefaciens*, seguido del mantenimiento en oscuridad durante 1,5;

2 o 3 horas, momento en el que se retiró el exceso de bacterias y los embriones fueron transferidos al medio de co-cultivo (Tabla 2.7). A continuación, fueron incubados en oscuridad a 25° C durante tres días y después fueron transferidos al medio de inducción (Tabla 2.7) en presencia de 160 mg/l de ticarcilina. Los embriones fueron mantenidos en este medio entre tres y cuatro semanas en oscuridad a 25°C.

En los experimentos de expresión transitoria del gen *uidA*, tras el co-cultivo y la permanencia durante dos días en medio de inducción en presencia de 160 mg/l de ticarcilina, se llevaron a cabo ensayos de actividad GUS según el protocolo descrito por Jefferson (1987). Los análisis estadísticos de los datos (número de foci por embrión) se llevaron a cabo usando la versión 7.1 del programa Statgraphics Plus.

Tabla 2. 8.- Composición de los medios de cultivo para la transformación de embriones mediante *A. tumefaciens*

MEDIOS	Regeneración de callos	Selección de explantes	Desarrollo de plántulas
COMPONENTES			
Macroelementos MS 20x	5% (v/v)	5% (v/v)	5% (v/v)
Microelementos MS 100 x	1% (v/v)	1% (v/v)	1% (v/v)
Fe-EDTA 10⁻⁴M 200 x	0,5% (v/v)	0,5% (v/v)	0,5% (v/v)
Vitaminas MS	0,2% (v/v)	0,2% (v/v)	0,2% (v/v)
Glutamina (Merck)	-	-	0,05% (p/v)
Sacarosa (Duchefa)	2% (p/v)	2% (p/v)	2% (p/v)
A.N.A. 0,2 mg/ml (SIGMA)	0,25% (v/v)	0,25% (v/v)	0,1% (v/v)
Bencilaminopurina 0,5 mg/ml (SIGMA)	0,1% (v/v)	0,1% (v/v)	-
Agarosa (Pronadisa)			0,2% (p/v)
Phytigel (SIGMA)	0,3% (p/v)	0,3% (p/v)	0,25% (p/v)
Todos los componentes anteriores se disuelven en H ₂ O ultrapura. Ajuste de pH a 5,8 y esterilización en autoclave			
Ticarcilina (Duchefa)	160 mg/l	160 mg/l	160 mg/l
PPT (Duchefa)	-	4mg/l	-

2.3.2.3. REGENERACIÓN, SELECCIÓN Y DESARROLLO DE LAS PLÁNTULAS

Los callos formados a partir de los embriones cigóticos inmaduros fueron transplantados a un medio de regeneración (Tabla 2.8) con ticarcilina 160 mg/l, y se incubaron en una cámara a 25°C, con un fotoperiodo de 14 horas de luz.

Tras tres o cuatro semanas se realizó una selección tardía de las plántulas regeneradas, transfiriéndose a un medio de selección (Tabla 2.8) que llevaba PPT (4mg/l). Las plántulas que sobrevivieron se pasaron a un medio de desarrollo de plántulas (Tabla 2.8) sin agente selectivo. Cuando desarrollaron raíces fueron transplantadas a *ji-ffis*.

2.3.3. Análisis molecular de las plantas seleccionadas con fosfinotricina

2.3.3.1. PCR

Tras la selección con fosfinotricina, se extrajo el ADN de las plántulas que sobrevivieron mediante el kit Dneasy Plant Mini (Qiagen). Se hicieron combinaciones de distintas parejas de cebadores a distintas temperaturas de anillamiento y se incluyeron controles negativos que no habían sido transformados por ninguno de los dos métodos.

Las reacciones de PCR para la detección de la presencia del transgén *Glu-D1y10* se realizaron en un volumen de 20 µl conteniendo: tampón de reacción de Taq 1x (SIGMA); 0,25 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada cebador, 2 U de *Taq* polimerasa (SIGMA) y 200 ng de ADN. Los cebadores que se emplearon fueron Dy10L 5'-CTAACTCGCCGTGCACA-3' y el Dy10R 5'-AGCTAAGGTGCATGC ATG-3' (De Bustos y col., 2000). Las condiciones de amplificación fueron 2 min y 30 seg de desnaturalización inicial a 95°C, seguidos de 35 ciclos con 1 min a 94°C, 1 min a 66°C y 2 min y 30 seg de extensión a 72°C, además hubo una extensión final de 4 min a 72°C.

Las reacciones de PCR para la detección de la presencia del transgén *bar* se realizaron en un volumen de 20 µl conteniendo: tampón de reacción de Taq 1x (SIGMA); 0,125 mM de dNTPs, 0,25 µM de cada cebador, 2U de *Taq* polimerasa (SIGMA) y 200 ng de ADN. Los cebadores con los que se llevó a cabo la amplificación fueron un cebador que incluía parte del promotor UBI del gen *bar* 5'-

GCAGCATCTATTCATATGCTC-3' y el otro cebador correspondiente a la región terminadora "nos" del gen *bar* 5'-CATGCTTAACGTAATTCAACAG- 3'. Las condiciones de amplificación fueron 2 min y 30 seg de desnaturalización inicial a 95°C, seguidos de 35 ciclos con 45 seg a 94°C, 45 seg a 55°C y 1 min de extensión a 72°C, además hubo una extensión final de 5 min a 72°C.

Además mediante el kit REDEExtract-N-AmpTM Seed PCR (SIGMA) nos permitió analizar las semillas (T1) de la plantas transgénicas obtenidas (T0) de la variedad 'Craklin'. Así, se llevaron a cabo PCRs siguiendo las indicaciones del kit a la hora de llevar a cabo la extracción del ADN desde las semillas. Se emplearon los siguientes cebadores para detectar la presencia del gen *uidA* 5'-CTTACGCTGAAGAGATGCTCG-3' y 5'-TAATAACGGTTCAGGCACAGC-3. Las condiciones de amplificación fueron 2 min y 30 seg de desnaturalización inicial a 95°C, seguidos de 35 ciclos con 30 seg a 94°C, 30 seg a 63°C y 1 min de extensión a 72°C, además hubo una extensión final de 10 min a 72°C.

Los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa al 0,8 % en tampón TAE y con un voltaje de 5V/cm. Los geles se tiñeron por inmersión en bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/mL durante 20 minutos. Se visualizó y fotografió bajo luz ultravioleta usando un sistema de documentación de geles (Gel Doc, Bio Rad).

2.3.3.2. Southern-blot

Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de las hojas de las plantas que sobrevivieron al tratamiento con PPT siguiendo el procedimiento de Sharp. y col (1988).

Digestiones enzimáticas

Las enzimas de restricción con las que se digirió el ADN de las plantas fueron: *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI* y *Bg/II*. Se digirieron 18-25 µg de ADN empleando 3U de enzima por cada µg de ADN en un volumen de 250 µl con el tampón adecuado para

cada una de las enzimas. Las digestiones se llevaron a cabo a 37°C durante al menos 12 horas.

Electroforesis

Una vez precipitado el ADN digerido, los fragmentos generados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% aplicando un voltaje de 1-2 V/cm.

Southern blotting

Tras la electroforesis, se tiñó el gel con bromuro de etidio durante una hora y se expuso durante 3 min a luz ultravioleta para romper las bandas y conseguir así una mejor transferencia a la membrana de nylon cargada positivamente. A continuación se introdujo en una solución de desnaturalización (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) durante 30 min y después en una de neutralización (acetato amónico 1M) durante 15-20 min. La transferencia se realizó con acetato amónico 1M durante aproximadamente 24 horas.

A continuación se lavó la membrana con 2xSSC y el ADN se fijó a una membrana de nylon cargada positivamente con luz ultravioleta en un Spectrolinker XL-1000 uv crosslinker.

2.3.3.3. MARCAJE DE LAS SONDAS DE ADN

Las sondas se marcaron con radioactividad o con digoxigenina empleando en el primer caso el método de random priming y en el segundo PCR. Para el marcaje por random priming se introdujeron nucleótidos con ³²P empleando el kit High Prime (Roche). Para el marcaje de las sondas por PCR fue necesario introducir en la reacción de PCR una cierta proporción de uno de los desoxirribonucleótidos precursores marcado. Se utilizó dUTP unido a digoxigenina (Dig-dUTP) (Roche).

2.3.3.3.1. Random priming

Las sondas de los genes *uidA* y *bar* fueron amplificadas previamente. La amplificación de la sonda *uidA* (410 pb) se llevó a cabo en un volumen de reacción de 20 µl que contenía un tampón de reacción de Taq 1x (SIGMA); 0,125 mM de

dNTPs, 0,25 μ M de cada cebador y 1U de *Taq* polimerasa (SIGMA) y la cantidad de ADN molde fue de 20 ng del plásmido pAL156. Los cebadores empleados fueron RGUS: 5'-CTTACGCTGAAGAGATGCTCG-3' y LGUS: 5'-TAATAACG GTT C AGGCACAGC-3' y el programa empleado consistió en 5 min de desnaturalización inicial a 94°C, seguidos de 35 ciclos con 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 63°C y 1 min de extensión a 72°C, además hubo una extensión final de 5 min a 72°C. La amplificación de la sonda *bar* dio lugar a un fragmento de 443 pb con los cebadores 5'-GTCTGCACCATCGTCAACC-3' y 5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC-3' (Pastori y col., 2001), las condiciones de la reacción de PCR fueron las mismas que las anteriores excepto la temperatura de anillamiento que en este caso fue de 60°C y el tiempo de extensión fue de 45 seg durante 30 ciclos.

Los fragmentos amplificados fueron extraídos de los geles de agarosa y se utilizaron en la reacción de marcaje. En cada reacción de marcaje se emplearon 25 ng de ADN, que fueron desnaturalizados tras incubarse a 100°C durante 10 min. La reacción se realizó en un volumen de 20 μ l y al ADN desnaturalizado se le añadió la mezcla de enzima Klenow polimerasa; 0,25 μ M de cada nucleótido frío y 50 μ Ci de [α^{32} P]dCTP. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 1 hora. Los nucleótidos que no se incorporaron durante la reacción de marcaje se eliminaron siguiendo el protocolo proporcionado en el kit QIAquick Nucleotide Removal (Qiagen).

2.3.3.3.2. Marcaje con DIG

En el marcaje de la sonda de los genes *uidA* y *bar*, al igual que en el marcaje por radioactividad, se utilizó el ADN del plásmido pAL156 y las mismas condiciones de amplificación a la temperatura de anillamiento, de 63°C y 60°C, respectivamente. El volumen de la reacción fue de 25 μ l y la proporción de precursor marcado a no marcado (Dig-dUTP: dTTP) fue 1:2. Los componentes de cada reacción fueron los siguientes 20 ng de ADN diluido en agua; tampón de reacción de *Taq* 1x; 0,2 mM de una mezcla de dATP, dGTP y dCTP; 134 μ M de dTTP; 62 μ M de Dig-dUTP; 0,2 μ M de cada cebador y 1U de *Taq* polimerasa.

Se valoró la eficacia de la amplificación y se estimó la concentración del inserto marcado por electroforesis de una alícuota en un gel de agarosa al 1%. El resto de la amplificación se purificó siguiendo el protocolo del kit QIAquick

Nucleotide Removal (Qiagen), ya que la presencia de nucleótidos DIG-dUTP no incorporados en el ADN podría generar un exceso de señal de fondo tras las hibridaciones.

2.3.3.4. PREHIBRIDACIÓN E HIBRIDACIÓN

Se hizo una prehibridación de las membranas en 10 ml de una solución que contenía Na_2HPO_4 0,25 mM pH 7,2; SDS al 7% y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN de esperma de salmón a 65°C durante al menos 2 horas.

Tras la prehibridación se retiró la solución utilizada y se reemplazó por una nueva con la misma composición. Para el marcaje por *random priming*, se añadió entre 750.000 y 1.000.000 cpm/ml de la sonda marcada previamente desnaturalizada. Para el marcaje con *DIG* se añadió 10-15 ng/ml de la sonda que fue desnaturalizada por calor a 95°C durante 10 min, y enfriada rápidamente en hielo. La hibridación se realizó a 65°C durante al menos 14 horas.

2.3.3.5. DETECCIÓN DE LA HIBRIDACIÓN

2.3.3.5.1. Detección radiactiva

Tras la hibridación se lavaron las membranas, en primer lugar durante 20 min en una solución con 2xSSC-0,1%SDS a temperatura ambiente y a continuación dos veces, durante aproximadamente 15 min cada una, en 1xSSC-0,1%SDS a 65°C. Finalmente se lavaron de nuevo a 65°C en 0,1xSSC-0,1%SDS durante 15 o 20 min dependiendo de la cantidad de radioactividad que quedase en la membrana.

Tras los lavados, las membranas se humedecieron en 2xSSC para quitar los restos de SDS, se eliminó el exceso de humedad, se embolsaron y se expusieron en placas de autorradiografía X-Omat AR (Kodak) a -80°C. El tiempo de exposición fue de 21 días. El revelado de las placas se realizó empleando el revelador G150 (Agfa) y el fijador G350 (Agfa).

2.3.3.5.2. Detección quimioluminiscente

Tras la hibridación se sacó la membrana de la botella y se colocó en una cubeta. La membrana se sometió a los siguientes lavados posthibridación: 2 lavados de 5 min en solución HSW (0,15xSSC + SDS al 0,1%) a temperatura ambiente y 2 lavados de 30 min en HSW a 65°C. A continuación se sumergió la membrana en tampón 1 (0,1 M ácido maleico pH 7,5; 0,15 M NaCl; 0,3% Tween 20) durante unos segundos para equilibrarla. Posteriormente se sumergió la membrana en tampón 2 (1% Blocking en tampón 1) durante al menos 30 min, bloqueándose así los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo. Después se preparó una solución del anticuerpo a una dilución 1:25000 en tampón 2 y se sumergió la membrana durante 30 min con agitación suave.

La eliminación del anticuerpo no unido al ADN se realizó mediante 3 lavados en tampón 1 durante 10 min. A continuación, se sumergió la membrana en tampón 3 (0,1 M Tris-HCl pH 9,5; 0,1 M NaCl) durante 5 min. Se preparó una solución del sustrato CDP star (Roche) en tampón 3 diluyendo 1:200 y se puso en contacto con la membrana durante 5 min. Finalmente se selló la membrana en una bolsa de plástico y se colocó en un cassette con una película sensible a la luz visible, durante 3 horas y se reveló la película empleando el revelador G150 (Agfa) y el fijador G350 (Agfa).

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS.

En este capítulo se presentan los vectores a utilizar y los resultados de los ensayos de obtención de las formas transgénicas ordenadas por materiales, primero en triticale y a continuación en trigo común. A continuación, se expondrán los resultados de los ensayos de transformación para cada material, primero con el método biolístico y a continuación mediante infección con *A. tumefaciens*. Para cada metodología se indica, según corresponda, los resultados de la expresión transitoria en embriones haploides (triticale) y embriones cigóticos inmaduros (triticale y trigo común), y en su caso la obtención de plantas transgénicas.

3.1. CONSTRUCCION DE LOS VECTORES A UTILIZAR EN LA TRANSFORMACION.

3.1.1. Construcción del vector pAHGUS

En la Figura 3.1 se presenta un esquema del vector pAHGUS, construido específicamente para este trabajo y que combina elementos del vector pJIT61, que aporta el promotor 35S del CaMV, el gen *uidA* y el terminador 35S (2394 pb), y del vector Bluescript II, que aporta el gen de resistencia a ampicilina. para facilitar la selección de bacterias de la cepa *E. coli* DH10 β transformadas con el vector. En la Figura 3.2 se muestra la liberación y separación del fragmento de 2394 pb al cortar con la enzima *EcoRV*, ya que fue esa la diana de la enzima de restricción en la que fue clonado.

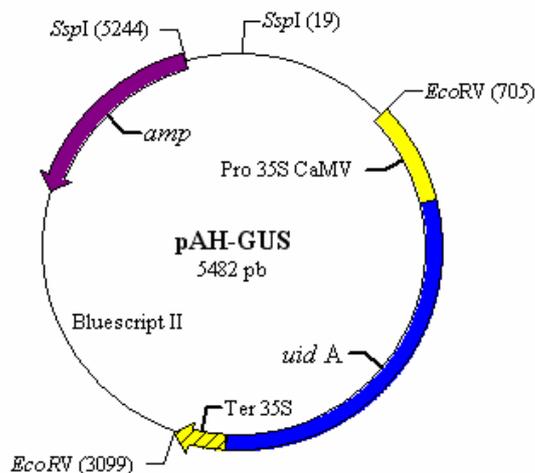


Figura 3.1.- Diagrama del vector pAHGUS usado en los experimentos de bombardeo.

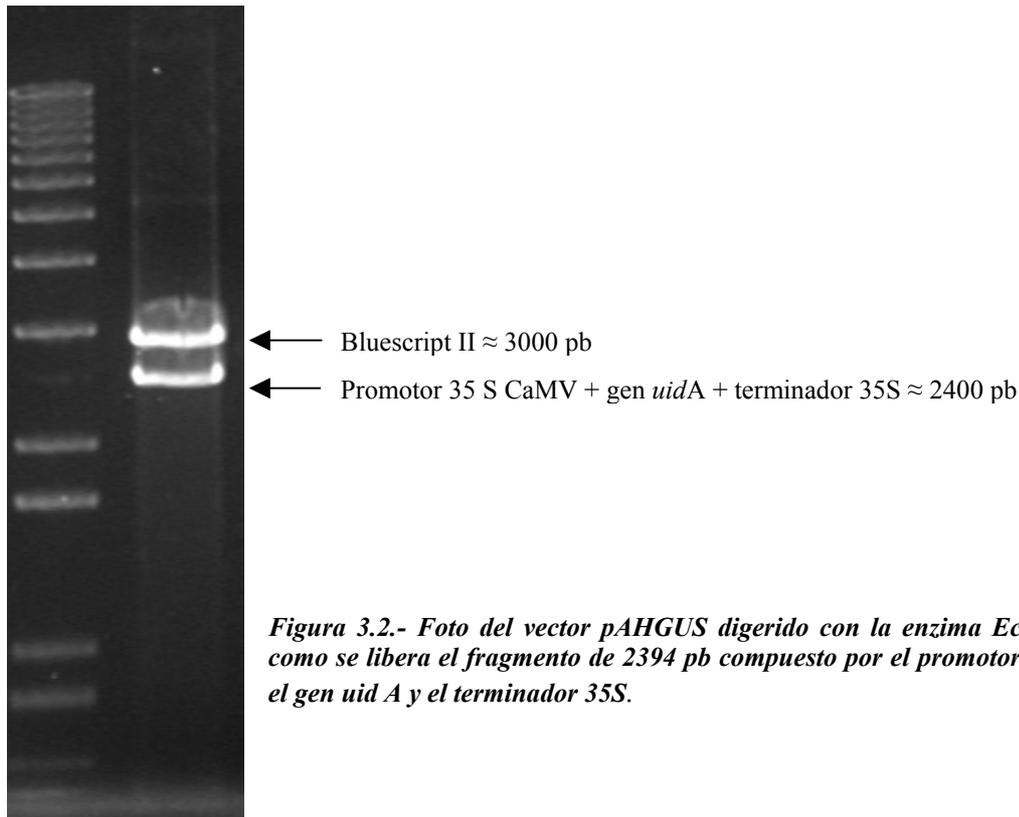


Figura 3.2.- Foto del vector pAHGUS digerido con la enzima EcoRV, mostrando como se libera el fragmento de 2394 pb compuesto por el promotor 35S del CaMV, el gen *uidA* y el terminador 35S.

La funcionalidad de la nueva secuencia clonada se probó transformando mediante biolística embriones haploides de la línea ‘ATOPE-6’ de triticale. Así, en experimentos de bombardeo en paralelo se transformaron embriones con el vector pJIT61 portador de las secuencias originales y el nuevo vector pAHGUS (Tablas 3.1 y 3.2). Los disparos se hicieron variando el tiempo de precultivo de los embriones, durante 0 o 72 horas y el parámetro de la altura de disparo, a 6 y 9 cm, manteniendo una presión de helio de 1.100 psi.

Tabla 3.1.- Media y desviación estándar del número de foci de expresión transitoria del gen *uidA* en embriones haploides de las línea ‘ATOPE-6’ de triticale usando el vector pAHGUS, tras los primeros ensayos de biolística.

Precultivo (horas)	Presión de helio (psi)	Distancia de disparo (cm)	foci/embrión haploide (+sd)
0	1.100	6	5,3 (7,8)
72	1.100	6	0,2 (0,8)
0	1.100	9	2,6 (4,7)
72	1.100	9	4,4 (8,1)

Tabla 3.2.- Media y desviación estándar del número de foci de expresión transitoria del gen *uidA* en embriones haploides de las línea 'ATOPE-6' de triticale usando el vector *pJIT61*, tras los primeros ensayos de biolística.

Precultivo (horas)	Presión de helio (psi)	Distancia de disparo (cm)	foci/embrión haploide (\pm sd)
0	1.100	6	2,4 (3,1)
72	1.100	6	2,8 (5,9)
0	1.100	9	3 (4,5)
72	1.100	9	1,1 (2,9)

En general, los resultados obtenidos fueron mejores con el nuevo vector *pAHGUS* en los ensayos de expresión transitoria realizados. Respecto a las condiciones de los ensayos, los mejores resultados con este vector se obtuvieron sin precultivo, a 1.100 psi y 6 cm de distancia de disparo.

3.1.2. Construcción de los vectores *PAHDX5-BAR*, *PAHBX7-BAR* y *PAHDY10-BAR*

3.1.2.1. ELECCIÓN DE PROMOTORES Y AISLAMIENTO DE LOS GENES *GLU-D1x5*, *GLU-D1y10* Y *GLU-B1x7*

Se emplearon las secuencias de los genes *Glu-D1x5*, *Glu-B1x7* y *Glu-D1y10* obtenidas del banco EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*: número de registro X12928, X13927 y X12929 respectivamente) para el diseño de los cebadores específicos de cada gen. De este modo se obtuvieron los cebadores de *Glu-D1x5*: Cdx5L \leftrightarrow Cdx5R; *Glu-B1x7*: ProBx7L2 \leftrightarrow ProBx7-R y *Glu-D1y10*: ProDy10-L2 \leftrightarrow ProDy10-R que se utilizaron para amplificar cada gen (Figura 3.3) a partir del 'Hope', 'Pané-247' y '48-136'

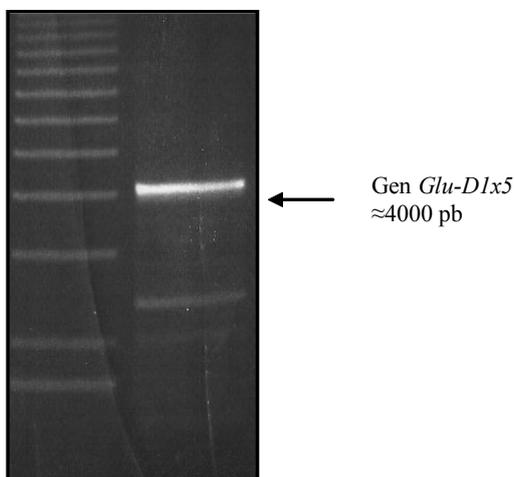


Figura 3.3.- Amplificación del alelo *Glu-D1x5* a partir del trigo 'Hope' Cdx5L \leftrightarrow Cdx5R. El carril de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular.

Los cebadores incluían las dianas de restricción para permitir el clonaje de los genes a partir del vector Bluescript II (Figura 3.4), como se explicó en el apartado de material y métodos (Figura 3.5, 3.6).

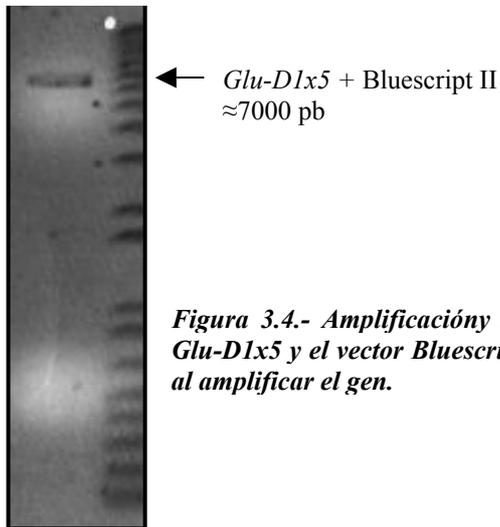


Figura 3.4.- Amplificación y separación del fragmento de ligazón entre del gen *Glu-D1x5* y el vector *Bluescript II*, gracias a las dianas *XbaI* y *BamHI* incluidas al amplificar el gen.

Figura 3.5.- Subclonaje de la secuencia del gen *Glu1-Dx5* mediante el kit “Erase a base” (Promega) para poder obtener la secuencia completa.

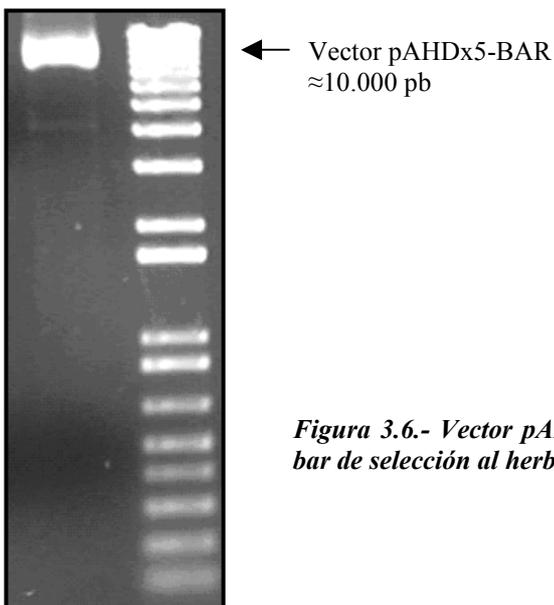
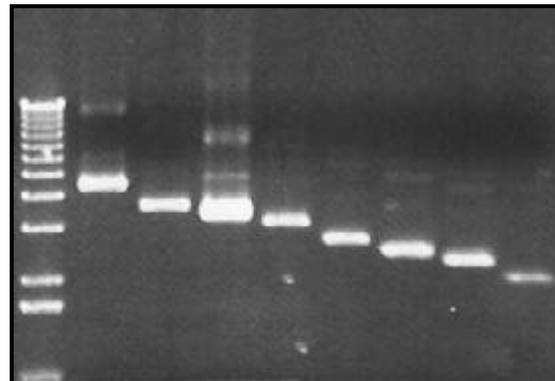


Figura 3.6.- Vector *pAHDx5* el cual contiene el gen *Glu-D1x5* y el gen bar de selección al herbicida *BASTA™*.

Los alineamientos entre las nuevas secuencias amplificadas y las ya publicadas se llevaron a cabo con el programa Clustal W 1.82 como se muestra en el ANEXO. Mediante estos alineamientos se comprobó que todas las regiones amplificadas mantenían las secuencias presuntamente reguladoras, como lo demuestra su comparación con la región promotora del gen *Glu1-Dx1* de la variedad de trigo común ‘Cheyenne’ previamente publicada (Lamacchia y col., 2001). El estudio comparativo se incluye en el ANEXO. Además los alineamientos de cada uno de estos genes con las secuencias publicadas, muestran solo diferencias puntuales de algunas bases entre ellos. Es interesante destacar que la región promotora del gen *Glu-B1x7* mostró alguna variación de bases en el intensificador parcial de HMW y el intensificador de HMW.

3.1.2.2. OBTENCIÓN DE LOS VECTORES PARA LA TRANSFORMACIÓN

Los vectores pAHDx5-BAR, pAHBx7-BAR y pAHDy10-BAR contienen el gen *bar* que confiere resistencia al herbicida BASTA™, más un gen de gluteninas, que en el caso de pAHDx5-BAR es *Glu-D1x5*, en el de pAHBx7-BAR es *Glu-B1x7* y en el caso de pAHDy10-BAR es *Glu-D1y10*.

En Materiales y Métodos se describe el proceso de obtención de estos vectores. En la Figura 3.8 se esquematiza la construcción del vector pAHDx5-BAR partiendo de ADN genómico de ‘Hope’ y el vector 35S-GUS/UBI-BAR.

En la Figura 3.9 se presentan las distintas regiones localizadas en la construcción pAHDx5-BAR en Bluescript II (10.150 pb) y en cada uno de los otros dos vectores pAHBx7-BAR (9745 pb) y pAHDy10-BAR (9380 pb).

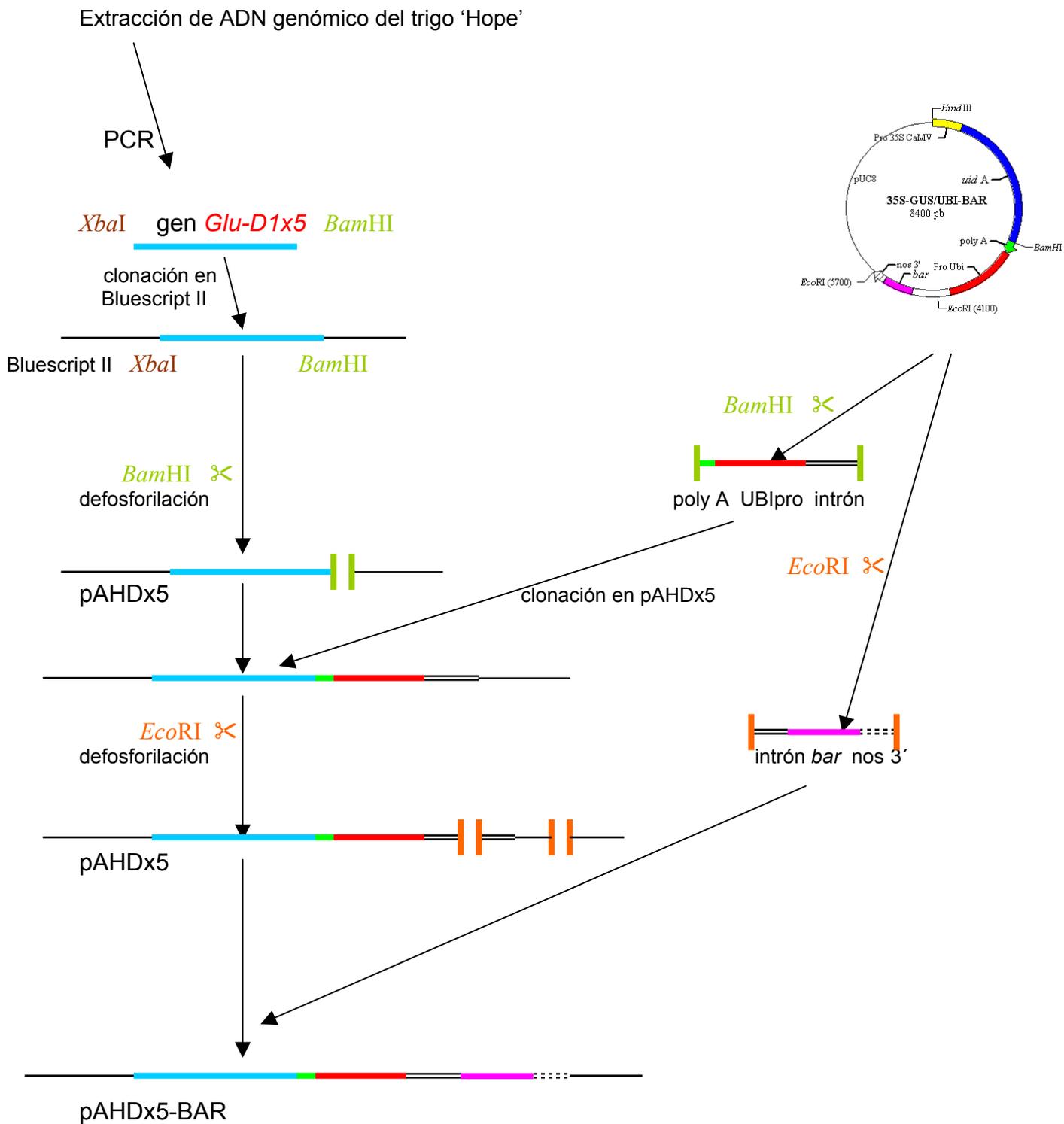
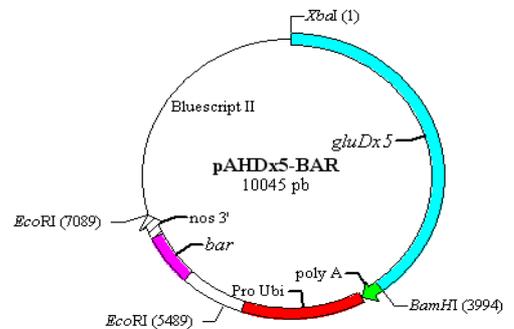


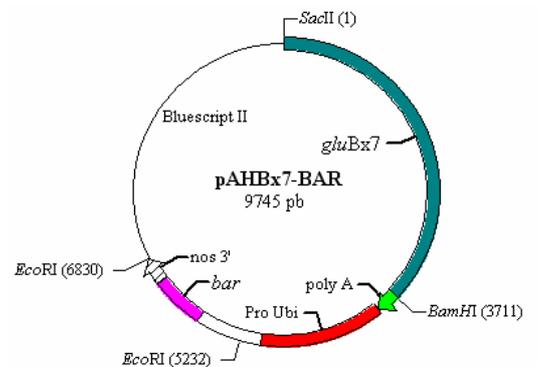
Figura 3.8.-Esquema de la construcción pAHDx5-BAR.

Figura 3.9.- Diagramas de los vectores pAHDx5-BAR, pAHBx7-BAR y pAHDy10-BAR utilizados en los experimentos de bombardeo

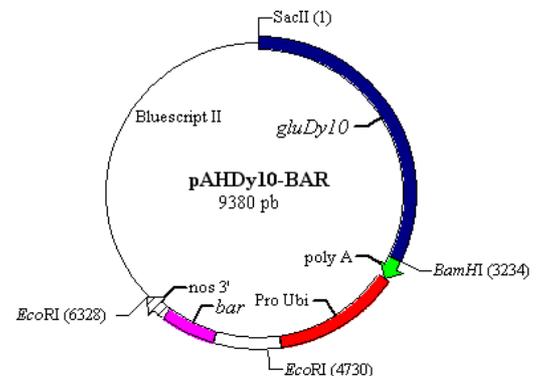
1-----1252→ promotor *GluDx5*
 1253---3802→ secuencia codificadora del gen *GluDx5*
 3996---4229→ poly (A)
 4230---6252→ promotor ubiquitina
 6271---6822→ gen *bar*
 6835---7089→ nos3'
 7090---10045→ esqueleto de Bluescript II



1-----1241→ promotor *Glu-B1x7*
 1242---3614→ secuencia codificadora del gen *Glu-B1x7*
 3711---3945→ poly (A)
 3946---5968→ promotor ubiquitina
 5986---6538→ gen *bar*
 6539---6829→ nos 3'
 6830--- 9745→ esqueleto de Bluescript II



1-----1206→ promotor *GluD1-y10*
 1207---3156→ secuencia codificadora del gen *GluD1-y10*
 3234---3468→ poly (A)
 3469---5491→ promotor ubiquitina
 5510---6061→ gen *bar*
 6062---6327→ nos 3'
 6328--- 9380→ esqueleto Bluescript II



3.2. TRANSFORMACIÓN EN TRITICALE.

Se han utilizados dos métodos, biolística e infección con *Agrobacterium*.

3.2.1. Biolística

Los ensayos de transformación se realizaron sobre dos tipos de materiales, embriones haploides de origen androgenético y embriones inmaduros.

3.2.1.1. EMBRIONES HAPLOIDES

3.2.1.1.1. Análisis de la expresión transitoria del gen uidA en embriones haploides de triticale

Tras el ensayo inicial de la eficacia de los vectores en una pequeña muestra de embriones (Tablas 3.1 y 3.2), se procedió al análisis de la expresión transitoria del gen *uidA* mediante tinción histoquímica (Jefferson, 1987) en 1.440 embriones haploides de las líneas de triticale ‘ATOPE-6’ y ‘ATOPE-22’. Estos embriones fueron bombardeados con micropartículas de oro de 1µm recubiertas con el vector pAHGUS, utilizando el cañón de partículas Biolistic® PDS-1000/He de BioRad. Se ha estudiado la influencia del genotipo, el tiempo de precultivo de los embriones haploides, la presión de helio y la distancia de disparo. Para cada uno de los genotipos y condiciones experimentales se han realizado tres repeticiones de 30 embriones haploides cada una. Tras el bombardeo y la tinción histoquímica se contabilizó el número de puntos azules (foci) que presentaba cada embrión haploide (Figura 3.10), como evidencia de la manifestación del ensayo GUS.

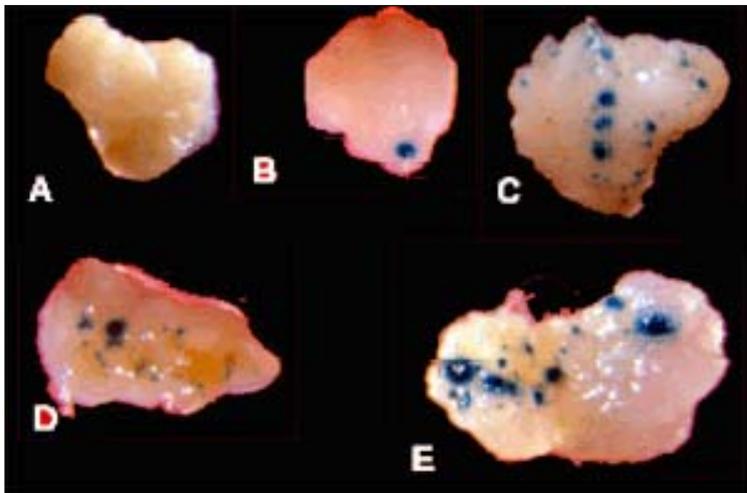


Figura 3.10.- Se muestran distintas condiciones de los embriones haploides bombardeados: A) Control negativo: embrión bombardeado sin vector; B) Embrión con 0 horas de precultivo, 1.100 psi y 6 cm de distancia; C) Embrión con 24 horas de precultivo, 1.100 psi y 6 cm de distancia; D) Embrión con 48 horas de precultivo, 1.800 psi y 9 cm de distancia; E) Embrión con 72 horas en precultivo, 1.100 psi y 9 cm de distancia.

En cada uno de los experimentos se utilizaron como control 30 embriones haploides bombardeados con partículas de oro pero sin ADN, no apareciendo en ningún caso puntos azules. Para cada una de las repeticiones se calculó el número de puntos azules por embrión (Tabla 3.4).

Tabla 3.4.- Media y desviación estándar del número de foci de expresión transitoria del gen uidA en las tres replicaciones de cada uno de los experimentos en embriones haploides de las líneas 'ATOPE-22' y 'ATOPE-6' de triticale.

GENOTIPO							
'ATOPE-22'				'ATOPE-6'			
Precultivo (horas)	Presión de helio (psi)	Distancia de disparo (cm)	foci/embrión haploide (\pm sd)	Precultivo (horas)	Presión de helio (psi)	Distancia de disparo (cm)	foci/embrión haploide (\pm sd)
0	1.100	6	2,41 (3,13)	0	1.100	6	2,02 (2,9)
24	1.100	6	3,33 (0,73)	24	1.100	6	0,63 (0,25)
48	1.100	6	0,89 (0,69)	48	1.100	6	1,1 (0,88)
72	1.100	6	2,41 (0,67)	72	1.100	6	0,21 (0,18)
0	1.100	9	1,2 (1,93)	0	1.100	9	1,87 (1,36)
24	1.100	9	0,59 (0,19)	24	1.100	9	0,24 (0,33)
48	1.100	9	0,13 (0,09)	48	1.100	9	2,3 (1,5)
72	1.100	9	0,03 (0,02)	72	1.100	9	1,83 (2,2)
0	1.800	6	1,2 (1,13)	0	1.800	6	0,08 (0,02)
24	1.800	6	1,14 (0,60)	24	1.800	6	0,86 (1,18)
48	1.800	6	0,17 (0,08)	48	1.800	6	0,6 (0,57)
72	1.800	6	0,31 (0,36)	72	1.800	6	0,8 (0,6)
0	1.800	9	0,37 (0,17)	0	1.800	9	0,14 (0,09)
24	1.800	9	0,15 (0,07)	24	1.800	9	0,33 (0,14)
48	1.800	9	0,32 (0,19)	48	1.800	9	0,7 (0,5)
72	1.800	9	0,47 (0,39)	72	1.800	9	0,3 (0,3)

Estos datos (x) fueron transformados con la función $\arcsen\sqrt{\alpha}$, $\alpha=x/10$ con el fin de normalizar su distribución. Con los datos normalizados se ha realizado un análisis de varianza (ANOVA) para cada uno de los parámetros estudiados (Tabla 3.5).

Tabla 3.5.- ANOVA para las variables analizadas en los experimentos de expresión transitoria del gen uidA en embriones haploides de las líneas ‘ATOPE-22’ y ‘ATOPE-6’ de triticale.
 - = no significativo; * = significativo; ***=altamente significativo

Variable	Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media²	F-ratio	Nivel de significación p<0,05
Genotipo	Entre grupos	1	38,81	38,81	0,357	0,557-
	Dentro de grupos	94	10.214,18	108,66		
	Total	95	10.252,99			
Precultivo	Entre grupos	3	19,02	6,34	0,057	0,982-
	Dentro de grupos	92	10.233,97	111,23		
	Total	95	10.252,99			
Distancia de disparo	Entre grupos	1	577,51	577,51	5,611	0,019*
	Dentro de grupos	94	9.675,48	102,93		
	Total	95	10.252,99			
Presión de helio	Entre grupos	1	1.124,90	1.124,90	11,58	0,001***
	Dentro de grupos	94	9.128,09	97,10		
	Total	95	10.252,99			

Influencia del genotipo

Los genotipos ATOPE-6’ y para ‘ATOPE-22’ forman parte de una colección de líneas haploides duplicadas obtenidas por androgénesis in vitro a partir del híbrido ‘ToxPe’ y fueron seleccionadas por su elevada producción de embriones haploides a partir del cultivo de anteras, 1,16 y 0,88 embrión haploide/antera, respectivamente. Estas líneas tienen una respuesta androgenética global muy diferente, siendo de 17,20 y 181,27 plantas haploides verdes/1.000 anteras para ‘ATOPE-6’ y para ‘ATOPE-22’, respectivamente. Los resultados de la expresión transitoria tras el bombardeo de los embriones haploides de ambas líneas, revelada por el número de foci, no son estadísticamente significativos (Tabla 3.5), siendo el número medio de foci por embrión haploide de 0,98 y de 0,78 para ATOPE-6’ y para ‘ATOPE-22’, respectivamente. A la vista de la diferente capacidad para regenerar plantas haploides verdes tal vez cabría esperar que la respuesta en la obtención de plantas transgénicas fuese igualmente distinta. Sin embargo, la expresión transitoria del gen uidA en las dos líneas resultó ser muy semejante.

Precultivo de los embriones haploides

Los embriones haploides fueron precultivados en un medio MS conteniendo 2 mg/l de 2,4-D durante 0, 24, 48 y 72 horas inmediatamente antes del tratamiento osmótico y del bombardeo. El análisis de la varianza indica que no hay diferencias

entre los distintos pretratamientos y el nivel de expresión transitoria del gen *uidA* en los embriones haploides (Tabla 3.5).

Parámetros del bombardeo de micropartículas: presión de helio y distancia de disparo

Se observó que hay diferencias significativas en la expresión del gen *uidA* a dos presiones de helio distintas: 1.100 y 1.800 psi (Tabla 3.5). En el primer caso el número de foci por embrión haploide fue de 1,262 y en el segundo de 0,463. También se han observado diferencias estadísticamente significativas cuando se emplea una distancia entre la pantalla de parada y los embriones haploides de 6 y de 9 cm (Tabla 3.5). En el primer caso se obtiene un número de foci por embrión haploide de 1,11 y en el segundo de 0,64.

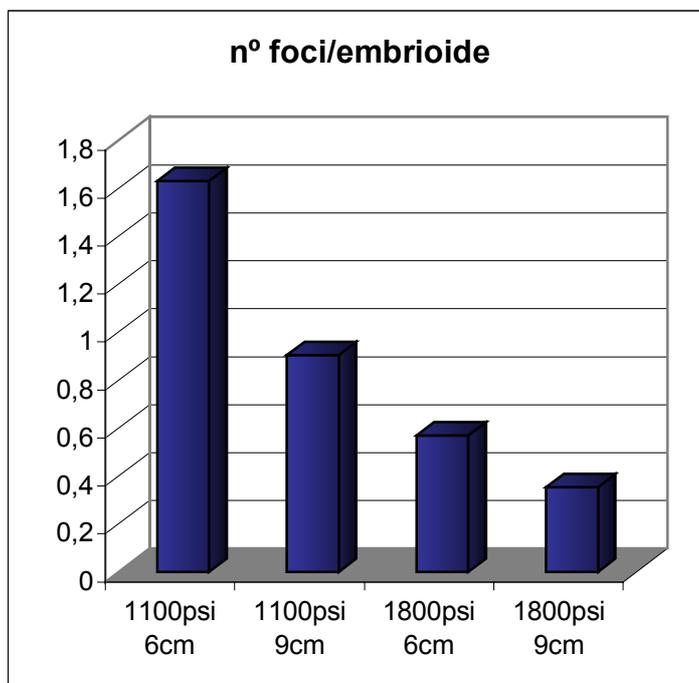


Figura 3.11.- Número medio de foci/embrión haploide bombardeado obtenidos con diferentes condiciones de presión de helio y distancia de disparo. Se consideraron el número total de embriones haploides provenientes de ambos genotipos.

Teniendo en cuenta el conjunto de resultados obtenidos variando las condiciones de bombardeo sobre los embriones haploides de los dos genotipos de triticale, ‘ATOPE-6’ y ‘ATOPE-22’, se puede deducir que la presión de helio tiene una mayor influencia en el número de foci que la distancia de disparo (Figura 3.11). La combinación de una presión de 1.100 psi y 6 cm de distancia es la que da lugar a un mayor número de foci por embrión haploide (1,63) y también la que produce el mayor número medio de embriones haploides que presentan al menos un focus (0,38). Sin embargo, una presión de 1.800 psi y una distancia de 9 cm, solamente da

lugar 0,35 foci por embrión haploide y un número medio de 0,18 embriones haploides que presentan uno o más foci.

3.2.1.1.2. Obtención de plantas transgénicas de la línea ‘ATOPE-22’ de triticale

A la vista de las condiciones que ofrecían los mejores resultados, 24 horas de precultivo, una presión de helio de 1.100 psi y una distancia de disparo de 6 cm, se procedió al bombardeo con vectores portadores de los genes de gluteninas sobre 610 embriones haploides de la línea ‘ATOPE-22’. Los embriones fueron bombardeados con micropartículas de oro de 1µm recubiertas con los vectores pAHDx5-BAR y pAHDy10-BAR empleando el cañón de partículas Biolistic® PDS-1000/He de BioRad. Los embriones bombardeados se sometieron a una selección temprana con PPT (2-5mg/L), recuperándose al final del proceso 6 plantas verdes haploides procedentes de los experimentos de bombardeo con el vectores pAHDx5-BAR y pAHDy10-BAR. Se llevó a cabo la extracción del ADN genómico en estas plántulas y se realizó un análisis mediante PCR, usando cebadores específicos para amplificar las secuencias transformantes y se confirmó la presencia de la secuencia del alelo *Glu-D1y10* (Figura 3.12). Tras el tratamiento con colchicina sólo una de las plántulas fue fértil obteniéndose 2 granos. Uno de los granos no germinó y el otro dio lugar a una planta que tras el análisis del ADN genómico mediante Southern-blot utilizando una sonda del gen *bar*, no mostró señal de hibridación.

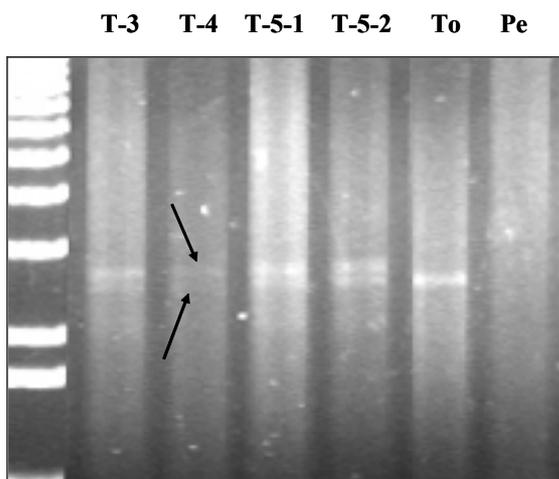


Figura 3.12.- Amplificación por PCR del ADN genómico de plantas androgenéticas procedentes de la línea ‘ATOPE-22’ de triticale: T-3; T-4; T-5-1 y T-5-2, resistentes al herbicida BASTA™, con cebadores específicos para el alelo *Glu-D1y10*. Parentales control: ‘Torote’ (To) y ‘Presto’ (Pe). Las flechas marcan los nuevos fragmentos amplificados.

3.2.1.2. EMBRIONES CIGÓTICOS INMADUROS

3.2.1.2.1. Análisis de la expresión transitoria del gen *uidA* en embriones cigóticos inmaduros de la línea ‘ATOPE-22’ de triticale

Se realizó el análisis de la expresión transitoria del gen *uidA* mediante tinción histoquímica (Jefferson, 1987) en 1.440 embriones cigóticos inmaduros de la línea ‘ATOPE-22’. Al igual que en el caso de los embriones de origen androgenético, los embriones cigóticos se bombardearon con el cañón de partículas Biolistic® PDS-1000/He de BioRad, utilizando micropartículas de oro de 1µm recubiertas con el vector pAHGUS.

Se evaluó la influencia del precultivo, la presión de helio y la distancia de disparo. Se realizaron tres repeticiones de 30 embriones para cada una de las condiciones experimentales. Tras el bombardeo y la tinción histoquímica se contabilizó el número de puntos azules que presentaba cada embrión (Figura 3.13) y se calculó para cada repetición el número medio de foci por embrión (Tabla 3.6). En cada uno de los experimentos se utilizaron como control 30 embriones cigóticos que fueron bombardeados con partículas de oro pero sin ADN, no apareciendo en ningún caso puntos azules.

*Tabla 3.6.- Media y desviación estándar del número de foci de expresión transitoria del gen *uidA* en las tres repeticiones de cada uno de los experimentos tras el bombardeo de embriones cigóticos de la línea ‘ATOPE-22’ de triticale.*

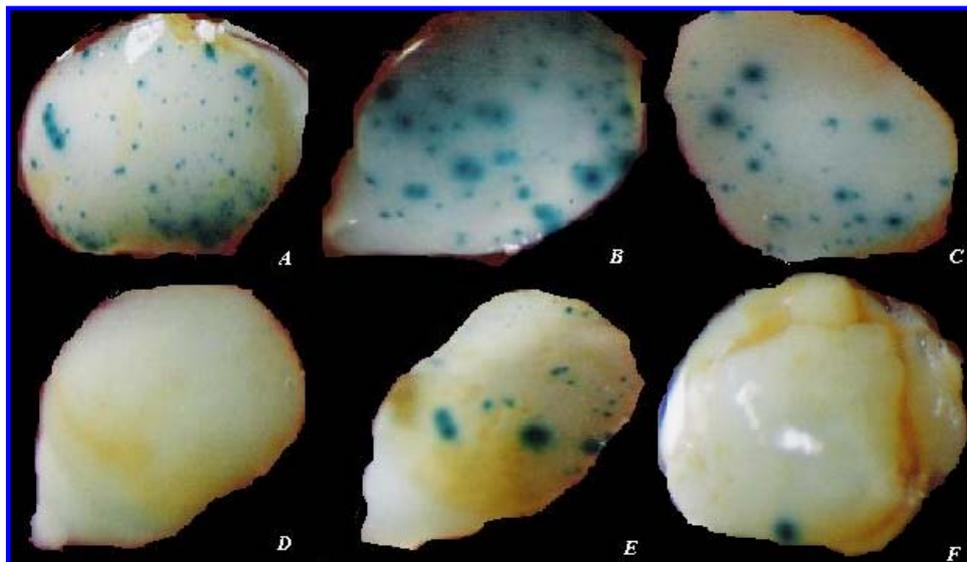
Precultivo (horas)	Presión de helio (psi)	Distancia de disparo (cm)	foci/embrión cigótico (±sd)
0	1.100	6	18,9 (2,4)
24	1.100	6	8,9 (4,4)
48	1.100	6	11,0 (2,0)
72	1.100	6	5,6 (2,0)
0	1.100	9	10,2 (3,0)
24	1.100	9	2,8 (1,7)
48	1.100	9	7,9 (3,7)
72	1.100	9	2,9 (1,6)
0	1.800	6	4,8 (1,2)
24	1.800	6	4,9 (2,4)
48	1.800	6	0,6 (0,1)
72	1.800	6	1,2 (1,4)
0	1.800	9	0,8 (0,7)
24	1.800	9	2,0 (1,0)
48	1.800	9	1,9 (1,5)
72	1.800	9	1,9 (1,5)

Estos datos (x) fueron transformados con la función $\arcsen\sqrt{\alpha}$, $\alpha=x/100$ para normalizar su distribución. Con los datos normalizados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada uno de los parámetros estudiados (Tabla 3.7).

Tabla 3.7.- ANOVA para las variables analizadas en los experimentos de expresión transitoria del gen uidA en embriones cigóticos inmaduros de la línea 'ATOPE-22' de triticale.
- = no significativo; * = significativo; ***=altamente significativo

Variable	Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media ²	F-ratio	Nivel de significación $p<0,05$
Precultivo	Entre grupos	3	253,85	84,62	2,169	0,105-
	Dentro de grupos	44	1.716,64	39,01		
	Total	47	1.970,48			
Distancia de disparo	Entre grupos	1	159,76	159,76	4,059	0,049*
	Dentro de grupos	46	1.810,72	39,36		
	Total	47	1.970,48			
Presión de helio	Entre grupos	1	830,09	830,09	33,483	0,000***
	Dentro de grupos	46	1.140,40	24,79		
	Total	47	1.970,48			

Figura 3.13.- Embriones cigóticos inmaduros transformados por bombardeo de micropartículas de oro cubiertas con el vector pAHGUS. Se muestran distintas condiciones de los embriones bombardeados: A) Embrión con 24 horas de precultivo, 1100 psi y distancia 6 cm; B) Embrión con 0 horas de precultivo, 1100 psi y distancia 6 cm; C) Embrión con 48 horas de precultivo, 1100 psi y distancia 9 cm; D) Embrión con 0 horas de precultivo, 1100 psi y distancia 9 cm; E) Embrión con 0 horas en precultivo, 1100 psi y distancia 9 cm. F) Embrión con 72 horas en precultivo, 1800 psi y distancia 6 cm.



Precultivo de los embriones cigóticos inmaduros

Los embriones cigóticos inmaduros fueron precultivados en un medio MS conteniendo 2 mg/l de 2,4 D durante 0, 24, 48 y 72 horas inmediatamente antes del tratamiento osmótico y del bombardeo. El análisis de varianza muestra que no hay diferencias en el número de foci, demostrativo de la expresión transitoria del gen *uidA*, observados en los embriones cigóticos inmaduros de la línea ‘ATOPE-22’ sometidos a distintos tiempos de precultivo (Tabla 3.7).

Parámetros del bombardeo de micropartículas: presión de helio y distancia de disparo

Se observó que hay diferencias muy significativas en la expresión del gen *uidA* tras el bombardeo a dos presiones de helio: 1.100 y 1.800 psi (Tabla 3.7). En el primer caso el número medio de foci por embrión fue de 8,5 y en el segundo de 2,3. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos a las distancias de 6 y de 9 cm entre la pantalla de parada y los embriones cigóticos inmaduros (Tabla 3.7). En el primer caso se obtuvo un número medio de foci por embrión de 7,0 y en el segundo de 3,8.

Teniendo en cuenta el conjunto de resultados obtenidos del bombardeo de los embriones cigóticos inmaduros a diferentes tiempos de precultivo, se observa que la presión de helio tiene mayor influencia en el número de foci que la distancia de disparo (Figura 3.14). La combinación de una presión de 1.100 psi y una distancia de 6 cm es la que da lugar a un mayor número de foci por embrión (11,1), mientras que una presión de 1.800 psi y una distancia de 9 cm solamente da lugar 1,65 foci por embrión.

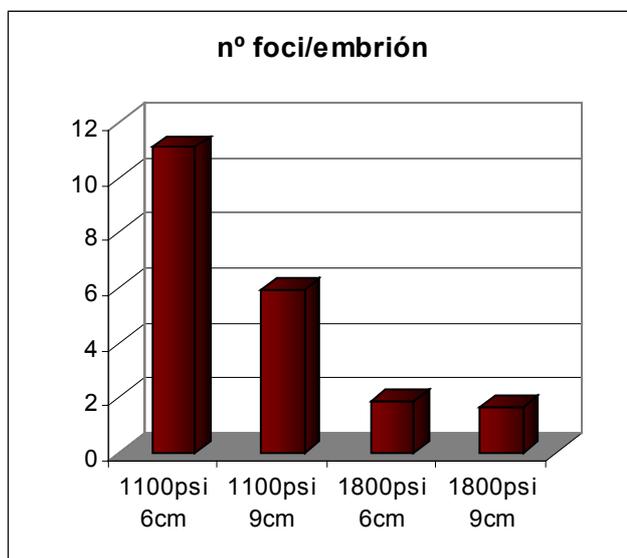


Figura 3.14.- Número de foci/embriones cigótico inmaduros de la línea ‘ATOPE.22’ bombardeados para su transformación con el vector *pAHGUS*, obtenidos en diferentes condiciones de presión de helio y distancia de disparo.

3.2.2. Transformación mediante *A. tumefaciens*

Los experimentos de transformación con *Agrobacterium tumefaciens* se realizaron sobre dos tipos de materiales, embriones haploides de origen androgenético y embriones inmaduros.

3.2.2.1. EMBRIONES HAPLOIDES

3.2.2.1.1. Análisis de la expresión transitoria del gen *uidA* en embriones haploides de la línea ‘ATOPE-22’ de triticales

Se infectaron 885 embriones haploides de la línea ‘ATOPE-22’ de triticales con la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* portadora de los vectores pAL154/156. Se analizó la influencia que tiene el tiempo de inoculación y el tiempo de co-cultivo de los embriones con *A. tumefaciens* sobre el número de focos por embrión. Para cada una de las condiciones experimentales se han realizado tres repeticiones de 15 embriones cada una. Tras la infección se llevó a cabo la tinción histoquímica (Jefferson, 1987). No hubo expresión transitoria del gen *uidA* en ninguna de las condiciones probadas.

3.2.2.2. EMBRIONES CIGÓTICOS INMADUROS

3.2.2.2.1. Análisis de la expresión transitoria del gen *uidA* en embriones cigóticos inmaduros de la línea ‘ATOPE-22’ de triticales

Se trataron 360 embriones cigóticos de la línea ‘ATOPE-22’ con la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* portadora de los plásmidos pAL154/156. Se analizó la influencia del tiempo de precultivo y el tiempo de inoculación de los embriones con *A. tumefaciens* sobre el número de focos por embrión (Figuras 3.15). Para cada una de las condiciones experimentales se han realizado tres repeticiones de 10 embriones cada una. Tras la infección y la tinción histoquímica se contabilizó el número de focos que presentaba cada embrión y se calculó el número medio de puntos por embrión para cada repetición (Tabla 3.8).

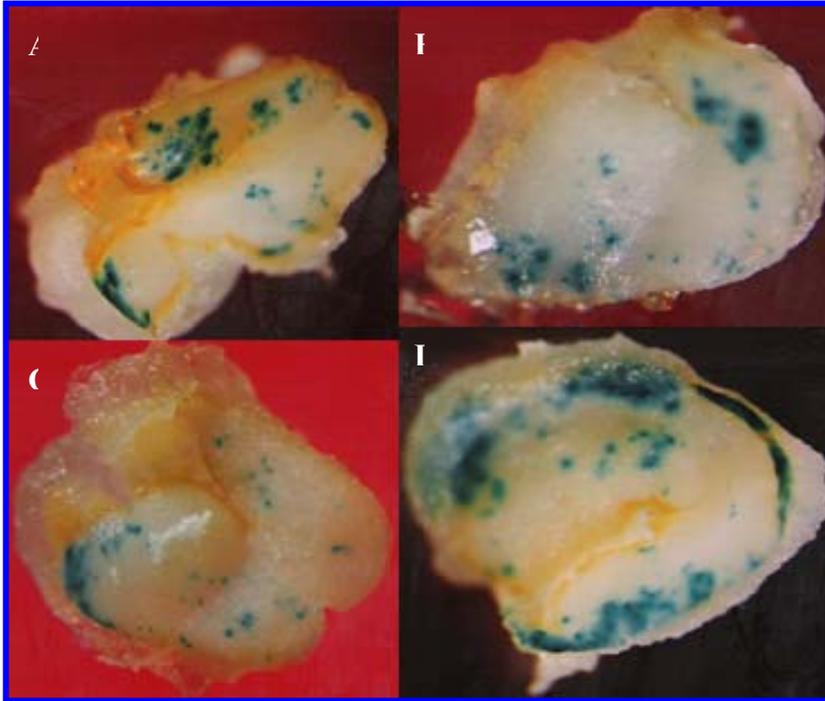


Figura 3.15.- Embriones cigóticos inmaduros de la línea 'ATOPE-22' de triticale transformado con la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* portadora de los vectores pAL154/pAL156 con distintas condiciones de precultivo e inoculación con la bacteria. A) Embrión con 0,5 horas de precultivo y 2 horas de inoculación; B) Embrión con 1 hora de precultivo y 3 horas de tiempo de inoculación; C) Embrión con 0,5 horas de precultivo y 1,5 horas de inoculación; D) Embrión con 0,5 horas de precultivo y 3 horas de inoculación.

En la Figura 3.15 se observa que la distribución de los puntos azules en cada uno de los embriones es menos homogénea en el embrión que en el caso de los embriones transformados por biolística (ver Figura 3.13), habiendo un mayor número de foci en los bordes de los mismos.

Tabla 3.8.- Media y desviación típica del número de foci de expresión transitoria del gen uidA obtenidos en los diferentes tiempos de inoculación y precultivo en la variedad 'ATOPE-22' de triticale.

TIEMPO DE PRECULTIVO	TIEMPO DE INOCULACIÓN			
	'ATOPE-22'			
		2h	3h	Media
0,5 h	14,13 (2,87)	17,22 (9,44)	14,80 (2,50)	15,38 (1,62)
1h	0,17 (0,20)	7,75 (4,77)	11,75 (2,90)	6,56 (5,88)
3h	1,60 (1,50)	3,87 (2,05)	7,73 (1,75)	4,40 (3,09)
24h	0,10 (0,10)	1,10 (1,90)	0,40 (0,70)	0,20 (0,20)
Media	(6,79)	(7,04)	(6,23)	(4,74)

Los datos (x) fueron transformados con la función $\arcsen\sqrt{\alpha}$, $\alpha=x/100$ para normalizar su distribución. Con los datos normalizados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada uno de los parámetros estudiados (Tabla 3.9).

Tabla 3.9.- ANOVA para las variables analizadas en los experimentos de expresión transitoria del gen *uidA* en embriones cigóticos inmaduros de la línea 'ATOPE-22' de triticale.
- = no significativo***=altamente significativo

Variable	Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados		F ratio	Nivel de significación $p < 0,05$
Tiempo de precultivo	Entre grupos	3	1.933,52	644,50	18,64	0,000***
	Dentro de grupos	32	1.106,54	34,58		
	Total	35	3.040,06			
Tiempo de inoculación	Entre grupos	2	372,56	186,28	2,30	0,116-
	Dentro de grupos	33	2.667,50	80,83		
	Total	35	3.040,06			

Influencia del tiempo de precultivo

Se precltivaron los embriones cigóticos inmaduros en el medio de inoculación durante 0,5; 1; 3 y 24 horas antes de la infección con *A. tumefaciens*. El análisis de varianza demuestra la existencia de diferencias significativas en el número de foci, a los distintos tiempos de precultivo de los embriones cigóticos inmaduros de la línea 'ATOPE-22' ensayados antes de la infección. El tiempo de precultivo que da lugar a un mayor número de foci por embrión es el de 0,5 horas.

Influencia del tiempo de inoculación

El análisis de varianza realizado para la comparación de los resultados obtenidos con diferentes tiempos de inoculación de 1,5; 2 y 3 horas, demuestra la inexistencia de diferencias estadísticamente significativas en el nivel de expresión del gen *uidA*. Sin embargo se aprecia el aumento de la media del número de foci por embrión (Tabla 3.8) con la prolongación del tiempo de inoculación.

3.2.2.2.2. Obtención de plantas transgénicas de la línea 'ATOPE-22' de triticale

Se trataron 540 embriones de la línea 'ATOPE-22' de triticale con la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* portadora de los plásmidos pAL154/156, en las mejores condiciones obtenidas en los ensayos de expresión transitoria del gen *uidA*: 0,5 horas de

precultivo y 2 o 3 horas de inoculación. Tras llevar a cabo una selección tardía se obtuvieron 30 plantas resistentes a PPT (Figura 3.16). De éstas se llevó a cabo la extracción de ADN genómico y se realizó un análisis de la presencia de las secuencias transformantes mediante Southern-blot. El resultado al hibridar con una sonda del gen *bar* fue negativo en todas ellas.



Figura 3.16.- Callos regenerando plántulas de la variedad 'ATOPE-22' de triticale en un medio selectivo con 4 mg/L de PPT.

3.3. TRANSFORMACIÓN DE VARIEDADES DE TRIGO.

En el caso del trigo se han hecho ensayos de transformación únicamente sobre embriones cigóticos utilizando los dos métodos, biolística e infección con *Agrobacterium*. Como paso previo a los experimentos de transformación se analizó la capacidad de regenerar plántulas a partir del cultivo de embriones inmaduros de las variedades 'Craklin' y 'Anza'. Siendo de 0,5 y 0,98 plántulas por embrión en 'Anza' y 'Craklin', respectivamente.

3.3.1. Biolística

3.3.1.1. OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE LAS VARIEDADES 'ANZA' Y 'CRAKLIN' MEDIANTE BIOLÍSTICA

Como material vegetal para la obtención de plantas transgénicas por este procedimiento se utilizaron embriones inmaduros de las variedades comerciales de trigo hexaploide 'Anza' y 'Craklin'. Se bombardearon los embriones de 'Anza'

simultáneamente con los vectores pAHDx5-BAR y pAHDy10-BAR y de la variedad ‘Craklin’ con el plásmido pAHBx7-BAR. Las condiciones de bombardeo para todos los ensayos consistieron en una presión de disparo de 1.100 psi y 24 horas de precultivo, adoptadas en función de los resultados de los ensayos de expresión transitoria con embriones haploides y cigóticos inmaduros de triticale. Además se llevaron a cabo dos tipos de selección del material bombardeado: temprana y tardía.

3.3.1.1.1. Transformación de la variedad ‘Anza’

Selección temprana

Tras el bombardeo de 2.072 embriones de la variedad ‘Anza’ con los vectores pAHDx5-BAR y pAHDy10-BAR, se llevó a cabo una selección temprana del material tratado durante el primer mes, en un medio que contenía 2 mg/l de PPT. Transcurrido este tiempo, los embriones supervivientes se transfirieron a un medio de regeneración conteniendo 5 mg/l de PPT. De este modo se obtuvieron dos plantas en cuyo ADN genómico se analizó la presencia de las secuencias transformantes mediante la utilización de dos tipos de análisis: PCR y Southern-blot, aplicando cebadores y sondas que permitían detectar el gen *bar*. En ambos casos los resultados fueron negativos, por lo que se concluyó que estas plantas resultaron ser escapes al proceso de selección con PPT.

Selección tardía

Se bombardearon 1.560 embriones de la variedad ‘Anza’ con los vectores pAHDx5-BAR y pAHDy10-BAR, que se sometieron a una selección tardía con PPT (4 mg/l) añadido al medio de regeneración de las plántulas. Para analizar la presencia del ADN transformante se extrajo ADN genómico de las plantas supervivientes, en distintos estadios de crecimiento. De este modo, se utilizó un análisis con PCR cuando las plántulas se encontraban aun en el medio de selección con 4 mg/l de PPT. También se llevó a cabo un análisis mediante Southern-blot en ADN genómico de hojas de plantas, que se encontraban creciendo en condiciones de invernadero y en estado avanzado de desarrollo sin contacto con el herbicida. Así, de los 1.560 embriones cigóticos inmaduros bombardeados se obtuvieron 61 plántulas durante el proceso de selección tardía, de las que 43 dieron positivo por análisis de PCR para la presencia de las secuencias transformantes. Los cebadores utilizados para amplificar

el gen *bar* incluyeron parte del promotor de la ubiquitina y parte del terminador nos del gen *bar*, (Figura 3.17). Sin embargo, de las 61 plántulas regeneradas sólo 15 llegaron a planta adulta y de ellas sólo una (planta 25) manifestó la presencia de la secuencia *bar* al realizar el análisis molecular mediante Southern-blot (Figura 3.18).

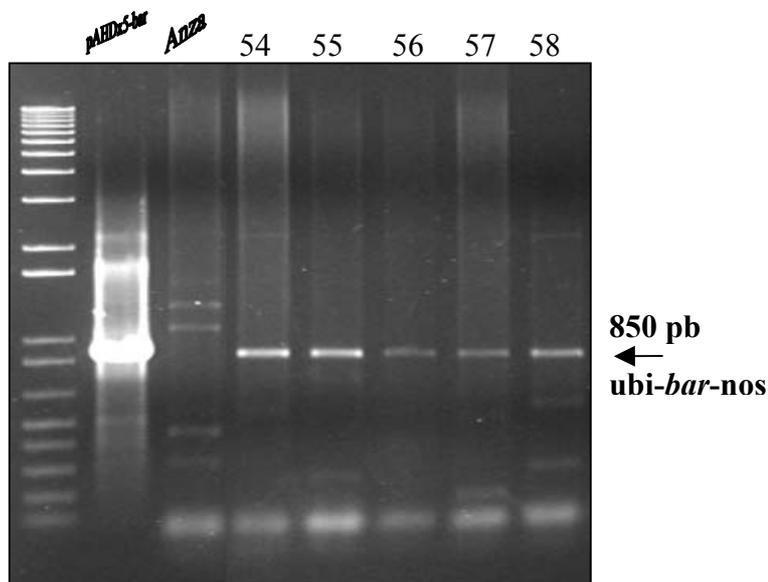


Figura 3.17.- Ejemplo de análisis de PCR en plántulas de la variedad de trigo ‘Anza’ transformadas por biolística. Las plantas son designadas del 54 al 58. Como control negativo se ha utilizado el trigo ‘Anza’ y como control positivo el plásmido pAHDx5-BAR.

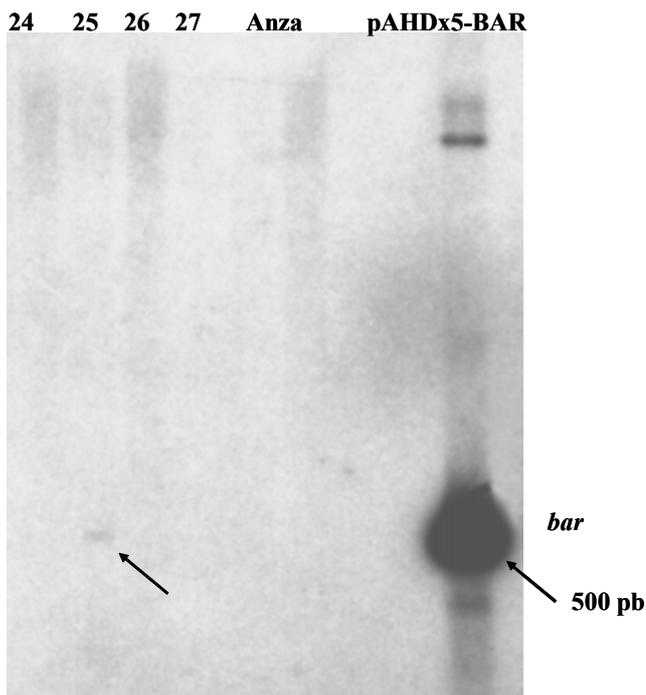


Figura 3.18.- Southern-blot de ADN genómico de plantas de trigo de la variedad ‘Anza’ transformadas por bombardeo de micropartículas y digeridos con *EcoRI* indicando presencia o ausencia de banda al hibridarse con la sonda *bar* marcada con P^{32} . Las plantas son designadas del 24 al 27. Como control negativo se ha utilizado el trigo ‘Anza’ y como control positivo el plásmido pAHDx5-BAR.

3.3.1.1.2. Transformación de la variedad ‘Craklin’

Selección temprana

Se bombardearon 238 embriones de la variedad ‘Craklin’ con el vector pAHBx7-BAR en las mismas condiciones de la variedad ‘Anza’. Tras la selección temprana no se consiguió regenerar ninguna planta resistente al herbicida.

Selección tardía

Se llevó a cabo el bombardeo de 2.000 embriones de la variedad ‘Craklin’ con las condiciones de bombardeo anteriores y el vector pAHBx7-BAR. Durante el proceso de selección tardía con PPT (4 mg/l) se obtuvieron 163 plántulas de las cuales sólo 20 llegaron a planta adulta. El análisis del ADN transformante llevado a cabo mediante Southern-blot empleando una sonda del gen *bar* marcada con P³² sobre el ADN genómico de estas plantas, resultó negativo, no detectándose hibridación en ninguna de las plantas.

3.3.2. Transformación mediante *A. tumefaciens*

3.3.2.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN TRANSITORIA DEL GEN *UIDA* EN EMBRIONES CIGÓTICOS INMADUROS DE TRIGO

Se infectaron 540 embriones cigóticos inmaduros de cada una de las variedades de trigo ‘Anza’ y ‘Craklin’ con la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* portadora de los vectores pAL154/156. Se analizó la influencia de los tiempos de precultivo e inoculación de los embriones con *A. tumefaciens*, contabilizando el número de foci por embrión. Para cada una de las condiciones experimentales se han realizado tres repeticiones de 15 embriones cada una. Tras la infección y la tinción histoquímica se contabilizó el número de foci que presentaba cada embrión cigótico inmaduro y se calculó el número de puntos por embrión para cada repetición (Tabla 3.10).

Estos datos (x) fueron transformados con la función $\arcsen\sqrt{\alpha}$, $\alpha=x/100$ para normalizar su distribución. Con los datos normalizados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada uno de los parámetros estudiados (Tabla 3.11).

Tabla 3.10.- Media y desviación típica del número de
obten y
precultivo de embriones inmaduros de las variedades de trigo ‘Craklin’ y ‘Anza’.

Tiempo precultivo	Tiempo de inoculación							
	‘Craklin’				‘Anza’			
		2 h	3 h	Media	1,5 h	2 h	3 h	Media
0,5 h	25,9 (30,15)	24,07 (4,45)	28,80 (11,70)	26,26 (2,38)	10,83 (2,63)	10,2 (2,52)	37,56 (33,04)	19,53 (
1 h	43,57 (17,35)	40,73 (8,73)	11,13 (2,48)	31,81 (31,07 (24,45)	23,97 (21,04)	24,30 (19,39)	26,44 (4,01)
3 h	39,70 (9,25)	23,20 (9,10)	28,63 (21,49)	30,51 (8,41)	1,6 (1,35)	2,9 (3,51)	6,38 (4,21)	3,63 (2,47)
24 h	0,27 (0,46)	3,77 (0,51)	16,02 (4,99)	6,69 (8,27)	0 (0)	1,83 (3,17)	15,57 (5,31)	5,8 (8,51)
Media	(19,59)	(15,11)	(8,97)	(8,45)	(14,28)	(10,20)	(13,27)	(8,53)

Tabl
gen uidA en
'y 'Anza'.
- = no significativo; * = significativo; ***=altamente significativo

Variable	Fuente de variación	Grados de lib d	Suma de cuadrados	Media ²	F-ratio	Nivel de s p<0,05
Tiempo de precultivo	Entre grupos	3	5.339,99	1779,99	12,75	0,000***
	Dentro de grupos	68	9.494,65	139,63		
	Total	71	14.834,64			
Tiempo de inoculación	Entre grupos	2	512,62	256,31	1,23	0,297-
	Dentro de grupos	69	14.322,02	207,56		
	Total	71	14.834,64			
Genotipo	Entre grupos	1	899,59	899,59	4,52	0,037*
	Dentro de grupos	70	13.935,05	199,07		
	Total	71	14.834,64			

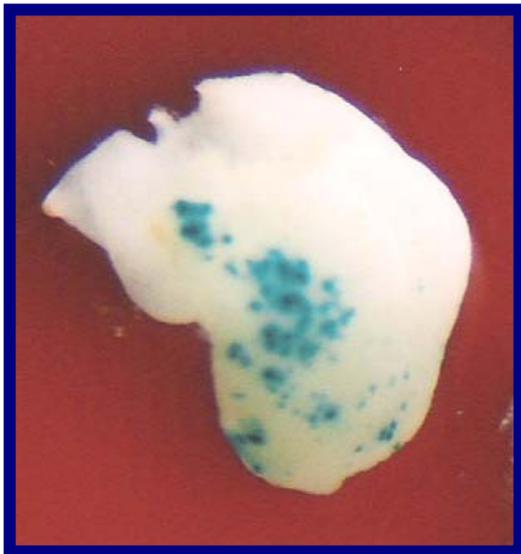
Influencia del genotipo

Se han observado diferencias estadísticamente significativas en la expresión transitoria del gen uidA en los embriones cigóticos inmaduros de las variedades de trigo ‘Craklin’ y ‘Anza’ (Tabla 3.11). El número medio de foci por embrión fue de 23,82 y de 13,85, respectivamente.

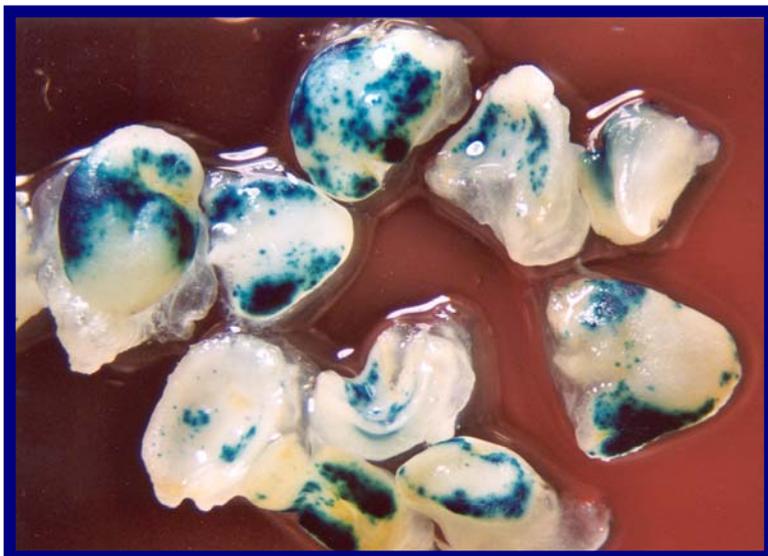
Influencia del tiempo de precultivo

Los embriones cigóticos inmaduros de ambos trigos fueron precultivados en el medio de inoculación durante 0,5; 1; 3 y 24 horas antes de la infección con *A. tumefaciens*. El análisis de varianza demuestra que hay diferencias significativas en el nivel de expresión transitoria del gen *uidA* de los embriones entre los distintos tiempos de precultivo.

Se observan diferencias entre las dos variedades en cuanto a la media del número de foci por embrión en todos los tiempos de precultivo. En todos los casos la variedad ‘Craklin’ mostró un mayor número medio de foci por embrión, llegando a ser muy superior en el caso del tiempo de precultivo de 3 horas. Los tiempos de precultivo que dan lugar a un mayor número medio de foci por embrión, resultaron ser de 1 y 3 horas en la variedad ‘Craklin’ (Figuras 3.19 y 3.20) y de 1 hora en la variedad ‘Anza’.



*Figura 3.19.-Embrión cigótico inmaduro de la variedad de trigo ‘Craklin’, transformado mediante *A. tumefaciens* llevando a cabo un precultivo de 0,5 horas, tras 3 horas de inoculación con la bacteria.*



*Figura 3.20.- Embriones cigóticos inmaduros de la variedad ‘Craklin’ transformados mediante *A. tumefaciens* tras un precultivo de 1 hora y 2 horas de tiempo de inoculación con la bacteria.*

Influencia del tiempo de inoculación

El análisis de varianza no demuestra diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tiempos de inoculación 1,5; 2 y 3 horas. No obstante, al observar la media del número de foci por embrión (Tabla 3.10) se observa un ligero incremento al aumentar el tiempo de inoculación en los embriones de la variedad ‘Anza’. El número medio de foci por embrión permaneció más o menos constante en el caso de los embriones de la variedad ‘Craklin’.

Del conjunto de resultados de las tres variables analizadas, la que resulta más determinante y muestra una mayor influencia en el número de foci por embrión es el tiempo de precultivo, siendo el tiempo de 1 hora el que ofrece las mejores perspectivas de transformación por *Agrobacterium* como lo demuestra la mayor expresión del gen *uidA*. Además, el tiempo de inoculación dependería del genotipo ensayado. Los mejores resultados, en cuanto al mayor número medio de foci por embrión inoculado, los ofreció la variedad ‘Craklin’, para tiempos de inoculación de 1,5 y 2 horas y ‘Anza’ para tiempos de inoculación de 3 horas.

3.3.2.2. OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE LAS VARIEDADES ‘ANZA’ Y ‘CRAKLIN’ MEDIANTE *A. TUMEFACIENS*

Se infectaron un total de 685 embriones cigóticos inmaduros con la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* portadora de los vectores pAL154/156, tanto de la variedad ‘Anza’ como ‘Craklin’. La infección se llevó a cabo con las distintas combinaciones de los tiempos de precultivo y de inoculación descritos anteriormente. Se realizó una selección tardía del material transformado.

3.3.2.2.1. Transformación de la variedad ‘Anza’

Se trataron 685 embriones cigóticos inmaduros de ‘Anza’. Durante el proceso de selección tardía se obtuvieron 68 plántulas (Figura 3.21) de las cuales 24 fueron analizadas por PCR y de ellas 2 resultaron ser positivas para el gen *bar*. Los cebadores utilizados para amplificar el gen *bar* incluyeron parte del promotor de la ubiquitina y parte del terminador nos del gen *bar*. Finalmente se obtuvieron 3 plantas adultas de las que mediante el análisis por Southern-blot con sondas de los genes *uidA* y *bar* ninguna reveló la presencia del ADN transformante.



Figura 3.21.-Plántulas de la variedad de trigo 'Anza' transformadas mediante A. tumefacines regenerando en un medio de selección con 4mg/L de PPT.

3.3.2.2.2. Transformación de la variedad 'Craklin'

Se trataron 685 embriones cigóticos inmaduros de 'Craklin'. Durante el proceso de selección tardía se analizaron 148 plántulas (Figura 3.22) de las cuáles 7 fueron positivas por PCR para el gen *bar* (Figura 3.23). Los cebadores utilizados para amplificar el gen *bar* incluyeron parte del promotor de la ubiquitina y parte del terminador nos de este gen. Finalmente, se obtuvieron 6 plantas adultas (Figura 3.24) que tras el análisis por Southern-blot con sondas de los genes *uidA* y *bar* permitió identificar una planta positiva (T0) para ambos genes (Figuras 3.24 y 3.25).



Figura 3.22.- Plántulas de la variedad de trigo 'Craklin' transformadas con A. tumefacines sometidas a selección con 4mg/L de PPT.

Esta planta transgénica resultó fértil, por lo que se recogió toda la semilla procedente de su autofecundación (T1) y se analizó la permanencia del ADN transformante en el ADN genómico de una parte de su descendencia, mediante dos métodos. En primer lugar se aplicó Southern-blot, utilizando una sonda del gen *bar* para detectar el ADN transformante en ADN procedente de hoja. En segundo lugar se aplicó PCR para amplificar el ADN procedente de semilla, usando el kit REExtract-N-AmpTM Seed PCR (SIGMA) y los cebadores que amplifican el gen *uidA*. Del conjunto de plantas analizadas se detectó la presencia del transgén *gus* en tres de ellas (Tabla 3.12 y Figura 3.27).

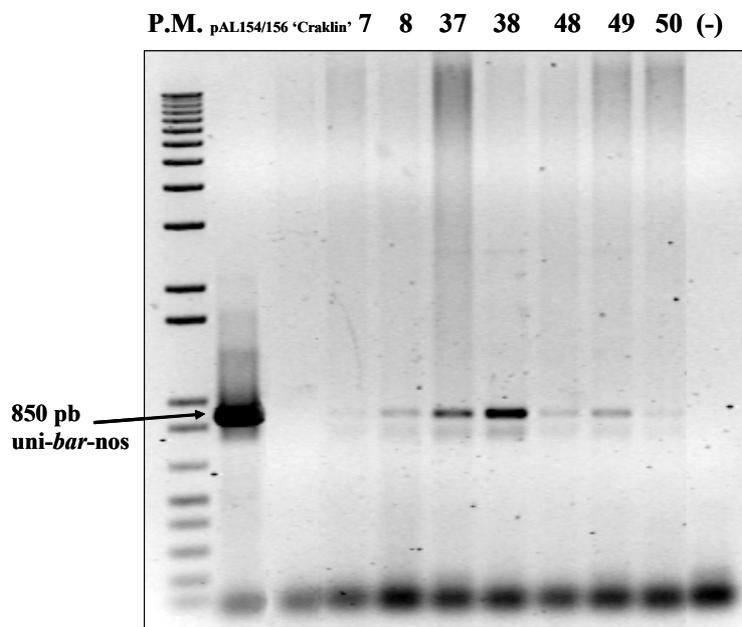


Figura 3.23.- Ejemplo de análisis de PCR en plántulas de la variedad de trigo 'Craklin' (7, 8, 37, 38, 48, 49 y 50) transformadas mediante A. tumefaciens, como control negativo se ha utilizado ADN del trigo 'Craklin' sin transformar y como control positivo el plásmido pAL156.

Figura 3.24.- Plantas transformadas de la variedad de trigo 'Craklin' supervivientes tras la selección con PPT.



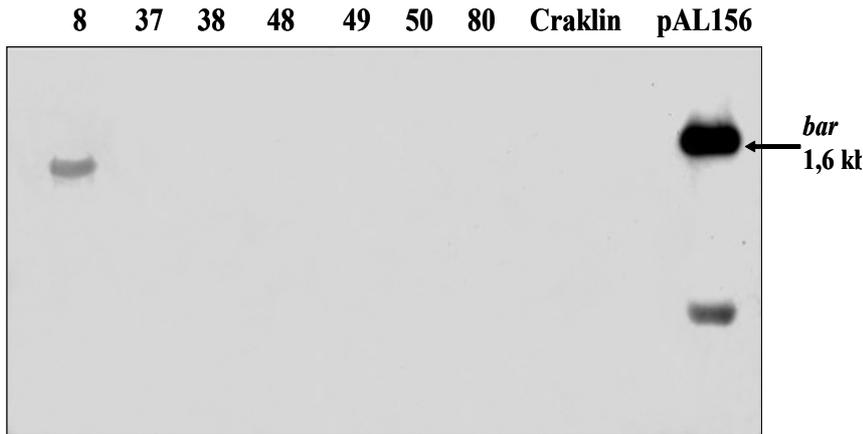


Figura 3.25.- Southern-blot de ADN genómico de 7 plantas de la variedad ‘Craklin’ transformadas mediante *A. tumefaciens* y digeridos con la enzima *Bgl*III que permite conocer el número de copias integradas en el genoma al hibridar con una sonda del gen *bar* marcada con P^{32} . Como control (-) ADN genómico de la variedad ‘Craklin’ sin transformar y como control (+) el plásmido *pAL156*.

Figura 3.26.- Southern-blot de ADN genómico de trigos de la variedad ‘Craklin’. Se muestra la presencia de la secuencia transformante en la planta 8. Los ADN genómicos fueron digeridos con la enzima *Bgl*III indicando el número de copias integradas en el genoma al hibridar con una sonda del gen *uidA*; como control negativo se utilizó el trigo ‘Craklin’ sin transformar y como control positivo el plásmido *pAL156*.

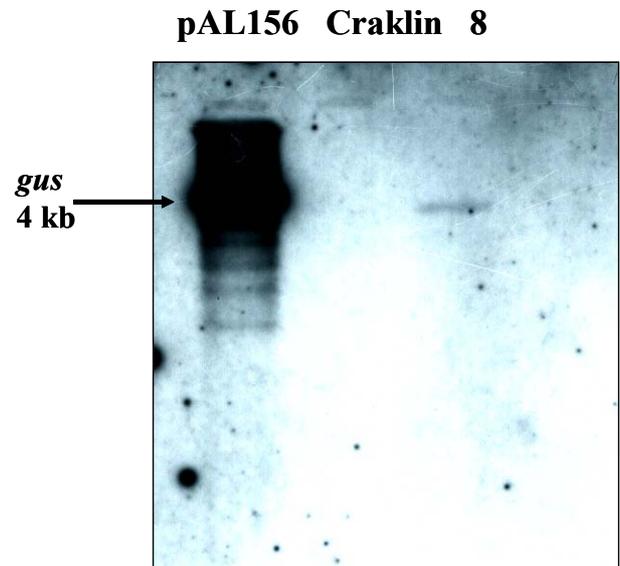


Tabla 3.12.-Resultados obtenidos al analizar la descendencia (T1) del trigo ‘Craklin’ que fue transformado con los vectores *pAL154/156* mediante *A. tumefaciens*.

Espiga (T0)	Nº de semillas (T1)	Nº de semillas analizadas por Southern-blot mediante una sonda del gen <i>bar</i>	Nº de semillas analizadas por PCR	Nº de plantas T1(+)
1	16	5	5	0
2	24	5		0
3	43	5		0
4	34	5		0
5	16	5		0
6	38		5	1
7	19		10	0
8	24		5	0
9	29		5	1
10	6		5	0
11	47		5	0
12	22		5	1

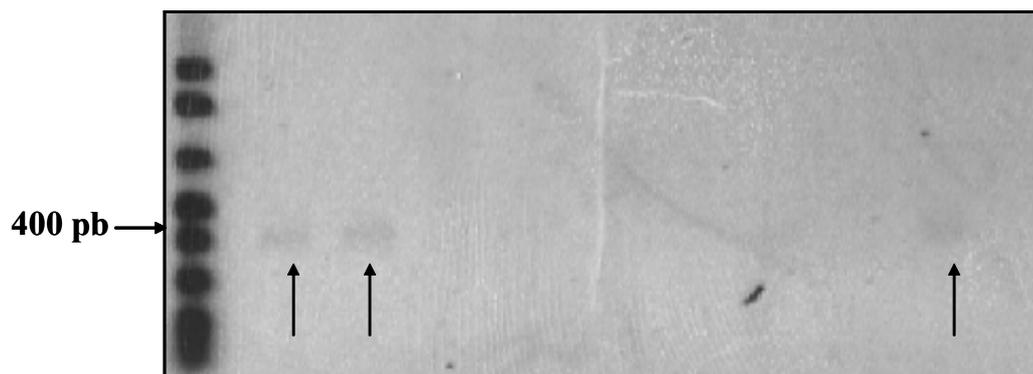


Figura 3.27.- Detección del transgén uidA por PCR en plantas T1 descendientes de una forma transgénica T0 del trigo ‘Craklin’, obtenida por transformación mediante A. tumefaciens.

4.DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN.

4.1. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES Y EFICACIA DE SU UTILIZACIÓN.

La introducción de genes específicos en células vegetales mediante biolística o *Agrobacterium*, requiere la utilización de plásmidos en los que insertar el ADN correspondiente al gen junto con los elementos de control necesarios para su transferencia, selección, detección y expresión. Estos plásmidos deben contener al menos un origen de replicación bacteriano, un marcador de selección y un sitio de multiclonaje en el que se incluya la secuencia de ADN deseada. Todo ello va a permitir que el vector obtenido se replique y se mantenga en una bacteria como puede ser *Escherichia coli*, y que una vez aislado y purificado sirva para los experimentos de transformación.

El ADN que se introduce en el plásmido (cassette) debe contener una serie de elementos para permitir la expresión adecuada y óptima del gen. Un cassette normalmente debe constar de un promotor, un marco abierto de lectura y un sitio de poliadenilación que sea funcional en plantas. En el caso de la transformación mediante biolística, el esqueleto del plásmido en el que se inserta el ADN de interés, no parece tener una gran importancia a la hora de la liberación del ADN por bombardeo en las células (Altpeter y col., 2005), incluso se han conseguido plantas transgénicas utilizando ADN “limpio” donde las secuencias de los vectores fueron eliminadas y sólo se empleó el ADN de interés. En un trabajo realizado por Fu y col. (2000) para la obtención de plantas transgénicas de arroz, se demostraba la posibilidad de obtener mejores resultados de integración y en menor número de copias con ADN “limpio” que con los vectores completos.

En el presente trabajo se han desarrollado y utilizado en los experimentos de transformación con biolística varios vectores específicos. Así, se llevó a cabo la construcción del vector pAHGUS en el que se usó el esqueleto de un plásmido de alto número de copias como es Bluescript II, en cuyo sitio de multiclonaje se incluyó el cassette procedente del vector pJIT61, que pertenece a la serie pGreen (Hellens y col., 2000), que ha sido utilizado en otros experimentos de transformación de diferentes especies incluyendo monocotiledóneas (Amoah y col., 2001; Wu y col., 2003). El cassette introducido incluye el promotor 35S del virus del mosaico de la

colifor (CaMV) que es activo tanto en dicotiledóneas como en monocotiledóneas, el gen delator *uidA* y el terminador 35S.

Los resultados de la expresión transitoria en embriones haploides transformados procedentes de la línea 'ATOPE-6 de triticale, mostraron que en las mismas condiciones experimentales el vector pAHGUS produce un mayor número medio de foci por embrión que el vector pIJT61, por lo que se eligió este nuevo vector, pAHGUS para su utilización en el resto de experimentos de transformación, y en particular para el estudio de la expresión transitoria en triticale, lo que permitiría optimizar los parámetros de bombardeo y en su caso abordar la obtención de plantas transgénicas tanto de trigo como de triticale.

Además del plásmido pAHGUS se han construido tres vectores más que son portadores de diferentes subunidades de gluteninas de alto peso molecular. Se trata de los plásmidos pAHDx5-BAR, pAHBx7-BAR y pAHDy10-BAR, cada uno de ellos portador de un gen que codifica para una glutenina diferente y del gen *bar* que confiere resistencia a la fosfotricina, componente activo del herbicida BASTA™.

En trigo, los genes que codifican para gluteninas son ortólogos (*Glu-A1*, *Glu-B1* y *Glu-D1*) o parálogos (subunidades x e y) que comparten un gen ancestral común y forman parte de una familia multigénica, cuya expresión está controlada de manera coordinada principalmente a nivel transcripcional. Se trata de genes que son específicos de tejido y que están regulados temporalmente, siendo su expresión máxima en las etapas medias y tardías de formación del endospermo (Lamacchia y col., 2001). Al tratarse de una familia multigénica, los diferentes miembros comparten una parte de la secuencia codificante y también de las secuencias reguladoras. Así, Forde y col., 1985 comprobaron que para la familia de prolaminas ricas y pobres en azufre se mantenía la secuencia consenso (5' –TGACATGTAA AGTGAATAAG ATGAGTCATG) situada a 300 pb aguas arriba del sitio de comienzo de la transcripción, y que fue denominada caja de prolaminas o elemento del endospermo, conteniendo dos motivos conservados, el motivo E del endospermo TGTAAT (Hammond-Kosack y col., 1993) y el motivo N o elemento del nitrógeno (Hammond-Kosack y col., 1993). El elemento N con la secuencia G(A/G) TGAGTCAT es el motivo similar al sitio de unión del factor de transcripción GCN4 y es llamado GLM. Este factor de transcripción GCN4 es un componente de la ruta de señalización del nitrógeno en levaduras. Esta caja de prolaminas no está completa

en los promotores de los genes de prolaminas de HMW (Shewry y col., 1999), en su lugar, se encuentra un elemento regulador mayor localizado a 38 pb, que es la secuencia consenso 5' GTTTTGCAAAGCTCCAATTG CTCCTTGCTT ATCCAGCT altamente conservada en todos los promotores de prolaminas de HMW.

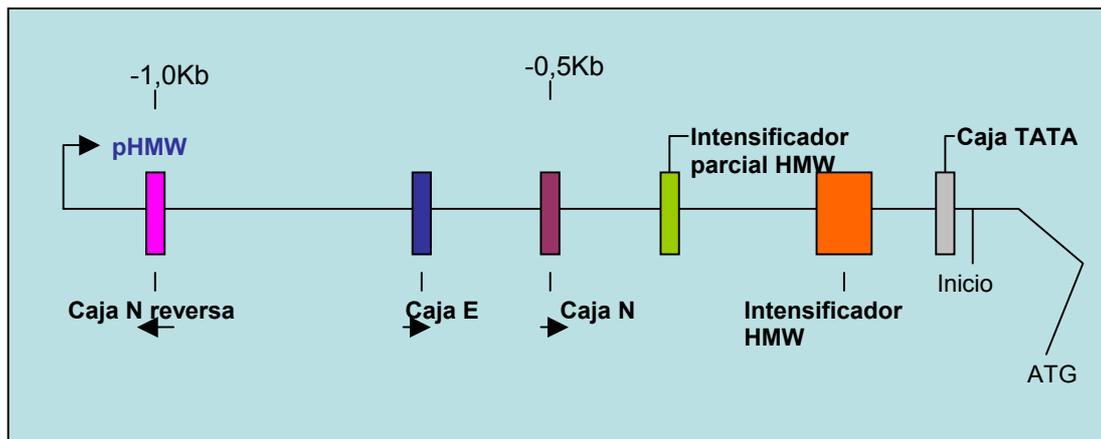
Dado el grado de conservación de estos genes, el estudio de las secuencias conocidas previamente, permitió el diseño de cebadores adecuados para la amplificación y obtención de las secuencias homólogas en las líneas de interés en el presente trabajo. De este modo, para la construcción de los plásmidos pAHDx5-BAR, pAHBx7-BAR y pAHDy10-BAR, se aislaron las regiones promotoras de los genes *Glu-D1x5*, *Glu-B1x7* y *Glu-D1y10* junto con los correspondientes genes a partir de las variedades de trigo común 'Hope', 'Pané-247' y '48-136', respectivamente. Estas líneas habían sido caracterizadas genéticamente con anterioridad por Rubio (Rubio, 1998; Rubio y col., 1999; De Bustos y col., 2000, 2001) y fueron elegidas por presentar los alelos de interés que mejoran la calidad harino-panadera del trigo (Shewry y col., 1992, 1994; Altpeter y col., 1996b; Blech y Anderson, 1996).

La correspondiente secuenciación de las regiones promotoras de los genes *Glu-D1x5*, *Glu-B1x7* y *Glu-D1y10* ha servido para comprobar que, a pesar del elevado grado de conservación, existen algunas diferencias entre algunos de los elementos supuestamente conservados. Su caracterización se llevó a cabo comparándola con el promotor del gen *Glu-D1x5* de la subunidad de alto peso molecular *Glu-D1-1* del trigo descrito por Lamacchia y col. (2001). En la tabla 4.1 y en la figura 4.1 se muestran los elementos más conservados de los promotores de las gluteninas HMW, que fueron descritos por primera vez por Thomas y Flavell en 1990. Así, en los tres alelos están presentes los elementos N y E propios de los genes de prolaminas ricos y pobres en azufre. Sin embargo la caja N reversa sólo se encuentra en el promotor del gen *Glu-D1x5*. Los promotores de las subunidades génicas de gluteninas de HMW *Glu-D1x5* y *Glu-D1y10* mostraron una total similitud en el resto de los elementos conservados de los genes de prolaminas de HMW. Además, el promotor de la subunidad *Glu-B1x7* presentó diferencias con respecto a las otras dos subunidades en un par de bases en el intensificador parcial y en el intensificador de HMW.

Tabla 4.1. Elementos y secuencias de las regiones reguladoras más importantes de los genes de gluteninas HMW.

ELEMENTO	SECUENCIA 5'→3'
Intensificador HMW	GTTTTGCAAAGCTCCAATTG CTCCTTGCTT ATCCAGCT
Intensificador parcial HMW	TTTGCAAA
Caja N	TGAGTCA
Caja E	TGTAAG
Caja N reversa	CTCATC
Caja TATA	CTATAAAAG

Figura 4.1. Diagrama de las regiones reguladoras del promotor de los genes de gluteninas HMW



En la actualidad, hay una carencia de promotores de genes de trigo que estén bien caracterizados y que se puedan emplear en la obtención de plantas transgénicas (Jones, 2005), por lo que se recurre a la utilización de promotores de genes aislados de otras especies. Sin embargo, estos promotores heterólogos no siempre mantienen la actividad observada en las especies de origen. En el presente estudio, y dado que en otros trabajos se ha demostrado que estos promotores son altamente específicos del endospermo, se clonó cada gen de gluteninas junto con su promotor, con el fin de obtener una expresión óptima en las plantas en las que fueran introducidos. En trabajos previos se ha demostrado que el promotor del gen *Glu-D1x5* unido al gen *uidA* (GUS) se expresa en el endospermo de plantas transgénicas de trigo duro

(Lamacchia y col., 2001). Otros autores han comprobado que este promotor es capaz de dirigir la expresión GUS en tejidos de otras especies como son las raíces, hojas y polen de cebada transgénica (Zhang, 2001) y en las glumas y aleuronas de avenas transgénicas (Perret y col., 2003). También se han llevado a cabo estudios en maíz transgénico en el que se introdujo el gen *Glu-D1x5* junto con su promotor, comprobándose que aunque mantiene su especificidad en el endospermo no se hereda adecuadamente a través de la línea germinal masculina, probablemente porque hay alguna anomalía en el polen (Sangtong y col., 2002).

4.1.1. Acercamiento genético al estudio del desarrollo del grano y su composición

La calidad harino-panadera está principalmente determinada por la fuerza de la masa, como resultado de las interacciones entre las proteínas del gluten y en concreto de las gluteninas de alto peso molecular HMW (Shewry y col., 1995). Las subunidades que componen estas gluteninas de HMW mantendrían la estructura del gluten, el mayor polímero de proteínas conocido, el cual forma una red proteica continua durante el amasado, afectando a la fuerza de la masa y al volumen del pan. La mayoría de los trabajos publicados para modificar la composición del grano mediante la obtención de plantas transgénicas se refieren a estas proteínas (Anderson y col., 1989, 1998; Halford y col., 1992; Altpeter y col., 1996b; Barro y col., 1997; Rooke y col., 1999; Vasil y col., 2001).

Hasta hace poco tiempo el aislamiento de genes, la regeneración y el cultivo de tejidos eran importantes cuellos de botella para llevar a cabo transgénesis en trigo o triticale. En este trabajo se han desarrollado las diferentes aproximaciones metodológicas para avanzar en los diferentes aspectos de este problema. Al aislamiento de genes de interés y su introducción en vectores de transformación, se añade la optimización del método biolístico para el bombardeo de embriones haploides y cigóticos, la regeneración de embriones y plántulas y en particular la introducción de los transgenes mediante *Agrobacterium tumefaciens*. La obtención de las formas transgénicas puede tener diversas aplicaciones, puede contribuir al conocimiento de los factores que influyen en la calidad de la harina, el desarrollo de nuevas estrategias de investigación sobre la composición del endospermo de trigo, textura del grano, composición lipídica, calidad de fibra alimenticia, etc. y su

aprovechamiento en la industria panadera. Por ello el presente trabajo se orientó hacia la utilización de genes de importancia en la calidad y variedades de interés comercial, a pesar de que a priori no se tuviera una idea de la facilidad de su transformación por cualquiera de los métodos. En el presente trabajo se ha tratado de introducir los genes *Glu-D1x5*, *Glu-B1x7* y *Glu-D1y10*, mediante bombardeo de partículas en las variedades de trigo ‘Anza’ y ‘Craklin’ y en la línea ‘ATOPE-22’ de triticale. Con anterioridad se había demostrado la importancia del genotipo para la obtención de plantas transgénicas de trigo (Pastori y col., 2001; Pellegrineschi y col., 2002). De ahí que se hayan abordado trabajos para optimizar las condiciones de bombardeo, con el fin de transformar variedades comerciales de trigo común (Rasco-Gaunt y col., 2001). Por otro lado, la línea de triticale ‘ATOPE-22’ fue elegida por ser una línea de estudio propia, obtenida mediante androgénesis en el laboratorio en el que se ha desarrollado el trabajo y de la que se conocía su buena respuesta al cultivo *in vitro* (González y col., 1997, 2000, 2002).

4.2. INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS IMPLICADOS Y EFICACIA DE LA TRANSFORMACIÓN MEDIANTE BIOLÍSTICA Y *A. tumefaciens*.

4.2.1. El bombardeo de partículas facilita un gran rango de estrategias de transformación

La transformación genética ocurre en dos etapas: transferencia del ADN dentro de la célula e integración del mismo dentro del genoma. Los resultados de este trabajo y otros previos permiten afirmar que la etapa de integración es mucho menos eficiente que la de transferencia del ADN. En la mayoría de las células el ADN entra y puede ser expresado por un corto periodo de tiempo (expresión transitoria), pero no se integra y es finalmente degradado por nucleasas. A la vista de los resultados de expresión transitoria parece evidente que resulta transformada establemente sólo una pequeña proporción de células de las que inicialmente recibieron los vectores de transformación. La expresión transitoria ocurre casi inmediatamente después de la transferencia del gen y no requiere la regeneración de toda la planta, por tanto puede ser utilizada como un indicador rápido para evaluar la eficiencia de la transferencia del ADN y verificar si las construcciones usadas son funcionales.

Aunque el bombardeo de partículas puede ser utilizado en estudios de la expresión transitoria de ciertas construcciones génicas, en la mayoría de los trabajos previos publicados y en las patentes derivadas se emplea este método por su potencial para la transformación estable (Altpeter y col., 2005). En este sentido, la técnica demuestra una gran versatilidad ya que, además de la transformación nuclear, permite la transformación de plastidios, un proceso que no puede ser realizado con la transformación mediante *Agrobacterium* sp. porque el complejo de ADN-T se dirige directamente al núcleo (Jones, 2005). Además, el bombardeo de partículas es la única técnica que puede ser empleada para la transformación mitocondrial, aunque esto todavía no se ha conseguido en plantas (Johnston y col., 1988; Altpeter y col., 2005).

La introducción de ADN mediante la técnica biolística es independiente, en principio, del genotipo de las células vegetales que se emplean como dianas. Sin embargo, hay varios factores que influyen en la eficacia de la introducción del ADN en las células vegetales, como el tipo de tejido u órgano del que procedan, que va a determinar el porcentaje de plantas transgénicas obtenidas (Nehra y col., 1994; Becker y col., 1994; Rasco Gaunt y col. 2001; Rubio y col. 2004; Jones, 2005). Para optimizar los parámetros del proceso de bombardeo se recurre al análisis de la expresión de un gen delator, que en el presente trabajo ha sido el gen *uidA*, estudiando su expresión transitoria mediante la tinción histoquímica de las células bombardeadas (Jefferson, 1987).

Entre los principales parámetros a optimizar en el bombardeo de partículas se encuentran: el tipo, tamaño y cantidad de los microproyectiles, la cantidad de ADN y el método de precipitación del mismo, la fuerza propulsora, la presión de helio y la distancia de disparo a la diana. Todos estos parámetros pueden influir en la eficiencia de entrada del ADN y en el daño provocado en las células de los explantes (Altpeter y col., 1996a; Perl y col., 1992; Rasco-Gaunt y col., 1999b).

Rasco-Gaunt y col. (1999b), analizaron la influencia de distintos factores en la expresión transitoria del gen *uidA* en embriones cigóticos inmaduros de trigo. Así, estudiaron la cantidad de ADN y de micropartículas de oro empleadas en cada bombardeo, no encontrando diferencias en la cantidad de ADN en el rango de 2,5 a 20 µg cuando se precipitaron en 2 mg de micropartículas de oro. También analizaron la importancia que la concentración de CaCl₂ y de espermidina tiene a la hora de precipitar el ADN de manera que no se pierda en los sucesivos lavados. La

concentración óptima de CaCl_2 se encuentra entre 1,2 y 1,5 M, aunque en el presente trabajo se optó por emplear una concentración de 2,5 M de acuerdo con los resultados obtenidos por Vasil y col. (1993). Con respecto a la espermidina Rasco Gaunt y col. (1999b, 2001) encontraron que las concentraciones de 8 y 16 mM fueron las mejores para trigos *elite*. Sin embargo, Vasil y col., 1993 obtuvieron mayor expresión GUS con rangos entre 100 y 500 mM en embriones de mijo. En base a este estudio se optó por una concentración de espermidina de 100 mM. La adición de espermidina es recomendada por autores como Vasil y col., 1993 por su implicación en la de unión del ADN a las micropartículas, aunque hay cierta controversia entre diferentes autores ya que la espermidina puede producir agregados entre las partículas cubiertas de ADN, lo cual provocaría daños en los tejidos bombardeados y la pérdida de la viabilidad de las células tras el bombardeo. De hecho, Perl y col., 1992 encontraron que mejoraba la expresión del gen GUS en ausencia de espermidina cuando transformaron callos embriogénicos de trigo, observando que el daño era mucho menor en ellos.

INFLUENCIA DEL GENOTIPO

El genotipo es uno de los factores que influyen en mayor medida en la obtención de plantas transgénicas debido principalmente a las diferencias que manifiestan en su capacidad de obtención de callos embriogénicos y posterior regeneración de planta adulta. Se han realizado trabajos en los que se ha optimizado la transformación para determinados genotipos de trigo (Pastori y col., 2001; Rasco-Gaunt y col., 2001; Huber y col., 2002) o de cebada (Koprek y col., 1996; Dahleen y Bregitzer, 2002; Manoharan y Dahleen, 2002). Sin embargo, hay datos contradictorios cuando se trata de la transformación mediante bombardeo de partículas. Así, Takumi y Shimada (1997) estudiaron seis variedades de trigo y encontraron una correlación entre la frecuencia de transformación y la respuesta al cultivo *in vitro* de cada uno de los genotipos. No obstante, Iser y col. (1999) trabajando igualmente en trigo, no encontraron esta correlación. En el presente caso, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los experimentos de expresión transitoria del gen *uidA* en embriones haploides procedentes de las líneas ‘ATOPE-22’ y ‘ATOPE-6’, aunque su capacidad androgenética global (plantas haploides verdes/1000 anteras) es muy diferente 17,20 y 181,27 para ‘ATOPE-6’ y ‘ATOPE-22’, respectivamente.

IMPORTANCIA DEL PRECULTIVO

En los experimentos de transformación empleando embriones inmaduros es habitual someter a los explantes a tratar a un precultivo de uno, dos o incluso más días (Koprek y col. 1996; Kemper y col. 1996; Rasco-Gaunt y col., 1999b; Pastori y col. 2001), en medios nutritivos conteniendo auxinas, en cuyo caso comienzan a aparecer callos en la superficie de los embriones (Huber y col., 2002; Perl y col. 1992; Altpeter y col, 1996a y b; Manoharan y Dahleen, 2002). En otros trabajos en los que se utilizan microesporas como dianas en experimentos de transformación, se ha demostrado que es importante realizar un precultivo de las mismas. Así, Folling y Olesen (2001) han demostrado que en trigo el precultivo de microesporas, es un requisito importante para su transformación. Los mismos resultados han sido obtenidos por Nehlin y col. (2000) en *Brassica napus*.

El efecto positivo del precultivo puede estar relacionado con la eficacia con la que el ADN llega a los cromosomas y también con el daño ocasionado por el bombardeo. El precultivo induce la división, por lo que las células pueden encontrarse en una fase de la mitosis en la cual la membrana nuclear puede haber desaparecido total o parcialmente y de esta forma ser un obstáculo menos a la penetración del ADN, estando menos tiempo expuesto a la degradación por nucleasas (Rubio y col., 2004). Los estudios llevados a cabo en este trabajo sobre el precultivo de los embriones haploides de las líneas de triticale ‘ATOPE-22’ y ‘ATOPE-6’, y de embriones cigóticos inmaduros de la línea ‘ATOPE-22’ antes del bombardeo (0, 24, 48 o 72 horas), no demuestran la existencia de diferencias significativas entre los distintos pretratamientos y el nivel de expresión transitoria del gen *uidA*. En el caso de los embriones haploides, la ausencia de diferencias significativas, se puede deber a que estos embriones aparecen en la superficie de anteras que han estado en cultivo durante un periodo mínimo de un mes en el medio N6, que contiene 2mg/L de 2,4D (Chu, 1978). La transferencia de los embriones haploides a un medio MS conteniendo la misma concentración de 2,4-D no supone un cambio sustancial con respecto al medio en el que se han desarrollado no obteniéndose por tanto ningún efecto aparente.

TRATAMIENTO OSMÓTICO

Es importante considerar factores como la presión osmótica en los medios de cultivo durante el bombardeo para minimizar las pérdidas citoplásmicas de las células bombardeadas (Perl. y col., 1992; Vain y col., 1993; Ferrer y col., 2000). Existen distintos tratamientos osmóticos inducidos por incubación en medios que contienen diferentes combinaciones de azúcar como la sacarosa a menudo en una concentración del 2-3 % (Deblock y col., 1987; Nehra y col., 1994; Chen y col., 1998; Rasco-Gaunt y col., 2001) y alcoholes como son el manitol y el sorbitol (Altpeter y col., 1996a; Blechl y Anderson, 1996; Ortiz y col., 1996; Rubio y col., 2004). Por el contrario, estos tratamientos osmóticos no parecen favorecer la liberación del ADN-T en la transformación mediante *A. tumefaciens* en trigo (Cheng y col., 2003).

En el presente trabajo se prepararon medios de plasmólisis con manitol y sorbitol 0,4M para el tratamiento de los embriones durante 4 horas previas al bombardeo y también para la recuperación durante las 24 horas posteriores al mismo. Este tratamiento permite reducir las pérdidas celulares después de la penetración de las partículas y mejora la variabilidad celular. Las tasas de transformación de trigo obtenidas por Huber y col., (2002) fueron del 0,6% con pretratamientos de 4 a 6 horas antes del bombardeo y 16 horas después del mismo en medios con manitol 0,4M. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio, que fueron del 0,09% en la variedad ‘Anza’ de trigo y del 0,9% en la línea ‘ATOPE-22’ de triticale.

PARÁMETROS DEL BOMBARDEO DE PARTÍCULAS: PRESIÓN DE HELIO Y DISTANCIA DE DISPARO

El cañón de partículas Biolistic® PDS-1000/He de BIORAD permite la variación de distintos parámetros para intentar optimizar la liberación del ADN en las células diana. Así, la presión de helio y la distancia entre el punto de lanzamiento de las micropartículas y las células diana, son las dos variables que más influyen en la liberación del ADN en el interior de las mismas y en el daño ocasionado. Distintos autores han estudiado la influencia de estos factores en la expresión transitoria y en la obtención de plantas transgénicas de varias especies de cereales (Koprek y col., 1996; Rasco-Gaunt y col., 2001; Manoharan y Dahleen, 2002). En general, presiones

de helio entre 650 y 1.100 psi son las que producen mejores resultados de expresión transitoria, mientras que presiones mayores disminuyen significativamente la expresión (Rasco-Gaunt y col., 1999b). Se han conseguido plantas transgénicas a partir de embriones inmaduros de trigo o de cebada, empleando presiones entre 1.100 y 1.200 psi, mientras que con presiones inferiores o superiores a estos valores no se han obtenido plantas transgénicas o el porcentaje fue muy bajo (Koprek y col., 1996; Rasco-Gaunt y col., 2001; Manoharan y Dahleen, 2002).

En experimentos de transformación en otros tipos de tejidos también se ha puesto de manifiesto la importancia del disco de ruptura y de la distancia de disparo, aunque con resultados muy variables. Así, Jähne y col., (1994) y Folling y Olesen (2001) no encontraron diferencias entre discos de ruptura comprendidos entre 1.100 y 1.800 psi en ensayos sobre microesporas de cebada y trigo, respectivamente. Sin embargo, Harwood y col., (1995) utilizando microesporas de cebada precultivadas durante 1-4 días observaron que reduciendo la presión del disco de ruptura de 900 a 450 psi hay un incremento en el número de microesporas que muestran expresión transitoria del gen *uidA*.

También se ha comprobado que el tiempo de precultivo puede influir en el nivel de expresión transitoria del gen *uidA* en microesporas de trigo. Así, Mentewab y col., (1999) encontraron que el precultivo de las microesporas durante un día conducía a niveles más altos de expresión, tras el bombardeo con una presión de helio de 650 psi, mientras que en el caso de las microesporas precultivadas 8 días, daba mejor resultado una presión de 1.100 psi. En el presente estudio, sobre embriones haploides se ha observado que hay diferencias significativas en la expresión del gen *uidA* entre dos presiones de helio: 1.100 y 1.800 psi. En el primer caso el número de foci por embrión fue de 1,26 y en el segundo de 0,46.

Además, se han observado diferencias estadísticamente significativas cuando se emplea una distancia entre la pantalla de parada y los embriones haploides de 6 y 9 cm. En el primer caso se obtiene un número de foci por embrión haploide de 1,11 y en el segundo de 0,64. La distancia de 6 cm es también la elegida por otros autores en trabajos de transformación de microesporas de cebada (Harwood y col., 1995), de trigo (Folling y Olesen, 2001) y de maíz (Jardinaud y col., 1995) en donde se ha demostrado que una distancia de 3 cm reduce drásticamente el porcentaje de microesporas con expresión transitoria del gen *uidA*.

Sí se tiene en cuenta el conjunto de resultados de los dos genotipos de triticale ‘ATOPE-6’ y ‘ATOPE-22’ y los cuatro tiempos de precultivo utilizados en este trabajo sobre los embriones haploides, se observa que la presión de helio tiene una mayor influencia en el número de foci que la distancia de disparo. La combinación de una presión de 1.100 psi y una distancia de 6 cm es la que da lugar a un mayor número de foci por embrión haploide (1,63) y también a un mayor número de embriones haploides que al menos tienen un focus (0,38). Sin embargo, una presión de 1.800 psi y una distancia de 9 cm solamente dan lugar a 0,35 foci por embrión haploide y 0,18 embriones que tienen uno o más foci.

Este planteamiento experimental se repitió para analizar los mismos parámetros y condiciones empleando embriones cigóticos inmaduros en la línea ‘ATOPE-22’ de triticale. Las distintas repeticiones permitieron confirmar que la presión de helio tiene mayor influencia en el número de foci que la distancia de disparo. La combinación de una presión de 1.100 psi y una distancia de 6 cm es la que dio lugar a un mayor número de foci por embrión, 11,1, mientras que una presión de 1.800 psi y una distancia de 9 cm solamente da lugar 1,65 foci por embrión. Las diferencias observadas pueden deberse, como han sugerido Rasco-Gaunt y col. (1999a y b) a la diferente profundidad de penetración y también a la distinta distribución de las micropartículas de oro cargadas con ADN.

Aunque existen diferentes protocolos de transformación de trigo mediante biolística (Barceló y Lazzeri, 1995; Sparks y Jones, 2004) las tasas de transformación son relativamente bajas, por lo que se están desarrollando nuevos protocolos de transformación de trigo mediante *Agrobacterium* (Cheng y col., 1997, 2003, 2004).

4.2.2. Entrada de ADN mediante *A. tumefaciens*

Los cereales no son hospedadores naturales de las especies de *Agrobacterium*, por lo que se hace necesario un estudio exhaustivo de cepas hospedadoras, plásmidos, sistemas de selección, genotipos adecuados y composiciones de los medios de cultivo que permitan la transformación de monocotiledóneas mediante esta bacteria (Cheng y col., 2004). Los diferentes estudios realizados hasta ahora han demostrado que existe un amplio rango de condiciones que permite obtener plantas transgénicas mediante el empleo de *Agrobacterium* en trigo (Tabla 4.2).

Tabla 4.2.- Resumen de los datos publicados a cerca de la transformación mediante *A. tumefaciens* con resultado de obtención de plantas adultas y fértiles de trigo común (adaptada de Jones, 2005)

Variedad de trigo	Explantante	Cepa <i>Agrobacterium</i> (vector)	Frecuencia de transformación (%)	Nº de plantas obtenidas	Bibliografía
'Bobwhite'	EIPC, EC	C58 (pMON18365)	1,4-4,3	>100	Cheng y col. (1997)
'Fielder'	EIPC	AGL0 (pBGX1)	1,8	4	Weir y col. (2001)
'Florida'	EI	AGL1 (pAL154/156)	0,3-3,3	39	Wu y col. (2003)
'Cadenza'	EI	AGL1 (pAL154/156)	2,5	5	Wu y col. (2003)
'Veery-5'	EC	LBA4404 (pHK21)	1,2-3,9	17	Khanna y Daggard (2003)
'Bobwhite'	EIPC, EC	C58 (pMON18365)	4,4	3354	Hu y col. (2003)
'Bobwhite'	EIPC, EC	C58 (pMOM18365)	4,8-19	154	Cheng y col. (2003)
'Bobwhite'	EIPC	C58 (pPTN155)	0,5-1,5	13	Haliloglu y Baenziger (2003)
'Craklin'	EI	AGL1 (pAL154/156)	0,15	1	Presente trabajo
'Anza'	EI	AGL1 (pAL154/156)	0	0	Presente trabajo

EIPC:embriones inmaduros precultivados; **EC:**callos embriogénicos; **EI:**embriones inmaduros frescos

La eficiencia de transformación (número de plantas transformadas independientemente por cada 100 explantes infectados) mediante *Agrobacterium* es más elevada en genotipos modelo como 'Bobwhite' que tienen una alta tasa de regeneración, que en genotipos comerciales, aunque se mantienen más bajos que las tasas de transformación obtenidas mediante biolística (Jones, 2005). Las variedades de trigo 'Craklin' y 'Anza' utilizadas en este trabajo, se eligieron por su interés agronómico, aunque la tasa de regeneración de plantas a partir de embriones inmaduros era de tan sólo 0,98 y 0,51 plántulas por embrión, respectivamente, mientras que en la variedad modelo 'Bobwhite' es de 58 plántulas por embrión (Zale y col., 2004).

En el presente trabajo se ha conseguido extender los protocolos de transformación mediante *Agrobacterium* a genotipos de trigo con relevante importancia agronómica y también al triticale, completando los estudios realizados hasta ahora sólo en genotipos modelo. Así, siguiendo el trabajo de Wu y col. (2003)

como paso previo a la obtención de plantas transgénicas, se ha analizado la expresión transitoria del gen *uidA* bajo diferentes condiciones experimentales.

Los ensayos de infección de embriones haploides de la línea ‘ATOPE-22’ de triticale con *A. tumefaciens* variando el tiempo de precultivo, el tiempo de inoculación y el tiempo de co-cultivo con la bacteria no dieron resultados positivos. Esto se puede deber a que el proceso de obtención de los embriones haploides exige largos periodos de tiempo de cultivo *in vitro* en medios artificiales, en presencia de altas concentraciones de reguladores de crecimiento como el 2,4-D, cuya presencia podría alterar las condiciones de competencia de la infección bacteriana. Por el contrario, sí se obtuvieron resultados con embriones cigóticos inmaduros. En este caso, se han observado diferencias significativas entre los distintos tiempos de precultivo y el nivel de expresión del gen *uidA* y se ha determinado que un tiempo de precultivo de 0,5 horas es el que permite obtener el mayor número de foci por embrión (15,38). Este valor es inferior al obtenido por otros autores que emplearon condiciones de precultivo idénticas, aunque en genotipos modelo de trigo como ‘Bobwhite’, ‘Cadenza’, ‘Canon’ o ‘Florida’ (Cheng y col. 1997; Wu y col., 2003).

En cuanto al trigo, la infección de un número significativo de embriones de cada una de las variedades comerciales ‘Craklin’ y ‘Anza’ mostró la importancia del tiempo de precultivo en los resultados de la expresión transitoria del gen *uidA*. El mayor número medio de foci obtenido correspondió a un precultivo de 0,5 horas, siendo para la variedad ‘Craklin’ de 26,26 y para ‘Anza’ de 19,53. Los resultados obtenidos apoyarían los trabajos de Cheng y col. (1997) y Wu y col., (2003) que probaron que un aumento del tiempo de precultivo disminuye la expresión GUS. El número medio de foci por embrión considerando todas las condiciones experimentales fue de 23,82 para ‘Craklin’ y de 13,85 para la variedad ‘Anza’, lo que indica la menor eficacia de la transferencia del gen *uidA* en la variedad ‘Anza’ y por tanto la importancia del genotipo. No se han observado diferencias significativas entre los diferentes tiempos de inoculación (1,5; 2 y 3 horas) con respecto al número de foci por embrión ni en triticale ni en trigo, aunque se observa un incremento en la media del número medio de foci por embrión al aumentar el tiempo de inoculación en los distintos genotipos, lo cual apoyaría los datos obtenidos por Wu y col., (2003).

Los estudios de la expresión GUS son solo orientativos de la metodología más óptima para introducir el ADN en las células (Jones, 2005). En el presente

trabajo una vez realizados los ensayos de expresión transitoria del gen *uidA*, se infectaron con *Agrobacterium* 540 embriones cigóticos inmaduros de la línea ‘ATOPE-22’ de triticale. Tras la selección tardía con fosfotricina se regeneraron 30 plantas, que a pesar de su crecimiento en este medio, tras las pruebas de Southern-blot con una sonda del gen *bar* sobre el ADN genómico de cada una de ellas demostraron la ausencia de las secuencias transformantes.

Por otro lado, se infectaron 685 embriones de cada una de las dos variedades de trigo ‘Anza’ y ‘Craklin’ con las combinaciones de los tiempos de precultivo y de inoculación descritos anteriormente, llevándose a cabo una selección tardía del material transformado. En la variedad ‘Anza’ se obtuvieron 68 plantas, de las que solo 3 llegaron a adultas sin que se detectara en ninguna de ellas la presencia ni del gen *bar* ni del gen *uidA*. En el caso de la variedad ‘Craklin’ se obtuvieron 148 plántulas de las cuales 7 fueron positivas al ser analizadas por PCR para el gen *bar*. Finalmente se obtuvieron 6 plantas adultas de las que, tras el análisis por Southern-blot con sondas de los genes *uidA* y *bar*, una resultó positiva (T0) para ambos genes. Esta planta transgénica ha sido fértil y de ella se ha analizado mediante PCR parte de las plantas descendientes (80) correspondientes a la primera generación de autofecundación (T1). De este modo se ha detectado la presencia del transgén *gus* en tres de ellas.

A la vista de los resultados aquí obtenidos se puede deducir que uno de los problemas que existen en la obtención de plantas transgénicas es el elevado número de plantas que se regeneran, que son falsos positivos, tanto mediante biolística como por transformación mediante *Agrobacterium*. Además, en los últimos estudios acerca del análisis de plantas transgénicas obtenidas mediante *Agrobacterium*, se ha demostrado que esta bacteria permanece de manera latente en el tejido de la planta, a pesar de la aplicación de antibióticos, confundiendo los resultados obtenidos del análisis por PCR (Nain y col., 2005). La presencia de *Agrobacterium* puede ser confirmada por amplificación de genes cromosómicos de *Agrobacterium* o genes que se encuentran fuera del ADN de transferencia (ADN-T) en el vector binario. Esto podría explicar los falsos positivos que se han encontrado al analizar las plántulas transformadas por *Agrobacterium*, de las que finalmente solo una presentó transformación estable.

4.2.3. Distinta distribución de foci con ambos métodos

La expresión transitoria del gen *uidA* en términos de frecuencia, así como el total del número de foci azules, indica la intensidad y uniformidad de la expresión génica. Una expresión moderada y distribuida del gen *uidA* es preferible ya que la expresión intensa y localizada puede causar más daño celular y puede ser mortal. En el presente caso los plásmidos pAL154/156 (Hellens y col., 2000; Amoah y col., 2001; Wu y col., 2003) incluyen un intrón en el marco abierto de lectura del gen *uidA* para evitar la expresión del gen en la bacteria, por lo que los puntos azules corresponden realmente a cada uno de los eventos de transformación obtenidos.

Se encontraron diferencias visuales en la distribución de los foci en los embriones dependiendo de si la transformación se llevó a cabo mediante biolística o *Agrobacterium*. Así, en el caso de los embriones transformados mediante *Agrobacterium*, dependiendo sobre todo del tiempo de inoculación y co-cultivo con la bacteria, se observaba que los puntos no estaban bien definidos y pasaban a ser manchas que invadían todo el embrión. Según fue descrito por Cheng y col., (1997) esto no favorece la regeneración de la planta a la hora de obtener plantas transgénicas. La distribución en la que se obtuvieron puntos definidos correspondió a 0,5 horas de precultivo, con 2 a 3 horas de inoculación y no más de 3 días de co-cultivo con la bacteria en ambos genotipos de trigo estudiados ‘Anza’ y ‘Craklin’ y en la línea ‘ATOPE-22’ de triticale, siendo estos resultados similares a los obtenidos por otros autores (Cheng y col., 1997; Wu y col., 2003; Mitic y col., 2004, Jones y col., 2005). En los ensayos con biolística, la distribución de los puntos fue más homogénea que en el caso de la infección con *Agrobacterium*. Las condiciones de 24 horas de precultivo, 1.100 psi de presión de disparo y 6 cm de altura de disparo (Rubio y col., 2004) son las que dan lugar a un mayor número de foci por embrión y más definidos.

4.3. LA IMPORTANCIA DEL MATERIAL TRANSFORMANTE. ESPECIE, GENOTIPO Y TEJIDO.

4.3.1. Elección del explante

Como se ha indicado anteriormente, la producción de plantas de trigo transgénico y fértiles depende de dos procesos. En primer lugar, el ADN donador debe estar integrado establemente dentro del genoma de una célula receptora (transformación) y después se debe obtener una planta vía cultivo *in vitro* desde esta célula. Se ha utilizado un amplio rango de tipos de explantes y métodos de transferencia de genes de manera directa o por *A. tumefaciens*, aunque sólo unas cuantas combinaciones han tenido éxito. A diferencia de otras especies relacionadas, uno de los mayores factores limitantes para la transformación del trigo y el triticale ha sido la dificultad para regenerar plantas a partir del cultivo *in vitro*. El éxito de la transformación de protoplastos de maíz y arroz por electroporación o tratamientos con polyetilenglicol/calcio (Rhodes y col., 1988; Shimamoto y col., 1989) no ha sido transferible al trigo o al triticale (Jones y col., 2005). Si bien se pueden obtener plantas de trigo transgénico fértiles y adultas a partir de unos pocos explantes celulares, la mayor dificultad para la obtención de plantas transgénicas se encuentra en la inserción y ulterior expresión de los genes (Muller y col., 1996; Demeke y col., 1999; Álvarez y col., 2000; Iyer y col., 2000; Hueros y Jouve, 2002).

Las inflorescencias inmaduras se han utilizado como una fuente alternativa para la transformación estable del trigo duro (Lamacchia y col., 2001), tritordeum (Barceló y col., 1994) y trigo panadero (Rasco Gaunt y Barceló, 1999a). Estos explantes también han mostrado una buena expresión del ADN-T de los genes liberados después del co-cultivo con *Agrobacterium* (Amoah y col., 2001). Sin embargo, la transformación a partir de este tejido es más dependiente del genotipo que el escutelo de embriones inmaduros (Rasco-Gaunt y Barceló, 1999a).

A la vista de los resultados de este trabajo y de los de otros autores, el mejor tipo de explante para la transformación en trigo lo constituye el escutelo inmaduro, un tejido especializado que forma parte del embrión (Jones, 2005). En 1993, Vasil y col. consiguieron obtener plantas transgénicas de trigo a partir de la transformación de embriones inmaduros con una frecuencia de transformación menor del 1%. Un año más tarde Nehra y Becker (1994) consiguieron aumentar la probabilidad de

transformación a más del 1% utilizando el tejido escutelar de embriones cigóticos inmaduros. La germinación cigótica precoz es un problema importante cuando se utilizan los embriones inmaduros como explantes, pero esta dificultad puede ser superada añadiendo a los medios de cultivo hormonas tales como dicamba, ácido abscísico o 2,4-D. Algunos autores proponen quitar el eje embrionario o dañarlo para prevenir la germinación precoz (Weir y col., 2001; Wu y col., 2003). Se ha demostrado que el tamaño y edad del embrión tienen una gran importancia en la liberación del ADN-T y en la regeneración de la planta. Con embriones grandes (mayores de 2 mm) se consiguen niveles más altos de expresión transitoria pero frecuencias menores de regeneración (Wu y col., 2003) que con embriones más pequeños (menores de 1,5 mm). En concordancia con estos estudios, los ensayos de transformación realizados en el presente trabajo con embriones inmaduros, tanto de la línea 'ATOPE-22' de triticale como en las variedades de trigo hexaploide 'Anza' y 'Craklin', se realizaron con embriones de 0,8-1,5 mm, considerados adecuados tanto para los experimentos de transformación mediante el método biolístico como por *Agrobacterium*, si bien teniendo en cuenta el control de otros parámetros y factores implicados en ambos métodos para optimizar la regeneración de plantas potencialmente transgénicas.

En el caso de los embriones haploides bombardeados con los vectores pAHDx5-BAR y pAHDy10-BAR se llegaron a obtener plantas haploides transformadas, si bien el cuello de botella se encontró en la duplicación cromosómica con colchicina de las plántulas haploides. Al final de todo el proceso, sólo una de las plantas viables fue fértil. Como se discutió anteriormente no fue posible la transformación de los embriones haploides con *A. tumefaciens*, probablemente por el efecto inhibitorio de la infección bacteriana ejercido por la presencia de hormonas en el medio de cultivo *in vitro*, que son necesarias para la inducción de la embriogénesis. Por tanto, los embriones cigóticos inmaduros constituyen el mejor tipo de explante de los ensayos para llevar a cabo la transformación y obtención de plantas adultas y fértiles de trigos y triticales, tanto por biolística como mediante *A. tumefaciens*. Como se ha visto en los experimentos de este trabajo, también es importante en el caso de los embriones diploides inmaduros controlar el tiempo de precultivo de los mismos antes de la transformación mediante *Agrobacterium* ya que al aumentar el tiempo de precultivo disminuye la tasa de transformación.

4.3.2. Eficacia de transferencia de ADN mediante biolística y *Agrobacterium* en triticales y trigo

Los análisis llevados a cabo mediante la expresión transitoria del gen *uidA* en embriones cigóticos inmaduros de ambas especies tanto mediante *Agrobacterium* como biolística y utilizando los mismos vectores de transformación, nos permiten hacer algunas consideraciones sobre las diferencias entre las dos especies y entre los distintos métodos empleados.

Así, si nos fijamos en los ensayos de biolística en triticales, tanto con embriones haploides como cigóticos inmaduros, el mayor número de foci correspondió a los embriones diploides, lo que pone de manifiesto la importancia del tamaño del explante tratado, ya que muchos de los embriones haploides son menores de 0,8 mm frente a los 0,8-1,5 mm de los cigóticos. A pesar del bajo rendimiento, un avance del presente trabajo es la transformación de los embriones haploides, con relación a la obtención de plantas transgénicas mediante biolística a partir de embriones cigóticos de triticales llevado a cabo por Zimny y col. en 1995, (Rubio y col., 2004).

Otra observación a tener en cuenta es el hecho de que los estudios realizados en la transformación de embriones cigóticos de triticales y trigo mediante *Agrobacterium* demuestran la importancia del tiempo de precultivo a la hora de conocer el nivel de expresión transitoria del gen *uidA*. El mayor número de foci ($15,38 \pm 1,62$ en triticales y $31,81 \pm 17,96$ en la variedad de trigo ‘Craklin’) se consiguió en ambas especies cuando los embriones eran frescos. De este modo, los embriones no deberían tener un precultivo mayor de media hora desde que se sacaron de las espigas y se infectaron con la bacteria, en el caso de triticales, y no más de una hora en el caso del trigo, lo que corrobora las condiciones propuestas por Wu y col., (2003). En cualquier caso, los genotipos de trigo ensayados mostraron una mayor expresión del gen *uidA* que la línea de triticales, al revelar un mayor número medio de foci.

También se observaron diferencias entre los dos genotipos de trigo analizados ‘Anza’ y ‘Craklin’. De este modo, ‘Anza’ mostró menor número de foci ($26,44 \pm 4,01$) que ‘Craklin’ ($31,81 \pm 17,96$), corroborando la importancia del factor genotípico a la hora de llevar a cabo la transformación, tanto mediante biolística,

como había sido ya descrito anteriormente en trigo (Pastori y col., 2001; Rasco-Gaunt y col., 2001; Huber y col., 2002) y cebada (Koprek y col., 1996; Dahleen y Bregitzer, 2002; Manoharan y Dahleen, 2002), como mediante *Agrobacterium*.

4.3.3. Selección y mosaicismo

Debido a las bajas tasas de transformación es necesario utilizar sistemas de selección que debiliten o ralenticen el crecimiento de los tejidos no transformados y permitan la supervivencia preferente de las células transformadas (Wu y col., 2003). De este modo, en especies como el trigo, se utilizan rutinariamente sistemas basados en la adición de un agente de selección al medio de cultivo del tejido, bien sea un antibiótico, un herbicida o una fuente de carbono. Para ello es necesario introducir un gen que confiera ventaja selectiva bajo las condiciones específicas del medio. Los agentes selectivos usados normalmente para trigo contienen fosfotricina o antibióticos aminoglicósidos (Goodwin y col., 2004; Jones, 2005).

Dados los supuestos riesgos atribuidos a las plantas transgénicas por la posible transferencia del gen de selección a especies relacionadas, se han desarrollado recientemente diferentes sistemas de selección, más seguros y respetuosos con el medio ambiente. El más avanzado es el sistema de la isomerasa fosfomanosa (PMI) patentado por la firma Syngenta el cual utiliza el gen *manA* para convertir la fuente de carbono predominante, manosa-6-fosfato, en fructosa-6-fosfato para la respiración celular (Joersbo, 2001). Las células no transformadas no sólo estarían desprovistas de una fuente de carbono, sino que la manosa-6-fosfato que no es usada se acumula y tiene efectos negativos adicionales, incluyendo la inhibición de la glicólisis, posiblemente debido a la falta de fosfato. La selección PMI ha mostrado mejores resultados que la selección mediante antibióticos y herbicidas para el trigo (Reed y col., 2001).

4.3.3.1. CONTROL DE *AGROBACTERIUM*, REGENERACIÓN Y SELECCIÓN

Después del periodo de co-cultivo con la bacteria, los explantes infectados siguen una serie de pasos en el cultivo de tejidos, en distintos medios diseñados para inhibir el crecimiento de *Agrobacterium* y promover la regeneración y selección de los transformantes. Los antibióticos usados para la inhibición del crecimiento de

Agrobacterium se añaden inmediatamente después del co-cultivo durante la inducción de la formación de callos (Jones y col., 2005). Normalmente se utilizan antibióticos como la timentina (Wu y col., 2003) o la carbenicilina (Cheng y col., 1997), pero también se han estudiado otros componentes como la cefotaxina (Mitic y col., 2004), cefatoxina, ticarcilina y vancomicina (Haliloglu y col., 2003). Complementariamente a los genes marcadores, en el ADN-T se introducen los agentes de selección de la planta para matar o ralentizar el crecimiento del material no transformado. La selección de las células transformadas se inicia a menudo unos días después del co-cultivo, durante la fase de inducción de callos y se mantiene durante los últimos pasos de regeneración (selección temprana). Wu y col., (2003) prefirieron llevar a cabo una selección tardía, consistente en la selección de la planta transcurridas 4 semanas en el medio de regeneración. En resumen, la transformación de trigo y de triticale vía *Agrobacterium*, tendría una duración en el tiempo de 12-16 semanas, desde el explante original hasta la transferencia de las plantas jóvenes a suelo, dependiendo del tiempo de pre-cultivo y el número de pasos de selección.

4.3.3.2. SELECCIÓN TEMPRANA Y TARDÍA

En el presente trabajo se probaron ambos tipos de selección. En los experimentos llevados a cabo mediante biolística sobre embriones haploides de triticale, se procedió a una selección temprana con fosfotricina (2-5 mg/L) a las 24 horas de ser bombardeados, con un resultado de regeneración de plantas haploides del 0,9%. En los experimentos similares llevados a cabo en las variedades de trigo ‘Anza’ y ‘Craklin’ se un 0,09% y un 9% de plantas supervivientes a la selección temprana.

A la vista de que muy pocas plantas sobrevivieron a una selección temprana y que la mayoría de las que regeneraron, tras los análisis moleculares se demostró que eran escapes al proceso de selección, se procedió a la selección tardía, que se llevó a cabo tras 4 semanas de regeneración de la planta introduciendo en el medio la fosfotricina como agente selectivo de acuerdo con el protocolo de Wu y col., (2003). Este procedimiento se empleo en los embriones inmaduros de la línea ‘ATOPE-22’ y de las variedades ‘Anza’ y ‘Craklin’ de trigo, transformados mediante *A. tumefaciens*. El resultado fue del 5%, de plantas supervivientes de la línea de triticale, y del 9% y el 21% de plantas supervivientes de las plántulas resistentes al

PPT en ‘Anza’ y Craklin’, respectivamente. Por otra parte, en los experimentos llevados a cabo mediante biolística, tras la selección tardía, regeneraron el 3,9% de las plántulas de ‘Anza’ y el 8,15%, de ‘Craklin’.

De cualquier forma, es importante señalar que tras los análisis moleculares llevados a cabo para detectar el ADN transformante en diferentes estadios de las plantas obtenidas, la mayoría de ellas resultaron ser escapes al proceso de selección. La duración y concentración del agente selectivo varía de acuerdo a la sensibilidad del genotipo. La necrosis y muerte celular es rápida y completa con agentes como la higromicina (Visarada y Sarma, 2004), mientras que con PPT es difusa y gradual provocando los denominados “escapes”, explantes que eluden la selección llegando incluso a planta adulta. En el presente caso, en los distintos experimentos realizados en los trigos ‘Anza’ y ‘Craklin’ y en la línea ‘ATOPE-22’ de triticale, a pesar del elevado número de embriones que fueron bombardeados y transformados mediante *Agrobacterium*, la mayoría de las plantas regeneradas y potencialmente transformadas resultaron ser escapes. Podría ser que el fragmento de ADN que contiene el gen marcador a pesar de no integrarse en el genoma de la planta, pudiera transmitirse y expresarse durante unas pocas generaciones, dando lugar a la formación de un pequeño callo, a partir del cual podría regenerarse una plántula al repicarse en un medio de regeneración completo y sin el agente de selección, lo que explicaría los escapes. Otra posibilidad, descrita por Christou y col. (1990), para dar explicación a los escapes sería que los tejidos transformados son tan eficientes en detoxificar el agente selectivo que las células vecinas también sobreviven consiguiendo regenerar una planta adulta.

4.3.3.3. MOSAICISMO

En la obtención de plantas transgénicas se produce el fenómeno del mosaicismo, que consiste en la heterogeneidad intercelular del suceso transgénico, que se manifiesta en el explante tratado o en las plántulas regeneradas tras el tratamiento transformante. Aunque el cultivo de tejidos y las condiciones de selección son manipuladas para obtener sólo plantas enteras, que provengan de una única célula original transformada y sean éstas únicamente las que regeneren, sin embargo en la regeneración de la planta pueden haber intervenido células no transformadas que tras

las divisiones posteriores conducen a una distribución de sectores transformados y no transformados dentro de la misma planta. Dependiendo de si los sectores transgénicos llegan al desarrollo de los tejidos florales, las espigas de estas plantas pueden llegar a producir semillas no portadoras de las secuencias transformantes. El mosaicismo es una de las causas de la baja o nula transmisión de los transgenes a la primera generación, T1 (Jones, 2005). Así, en el presente caso la planta transgénica de la variedad ‘Craklin’ obtenida mediante *A. tumefaciens* mostró variabilidad en la transmisión, de modo que el análisis en T1 demostró que sólo en 3 de las 12 inflorescencias (espigas) analizadas de la planta T0, eran portadoras del transgén *gus*.

4.4. LA OBTENCIÓN DE TRIGO Y TRITICALE TRANSGÉNICO

En la actualidad las plantas transgénicas que se consiguen están limitadas a unos pocos genotipos “modelo” los cuales tienen altas tasas de regeneración antes de ser bombardeados o transformados con *Agrobacterium*. Así, el maíz ‘A188’ y sus derivados, la variedad de trigo ‘Bobwhite’ y las cebadas ‘Golden Promise’ e ‘Igri’ son los que muestran mayor respuesta a la transformación genética. No obstante, los programas de mejora de cereales implican la apuesta agronómica de cultivos que son específicos de regiones agroclimáticas determinadas. Además, los resultados indican la posibilidad de que aunque ciertos genotipos son buenos en expresión transitoria, los genes introducidos se bloquean o las células transformadas son incapaces de multiplicarse después de ciertos estadios.

Para saber si los genes transformados son eliminados después de ciertas divisiones celulares, habría que estudiar que ocurre cuando se les introduce por métodos convencionales. Hay que tener en cuenta que el triticale tiene de por sí un porcentaje relativamente alto de inestabilidad cromosómica, probablemente debido a la falta de tiempo evolutivo para la coadaptación de dos sistemas genómicos filogenéticamente afines. El triticale (*xTriticosecale* Wittmack) es una especie sintética alohexaploide que contiene los genomas de *Triticum durum* y *Secale cereale*. A pesar del funcionamiento de un sistema genético que garantiza la diploidización y comportamiento regular de los cromosomas durante la meiosis, con predominio del apareamiento homólogo, en los triticales o en sus derivados por cruzamiento existe un cierto grado de irregularidad, que se traduce en asinapsis,

desinapsis o intercambios no homeólogos (Galindo y Jouve, 1989; Soler y col, 1990; Lukaszewski y col., 1994; Jouve y Soler, 1996; Cuadrado y col., 1999). De este modo, las irregularidades meióticas pueden influir en la segregación y transmisión de los transgenes, o en la expresión diferencial de los mismos.

Zimmy y col. (1995), obtuvieron las primeras plantas transgénicas de triticale hexaploide mediante bombardeo de embriones con micropartículas recubiertas con un plásmido portador de los genes *uidA* y *bar*, hace diez años. En estos experimentos se encontraron con la dificultad de la falta de correlación en la expresión de ambos genes al tratar las plantas con el herbicida BASTA™ en la generación T1. En alguna planta de la progenie analizada, se evidenciaba la presencia del gen *bar*, pero no se expresaba suficientemente en las hojas, las cuales habían sido tratadas con el herbicida, que si mostraban expresión GUS. Wax y Lemaux (1994) explicaron que la expresión del gen *bar* en la descendencia transgénica puede variar de una planta a otra y depende del estadio de desarrollo en el que se encuentre la planta. Para el triticale esta situación es incluso más probable debido a los problemas de regulación en este aloploide sintético en el que se han observado fenómenos de anfiplastia (Cuadrado y Jouve, 1994; Jouve y Soler, 1996).

En este trabajo se ha demostrado que es posible introducir genes que se expresen de forma transitoria en células haploides y diploides de triticale, como lo demuestran los resultados del estudio del gen *uidA*. Sin embargo, no ha sido factible la obtención de plantas transgénicas adultas y fértiles tras el bombardeo de embriones haploides o cigóticos o mediante infección con *A. tumefaciens* de embriones cigóticos. El análisis de la presencia del transgén mediante PCR en plántulas indicaba la presencia del mismo. No obstante, al analizar la descendencia de una planta haploide duplicada obtenida a partir del bombardeo de embriones haploides, no mostró la presencia del transgén. Así mismo, el estudio de las plántulas regeneradas a partir de la transformación mediante *A. tumefaciens* de embriones cigóticos inmaduros y que soportaron la selección con PPT, tampoco ha permitido revelar la presencia del transgén en las mismas. Por lo que podemos suponer que todas estas plantas fueron escapes al proceso de selección. Por otra parte, las variedades ‘Craklin’ y ‘Anza’ de trigo hexaploide no pueden considerarse buenas variedades para el cultivo *in vitro* pero si presentan un alto interés comercial, razón por la que se intentó con bajo rendimiento la transformación mediante ambos

procedimientos biolística y *Agrobacterium*, con una probabilidad de éxito que se encuentra en la parte baja del rango que presentan las variedades modelo, como ‘Bobwhite’.

4.4.1. ¿*Agrobacterium* o biolística?

El último aspecto a considerar es el de la conveniencia de uno u otro de los dos métodos de transformación ensayados en el presente trabajo. Bien por el método biolístico o mediante *A. tumefaciens*, la primera fase del proceso de transformación, la liberación del ADN dentro del núcleo, seguida del proceso de su integración en el genoma de la planta, es aparentemente similar. Los análisis moleculares de los sitios de integración suponen que la inserción de los transgenes vía recombinación ilegítima, utilizando la maquinaria de reparación del ADN propia de la planta, es en un único locus (o a veces en más de uno) (Jones, 2005). Los loci pueden contener una o múltiples copias de concatámeros de los transgenes, lo cual puede generar reorganizaciones en el genoma de la planta (Kohli y col., 1998; Pawlowski y Somers, 1998; Svitashv y col., 2002).

Como es lógico es preferible obtener plantas con pocas copias del transgén y mínimas reorganizaciones, ya que son más fáciles de caracterizar a nivel molecular, es más probable que presenten normalidad en la segregación mendeliana y parece menos probable que sufran mecanismos de silenciamiento. Sin embargo, en los ensayos realizados hasta el momento en trigo mediante biolística no es habitual la obtención de inserciones de una sola copia, siendo frecuente la reorganización de secuencias y la aparición de múltiples copias (Pawlowski y Somer, 1998; Kholi y col., 2003). De este modo, la transformación mediante *Agrobacterium* es una opción ventajosa frente a otras formas de liberación del ADN, incluyendo la biolística, porque puede introducir grandes segmentos de ADN con un mínimo de reorganización y con un menor número de copias de los transgenes insertados, además de presentar con una eficiencia más alta y un coste más bajo (Hiei y col., 1997; Hu y col., 2003). Cheng y col., (1997) compararon el número de líneas transgénicas de trigo obtenidas con sólo una copia del transgén por bombardeo de micropartículas o mediante *Agrobacterium*. Sólo el 17% (13/77) de las líneas bombardeadas contenían una única copia del transgén, lo que contrasta con el 35%

(9/26) de las transformadas mediante *Agrobacterium*. También Hu y col. (2003) demostraron que 4 de 6 líneas de trigo transgénico presentaban una sola copia del transgén en contraste con la obtención de una sola línea de 5 obtenidas por bombardeo de micropartículas. Wu y col., (2003) corroboraron estos resultados al observar que 22 de 24 líneas transgénicas de trigo obtenidas mediante *Agrobacterium* segregaron mendelianamente 3:1, mientras que esta proporción solo ocurría en 12 de 20 líneas obtenidas por biolística.

Sin embargo, el método de *Agrobacterium* ha dado resultado negativo en la introducción de información genética en embriones haploides de triticale en el presente trabajo, debido a que la bacteria no pudo infectar dichos embriones. Este resultado pone de manifiesto la dificultad de obtener plantas transgénicas homocigotas a partir de los embriones haploides seguida de la duplicación cromosómica. Al problema de la falta de infección se añade la dificultad en la duplicación de cromosomas, todo lo que supone una pérdida de material vegetal y un descenso en el rendimiento del proceso de producción de las plantas transformadas. Sin embargo, los resultados obtenidos con el método biolístico en triticale, especialmente en la línea ‘ATOPE-22’ inducen a pensar que este procedimiento sigue siendo el más adecuado para la obtención de formas transgénicas en este cereal, a partir de embriones haploides de origen androgenético.

En el caso de los embriones diploides de triticale la comparación de la expresión transitoria del gen *uidA* introducido por biolística o mediante *Agrobacterium*, indica que se obtiene un mayor número de foci por embrión en el caso del bombardeo de partículas que frente a la utilización de *Agrobacterium* aunque estas diferencias no llegan a ser significativas.

La transformación mediante *Agrobacterium* es el método elegido para dicotiledóneas en la mayoría de los laboratorios comerciales (Jones, 2005) y, excepto para algunas aplicaciones específicas, podría llegar a desplazar al método biolístico como método de transformación en trigo u otras especies recalcitrantes al cultivo *in vitro* en los próximos años. En el presente caso los dos genotipos de trigo ensayados produjeron formas transgénicas por ambos métodos. Gracias al bombardeo de partículas se obtuvo resultados positivos en la variedad ‘Anza’. Por otra parte, mediante infección con *Agrobacterium* se transformó el genotipo ‘Craklin’ y se obtuvo una planta transgénica cuya descendencia contenía el transgén. Aunque la

tasa de transformación con ambos métodos es relativamente baja y similar con respecto al número de plantas obtenidas, la transformación mediante *Agrobacterium* además de las ventajas anteriormente indicadas, parece recomendable por el bajo coste que presenta la técnica en comparación con el método biolístico.

4.4.2. Destino de los transgenes

Para conocer los factores que influyen en el destino final de los transgenes en el medio ambiente, y los efectos que su dispersión puede tener en el medio natural, se han llevado a cabo experimentos cultivando plantas modificadas genéticamente (OMG), utilizando formas no transgénicas como controles (Muench, 1990; Umbeck y col., 1991; Gliddon, 1994; Karieva y col., 1994; Rogers y Parkers, 1995). Los estudios conllevan un análisis de las poblaciones naturales y cultivos del entorno ambiental en que se cultivan las formas transgénicas (Figura 4.2). En estos experimentos es posible predecir la distancia de aislamiento requerido para limitar la liberación del polen y las semillas de las plantas transgénicas más allá de los terrenos de su propio cultivo. En el caso de los cereales y en particular del triticale y trigo, ambos con sistema reproductor autógeno y en las que la alogamia es muy baja y ocasional, existen además importantes barreras de aislamiento reproductor con especies silvestres afines, con las que solo se han descrito resultados de hibridación artificial en condiciones ambientales muy controladas (Sybenga, 1998). Al margen del rendimiento del método de transformación que se elija, dada la improbable contaminación de las formas transgénicas de los dos tipos de cereales del presente trabajo con relación a especies afines, dicha metodología supone una opción válida para la mejora de las variedades en sistemas genéticos sencillos.

El mejorador tradicional trata de distinguir en el campo, en una población genéticamente heterogénea, los mejores individuos entre cientos o miles de genotipos, para seleccionar o hacer cruzamientos entre los que considere más adecuados, y generar una nueva fuente de diversidad de la que seleccionar otros mejores. La transgénesis, es más directa, ya que se trata de transformar individuos mediante la única incorporación del gen o genes responsables de una determinada característica. Desde el punto de vista de la modificación genética, es evidente que la mejora por ingeniería genética es más limitada y directa que la de los tradicionales

métodos de cruzamiento y selección. Por otra parte, cuando se realiza la mejora de una variedad de trigo a partir de un cruzamiento artificial con un donante, silvestre o cultivado, de la misma u otra especie, portador de un gen deseado, se obtiene un híbrido que combina los miles de genes de ambos parentales. Después, ha de seguir un largo proceso de retrocruzamientos reiterados por la variedad cultivada y de selección de las formas portadoras del gen a incorporar hasta recuperar el fondo genético de aquella. Al final, tras varias generaciones de retrocruzamiento y selección, tendremos una variedad muy similar a la de partida que habrá incorporado el gen deseado. Mientras tanto, en el híbrido y a lo largo del proceso nos tendremos que librar de cientos de genes no deseados cuya eliminación es siempre tediosa y muchas veces incompleta. Los métodos biotecnológicos de transformación eluden el largo proceso de eliminación de genes indeseados, ya que lo que se hace es incorporar el gen deseado, lo que requiere un número limitado de ciclos biológicos.

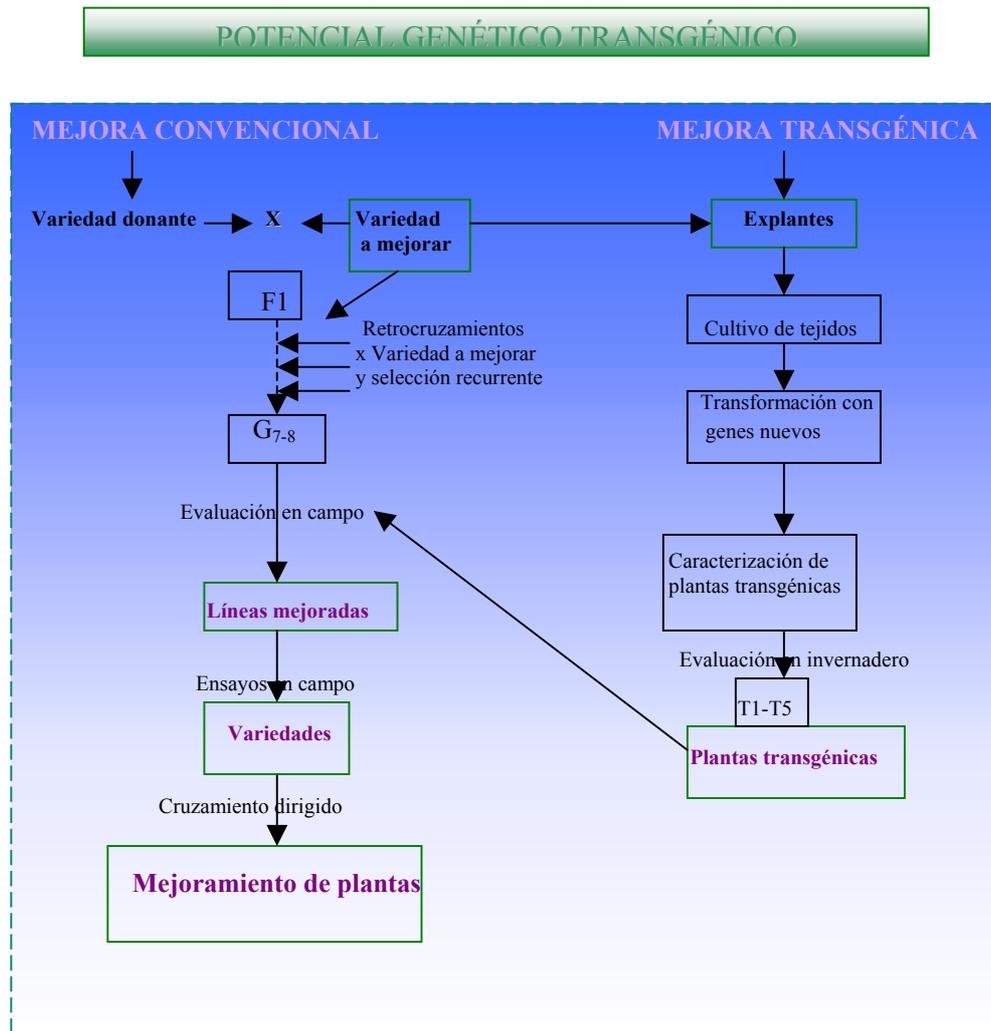
Descartado o controlado el efecto ambiental, el potencial de la aplicación de los métodos de transformación en cereales sigue ofreciendo la ventaja del ahorro de tiempo frente a los largos métodos de la mejora tradicional. En la Figura 4.2 se representa un esquema de ambos procedimientos de mejora. En el caso de los cereales en que se parte de híbridos intervarietales son necesarios cerca de 10 años para la producción de variedades en condiciones de multiplicación y ensayo en campo, reduciéndose a la mitad en la producción de las variedades de origen transgénico, si bien esta metodología es solo útil para caracteres cualitativos controlados por genes simples y supeditada a los problemas del bajo rendimiento.

Según datos del ISAAA (Servicio Internacional para la Adquisición de Información de las Aplicaciones en Agrobiotecnología) el incremento de área de los cultivos biotecnológicos o cultivos transgénicos fue de 13,3 millones de hectáreas en 2004. Se cultivaron 81,0 millones de hectáreas frente a las 67,7 millones de hectáreas de 2003. En cuanto a la distribución hubo 14 países con 50.000 hectáreas o más de cultivos transgénicos, de ellos 5 industrializados y 9 en vías de desarrollo que en orden decreciente de la extensión e los cultivos transgénicos fueron: EE.UU, Argentina, Canadá, Brasil, China, Paraguay, India, África del Sur, Uruguay, Australia, Rumanía, Méjico, España y Filipinas (James, 2004). A finales de los años 80 en Europa se promovieron programas de investigación para aumentar la seguridad de los cultivos transgénicos mediante estudios de dispersión de polen,

establecimiento de distancias de aislamiento, transferencia de genes e implicaciones ecológicas del uso de plantas modificadas genéticamente. De esta forma se establecieron programas especiales como el PROSAMO (Planned Release of Selected and Modified Organisms) en el Reino Unido y otros como el BAP/BRIDGE (Biotechnology Action Programme; Biotechnology Research for Innovation, Development and Growth in Europe) en el resto de Europa (Dale, 1993; Rogers y Parkes, 1995).

Finalmente, la obtención de plantas transgénicas ha dado ya grandes beneficios en el estudio de procesos biológicos básicos, y ofrece el potencial de producir un gran rango de nuevos comestibles y otras materias primas, así como para encarar problemas ambientales, ahorrar fuentes no renovables y proveer alimento a una población mundial en crecimiento progresivo.

Figura 4.2.-Diagrama de flujo mostrando la integración de la tecnología de transformación con el cultivo convencional de plantas (modificado de Sharma K.K. y col., 2002)



5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se han desarrollado experimentos de transformación mediante dos métodos: biolística y *Agrobacterium*, de dos líneas comerciales de trigo común y dos líneas de triticale de origen androgenético. Se llevó a cabo la síntesis de varios vectores de transformación que permitieran el análisis de la expresión transitoria, la optimización de los parámetros susceptibles de variación en los ensayos de biolística y agroinfección y para favorecer la selección y detección de las formas transgénicas derivadas. Las principales conclusiones derivadas de este trabajo son las siguientes:

1. Se ha construido específicamente para este trabajo, el vector pAHGUS, que combina elementos de los vectores pJIT61 (promotor 35S del CaMV, gen *uidA* y terminador 35S) y Bluescript II (resistencia a ampicilina). Tras la realización de experimentos de transformación por biolística se comprobó que en general, el vector pAHGUS daba mejores resultados que el vector pJIT61, como lo demuestran los ensayos comparados de expresión transitoria del gen *uidA*.
2. La aplicación de diferentes tiempos de precultivo de los embriones haploides o cigóticos inmaduros de triticale, para su transformación por el método biolístico, no ofrecen resultados significativamente diferentes, respecto a la expresión transitoria. Por otra parte, se observa que la presión de helio tiene una mayor influencia en el número de foci que la distancia de disparo, siendo la combinación de una presión de 1.100 psi y una distancia de 6 cm los que ofrecen los mejores resultados.
3. La distribución de los foci de expresión transitoria en los embriones tratados presenta diferencias entre ambos métodos de transformación. Los foci son puntuales y bien definidos en el caso de la biolística, mientras que en el caso de los embriones transformados mediante *Agrobacterium*, las zonas de expresión ofrecen un aspecto de manchas confluyentes que invaden todo el embrión. Este fenómeno se observa cuando se emplean tiempos de más de dos o tres horas de inoculación y más de tres días de co-cultivo con la bacteria.
4. La aplicación del método de *Agrobacterium* no dio buen resultado en los embriones haploides de triticale, probablemente debido a la presencia de reguladores de crecimiento como el 2,4-D en los medios en los que se obtienen estos embriones, que podrían alterar las condiciones de competencia de la

infección bacteriana. En el caso de los embriones cigóticos inmaduros, tanto de triticale como de trigo, los mejores resultados se obtuvieron con un tiempo de precultivo de 0,5 horas. No se han observado diferencias significativas en los diferentes tiempos de inoculación ensayados.

5. Los mejores resultados, tanto en los experimentos de transformación mediante el método biolístico como por *Agrobacterium*, en las líneas de triticale y trigo hexaploide ensayados, los ofrecieron los embriones cigóticos inmaduros de 0,8-1,5 mm.
6. Los resultados de la utilización de *Agrobacterium* demuestran la posibilidad de aplicación de este método de transformación tanto para las líneas de triticale como para las variedades comerciales de trigo ensayadas, completando los estudios realizados hasta ahora preferentemente con biolística y exclusivamente en genotipos modelo.
7. Mediante el método de *Agrobacterium* se ha obtenido una planta transgénica T0 de la variedad de trigo ‘Craklin’, portadora de los genes *uidA* y *bar* y mediante biolística de la variedad ‘Anza’, portadora de los genes de gluteninas *Glu-D1x5*, *Glu-D1y10* y del gen *bar*; si bien de ambas solo se han obtenido plantas portadoras del transgén en la T1 de ‘Craklin’. Se pone de manifiesto que uno de los problemas es el elevado número de escapes y falsos positivos, para ambos métodos de transformación. La modificación del trigo, tanto mediante biolística como vía *Agrobacterium*, tendría una duración en el tiempo de 12-16 semanas, desde el explante original hasta la transferencia de las plantas jóvenes a suelo. Sin embargo, la transformación mediante *Agrobacterium*, parece más recomendable por su bajo coste en comparación con el método biolístico.
8. El éxito de la transformación es muy dependiente de la respuesta genotípica al cultivo *in vitro*. A pesar de que las variedades de trigo hexaploide ‘Craklin’ y ‘Anza’ no pueden considerarse buenas variedades para el cultivo *in vitro*, respecto a variedades modelo como ‘Bobwhite’, en el conjunto regeneración-transformación, evidencian una probabilidad de éxito dentro del rango de aquellas, lo que supone que estas variedades cultivadas y en las condiciones de los ensayos ofrecen una respuesta adecuada a la transformación.

6.BIBLIORAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ajith A., Harold N. T., Bikram S. G., Subbaratnam M.,** (2003). Stable transgene expression and random gene silencing in wheat. *Plant Biotechnology Journal* 1, 241-251.
- Altpeter F., Vasil V., Srivastava V., Stoger E., Vasil I.K.,** (1996a). Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Plant Cell Reports* 16, 12-17.
- Altpeter F., Vasil V., Vasil I.K.,** (1996b). Integration and expresión of the high-molecular-weight glutenin subunit 1Ax1 gene into wheat. *Nature Biotechnology* 14, 1155-1159.
- Altpeter F., Varshney A.,** (2001). Stable transformation and tissue culture response in current European winter wheats (*Triticum aestivum* L.). -En: *International Plant and Animal Genome IX Conference*. San Diego.
- Altpeter F., Popelka J.C., Wieser H.,** (2004). Stable expression of *IDX5* and *IDy10* high-molecular-weight glutenin subunit genes in transgenic rye drastically increases the polymeric glutelin fraction in rye flour. *Plant Molecular Biology* 54, 783-792.
- Altpeter F., Baisakh N., Beachy R., Bock R., Capell T., Christou P., Daniell H., Datta K., Datta S., Dix P.J., Fauquet C., Huang N., Kohli A., Mooibroek H., Nicholson L., N G., Nguyen T.T., Nugent G., Raemakers K., Romano A., Somers D.A., Stoger E., Taylor N., Visser R.,** (2005). Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding* 15, 305-327.
- Alvarez M.L., Guelman S., Halford N.G., Lustig S., Reggiardo M.I., Ryabushkina N., Schewry P., Stein J., Vallejos R.H.,** (2000). Silencing of HMW glutenins in transgenic wheat expressing extra HMWsubunits. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 319-327.
- Amoah B.K., Wu H., Sparks C., Jones H.D.,** (2001). Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue. *Journal of Experimental Botany* 52, 1135-1142.

- Anand A., Trick H.N., Gill B.S., Muthukrishnan S.,** (2003). Stable transgene expression and random gene silencing in wheat. *Plant Biotechnology Journal* 1,241-251.
- Anderson O.D.,Greene F.C., Yip R.E., Halford N.G., Shewry P.R., Malpica-Romero J.M.,** (1989). Nucleotide sequences of the two high-molecular-weight glutenine genes from the D-genome of a hexaploid bread wheat, *Triticum aestivum* L. cv. Cheyenne. *Nucleic Acids Research* 17, 461-462.
- Anderson O.D., Abraham-Pierce F.A., Tam A.,** (1998). Conservation in wheat high-molecular-weight glutenin gene promoter sequences: comparisons among loci among alleles of the *GLU-B1-1* locus. *Theoretical and Applied Genetics* 96, 568-576.
- Barceló P., Hagel C., Becker D., Martín A., Lorz H.,** (1994). Transgenic cereal (tritordeum) plants obtained at high-efficiency by microprojectile bombardment of inflorescence tissue. *Plant Journal* 5, 583-592.
- Barceló P., Lazzeri P.A.,** (1995). Transformation of cereals by microprojectile bombardment of immature inflorescence and scutellum tissues. En: *Jones H (ed) Methods in molecular biology: plant gene transfer and expression protocols*. Humana Press, Totowa N.J., pp: 13-123.
- Barro F., Rooke L., Bekes F., Gras P., Tatham A.S., Fido R., Lazzeri P.A., Shewry P.R. and Barceló P.,** (1997). Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. *Nature Biotechnology* 15, 1295-1299.
- Barro F., Barceló P., Lazzeri P.A., Shewry P.R., Martin A., Ballesteros J.,** (2003). Functional properties and agronomic performance of transgenic tritordeum expressing high molecular weight glutenin subunit genes *1Ax1* and *1Dx5*. *Journal of Cereal Science* 37, 65-70.
- Baum B.R.,** (1971). The taxonomic and cytogenetics implications of the problem of naming amphiploids of *Triticum* and *Secale*. *Euphytica* 20, 302-306.
- Becker D., Brettschneider R., Lörz H.,** (1994). Fertile transgenic wheat plants from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *Plant Journal* 5, 299-307.
- Bell G.D.H.,** (1987). The history of wheat cultivation. *Wheat Breeding*. Ed. F.G.H.Lupton. London. New York. Chapman and Hall, pp: 31-49.

- Bernardo A., Luengo P., Jouve N.**, (1988a). Chromosome constitution in G₂ and G₃ progenies of 6x-triticale x *T.turgidum* L. hybrids. *Euphytica* 37, 157-166.
- Bernardo A., Díaz F., Jouve N.**, (1988b). Chromosome factors affecting pairing in progenies of 6x-triticale x *Triticum turgidum* L. ssp *turgidum* conv. *durum* Desf. *Heredity* 60, 455-461.
- Binns A.N., Thomashow M.F.**, (1988). Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Annual Review of Microbiology* 42, 575-606.
- Blakeslee A.**, (1937). De´doublement du nombre de chromosomes chez les plantes par traitement chinique. *CR Acad Sci. Paris*, 205, 476-479.
- Blech A.E., Anderson O.D.**, (1996). Expression of a novel high-molecular-weight glutenin subunit gene in transgenic wheat. *Nature Biotechnology* 14, 875-879.
- Bradley L.R., Kim J.S., Matthyse A.G.**, (1997). Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot cells and *Arabidopsis* wound sites is correlated with the presence of a cell-associated, acidic polysaccharide. *Journal of Bacteriology* 179, 5372-5379.
- Bushuk W., Wrigley C.W.**, (1974). Proteins: Composition, structure and function. En: *Wheat: Production and Utilization*. G.E. Inglett GE, ed. AVI Publishing: Westport, CT; pp: 119-145.
- Campbell B.T., Baenziger P.S., Mitra A., Sato S., Clemente T.**, (2000). Inheritance of multiple transgenes in wheat. *Crop Science* 40, 1133-1141.
- Carrillo J.M., Rodríguez-Quijano M., Galiano A., Hamié B., Vazquez J.F., Orellana J.**, (1988). Composición en gluteninas de alto peso molecular de variedades de trigo blando registradas en España y su relación con la calidad panadera. *An. Aula Dei* 19, 239-250.
- Carrillo J.M., Vazquez J.F., Orellana J.**, (1990). Use of recombinat inbred lines of wheat for study of associations of high-molecular-weight glutenin subunits alleles to quantitative traits .1. Grain yield and quality prediction tests. *Theoretical Applied Genetics* 79, 321-330.

- Castillo A.M., Vasil V., Vasil I.K.,** (1994). Rapid production of fertile transgenic plants of rye (*Secale cereale* L.). *Bio-Technology* 12, 1366-1371.
- Creissen G., Smith C., Francis R., Reynolds H., Mullineaux P.,** (1990). *Agrobacterium*- and microprojectile-mediated viral DNA delivery into barley microspore-derived cultures. *Plant Cell Reports* 8, 680-683.
- Chen W.P., Gu X., Liang G.H., Muthukrishnan S., Chen P.D., Liu D.J., Gill B.S.,** (1998). Introduction and constitutive expression of a rice chitinase gene in bread wheat using biolistic bombardment and the bar gene as a selectable marker. *Theoretical Applied Genetics* 97, 1296-1306.
- Chen W.P., Chen P.D., Liu D. J., Kynast R., Friebe B., Velazhahan R., Muthukrishnan S., Gill B.S.,** (1999). Development of wheat scab symptoms is delayed in transgenic wheat plants that constitutively express a rice thaumatin-like protein gene. *Theoretical Applied Genetics* 99, 755-760.
- Cheng M., Fry J., Pang S., Zhou H., Hironaka C., Duncan D., Conner T., Wan Y.,** (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* 115, 971-980.
- Cheng M., Hu T.C., Layton J., Liu C.N., Fry J.E.,** (2003). Dessication of plant tissues post-*Agrobacterium* infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39, 595-604.
- Cheng M., Lowe B.A., Spencer T.M., Ye X.D., Armstrong C.L.,** (2004) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant* 40, 31-45.
- Chiu W., Niwa Y., Zeng W., Hirano T., Kobayashi H., Sheen J.,** (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology* 6, 326-330.
- Choi H.W., Lemaux P.G., Cho M.J.,** (2000). Increased chromosomal variation in transgenic versus nontransgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. *Crop Science* 40, 524-533.
- Christensen A.H., Sharrock R.A., Quail P.H.,** (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology* 18, 675-689.

- Christensen A.H., Quail P.H.,** (1996). Ubiquitin promoter-based for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research* 5, 213-218.
- Christou P., Swain W.F.,** (1990). Cotransformation frequencies of foreign genes in soybean cell cultures. *Theoretical and Applied Genetics* 79, 337-341.
- Chu C.C.,** (1978). The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. *Proc. Sympos. Plant Tissue Culture*. Science Press, Beijing, pp 43-50.
- Clough S.J., Bent A.F.,** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16, 735–743.
- Cuadrado A., Jouve N.,** (1994). Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-triticale. *Chromosome Research* 3, 331-338.
- Cuadrado A., Vitellozzi F., Jouve N, Ceoloni C.,** (1997). Fluorescence in situ hybridization with multiple probes applied to the analysis of wheat-rye chromosome pairing. *Theoretical and Applied Genetics* 94, 347-355.
- Dahleen L.S., Bregitzer P.,** (2002). An improved media system for high regeneration rates from barley immature embryo derived callus of commercial cultivar. *Crop Science* 42, 934–938.
- Dai S.H., Zheng P., Marmey P., Zhang S.P., Tian W.Z., Chen S.Y., Beachy R.N., Fauquet C.,** (2001). Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding* 7, 25-33.
- Dale P.J., Marks M.S., Brown M.M., Woolston C.J., Gunn H.V., Mullineaux P.M., Lewis D.M., Kemp J.M., Chen D.F., Gilmour D.M., Flavell R.B.,** (1989). Agroinfection of wheat: Inoculation of in vitro grown seedlings and embryos. *Plant Science* 63, 237-245.
- Dale P.J.,** (1993). The release of transgenic plants into agriculture. *Journal of Agricultural Science* 120, 1-5.
- Daley M., Knauf V.C., Summerfelt K.R., Tuner J.C.,** (1998). Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmid as a method for producing marker-free transgenic plants. *Plant Cell Reports* 17, 489-496.

- Deblock M., Herrera-Estrella L., Van Montagu M., Schell J., Zambryski P.,** (1984). Expresión of foreign genes in regenerated plants and their progeny. *European Molecular Biological Organization Journal* 3: 1681-1689.
- Deblock M., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gossele V., Movva N.R., Thompson C., Vanmontagu M., Leemans J.,** (1987). Engineering herbicide resistance in plnats by expression of a detoxifying enzyme. *European Molecular Biological Organization Journal* 6, 2513-2518.
- De Bustos A., Rubio P., Jouve N.,** (2000). Molecular characterisation of the inactive allele of the gene Glu-A1 and the development of a set of AS-PCR markers for HMW glutenins of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 1085-1094.
- De Bustos A., Rubio P., Soler C., Garcia P., Jouve N.,** (2001). Marker assisted selection to improve HMW-glutenins in wheat. *Euphytica* 119, 69-73.
- De la Riva G.A., González-Cabrera J., Vázquez-Padrón R., Ayra-Pardo C.,** (1998). *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. ISSN: 0717-3458, *Electronic Journal of Biotechnology* 1, nº 3.
- Demeke T., Hucl P., Båga M., Caswell K., Leung N., Chibbar R.N.,** (1999). Transgene inheritance and silencing in hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 99, 947-953.
- Drakakaki G., Christou P., Stoger E.,** (2000). Constitutive expression of soybean ferritin cDNA in transgenic wheat results in increased iron levels in vegetative tissues but not in seeds. *Transgenic Research* 9, 445-452.
- Doty S.L., Yu N.C., Lundin J.I., Heath J.D., Nester E.W.,** (1996). Mutational analysis of the input domain of the *VirA* protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* 178, 961-970.
- Douglas C.J., Halperin W., Nester E.W.,** (1982). *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in attachment to plant cell. *Journal of Bacteriology* 152, 1265-1275.
- Ebinuma H., Sugita K., Matsunaga E., Yamakado M.,** (1997). Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proceedings of National Academy of Sciences. USA* 94, 2117-2121.

- Eigsti O.**, (1938). A cytogenetical study of colchicines effects in the induction of polyploidy in plants. *Proceedings of National Academy of Sciences*. USA 24, 56-63.
- Feldman M.**, (1976). Wheats *Triticum* spp. (Gramineae-Triticinae). En: *Evolution in Crop Plants*. Simonds NW. Ed. Long man Group Ltd., Londres, pp: 120-128.
- Ferrer E., Linares C., González J.M.**, (2000). Efficient transient expresión of the β -glucuronidase reporter gene in garlic (*Allium sativum* L.). *Agronomie* 20, 869-874.
- Fetting S., Hess D.**, (1999). Expression of a chimeric stilbene synthase gene in transgenic wheat lines. *Transgenic Research* 8, 179-189.
- Folling L., Olesen A.**, (2001). Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore-derived callus and microspores by particle bombardment. *Plant Cell Reports* 20, 629-636.
- Forde B.G., Heyworth A., Pywell J., Kreis M.**, (1985). Nucleotide sequence of a B1 hordein gene and the identification of possible upstream regulatory elements in endosperm storage protein genes from barley, wheat and maize. *Nucleic Acids Research* 13, 7327-7339.
- Fu X.D., Duc L.T., Fontana S., Bong B.B., Tinjuangjum P., Sudhakar D., Twyman R.M., Christou P., Kohli A.**, (2000). Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Research* 9, 11-19.
- Galindo C., Jouve N.**, (1989). C-banding in meiosis. An approach to the study of genome interactions in Triticale. *Genome* 32, 1074-78.
- Garfinkel M, Nester E W.**, (1980). *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *Journal of Bacteriology* 144, 732-743.
- Gliddon C.**, (1994). The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their related species: biological models and theoretical perspectives. *Molecular Ecology* 3, 41-44.

- Goff S.A., Klein T.M., Roth B.A., Fromm M.E., Cone K.C., Radicella J.P., Chandler V. L.**, (1990). Transactivation of anthocyanin biosynthetic genes following transfer of B regulatory genes into maize tissues. *European Molecular Biological Organization Journal* 9, 2517-2522.
- Goldsbrough A.P., Lastrella C.N., Yoder J.I.**, (1993). Transposition mediated repositioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato. *Bio-technology* 11, 1286-1292.
- González J.M., Hernández I., Jouve N.**, (1997). Analysis of anther culture response in hexaploid triticale. *Plant Breeding* 116, 302-304.
- González J.M., Jouve N.**, (2000). Improvement of anther culture media for haploid production in triticale. *Cereal Research Communications* 28, 65-72.
- González, J.M., Jouve N. and Muñiz, L.M.**, (2002). Practical application of a molecular genetic map in triticale: locating QTLs for androgenesis. Proceeding of the 5th International Triticale Symposium. Edited by Plant Breeding and Acclimatization Institute, Radzików, 05-870, Poland. ISBN 0958559260, pp: 95-102.
- Goodwin J., Pastori G., Davey M., Jones H.D.**, (2004). Selectable markers: antibiotic and herbicide resistance, in: Pena, L. (Ed.), *Transgenic Plants: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa NJ
- Guivarch A., Caissard J.C., Brown S., Marie D., Dewitte W., Vanonckelen H., Chriqui D.**, (1993). Localization of target-cells and improvement of Agrobacterium-mediated transformation efficiency by direct acetosyringone pretreatment of carrot root disks. *Protoplasma* 174, 10-18.
- Gupta P.K., Reddy V.B.K.**, (1991). Cytogenetics of Triticale- a man-made cereal. *Chromosome engineering in plants: Genetics, Breeding, Evolution*. Gupta P.K. y Tsuchiya T. eds. Parte A, pp: 335-359.
- Gustafson J.P.**, (1982). Cytogenetics of Triticale. In “Cytogenetics of crop plants” *MS Swaminathan, PK Gupta, U Sinha*, eds. Macmillan India Ltd., pp228-250.
- Halford N.G, Field J.M., Blair H., Urwin P., Moore K., Robert L.,Thompson R., Flavell R.B., Tatham A.S., Shewry P.R.**, (1992). Analysis of HMW glutenin subunits encoded by chromosome 1A of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) indicates quantitative effects on grain quality. *Theoretical and Applied Genetics* 83, 373-378.

- Haliloglu K., Baenziger P.S.,** (2003). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated wheat transformation. *Cereal Research Communications* 31, 9-16.
- Hammond-Kosack M.C.U., Holdsworth M.J., Bevan M.W.,** (1993). *In vitro* footprinting of a low molecular weight glutenin gene (*LM WG-1DI*) in wheat endosperm. *European Molecular Biological Organization Journal* 12, 545-554.
- Harwood W.A., Ross S.M., Cilento P., Snape J.W.,** (1995). The effect of DNA/gold particle preparation technique, and particle bombardment device, on the transformation of barley (*Hordeum vulgare*). *Euphytica* 111, 67-76.
- Hauptmann R.M., Vasil V., Ozalias-Aikins P., Tabaeizadeh Z., Rogers S.G., Fraley R.T., Horsch R.B., Vasil I.K.,** (1988). Evaluation of selectable markers for obtaining stable transformation in the Gramineae. *Plant Physiology* 86, 602-606.
- He G.Y., Rooke L., Cannell M., Rasco-Gaunt S., Sparks C., Lamacchia C., Békes F., Tatham A.S., Barcelo P., Shewry P.R., Lazzeri P.A.,** (1998). Current status of transformation in bread and durum wheats and modifications of gluten quality. *Acta Agronomica Hungarica* 46 (4), pp: 449-462.
- Hellens, RP., Edwards, EA., Leyland NR., Bean, S., Mullineaus PM.,** (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* 42, 919-832.
- Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montague M., Schell, J.,** (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303, 209–213.
- Hess D., Dressler K., Nimmrichter R.,** (1990). Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science* 72, 233-244.
- Hess J., Carman J.,** (1998). Competence of immature wheat embryos: genotype, donor plant environment and endogenous hormone levels. *Crop Science* 38, 249-253.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T.,** (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* 6(2), 271-282.

- Hiei Y., Komari T., Kubo T.,** (1997). Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology* 35, 205-218.
- Hillman G.C.,** (1972). Papers in Economic History (ed. *E.S. Higgs*), Cambridge University Press, pp 182-188
- Hooykaas P.J., Shilperoort R.A.,** (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* 19, 15-38.
- Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G., Sanders P.R., Lloyd A., Hoffmann N.,** (1984). Inheritance of functional genes in plants. *Science* 223, 496-498.
- Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N., Eicholz D., Rogers S.G., Fraley R.T.** (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.
- Hoseney R.C.,** (1985). The missing phenomenon. *Cereal Foods World* 30: 453-457.
- Hu T., Metz S., Chay C., Zhou H.P., Biest N., Chen G., Cheng M., Feng X., Radionenko M., Lu F., Fry J.,** (2003). *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosphate selection. *Plant Cell Reports* 21, 1010-1019.
- Huber M., Hahn R., Hess D.,** (2002). High transformation frequencies obtained from a commercial wheat (*Triticum aestivum* L. cv. 'Combi') by microbombardment of immature embryos followed by GFP screening combined with PPT selection. *Molecular Breeding* 10, 19-30.
- Hueros G., Jouve N.,** (2002). Genómica Funcional en Plantas. *Genómica y Mejora Vegetal* (Nuez, F., Carrillo, J.M., Lozano, R., coord.), ISBN: 84-8476-066-9, pp: 331-364.
- Iser M., Fettig S., Scheyhing F., Viertel K., Hess D.,** (1999). Genotype-dependent stable genetic transformation in german spring wheat varieties selected for high regeneration potential. *Journal of Plant Physiology* 154, 509-516.
- Ishida Y., Saito H., Ohta S., Hiei Y., Komari T., Kumashiro T.,** (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* 14, 745-750.

- Iuchi S.**, (1993). Phosphorylation/dephosphorylation of the receiver module at the conserved aspartate residue controls transphosphorylation activity of histidine kinase in sensor protein ArcB of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 268, 23972-23980.
- Iyer L. M., Kumpatla S. P., Chandrasekharan M. B., Hall T.C.**, (2000). Transgene silencing in monocots. *Plant Molecular Biology* 43, 323-346.
- Jackson E.A., Holt L.M., Payne P.I.**, (1983). Characterization of high molecular weight gliadin and low-molecular-weight glutenin subunits of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and the chromosomal location of their controlling genes. *Theoretical and Applied Genetics* 66, 29-37.
- Jähne A., Becker D., Brettschneider R., Lörz H.**, (1994). Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley. *Theoretical and Applied Genetics* 89, 525-533.
- James C.**, (2004). Preview: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2004. ISBN: 1-892456-36-2. *ISAAA Briefs* N° 32. ISAAA: Ithaca, NY
- James D.J., Uratsu S., Cheng J.S, Negri P., Viss P., Dandekar A.M.**, (1993). Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *Plant Cell Reports* 12, 559-563.
- Jardinaud M.F., Souvré A., Alibert G., Beckert M.**, (1995). *Uida* gene transfer and expression in maize microspores using the biolistic method. *Protoplasma* 187, 138-143.
- Jefferson, R.A.**, (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5, 429-436.
- Jeon G.A., Eum J.S., Sim W.S.**, (1998). The role of inverted repeat (IR) sequence of the *virE* gene expression in *Agrobacterium tumefaciens* pTiA6. *Molecules and Cells* 8, 49-53.
- Jin S., Song Y., Pan S., Nester E.W.**, (1993). Characterisation of a *virG* mutation that confers constitutive virulence gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Microbiology* 7, 555-562.

- Joao K.H.L., Brown T.A.,** (1993). Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium-tumefaciens* c58clrifr/pgsfr1161 in the presence of acetosyringone. *Plant Cell Reports* 12, 422-425.
- Joersbo M.,** (2001). Advances in the selection of transgenic plants using non-antibiotic marker genes. *Physiologia Plantarum* 111, 269-272.
- Johnston S.A., Anziano P.Q., Shark K., Sanford J.C., Butow R.A.,** (1988). Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science* 240, 1538-1541.
- Jones H.D.,** (2005). Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *Journal of Cereal Science* 41, 137-147.
- Jones H.D., Doherty A., Wu H.,** (2005). Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Plant methods* (en prensa).
- Jouve N., Soler C., Saiz G.,** (1977a). Cytoplasmic influence on the meiosis of 6x-Triticale. *Z Pflanzenzüchtg*, 78, 124-134.
- Jouve N., Montalvo D.,** (1977b). Meiotic behaviour in hybrids between 6x-triticale and *Secale cereale* L. *Proc 8th Congr Eucarpia*, Madrid, Spain, pp: 191-197.
- Jouve N., Bernardo A., Soler C.,** (1984). Hybrids 6x-triticale x *Triticum turgidum* L. and the obtention of its F₂ and BC₁ progenies. *Cereal Research Communications* 12, 223-28.
- Jouve N., Montalvo D., Soler C.,** (1985). Distribution of univalents in the meiosis and chromosomal análisis of the progeny of 6x triticale x common wheat hybrids. *Eucarpia meeting on Triticale Clermont Ferrand*, France, pp 227-37.
- Jouve N., Diez N., Rodríguez M.,** (1988). C-banding in 6x-triticale x *Secale cereale* hybrid cytogenetics. *Theoretical and Applied Genetics* 57, 75-79.
- Jouve N., Soler C.,** (1996). Triticale genomic and Chromosomes'history. En *Triticale: Today and Tomorrow* (H. Guedes-Pinto et al. Eds), I.S.B.N: 0-7923-4212-7. Kluwer Academic Publishers. Holanda, pp: 91-118.

- Karieva P., Morris W., Jacobi C.M.,** (1994). Studying and managing the risk of cross-fertilization between transgenic crops and wild relatives. *Molecular Ecology* 3, 15-21.
- Kass S.U., Pruss D., Wolffe A.P.,** (1997). How does DNA methylation repress transcription? *Trends in Genetics* 13, 444-449.
- Kemper E.L., da Silva M.J., Arruda P.** (1996). Effect of microprojectile bombardment parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed cultured immature maize (*Zea mays* L.) embryos. *Plant Science* 121, 85–93.
- Khanna H.K., Daggard G.E.,** (2003). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using a superbinaty vector and a polyamine-supplemented regeneration medium. *Plant Cell Reports* 21, 429-436.
- Kihara H.,** (1924). Cytologische and genetische Studien bei wichtigen Getreidearten mit besonderer Rücksicht auf das Verhalten der Chromosomen und die Sterilität in den Bastarden. *Mem Coll Sci Kyoto Imp Univ* 1, 1-200.
- Kikkert J.,** (1993). The Biolistic PDS-1000/He device. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 33, 221-226.
- Kiss A.,** (1966). Neue richtung in der Triticale-züchtung. *Z Pflanzenzüchtg* 55, 309-329.
- Kiss A., Videki L.,** (1971). Development of secondary hexaploid triticales by crossing Triticale with rye. *Wheat Inf Ser* 32, 17-20.
- Kohli A., Leech M., Vain P., Lauri D.A., Christou P.,** (1998). Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediation by the establishment of integration hot spots. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* 95, 7203-7208.
- Kohli A., Twyman R.M., Abranches R., Wegel E., Stoger E., Christou, P.,** (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Molecular Biology* 52, 247-258.
- Komari T., Hiei Y., Saito Y., Murai N., Kumashiro T.,** (1996). Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant Journal* 10, 165-174.

- Koprek T., Hänsch R., Nerlich A., Mendel R.R., Schulze J.,** (1996). Fertile transgenic barley of different cultivars obtained by adjustment of bombardment conditions to tissue response. *Plant Science* 119, 79-91.
- Lafferty J., Lelley T.,** (2001). Introduction of high molecular weight glutenin subunits 5+10 for the improvement of the bread-making quality of hexaploid triticale. *Plant Breeding* 120, 33-37.
- Lamacchia C., Shewry P.R., Di Fonzo N., Forsyth J.L., Harris N., Lazzeri P.A., Napier J.A., Halford N.G., Barceló P.,** (2001). Endosperm-specific activity of a storage protein gene promoter in transgenic wheat seed. *Journal of Experimental Botany* 52, 243-250.
- Large E.C.,** (1954). Growth Stages in Cereals. Illustration of the Feekes Scale. *Plant Pathology* 3, 128-129.
- Larter E.N.,** (1968). Triticale. *Agric Inst Can Rev* 23:12-15.
- Lazo G. R., Stein P. A., Ludwig R. A.,** (1991). A DNA Transformation- Competent Arabidopsis Genomic Library in *Agrobacterium*. *Bio-Technology* 9, 963-967.
- Lindshau M., Oehler E.,** (1935). Untersuchungen am konstant intermediären additiven Rimpauschen Weizen-Roggen-Bastarden. *Der Zuchter*, 7, 228-233.
- Lukaszewski A.J., Apolinarska B., Gustafson J.P., Krolow K.D.,** (1987a). Chromosome pairing and aneuploidy in tetraploid triticale. I. Stabilized karyotypes. *Genome* 29, 554-561.
- Lukaszewski A.J., Apolinarska B., Gustafson J.P., Krolow K.D.,** (1987b). Chromosome pairing and aneuploidy in tetraploid triticale. II. Unstabilized karyotypes. *Genome* 29, 562-569.
- Lukaszewski A.J., Curtis C.H.,** (1994). Transfer of the *Glu-D1* gene from chromosome 1D of breadwheat to chromosome 1A in hexaploid *Triticale*. *Plant Breed* 112, 177-182.
- Mackey J.,** (1966). Species relationship in Triticum. Proceedings of the 2nd International Wheat Genetics Symposium, Lund. *Hereditas suppl* 2, 237-276.

- Manoharan M., Dahleen L.S.,** (2002). Genetic transformation of the commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar Conlon by particle bombardment of callus. *Plant Cell Reports* 21, 76-80.
- McCormac A. C., Wu H., Bao M., Wang Y., Xu R., Elliott M.C., Chen D.,** (1998). The use of visual marker genes as cell-specific reporters of *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery to wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) *Euphytica* 99, 17-25.
- McElroy D., Blowers A.D., Jenes B., Wu R.,** (1991). Construction of expression vectors based on the rice actin-1 (Act1) 5' region for use in monocot transformation. *Molecular and General Genetics* 231, 150-160.
- McElroy D., Brettel R.I.S.,** (1994). Foreign gene expression in transgenic cereals. *Trends in Biotechnology* 12, 62-68.
- McFadden E.S., Sears E.R.,** (1946). The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J Hered* 37, 81-89.
- Mentewab A., Letellier V., Marque C., Sarrafi A.,** (1999). Use of anthocyanin biosynthesis stimulatory genes as marker for the genetic transformation of haploid embryos and isolated microspores in wheat. *Cereal Research Communications* 27, 1-2.
- Merker A.,** (1976). The cytogenetic effect of heterochromatin in hexaploid triticales. *Hereditas* 83, 215-222.
- Miflin B.J., Field J.M., Shewry P.R.,** (1983). Cereal storage proteins and their effect on technological properties. En Daussant J, Mossé J, Vaughan J (eds.) *Seed Proteins. Acad Press*, pp: 255-319.
- Mihaly R., Kótai E., Kiss O., Pauk J.,** (2002). In vitro selection of transformed foreign gene (*bar*) in wheat anther culture. *Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology* S1-03, pp: 9-10.
- Miller C.U.,** (1963). Kinetin and kinetin-like compounds. Moderne methoden der pflanzen analyse. Linskens H.F., Tracey M.V. Eds., pp: 194-202.
- Mitic N., Nikolic R., Ninkovic S., Miljus-Djukic J., Neskovic M.,** (2004). *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration of *Triticum aestivum* L. *Biologia Plantarum* 48, 179-184.

- Muench R.S.**, (1990). Requirements and considerations in successful field releases of genetically engineered plants. En: *International symposium on the biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms*. Kiawah Island, South Carolina, 3-7.
- Muller E., Lorz H., Lutticke S.**, (1996). Variability of transgene expression in clonal cell lines of wheat. *Plant Science* 114, 71-82.
- Murakami T., Anzai H., Imai S., Satoh A., Nagaoka K., Thompson C.J.**, (1986). The Bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces-hygroscopicus*-molecular-cloning and characterization of the gene-cluster. *Molecular and General Genetics* 205, 42-50.
- Murashige T., Skoog F.**, (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Müntzig A.**, (1936). Über die entstehungsweise 56-chromosomiger Weizen-Roggen bastarde. *Züchter*, 8, 188-191.
- Nain V., Jaiswal R., Dalal M., Ramesh B., Kumar P.A.**, (2005). Polymerase chain reaction analysis of transgenic plants contaminated by *Agrobacterium*. *Plant Molecular Biology Reporter* 23, 59-65.
- Nakajima G.**, (1958). Genetical and cytological studies in breeding of amphiploid types between *Triticum* and *Secale*. I, The external characters and chromosomes of the fertile F₁ *T. turgidum* n=14 x *S.cereale* n=7 and its F₂ progenies. *Jap J Genet* 25, 139-48.
- Nehlin L., Möllers C., Bergman P., Glimelius K.**, (2000). Transient β -gus and *gfp* gene expression and viability analysis of microprojectile bombardment microspores of *Brassica napus* L. *Journal of Plant Physiology* 156, 175–183.
- Nehra N.S., Chibbar R.N., Leung N., Caswell K, Mallard C., Steinhauer L., Baga M., Kartha K.K.**, (1994). Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs. *Plant Journal* 5, 285-297.
- Nehra N.S., Chibbar R.N., Kutty K.K.**, (1995). Wheat transformation: Methods and prospects. *Plant Breeding Abstracts* 65, 803-808.

- Nester E.W., Gordon M.P., Amasino R.M., Yanofsky M.F.,** (1984). Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Annual Review of Plant Physiology* 35, 387-413.
- Nixon B.T., Ronson C.W., Ausubel F.M.,** (1986). Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 83,7850-7854.
- Odell J., Caimi P., Sauser B., Russell S.,** (1990). Site-directed recombination in the genome of transgenic tobacco. *Molecular and General Genetics* 223, 369-378.
- O'Mara J.G.,** (1948). Fertility in allopolyploid. *Rec Genet Sci Am* 17:52.
- Ortiz J.P.A., Reggiardo M.I., Ravizzini R.A., Altabe S.G., Cervigni G.D.L., Spittleler M.A., Morata M.M., Elias F.E., Vallejos R.H.,** (1996). Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation. *Plant Cell Reports* 15, 877-881.
- Osborne T.B.,** (1907). The proteins of the wheat kernel. *Publ. 84 Carnegie Inst,* Washington.
- Pan S.Q., Charles T., Jin S., Wu Z.L., Nester E.W.,** (1993). Pre-formed dimeric state of the sensor protein VirA is involved in plant-*Agrobacterium* signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90, 9939-9943.
- Pastori G.M., Wilkinson M.D., Steele S.H., Sparks C.A. Jones H.D., Parry A.J.,** (2001). Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties. *Journal of Experimental Botany* 52, 857-863.
- Patnaik D., Khurana P.** (2001). Wheat biotechnology: A minireview. *Electronic Journal of Biotechnology* 4, n°2.
- Pawlowski W.P., Somers D.A.,** (1998). Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* 95, 12106-12110.
- Payne P.I., Corfield K.G.,** (1979). Subunit composition of wheat glutenin proteins isolated by gel filtration in a dissociating medium. *Planta* 145, 83-88.

- Payne P.I., Holt L.M., Law C.N.,** (1981). Structural and genetical studies on the high molecular weight subunits of wheat glutenin. Part 1: allelic variation in subunits amongst varieties of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 60, 229-236.
- Payne P.I., Nightingale M.A., Krattiger A.F., Holt L.M.,** (1987). The relation between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 40, 51-65.
- Pellegrineschi A., Noguera L.M., Skovmand B., Brito R.M., Velásquez L., Salgado M.M., Hernandez R., Warburton M., Hoisington D.,** (2002). Identification of highly transformable wheat genotypes for mass production of fertile transgenic plants. *Genome* 45, 421-430.
- Peña E.,** (2004). Análisis de la calidad del trigo blando, *Triticum aestivum* L. Caracterización genética, cuantificación y composición de las proteínas del grano y su influencia en las propiedades reológicas. *Tesis Doctoral, Departamento de Biología Celular y Genética, Universidad de Alcalá.*
- Peña E., Bernardo A., Soler C., Jouve N.,** (2005). Relationship between common wheat (*Triticum aestivum* L.) gluten proteins and dough rheological properties. *Euphytica* 143, 169-177.
- Perl A., Kless H., Blumenthal A., Galili G., Galun E.,** (1992). Improvement of plant regeneration and GUS expression in scutellar wheat calli by optimization. *Molecular General Genetics* 235, 279-284.
- Permingeat H.R., Alvarez M.L., Cervigni G.D.L., Ravizzini R.A., Vallejos R.H.,** (2003). Stable wheat transformation obtained without selectable markers. *Plant Molecular Biology* 52, 415-419.
- Perret S.J., Valentine J., Leggett J.M., Morris P.,** (2003). Integration, expression and inheritance of transgenes in hexaploid oat (*Avena sativa* L.). *Journal of Plant Physiology* 160, 931-943.
- Popelka J.C., Altpeter F.,** (2003). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of rye (*Secale cereale* L.). *Molecular Breeding* 11, 203-211.

- Popineau Y., Deshayes G., Lefebvre, Fido R., Tatham A., Shewry P.R.,** (2001). Prolamin Aggregation, Gluten Viscoelasticity and Mixing Properties of Transgenic Wheat Lines Expressing 1Ax and 1Dx High Molecular Weight Glutenin Subunit Transgenes. *J. Agric. Food Chem.* 49, 395-401.
- Provan J., Wolters P., Cadwell K.H., Powell W.,** (2004). High-resolution organellar genome analysis of Triticum and Aegilops sheds new light on cytoplasm evolution in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 108, 1182-1190.
- Puchta, H.,** (2000). Removal selectable marker genes: taking the shortcut. *Trends Plant in Science* 5, 273-274.
- Rampitsch C., Jordan MC, Cloutier S.,** (2000). A matrix attachment region is located upstream from the high-molecular-weight glutenin gene *Bx7* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* 43, 483-486.
- Randall P.G., Manley M., McGill A.E.J., Taylor J.R.N.,** (1993). Relationships between the high Mr subunits of glutenin of South African wheats and end-use quality. *Journal of Cereal Science* 18, 251-258.
- Rasco-Gaunt S., Barcelo P.,** (1999a). Immature inflorescence culture of cereals: A highly responsive system for regeneration and transformation. *Methods in Molecular Biology, Plant Cell Protocols*. Eds. R D Hall. Totowa, NJ: Humana Press Inc., pp: 71-81.
- Rasco-Gaunt S., Riley A., Barcelo P., Lazzeri P.A.,** (1999b). Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Reports* 19, 118-127.
- Rasco-Gaunt S., Riley A., Barcelo P., Lazzeri P.A.,** (1999c). A facile method for screening for phosphinothricin (PPT)-resistant transgenic wheats. *Molecular Breeding* 5, 255-262.
- Rasco-Gaunt S., Riley A., Cannell M., Barcelo P., Lazzeri P.A.,** (2001). Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment. *Journal of Experimental Botany* 52, 865-874.
- Razin A.,** (1998). CpG methylation, chromatin structure and gene silencing- the three way interaction. *European Molecular Biological Organization Journal* 17, 4905-4908.

- Redway F.A., Vasil V., Lu D., Vasil I.K.,** (1990a). Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 79, 609-617.
- Redway F.A., Vasil V., Vasil I.K.,** (1990b). Characterization and regeneration of *Triticum aestivum* L. (wheat) embryogenic cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* 8, 714-717.
- Reed J., Privalle L., Powell M.L., Meghji M., Dawson J., Dunder E., Suttie J., Wenck A., Launis K., Kramer C., Chang Y.F., Hansen G., Wright M.,** (2001). Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 37, 127-132.
- Rhodes C.A., Lowe K.S., Ruby K.L.,** (1988). Plant-regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell-cultures. *Bio-Technology* 6, 56-60.
- Ritala A., Aikasalo R., Aspegren K., Salmenkallio-Marttila M., Akerman S., Mannonen L., Kurtén U., Puupponen-Pimiä R., Teeri T.H., Kauppinen V.,** (1995). Transgenic barley by particle bombardment. Inheritance of the transferred gene and characteristics of transgenic barley plants. *Euphytica* 85, 81-88.
- Rogers H.J., Parkers H.C.,** (1995). Transgenic plants and the environment. *Journal of Experimental Botany* 46, 467-488.
- Rooke L., Bekes F., Fido R., Barro F., Tatham A.S., Barcelo P., Lazzeri P., Shewry P.R.,** (1999). Overexpression of a gluten protein in transgenic wheat results in greatly increased dough strength. *Journal of Cereal Science* 30: 115-120.
- Rubio P.,** (1998). Obtención y análisis genético de marcadores cromosómicos para la introgresión de centeno en trigo. *Tesis Doctoral, Departamento de Biología Celular y Genética, Universidad de Alcalá.*
- Rubio P., Danzam L., Jouve N.,** (1999). Meiotic behaviour, chromosome stability and genetic analysis of the preferential transmission of 1B-1R, 1A-1R and 1R (1D) chromosomes in intervarietal hybrids of wheat. *Agronomie* 19, 57-68.
- Rubio S., Jouve N., González J.M.,** (2004). Biolistic transfer of the gene *uidA* and its expression in haploid embryo-like structures of triticale (*xTriticosecale* Wittmack). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77, 203-209.

- Sambrook J., Frisch E.F., Maniatis T.A.**, (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez-Monge E., Tijo JH.**, (1954). Note on 42 chromosome Triticale. *Caryologia supp.* 2, 748.
- Sanchez-Monge E.**, (1956a). Studies on 42-chromosome Triticale. I. The production of the amphiploids. *Ann Est Exp Aula Dei* 4, 191-207.
- Sanchez-Monge E.**, (1956b). Crossability of tetraploid wheat species with cultivated rye. *Wheat Inf Serv* 3, 30.
- Sánchez-Monge E.**, (1956c). Fertility in triticales. *Wheat Inf Serv* 3, 29.
- Sánchez-Monge E.**, (1958). Hexaploid triticales. *Proc 1st Int Wheat Genet Symp Manitoba*, pp: 181-194.
- Sánchez-Monge E.**, (1968). Improvement of endosperm quality in Triticale. *Proc 3rd Int Wheat Genet Symp*, pp: 371-372.
- Sánchez-Monge E.**, (1969). La saga del Cachirulo. *Ann Est Exp Aula Dei* 10, 795-799.
- Sánchez-Monge E.**, (1973). Hexaploid triticales with different cytoplasms. *Ann INIA. Ser Prod Veg* 3, 37-43.
- Sanchez-Monge E., Soler C.**, (1973). Wheat and Triticale with rye cytoplasm. *Proc 4th Int Wheat Genet Symp Columbia, Missouri*, pp: 387-390.
- Sánchez- Monge E.**, (1974). Development of triticales in wertern Europe. *Proc Symp Triticale El Batán, Mexico*, pp: 31-39.
- Sánchez-Monge E.**, (1975). Hexaploid triticales with different cytoplasms. *Proc Eucarpia Triticale Symposium Leningado, USSR*, pp: 75-180.
- Sanford J., Klein T., Wolf E., Allen N.**, (1987). Delivery of substances into cells and tissues using particle bombardment process. *J. Part. Sci. Tech* 5, 27-37.
- Sanford J.**, (1988). The biolistic process. *Trends in Biotechnology* 6, 299-302.

- Sangtong V., Moran D.L., Chikwamba R., Wang K., Woodman-Clikeman W., Long M.J., Lee M., Scott M.P., (2002).** Expression and inheritance of the wheat Glu-1DX5 gene in transgenic maize. *Theoretical and Applied Genetics* 105, 937-945.
- Scoles G.J., Kaltsikes P.J., (1974).** The cytology and cytogenetics of Triticale. *Z. Pflanzenzüchtg* 73, 13-43.
- Sharp P.J., Desai S., Gale M.D., (1988).** Isozyme variation and RFLPs at the β -amylase loci in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 76, 691-699.
- Sharma K.K., Sharma H.C., Seetharama N., Ortiz R., (2002).** Development and Deployment of Transgenic Plants: Biosafety Considerations. *In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant* 38(2), 106-115.
- Shewry P.R., Mifflin B.J., (1985).** Proteins of economically important cereals. *Adv Cereal Sci Technol* 7, 1-84.
- Shewry P.R., Parmar S., Fulrath N., Kasarda D.D., Miller T.E., (1986).** Chromosomal locations of the structural genes for secalins in wild perennial rye (*Secale montanum* Guss) and cultivated rye (*Secale cereale* L.) determined by two-dimensional electrophoresis. *Can J Genet Cytol* 28, 76-83.
- Shewry P.R., Halford N.G., Tatham A.S., (1992).** High molecular weight subunits of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science* 15, 105-120.
- Shewry P.R., Tatham A.S., Halford N.G., Barker J.H.A., Hannappel U., Gallois P., Thomas M., Kreis M., (1994).** Opportunities for manipulating the seed protein composition of wheat and barley in order to improve quality. *Transgenic Research* 3, 3-12.
- Shewry P.R., Tatham A.S., Barro F., Barceló P., Lazzeri P., (1995).** Biotechnology of breadmaking: unravelling and manipulation the multi-protein gluten complex. *Bio-technology* 13, 1185-1190.
- Shewry P.R., Tatham A.S., Halford N.G., (1999).** The prolamins of the Triticeae. In: Casey R, Shewry P.R., eds. *Seed proteins*. Dordrecht: Kluwer Academic Press, pp: 35-78.

- Shewry P.R., Pompienau Y., Lafiandra D., Belton P.,** (2001). Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. *Trends in Food Science Technology* 11, 433-441.
- Shimamoto K., Terada R., Izawa T., Fujimoto H.,** (1989). Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338, 274-276.
- Smith E.F., Townsend C.O.,** (1907). A plant tumour of bacterial origin. *Science* 25, 671-673.
- Smith R.H., Hood E.E.,** (1995). *Agrobacterium tumefaciens* transformation in monocotyledons. *Crop Science* 35, 301-309.
- Soler C., Montalvo D., Jouve N.,** (1980). Secondary association and univalent chromosomes in hybrids of hexaploid triticale and rye and wheat. *J Hered* 71, 408-410.
- Soler C., García P., Jouve N.,** (1990). Meiotic expression of modified chromosome constitution and structure in 6x-triticale. *Heredity* 65, 21-28.
- Sparks C.A., Jones H.D.,** (2004). Transformation of wheat by biolistics, in: Curtis, I. (Ed.), *Transgenic Crops of the World-Essential Protocols*. Kluwer, Dordrecht.
- Srivastava V., Vasil V., Vasil I.K.,** (1996). Molecular characterisation of the fate of transgenes in transformed wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 92, 1031-1037.
- Srivastava V., Anderson O.A., Ow D.W.,** (1999). Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns. *Proceedings of Nacional Academy of Sciences, USA* 96, 11117-11121.
- Steck T.R.,** (1997). To plasmid type effects of T-DNA processing in *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiology Letters* 147, 121-125.
- Stewart Jr C.N., Halfhill M.D., Warwick S.I.,** (2003). Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nature* 4, 806-817.

- Svitashev S.K., Pawlowski W.P., Makarevitch, I., Plank D.W., Somer D.A.,** (2002). Complex transgene locus structures implicate multiple mechanisms for plant transgene rearrangement. *Plant Journal* 32, 433-445.
- Sybenga, J.** (1998). Forty years of cytogenetics in plant breeding: a personal view. En *Current Topics in Plant Cytogenetics related to plant improvement*. (Tamas Lelley, Ed.) WUV Universitätsverlag, Viena; pp: 22-32.
- Tachibana K., Watanabe T., Sekizawa Y., Takematsu T.,** (1986). Action mechanism of Bialaphos.2.Accumulation of ammonia in plants treated with Bialaphos. *Journal of Pesticide Science* 11, 33-37.
- Takumi S., Shimada T.,** (1996). Production of transgenic wheat through particle bombardment of scutellar tissues: frequency is influenced by culture duration. *Journal of Plant Physiology* 149, 418-423.
- Takumi S., Shimada T.,** (1997). Variation in transformation frequencies among six common wheat cultivars through particle bombardment of scutellar tissues. *Genes and Genetics Systems* 72, 63-69.
- Taylor N.J., Fauquet C.M.,** (2002). Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biology* 21, 963-977.
- Thomas J.B., Kaltsikes P.J.,** (1972). Genotypic and cytological influences on the meiosis of hexaploid Triticale. *Can J Genet Cytol* 4, 889-898.
- Thomas M.S., Flavell R.B.,** (1990). Identification of an enhancer element for the endosperm-specific expression of high molecular weight glutenin. *The Plant Cell* 2, 1171-1180.
- Thomashow M.F., Karlinsey J.E., Marks J.R., Hulbert R.E.,** (1987). Identification of a new virulence locus in *Agrobacterium tumefaciens* that affects polysaccharide composition and plant attachment. *Journal of Bacteriology* 169, 3209-3216.
- Thompson C.J., Movva N.R., Tizard R., Crameri R., Davies J.E., Lauwereys M., Botterman J.,** (1987). Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces-hygroscopicus*. *European Molecular Biology Organization Journal* 6, 2519-2523.

- Tingay S, McElroy D, Kalla R, Fieg S, Wang MB, Thornton S, Bretell R., (1997)** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant Journal* 11, 1369-1376.
- Tinland B., Schoumacher F., Gloeckler V., Bravo A.M., Hohn B., (1995).** The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *European Molecular Biological Organization Journal* 14, 3585-3595.
- Toki S., Takamatsu S., Nojiri Ch., Ooba S., Anzai H., Iwata M., Christensen A.H., Quail P. H., Uchimiya H., (1992).** Expression of a maize ubiquitin gene promoter-bar chimeric gene in transgenic rice plants. *Plant Physiology* 100, 1503-1507.
- Torisky R.S., Kovacs L., Avdiushko S., Newman J.D., Hunt A.G., Collins G.B., (1997).** Development of a binary vector system for plant transformation based on supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Chry5. *Plant Cell Reports* 17, 102-108.
- Umbeck P.F., Barton K.A., Nordheim E.V., McCarthy J.C., Parrott W.L., Jenkins J.N., (1990).** Degree of pollen dispersal by insects from a field test of genetically engineered cotton. *Journal of Economic Entomology* 84, 1943-1950.
- Uthayakumaran S., Lukow O.M, Jordan M.C., Cloutier S., (2003).** Development of genetically modified wheat to assess its dough functional properties. *Molecular Breeding* 11, 249-258.
- Vain P., McMullen M.D., Finer J.J., (1993).** Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports* 12, 84-88.
- Vain P., De Buyser J., Bui Trang V., Haicour R., Henry Y., (1995).** Foreign gene delivery into monocotyledonous species. *Biotechnol. Adv.* 13, 653-671
- Vasil V., Castillo A.M., Fromm M.E., Vasil I.K., (1992).** Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regeable embryogenic callus. *Bio-Technology* 10, 667-674.
- Vasil V., Srivastava V., Castillo AM., Fromm M., Vasil I.K., (1993).** Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. *Bio-Technology* 11, 1553-1558.

- Vasil I.K., Bean S., Zhao J., McCluskey P., Lookhart G., Zhao H.P., Altpeter F., Vasil V.,** (2001). Evaluation of baking properties and gluten protein composition of field grown transgenic wheat lines expressing high molecular weight glutenin gene *LAX1*. *Journal of Plant Physiology* 158, 521-528.
- Viertel K., Schmid A., Iser M., Hess D.** (1998). Regeneration of german spring wheat varieties from embryogenic scutellar callus. *Journal of Plant Physiology* 152, 167-172.
- Villegas E.M., Eggum B.O., Vasal S.K., Kohli M.M.,** (1980). *Food Nutr. Bull* 2, 7-24.
- Visarada K.B.R.S., Sarma N.P.,** (2004). Transformation of indica rice through particle bombardment: factors influencing transient expression and selection. *Biologia Plantarum* 48 (1), 25-31.
- Wanous M.K., Munkvold J.D., Kruse J.D., Brachman E.E., Klawiter M.A., Fuehrer K.J.,** (2003). Identification of chromosome arms influencing expression of the HMW glutenins in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 106, 213-220.
- Weeks J.T., Anderson O.D., Blech A.E.,** (1993). Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology* 102, 1077-1084.
- Weir B., Gu X., Wang M.B., Upadhyaya N., Elliott A.R., Brettell R.I.S.,** (2001). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using suspension cells as a model system and green fluorescent protein as a visula marker. *Australian Journal of Plant Physiology* 28, 807-818.
- Werner J.E., Endo T.R., Gill B.S.,** (1992). Toward a cytogenetically based physical map of wheat genome. *Proceedings of Nacional Academy of Sciences, USA* 89, 11307-11311.
- Whitley M.H., Spress L.D.,** (1977). Role of bacterial lipopolysaccharide in attachment of *Agrobacterium* to moss. *Plant Physiology* 60, 765-766.
- Wieser H., Zimmermann G.,** (2000). Importance of amounts and proportions of high molecular weight subunits of glutenin for wheat quality. *Eur. Food Res. Technol.* 210, 324-330.

- Winans S.C.**, (1992). Two-way chemical signalling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiology Reviews* 56, 12-31.
- Wohlleben W., Arnold W., Broer I., Hillemann D., Strauch E., Puhler A.**, (1988). Nucleotide-sequence of the phosphinotricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes*-Tu494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70, 25-37.
- Wolski T., Maczinska L., Tymienicka E.**, (1985). Winter triticale varieties from the Choryn and Laski Experimental Stations. *Eucarpia meeting on Triticale Clermont Ferrand, France*, pp: 487-496.
- Wolski T., Pojmaj M.S., Sawicka E.J.**, (1991). Evaluation of short triticale mutants for hybrid breeding. *Cereal Research Communications* 19, 261-266.
- Wu H., Sparks C., Amoah B., Jones H.D.**, (2003). Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Reports* 21, 659-668.
- Xia G., Li Z., He C., Chen H., Brettell R.**, (1999). Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Phytophysiol Sin* 25, 22-28.
- Zale J.M., Borchardt-Wier H., Kidwell K.K., Steber C.M.**, (2004). Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76, 277-281.
- Zhang Y.**, (2001). Genetic manipulation of seed storage protein and carbohydrate metabolism in barley (*Hordium vulgare* L.). Tesis Doctoral, Rothamsted Research y Universidad de Nottingham.
- Zhou H., Arrowsmith J.W., Fromm M.E., Hironaka C.M., Taylor M.L., Rodríguez D., Pajeau M.E., Brown S.M., Santino C.G., Fry J.E.**, (1995). Glyphosate-tolerant CP4 and GOX genes as a selectable marker in wheat transformation. *Plant Cell Reports* 15, 159-163.
- Zimny J., Becker D., Brettschneider R., Lörz H.**, (1995) Fertile, transgenic *Triticale* (*xTriticosecale* Wittmack) (1995) *Molecular Breeding* 1, 155-164.

Zupan J.R., Zambryski P.C., (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* 23 (1), 11-28.

<http://www.bio-rad.com> Página Web de la compañía *BioRad*. Hercules, CA.

<http://faostat.fao.org/> Página Web de la *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación* (FAO).

<http://www.isaaa.org> Página Web del *Servicio Internacional para la Adquisición de Información de las Aplicaciones en Agrobiotecnología*. Ithaca, NY.

<http://www.sar.admin.ch> Página Web de la *Estación Federal de Investigación en Producción Vegetal*. Nyon, Suiza.

1. Alineamiento de la secuencia del gen <i>Glu-D1x5</i>	2
2. Alineamiento de la secuencia del gen <i>Glu-B1x7</i>	10
3. Alineamiento de la secuencia del gen <i>Glu-Dy10</i>	17
4. Alineamiento de las regiones promotoras de los tres genes de gluteninas HMW que se clonaron: <i>Glu-D1x5</i>, <i>Glu-D1y10</i> y <i>Glu-B1x7</i>	24

1. Alineamiento de la secuencia del gen *Glu-D1x5* publicado con nº de registro X12928 y la secuencia del gen *Glu-D1x5* que se obtuvo a partir del trigo blando 'Hope', obtenido mediante el programa CLUSTAL W (1.82). Se señalan las diferencias encontradas entre ellas:

```

Glu-D1x5_X12928_   GCATGCAAATATGCAACATAATTTTCCTTTTTACTTGGCTAATTATATTTGATAAAATATTT 60
Glu-D1x5_         GCATGCAAATATGCAACATAATTTTCCTTTTTACTTGGCTAATTATATTTGATAAAATATTT 60
*****

Glu-D1x5_X12928_   CACAGATATAACAATAATCAAACACAATAAATCATATGTGTTTTTAGTTTTAGTTTCTCATA 120
Glu-D1x5_         CACAATATAACAATAATCAAACACAATAAATCATATGTGTTTTTAGTTTTAGTTTCTCATA 120
****

Glu-D1x5_X12928_   TCCAAATATACAATAGCTAACCAAATCTCATCGGGAAGTTAGCCATGCCGAGGTAGGTTG 180
Glu-D1x5_         TCCAAATATACATATAGCTAACCAAATCTCATCGGGAAGTTAGCCATGCCGAGGTAGGTTG 180
*****

Glu-D1x5_X12928_   TTGCCGGAATGTTTTTAGTTTTAGTTTCTCATAACAACCAAATCTCATTCAAATATATAAAA 240
Glu-D1x5_         TTGCCGGAATGTTTTTAGTTTTAGTTTCTCATAACAACCAAATCTCATTCAAATATATAAAA 240
*****

Glu-D1x5_X12928_   CATTCCGGAACAACCTTGTGGCGTACATCTAGTTACAAGGGAATATTAGTGATGGCGTGA 300
Glu-D1x5_         CATTCCGGAACAACCTTGTGGCGTACATCTAGTTACAAGGGAATATTAGTGATGGCGTGA 300
*****

Glu-D1x5_X12928_   GCAAGCGATAAGGCCAAGGAGAGAAGAAGTGCATCGTCTACGGAGGCCAGGGAAAGACAA 360
Glu-D1x5_         GCAAGCGATAAGGCCAAGGAGAGAAGAAGTGCATCGTCTACGGAGGCCAGGGAAAGACAA 360
*****

Glu-D1x5_X12928_   TGGACATGCAGAGAGGCAGGGGCGGGGAAGAAACACTTGGAGATCATAGAAGAAGATAAG 420
Glu-D1x5_         TGGACATGCAGAGAGGCAGGGGCGGGGAAGAAACACTTGGAGATCATAGAAGAAGATAAG 420
*****

```

```

Glu-D1x5_X12928_   AGGTAAACATAGGAGGAGGATATAATGGACAATTAAATCTGCCTTAGTTGAACTCATTT 480
Glu-D1x5           AGGTAAACATAGGAGGAGGATATAATGGACAATTAAATCTGCCTTAGTTGAACTCATTT 480
*****

Glu-D1x5_X12928_   GGAAGTAAACAAATTTTCTATTCTGTGTAAACCAAACATTTGACGCGGATTTTCTCTG 540
Glu-D1x5           GGAAGTAAACAAATTTTCTATTCTGTGTAAACCAAACATTTGACGCGGATTTTCTCTG 540
*****

Glu-D1x5_X12928_   AAGATCCTATATTAATTTTAGACATGGTTTGGCTAGTTCATTTGTCCTGAAAAGGTGTTT 600
Glu-D1x5           AAGATCCTATATTAATTTTAGACATGGTTTGGCTAGTTCATTTGTCCTGAAAAGGTGTTT 600
*****

Glu-D1x5_X12928_   CCATAAGTCCAAAATTCACCAACTTTTTTGTATGGCACGTCATAGCATAGATAGATGTT 660
Glu-D1x5           CCATAAGTCCAAAATTCACCAACTTTTTTGTATGGCACGTCATAGCATAGATAGATGTT 660
*****

Glu-D1x5_X12928_   GTGAGTCACTGGATAGATATTGTGAGTCATAGCATGGATTTCGTGTTGCTGGAAATCCAAC 720
Glu-D1x5           GTGAGTCACTGGATAGATATTGTGAGTCATAGCATGGATTTCGTGTTGCTGGAAATCCAAC 720
*****

Glu-D1x5_X12928_   TACATGACAAGCAACAAAACCTGAAATGGGCTTTAGGAGTTATCAATTTACTTGTTCAT 780
Glu-D1x5           TACATGACAAGCAACAAAACCTGAAATGGGCTTTAGGAGTTATCAATTTACTTGTTCAT 780
*****

Glu-D1x5_X12928_   GCAGGCTACCTTCCACTACTCGACATGCTTAGAAGCTTTGAGTGGCCGTAGATTTGCAA 840
Glu-D1x5           GCAGGCTACCTTCCACTACTCGACATGCTTAGACGCTTTGAGTGGCCGTAGATTTGCAA 840
*****

Glu-D1x5_X12928_   AGCAATGGCTAACAGACACATATTCTGCCAAACCCCAAGAAGGATAATCACTTTTCTTAG 900
Glu-D1x5           AGCAATGGCTAACAGACACATATTCTGCCAAACCCCAAGAAGGATAATCACTTTTCTTAG 900
*****

```

```

Glu-D1x5_X12928_ ATAAAAAAGAACAGACCAATATACAAACATCCACACTTCTGCAAACAATACATCAGAACT 960
Glu-D1x5_ ATAAAAAAGAACAGACCAATATACAAACATCCACACTTCTGCAAACAATACATCAGAACT 960
*****

Glu-D1x5_X12928_ AGGATTACGCCGATTACGTGGCTTTAGCAGACTGTCCAAAAATCTGTTTTGCAAAGCTCC 1020
Glu-D1x5_ AGGATTACGCCGATTACGTGGCTTTAGCAGACTGTCCAAAAATCTGTTTTGCAAAGCTCC 1020
*****

Glu-D1x5_X12928_ AATTGCTCCTTGCTTATCCAGCTTCTTTTTGTGTTGGCAAACGCGCTTTTCCAACCGATT 1080
Glu-D1x5_ AATTGCTCCTTGCTTATCCAGCTTCTTTTTGTGTTGGCAAACGCGCTTTTCCAACCGATT 1080
*****

Glu-D1x5_X12928_ TTGTTCTTCTCGCGCTTTCTTCTTAGGCTAAACAAACCTCACCGTGCACGCAGCCATGGT 1140
Glu-D1x5_ TTGTTCTTCTCGCGCTTTCTTCTTAGGCTAAACAAACCTCACCGTGCACGCAGCCATGGT 1140
*****

Glu-D1x5_X12928_ CCTGAACCTTCACCTCGTCCCTATAAAAGCCTAGC AACCTTCACAATCTTATCATCACC 1199
Glu-D1x5_ CCTGAACCTTCACCTCGTCCCTATAAAAGCCTAGC AACCTTCACAATCTTATCATCACC 1200
*****

Glu-D1x5_X12928_ CACAACACCGAGCACCACAAACTAGAGATCAATTCACTGATAGTCCACCGAGATGGCTAA 1259
Glu-D1x5_ CACAACACCGAGCACCACAAACTAGAGATCAATTCACTGATAGTCCACCGAGATGGCTAA 1260
*****

Glu-D1x5_X12928_ GCGGTTAGTCTCTTTGTGGCGGTAGTCGTCGCCCTCGTGGCTCTCACCGTCGCTGAAGG 1319
Glu-D1x5_ GCGGTTAGTCTCTTTGTGGCGGTAGTCGTCGCCCTCGTGGCTCTCACCGTCGCTGAAGG 1320
*****

Glu-D1x5_X12928_ TGAGGCCTCTGAGCAACTACAGTGTGAGCGCGAGCTCCAGGAGCTCCAGGAGCGCGAGCT 1379
Glu-D1x5_ TGAGGCCTCTGAGCAACTACAGTGTGAGCGCGAGCTCCAGGAGCTCCAGGAGCGCGAGCT 1380
*****

Glu-D1x5_X12928_ CAAGGCATGCCAGCAGGTCATGGACCAACAGCTCCGAGACATTAGCCCCGAGTGCCACCC 1439
Glu-D1x5_ CAAGGCATGCCAGCAGGTCATGGACCAACAGCTCCGAGACATTAGCCCCGAGTGCCACCC 1440
*****

```

```

Glu-D1x5_X12928_   CGTCGTCGTCAGCCCGGTTCGCGGGACAATACGAGCAGCAAATCGTGGTGCCGCCCAAGGG 1499
Glu-D1x5           CGTCGTCGTCAGCCCGGTTCGCGGGACAATACGAGCAGCAAATCGTGGTGCCGCCCAAGGG 1500
*****

Glu-D1x5_X12928_   CGGATCTTTCTACCCCGGCGAGACCACGCCACCGCAGCAACTCCAACAACGTATATTTTG 1559
Glu-D1x5           CGGATCTTTCTACCCCGGCGAGACCACGCCACCGCAGCAACTCCAACAACGTATATTTTG 1560
*****

Glu-D1x5_X12928_   GGAATACCTGCCTACTAAAAAGGTATTACCCAAGTGTAACTTGTCCGCAGCAGGTTTC 1619
Glu-D1x5           GGAATACCTGCCTACTAAAAAGGTATTACCCAAGTGTAACTTGTCCGCAGCAGGTTTC 1620
*****

Glu-D1x5_X12928_   ATACTATCCAGGCCAAGCTTCTCCGCAACGGCCAGGACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGG 1679
Glu-D1x5           ATACTATCCAGGCCAAGCTTCTCCGCAACGGCCAGGACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGG 1680
*****

Glu-D1x5_X12928_   ACAACAAGGGTACTACCCAACTTCTCCGCAACAGCCAGGACAATGGCAACAACCGGAACA 1739
Glu-D1x5           ACAACAAGGGTACTACCCAACTTCTCCGCAACAGCCAGGACAATGGCAACAACCGGAACA 1740
*****

Glu-D1x5_X12928_   AGGGCAACAAGGGTACTACCCAACTTCTCCGCGAGCAGCCAGGACAATTGCAACAACCAGC 1799
Glu-D1x5           AGGGCAACAAGGGTACTACCCAACTTCTCCGCGAGCAGCCAGGACAATTGCAACAACCAGC 1800
*****

Glu-D1x5_X12928_   ACAAGGGCAGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACCAGG 1859
Glu-D1x5           ACAAGGGCAGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACCAGG 1860
*****

Glu-D1x5_X12928_   GTACTACCCAACTTCTTCGCGAGCTGCAGCCAGGACAATTGCAACAACCAGCACAAGGGCA 1919
Glu-D1x5           GTACTACCCAACTTCTTCGCGAGCTGCAGCCAGGACAATTGCAACAACCAGCACAAGGGCA 1920
*****

Glu-D1x5_X12928_   ACAAGGGCAGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAACC 1979
Glu-D1x5           ACAAGGGCAGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAACC 1980
*****

```

Glu-D1x5_X12928_	AGGACAAGGACAACAAGGTCAACAGCCAGGACAAGGGCAACAACCAGGACAAGGGCAACA	2039
Glu-D1x5	AGGACAAGGACAACAAGGTCAACAGCCAGGACAAGGGCAACAACCAGGACAAGGGCAACA	2040

Glu-D1x5_X12928_	AGGTCAGCAGCTCGGACAAGGACAACAAGGGTACTACCCAACCTTCTCTGCAACAGTCGGG	2099
Glu-D1x5	AGGTCAGCAGCTCGGACAAGGACAACAAGGGTACTACCCAACCTTCTCTGCAACAGTCGGG	2100

Glu-D1x5_X12928_	ACAAGGGCAACCAGGGTACTACCCAACCTTCTCTGCAGCAGCTAGGACAAGGGCAATCAGG	2159
Glu-D1x5	ACAAGGGCAACCAGGGTACTACCCAACCTTCTCTGCAGCAGCTAGGACAAGGGCAATCAGG	2160

Glu-D1x5_X12928_	GTACTACCCAACCTTCTCCGCAGCAACCAGGACAAGGGCAGCAGCCAGGACAATTGCAACA	2219
Glu-D1x5	GTACTACCCAACCTTCTCCGCAGCAACCAGGACAAGGGCAGCAGCCAGGACAATTGCAACA	2220

Glu-D1x5_X12928_	ACCAGCACAAGGGCAGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGGCA	2279
Glu-D1x5	ACCAGCACAAGGGCAGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGGCA	2280

Glu-D1x5_X12928_	ACAAGGCCAGCAGCCAGGACAAGGGCAGCAACCGGGACAAGGGCAACCAGGGTACTACCC	2339
Glu-D1x5	ACAAGGCCAGCAGCCAGGACAAGGGCAGCAACCGGGACAAGGGCAACCAGGGTACTACCC	2340

Glu-D1x5_X12928_	AACTTCTCCGCAGCAGTCAGGACAAGGGCAACCAGGGTACTACCCAACCTTCTTCGCAGCA	2399
Glu-D1x5	AACTTCTCCGCAGCAGTCAGGACAAGGGCAACCAGGGTACTACCCAACCTTCTTCGCAGCA	2400

Glu-D1x5_X12928_	GCCAACACAATCGCAGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGGTAGGACAAGGGCA	2459
Glu-D1x5	GCCAACACAATCGCAGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGGTAGGACAAGGGCA	2460

Glu-D1x5_X12928_	ACAAGCTCAGCAGCCAGGACAAGGGCAGCAACCGGGACAAGGGCAGCCAGGGTACTACCC	2519
Glu-D1x5	ACAAGCTCAGCAGCCAGGACAAGGGCAGCAACCGGGACAAGGGCAGCCAGGGTACTACCC	2520

```

Glu-D1x5_X12928_  AACTTCTCCGCAGCAGTCAGGACAAGGGCAACCAGGGTACTACCTAACTTCTCCGCAGCA 2579
Glu-D1x5_          AACTTCTCCGCAGCAGTCAGGACAAGGGCAACCAGGGTACTACCTAACTTCTCCGCAGCA 2580
*****

Glu-D1x5_X12928_  GTCAGGACAAGGGCAGCAGCCAGGACAATTGCAACAATCAGCACAAGGGCAAAAAGGACA 2639
Glu-D1x5_          GTCAGGACAAGGGCAGCAGCCAGGACAATTGCAACAATCAGCACAAGGGCAAAAAGGACA 2640
*****

Glu-D1x5_X12928_  GCAACCAGGACAAGGTCAACAGCCAGGGCAAGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGG 2699
Glu-D1x5_          GCAACCAGGACAAGGTCAACAGCCAGGGCAAGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGG 2700
*****

Glu-D1x5_X12928_  GCAACAAGGTCAGCAACCGGGGCAAGGGCAGCCAGGGTACTACCCAACCTTCTCCGCAGCA 2759
Glu-D1x5_          GCAACAAGGTCAGCAACCGGGGCAAGGGCAGCCAGGGTACTACCCAACCTTCTCCGCAGCA 2760
*****

Glu-D1x5_X12928_  ATCAGGACAAGGGCAACAGCCAGGACAATGGCAACAACCAGGACAAGGGCAACCAGGATA 2819
Glu-D1x5_          ATCAGGACAAGGGCAACAGCCAGGACAATGGCAACAACCAGGACAAGGGCAACCAGGATA 2820
*****

Glu-D1x5_X12928_  CTACCCAACCTTCTCCGTTGCAGCCAGGACAAGGGCAACCAGGGTACGACCCAACCTTCTCC 2879
Glu-D1x5_          CTACCCAACCTTCTCCGTTGCAGCCAGGACAAGGGCAACCAGGGTACGACCCAACCTTCTCC 2880
*****

Glu-D1x5_X12928_  GCAACAGCCAGGACAAGGGCAGCAACCAGGACAATTGCAACAACCAGCACAAGGGCAACA 2939
Glu-D1x5_          GCAACAGCCAGGACAAGGGCAGCAACCAGGACAATTGCAACAACCAGCACAAGGGCAACA 2940
*****

Glu-D1x5_X12928_  AGGGCAGCAACTAGCACAAGGGCAACAAGGGCAGCAACCAGCACAAGTGCAACAAGGGCA 2999
Glu-D1x5_          AGGGCAGCAACTAGCACAAGGGCAACAAGGGCAGCAACCAGCACAAGTGCAACAAGGGCA 3000
*****

Glu-D1x5_X12928_  GCAGCCAGCACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGC-----T 3032
Glu-D1x5_          GCAGCCAGCACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGCAGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGC-----T 3060
** ******
    
```

```

Glu-D1x5_X12928_   AGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGGCAGCAACCAGCACA 3092
Glu-D1x5           AGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGGCAGCAACCAGCACA 3120
*****

Glu-D1x5_X12928_   AGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGGCA 3152
Glu-D1x5           AGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGGCA 3180
*****

Glu-D1x5_X12928_   ACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGGCAGCAACCGGGACAAGGGCAGCCATGGTACTACCC 3212
Glu-D1x5           ACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGGCAGCAACCGGGACAAGGGCAGCCATGGTACTACCC 3240
*****

Glu-D1x5_X12928_   AACTTCTCCGCAGGAGTCAGGACAAGGGCAACAGCCAGGACAATGGCAACAACCAGGACA 3272
Glu-D1x5           AACTTCTCCGCAGGAGTCAGGACAAGGGCAACAGCCAGGACAATGGCAACAACCAGGACA 3300
*****

Glu-D1x5_X12928_   AGGGCAACCAGGGTACTACCTAACTTCTCCGTTGCAGCTAGGACAAGGGCAACAAGGGT 3331
Glu-D1x5           AGGGCAACCAGGGTACTACCTAACTTCTCCGTTGCAGCTAGGACAAGGGCAACAAGGGT 3359
*****

Glu-D1x5_X12928_   ACTACCCAACTTCTCTGCAACAACCAGGACAAGGGCAGCAACCAGGACAATGGCAACAAT 3391
Glu-D1x5           ACTACCCAACTTCTCTGCAACAACCAGGACAAGGGCAGCAACCAGGACAATGGCAACAAT 3419
*****

Glu-D1x5_X12928_   CGGGACAAGGGCAACATTTGGTACTACCCAACTTCTCCGAGCTGTCAGGACAAGGGCAAC 3451
Glu-D1x5           CGGGACAAGGGCAACATTTGGTACTACCCAACTTCTCCGAGCTGTCAGGACAAGGGCAAC 3479
*****

Glu-D1x5_X12928_   GGCCAGGACAATGGCTGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAACTTCTCCGC 3511
Glu-D1x5           GGCCAGGACAATGGCTGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAACTTCTCCGC 3539
*****

Glu-D1x5_X12928_   AACAGCCAACAAGGGCAACAACCTAGGACAATGGCTGCAACCAGGACAAGGGCAACAAG 3571
Glu-D1x5           AACAGCCAACAAGGGCAACAACCTAGGACAATGGCTGCAACCAGGACAAGGGCAACAAG 3599
*****

```

```

Glu-D1x5_X12928_  GGTACTACCCAACCTTCTCTGCAACAGACAGGACAAGGGCAGCAATCAGGACAAGGGCAAC 3631
Glu-D1x5_          GGTACTACCCAACCTTCTCTGCAACAGACAGGACAAGGGCAGCAATCAGGACAAGGGCAAC 3659
*****

Glu-D1x5_X12928_  AAGGCTACTACAGCTCATAACCATGTTAGCGTGGAGCACCAGGCGGCCAGCCTAAAGGTGG 3691
Glu-D1x5_          AAGGCTACTACAGCTCATAACCATGTTAGCGTGGAGCACCAGGCGGCCAGCCTAAAGGTGG 3719
*****

Glu-D1x5_X12928_  CAAAGGCGCAGCAGCTCGCGGCACAGCTGCCGGCAATGTGCCGGCTGGAGGGCGGCACG 3751
Glu-D1x5_          CAAAGGCGCAGCAGCTCGCGGCACAGCTGCCGGCAATGTGCCGGCTGGAGGGCGGCACG 3779
*****

Glu-D1x5_X12928_  CATTGTCGGCCAGCCAGTGATAGAACTCTCTGCAGCTCGCATGGTGCTTAGGCATGCATG 3811
Glu-D1x5_          CATTGTCGGCCAGCCAGTGATAGAACTCTCTGCAGCTCGCATGGTGCTTAGGCATGCATG 3839
*****

Glu-D1x5_X12928_  C-CTTTAGCTATAACAATAAATGTGACGTGTGTTACAGTTTTTTCATGTAAGTAGAGTAAA 3870
Glu-D1x5_          CACTTTAGCTATAACAATAAATGTGACGTGTGTTACAGTTTTTTCATGTAAGTAGAGTAAA 3899
* *****

Glu-D1x5_X12928_  GCCCAGTAATAATGCAAAATGAAAAGCTTTTCTGGCTAAAAAA-GAACAAAACCTGGGTGC 3929
Glu-D1x5_          GCCCAGTAATAATGCAAAATGAAAAGCTTTTCTGGCTAAAAAA-GAACAAAACCTGG-TGC 3958
*****

Glu-D1x5_X12928_  TATATGGTATGTGCTGCATGTCTCAGCTCATTGTCA-GCCACTGAATGCCAACGACTCCTA 3989
Glu-D1x5_          TATATGGTATGTGCTGCATGTCTCAGCTCATTGTCA----- 3994
*****

```

Alineamiento de la secuencia del gen *Glu-B1x7* publicado con nº de registro X13927 y la secuencia del gen *Glu-B1x7* que se obtuvo a partir del trigo blando 'Pané-247', obtenido mediante el programa CLUSTAL W (1.82). Se señalan las diferencias encontradas entre ellas:

```

Glu-B1x7_X13927_   CATGCAAACATGCAGCATAATTTCCATTTTACTTGGCTATTTATGTTTGATAAAATATTTTC 60
Glu-B1x7_         CATGCAAACATGCAGCATAATTTCCATTTTACTTGGCTATTTATGTTTGATAAAATATTTTC 60
*****

Glu-B1x7_X13927_   ACAAATATAACAATAATCAAAAACAATAAATTATATGTGTTTTTAGTTTTAGTTCTCATAT 120
Glu-B1x7_         ACAAATATAACAATAATCAAAAACAATAAATTATATGTGTTTTTAGTTTTAGTTCTCATAT 120
*****

Glu-B1x7_X13927_   CCAAATATACATGTTTCATACAACCAAATCTCATTTAAATATATTGTAAAATATTCCGGC 180
Glu-B1x7_         CCAAATATACATGTTTCATACAACCAAATCTCATTTAAATATATTGTAAAATATTCCGGC 180
*****

Glu-B1x7_X13927_   AACAACTTGTGGGGTACATCTAGTTACAGTGGAATATTAGTGATGGCGTGAGCAAGCGAT 240
Glu-B1x7_         AACAACTTGTGGGGTACATCTAGTTACAGTGGAATATTAGTGATGGCGTGAGCAAGCGAT 240
*****

Glu-B1x7_X13927_   AAGCCAACGAGAGAAGAAGTGCGTCGTCATGGAGGCCAGGGAAAGACAATGGACATGC 300
Glu-B1x7_         AAGCCAACGAGAGAAGAAGTGCGTCGTCATGGAGGCCAGGGAAAGACAATGGACATGC 300
*****

Glu-B1x7_X13927_   AAAGAGGTAGGGGCAGGGAAGAAACACTTGGAGATCATAGAAGAACATAAGAGGTAAAC 360
Glu-B1x7_         AAAGAGGTAGGGGCAGGGAAGAAACACTTGGAGATCATAGAAGAACATAAGAGGTAAAC 360
*****

Glu-B1x7_X13927_   ATAGGAGGGCATAATGGACAATTAATCTACATTAATTGAACTCATTTGGGAAGTAAACA 420
Glu-B1x7_         ATAGGAGGGCATAATGGACAATTAATCTACATTAATTGAACTCATTTGGGAAGTAAACA 420
*****

Glu-B1x7_X13927_   AAATCCATATTTCTGGTGTAAATCAAACATTTGACGCGGATTTACTAAGATCCTATGTTA 480
Glu-B1x7_         AAATCCATATTTCTGGTGTAAATCAAACATTTGACGCGGATTTACTAAGATCCTATGTTA 480
*****

```

```

Glu-B1x7_X13927_ ATTTTAGACATGACTGGCCAAAGGTTTCAGTTAGTTCATTTGTCACGGAAAGGTGTTTTTC 540
Glu-B1x7_ ATTTTAGACATGACTGGCCAAAGGTTTCAGTTAGTTCATTTGTCACGGAAAGGTGTTTTTC 540
*****

Glu-B1x7_X13927_ ATAAGTCCAAAACCTCTACCAACTTTTTTGCACGTCATAGCATAGATAGATGTTGTGAGTC 600
Glu-B1x7_ ATAAGTCCAAAACCTCTACCAACTTTTTTGCACGTCATAGCATAGATAGATGTTGTGAGTC 600
*****

Glu-B1x7_X13927_ ATTGGATAGATATTGTGAGTCAGCATGGATTTGTGTTGCCTGGAAATCCAACCTAAATGAC 660
Glu-B1x7_ ATTGGATAGATATTGTGAGTCAGCATGGATTTGTGTTGCCTGGAAATCCAACCTAAATGAC 660
*****

Glu-B1x7_X13927_ AAGCAACAAAACCTGAAATGGGCTTTAGGAGAGATGGTTTATCAATTTACATGTTCCATG 720
Glu-B1x7_ AAGCAACAAAACCTGAAATGGGCTTTAGGAGAGATGGTTTATCAATTTACATGTTCCATG 720
*****

Glu-B1x7_X13927_ CAGGCTACCTTCCACTACTCGACATGGTTAGAAGTTTTGAGTGCCGCATATTTGCGGAAG 780
Glu-B1x7_ CAGGCTACCTTCCACTACTCGACATGGTTAGAAGTTTTGAGTGCCGCATATTTGCGGAAG 780
*****

Glu-B1x7_X13927_ CAATGGCACTACTCGACATGGTTAGAAGTTTTGAGTGCCGCATATTTGCGGAAGCAATGG 840
Glu-B1x7_ CAATGGCACTACTCGACATGGTTAGAAGTTTTGAGTGCCGCATATTTGCGGAAGCAATGG 840
*****

Glu-B1x7_X13927_ CTAACAGATACATATTTCTGCCAAACCCCAAGAAGGATAATCACTCCTCTTAGATAAAAAG 900
Glu-B1x7_ CTAACAGATACATATTTCTGCCAAACCCCAAGAAGGATAATCACTCCTCTTAGATAAAAAG 900
*****

Glu-B1x7_X13927_ AACAGACCAATGTACAAACATCCACACTTCTGCAAACAATACACCAGAACTAGGATTAAG 960
Glu-B1x7_ AACAGACCAATGTACAAACATCCACACTTCTGCAAACAATACACCAGAACTAGGATTAAG 960
*****

Glu-B1x7_X13927_ CCCATTACGTGGCTTTAGCAGACCGTCCAAAAATCTGTTTTGCAAGCACCAATTGCTCCT 1020
Glu-B1x7_ CCCATTACGTGGCTTTAGCAGACCGTCCAAAAATCTGTTTTGCAAGCACCAATTGCTCCT 1020
*****

```

Glu-B1x7_X13927_	TACTTATCCAGCTTCTTTTGTGTTGGCAAACCTGCCCTTTTCCAACCGATTTTGTTCCTTC	1080
Glu-B1x7_	TACTTATCCAGCTTCTTTTGTGTTGGCAAACCTGCCCTTTTCCAACCGATTTTGTTCCTTC	1079
	*****	****
Glu-B1x7_X13927_	TCACGCTTTCTTCATAGGCTAAACTAACCTCGGCGTGCACACAACCATGTCCTGAACCTT	1140
Glu-B1x7_	TCACGCTTTCTTCATAGGCTAAACTAACCTCGGCGTGCACACAACCATGTCCTGAACCTT	1139

Glu-B1x7_X13927_	CACCTCGTCCCTATAAAAAGCCCATCCAACCTTCACAATCTCATCATCACCCACAACACCG	1200
Glu-B1x7_	CACCTCGTCCCTATAAAAAGCCCATCCAACCTTCACAATCTCATCATCACCCACAACACCG	1199

Glu-B1x7_X13927_	AGCACCCCAATCTACAGATCAATTCACTGACAGTTCACTGAGATGGCTAAGCGCCTGGTC	1260
Glu-B1x7_	AGCACCCCAATCTACAGATCAATTCACTGACAGTTCACTGAGATGGCTAAGCGCCTGGTC	1259

Glu-B1x7_X13927_	CTCTTTGCGGCAGTAGTCGTGCGCCCTCGTGGCTCTCACCGCCGCTGAAGGTGAGGCCTCT	1320
Glu-B1x7_	CTCTTTGCGGCAGTAGTCGTGCGCCCTCGTGGCTCTCACCGCCGCTGAAGGTGAGGCCTCT	1319

Glu-B1x7_X13927_	GGACAACCTACAATGTGAGCACGAGCTCGAGGCATGCCAACAGGTGGTGGACCAGCAACTC	1380
Glu-B1x7_	GGACAACCTACAATGTGAGCACGAGCTCGAGGCATGCCAACAGGTGGTGGACCAGCAACTC	1379

Glu-B1x7_X13927_	CGAGACGTTAGCCCCGGGTGCCGCCCATCACCGTCAGCCCCGGGCACGAGACAATACGAG	1440
Glu-B1x7_	CGAGACGTTAGCCCCGGGTGCCGCCCATCACCGTCAGCCCCGGGCACGAGACAATACGAG	1439

Glu-B1x7_X13927_	CAGCAACCTGTGGTGCCGTCCAAGGCCGGATCCTTCTACCCAGCGAGACTACGCCTTCG	1500
Glu-B1x7_	CAGCAACCTGTGGTGCCGTCCAAGGCCGGATCCTTCTACCCAGCGAGACTACGCCTTCG	1499

Glu-B1x7_X13927_	CAGCAACTCCAACAAATGATATTTTGGGGAATACCTGCACTACTAAGAAGGTATTACCCA	1560
Glu-B1x7_	CAGCAACTCCAACAAATGATATTTTGGGGAATACCTGCACTACTAAGAAGGTATTACCCA	1559

```

Glu-B1x7_X13927_   AGTGTAACTTCTTCGCAGCAGGGGTCATACTATCCAGGCCAAGCTTCTCCCCAACAGTCA 1620
Glu-B1x7_          AGTGTAACTTCTTCGCAGCAGGGGTCATACTATCCAGGCCAAGCTTCTCCCCAACAGTCA 1619
*****

Glu-B1x7_X13927_   GGACAAGGACAGCAGCCAGGACAAGAACAGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGATCAGCAG 1680
Glu-B1x7_          GGACAAGGACAGCAGCCAGGACAAGAACAGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGATCAGCAG 1679
*****

Glu-B1x7_X13927_   CCAGGACAAAGACAACAAGGATACTACCCAACCTTCTCCGCAACAGCCAGGACAAGGGCAA 1740
Glu-B1x7_          CCAGGACAAAGACAACAAGGATACTACCCAACCTTCTCCGCAACAGCCAGGACAAGGGCAA 1739
*****

Glu-B1x7_X13927_   CAACTGGGACAAGGGCAACCAGGGTACTACCCAACCTTTCACAGCAGCCAGGACAAAAGCAG 1800
Glu-B1x7_          CAACTGGGACAAGGGCAACCAGGGTACTACCCAACCTTTCACAGCAGCCAGGACAAAAGCAG 1799
*****

Glu-B1x7_X13927_   CAGGCAGGACAAGGGCAACAATCAGGACAAGGACAACAAGGGTACTACCCAACCTTCCCCG 1860
Glu-B1x7_          CAGGCAGGACAAGGGCAACAATCAGGACAAGGACAACAAGGGTACTACCCAACCTTCCCCG 1859
*****

Glu-B1x7_X13927_   CAACAGTCAGGACAAGGGCAACAACCGGGACAAGGGCAACCAGGGTACTACCCAACCTTCT 1920
Glu-B1x7_          CAACAGTCAGGACAAGGGCAACAACCGGGACAAGGGCAACCAGGGTACTACCCAACCTTCT 1919
*****

Glu-B1x7_X13927_   CCGCAGCAGTCAGGACAATGGCAGCAACCAGGACAAGGGCAACAACCAGGACAAGGGCAG 1980
Glu-B1x7_          CCGCAGCAGTCAGGACAATGGCAGCAACCAGGACAAGGGCAACAACCAGGACAAGGGCAG 1979
*****

Glu-B1x7_X13927_   CAATCAGGACAAGGGCAACAAGGTTCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACGACCAGGACAAGGA 2040
Glu-B1x7_          CAATCAGGACAAGGGCAACAAGGTTCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACGACCAGGACAAGGA 2039
*****

Glu-B1x7_X13927_   CAACAAGGGTACTACCCAATTTCTCCGCAACAGCCGGGACAAGGGCAACAATCAGGACAA 2100
Glu-B1x7_          CAACAAGGGTACTACCCAATTTCTCCGCAACAGCCGGGACAAGGGCAACAATCAGGACAA 2099
*****

```

Glu-B1x7_X13927_	GGGCAACCAGGGTACTACCCAACCTTCTTTGCGGCAGCCAGGACAATGGCAGCAACCAGGA	2160
Glu-B1x7_	GGGCAACCAGGGTACTACCCAACCTTCTTTGCGGCAGCCAGGACAATGGCAGCAACCAGGA	2159

Glu-B1x7_X13927_	CAAGGGCAGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGACAACAATCA	2220
Glu-B1x7_	CAAGGGCAGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGACAACAATCA	2219

Glu-B1x7_X13927_	GGACAAGGACAACAAGGATACTACCCAACCTTCTCTGCAACAGCCAGGACAAGGGCAACAA	2280
Glu-B1x7_	GGACAAGGACAACAAGGATACTACCCAACCTTCTCTGCAACAGCCAGGACAAGGGCAACAA	2279

Glu-B1x7_X13927_	CTGGGACAAGGGCAACCAGGGTACTACCCAACCTTCGCAGCAGTCGGAACAAGGGCAGCAG	2340
Glu-B1x7_	CTGGGACAAGGGCAACCAGGGTACTACCCAACCTTCGCAGCAGTCGGAACAAGGGCAGCAG	2339

Glu-B1x7_X13927_	CCAGGACAAGGAAAACAACCAGGACAAGGACAACAAGGGTACTACCCAACCTTCTCCGCAA	2400
Glu-B1x7_	CCAGGACAAGGAAAACAACCAGGACAAGGACAACAAGGGTACTACCCAACCTTCTCCGCAA	2399

Glu-B1x7_X13927_	CAGTCAGGACAAGGGCAACAACCTGGGACAAGGGCAACCAGGGTACTACCCAACCTTCTCCA	2460
Glu-B1x7_	CAGTCAGGACAAGGGCAACAACCTGGGACAAGGGCAACCAGGGTACTACCCAACCTTCTCCA	2459

Glu-B1x7_X13927_	CAGCAGTCAGGACAAGGACAACAATCAGGACAAGGACAACAAGGGTACTACCCAACCTTCT	2520
Glu-B1x7_	CAGCAGTCAGGACAAGGACAACAATCAGGACAAGGACAACAAGGGTACTACCCAACCTTCT	2519

Glu-B1x7_X13927_	CCGCAACAGTCAGGACAAGGGCAACAACCGGGACAAGGGCAATCGGGGTACTTCCCAACT	2580
Glu-B1x7_	CCGCAACAGTCAGGACAAGGGCAACAACCGGGACAAGGGCAATCGGGGTACTTCCCAACT	2579

Glu-B1x7_X13927_	TCTCGGCAGCAGTCAGGACAAGGGCAGCAGCCAGGACAAGGACAACAGTCGGGACAAGGG	2640
Glu-B1x7_	TCTCGGCAGCAGTCAGGACAAGGGCAGCAGCCAGGACAAGGACAACAGTCGGGACAAGGG	2639

Glu-B1x7_X13927_	CAACAAGGTCAGCAACCAGGACAAGGACAACAAGCGTACTACCCAACCTTCTTCGCAACAG	2700
Glu-B1x7_	CAACAAGGTCAGCAACCAGGACAAGGACAACAAGCGTACTACCCAACCTTCTTCGCAACAG	2699

Glu-B1x7_X13927_	TCAAGACAAAGGCAACAGGCAGGACAATGGCAACGACCGGGACAAGGGCAACCAGGGTAC	2760
Glu-B1x7_	TCAAGACAAAGGCAACAGGCAGGACAATGGCAACGACCGGGACAAGGGCAACCAGGGTAC	2759

Glu-B1x7_X13927_	TACCCAACCTCTCCACAGCAGCCAGGACAAGAGCAACAATCAGGACAAGCGCAACAATCA	2820
Glu-B1x7_	TACCCAACCTCTCCACAGCAGCCAGGACAAGAGCAACAATCAGGACAAGCGCAACAATCA	2819

Glu-B1x7_X13927_	GGACAATGGCAACTAGTGTACTACCCAACCTTCTCCGCAACAGCCAGGCCAATTGCAACAA	2880
Glu-B1x7_	GGACAATGGCAACTAGTGTACTACCCAACCTTCTCCGCAACAGCCAGGCCAATTGCAACAA	2879

Glu-B1x7_X13927_	CCAGCACAAGGGCAACAACCAGCACAAGGGCAACAATCAGCACAAGAGCAACAGCCAGGA	2940
Glu-B1x7_	CCAGCACAAGGGCAACAACCAGCACAAGGGCAACAATCAGCACAAGAGCAACAGCCAGGA	2939

Glu-B1x7_X13927_	CAAGCGCAACAATCAGGACAATGGCAACTAGTGTACTACCCAACCTTCTCCGCAACAGCCA	3000
Glu-B1x7_	CAAGCGCAACAATCAGGACAATGGCAACTAGTGTACTACCCAACCTTCTCCGCAACAGCCA	2999

Glu-B1x7_X13927_	GGACAATTGCAACAACCAGCACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAACCTTCTCCACAACAG	3060
Glu-B1x7_	GGACAATTGCAACAACCAGCACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAACCTTCTCCACAACAG	3059

Glu-B1x7_X13927_	TCAGGACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAACCTTCTCCGCAACAGTCAGGACAAGGGCAA	3120
Glu-B1x7_	TCAGGACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAACCTTCTCCGCAACAGTCAGGACAAGGGCAA	3119

Glu-B1x7_X13927_	CAAGGGTACTACCCAACCTTCTCCGCAACAGTCAGGACAAGGGCAGCAGCCAGGACAAGGA	3180
Glu-B1x7_	CAAGGGTACTACCCAACCTTCTCCGCAACAGTCAGGACAAGGGCAGCAGCCAGGACAAGGA	3179

```

Glu-B1x7_X13927_ CAACAGCCAAGACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAATTTCTCCGCAGCAGTCAGGACAA 3240
Glu-B1x7_ CAACAGCCAAGACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAATTTCTCCGCAGCAGTCAGGACAA 3239
*****

Glu-B1x7_X13927_ GGGCAACAACCAGGACAAGGGCAACAAGGATACTACCCAAC TTCTCCGCAGCAGTCAGGA 3300
Glu-B1x7_ GGGCAACAACCAGGACAAGGGCAACAAGGATACTACCCAAC TTCTCCGCAGCAGTCAGGA 3299
*****

Glu-B1x7_X13927_ CAAGGGCAACAACCAGGACATGAGCAACAGCCAGGACAATGGCTGCAACCAGGACAAGGG 3360
Glu-B1x7_ CAAGGGCAACAACCAGGACATGAGCAACAGCCAGGACAATGGCTGCAACCAGGACAAGGG 3359
*****

Glu-B1x7_X13927_ CAACAAGGGTACTATCCAAC TTCTTCACAGCAGTCAGGACAAGGGCATCAATCAGGACAA 3420
Glu-B1x7_ CAACAAGGGTACTATCCAAC TTCTTCACAGCAGTCAGGACAAGGGCATCAATCAGGACAA 3419
*****

Glu-B1x7_X13927_ GGGCAACAAGGGTACTACCCAAC TTCTCTCTGGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGGCTAC 3480
Glu-B1x7_ GGGCAACAAGGGTACTACCCAAC TTCTCTCTGGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGGCTAC 3479
*****

Glu-B1x7_X13927_ GCCAGCCCATACCATGTTAGCGCGGAGTACCAGGCGGCCCGCC TAAAGGTGCAAAGGCG 3540
Glu-B1x7_ GCCAGCCCATACCATGTTAGCGCGGAGTACCAGGCGGCCCGCC TAAAGGTGCAAAGGCG 3539
*****

Glu-B1x7_X13927_ CAGCAGCTCGCGGCACAGCTGCCGGCAATGTGCCGGCTGGAGGGCAGCGACGCATTGTTCG 3600
Glu-B1x7_ CAGCAGCTCGCGGCACAGCTGCCGGCAATGTGCCGGCTGGAGGGCAGCGACGCATTGTTCG 3599
*****

Glu-B1x7_X13927_ ACCAGGCAGTGATAGAACTCTCTGCAGCTTGCATGGTGCTTGGGCATGCATGCACCTTAG 3660
Glu-B1x7_ ACCAGGCAGTGATAGAACTCTCTGCAGCTTGCATGGTGCTTGGGCATGCATGCACCTTAG 3659
*****

Glu-B1x7_X13927_ CTATACAATAAACGTGACGTGTGTTACAGCTTTTCGTGTAAGTAAAG 3713
Glu-B1x7_ CTATACAATAAACGTGACGTGTGTTACAGCTTTTCGTGTAAGTAAAGA 3713
*****

```

Alineamiento de la secuencia del gen *Glu-D1y10* publicado con n° de registro X12929 y la secuencia del gen *Glu-D1y10* que se obtuvo a partir del trigo blando '48-136', obtenido mediante el programa CLUSTAL W (1.82). Se señalan las diferencias encontradas entre ellas:

```

Glu-D1y10_X12929_   TCAACATGCAACCATGCATCAAAATTTCCATTTTACTAGGCTATTTATTTGATAAAAATTT 60
Glu-D1y10           TCAACATGCAACCATGCATCAAAATTTCCATTTTACTAGGCTATTTATTTGATAAAAATTT 60
*****

Glu-D1y10_X12929_   CACAAATATACAATAATCAAACACAATAGATCATATGTGTTTTTCAGTTTTTGGTTCTCACA 120
Glu-D1y10           CACAAATATACAATAATCAAACACAATAGATCATATGTGTTTTTCAGTTTTTGGTTCTCACA 120
*****

Glu-D1y10_X12929_   TTATTACTCCAAATATAAATGTTTCGTATAACCAAATTTTCATTCAAATATACTGCAGAAC 180
Glu-D1y10           TTATTACTCCAAATATAAATGTTTCGTATAACCAAATTTTCATTCAAATATACTGCAGAAC 180
*****

Glu-D1y10_X12929_   ATTTCCGTGACAACAGGTGGGGTACATCTAGTTA-----GTN GATGTCCTGCA 228
Glu-D1y10           ATTTCCGTGACAACAGGTGGGGTACATCTAGTTATAAGGAAATATTAGT GATGTCCTGCA 240
*****

Glu-D1y10_X12929_   AGTGATAAGGCCAAGGAGAGAAGAAGTGCACCATCTACAGAGGCCAGGGAAAGACAATGG 288
Glu-D1y10           AGTGATAAGGCCAAGGAGAGAAGAAGTGCACCATCTACAGAGGCCAGGGAAAGACAATGG 300
*****

Glu-D1y10_X12929_   ACATGCAGAGAGGCGGGGGCGGGGAAGAAACACATGGAGATCATAGAAGAACATAAGAGG 348
Glu-D1y10           ACATGCAGAGAGGCGGGGGCGGGGAAGAAACACATGGAGATCATAGAAGAACATAAGAGG 360
*****

Glu-D1y10_X12929_   TTAAACATAGGAGGAGGTTATAATGGTCAATTAAATCCACATTACTTGAACTCATTTGG 405
Glu-D1y10           TTAAACATAGGAGGAGGATATAATGGTCAATTAAATCCACATTACTTGAACTCATTTGGG 420
*****

```

```

Glu-D1y10_X12929_   AAGTG-AAAAAATCCCCTATCT--GTGTAAATCAAAC TAATTGACGCGAGTTTTCTCTGA 462
Glu-D1y10           AAGTGGAAAAAATCCCCTATCTGTGTGTAAATCAAAC TAATTGACGCGAGTTTTCTCTGA 480
*****
Glu-D1y10_X12929_   AGATTCTATGTTAATTTTAGACATGAATGACCAAAGGTTTCAGTTAGTTGAGTTTTGTCA 522
Glu-D1y10           AGATTCTATGTTAATTTTAGACATGAATGACCAAAGGTTTCAGTTAGTTGAGTTTTGTCA 540
*****
Glu-D1y10_X12929_   TCGAAAGGTGTTTACATAAGTCCAAAAATTC TACCAGCTTTTGGTACGGCGCGTCACAGA 582
Glu-D1y10           TCGAAAGGTGTTTACATAAGTCCAAAAATTC TACCAGCTTTTGGTACGGCGCGTCACAGA 600
*****
Glu-D1y10_X12929_   ACAGATAAATGGTGTGAGTCATTGGATAGATATTATGAGTCATAGCATGGATTTGTGTTG 642
Glu-D1y10           ACAGATAAATGGTGTGAGTCATTGGATAGATATTATGAGTCATAGCATGGATTTGTGTTG 660
*****
Glu-D1y10_X12929_   CCTGGAAATCTAAC TATGACAAGAAACAAAACATAAATGGGCTTTTGAAAGATGATTTAT 702
Glu-D1y10           CCTGGAAATCTAAC TATGACAAGAAACAAAACATAAATGGGCTTTTGAAAGATGATTTAT 720
*****
Glu-D1y10_X12929_   CAACTTACCTTATCCATGCAAGCTACCTTCCACTAGTCGACATGCTTAGAAGCTTTTAGT 762
Glu-D1y10           CAACTTACCTTATCCATGCAAGCTACCTTCCACTAGTCGACATGCTTAGAAGCTTTTAGT 780
*****
Glu-D1y10_X12929_   GACCGCAGATTTGCAAAAGCAATGGCTAACAGACACCCAAACCCCAAGAAGCATAACCAC 822
Glu-D1y10           GACCGCAGATTTGCAAAAGCAATGGCTAACAGACACCCAAACCCCAAGAAGCATAACCAC 840
*****
Glu-D1y10_X12929_   TTCTCTTAGATAAAAAATAGCAGATCGATATACAAACGGTCTACACTTCTGCAAACAATAC 882
Glu-D1y10           TTCTCTTAGATAAAAAATAGCAGATCGATATACAAACGGTCTACACTTCTGCAAACAATAC 899
*****

```

Glu-D1y10_X12929_	CCAGAAGCCAGAATTAGGATTGAACCGATTACGTGGCTTTAGCAGACCGTCCAAAAATCT	942
Glu-D1y10	CCAGAAGCCAGAATTAGGATTGAACCGATTACGTGGCTTTAGCAGACCGTCCAAAAATCT	959

Glu-D1y10_X12929_	GTTTTGCAAAGCTCCAATTGCTCCTTGCTTATCCAGCTTCTTTTGTGTTGGCAAATTGTT	1002
Glu-D1y10	GTTTTGCAAAGCTCCAATTGCTCCTTGCTTATCCAGCTTCTTTTGTGTTGGCAAATTGTT	1019

Glu-D1y10_X12929_	CTTTTCCAACCAACTTTATTCTTTTCACACTTTTCTTCTTAGGCTGAACTAAC	1061
Glu-D1y10	CTTTTCCAACCAACTTTATTCTTTTCACA-TTTTCTTCTTAGGCTGAACTAAC	1078

Glu-D1y10_X12929_	GCACACAACCATTGTCTTGAACCTTCACCACGTCCCTATAAAAAGCCCAACCAATCTCCAC	1121
Glu-D1y10	GCACACAACCATTGTCTTGAACCTTCACCACGTCCCTATAAAAAGCCCAACCAATCTCCAC	1138

Glu-D1y10_X12929_	AATTTTCATCATCACCCACAACACCGAGCACCACAAAATAGAGATCAATTCACTGACAGTC	1181
Glu-D1y10	AATTTTCATCATCACCCACAACACCGAGCACCACAAAATAGAGATCAATTCACTGACAGTC	1198

Glu-D1y10_X12929_	CACCGAGATGGCTAAGCGGCTGGTCTCTTTGCGGCAGTAGTCATCGCCCTCGTGGCTCT	1241
Glu-D1y10	CACCGAGATGGCTAAGCGGCTGGTCTCTTTGCGGCAGTAGTCATCGCCCTCGTGGCTCT	1258

Glu-D1y10_X12929_	CACCACTGCTGAAGGTGAGGCCCTCTAGGCAACTACAGTGTGAGCGCGAGCTCCAGGAGAG	1301
Glu-D1y10	CACCACTGCTGAAGGTGAGGCCCTCTAGGCAACTACAGTGTGAGCGCGAGCTCCAGGAGAG	1318

Glu-D1y10_X12929_	CTCGCTTGAGGCATGCCGGCAGGTTGTGGACCAACAGTTGGCCGGTCGGCTGCCATGGAG	1361
Glu-D1y10	CTCGCTTGAGGCATGCCGGCAGGTTGTGGACCAACAGTTGGCCGGTCGGCTGCCATGGAG	1378

Glu-D1y10_X12929_	CACGGGGCTCCAGATGCGATGCTGCCAGCAGCTCCGAGATGTTAGCGCCAAGTGCCGCTC	1421
Glu-D1y10	CACGGGGCTCCAGATGCGATGCTGCCAGCAGCTCCGAGATGTTAGCGCCAAGTGCCGCTC	1438

Glu-D1y10_X12929_	CGTCGCCGTCAGCCAAGTCGCAAGACAATATGAGCAAACCTGTGGTGCCGCCCAAGGGCGG	1481
Glu-D1y10	CGTCGCCGTCAGCCAAGTCGCAAGACAATATGAGCAAACCTGTGGTGCCGCCCAAGGGCGG	1498

Glu-D1y10_X12929_	ATCCTTCTACCCTGGTGAGACCACGCCACTGCAGCAACTCCAACAAGGAATATTTTGGGG	1541
Glu-D1y10	ATCCTTCTACCCTGGTGAGACCACGCCACTGCAGCAACTCCAACAAGGAATATTTTGGGG	1558

Glu-D1y10_X12929_	AACATCTTCACAAACAGTACAAGGGTATTACCCAGGCGTAACCTTCTCCTCGGCAGGGGTC	1601
Glu-D1y10	AACATCTTCACAAACAGTACAAGGGTATTACCCAGGCGTAACCTTCTCCTCGGCAGGGGTC	1618

Glu-D1y10_X12929_	ATATTATCCAGGCCAAGCTTCTCCACAACAGCCAGGACAAGGGCAACAGCCTGGCAAATG	1661
Glu-D1y10	ATATTATCCAGGCCAAGCTTCTCCACAACAGCCAGGACAAGGGCAACAGCCTGGCAAATG	1678

Glu-D1y10_X12929_	GCAAGAACCAGGACAAGGGCAACAATGGTACTACCCAACCTTCTTTGCAGCAGCCAGGACA	1721
Glu-D1y10	GCAAGAACCAGGACAAGGGCAACAATGGTACTACCCAACCTTCTTTGCAGCAGCCAGGACA	1738

Glu-D1y10_X12929_	AGGGCAACAGATAGGAAAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAACCTTCTTGCAGCAGCCAGG	1781
Glu-D1y10	AGGGCAACAGATAGGAAAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAACCTTCTTGCAGCAGCCAGG	1798

Glu-D1y10_X12929_	ACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAACCTTCTTGCAGCACACAGGACAAAGGCAACAACC	1841
Glu-D1y10	ACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAACCTTCTTGCAGCACACAGGACAAAGGCAACAACC	1858

Glu-D1y10_X12929_	AGTACAAGGGCAACAACCAGAACAAGGGCAACAACCAGGACAATGGCAACAAGGGTACTA	1901
Glu-D1y10	AGTACAAGGGCAACAACCAGAACAAGGGCAACAACCAGGACAATGGCAACAAGGGTACTA	1918

Glu-D1y10_X12929_	TCCAACCTTCTCCACAACAGCTAGGACAAGGGCAACAACCAAGACAATGGCAACAATCAGG	1961
Glu-D1y10	TCCAACCTTCTCCACAACAGCTAGGACAAGGGCAACAACCAAGACAATGGCAACAATCAGG	1978

```

Glu-D1y10_X12929_   ACAAGGGCAACAAGGGCACTACCCAACTTCTCTACAACAGCCAGGACAAGGGCAACAAGG 2021
Glu-D1y10           ACAAGGGCAACAAGGGCACTACCCAACTTCTCTACAACAGCCAGGACAAGGGCAACAAGG 2038
*****

Glu-D1y10_X12929_   GCATTACCTAGCTTCTCAGCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGGCACTACCCAGCTTC 2081
Glu-D1y10           GCATTACCTAGCTTCTCAGCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGGCACTACCCAGCTTC 2098
*****

Glu-D1y10_X12929_   TCAGCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGGCACTACCCAGCTTCTCAGCAGCAGCCAGG 2141
Glu-D1y10           TCAGCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGGCACTACCCAGCTTCTCAGCAGCAGCCAGG 2158
*****

Glu-D1y10_X12929_   ACAAGGGCAACAAGGGCACTACCCAGCTTCTCAGCAAGAGCCAGGACAAGGGCAACAAGG 2201
Glu-D1y10           ACAAGGGCAACAAGGGCACTACCCAGCTTCTCAGCAAGAGCCAGGACAAGGGCAACAAGG 2218
*****

Glu-D1y10_X12929_   GCAAATCCCAGCTTCTCAGCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGGCACTACCCAGCTTC 2261
Glu-D1y10           GCAAATCCCAGCTTCTCAGCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGGCACTACCCAGCTTC 2278
*****

Glu-D1y10_X12929_   TCTGCAGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGGGCATTACCCAACTTCTCTACAGCAGCTAGG 2321
Glu-D1y10           TCTGCAGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGGGCATTACCCAACTTCTCTACAGCAGCTAGG 2338
*****

Glu-D1y10_X12929_   ACAAGGGCAACAAACAGGACAGCCAGGACAAAAGCAACAACCAGGACAAGGGCAACAAAC 2381
Glu-D1y10           ACAAGGGCAACAAACAGGACAGCCAGGACAAAAGCAACAACCAGGACAAGGGCAACAAAC 2398
*****

Glu-D1y10_X12929_   AGGACAAGGGCAACAGCCAGAACAAGAGCAACAACCAGGACAAGGGCAACAAGGATACTA 2441
Glu-D1y10           AGGACAAGGGCAACAGCCAGAACAAGAGCAACAACCAGGACAAGGGCAACAAGGATACTA 2458
*****

Glu-D1y10_X12929_   TCCAACCTTCTCTGCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAGCAAGGACAAGGGCAACAAGGGTA 2501
Glu-D1y10           TCCAACCTTCTCTGCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAGCAAGGACAAGGGCAACAAGGGTA 2518
*****

```

Glu-D1y10_X12929_	CTACCCAACTTCTCTCCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGGCACTACCCAGCTTCTCT	2561
Glu-D1y10	CTACCCAACTTCTCTCCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGGCACTACCCAGCTTCTCT	2578

Glu-D1y10_X12929_	GCAGCAGCCAGGACAAGGACAGCCAGGACAAAGGCAACAACCAGGACAAGGGCAACATCC	2621
Glu-D1y10	GCAGCAGCCAGGACAAGGACAGCCAGGACAAAGGCAACAACCAGGACAAGGGCAACATCC	2638

Glu-D1y10_X12929_	AGAACAAGGGAAACAACCAGGACAAGGGCAACAAGGGTACTATCCAAC TTCTCCACAGCA	2681
Glu-D1y10	AGAACAAGGGAAACAACCAGGACAAGGGCAACAAGGGTACTATCCAAC TTCTCCACAGCA	2698

Glu-D1y10_X12929_	GCCAGGACAAGGGCAACAAC TAGGACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAAC TTCTCCGCA	2741
Glu-D1y10	GCCAGGACAAGGGCAACAAC TAGGACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAAC TTCTCCGCA	2758

Glu-D1y10_X12929_	GCAGCCAGGACAAGGGCAACAACCAGGACAAGGGCAACAAGGGCACTGCCCAACGTCCCC	2801
Glu-D1y10	GCAGCCAGGACAAGGGCAACAACCAGGACAAGGGCAACAAGGGCACTGCCCAACGTCCCG	2818

Glu-D1y10_X12929_	GCAGCAGTCAGGACAAGCGCAACAACCAGGACAAGGCCAACAAATAGGACAAGTGCAACA	2861
Glu-D1y10	GCAGCAGTCAGGACAAGCGCAACAACCAGGACAAGGCCAACAAATAGGACAAGTGCAACA	2878

Glu-D1y10_X12929_	ACCAGGACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAAC TTCTGTGCAGCAGCCTGGACAAGGGCA	2921
Glu-D1y10	ACCAGGACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAAC TTCTGTGCAGCAGCCTGGACAAGGGCA	2938

Glu-D1y10_X12929_	ACAATCAGGACAAGGGCAACAGTCAGGACAAGGACACCAACCAGGACAAGGGCAGCAATC	2981
Glu-D1y10	ACAATCAGGACAAGGGCAACAGTCAGGACAAGGACACCAACCAGGACAAGGGCAGCAATC	2998

Glu-D1y10_X12929_	AGGACAAGAGCAACAAGGCTACGACAGCCCATACCATGTTAGCGCAGAGCAGCAAGCGGC	3041
Glu-D1y10	AGGACAAGAGCAACAAGGCTACGACAGCCCATACCATGTTAGCGCAGAGCAGCAAGCGGC	3058

```
Glu-D1y10_X12929_ CAGCCCAATGGTGGCAAAGGCGCAGCAGCCGCGACACAGCTGCCGACAGTGTGTCCGGAT 3101
Glu-D1y10         CAGCCCAATGGTGGCAAAGGCGCAGCAGCCGCGACACAGCTGCCGACAGTGTGTCCGGAT 3118
*****

Glu-D1y10_X12929_ GGAGGGGGGCGACGCATTGTCGGCTAGCCAGTGATAGAACTCTCTGCAGCTTGCATGGTG 3161
Glu-D1y10         GGAGGGGGGCGACGCATTGTCGGCTAGCCAGTGATAGAACTCTCTGCAGCTTGCATGGTG 3178
*****

Glu-D1y10_X12929_ CTTGGGCATGCATGCACCTTAGCTATCCAATAAACGTGATGCGTGTTACAGTTTTTCAT 3221
Glu-D1y10         CTTGGGCATGCATGCACCTTAGCTATCCAATAAACGTGATGCGTGTTACAGTT----- 3232
*****
```

Alineamiento de las regiones promotoras de los tres genes de gluteninas HMW que se clonaron: *Glu-D1x5*, *Glu-D1y10* y *Glu-B1x7*. Se señalan las secuencias reguladoras del promotor de cada uno de los genes:

```

ProGlu-D1x5      ---GCATGCAAATATGCAACATAATTTCCCTTTTTACTTGGCTAATTATATTTGATAAAATA 57
ProGlu-D1y10    TCAACATGCAACCATGCATCAAAATTTCCATTTTACTAGGCTATTTAT--TTGATAAA-A 57
ProGlu-B1x7     ----CATGCAAACATGCAGCATAATTTCCATTTTACTTGGCTATTTATGTTTGATAAAATA 56
                *****  *****  **  *****  *****  *****  *****  *****  *

ProGlu-D1x5     TTTCACAAATATACAATAATCAAACACAATAAATCATATGTGTTTTTTAGTTTTAGTTTCTC 117
ProGlu-D1y10    TTTCACAAATATACAATAATCAAACACAATAGATCATATGTGTTTTTCAGTTTTGGTTCTC 117
ProGlu-B1x7     TTTCACAAATATACAATAATCAAAAACAATAAATTATATGTGTTTTTTAGTTTTAGTTTCTC 116
                *****  *****  **  *****  *****  *****  *****

ProGlu-D1x5     ATATCCAAATATACTATAGCTAACCAAATCTCATCGGGAAGTTAGCCATGCCGAGGTAGG 177 (Caja N reversa)
ProGlu-D1y10    ACAT-----TATTACT--CCAAATAT----- 136
ProGlu-B1x7     ATAT-----CCAAATAT----- 128
                *  **                               *****  *

ProGlu-D1x5     TTGTTGCCGGAATGTTTTTAGTTTTAGTTTCTCATAACCAAATCTCATTCAAATATAT- 236
ProGlu-D1y10    -----AAATGTTT-----CGTATAACCAAATTTTCATTCAAATATACT 173
ProGlu-B1x7     -----ACATGTTT-----CATAACCAAATCTCATTTAAATATATT 165
                *****                               *  **  *****  *****  *****

ProGlu-D1x5     --AAAACATTCGGCAACAACCTTGTGGCGTACATCTAGTTACAAGGGAATATTAGTGATG 294
ProGlu-D1y10    GCAGAACATTTCCGTGACAACATGTGGGGTACATCTAGTTATAAGGAAATATTAGTGATG 233
ProGlu-B1x7     GTAAAATATTCGGCAACAACCTTGTGGGGTACATCTAGTTACAGTGGAATATTAGTGATG 225
                *  **  ***  *  *  *****  *****  *****  *****  *  *  *****

ProGlu-D1x5     GCGTGAGCAAGCGATAAGGCCAAGGAGAGAAGAAGTGCATCGTCTACGGAGGCCAGGGAA 354
ProGlu-D1y10    TCCTG--CAAGTGATAAGGCCAAGGAGAGAAGAAGTGCACCATCTACAGAGGCCAGGGAA 291
ProGlu-B1x7     GCGTGAGCAAGCGATAAGGCCAACGAGAGAAGAAGTGCATCGTCTATGGAGGCCAGGGAA 285
                *  **  ****  *****  *****  *****  *****  *  ****  *****

ProGlu-D1x5     AGACAATGGACATGCAGAGAGGCAGGGGCGGGGAAGAAACACTTGGAGATCATAGAAGAA 414
ProGlu-D1y10    AGACAATGGACATGCAGAGAGGCAGGGGCGGGGAAGAAACACATGGAGATCATAGAAGAA 351
ProGlu-B1x7     AGACAATGGACATGCAAAGAGGTAGGGGCGAGAAAGAAACACTTGGAGATCATAGAAGAA 345
                *****  *****  *****  **  *****  *****  *****
    
```

```

ProGlu-D1x5      GATAAGAGGTTAAACATAGGAGGAGGATATAATGGACAATTAAATCTGCATTAGTTGAAC 474
ProGlu-D1y10    CATAAGAGGTTAAACATAGGAGGAGGATATAATGGACAATTAAATCCACATTACTTGAAC 411
ProGlu-B1x7     CATAAGAGGTTAAACATAGGAG---GGCATAATGGACAATTAAATCTACATTAATTGAAC 402
                ***** * ***** ***** *****
ProGlu-D1x5      TCATTTGGGAAGTA-AACAAATTTTCTATTCTG-TGTAAACCAAAC TATTTGACGCGGAT 532
ProGlu-D1y10    TCATTTGGGAAGTGGAAAAATCCCCTATTCTGGTGTAAATCAAAC TAAATTGACGCGAGT 471 (Caja E)
ProGlu-B1x7     TCATTTGGGAAGTA-AACAAAATCCATATTCTGGTGTAAATCAAAC TATTTGACGCGGAT 461
                ***** ** *** ***** ***** ***** ***** *
ProGlu-D1x5      TTTCTCTGAAGATCCTATATTAATTTTAGACATGG-----TTTGGCTAGTTCA 580
ProGlu-D1y10    TTTCTCTGAAGATCTATGTTAATTTTAGACATGAATGACCAAAGGTTTCAGTTAGTTGA 531
ProGlu-B1x7     TTACT---AAGATCCTATGTTAATTTTAGACATGACTGGCCAAAGGTTTCAGTTAGTTCA 518
                ** ** ***** ***** ***** ** * ***** *
ProGlu-D1x5      --TTTGTGCATGAAAAGGTGTTTCCATAAGTCCAAAA-TTCTACCAACTTTTTTGTATGGC 637
ProGlu-D1y10    GTTTTGTGCATCGAAAGGTGTTTACATAAGTCCAAAAATTCTACCAGCTTTTG-GTACGGC 590
ProGlu-B1x7     --TTTGTGCACGAAAGGTGTTTCCATAAGTCCAAAA-CTCTACCAACTTTTTT-----TGC 570
                ***** ***** ***** ***** ***** **
ProGlu-D1x5      ACGTCATAGCATAGATAGATGTTGTGAGTCACTGGATAGATATTGTGAGTCA TAGCATGG 697
ProGlu-D1y10    GCGTCACAGAACAGATAAAATGGTGTGAGTCACTGGATAGATATTGTGAGTCA TAGCATGG 650 (Caja N)
ProGlu-B1x7     ACGTCATAGCATAGATAGATGTTGTGAGTCACTGGATAGATATTGTGAGTCA --GCATGG 628
                ***** ** * ***** ** ***** ***** ***** *****
ProGlu-D1x5      ATTCGTGTTGC-TGGAAATCCAAC TACATGACAAGCAACAAAACCTGAAATGGGCTTTAG 756
ProGlu-D1y10    ATTTGTGTTGCCTGGAAATCTAAC TA--TGACAAGAAACAAAACAT-AAATGGGCTTTTG 707
ProGlu-B1x7     ATTTGTGTTGCCTGGAAATCCAAC TAAATGACAAGCAACAAAACCTGAAATGGGCTTTAG 688
                *** ***** ***** ***** ***** ***** * ***** *
ProGlu-D1x5      GAG-----TTATCAATTTACTTGTTCATGCAGGCTACCTTCCACTACTCGACATGCT 809
ProGlu-D1y10    AAAG-ATGATTTATCAACTTACCTTATCCATGCAAGCTACCTTCCACTAGTCGACATGCT 766
ProGlu-B1x7     GAGAGATGGTTTATCAATTTACATGTTCCATGCAGGCTACCTTCCACTACTCGACATGGT 748
                * ***** ** * ***** ***** ***** ***** *
    
```

ProGlu-D1x5	TAGACGCTTTGAGTG-----	824	
ProGlu-D1y10	TAGAAGCTTTTAGTG-----	781	
ProGlu-B1x7	TAGAAGTTTTGAGTGCCGCATATTTGCGGAAGCAATGGCACTACTCGACATGGTTAGAAG	808	
	**** * *** ****		
ProGlu-D1x5	-----GCCGTAGATTTTGCAAAGCAATGGCTAACAGACACATATTTGCCAAACCC	876	
ProGlu-D1y10	-----ACCGCAGATTTTGCAAAGCAATGGCTAACAGACAC-----CCAAACCC	825	(Intensificador parcial HMW)
ProGlu-B1x7	TTTTGAGTGCCGCATATTTGCGGAAGCAATGGCTAACAGATAACATATTTGCCAAACCC	868	
	*** * ***** ***** ** *****		
ProGlu-D1x5	AAGAAGGATAATCACTTTTCTTAGATAAAAAAGAACAGACCAATATACAAACATCCACAC	936	
ProGlu-D1y10	AAGAAGCATAACCCTTCTCTTAGATAAAAAAT-AGCAGATCGATATACAAACGTCTACAC	884	
ProGlu-B1x7	AAGAAGGATAATCACTCCTCTTAGATAAAAAAG-AACAGACCAATGTACAAACATCCACAC	927	
	***** ** ** ** ***** * **** * ** ***** ** ****		
ProGlu-D1x5	TTCTGCAAACAATAC-----ATCAGAACTAGGATTACGCCGATTACGTGGCTTTAGCAG	990	
ProGlu-D1y10	TTCTGCAAACAATACCCAGAAGCCAGAATTAGGATTGAACCGATTACGTGGCTTTAGCAG	944	
ProGlu-B1x7	TTCTGCAAACAATAC-----ACCAGAACTAGGATTAAGCCATTACGTGGCTTTAGCAG	981	
	***** ***** ***** ** *****		
ProGlu-D1x5	ACTGTCCAAAAATCTGTTTTGCAAAGCTCCAATTGCTCCTTGCTTATCCAGCTTCTTTTG	1050	
ProGlu-D1y10	ACCGTCCAAAAATCTGTTTTGCAAAGCTCCAATTGCTCCTTGCTTATCCAGCTTCTTTTG	1004	(Intensificador HMW)
ProGlu-B1x7	ACCGTCCAAAAATCTGTTTTGCAA-GCACCAATTGCTCCTTACTTATCCAGCTTCTTTTG	1040	
	** ***** ** ***** *****		
ProGlu-D1x5	TGTTGGCAAACCTGCGCTTTTCCAACCGATTTTGTTCCTTCTCGCGCTTTCTTCTTAGGCTA	1110	
ProGlu-D1y10	TGTTGGCAAATTGTTCTTTTCCAACCAACTTTTATTCCTTTTACACA-TTTCTTCTTAGGCTG	1063	
ProGlu-B1x7	TGTTGGCAAACCTGCCCTTTTCCAACCGATTTTGTTCCTTCTCAGCTTTCTTCATAGGCTA	1100	
	***** ** ***** * ** ***** ** * ***** *****		
ProGlu-D1x5	AACAAACCTCACCGTGCACGCAGCCATGGTCCTGAACCTTCACCTCGTCCCTATAAAAGC	1170	
ProGlu-D1y10	AACTAACCTCGCCGTGCACACAACCATTTGTCCTGAACCTTCACCACGTCCCTATAAAAGC	1123	(Caja TATA)
ProGlu-B1x7	AACTAACCTCGGCGTGCACACAACCAT-GTCCTGAACCTTCACCTCGTCCCTATAAAAGC	1159	
	*** ***** ***** ** ***** *****		

