

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 triticales	32
2.1.2. Obtención de embriones haploides de triticales 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.