

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA



MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS

“Regulación de la longevidad de los granos de trigo mediada por el factor de transcripción de *Arabidopsis thaliana* Homeobox 25”

Trabajo Fin de Máster

ALUMNO:

Delo Dalison Huamaní Mallma

TUTORES:

Ph.D. Eduardo Bueso Ródenas

Ph.D. Ramón Serrano Salom

Curso Académico: 2015-2016

VALENCIA, Enero 2017

Resumen

Los bancos de germoplasma juegan un papel fundamental en la conservación de la biodiversidad del mundo vegetal. Uno de los parámetros fundamentales es la denominada longevidad de la semilla, que se define como el periodo de tiempo en el cual la semilla es capaz de mantener su poder de germinación, siendo los factores más críticos, la humedad y la temperatura a la que están sometidas durante su conservación.

Los principales estudios sobre longevidad de semillas se han realizado en *Arabidopsis thaliana*, donde se demostró que el factor de transcripción Homeobox 25 (AtHB25) regula la cubierta de la semilla. Este tipo de factores de transcripción están muy conservados en las distintas familias del reino vegetal. Sin embargo, su papel es incierto. Este trabajo pretende clarificar si este factor de transcripción pudiera realizar un papel similar en una especie vegetal tan alejada a *Arabidopsis* como es el trigo.

En este trabajo se seleccionaron líneas transgénicas sobreexpresoras del factor de transcripción AtHB25 en trigo mediante q-PCR (el número de inserciones relativa de las plantas transgénicas), se analizó la expresión del transgén mediante qRT-PCR, se realizaron ensayos de longevidad, cortes histológicos y tinciones de la capa de suberina del grano de trigo.

Finalmente llegamos a la conclusión que estas líneas transgénicas de trigo presentan granos con mayor poder germinativo tras someterlos a condiciones de envejecimiento acelerado y una mayor deposición de suberina en la testa de su cariósido.

Palabras claves: Trigo, factor de transcripción, homeobox, longevidad de semilla, cariósido, suberina.

Dedicatoria

A mi mamicha Delia por apoyarme en “tiempos de guerra” y enseñarme a tener coraje...

A mi abuelita Victoria por salvarme en situaciones críticas...

A mis profesores David Choque y Fredy Taipe, porque, a pesar de todo, pusieron las “manos al fuego” por mí...



Agradecimientos

Al profesor Ramón Serrano por permitirme ser parte de su equipo en el laboratorio, y así, poder realizar el TFM. A Mariche por hacerme sentir, como si estuviese en casa. A mi maestro Eduardo por sus explicaciones, su amistad y paciencia...espero ya no fracturarlo!!! A Irene por su compañerismo y apoyo... y que viva la resistencia!!! A Gaetano, Joan, Marcos, Lola por sus ánimos y amistad. Gracias por la bonita experiencia.

A mi papá Erasmo por sus buenos ánimos y su paciencia...espérame un poco más!!! A mi mamicha Delia por su ayuda incondicional, gracias a ti estoy aquí... vaya a la burro!!! A mis hermanos Yovaldo, Sumara, Abimael y Edelyn. Y no menos importante, a mi abuelita y amiga Mamavicky...warmachari!!! Mientras más lejos, en mi mente más cerca están.

A todos los profesores de Máster que me han dado los cimientos de un nuevo conocimiento que hasta entonces conocía vagamente... ahora ya puedo caminar!!! A mis compañeros del Máster por su amistad.

A PRONABEC por el apoyo económico.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.EROSIÓN GENÉTICA.....	1
1.2.CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA.....	1
1.3.LONGEVIDAD DE SEMILLA.....	2
1.4.FACTORES QUE AFECTAN LA LONGEVIDAD DE SEMILLAS.....	3
1.5.LA CUBIERTA DE LAS SEMILLAS.....	6
1.6.IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL TRIGO.....	8
1.7.DESCRIPCIÓN DEL TRIGO BLANDO.....	10
1.8.FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN HOMEBOX.....	11
1.9.ANTECEDENTES.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1.OBJETIVO GENERAL.....	14
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3. MATERIALES Y METODOS.....	15
3.1.MATERIAL BIOLÓGICO.....	15
3.2.TRATAMIENTO DE ENVEJECIMIENTO DE LAS SEMILLAS.....	17
3.3.SIEMBRA EN EL INVERNADERO.....	17
3.4.GENOTÍPADO DE LOS TRANSGÉNICOS DE HB25.....	18
3.4.1. Extracción de DNA.....	18
3.4.2. Electroforesis de DNA.....	19
3.4.3. Reacción de cadena de polimerasa en tiempo real (Q-PCR).....	20
3.5.NIVEL DE EXPRESION DE AtHB25.....	21
3.5.1. Extracción de RNA.....	21
3.5.2. Obtención del cDNA.....	22
3.5.3. qRT-PCR (PCR cuantitativa).....	22
3.6.CORTES HISTOLÓGICOS Y TINCIÓN DE LA CAPA DE SUBERINA.....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	24
4.1.GENOTIPADO T2 DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS DEL GEN AtHB25.....	27
4.1.1. Genotipado T2 del cultivar BW208 con la inserción pEm:HB25.....	28
4.1.2. Genotipado T2 del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25.....	29
4.1.3. Genotipado T2 del cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25.....	31

4.2. ENSAYO DE LONGEVIDAD DE SEMILLA EN LÍNEAS TRANSGÉNICAS DEL GEN AtHB25 EN LA GENERACIÓN T2.....	32
4.2.1. Ensayo de longevidad de semillas en el cultivar BW208 con la inserción pEm: HB25	33
4.2.2. Ensayo de longevidad de semillas en el cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25	33
4.2.3. Ensayo de longevidad de semillas en el cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25	34
4.3. GENOTIPADO T3 DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS DEL GEN AtHB25	35
4.3.1. Genotipado T3 del cultivar BW208 con la inserción pEm: HB25	35
4.3.2. Genotipado T3 del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25.....	36
4.3.3. Genotipado T3 del cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25	36
4.4. ENSAYO DE LONGEVIDAD DE SEMILLA EN LÍNEA TRANSGÉNICA DEL GEN HB25 DE LA GENERACIÓN T3.....	37
4.4.1. Ensayo de longevidad de semillas en el cultivar BW208 con la inserción pEm: HB25 de la generación T3.....	37
4.4.2. Ensayo de longevidad de semillas en el cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25 de la generación T3.....	38
4.4.3. Ensayo de longevidad de semillas en el cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25 de la generación T3.....	39
4.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LA GENERACIÓN T3 DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN HOMEBOX25.....	39
4.6. CORTES HISTOLÓGICOS Y TINCIÓN CON ROJO SUDÁN	40
4.6.1. Cortes histológicos y tinción con rojo sudán en la semilla de la línea transgénica pEm: HB25 y pUbi: HB25 en los cultivares BW208 y THA53.....	41
5. CONCLUSIONES.....	42
6. BIBLIOGRAFÍA	43

Figuras

Figura 1. Esquema de los principales parámetros que interviene en la longevidad de semillas.....	3
Figura 2. Herencia de las semillas	6
Figura 3. Producción a nivel mundial del trigo	8
Figura 4. Producción mundial por país.....	9
Figura 5. Precio del trigo durante los últimos 5 años (USD/Bushel).....	9
Figura 6. Evolución del trigo suave (<i>Triticum aestivum</i>)	10
Figura 7. Cariópside de trigo, corte longitudinal	11
Figura 8. Caracterización molecular del mutante <i>isl1-1D</i>	13
Figura 9. Plásmido pAHC17 con la inserción pUbi: HB25.....	15
Figura 10. Construcciones del T-DNA	16
Figura 11. Alineamiento Múltiple de Proteínas del gen <i>AtHB25</i> de <i>Arabidopsis</i> con sus homólogos.....	24
Figura 12. Dominio de unión a DNA y dominio regulador del factor de transcripción <i>Homeobox25</i>	25
Figura 13. Estructura tridimensional de <i>AtHB25</i>	25
Figura 14. Genotipado de la generación T2 de las líneas transgénicas del cultivar BW208 con la inserción pEm: HB25.....	28
Figura 15. Genotipado de la generación T2 de las líneas transgénicas del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25.....	30
Figura 16. Genotipado de la generación T2 de las líneas transgénicas del cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25	31
Figura 17. Ensayo de longevidad se semillas del cultivar BW208 con la inserción pEm: HB25 ..	33
Figura 18. Ensayo de longevidad se semillas del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25...	34
Figura 19. Ensayo de longevidad se semillas del cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25 ...	34
Figura 20. Genotipado de la generación T3 de las líneas transgénicas del cultivar BW208 con la inserción pEm: HB25.....	35
Figura 21. Genotipado de la generación T3 de las líneas transgénicas del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25.....	36
Figura 22. Genotipado de la generación T3 de las líneas transgénicas del cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25	37
Figura 23. Ensayo de longevidad se semillas del cultivar BW208 con la inserción pEm: HB25 ..	38
Figura 24. Ensayo de longevidad se semillas del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25...	38
Figura 25. Ensayo de longevidad se semillas del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25...	39
Figura 26. Nivel de expresión de la generación T3	40
Figura 27. Visualización de la capa de suberina en semilla de la líneas transgénicas pEm: HB25 y pUbi: HB25 del cultivar BW208 y THA53. Las flechas indican la ubicación de la capa de suberina en la cariópside del trigo.....	41

Tablas

Tabla 1 Líneas transgénicas de los cultivares BW208 y THA53.....	16
Tabla 2 Líneas transgénicas en los cultivares BW208 y THA53.....	26
Tabla 3 Líneas transgénicas descartadas de la generación T1	27
Tabla 4 Análisis de datos de la generación T2 de las líneas transgénicas del cultivar BW208 con la inserción pEm: HB25.....	29
Tabla 5 Análisis de datos de la generación T2 de las líneas transgénicas del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25.....	30
Tabla 6 Análisis de datos de la generación T2 de las líneas transgénicas del cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25	32

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EROSIÓN GENÉTICA

El hombre después de la última glaciación, cambió su estilo de vida, pasando de ser nómada a sedentario dando origen al periodo neolítico. En este periodo, el hombre domesticó tanto a plantas como a animales para su propio beneficio. Con el transcurso del tiempo se realizaron adaptaciones de cultivares, que no crecían en su zona geográfica y paralelamente a la adaptación se realizó la selección de cultivos, dando lugar al proceso denominado como la “Primera Revolución Verde”. Sin embargo, se produjo una reducción importante de la variabilidad genética, ya que muchas variedades no eran interesantes para el cultivo (Van de Wouw *et al.*, 2009).

La “Segunda Revolución Verde” que se llevó a cabo en la década de los años 40 del siglo XX, se caracterizó por el desarrollo de paquetes tecnológicos basados en siembra de monocultivos, la aplicación desmesurada de agua, el exceso en la dosis de agroquímicos, etc. Esto ocasionó el aumento de la producción de alimentos a nivel mundial. Por otro lado, la utilización de este tipo de tecnología redujo la variabilidad genética por abandono de muchos cultivos, que no cumplían determinados estándares de producción (Iriondo, 2001).

La alarma sobre la erosión genética, comenzó a darse importancia en los años setenta, al descubrirse el alto ritmo de desplazamiento de las variedades nativas, por causa de la introducción de nuevas variedades mejoradas, disminuyendo así la base genética (Alegria *et al.*, 2001).

Una vez conocido el gran problema de la erosión genética, en los últimos años se han implementado diferentes vías de conservación de la variabilidad genética y recursos fitogenéticos (Iriondo, 2001).

1.2. CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

La diversidad genética se ha definido como la variabilidad de alelos y genotipos presentes en una población, la cual, refleja las diferencias morfológicas, fisiológicas y de comportamiento entre los individuos y entre las poblaciones.

El mantenimiento de la biodiversidad es una de las preocupaciones más importantes de la humanidad. Muchas especies salvajes como domesticadas están desapareciendo a

un ritmo alarmante, es por ello que se requiere la intervención humana para garantizar la supervivencia de las especies (Frankham *et al.*, 2002).

La conservación de especies de plantas, se puede dar por dos medios, tanto *in situ* como *ex situ*. La conservación *in situ* es la conservación de las variedades vegetales en su hábitat nativo. Mientras la conservación *ex situ*, es la técnica más utilizada y consiste en la toma de muestras de una población vegetal, la cual puede ser hojas, tallos, semillas, etc., las cuales, son cultivadas en lugares fuera de su hábitat de origen, como son los bancos de germoplasma que son utilizadas como métodos de conservación a largo plazo. Un método combinatorio generalmente es la mejor forma de proteger a una especie críticamente amenazada, de forma que se pueda aplicar un plan de conservación integral.

La conservación de especies vegetales en periodos largos es la forma más utilizada en los bancos de germoplasma y trata de conservarlas en semillas. El mecanismo favorable que poseen las semillas es la gran capacidad de estar en estado latente o dormancia, su mecanismo consiste en inhibir la germinación en condiciones desfavorables. Estas condiciones desfavorables se pueden controlar en laboratorio. Los factores limitantes más importantes que afectan la germinación de las semillas son la temperatura y la humedad.

1.3. LONGEVIDAD DE SEMILLA

La longevidad de las semillas, está dada, por el tiempo que pueden mantenerse viables en unas determinadas condiciones de humedad y temperatura. La viabilidad es la capacidad que tiene la semilla, para germinar con vigorosidad en ambientales favorables. La vigorosidad es el conjunto de propiedades que determinan el nivel de actividad y capacidad de las semillas, durante la germinación y posterior crecimiento de la plántula. El vigor de las semillas, está dada, por la interacción de una serie de características propias de la semillas, constitución genética, condiciones ambientales y nutricionales de la planta, grado de madurez, tamaño, peso y densidad, integridad mecánica, grado de deterioro y envejecimiento y contaminación por microorganismos patógenos (Pérez & Pita, 2000).

1.4. FACTORES QUE AFECTAN LA LONGEVIDAD DE SEMILLAS

La longevidad de semilla varía entre diferentes especies, y en algunos casos esta diferencia se manifiesta entre subespecies, cultivares o líneas genéticas. La longevidad de las semillas fluctúa entre 5 y 25 años. La tasa de envejecimiento está fuertemente influenciada por factores endógenos y ambientales tales como la temperatura de almacenamiento, el contenido de humedad de la semilla, etc. (Walters *et al.*, 2005). Las semillas se van deteriorando en el periodo de almacenamiento, reduciendo el vigor de la misma, hasta el punto de que dejan de germinar (Figura 1).

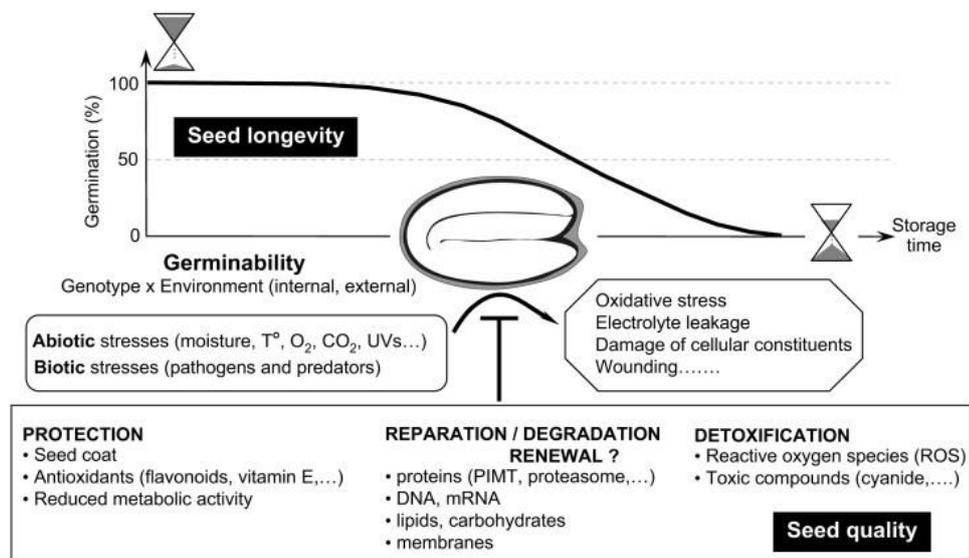


Figura 1. Esquema de los principales parámetros que interviene en la longevidad de semillas. La gráfica muestra el deterioro de las semillas en condiciones de almacenamiento está en función al porcentaje de germinación a través del tiempo. Las interacciones de los factores endógenos como ambientales (estrés abiótico y biótico) definen la calidad de las semillas. Adaptado de Rajjou & Debeaujon (2008).

Dentro de los factores endógenos que se producen con el envejecimiento tenemos la disminución de reservas, las alteraciones del material genético y la acumulación de metabolitos tóxicos. De todas ellas, la acumulación de metabolitos tóxicos en el embrión parece ser la principal causa de deterioro de las semillas (Pérez & Pita, 2000).

Para hacer frente a la acumulación de metabolitos tóxicos, se han hecho estudios en *Arabidopsis* y se observaron que los flavonoles son abundantes en el embrión, éstos ejercen acción protectora contra los ROS (especies reactivas de oxígeno) y la protección de las membranas mediante la reducción de la peroxidación de lípidos. Es muy probable que el papel protector de flavonoides en el nivel celular no se debe exclusivamente a sus propiedades antioxidantes. De hecho, existe una creciente evidencia de que los

flavonoides también pueden tener funciones de señalización (Stevenson & Hurst, 2007). Dentro de los flavonoides, los tocoferoles y tocotrienoles son antioxidantes lipofílicos no enzimáticos que están presentes durante el almacenamiento de las semillas, germinación y desarrollo de las primeras fases de la plántulas (Sattler *et al.*, 2004). Difieren entre ellos estructuralmente, los tocotrienoles presentan tres enlaces dobles *trans* en la cola hidrocarbonada y se localizan principalmente en hojas (Matringe *et al.*, 2008) y semillas (Horvath *et al.*, 2006). Además, éstos están restringidos solo a los tejidos del endospermo (Horvath *et al.*, 2006).

También se han encontrado en análisis del proteoma de semillas maduras y secas de *Arabidopsis thaliana*, la presencia del enzima succínico semialdehído deshidrogenasa (SSADH). El SSADH es una de las tres enzimas implicadas en la síntesis del γ -ácido aminobutírico (GABA), que posee un papel de protección contra el estrés oxidativo (Bouché *et al.*, 2003).

Según Bailly (2004), se pueden reducir los ROS por medio del glutatión, ácido ascórbico (vitamina C) y peroxirredoxinas en la formación de las semillas. Sin embargo, el papel de estos antioxidantes en semilla seca aún queda por determinar.

Las ROS son altamente reactivas y pueden modificar e inactivar proteínas, lípidos, ADN y ARN e inducir disfunciones celulares (Møller *et al.*, 2007). Con el fin de controlar el daño celular inducido por radicales libres, las semillas han desarrollado un mecanismo de desintoxicación. Este sistema de desintoxicación incluye una serie de enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión peroxidasa (GSHPx), y glutatión reductasa (GSSGR) (Bailly, 2004; Møller *et al.*, 2007).

Por otra parte, el contenido de agua encontrado en semillas ortodoxas (semillas que viven en niveles de 4% de humedad relativa) se asocia directamente con la viscosidad, aumentando la concentración citoplasmática y una movilidad celular muy baja debido a la aparición del estado vítreo (Treutter, 2006).

La tolerancia a la desecación de las semillas ortodoxas y su mantenimiento en estado de latencia están asociados con la presencia de proteínas particulares, tales como las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA), proteínas de choque térmico (HSPs) y otras proteínas de almacenamiento (Campos *et al.*, 2002).

Por su parte, las HSP son chaperonas moleculares que juegan un papel importante en el plegamiento de proteínas, en la estabilidad y también en la protección contra el daño oxidativo (Job *et al.*, 2005). La alta especificidad de la oxidación de estas importantes proteínas de la semilla puede actuar como una trampa para especies reactivas de oxígeno (ROS) con el fin de proteger las estructuras celulares y otras proteínas de la semilla contra el estrés oxidativo.

Por otro lado, el papel de las hormonas vegetales en la correcta maduración y longevidad de la semilla es crucial. Existen estudios describiendo el papel del ABA, las auxinas, citoquininas y el ácido giberélico (White & Rivin, 2000).

Con el fin de aumentar la longevidad de las semillas, se debe disminuir la actividad metabólica de la misma, y así, reducir el deterioro.

Los factores externos que influyen directamente en la pérdida de viabilidad de las semillas son la temperatura y la humedad. Según Harrington (1972):

1. La longevidad de una semilla se duplica por cada cinco grados centígrados que se disminuye su temperatura de conservación (un lote de semillas conservado a 5°C, vivirá ocho veces más que otro lote equivalente conservado a 20 °C).
2. Cada unidad porcentual que se rebaje en el contenido de humedad de una semilla, duplicará su longevidad (un lote de semillas con un contenido medio de humedad del 6% vivirá dieciséis veces más que otro con un contenido de humedad del 10%).

La disminución de la temperatura como la desecación tiene sus límites: cuando la temperatura desciende lentamente hasta la congelación, se forman cristales de hielo intracelular, las cuales, pueden ocasionar rupturas celulares y posterior deshidratación. La disminución de humedad por debajo de 2 – 3% afecta el contenido de agua de estructuras y orgánulos celulares, provocando en cualquiera de los dos casos el deterioro irreversible de los tejidos de las semillas (Perez & Pita, 2000).

Para la protección ante la acción de la temperatura y la humedad, las semillas poseen una cubierta llamada testa. Esta cubierta posee en su composición suberina, que está conformada por heterodímero (monómeros de suberina), que posee la propiedad de disminuir la permeabilidad, protegiéndolas del medio ambiente externo (humedad, oxígeno, radiación, etc.), para que no puedan alterar el estado de latencia de la semilla.

1.5. LA CUBIERTA DE LAS SEMILLAS

La cubierta de las semillas, se compone de varias capas de tipo celular especializadas. Son de origen materno y están en la interfaz entre el endospermo y el medio ambiente externo durante el proceso de embriogénesis, la latencia y la germinación (Figura 2).

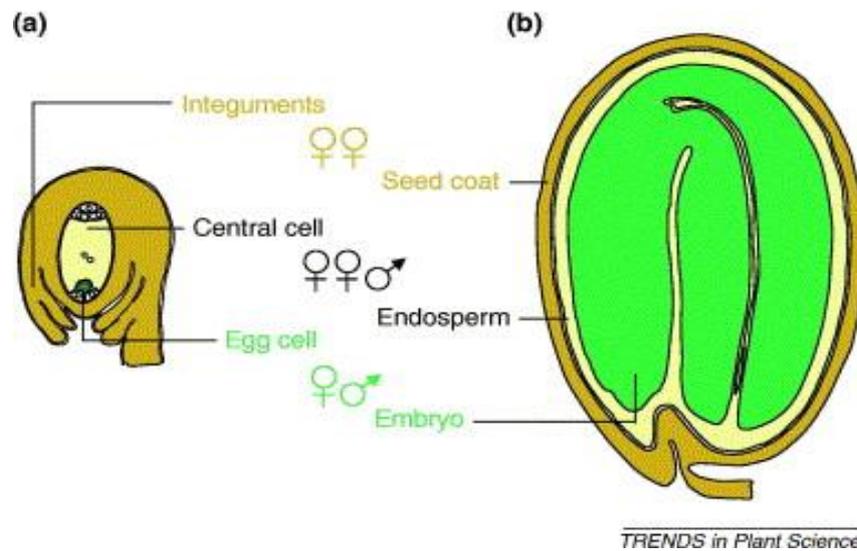


Figura 2. Herencia de las semillas

a) El óvulo y el núcleo de una esperma se fusionan para formar el cigoto diploide, que posteriormente formará al embrión. b) una segunda célula del esperma se fusiona con la célula central diploide, que da origen al desarrollo del endospermo triploide. Cuando se induce el evento de fertilización, la célula diploide materna del tegumento es diferenciada, formando la cubierta de la semilla. Adaptado de Haughn & Chaudhury (2005).

La semilla se compone en forma general de embrión, endospermo y cubierta, cada una de las cuales es genéticamente distinto (Le *et al.*, 2010).

Después de la fertilización el tegumento de los ovarios se divide en dos partes, el tegumento interno conformada por capas de tres tipo de células y el tegumento externo, formada por dos capas celulares, llamadas células epidérmicas y células empalizadas (Schneitz *et al.*, 1995) que son formadas por división y expansión celular (Dixon *et al.*, 2005). En las células epidérmicas se produce secreciones de polisacáridos como la pectina, compuestos hidrofílicos como el mucílago, que son depositados en el apoplasto (Goto, 1985), mientras que en las células empalizadas (testa), se producen una acumulación de suberina (Haughn & Chaudhury, 2005).

En el trigo, la capa más externa del endospermo se llama aleurona, que está formada por la parte externa de la nucela. La epidermis de la cariósida está fusionada con el pericarpio. Durante la maduración el pericarpio se desarrolla a partir del carpelo. Por otra parte, la testa se desarrolla a partir de los tegumentos exterior e interior del óvulo. En el proceso de maduración de la cariósida, se desintegra el tegumento exterior, formando una capa celular tubulares y la célula de tubo transversal, mientras que el tegumento interno y la epidermis de la nucela forman la capa de hialina. Por lo tanto, la capa protectora externa de la cariósida madura, se derivan de la nucela, tegumento y carpelo, que en combinación producen la cubierta, formada por células muertas que estarán en todo el transcurso del desarrollo de la semilla (Esau, 1977).

En las capas externas del pericarpio, las células son capaces de sintetizar proantocianidinas, conocidos también, como taninos condensados, que pertenecen a la familia de los flavonoides. Están acumuladas en las vacuolas como compuestos incoloros, y se oxidan durante la desecación de las semillas, cambiando al color característico de las semillas. Las proantocianidinas están relacionados con la protección de las semillas, evitando la acción de las especies reactivas de oxígeno (Rajjou & Debeaujon, 2008).

La cubierta de las semillas, específicamente la testa, ejerce una acción de restricción de la germinación por la impermeabilidad que tiene al agua y al oxígeno principalmente, además produce presión mecánica al embrión evitando así la germinación (Haughn & Chaudhury, 2005).

Además en la testa se deposita suberina, heterodímero rico en lípidos que se localiza en la pared celular primaria de ciertos tejidos (Kolattukudy, 2001). Es un compuesto soluble en disolventes no polares. La suberina está constituida por derivados de ácidos grasos C16-C22, alcoholes grasos (\leq C18), etc., unidos a compuestos fenólicos como el ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, entre otros (Bernards & Lewis, 1992; Schreiber *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007).

Por otra parte, las enzimas que están involucradas en la biosíntesis de la cubierta de las semillas son la peroxidasa 25 (PRX25), glicerol-3-fosfato aciltransferasa 5 (GPAT5) y alcohol graso: caffeoyl COA transferasa (FACT). Las rutas de la suberina como la de la lignina poseen enzimas comunes. La PRX25 tiene la función de

polimerizar los monómeros responsables de la formación de la suberina y/o lignina (Shigeto *et al.*, 2013). La GPAT5 está involucrada en la síntesis de poliésteres de suberina en las semillas (Beisson *et al.*, 2007). FACT posee actividad aciltransferasa y está involucrado en la formación de monómeros de suberina (Kosma *et al.*, 2015).

1.6. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL TRIGO

El trigo es uno de los cereales más cultivados a nivel mundial, llegando en el 2007 a ocupar el tercer lugar en producción después del maíz y el arroz (<http://www.fao.org/in-action/inpho/crop-compendium/cereals-grains/es>), según la figura 3, tendencia indica que va en aumento.

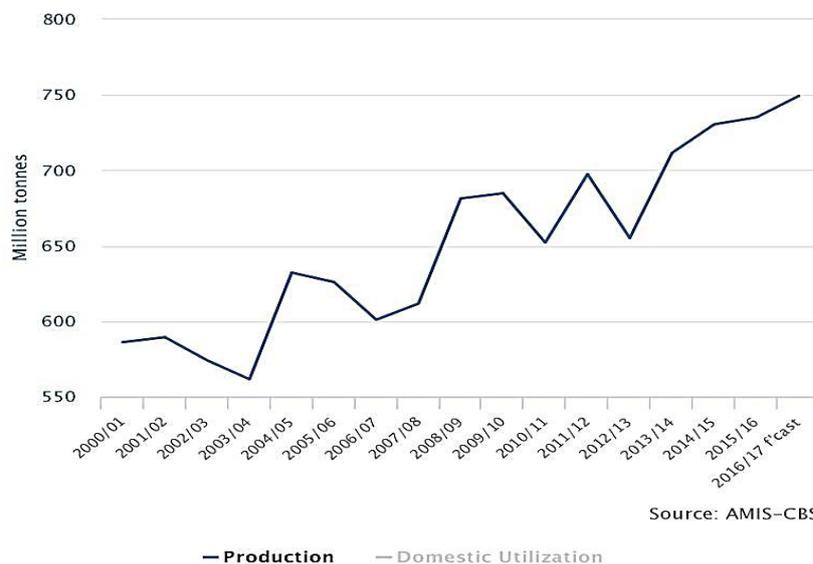
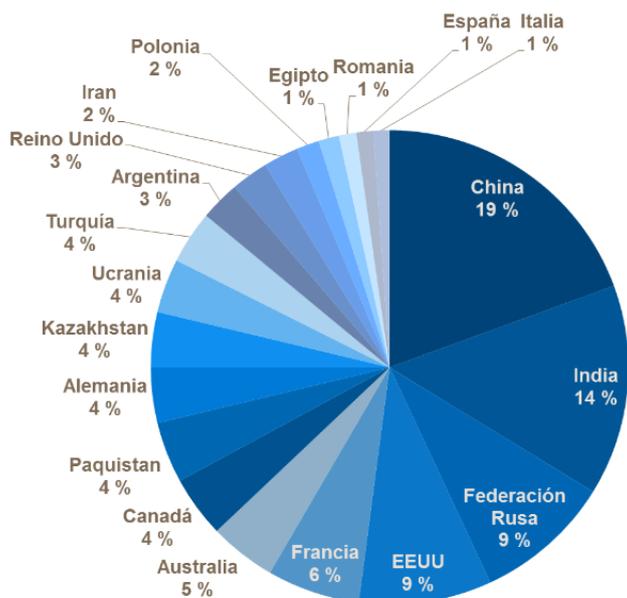


Figura 3. Producción a nivel mundial del trigo

Las principales categoría de utilización es para consumo humano directo, es decir, para su alimentación. Además se utiliza para la fabricación de piensos, forrajes para la alimentación ganadera, extracción de almidón y obtención de biocombustibles con fines industriales. Es por esta razón que muchos países (Figura 4) se dedican al cultivo del trigo, destacando China con 19 % de la producción mundial.



REF: Faostats 2011

Figura 4. Producción mundial por país

La producción de trigo está en función a la oferta y la demanda del mercado. Según los datos obtenidos a partir de mediados del 2012 hasta el 2016, el precio de trigo está yendo en caída, reportándose en la última actualización del mes de diciembre del 2016 un precio de 415.75 U\$\$/bushel (<https://www.bloomberg.com/quote>) (Figura 5).



Figura 5. Precio del trigo durante los últimos 5 años (U\$D/Bushel)
Fuente: Bloomberg

1.7. DESCRIPCIÓN DEL TRIGO BLANDO

El *Triticum aestivum*, es conocido también como el trigo blando. El genoma de *Triticum aestivum* es de ~17 gigabase y además, es hexaploide, esto quiere decir, que tiene seis copias de sus siete cromosomas que equivalen a 42 cromosomas en total. Esto es debido a eventos de hibridación entre tres especies progenitoras diploides y son conocidas como AABBDD. Estas tres especies son *Triticum urartu* (cuyo genoma se denomina AA), el de una especie de hierba silvestre desconocida, del tipo *Aegilops searsii* o *Aegilops speltoides* (genoma denominado BB) y el genoma procedente de *Aegilops tauschii* (denominado DD) (Figura 6). Probablemente las especies tetraploides AABB se generaron de forma natural hace unos 500.000 años y la forma hexaploide AABBDD hace unos 8.000 años (<http://www.wheatgenome.org/>).

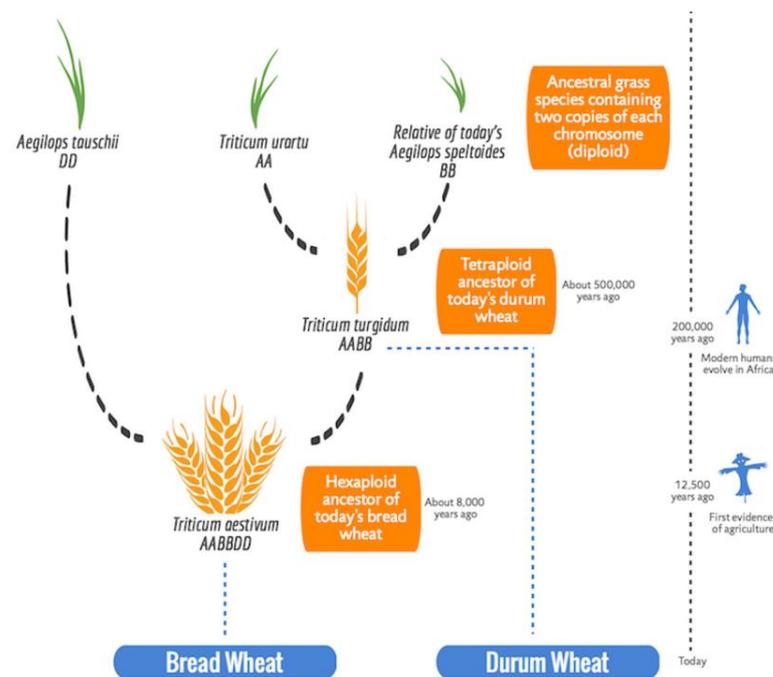


Figura 6. Evolución del trigo suave (*Triticum aestivum*)

Fuente: <http://www.wheatgenome.org/>

Por otra parte, es importante mencionar que la cariósida del trigo es a menudo de color rojo, y es causada por la deposición de derivados de las catequinas que son taninos, ubicados en el pericarpio (Miyamoto & Everson, 1958). Pero también, existen genotipos con cariósida de color púrpura o azul. En los genotipos de color púrpura predomina la deposición de cianidina-3-glucosido en el pericarpio y delphinidina-3-glucosido de color

azul en la capa de aleurona (Abdel-Aal & Hucl, 2003). Estos pigmentos son antocianinas, que pertenecen al grupo de los flavonoides. La ruta de las antocianinas está bien descrita y la enzima clave de la biosíntesis de los flavonoides es la chalcona sintasa (CHS) (Austin & Noel, 2003) (Figura 7).

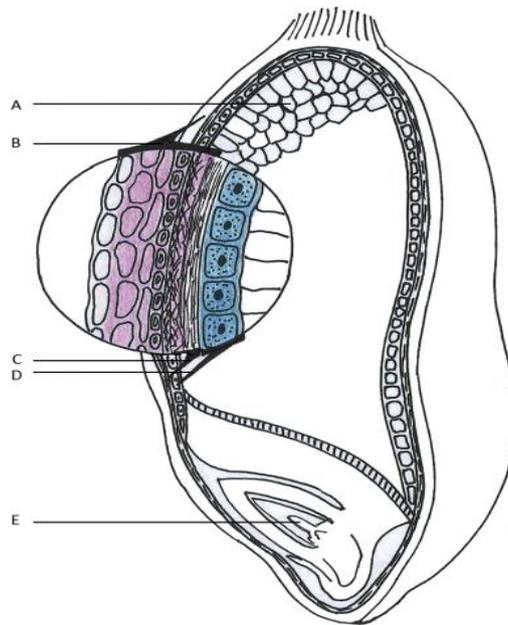


Figura 7. Cariópside de trigo, corte longitudinal

A) Endospermo, B) Pericarpio, C) Testa, E) Germen. Adaptado de Trojan *et al.*, 2013.

1.8. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN HOMEBOX

Los genes homeobox suelen estar formados por unos 180 pares de bases y están dentro de los genes que intervienen en las regulaciones de patrones anatómicos en hongos, plantas y animales. Codifica una proteína con 60 aminoácidos conocido como homeodominio, y se caracteriza por ser una gran familia de factores de transcripción. El homeodominio se pliega en una estructura 3D, que contiene tres alfa hélices, de las cuales, la segunda y la tercera forma un motivo hélice-giro-hélice (Mukherjee *et al.*, 2009).

Las proteínas homeodominio en plantas, se han clasificado en la literatura en varios grupos basándose en la similitud de sus secuencias. Están caracterizadas por la presencia del homeodominio (Bharathan *et al.*, 1997). Se han clasificado en siete clases; KNOX y BEL, pertenecientes a la superclase TALE (Bürglin, 1997), ZM-HOX, HAT1, HAT2,

ATHB8 y GL2, actualmente se conocen más clases de la familia homeobox, entre ellas el AtHB25.

El gen homeobox 25 de *Arabidopsis thaliana* (AtHB25: At5g65410), codifica un factor de transcripción dedo de zinc, que media la expresión del ácido Giberelico 3-Oxidasa 2, la cual está presente en la ruta de biosíntesis de las giberelinas activas GA1 y GA4. También está involucrado en la longevidad de semillas, la formación de mucílago, y posiblemente otra partes de la testa. El mutante de sobreexpresión de este factor de transcripción en *Arabidopsis*, al acumular más giberelinas activas hace más eficiente la formación y el refuerzo producido por la cubierta de la semilla (Bueso *et al.*, 2014). En investigaciones recientes se ha comprobado que el AtHB25, también está involucrado en la acumulación de suberina en la cubierta de las semillas.

1.9. ANTECEDENTES

En el laboratorio de Ramón Serrano, anteriormente se rastreó un colección de mutante por *activation tagging* en *Arabidopsis thaliana* con la intención de buscar mutantes con mayor longevidad de semillas, que se determinó por un ensayo de envejecimiento acelerado (temperatura de 42°C, humedad 100% en 24 horas). Fueron seleccionados cuatro mutantes dominantes que poseían mayor longevidad de semillas (isl1-1D a isl4-1D). El mutante isl1-1D sobreexpresa un factor de transcripción HOMEBOX25 (ATHB25; At5g65410), al expresar este gen con un promotor 35S. En este mutante se observó un aumento en la cubierta de las semillas de *Arabidopsis*, específicamente en el aumento de mucílago (Bueso *et al.*, 2014) (Figura 8) y en estudios recientes también se observó aumento en la capa de suberina.

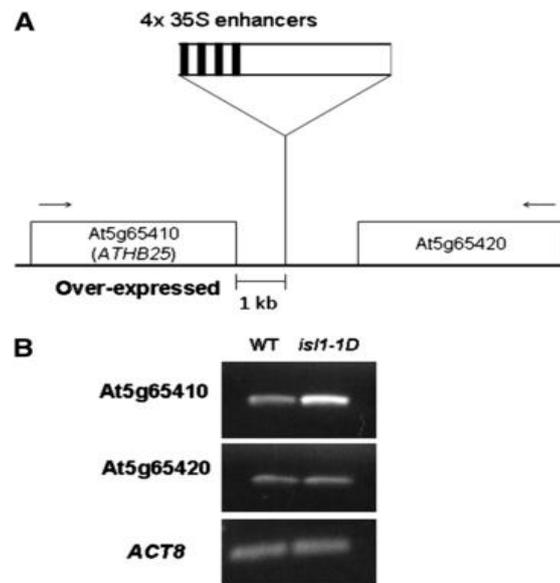


Figura 8. Caracterización molecular del mutante *is1-1D* A), localización del T-DNA en la región intergénica entre *At5g65410* y *At5g65420*, determinado por rescate de plásmido. B), RT-PCR, análisis semicuantitativo de *At5g65410*, *At5g65420* y *ACTIN8 (ACT8)*, mRNA del tipo salvaje (WT) y *is1-1D* mutante (Bueso *et al.*, 2014).

Con estos estudios previos, en el laboratorio de Ramón Serano, se planteó hacer investigaciones en plantas de interés agronómico específicamente el trigo por su gran importancia económica, mejorando la longevidad de las semillas para conservarlos por periodos más largos, y a la vez conocer el comportamiento del factor de transcripción de *Arabidopsis thaliana* Homeobox25 en el trigo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

- Comprobar la resistencia a envejecimiento de los granos de trigo en líneas transgénicas sobreexpresoras del factor de transcripción de *Arabidopsis Thaliana* Homeobox 25 de los cultivares BW208 y THA53.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Genotipar mediante PCR cuantitativas líneas transgénicas sobreexpresoras del factor de transcripción de *Arabidopsis Thaliana* Homeobox25 de los cultivares BW208 y THA53.
- Realizar el ensayo de longevidad de los granos de trigo en líneas transgénicas sobreexpresoras del factor de transcripción de *Arabidopsis Thaliana* Homeobox 25 de los cultivares BW208 y THA53.
- Estimar la expresión del factor de transcripción de *Arabidopsis Thaliana* Homeobox 25 en las líneas transgénicas.
- Realizar el ensayo de tinción de suberina con rojo sudán de la cubierta de los granos de trigo en dichas líneas transgénicas.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

En el presente trabajo se ha empleado como material vegetal de estudio el trigo (*Triticum aestivum*).

Los cultivares que se seleccionaron son *Triticum aestivum* cv. Thatcher (THA53) y el *Triticum aestivum* cv. Bobwhite (BW208), las cuales fueron cotransformadas con el vector pAHC17 en el que se clonó el factor de transcripción AtHB25 bajo la acción de los promotores de la ubiquitina del maíz (UBI: HB25) (Figura 9) o uno específico de embrión y de la capa de aleurona de gramíneas (Em: HB25) y el vector pAHC25, en donde se clonó el gen BAR dándole resistencia al herbicida Basta. Las construcciones fueron diseñadas en el laboratorio de Ramón Serrano del IBMCP y las transformaciones se realizaron por el método biolístico en el laboratorio de Francisco Barro del Instituto de Agricultura Sostenible (Córdoba).

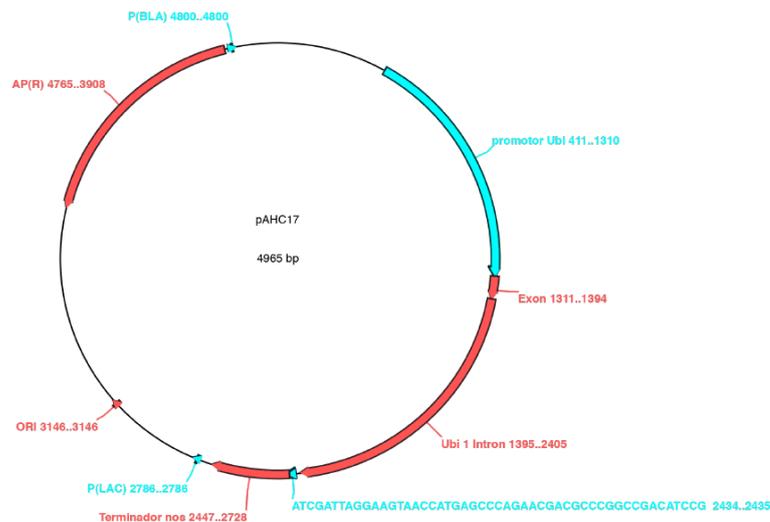


Figura 9. Plásmido pAHC17 con la inserción pUbi: HB25

El promotor UBI, es un promotor fuerte y constitutivo extraído del maíz, es decir se expresa en toda la planta y otorga una alta expresión génica, además es utilizada solo en plantas monocotiledóneas. El promotor Em, es un promotor específico de semilla, específicamente del embrión y del tejido de aleurona. En la Figura 10, se representan esquemáticamente los dos tipos de construcciones.

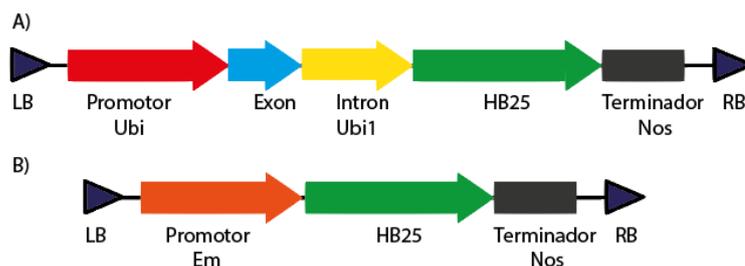


Figura 10. Construcciones del T-DNA

A) T-DNA, con el promotor Ubi, el primero exón y el primer intrón Ubi, el gen HB25 y el terminador Nos. B) T-DNA, con el promotor Em, el gen HB25 y el terminador Nos.

En la tabla 1, se muestran las líneas obtenidas tras la transformación con los diferentes T-DNA (UBI: HB25 y Em: HB25) en los dos cultivares THA53 y BW208, además de datos adicionales como la presión utilizada en la pistola de genes, el número de placas, el número de callos, las plantas obtenidas, el resultado de la PCR de la región del gen BAR y el número de granos.

Tabla 1

Líneas transgénicas de los cultivares BW208 y THA53

Nº línea	Presión (PSI)	Nº Placa	Callo	Planta	Genotipo	Construcción	PCR	Granos
2	644	4	3	1	THA53	UBI:HB25	+	27
4	644	4	2	1	THA53	UBI:HB25	+	41
6	644	1	4	2	THA53	UBI:HB25	+	33
8	644	1	2	1	THA53	UBI:HB25	+	14
10	644	4	3	4	THA53	UBI:HB25	+	13
11	644	1	3	3	THA53	UBI:HB25	+	20
13	644	4	3	2	THA53	UBI:HB25	+	11
15	657	2	1	1	THA53	Em:HB25	+	18
18	653	4	1	3	BW208	Em:HB25	+	>50
20	658	1	1	1	THA53	UBI:HB25	+	25
21	658	4	2	3	THA53	UBI:HB25	+	13
22	658	4	2	4	THA53	UBI:HB25	+	5
24	658	4	1	2	THA53	UBI:HB25	+	25
27	658	4	2	2	THA53	UBI:HB25	+	>50
28	658	1	1	2	THA53	UBI:HB25	+	15
30	658	1	2	1	THA53	UBI:HB25	+	7
31	657	2	1	1	THA53	Em:HB25	+	36
32	657	2	4	1	THA53	Em:HB25	+	43
34	653	4	1	5	BW208	Em:HB25	+	44
35	657	2	3	1	THA53	Em:HB25	+	42
36	642	1	1	1	THA53	Em:HB25	+	12
37	659	4	1	1	THA53	Em:HB25	+	10
39	657	2	2	1	THA53	Em:HB25	+	>50
46	642	1	2	1	THA53	Em:HB25	+	5

50	657	2	6	1	THA53	Em:HB25	+	33
51	657	2	5	1	THA53	Em:HB25	+	41
54	653	4	3	2	BW208	Em:HB25	+	17
55	653	4	3	1	BW208	Em:HB25	+	11
56	642	1	4	1	THA53	Em:HB25	+	9
57	642	1	3	1	THA53	Em:HB25	+	8
58	642	1	5	1	THA53	Em:HB25	+	13

3.2. TRATAMIENTO DE ENVEJECIMIENTO DE LAS SEMILLAS

El protocolo de envejecimiento acelerado empleado en este trabajo fue una modificación del “Basal Thermotolerance Assay” de Tejedor-Cano *et al.* (2012).

- Las semillas están almacenadas en tubos Falcón a una temperatura de 4 °C, previamente rotuladas, para reducir su deterioro.
- Se selecciona semillas al azar en tubos Falcón de 15 mL y se enrasar con 10 mL con agua miliQ, todo a 4 °C por 24 horas, esto ayuda a romper la latencia de las semillas, para que la germinación sea más eficiente.
- Pasado el tiempo previsto, se hace el tratamiento de envejecimiento, que consiste en poner las muestras a una temperatura de 41–42°C por 24 horas al 100 % de humedad en el Termobloque.

3.3. SIEMBRA EN EL INVERNADERO

Las semillas de *T. aestivum* se cultivaron en un sustrato que contiene 50 % de Turba Rubia Kekkika, 25 % perlita y 25 % de vermiculita. Las macetas se colocaron en bandejas previamente rotuladas y se distribuyeron las semillas en distancias equivalentes, posteriormente en la bandeja se llenan con agua hasta el 10% aproximadamente y se forran las mismas con Film Stretch, para mantener la humedad al 100%, se deja en esas condiciones hasta que se vea los primeros brotes, después se riegan 2 veces a la semana. Las condiciones para el crecimiento en el invernadero son de día largo, 23°C de temperatura, 70% de humedad relativa y una intensidad lumínica de $130 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

3.4. GENOTÍPADO DE LOS TRANSGÉNICOS DE HB25

3.4.1. Extracción de DNA

Para la extracción se ha empleado una adaptación del método CTAB descrito por McKinney *et al.*, 1995.

- Se recoge 0.1 g hojas jóvenes de *T. aestivum* en Eppendorf de 1.5 mL y se congela en nitrógeno líquido, con el fin de minimizar la degradación de DNA durante el traslado del invernadero al laboratorio.
- Se tritura las hojas con un pistilo de polipropileno en el mismo Eppendorf, se añade 600 µL del tampón de extracción CTAB (2% p/v CTAB, 100 mM Tris-ClH, pH 8, 20 Mm EDTA, 1.4 M NaCl y 1% p/v PVP PM.40 000), ésta debe estar precalentada a 55°C, se agita con el vórtex hasta homogenizarlo completamente y se deja incubar por 20 min a la misma temperatura.
- Se añade 600 µL de cloroformo: isoamílico (24:1) en la campana de extracción, ya que, el compuesto es muy volátil y puede causar toxicidad al inhalarlo. Se agita en el vórtex por 1 min aproximadamente, ver que las dos fases se mezclen completamente, seguidamente se centrifuga a 13 000 RPM por 5 min.
- Se extrae el sobrenadante y se vierte el contenido en un nuevo Eppendorf y se añade 600 µL de isopropanol, se agita manualmente y se deja en el congelador por 30 min, esto para que la precipitación de los ácidos nucleicos sea lo más eficiente posible.
- Se centrifuga a 13 000 RPM por 10 min, se elimina el sobrenadante completamente quedando solo el precipitado, se añade 500 µL de Etanol 70% y se agita manualmente hasta que el Pellet se separe de la base del Eppendorf, esto para que el lavado sea completo.
- Se centrifuga a 13000 RPM por 4 min, luego se elimina todo el etanol y se deja secar el pellet a temperatura ambiente por 2 horas, se resuspende añadiendo 50 µL de agua miliQ.
- Se añade 5 µL de RNAsa, se incuba a 37 °C por 20 min en el Termobloque, seguidamente se precipita añadiendo 500 µL Etanol: Acetato Amónico (6:1) 7.5 M, agitar manualmente y se pone en el congelador por 30 min, se centrifuga a 13 000 RPM por 10 min.

- Se elimina todo el sobrenadante y se añade 500 μL de etanol 70% se agita manualmente hasta que el Pellet se separe de la base del Eppendorf, se centrifuga a 13 000 RPM por 4 min, luego se elimina todo el etanol y se deja secar el pellet a temperatura ambiente por 2 horas, se resuspende añadiendo 50 μL de agua miliQ. Se mide la concentración de DNA en el NanoDrop en ng/ μL .

3.4.2. Electroforesis de DNA

Se instala la cámara de electroforesis horizontal en una base que no tenga pendiente.

- Se prepara gel de agarosa, pesando agarosa 0,7-1,5% (p/v), se añade al tampón de electroforesis TBE 0,5X (45 mM TrisBase, 45 Mm de ácido bórico, 1 mM EDTA, 0,05% de bromuro de etidio), se agita y se calienta en un horno microondas hasta que la agarosa se diluya completamente, luego se procede a enfriar a 50 $^{\circ}\text{C}$, esto para que no se solidifique, adicionando 0,05% (p/v) de Bromuro de Etidio.
- Se instala el molde con el respectivo “peine” y se vierte el gel de agarosa hasta la solidificación completa a temperatura ambiente.
- Por otra parte, se añade en un Eppendorf de 1 mL, 1 volumen de DNA y 5 volúmenes de LB 6X (50 % v/v glicerol, 60 mM Tris-Hcl pH 8, 6 mM EDTA y 0,35 % p/v de bromofenol).
- Una vez, llegado a este punto, en la cubeta de electroforesis se retira los soportes de los extremos del molde de agarosa, se añade el tampón de electroforesis TBE 0,5X hasta cubrir el gel completamente, cargar los pocillos con el DNA preparado. Como marcador de tamaño y cantidad de DNA, se utiliza como patrón lambda-*HindIII*.
- Se conecta la electroforesis, recordar que el electrodo negativo se introduce en la parte cabecera de los pocillos, el voltaje utilizado es de 80 Volt.
- Una vez, terminado el desplazamiento del DNA, se retira el gel y se pone en una cámara de UV de 254 nm y se revela la foto, se cuantifica el tamaño, la cantidad mediante interpolación y se observa la calidad del DNA, la cual, debe estar libre de impurezas.

3.4.3. Reacción de cadena de polimerasa en tiempo real (Q-PCR)

La reacción se lleva a cabo en placas multipocillos de 96 pocillos, la cantidad final en cada pocillo es de 20 μL , donde se añaden los siguientes componentes en ese orden:

- Se añade 1 μL de DNA (El DNA debe estar estandarizados a 40 $\text{ng}/\mu\text{L}$), para que la concentración sea constante.
- Si se desea se puede preparar un “mix”, con los otros componentes en un Eppendorf.
- Se añade 13 μL de agua miliQ.
- Seguidamente se añade 1 μL del cebador sentido y 1 μL de cebador antisentido (Deben estar normalizadas según los nanomoles que posean cada cebador y seguidamente diluir a una concentración del 100 X). Los cebadores oscilan entre 20 – 30 nucleótidos, y estas fueron diseñadas utilizando el software informático PrimerQuest Tool (<http://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) introduciendo la secuencia de cDNA del gen HB25 y comprados de la empresa Metabion (<http://www.metabion.com/home/index.php>).
- Se añade 4 μL de “5X *PyroTaq EvaGreen Qpcr Mix Plus (ROX)*”, (contiene polimerasa 5X, Buffer, MgCl_2 , dNTP, colorante EVAGreen y ROX), comprado de la empresa Cmb-Bioline (<http://www.cmb-bioline.es/>).
- Se forran los pocillos con Film selladoras para PCR adhesivas de forma hermética, en seguida se coloca la placa en el termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), con el siguiente programa:
 - 1 ciclo de desnaturalización a 95°C.
 - 40 ciclos:
 - 30 segundos de desnaturalización a 95°C
 - 30 segundos de hibridación de los cebadores a 55°C.
 - 30 segundos de extensión a 72°C. (los fragmentos amplificados no deben acceder los 0,5 kb).
 - 1 ciclo de extensión final a 72°C, durante 5 minutos.

3.5. NIVEL DE EXPRESION DE AtHB25

3.5.1. Extracción de RNA

En una balanza se pesan 1 gr de hojas de *T. aestivum*, se congela con nitrógeno líquido y se traslada al laboratorio.

- Se tritura las muestras en un mortero, vertiendo nitrógeno líquido para evitar la degradación del RNA y facilitar la trituración. Luego, se coloca la muestra en cuatro tubos Eppendorf equitativamente.
- Paralelamente se precalienta a 50°C, 1 mL del tampón TCES (0,2 M de Tris, 0,2 M NaOH, 50 mM EDTA, 2 % SDS, pH 8) y 1 mL de PCI (Fenol: Cloroformo: Isoamílico, 25:24:1) en una mezcla homogénea, y se añade 500 µL del contenido a cada muestra y se agita con el vórtex y se deja a 50°C por 10 min. Se centrifuga a 2000 RPM por 10 min.
- Se extrae el sobrenadante y se añade 1 volumen de cloroformo isoamilico (24:1), se centrifuga 12000 RPM por 10 min, se extrae el sobrenadante de los cuatro tubos en un solo Eppendorf, añadir 1 volumen de 6 M LiCl, la cual, ayuda a precipitar el RNA. Se mezcla suavemente y se deja precipitando en el congelador por 30 minutos. Se centrifuga a 12000 RPM por 10 minutos.
- Se elimina el sobrenadante y se añade 500 µL de etanol 70 % para el respectivo lavado. Se centrifuga a 12000 RPM por 3 minutos y se elimina el sobrenadante totalmente. Se deja secando de 2-4 horas, finalmente se resuspende añadiendo 100 µL de agua miliQ.
- Para eliminar impurezas y residuo de DNA, se adapta el Kit del protocolo de aislamiento de RNA de la empresa Manherey-Nagel.
- Se añade 300 µL de RA1 (30-60 % de Tiocianato de guanidina) y 300 µL de etanol 96-100 %, se mezcla en el vórtex. Se añade a la columna de color celeste, se centrifuga a 11000 RPM por 30 segundos.
- Se añade 350 µL de MDB (1-15 % de Tiocianato de guanidina y 5-20 % de etanol) a la columna y se centrifuga a 11000 RPM por 1 minuto.
- Seguidamente se añade a la columna 90 µL de Baffer de DNAsa y 10 µL de DNAsa y se incuban 15 minutos a temperatura ambiente.

- Se añade 200 μL del Buffer RAW2 (24-36 % Hidrocloruro de guanidina y 20-35 % etanol), se centrifuga a 11000 RPM por 30 segundos, se elimina el residuo y se añade 600 μL RA3 (96-100 % etanol) se centrifuga 11000 RPM por 30 segundos, eliminar el residuo y añadir 250 μL de RA3 y centrifugar a 11000 RPM por 2 minutos.
- Cambiar a un Eppendorf de 1,5 mL y colocar la columna, añadir 50 μL de agua libre de RNAsa, dejar 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 11000 RPM por 1 minuto. Se mide la concentración de RNA en un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop).

3.5.2. Obtención del cDNA

Se emplea 4 μg de RNA libre de DNA, y en un volumen de 14 μL de agua miliQ, se añade 4 μL de 5 X de Reacción Mix Buffer (reactivo buffer, dNTP, oligo (dT)₁₈ y primers hexámeros aleatorios) y 2 μL de enzima Máxima (Transcriptasa inversa e inhibidor de RNAsa), esta enzima más robusta que MuLV RT, fueron adquiridos de la Empresa ThermoFisher Scientific (<http://www.thermofisher.com/es/es/home.html>). Se incubaba a 37°C durante 30 minutos y se inactiva la enzima elevando la temperatura a 65°C por 30 minutos, luego se enfría en hielo.

3.5.3. qRT-PCR (PCR cuantitativa)

La reacción se lleva a cabo en placas multipocillos de 96 pocillos, la cantidad final en cada pocillo es de 20 μL , donde se añaden los siguientes componentes en ese orden:

- Se añade 1 μL de cDNA.
- Se prepara un “mix”, con los otros componentes en un Eppendorf.
 - Se añade 13 μL de agua miliQ. Seguidamente se añade 1 μL del cebador sentido y 1 μL de cebador antisentido. Los cebadores oscilan entre 20 – 30 nucleótidos, Se añade 4 μL de “5X *PyroTaq EvaGreen Qpcr Mix Plus (ROX)*”, (contiene polimerasa 5X, Buffer, MgCl₂, dNTP, colorante EVAGreen y ROX), Se forran los pocillos con Film selladoras para PCR adhesivas de forma hermética, en seguida se coloca la placa en el termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), y se utiliza el programa de la PCR descrita anteriormente.

3.6. CORTES HISTOLÓGICOS Y TINCIÓN DE LA CAPA DE SUBERINA

Se selecciona 2 semillas al azar en tubos Falcón de 15 mL y se enrasar con 10 mL con agua miliQ, todo a 4°C por 24 horas.

- Para la tinción de la suberina, se usa la técnica del Sudán, y para ellos se prepara el Sudán:
- Se pesa 0,25 g de Sudan Red 7B 95%, adquirido de la Empresa Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/>), se añade en un vaso precipitado con 125 mL de PEG-30, se incuba a 1 hora a 90°C, agitándolo paulatinamente hasta que se disuelva completamente y luego se enfría a temperatura ambiente.
- Se añade 125 mL de Glicerol 90 % y se mezcla hasta tener una solución homogénea, se almacena a 4°C.
- Como moldes se realizan un corte transversal de 1 cm desde la bases de las pipetas Pasteur de polietileno, se enraza el molde con NEG-50TM (83-84 % de agua, 10-11 % alcohol de polivinilo, 4-5 % de polietilenglicol y 1% de formiato de potasio).
- Paralelamente se seca el grano de trigo y se introduciendo primero la parte en donde se encuentra el embrión o germen del trigo de forma vertical. Se pone en nitrógeno líquido hasta que se congele completamente, posteriormente se retira el molde y se pega con NEG-50TM en el soporte de muestra, se deja en el criostato Microm HM 520 por un periodo de 30 minutos y luego se procede a hacer cortes y se recoge la muestra en el portaobjetos.
- Se coloca los portaobjetos en un cestillo, y en una cubeta para tinción se vierte el Sudán, se sumerge el cestillo por 10 minutos, posteriormente se enjuga con agua. Se hace la observación con el microscopio Nikon Eclipse E600 y se utilizan los objetivos 10X y 20X.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En un principio, con la intención de saber el grado de similitud del factor de transcripción AtHB25 de *Arabidopsis* con otros de la familia en gramíneas, se realizó un alineamiento múltiple de secuencia de proteínas mediante el software informático ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). El análisis se realizó sobre cuatro diferentes cultivos de los cuales, tres pertenecen a la familia de las poáceas y la última es de *Arabidopsis*, obteniendo los siguientes resultados en la figura 11. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos Plaza (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/>).

```

HV49691G00010      MSMDFDHDDGDEEMHMSMPMPVSSSYETPPPLSTGLAGAGITPNKPPGGGGGGG-
real_HB_25         --MDFDDHDDGDE---EMQMSMPMPVSSSYEPPLSTGFGGAGVAPNKPPGGGGGGG
BD3G38430         --MDFDEHDDGDDG---EEMAFMPVSSSFEAPPPQLLHPGLAHGVVVPKPGDSGGG-
AT5G65410         MEFEDNNNNNDEEQEEDMNLHEEEEDDDAVYDPPPLSRVLPKASTESHETTGTSTGGG
                   :: :::::..: .: .:.* * * *
HV49691G00010      ELGGRAKVPGG-ARYRECLKNHAVGIGGHAVDGCGEFIAAGEEGSIDALRCAACNCHRF
real_HB_25         ELGGRAKAPGGGARYRECLKNHAVSIGGHAVDGCGEFIAAGEEGSIDALRCAACNCHRF
BD3G38430         -----RFRTPSVRYRECLKNHAVGIGGHAVDGCGEFMAAGEDGSIDALSCAACCHRF
AT5G65410         GFMVHGGGSRFRFRECLKNQAVNIGGHAVDGCGEFMPAGIEGTIDALKCAACGCHRF
                   *.*****.*.*****. * * . * : * * * * * * * * * *
HV49691G00010      HRRESDFPAGAEAGSPTSPTAMVPYGGVP-----HHQFSPYYRTPAGYLHHHQA
Real_HB_25         HRRESDFPAGGEGSPTSPTAMVPYGGVP-----HHQFSPYYRTPAGYLHH-----
BD3G38430         HRKESESPAAA AVAAAAGAITPYGAMPFLPGHHGQFSPYYRTPAGYLHHHQA
AT5G65410         HRKELPYFHHAPFQHQP PPPPGFYRLPAP----VSYRPPSQAPPLQLALP-----
                   **:* . . . * . . * * : * * . *
HV49691G00010      AAVAAAAAGHPFLALPSTSHSGRDDAE-----ELSGMAAGPMSALAPLSSMSLGA
real_HB_25         -----PMSALVPLSSMSLGA
BD3G38430         MAAAMAAGHAQRFLALPSTSHSGRDEAGAADVMSAMMLSPVVMGSMAGLSPGSGGS
AT5G65410         -----PPQRRESDP
                   * ..
HV49691G00010      GPSGYGSGSGGKRFRTKFTQE QKDKMLAFAERVGWRIQKHDEAAVLHFCDEVGVKRHV
real_HB_25         GPSGYGSGSGGKRFRTKFTQE QKDKMLAFAERVGWRIQKHDEAAVLQFCDEVGVKRHV
BD3G38430         AGGPYSGSGSAGKRFRTKFSQE QKERMQAFADRLGWRIQKHDEAAVQQFCEEVGVKRHV
AT5G65410         METSSAEAGGGIRKRRTKFTAEQKERMLALAERIGWRIQRQDDEV IQRFCQETGVPRQV
                   ..... **.* * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * *
HV49691G00010      LKVMHNNKHTLGKKPPSI-----
real_HB_25         LKVMHNNKHGK--KPPSI-----
BD3G38430         LKVMHNNKHTLGKKPLP-----
AT5G65410         LKVLHNNKHTLGKSPSLHHHQAPPPPPQSSFHHEQDQEI
                   ****.* * * * . * .

```

Figura 11. Alineamiento Múltiple de Proteínas del gen AtHB25 de *Arabidopsis* con sus homólogos.

HV49691G00010 es la proteína homóloga del gen AtHB25 de la cebada (*Hordeum vulgare*), real_HB_25 es una proteína hipotética de HB25 del trigo (*Triticum aestivum*), BD3G38430 es la proteína homóloga del gen AtHB25 de *Distachyon brachypodium* y el AT5G65410 es la proteína de AtHB25 de *Arabidopsis thaliana*. El asterisco (*) indica la conservación de aminoácidos idénticos, los dos puntos (:) indican sustituciones conservativas y el punto (.) indican sustituciones semiconservativas.

Resumiendo los resultados en porcentaje de identificación según la matriz del alineamiento múltiple de las proteínas y tomando como referencia a la secuencia de *Arabidopsis* 100 %. La secuencia de AtHB25 difiere con la de *Hordeum vulgare* en un 41.90%, en *Triticum* un 39.52% y en *Distachyon* un 41.32 %.

Por otra parte, para conocer si los homólogos del factor de transcripción de *Arabidopsis thaliana* Homeobox 25 poseen también el dominio de unión a DNA y además el dominio regulador, en donde está la conformación *dedos de zinc* se utilizó el software informático Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (figura 12). El resultado se observa gráficamente.



Figura 12. Dominio de unión a DNA y dominio regulador del factor de transcripción Homeobox25

Como se puede observar en la imagen 12, es posible que existan homólogos del factor de transcripción de *Arabidopsis thaliana* Homeobox 25 en *Hordeum vulgare*, *Brachypodium distachyon* y *Triticum aestivum*, ya que poseen el dominio de unión a DNA y el dominio regulador, así como la conformación dedos de zinc.

Para tener una idea clara de la estructura tridimensional de la proteína AtHB25, se recurrió a un software informático Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>) y se introdujo la secuencia de aminoácidos extraídos del TAIR (Figura 13), se puede observar las tres alfa hélices bien diferenciadas.

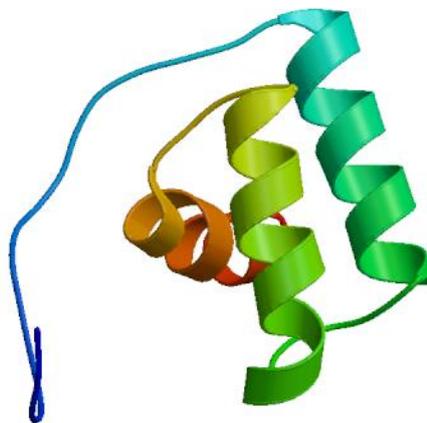


Figura 13. Estructura tridimensional de AtHB25

Como se ha comentado en apartado de Materiales y Métodos, a los cultivares BW208 y THA53 se les introdujo las construcciones pEm:HB25 o pUbi:HB25, y fueron cotransformadas con un plásmido que contenía el gen BAR que otorga resistencia al herbicida Basta. La transformación y la regeneración *in vitro* se realizó en el laboratorio de Francisco Barro del Instituto de Agricultura Sostenible donde se obtuvieron las diferentes líneas transgénicas (Tabla 2).

Tabla 2

Líneas transgénicas en los cultivares BW208 y THA53

	pUbi: HB25	pEm: HB25
BW208	-	18, 34, 54, 55
THA53	2, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 20, 21, 22, 24, 27, 28, 30	15, 31, 32, 35, 36, 37, 39, 46, 50, 51, 56, 57, 58

BW208 y THA53: cultivares; pUbi; Promotor Ubiquitina del maíz. pEm; Promotor de semillas (embrión y tejido de aleurona). AtHB25; factor de transcripción de *Arabidopsis thaliana* Homeobox25.

En el laboratorio de Francisco Barro, únicamente se detectó mediante PCR la región del gen BAR, que codifica la enzima fosfinotricina aciltransferasa (PAT), que inactiva al glufosinato (herbicida basta) (Brukhin *et al.*, 2000). El glufosinato se utiliza como medio de selección, inhibe la acción de la enzima glutamina sintasa que participa en la biosíntesis de glutamina, ocasionando que exista acumulación de amoníaco y reduce el pH celular, dando lugar a la aparición de ROS, peroxidación de lípidos y destrucción de la membrana. Todo esto trae como consecuencia la muerte de la planta (Rasche *et al.*, 1995).

En el laboratorio de Ramón Serrano se realizaron los genotipados mediante q-PCR de las líneas transgénicas y de las generaciones sucesivas con la intención de obtener líneas transgénicas estables del factor de transcripción AtHB25.

A partir del genotipado de la generación de líneas transgénicas T0 hasta la generación T1, las líneas 4, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 20, 22, 27, 28, 30, 36, 37, 39, 46, 50, 55, 56, 57 y 58 fueron descartadas debido a tres razones: plantas transformadas con el plásmido de resistencia a herbicida (gen BAR) pero no con el plásmido que contenía nuestra construcción con AtHB25, no germinación y la no presencia de granos al espigar (Tabla 3).

Tabla 3*Líneas transgénicas descartadas de la generación T1*

	Sin transformar con AtHB25	No hay germinación	Sin granos en la espiga
BW208 (pEm: HB25)	-	55	-
THA53 (pEm: HB25)	37, 57, 58	15, 36, 46, 56	39, 50
THA53 (pUbi: HB25)	8, 6, 28	10, 13, 20, 22, 27, 30	4, 11

La amplificación relativa está en función al genotipado de las líneas transgénicas realizadas con la q-PCR (37, 57, 58, 8, 6 y 28), son líneas que no han sido transformadas con AtHB25; las líneas que no han podido germinar en la generación T2, han estado supervisada hasta los 27 días después de la siembra en los maceteros (55, 15, 36, 46, 56, 10, 13, 20, 22, 27 y 30); y las líneas que no han dado granos en las plantas transgénicas de la generación T1 son 39, 50, 4 y 11.

4.1. GENOTIPADO T2 DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS DEL GEN AtHB25

En la siguiente generación, las líneas transgénicas T2 se volvieron a genotipar con el fin de seleccionar las más estables en la inserción del transgén AtHB25. Como gen de referencia con una sola inserción se utilizó el gen PIN. Este gen codifica la proteína Puroindolina, que participa en la regulación de la textura del trigo (Krishnamurthy & Giroux, 2001) y de la actividad microbiana (Luo *et al.*, 2008). El gen PIN proviene del genoma de *Aegilops tauschii* (DD) y que está ubicado en el cromosoma 5. Por tanto, no se encuentra ni en *Triticum urartu* (AA) ni en *Aegilops speltoides* (BB) (Gedye *et al.*, 2004).

Para determinar la amplificación relativa se adaptó la formula presentada por Michael (2001), y se determinará el número inserciones de cada línea transgénica utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\Delta Ct_i = Ct_{AtHB25} - Ct_{PIN}$$

$$\Delta Ct_T = \Delta Ct_i - \Delta Ct_0$$

$$AR = 2^{-\Delta Ct_T}$$

Donde,

- Ct es el ciclo umbral.
- ΔCt_i : variación entre las Ct de AtHB25 y PIN de las líneas transgénicas.
- Ct_{AtHB25} : media del ciclo umbral de AtHB25
- Ct_{PIN} : media del ciclo umbral de PIN

- ΔC_{T_T} : Variación de los ciclos de la muestra transgénica con referencia a plantas sin transformar.
- ΔC_{T_0} : variación de los ciclos de AtHB25 y PIN en plantas sin transformar.
- AR: Amplificación relativa

4.1.1. Genotipado T2 del cultivar BW208 con la inserción pEm:HB25

En la figura 14, se presentan los resultados de la q-PCR, obtenidos del genotipado de las líneas transgénicas de la generación T2 del cultivar BW208 con la inserción pEm:HB25. Estos resultados son relativos a la amplificación que se obtuvo con el gen PIN.

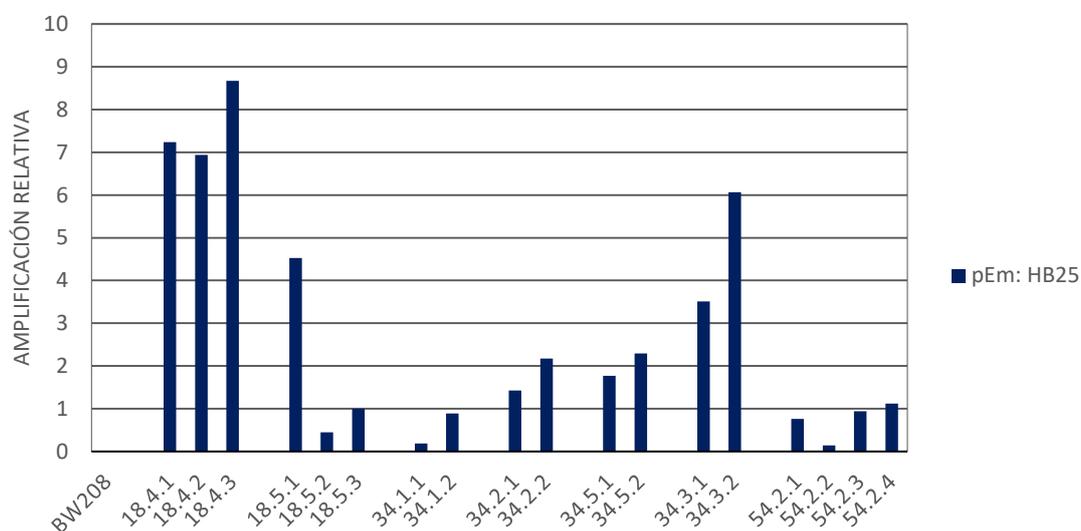


Figura 14. Genotipado de la generación T2 de las líneas transgénicas del cultivar BW208 con la inserción pEm: HB25

BW208, línea control; 18.4.1, 18.4.2, 18.4.3 son las segregaciones de la línea 18.4; 18.5.1, 18.5.2 y 18.5.3 son las segregaciones de la línea 18.5; 34.1.1 y 34.1.2 son las segregaciones de la línea 34.1; 34.3.1 y 34.3.2 son las segregaciones de la 34.3; 54.2.1, 54.2.2, 54.2.3 y 54.2.4 son las segregaciones de la línea 54.2.

En la tabla 4, se presenta un resumen de las segregaciones, es decir, el análisis de datos realizados de la figura 14, la cual consta del código de la segregación de la generación T1, número de plantas genotipadas, la suma de las amplificaciones relativas, su promedio, la varianza y desviación estándar.

Tabla 4

Análisis de datos de la generación T2 de las líneas transgénicas del cultivar BW208 con la inserción pEm: HB25

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Desviación estándar
18.4	3	22,8391647	7,61305489	0,85348057	0,92384012
18.5	3	5,97575182	1,99191727	4,89013583	2,21136515
34.1	2	1,07473366	0,53736683	0,24617041	0,49615563
34.2	2	3,60540157	1,80270079	0,27675149	0,52607175
34.5	2	4,06817664	2,03408832	0,13723963	0,37045867
34.3	2	9,57800243	4,78900121	3,26683495	1,80743878
54.2	4	2,97611623	0,74402906	0,18090788	0,42533267

Grupos, son los grupos provenientes las muestras; Cuenta, son los números de muestras de cada grupo; Desviación estándar, son las desviaciones máximas y mínimas (\pm) de promedio de las muestras.

Según los resultados obtenidos de la q-PCR de la generación T2 de la figura 14, las líneas 18.5, 34.1 y 54.2 presentaron algunos individuos con poca probabilidad de presentar inserción del transgén AtHB25 ya que sus amplificaciones relativas fueron menores de 1.

Entre las líneas restantes, la seleccionada como representativa del cultivar BW208 transformada con la construcción pEm:HB25 fue la línea 18.4 en la que fueron genotipados más individuos y nos proporcionó más seguridad de que no existieran posibles individuos sin transformar, y además posee una desviación estándar menor que la línea 34.3.

4.1.2. Genotipado T2 del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25

En la figura 15, se presenta los resultados de la q-PCR, obtenidos del genotipado de las líneas transgénicas de la generación T2 del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25. Estos resultados son relativos a la amplificación que se obtuvo con el gen PIN.

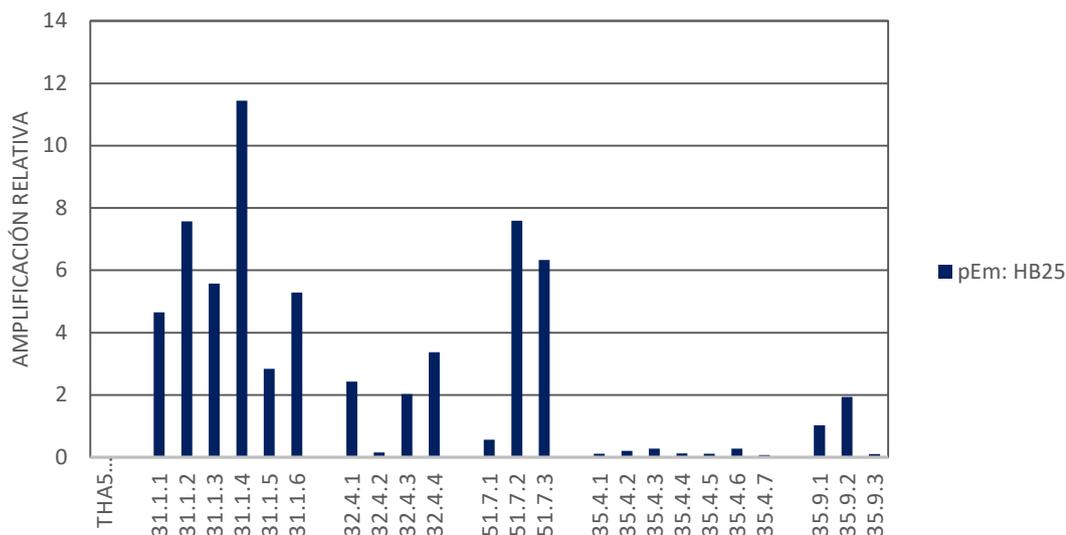


Figura 15. Genotipado de la generación T2 de las líneas transgénicas del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25

THA53.1, línea control; 31.1.1, 31.1.2, 31.1.3, 31.1.4, 31.1.5 y 31.1.6 son las segregaciones de la línea 31.1; 32.4.1, 32.4.2, 32.4.3 y 32.4.4 son las segregaciones de la línea 32.4; 51.7.1, 51.7.2 y 51.7.3 son las segregaciones de la línea 51.7; 35.4.1, 35.4.2, 35.4.3, 35.4.4, 35.4.5, 35.4.6 y 35.4.7, son las segregaciones de la línea 35.4; 35.9.1, 35.9.2 y 35.9.3, son las segregaciones de la línea 35.9.

En la tabla 5, se presenta un resumen de las segregaciones, es decir, el análisis de datos de la figura 15, la cual, consta del código de segregación, número de muestras genotipadas de cada segregación, la suma, el promedio, la varianza y desviación estándar de las mismas.

Tabla 5

Análisis de datos de la generación T2 de las líneas transgénicas del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Desviación estándar
31.1	6	37,3740661	6,22901101	8,86792992	2,97790697
32.4	4	7,98488904	1,99622226	1,83134836	1,3532732
51.7	3	14,4966111	4,8322037	14,0462619	3,74783429
35.4	7	1,21328404	0,17332629	0,0071215	0,08438896
35.9	3	3,07166141	1,02388714	0,8402549	0,91665419

Grupos, son los grupos provenientes las muestras; Cuenta, son los números de muestras de cada grupo; Desviación estándar, son las desviaciones máximas y mínimas (\pm) de promedio de las muestras.

Según los resultados obtenidos de la q-PCR de la generación T2 de la figura 15, las líneas 35.4, 35.9 y 32.4 presentaron algunos individuos con poca probabilidad de

presentar inserción del transgén AtHB25 ya que sus amplificaciones relativas fueron menores de 1.

Entre las líneas restantes la seleccionada como representativa del cultivar THA53 transformada con la construcción pEm:HB25 fue la línea 31.1 en la que fueron genotipados más individuos y nos proporcionó más seguridad de que no existieran posibles individuos sin transformar, y además posee una desviación estándar menor que la línea 51.7.

4.1.3. Genotipado T2 del cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25

En la figura 16, se presenta los resultados de la q-PCR, obtenidos del Genotipado de las líneas transgénicas de la generación T2 del cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25, la cual, está en función a la expresión relativa del gen en cuestión

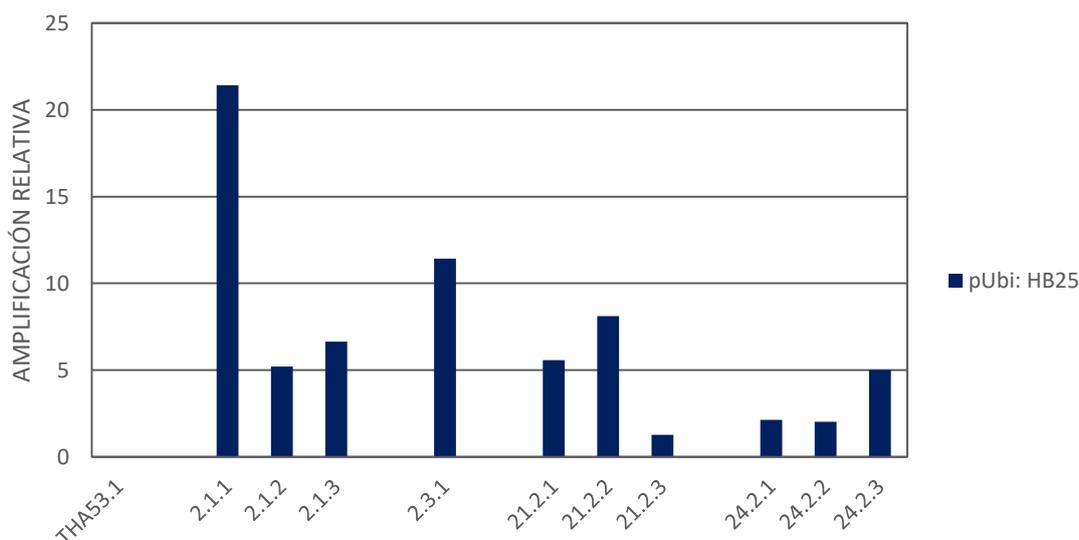


Figura 16. Genotipado de la generación T2 de las líneas transgénicas del cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25

THA53.1, línea control; 2.1.1, 2.1.2 y 2.1.3 son las segregaciones de la 2.1; 2.3.1 es la segregación de la línea 2.3; 21.2.1, 21.2.2 y 21.2.3 son las segregaciones de la línea 21.2; 24.2.1, 24.2.2 y 24.2.3, son las segregaciones de la línea 24.2.

En la tabla 6, se presenta un resumen de las segregaciones, es decir, el análisis de datos de la figura 16, la cual, consta del código de segregación, número de muestras genotipadas de cada segregación, la suma, el promedio, la varianza y desviación estándar de las mismas.

Tabla 6

Análisis de datos de la generación T2 de las líneas transgénicas del cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Desviación estándar
2.1	3	33,2687631	11,0895877	80,5445145	8,97465957
2.3	1	11,4231252	11,4231252	0	0
21.2	3	14,9337255	4,97790849	11,9475704	3,45652577
24.2	3	9,1466867	3,04889557	2,87689746	1,69614193

Grupos, son los grupos provenientes las muestras; Cuenta, son los números de muestras de cada grupo; Desviación estándar, son las desviaciones máximas y mínimas (\pm) de promedio de las muestras.

Según los resultados obtenidos de la q-PCR de la generación T2 de la figura 15, las líneas 21.2 y 24.2 presentaron algunos individuos con poca probabilidad de presentar inserción del transgén AtHB25 ya que sus amplificaciones relativas fueron menores de 1.

Entre las líneas restantes la seleccionada como representativa del cultivar THA53 transformada con la construcción pUbi:HB25 fue la línea 2.1 en la que fueron genotipados más individuos y nos proporcionó más seguridad de que no existieran posibles individuos sin transformar.

4.2. ENSAYO DE LONGEVIDAD DE SEMILLA EN LÍNEAS TRANSGÉNICAS DEL GEN AtHB25 EN LA GENERACIÓN T2

De los dos cultivares BW208 y THA53, se seleccionaron varias plantas de una misma línea transgénica de con diferentes promotores Em y UBI. Sobre ellas se realizó la evaluación de la longevidad de semillas y para ello se utilizó el ensayo de envejecimiento acelerado por 24 horas, según las condiciones descritas por Bueso *et al.*, (2014).

Se llevó a cabo, el recuento de germinación tras 7, 13, 15, 24, 27, 30 días según corresponda, realizadas después de la siembra en maceteros de plásticos.

4.2.1. Ensayo de longevidad de semillas en el cultivar BW208 con la inserción pEm: HB25

Las muestras 18.4.1, 18.4.2, 18.4.3 que fueron seleccionadas en el genotipado de la generación T2, son sometidas al ensayo de envejecimiento acelerado para poder observar la resistencia que las semillas transgénicas poseen, en comparación al cultivar BW208 (Figura 17).

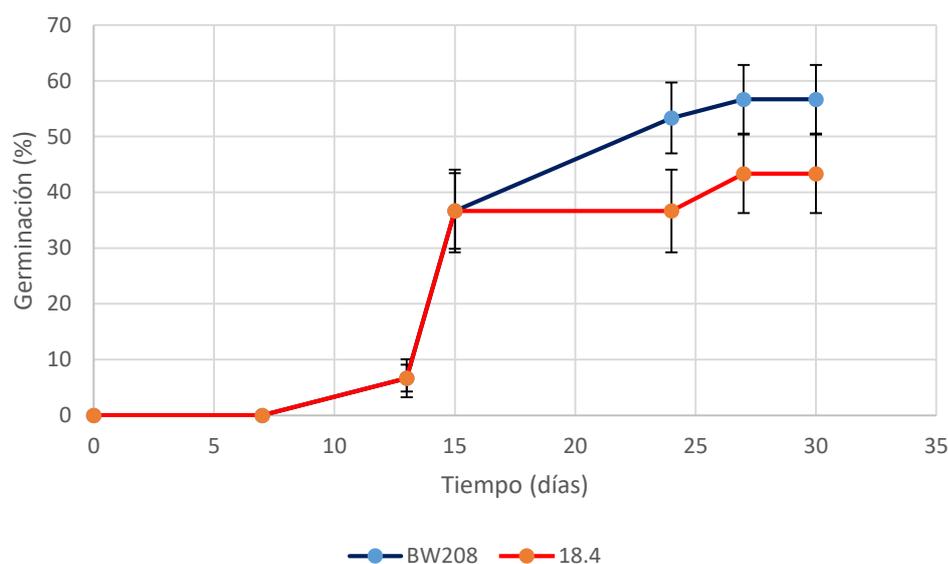


Figura 17. Ensayo de longevidad de semillas del cultivar BW208 con la inserción pEm: HB25

En la figura 17, se muestra que los granos de las líneas segregadas de la 18.4, poseen menor porcentaje (43.33%) de germinación en comparación con el control BW208 (56.67%) tras el envejecimiento acelerado, esto se puede deber a que el cultivar control presenta resistencia a este tratamiento.

4.2.2. Ensayo de longevidad de semillas en el cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25

Las muestras 31.1.1, 31.1.4 que fueron seleccionadas en el genotipado T2, serán sometidas al ensayo de longevidad para poder observar la resistencia que las semillas transgénicas poseen en comparación al cultivar THA53 (Figura 18).

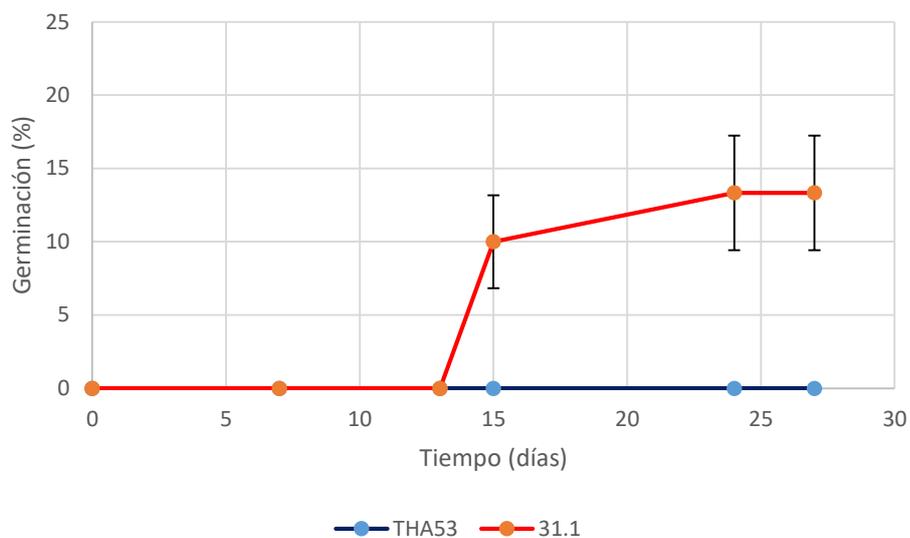


Figura 18. Ensayo de longevidad se semillas del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25.

En la figura 18, se muestra que los granos de las líneas segregadas de la 31.1, posee mayor porcentaje de germinación (13.3%) en comparación con el control THA53 (0%) tras el envejecimiento acelerado.

4.2.3. Ensayo de longevidad de semillas en el cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25

La muestras 2.1.1, 2.1.2 y 2.1.3 que fueron seleccionadas en el genotipado T2, serán sometidas al ensayo de envejecimiento acelerado para poder observar la resistencia que las semillas transgénicas poseen en comparación al cultivar THA53 (Figura 19).

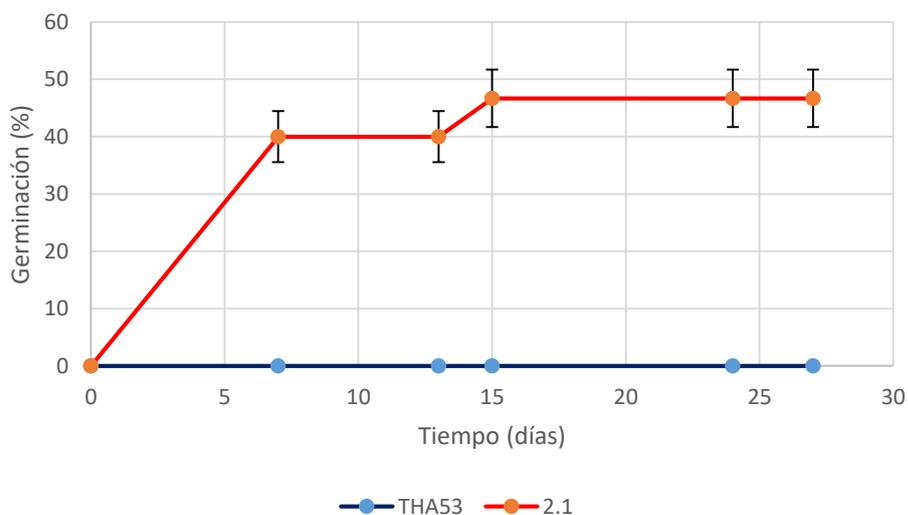


Figura 19. Ensayo de longevidad se semillas del cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25

En la figura 19, se muestra que los granos de las líneas segregadas de la 2.1, posee mayor porcentaje de germinación (46.67%) en comparación con el control THA53 (0%) tras el envejecimiento acelerado.

4.3. GENOTIPADO T3 DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS DEL GEN *AtHB25*

Se procedió a sembrar las líneas seleccionadas, obteniéndose la generación T3, las cuales fueron genotipadas.

4.3.1. Genotipado T3 del cultivar BW208 con la inserción pEm: HB25

En la figura 20, se presentan los resultados de la q-PCR, obtenidos del genotipado de las líneas transgénicas segregadas de la 18.4.1 de la generación T3 del cultivar BW208 con la inserción pEm HB25. Estos resultados son relativos a la amplificación que se obtuvo con el gen PIN.

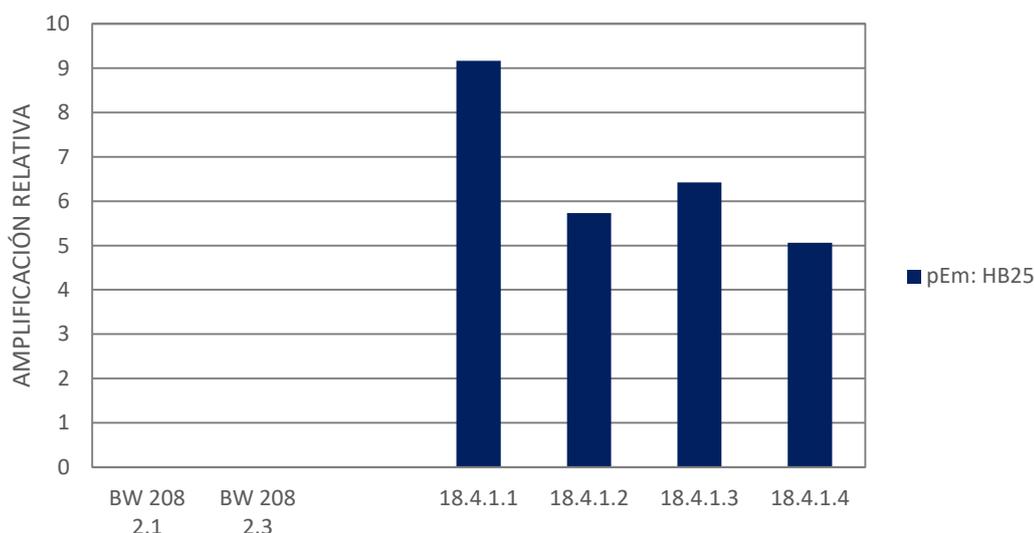


Figura 20. Genotipado de la generación T3 de las líneas transgénicas del cultivar BW208 con la inserción pEm: HB25

BW208.2.1, BW208.2.3 línea control; 18.4.1.1, 18.4.1.2, 18.4.1.3 y 18.4.1.4 son las segregaciones de la línea 18.4.1.

Según los resultados obtenidos de la q-PCR de la generación T3 de la figura 20, se observa que las cuatro líneas 18.4.1.1, 18.4.1.2, 18.4.1.3 y 18.4.1.4 son estables para la inserción del transgén *AtHB25* ya que sus amplificaciones relativas son mayores a 1.

Entre las líneas restantes la seleccionada como representativa del cultivar BW208 transformada con la construcción pEm:HB25 fueron las línea 18.4.1.1 y 18.4.1.4.

4.3.2. Genotipado T3 del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25

En la figura 21, se presentan los resultados de la q-PCR, obtenidos del genotipado de las líneas transgénicas segregadas de la 31.1.1 de la generación T3 del cultivar THA53 con la inserción pEm HB25. Estos resultados son relativos a la amplificación que se obtuvo con el gen PIN.

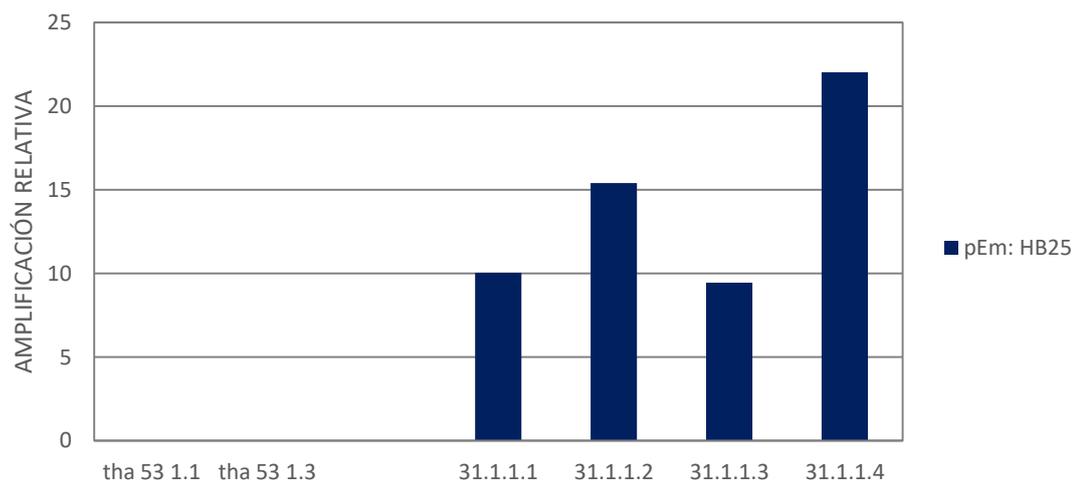


Figura 21. Genotipado de la generación T3 de las líneas transgénicas del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25
THA53.1.1 y THA53.1.3 línea control; 31.1.1.1, 31.1.1.2, 31.1.1.3 y 31.1.1.4 son las segregaciones de la línea 31.1.1.

Según los resultados obtenidos de la q-PCR de la generación T3 de la figura 21, se observa que las cuatro líneas 31.1.1.1, 31.1.1.2, 31.1.1.3 y 31.1.1.4 son estables para la inserción del transgén AtHB25 ya que sus amplificaciones relativas son mayores a 1.

Entre las líneas restantes la seleccionada como representativa del cultivar THA53 transformada con la construcción pEm:HB25 fueron las línea 31.1.1.2 y 31.1.1.4.

4.3.3. Genotipado T3 del cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25

En la figura 22, se presentan los resultados de la q-PCR, obtenidos del genotipado de las líneas transgénicas segregadas de la 31.1.1 de la generación T3 del cultivar THA53 con la inserción pUbi HB25. Estos resultados son relativos a la amplificación que se obtuvo con el gen PIN.

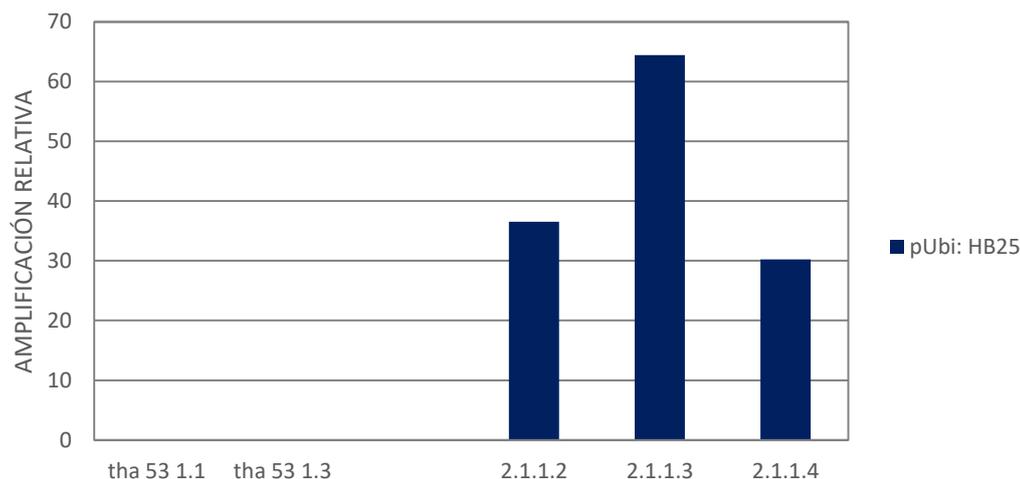


Figura 22. Genotipado de la generación T3 de las líneas transgénicas del cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25

THA53.1.1 y THA53.1.3 línea control; 2.1.1.2, 2.1.1.3 y 2.1.1.4 son las segregaciones de la línea 2.1.1.

Según los resultados obtenidos de la q-PCR de la generación T3 de la figura 22, se observa que las cuatro líneas 2.1.1.2, 2.1.1.3 y 2.1.1.4 son estables para la inserción del transgén AtHB25 ya que sus amplificaciones relativas son mayores a 1.

Entre las líneas restantes la seleccionada como representativa del cultivar THA53 transformada con la construcción pUbi:HB25 fueron las línea 2.1.1.2 y 2.1.1.3.

4.4. ENSAYO DE LONGEVIDAD DE SEMILLA EN LÍNEA TRANSGÉNICA DEL GEN HB25 DE LA GENERACIÓN T3

De los dos cultivares BW208 y THA53, se seleccionaron varias plantas de una misma línea transgénica de con diferentes promotores Em y UBI. Sobre ellas se realizó la evaluación de la longevidad de semillas y para ello se utilizó el ensayo de envejecimiento acelerado por 24 horas.

Se llevó a cabo, el recuento de germinación tras 7, 13, 15, 24 y 27 días, después de la siembra en maceteros de plásticos.

4.4.1. Ensayo de longevidad de semillas en el cultivar BW208 con la inserción pEm: HB25 de la generación T3

La muestras 18.4.1.4 y 18.4.1.1 que fueron seleccionadas en el Genotipado T3, serán sometidas a ensayo de longevidad para poder observar la resistencia que las semillas transgénicas poseen en comparación al cultivar BW208 (Figura 23).

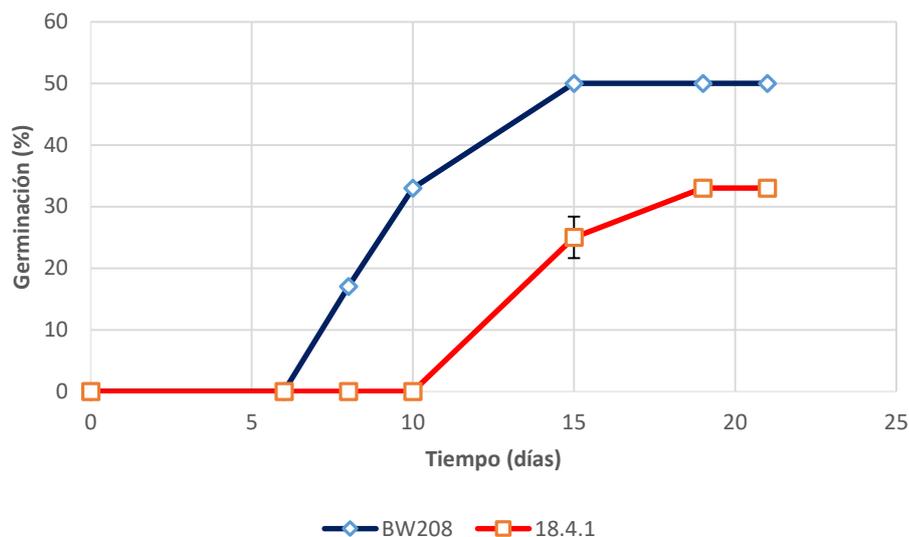


Figura 23. Ensayo de longevidad se semillas del cultivar BW208 con la inserción pEm: HB25

En la figura 23, se muestra que la línea 18.4.1, posee menor porcentaje (33%) de germinación en comparación con el control BW208 (50%), esto se puede deber a que el cultivar control es resistente a tratamiento de envejecimiento acelerado.

4.4.2. Ensayo de longevidad de semillas en el cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25 de la generación T3

La muestras 31.1.1.4 y 31.1.1.2 que fueron seleccionadas en el genotipado T3, serán sometidas a ensayo de longevidad para poder observar la resistencia que las semillas transgénicas poseen en comparación al cultivar THA53 (Figura 24).

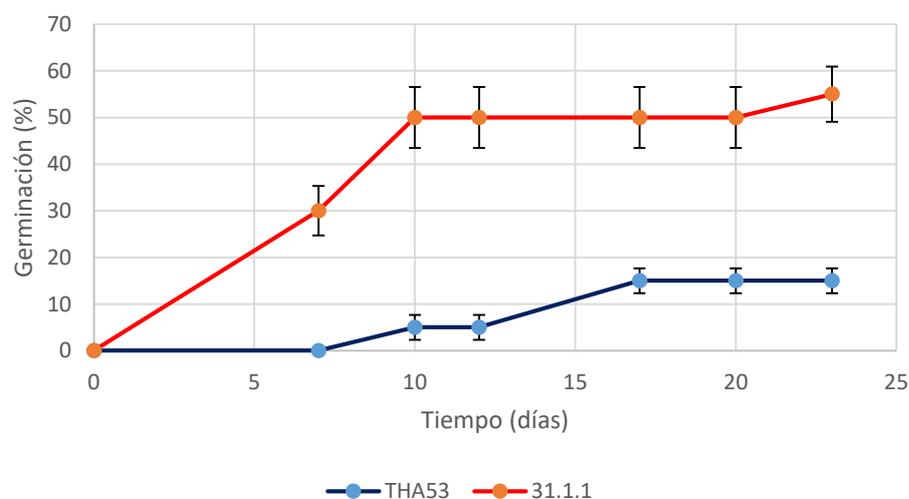


Figura 24. Ensayo de longevidad se semillas del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25

En la figura 24, se muestra que la línea 31.1.1, posee mayor porcentaje de germinación (55%) en comparación con el control THA53 (15%).

4.4.3. Ensayo de longevidad de semillas en el cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25 de la generación T3

Las muestras 2.1.1.2 y 2.1.1.3 que fueron seleccionadas en el Genotipado T3, serán sometidas a ensayo de longevidad para poder observar la resistencia que las semillas transgénicas poseen en comparación al cultivar THA53 (Figura 25).

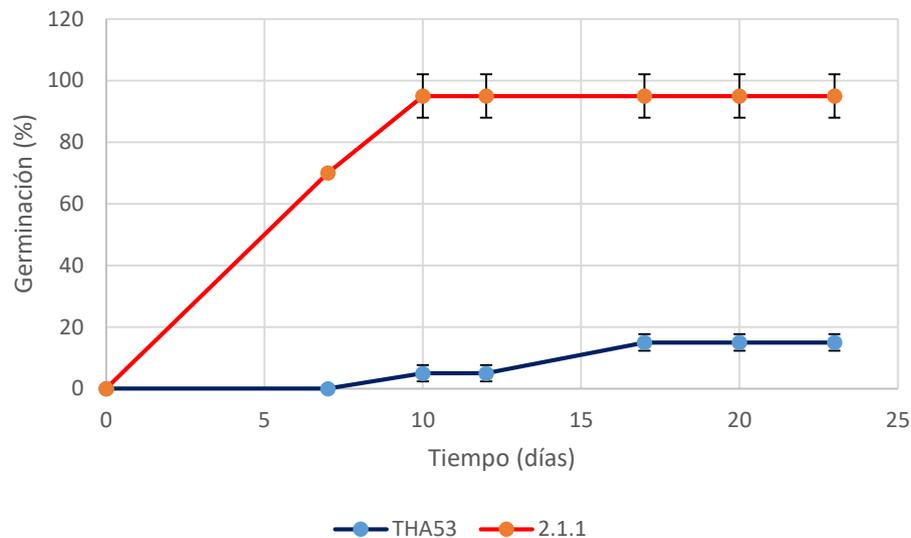


Figura 25. Ensayo de longevidad de semillas del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25

En la figura 25, se muestra que la línea 2.1.1, posee mayor porcentaje de germinación (95%) en comparación con el control THA53 (15%).

4.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LA GENERACIÓN T3 DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN HOMEBOX25

Para realizar este análisis, se seleccionaron las muestras del tratamiento de envejecimiento acelerado indistintamente de la generación T3, de las líneas 18.4.1, 2.1.1 y 31.1.1.

En la figura 26, se presenta los resultados de la RT-qPCR del transcrito AtHB25, obtenidos de las hojas de las líneas transgénicas de la generación T3 del cultivar BW208 y THA53 con la inserción pEm: HB25 y pUbi: HB25, la cual, está en función a la expresión relativa del gen en cuestión.

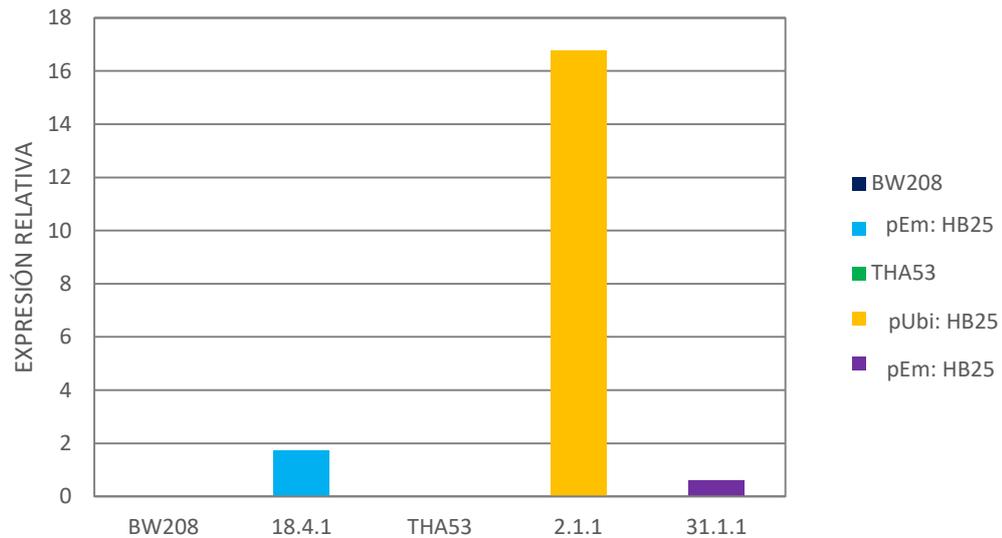


Figura 26. Nivel de expresión de la generación T3

BW208.2.4 y THA53.1.1, muestras control; 18.4.1 muestra transgénica del cultivar BW208 con la inserción pEm: HB25; 2.1.1 muestra transgénica del cultivar THA53 con la inserción pUbi: HB25; 31.1.1 muestra transgénica del cultivar THA53 con la inserción pEm: HB25.

Según la figura 26, se observa que hay mayor expresión relativa en la transcripción en la muestra 2.1.1, la cual, posee el inserto pUbi: HB25, a comparación de las muestras transgénicas 18.4.1 y 31.1.1, y así mismo de los controles BW208 y THA53. Los resultados son los esperados ya que tanto la línea 18.4.1 como la línea 31.1.1 fueron transformadas con construcciones que poseían promotores específicos de embrión (Em), y por tanto no se esperaban que el gen AtHB25 fuera sobreexpresado en el tejido.

4.6. CORTES HISTOLÓGICOS Y TINCIÓN CON ROJO SUDÁN

Se realizaron cortes histológicos de la cariósida del trigo para detectar posibles cambios en la cubierta de la semilla. Adicionalmente se realizó una tinción con Rojo Sudán con la intención de detectar y comprobar la deposición de la capa de Suberina.

Para este ensayo se seleccionaron las líneas T3 utilizadas en los ensayos descritos anteriormente.

La capa de suberina confiere impermeabilidad a la semilla, salvaguardo la integridad del embrión ante los efectos nocivos derivados del oxígeno (Beisson *et al.*, 2007; Ranathunge *et al.*, 2011).

4.6.1. Cortes histológicos y tinción con rojo sudán en la semilla de la línea transgénica pEm: HB25 y pUbi: HB25 en los cultivares BW208 y THA53

Para realizar este ensayo se tomaron las muestras BW208.2.4 y THA53.1.1 como control y 18.4.1.1, 2.1.1.3 y 31.1.1.4 como línea transgénica.

En la figura 27, se presentan los resultados tomados en el microscopio óptico Nikon Eclipse E600 y se utilizan el objetivo 20X.

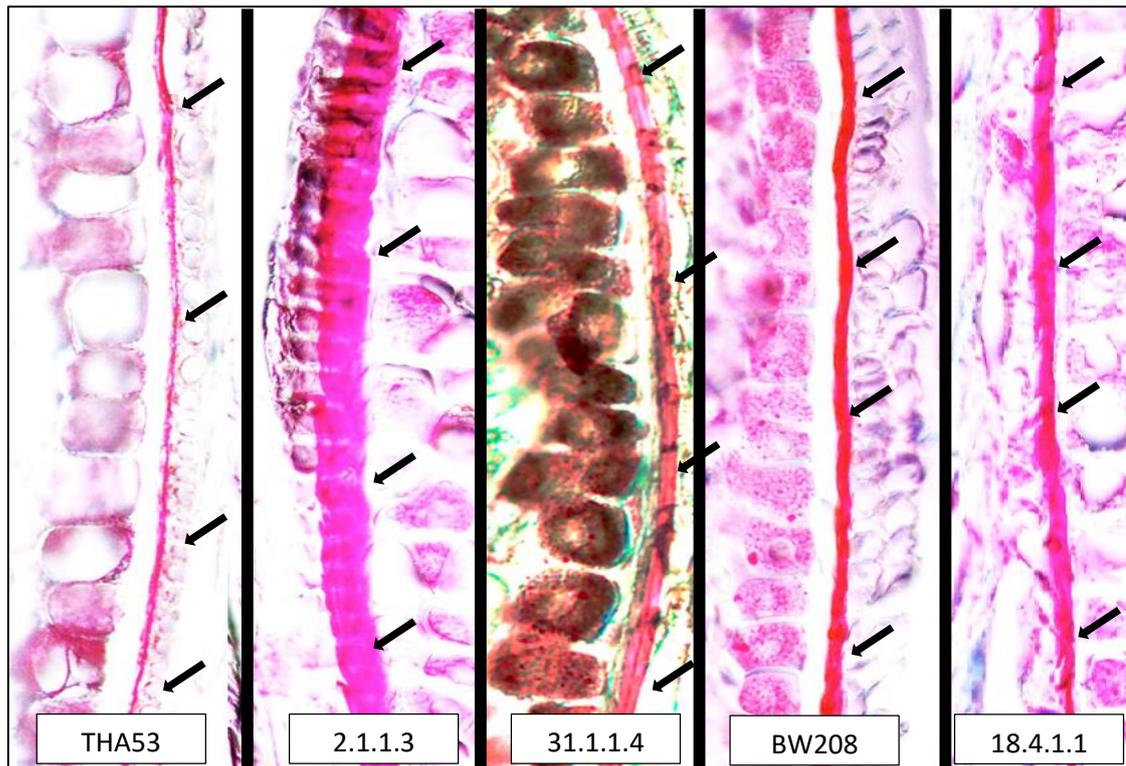


Figura 27. Visualización de la capa de suberina en semilla de la líneas transgénicas pEm: HB25 y pUbi: HB25 del cultivar BW208 y THA53. Las flechas indican la ubicación de la capa de suberina en la cariósida del trigo.

En la figura 27, se observa mayor engrosamiento de la capa de suberina en la muestra transgénica 2.1.1.3 y 31.1.1.4 en comparación con la muestra control THA53, seguidamente en la muestra 18.4.1.1 no se observan diferencias significativas con la muestra control BW208.

Este resultado aclara los obtenidos anteriormente sobre el tratamiento de envejecimiento acelerado, ya que el cultivar BW208 presenta una banda de suberina engrosada en comparación con el cultivar THA53. La sobreexpresión del gen AtHB25 promueve una mayor deposición de la capa de suberina en el cultivar THA53, otorgando al grano una mayor longevidad. En cambio esto no ocurre con líneas transformadas en el cultivar BW208 que ya tiene de por sí una mayor deposición de suberina.

5. CONCLUSIONES

- Se aislaron líneas transgénicas de los cultivares BW208 y THA53 con las construcciones pEM:HB25 y pUBI:HB25. Estas líneas fueron seleccionadas por el criterio de presentar individuos sin inserción.
- Líneas transformadas con las construcciones pEM:HB25 y pUBI:HB25 presentaron granos con resistencia al tratamiento de envejecimiento acelerado cuando fue utilizado el cultivar THA53, pero no cuando el elegido fue el cultivar BW208.
- El cultivar BW208 posee más resistencia al tratamiento de envejecimiento acelerado que el cultivar THA53.
- Las líneas transformadas en el cultivar THA53 con la inserción pUbi:HB25, posee mayor resistencia al envejecimiento acelerado que las líneas transgénicas transformadas con la inserción pEm:HB25.
- Se observa una mayor expresión relativa del gen AtHB25 en las líneas transgénicas con la inserción pUbi:HB25.
- En la visualización del ensayo de tinción de la capa de suberina con rojo sudán, se concluye que las líneas transgénicas con la inserción pUbi:HB25 y pEm:HB25 poseen mayor engrosamiento de la capa de suberina que el control THA53, mientras que no sucede lo mismo con las líneas transgénicas transformadas en el cultivar BW208.

CONCLUSIÓN GENERAL

Líneas transgénicas de trigo del cultivar THA53 que sobreexpresan el factor de transcripción de Arabidopsis AtHB25 contienen una mayor deposición de suberina en la testa de su cariósido proporcionándoles un grano resistente al tratamiento de envejecimiento acelerado.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Aal & Hucl, (2003). **Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat**. *J. Agric. Food Chem.*, 51, pp. 2174–2180.
- Alegría, J. M. I., (2001). **Germplasm conservation of rare and endangered species (Review)**. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.*, 16(1), 10–11.
- Austin & Noel, (2003). **The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases**. *Nat. Prod. Rep.*, 20, pp. 79–110.
- Bailly C., (2004). **Active oxygen species and antioxidants in seed biology**. *Seed Sci. Res.*, 14, pp. 93–107.
- Beisson F., Yonghua L., Bonaventure G., Pollard M., Ohlrogge J.B., (2007). **The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of Arabidopsis**. *Plant Cell* 19: 351-368.
- Bernards MA & Lewis NG, (1992). **Alkyl ferulates in wound healing potato tubers**. *Phytochemistry* 31: 3409–3412.
- Bharathan G, Janssen BJ, Kellogg EA, Sinha N., (1997). **Did homeodomain proteins duplicate before the origin of angiosperms, fungi, and metazoa?** *Proc Natl Acad Sci USA.*, 94:13749–13753.
- Bouché N., Fait A., Bouchez D., Moller S.G., Fromm H., (2003). **Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the gamma-aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, pp. 6843–6848.
- Brukhin V., Clapham D., Elfstrand M. y von Arnold S. (2000). **Basta tolerance as a selectable and screening marker for transgenic plants of Norway spruce**. *Plant Cell Reports*. Volume 19, Issue 9, pp 899–903.
- Bueso Eduardo, Muñoz-Bertomeu Jesús, Campos Francisco, Brunaud Veronique, Martínez Liliam, Sayas Enric, Ballester Patricia, Yenush Lynne & Serrano Ramón, (2014). **ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX25 Uncovers a Role for Gibberellins in Seed Longevity**. *Plant Physiology*, Vol. 164, pp. 999–1010.
- Bürglin TR., (1997). **Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals**. *Nucleic Acids Res.*, 25:4173–4180.
- Campos Álvarez, F.; Cruz García, F.; Torres Espinosa, A.; Sánchez Jiménez, M. P.; Colmenero Flores, José M. ; Smith Espinoza, C.; Covarrubias, A. A.; Vázquez

- Ramos, J. M. (2002). **Expression of Late Embryogenesis Abundant (LEA) protein codifying genes during osmopriming of maize and bean sedes.** *Agrociencia* 36: 461-470.
- Dixon R. A., et al., (2005). **Proanthocyanidins a final frontier in flavonoid research.** *New Phytol.*, 165, pp. 9–28.
 - Esau, (1977). **Anatomy of Seed Plants.** John Wiley and sons, New York.
 - Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA, (2002). **Introduction to conservation genetics.** Cambridge University Press.
 - Gedye K. R., MorrisEmail C. F. y Bettge A. D. (2004). **Determination and evaluation of the sequence and textural effects of the puroindoline a and puroindoline b genes in a population of synthetic hexaploid wheat.** *Theoretical and Applied Genetics*. Volume 109, pp 1597–1603.
 - Goto, N., (1985). **A mucilage polysaccharide secreted from testa of Arabidopsis thaliana.** *Arabid. Inf. Serv* 22: 143-145.
 - Haughn, G., & Chaudhury, A., (2005). **Genetic analysis of seed coat development in Arabidopsis.** *Trends in Plant Science*, 10(10), 472–477.
 - Horvath G., Wessjohann L., Bigirimana J., Monica H., Jansen M., Guisez Y., Caubergs R., Horemans N., (2006). **Accumulation of tocopherols and tocotrienols during seed development of grape (Vitis vinifera L. cv. Albert Lavallée).** *Plant Physiol. Biochem.*, 44, pp. 724–731.
 - Iriondo, J.M., (2001). **Conservación de recursos fitogenéticos In: Conservación y Caracterización de Recursos Fitogenéticos.** Publicaciones I.N.E.A, pp 15-31.
 - Job C., Rajjou L., Lovigny Y., Belghazi M., Job D., (2005). **Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds and during germination.** *Plant Physiol.*, 138, pp. 790–802.
 - Kolattukudy PE, (2001). **Polyesters in higher plants.** *Adv Biochem Eng Biotechnol* 71: 1–49.
 - Kosma Dylan K., Molina Isabel, Ohlrogge John B. y Pollard Mike (2015). **Identification of an Arabidopsis Fatty alcohol: Caffeoyle-Coenzyme A Acyltransferase required for the synthesis of alkyl Hydroxycinnamates in root waxes.** *American Society of Plant Biologists*. Vol. 160, pp 273-248.

- Krishnamurthy Konduru & Giroux Michael J. (2001). **Expression of wheat puroindoline genes in transgenic rice enhances grain softness.** *Nature Biotechnology* 19, pp 162–166.
- Le, B. H. *et al.*, (2010). **Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**,8063–8070.
- Li Y., Beisson F., Ohlrogge J., Pollard M., (2007). **Monoacylglycerols are components of root waxes and can be produced in the aerial cuticle by ectopic expression of a suberin-associated acyltransferase.** *Plant Physiol* 144: 1267–1277.
- Luo Liting, Jinrui Zhang, Guangxiao Yang, Yang Li, Kexiu Li, Guangyuan He (2008). **Expression of puroindoline a enhances leaf rust resistance in transgenic tetraploid wheat.** *Molecular Biology Reports*. Volume 35, pp 195–200.
- Matringe M., Ksas B., Rey P., Havaux M., (2008). **Tocotrienols, the unsaturated forms of vitamin E, can function as antioxidants and lipid protectors in tobacco leaves.** *Plant Physiol.*, 147, pp. 764–778.
- McKinney, E. C., Ali, N., Traut, A., Feldmann, K. A., Belostotsky, D. A., McDowell, J. M. and Meagher, R. B., (1995). **Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in *Arabidopsis*: actin mutants *act2-1* and *act4-1*.** *The Plant Journal*, 8: 613–622.
- Michael W. Pfaffl, (2001). **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Research*. Vol. 29 N° 900.
- Miyamoto & Everson, (1958). **Biochemical and physiological studies of wheat grain pigmentation.** *Agron. J.*, 50, pp. 733–734.
- Møller I. M., Jensen P.E., Hansson A., (2007). **Oxidative modifications to cellular components in plants.** *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, pp. 459–481.
- Mukherjee Krishanu, Brocchieri Luciano y Bürglin Thomas R., (2009). **A Comprehensive Classification and Evolutionary Analysis of Plant Homeobox Genes.** *Mol Biol Evol.*, 26: 2775–2794.
- Pérez & Pita, (2000). **Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas.** Universidad Politécnica de Madrid. Núm. 2112 HD.

- Rajjou, L., & Debeaujon, I., (2008). **Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds.** *Comptes Rendus - Biologies*, 331(10), 796–805.
- Ranathunge, K., & Schreiber, L., (2011). **Water and solute permeabilities of Arabidopsis roots in relation to the amount and composition of aliphatic suberin.** *Journal of Experimental Botany*, 62(6), 1961–1974.
- Rasche E., Cremer J., Donn G. y Zink J. (1995). **The Development of Glufosinate Ammonium Tolerant Crops into the Market.** In Brighton Crop Protection Conference, Weeds, Farnham, Surrey.
- Sattler S. E., Gilliland L. U., Magallanes-Lundback M., Pollard M., Della Penna D., (2004). **Vitamin E is essential for seed longevity, and for preventing lipid peroxidation during germination.** *Plant Cell*, 16, pp. 1419–1432.
- Schneitz, K., Hülskamp, M., Pruitt, R.E., (1995). **Wild-type ovule development in Arabidopsis thaliana: a light microscope study of cleared whole-mount tissue.** *Plant J* 7: 731-749.
- Schreiber L., Franke R. & Hartmann K., (2005). **Wax and suberin development of native and wound periderm of potato (Solanum tuberosum L.) and its relation to peridermal transpiration.** *Planta* 220: 520–530.
- Shigeto, J., Kiyonaga, Y., Fujita, K., Kondo, R., Tsutsumi, Y., (2013). **Putative cationic cell-wallbound peroxidase homologues in Arabidopsis, AtPrx2, AtPrx25 and AtPrx71 are involved in lignification.** *J Agric Food Chem* 61: 3781-3788.
- Stevenson D. E., Hurst R. D., (2007). **Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more?** *Cel. Mol. Life Sci.*, 64, pp. 2900–2916.
- Tejedor-Cano, J., Prieto-Dapena, P., Almoguera, C., Carranco, R., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Jordano, J., (2010). **Loss of Function of the Hsfa9 Seed Longevity Program.** *Plant Cell Environ* 33: 1408-1417.
- Treutter D., (2006). **Significance of flavonoids in plant resistance: a review.** *Environ. Chem. Lett.*, 4, pp. 147–157.
- Trojan Václav, Musilová Milena, Vyhnánek Tomáš, Klejdus Bořivoj, Hanáček Pavel & Havel Ladislav, (2013). **Chalcone synthase expression and pigments deposition in wheat with purple and blue colored caryopsis.** *Journal of Cereal Science.* Volume 59, Issue 1, Pages 48–55.

-
- Van de Wouw, M., Kik, C., van Hintum, T., van Treuren, R., Visser, B., (2009). **Genetic erosion in crops: concept, research results and challenges**. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 8(1); 1–15.
 - Walters C., L.M. Wheeler, J.M. Grotenhuis, (2005). **Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics**. *Seed Sci. Res.*, 15, pp. 1–20.
 - White CN & Rivin CJ., (2000). **Gibberellins and seed development in maize. II. Gibberellin synthesis inhibition enhances abscisic acid signaling in cultured embryos**. *Plant Physiol.* 122: 1089–97.