



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

REGENERACIÓN POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y  
AGROINFECCIÓN DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS  
EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA



DIRECCION GENERAL ACADEMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

PRESENTA

CÉSAR RAMOS HERNÁNDEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE: DR. JOSÉ OSCAR MASCORRO GALLARDO

Chapingo, Estado de México, junio 2017



**REGENERACIÓN POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y  
AGROINFECCIÓN DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)**

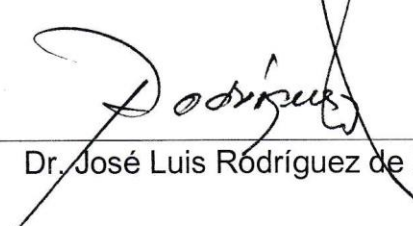
Tesis realizada por César Ramos Hernández bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y acepta como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

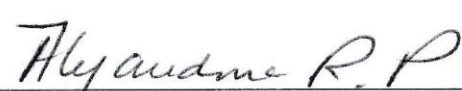
DIRECTOR: \_\_\_\_\_

  
Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESOR: \_\_\_\_\_

  
Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESORA: \_\_\_\_\_

  
Dra. Alejandrina Robledo Paz

## DEDICATORIA

A mis padres,  
Angelica Araceli y  
José Guadalupe

Con cariño, amor y  
agradecimiento por  
su apoyo y consejos.

A mis hermanos,  
Erik, Silvia y Yovani  
Alexis

Por su alegría,  
sinceridad y  
enseñanzas.

A mis amigos,  
Alexander, David  
Ismael, José Juan,  
Silvia Yazareth,  
Mariela Anelí,  
Elizabeth, Nadia y  
Efraín

Por su  
compañerismo y su  
apoyo en mi estancia  
en la Universidad.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para la realización de mi posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo por haberme permitido llevar a cabo mis estudios de posgrado y la realización de ésta investigación.

Al Instituto de Horticultura por haberme aceptado como estudiante y así cumplir mis objetivos profesionales.

Al Dr. José Oscar Mascorro Gallardo por la dirección de ésta investigación, por su conocimientos y experiencia científica.

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O por brindarme su apoyo y amplio conocimiento en el área de cultivo de tejidos.

A la Dra. Alejandrina Robledo Paz por aconsejarme acertadamente y compartirme su experiencia científica en el proyecto

A mis amigos y compañeros de generación, en especial a Michelle y Silvia por su conocimientos y amistad.

A mi familia, mis padres, y hermanos por su apoyo incondicional

## **DATOS BIOGRÁFICOS**



### **Datos personales**

Nombre: César Ramos Hernández

Fecha de nacimiento: 27 septiembre 1989

Lugar de nacimiento: San Lucas Atzala, Calpan, Puebla

No. Cartilla militar: C-9793621

CURP: RAHC890927HPLMRS00

Profesión: Ingeniero en Biotecnología

Cédula profesional: 09060737

### **Desarrollo académico**

Bachillerato: Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 185

Licenciatura: Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología en la Universidad Politécnica de Puebla, fecha de titulación 8 de octubre 2014.

## REGENERACIÓN POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y AGROINFECCIÓN DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)

## REGENERATION BY SOMATIC EMBRYOGENESIS AND AGROINFECTION OF WHEAT (*Triticum aestivum* L.)

César Ramos Hernández <sup>1</sup>; José Oscar Mascorro Gallardo<sup>2</sup>

### RESUMEN

El trigo es uno de los cultivos alimenticios más importantes en el mundo. En México es el tercer grano cultivado de importancia. En el futuro habrá que incrementar la producción de esta gramínea para satisfacer una mayor demanda y para enfrentar los efectos del cambio climático. Para este fin, la biotecnología proporciona un conjunto de herramientas como el mejoramiento genómico, la ingeniería genética y más recientemente la edición genética. La ingeniería genética para la generación de plantas transgénicas requiere de protocolos eficientes de regeneración mediante el cultivo *in vitro*, como pre-requisito para el proceso de transformación genética. En este trabajo se desarrollaron protocolos para la regeneración eficiente de dos variedades de trigo (Rebeca F2000 y Kronstad F2004) mediante embriogénesis somática inducida a partir de embriones maduros. La inducción de callo embriogénico se obtuvo en un medio MS con vitaminas Gamborg (MSG) o vitaminas MS (MSMS) con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de 2-4D y 2.4 mg L<sup>-1</sup> de Picloram, bajo incubación en oscuridad por cinco semanas. La brotación de los embriones, se logró en medio MSG con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de 2-4D y 1.0 mgL<sup>-1</sup> Tiazuron para la variedad Rebeca F2000, obteniendo hasta 14.8 brotes por explante en promedio, mientras que para la variedad Kronstad se empleó el medio MSMS con 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2-4D y 2.0 mgL<sup>-1</sup> Tiazuron, logrando hasta 8.4 brotes por explante. La brotación se llevó a cabo bajo fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y los brotes se obtuvieron en dos semanas. El enraizamiento y la

### ABSTRACT

Wheat is one of the most important food crops in the world. In Mexico it is the third most important grain cultivated in importance. In the future it will be necessary to increase the production of this crop to satisfy greater demand and to deal with the effects of climate change. To this end, biotechnology provides a set of tools such as genomic breeding, genetic engineering and more recently genetic editing. Genetic engineering for the generation of transgenic plants requires efficient regeneration protocols through *in vitro* culture as a prerequisite for the process of genetic transformation. In this work protocols were developed for the efficient regeneration of two wheat varieties (Rebeca F2000 and Kronstad F2004) through somatic embryogenesis induced from mature embryos. The induction of embryogenic callus was obtained in a MS medium with Gamborg vitamins (MSG) or MS vitamins with 0.5 mg L<sup>-1</sup> 2-4D and 2.4 mg L<sup>-1</sup> Picloram, under incubation in darkness for five weeks. Sprouting of the embryos was achieved in MSG medium with 0.2 mgL<sup>-1</sup> 2-4D and 1.0 mgL<sup>-1</sup> Tiazuron for the Rebeca F2000 variety, obtaining up to 14.8 shoots per explant on average, while for the Kronstad variety the same MSG medium with 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2-4D and 2.0 mg L<sup>-1</sup> Tiazuron was used, achieving up to 7.9 shoots per explant. Sprouting was carried out under a photoperiod of 16 hours of light and 8 of dark and the shoots were obtained in two weeks. Rooting and *ex vitro* adaptation could also be achieved efficiently. The amount of selective agent (sorbitol, NaCl,

adaptación *ex vitro* también pudo lograrse de manera eficiente. Se determinó la cantidad de agente selectivo (sorbitol, NaCl, kanamicina y fosfotricina) a emplear durante la transformación para ambas variedades, así como la mayor infectividad de la cepa EHA105 (pGUSint) sobre la GV3101(pGUSint) y la LBA4404 (pGUSint) en la variedad Kronstad.

**Palabras clave:** Cultivo de tejidos, embriogénesis somática, regeneración de plantas, embriones maduros, trigo.

kanamycin and phosphotricin) to be used during the transformation for both varieties was determined, as well as the highest infectivity of strain EHA105 (pGUSint) on GV3101 (pGUSint) and LBA4404 (pGUSint) on the Kronstad variety.

**Key words:** Tissue culture, somatic embryogenesis, plant regeneration, Mature embryos, wheat.

<sup>1</sup> Autor de tesis, para obtener el título de Maestro en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, México.

<sup>2</sup> Profesor-investigador del Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, México.

# ÍNDICE

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introducción.....                                                                         | 1  |
| 1.1    Objetivo general .....                                                                | 3  |
| 1.2    Objetivos particulares: .....                                                         | 3  |
| 1.3    Hipótesis .....                                                                       | 3  |
| 2. Revisión de literatura .....                                                              | 4  |
| 2.1    El trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) .....                                           | 4  |
| 2.1.1    Origen, botánica, fisiología .....                                                  | 4  |
| 2.1.2    Variedades cultivadas en México .....                                               | 6  |
| 2.2    Cultivo in vitro de trigo .....                                                       | 7  |
| 2.3    Mejoramiento clásico y Revolución Verde .....                                         | 16 |
| 2.4    Biotecnología del trigo .....                                                         | 17 |
| 2.5    Transformación genética.....                                                          | 19 |
| 2.5.1    Biobalística .....                                                                  | 19 |
| 2.5.2    Agroinfección .....                                                                 | 20 |
| 2.6    Transgénesis en trigo: características de interés.....                                | 21 |
| 2.7    Estrés abiótico (sequía y salinidad).....                                             | 25 |
| 2.7.1    Gen AVP1.....                                                                       | 25 |
| 3. Materiales y métodos.....                                                                 | 27 |
| 3.1    Material biológico .....                                                              | 27 |
| 3.2    Explante .....                                                                        | 27 |
| 3.3    Medios de cultivo in vitro .....                                                      | 28 |
| 3.4    Embriogénesis somática de trigo.....                                                  | 29 |
| 3.5    Descripción de variables .....                                                        | 32 |
| 3.6    Transformación por agroinfección .....                                                | 33 |
| 3.6.1    Establecimiento de condiciones óptimas para la agroinfección.....                   | 33 |
| 3.6.2    Selección (kanamicina, fosfotricina, sorbitol, NaCl).....                           | 33 |
| 3.6.3    Selección in vitro de transformantes .....                                          | 34 |
| 3.7    Análisis estadístico.....                                                             | 35 |
| 4. Resultados y discusión.....                                                               | 35 |
| 4.1    Embriogénesis somática y regeneración de trigo a partir de embriones<br>maduros ..... | 35 |
| 4.2    Agentes selectivos y selección (fosfotricina, sorbitol, NaCl y kanamicina)<br>44      |    |
| 4.2.1    Sensibilidad a PPT, sorbitol, NaCl.....                                             | 44 |
| 4.2.2    Sensibilidad a kanamicina .....                                                     | 46 |

|     |                                                               |    |
|-----|---------------------------------------------------------------|----|
| 4.3 | Efecto de las cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ..... | 47 |
| 4.4 | Selección para transformación estable.....                    | 49 |
| 5.  | Conclusiones y perspectivas .....                             | 50 |
| 6.  | Bibliografía consultada .....                                 | 52 |
| 7.  | ANEXOS.....                                                   | 55 |

## Índice de tablas

|          |                                                                                                                                                     |    |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1 | Etapa de desarrollo de la planta de trigo .....                                                                                                     | 6  |
| Cuadro 2 | Características de variedades Kronstad F2000 y Rebeca F2000 descritas por Villaseñor <i>et al.</i> (2004) y Camacho-Casas <i>et al.</i> (2010)..... | 7  |
| Cuadro 3 | Composición de medios utilizados.....                                                                                                               | 29 |
| Cuadro 4 | Concentración de fitohormonas de los medios empleados .....                                                                                         | 30 |
| Cuadro 5 | Sustratos utilizados para el trasplante de las plantas de trigo regeneradas .....                                                                   | 31 |
| Cuadro 6 | Tratamientos de presión de selección.....                                                                                                           | 34 |
| Cuadro 7 | Formación de callo y regeneración de las variedades Rebeca F200 y Kronstad F2004 .....                                                              | 41 |
| Cuadro 8 | Enraizamiento de los brotes de la variedad Kronstad F2004 después de 8 días .....                                                                   | 42 |
| Cuadro 9 | Tratamientos para adaptación ex vitro de Kronstad F2004 .....                                                                                       | 43 |

## Índice de figuras

|           |                                                                                                                                                                            |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1  | Micrografía electrónica de barrido de estructuras en trigo.....                                                                                                            | 13 |
| Figura 2  | Reacción de gen GUS y X- Gluc, Imagen tomada de Wakui <i>et al.</i> (2003). 24                                                                                             | 24 |
| Figura 3  | Formación, modo de acción y detoxificación de fosfinotricina.....                                                                                                          | 24 |
| Figura 4  | Representación esquemática del transporte de Na <sup>+</sup> en células vegetales, tomada de Yamaguchi & Blumwald (2005).....                                              | 27 |
| Figura 5  | Estructuras de la semilla de trigo y su germinación ( <i>Triticum aestivum</i> L.) 28                                                                                      | 28 |
| Figura 6  | Eliminación de partes no regenerantes .....                                                                                                                                | 37 |
| Figura 7  | Formación de estructuras no regenerantes en callos.....                                                                                                                    | 38 |
| Figura 8  | Cinética de desarrollo de callos: Rebeca F2000 y Kronstad F2004. ....                                                                                                      | 39 |
| Figura 9  | Proceso de regeneración in vitro de trigo Rebeca .....                                                                                                                     | 40 |
| Figura 10 | Formación de raíz y adaptación ex vitro de la variedad Kronstad F2004:43                                                                                                   | 43 |
| Figura 11 | Grafica de sensibilidad: a) Grafica de sensibilidad a sorbitol, b) Grafica de sensibilidad a NaCl de las variedades Rebeca F2000 y Kronstad F2004 al 2 <sup>do</sup> me 45 | 45 |
| Figura 12 | Grafica de sensibilidad a fosfinotricina al segundo mes de exposición....                                                                                                  | 46 |
| Figura 13 | Grafica de sensibilidad a Kanamicina después de un mes de exposició. 46                                                                                                    | 46 |
| Figura 14 | Expresión transitoria (ET) del gen GUS en callos de Kronstad F2004 ....                                                                                                    | 48 |
| Figura 15 | Expresión estable (EE) del gen GUS en callos de Kronstad F2004.....                                                                                                        | 48 |

## **1. Introducción**

El trigo es una de las fuentes de alimento más importantes del mundo ya que se producen 724 millones de toneladas (FAO, 2016). En México después del maíz y frijol, el trigo es una de las fuentes más importantes de nutrientes a bajo costo (Peña *et al.*, 2008).

Se espera que en la primera mitad del presente siglo la demanda mundial de trigo aumente. La demanda nueva y tradicional de estos productos ejercerá una presión creciente sobre los ya escasos recursos. La agricultura se verá forzada a competir por las tierras y el agua con los asentamientos urbanos (FAO, 2014).

La agricultura a nivel mundial es el mayor consumidor de agua dulce con un 70 a 80%, y el agua ha sido identificada como el factor principal que limita la producción agrícola, tanto de riego como de temporal. De los 400 mil millones de metros cúbicos que anualmente precipitan sobre el territorio nacional solo se aprovecha una pequeña fracción (Fox *et al.*, 1992).

El estrés ambiental y en particular la sequía; limita el crecimiento de las plantas ocasionando pérdidas de cosechas. Las plantas son capaces de desarrollar mecanismos de tolerancia para adaptarse a las condiciones ambientales limitantes (Almeselmani *et al.*, 2012).

Los mecanismos de tolerancia no son comunes en plantas superiores, por ello la ingeniería genética ha sido clave para mejorar su tolerancia a diferentes

factores abióticos, porque es posible introducir en un genoma, genes provenientes de otros organismos (Chaves y Oliveira, 2004).

Un sistema de regeneración eficiente, es la base para poder utilizar la ingeniería genética. A diferencia de las plantas modelo, en el trigo sea dificultado obtener plantas transgénicas, debido a la falta de explantes con una alta eficiencia de regeneración, por esta razón se han utilizado diferentes explantes; embriones inmaduros, embriones maduros, inflorescencias, y microesporas (Caswell *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2005; Sarker y Biswas, 2002), donde los embriones maduros han demostrado ser mejores a los demás explantes por tiempo, espacio, y a que reducen los costos asociados con el crecimiento de las plantas post antesis, la recolección de embriones inmaduros, y el monitoreo preciso de la antesis antes de la recolección de embriones (Özgen *et al.*, 1998). Estas ventajas hacen que los embriones maduros sean materiales de manejo fácil para la transformación de plantas. Además, para el desarrollo de estos explantes se deben considerar los componentes del medio de cultivo, entre los más importantes se encuentran: los reguladores del crecimiento, las fuentes de carbono, y aditivos inorgánicos (Yu *et al.*, 2008)

La transformación genética de trigo se puede realizar mediante agroinfección por *Agrobacterium Tumefaciens* (Beltrán *et al.*, 2003). Proceso que se ve afectado por diversos factores, tales como: la cepa de *Agrobacterium*, tipo de vector, uso de inductores, densidad del cultivo y tiempo de co-cultivo (Jones & Shewry, 2009) y con el uso de los genes reporteros y de selección en la transformación de cereales se puede identificar los eventos no transformados.

Con base a estos antecedentes nos planteamos los siguientes objetivos e hipótesis para poder establecer un eficiente protocolo de regeneración y determinar las variables más importantes para una eficiente agroinfección del trigo, así en un futuro puedan estas ser empleados para introducir genes como el *AVP1* de *Arabidopsis thaliana* y obtener plantas transgénicas con tolerancia a sequía y salinidad.

### 1.1 Objetivo general

Establecer un sistema eficiente de regeneración *in vitro* y transformación por agroinfección de trigo (*Triticum aestivum* L.).

### 1.2 Objetivos particulares:

Obtener un protocolo de regeneración *in vitro* de trigo a partir de embriones maduros.

Establecer las condiciones más adecuadas para la transformación por agroinfección de trigo

### 1.3 Hipótesis

Se considera posible establecer las condiciones necesarias para la obtención de callo embriogénico y la regeneración *in vitro* a partir de embriones maduros de dos variedades locales de trigo.

## 2. Revisión de literatura

### 2.1 El trigo (*Triticum aestivum* L.)

#### 2.1.1 Origen, botánica, fisiología.

El trigo cultivado moderno se estima que fue domesticado hace unos 10 000 años durante la revolución neolítica y la transición de la caza y recolección a la agricultura. Estas primeras formas cultivadas fueron diploides y tetraploides, y sus relaciones genéticas indican que procedían de la parte suroriental de Turquía (Shewry, 2009).

El trigo harinero (*Triticum aestivum*) es una especie allohexaploide ( $2n = 6x = 42$ , genomas BBAADD) que se originó de la hibridación de eventos relacionados con tres progenitores diploides diferentes clasificados en los géneros *Triticum* y *Aegilops*: (i) *T. urartu*, el donante del genoma A, (ii) una especie *Aegilops* estrechamente relacionado con *A. Speltoides*; el donante del genoma B, y (iii) *A. Tauschii*, el donante del genoma D. (Feldman y Levy, 2012).

Descripción botánica y fisiología: El trigo es considerado de la clase monocotiledónea, superorden, *Commeliniflorae*, orden *Poales*, familia *Poaceae*, subfamilia *poideae*, grupo *Triticum* Género *Triticum*, especie *T. aestivum* (Mateos, 2005).

El sistema radicular carece de una estructura secundaria, la raíz está rodeada por la epidermis que junto el parénquima cortical forma la zona cortical. Interiormente, está la endodermis, con células prismáticas unidas que carecen de espacios intercelulares y sus paredes transversales y radiales poseen una capa de suberina denominada Banda de Caspary. El sistema radicular es fasciculado y bastante desarrollado encontrándose el 55 % de su peso en los

primeros 25cm del suelo el cual tiene dos orígenes: las raíces primarias o seminales, que son realmente raíces embrionarias, es decir, provienen de la germinación del embrión, cuya función consiste principalmente en colaborar en las primeras fases del desarrollo de la plántula, siendo funcionales desde la nacencia hasta el comienzo del ahijamiento y constituidas por una raíz principal y de 4-5 raíces laterales. El sistema de raíces secundarias o adventicias, nacen del primer nudo del tallo, a partir del ahijamiento han de formar el sistema radicular definitivo y pueden encontrarse raíces hasta 1.5 m si las características del suelo lo permiten (Mateos *et al.*, 2005).

El sistema aéreo: En la semilla se encuentra un esbozo de tallo embrionario (plúmula), que en los primeros estadios de la germinación crece hacia arriba, protegido por una envoltura a modo de vaina que se denomina coleóptilo. Cuando el coleóptilo llega a la superficie del suelo, se rasga y aparece la primera hoja, que va alargándose poco a poco; al llegar a la mitad de su desarrollo empieza a aparecer más abajo la segunda hoja. Cuando surge la tercera hoja, empieza a notarse en la base de tallo un abultamiento que da origen a un nudo (nudo de ahijamiento) que a su vez engrosa y da origen a nuevos nudos de los que saldrán nuevos tallos. Este proceso se conoce como de ahijamiento o amacollamiento. Al principio los tallos son macizos, pero a medida que crecen, se va ahuecando los entrenudos, mientras que los nudos continúan siendo macizos durante toda la vida de la planta (Mateos *et al.*, 2005).

El trigo desarrolla de siete a ocho largas hojas, en forma de cinta y terminadas en punta. La parte inferior de las hojas, la vaina, rodeada toda la longitud de un entre nudo y se prolonga a través de una lígula transparente, larga y corta pegada al tallo. La parte superior de la hoja, el limbo, se prolonga a cada lado del tallo por dos aurículas pelosas poco abrazadoras (Mateos *et al.*, 2005).

La estructura interna de la hoja se caracteriza por presentar, entre la epidermis superior e inferior, haces vasculares en disposición longitudinal, entre los cuales se encuentran el mesofilo y esclerénquima. (Sierra, 2005). El ciclo de desarrollo del trigo está dividido en una serie de periodos según Mateos *et al.* (2005) y se muestra en el cuadro 1.

*Cuadro 1 Etapa de desarrollo de la planta de trigo.*

| <b>Periodos</b>                                                                                  | <b>Etapas</b>                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| Vegetativo o formación de hojas<br>(desde la germinación hasta el final<br>del ahijamiento)      | Germinación – Nascencia<br>Nascencia-Ahijamiento<br>Ahijamiento-Encañado                   |
| Reproductor o de formación de<br>tallos (desde el comienzo del<br>encañado hasta la fecundación) | Encañado<br>Espigado                                                                       |
| Formación y maduración del grano<br>(desde la fecundación hasta la<br>maduración del grano)      | Multiplicación celular intensa<br>Enriquecimiento de glúcidos y<br>proteínas<br>Desecación |

El trigo se le clasifica según su hábito de crecimiento en tres tipos básicos: primavera, invierno y facultativo. Los trigos de primavera tienen un ciclo de crecimiento continuo que dura de cuatro a cinco meses y por lo general no puede sobrevivir a un periodo prolongado de temperatura bajo cero. Los trigos de invierno se siembran en otoño y se cosechan ocho meses después y no se desarrollan en forma normal sin un periodo continuo de bajas temperaturas. Los trigos facultativos poseen atributos tanto los de primavera como los de invierno y han evolucionado de tal manera que encuadran en nichos ambientales muy específicos (CYMMYT, 1989).

### 2.1.2 Variedades cultivadas en México

El trigo harinero- suave o blando (*Triticum aestivum* L.) (Peña *et al.*, 2008) es el que más se cultiva en México (23 estados de la República), concentrándose en la zona Norte y Noroeste del país (SAGARPA, 2015). Entre las variedades se recomienda para el noroeste la variedad Kronstad F2004 (Camacho-Casas *et al.*, 2010) y la región mesa central la variedad Rebeca F2000 (Hortelano *et al.*, 2013) las cuales presentan las características descritas en el cuadro 2.

Cuadro 2 Características de variedades Kronstad F2000 y Rebeca F2000 descritas por Villaseñor *et al.* (2004) y Camacho-Casas *et al.* (2010)

| Variedad                                         | Kronstad F2004                                                                                           | Rebeca F2000                                                                                                                                                                                                 |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Altura promedio (cm)                             | 92                                                                                                       | 86                                                                                                                                                                                                           |
| Ciclo vegetativo-<br>madurez fisiológica (días)  | 79-120                                                                                                   | 95– 146                                                                                                                                                                                                      |
| Inmunidad a enfermedades                         | NPD                                                                                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• roya del tallo</li> <li>• roya amarilla</li> </ul>                                                                                                                  |
| Moderada resistencia a moderadamente susceptible | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Roya de la hoja</li> <li>• Carbón parcial del grano.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tizón foliar</li> <li>• Mancha bronceada</li> <li>• Mancha foliar</li> <li>• Tizón de la gluma</li> <li>• Mancha de la hoja</li> <li>• Roña de la espiga</li> </ul> |
| Rendimiento (t ha <sup>-1</sup> )                | RPM: 5.65                                                                                                | AI: 2 a 3.5, AF: mayor a 3.5, AC: menor de 2                                                                                                                                                                 |

NPD= No se presenta dato Promedio, AI= Ambientes intermedio, AF= Ambientes favorables, RPM = Rendimiento promedio. Ambas variedades con habito de crecimiento en primavera.

## 2.2 Cultivo *in vitro* de trigo

El concepto de cultivo de tejidos o propagación *in vitro* abarca tanto el cultivo aséptico de tejidos como de células y órganos. Se le llama *in vitro* debido a que se cultiva en recipientes de vidrio o plástico magenta. Se puede definir

como un conjunto de técnicas con las cuales se puede ejercer un control relativo sobre los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos bajo estudio. Basado en el concepto de totipotencia enunciada por Haberland en 1902. Totipotencia significa que todas las células vegetales tienen la capacidad de formar plantas completas (Abdelnour y Escalant, 1994).

La regeneración de las plantas puede lograrse a través de dos vías: embriogénesis u organogénesis

La embriogénesis es el proceso de desarrollo mediante el cual las estructuras bipolares que son similares a los embriones zigóticos se desarrollan a partir de células somáticas a través de los estadios embrionarios característicos sin fusión de gametos y no poseen conexiones vasculares con el tejido materno. Estas estructuras capaces de crecer y formar una planta completa (Deporte *et al.*, 2014; Abdelnour y Escalant, 1994). La embriogénesis somática indirecta se acompaña de un fenómeno llamado callogénesis o formación de callo (García *et al.*, 2004). El callo es un conjunto de células desorganizadas con la capacidad de dividirse (Abdelnour y Escalant, 1994).

La organogénesis es la formación de primordios unipolares, que posteriormente sufren organogénesis, dando como resultado una regeneración adventicia de brotes o raíces) (Hicks 1994).

La expresión del potencial embriogénico u organogénico sólo se produce si las células dentro del explante son competentes o responden a señales de cultivo específicas que les permiten diferenciarse en embriones u órganos (Elhiti y Stasolla, 2011).

Las células competentes pueden producir embriones u órganos en respuesta a estímulos internos y externos a menudo representados por cambios en los

reguladores del crecimiento. Para la embriogénesis, la auxina más importante en la promoción de este proceso es el 2,4-D y su incorporación al medio de cultivo estimula la producción de AIA nativa, la cual se ha asociado con un incremento en la respuesta a embriogénesis. Además, el 2,4-D también aumentan la expresión de niveles de etileno y genes de biosíntesis de ABA, el hecho de que tanto el etileno como el ABA se consideran hormonas de estrés, para el inicio del proceso embriogénico (Elhiti y Stasolla, 2011).

El cultivo *in vitro* de trigo se ve influenciado por el explante, genotipo y medio de cultivo. Se han utilizado como explantes: embriones inmaduros y embriones maduros, donde se ha demostrado que la respuesta de los cultivos de embriones maduros es superior a la de los embriones inmaduros. (Özgen *et al.*, 1998). Asimismo, los embriones maduros presentan las siguientes ventajas: ahorro tiempo y espacio, reducción de los costos asociados con el crecimiento de las plantas post antesis, la recolección de embriones maduros no requiere el aporte adicional de cámaras de baja temperatura para satisfacer la vernalización (en el caso de trigo de invierno), y requisitos para la inducción floral antes de la recolección de embriones (Özgen *et al.*, 1998).

En el cultivo de embriones maduros de trigo se distinguen las siguientes etapas de acuerdo con Delporte *et al.* (2014) al analizar la histología de callos, desde su desarrollo temprano hasta el paso final a la diferenciación completa de los embriones somáticos son descritos a continuación:

1. Iniciación de la división celular: 1 día después de la inducción del 2,4-D, se observan pocas células en división
2. Proliferación celular: después de 2 días de cultivo, los primeros signos de una división celular más activa son visibles, y a los 6 días, las divisiones de células se intensifican.

3. Embrión globular: al día 8, los primeros signos de diferenciación, aparece una capa unicelular (protoderma).
4. Estructura polar: después de 8 días, el proceso de diferenciación es confirmado y seguido por desarrollo polarizado; la formación de un meristemo apical.
5. Estructura bipolar: alrededor de 12 días, un patrón de simetría apical-basal y un eje del embrión se forman.
6. Embrión somático maduro: muestra todas las características de los embriones de gramínea, plúmula con el coleóptilo encerrando la hoja primordia, coleorriza, escutellum y epiblasto.

**El explante.** Todos los tejidos vegetales tienen el potencial de poder regenerar plantas completas *in vitro*. Sin embargo, dependiendo de las especies y de las condiciones de cultivo, solo algunos explantes son capaces de iniciar la embriogénesis somática (Abdelnour y Escalant, 1994).

**Medio de cultivo.** Los medios de cultivo son combinaciones de sustancias químicas que se han descrito después de numerosos experimentos y permiten que las plantas crezcan y se multipliquen *in vitro*. Lo componen: sales inorgánicas, preparaciones naturales complejas, y compuestos orgánicos.

Las sales inorgánicas necesarias para las plantas se presentan como elementos esenciales mayores y menores (Abdelnour y Escalant, 1994). El medio más frecuentemente usado en las especies monocotiledóneas para obtener embriogénesis somática es el medio MS (Zaidi *et al.*, 2000). Aunque existen otros medios utilizados como la de Gamborg (medio B5) (Davey y Anthony, 2010).

Preparaciones naturales complejas. la utilización de estas ha ido disminuyendo con el equilibrio entre las sales inorgánicas, el conocimiento del efecto de los aminoácidos y las sustancias de crecimiento. Sin embargo, varios suplementos de composición variable siguen siendo de uso común, como el caso del hidrolizado de caseína.

El hidrolizado de caseína (CH) puede ser una fuente de calcio, fosfato, varios micro elementos, vitaminas y una mezcla de hasta 18 amino ácidos. Contienen una cantidad relativamente grande de glutamina. Con su uso la tasa de crecimiento de células suspensiones se incrementa y se encontró que la adición de CH a medio MS era esencial para la formación de brotes a partir del callo (George *et al.*, 2008).

Dentro de los compuestos orgánicos se encuentra sustancias como: carbohidratos, hormonas, y vitaminas.

Los carbohidratos juegan un papel esencial como fuente de energía y de carbono, así como un agente osmótico. La sacarosa ha sido la mejor fuente de carbono seguida de la glucosa, y maltosa. La glucosa generalmente apoya el crecimiento igualmente bien, y en algunas plantas puede dar como resultado un mejor crecimiento *in vitro* que la sacarosa, o promover la organogénesis donde la sacarosa no; pero es más costosa, la glucosa sólo será preferida para la micropropagación donde produce resultados claramente ventajosos. La sacarosa puede ser remplazada por maltosa y trehalosa (Los tres azúcares tienen un radical alfa- glucosilo en el extremo no reductor) (George *et al.*, 2008).

La Maltosa también sirve como fuente de carbono y como un suplemento osmótico. En comparación con la sacarosa, hay una tasa de hidrólisis extracelular, se toma más lentamente, e hidroliza intracelularmente más lentamente. Se ha demostrado que conduce a un aumento en la inducción de callos y plántulas en la regeneración de trigo. Además, en otros cultivos aumentó la inducción del callo y apoya a la embriogénesis (George *et al.*, 2008).

La captación de moléculas de azúcar en los tejidos vegetales parece estar en parte a través de la permeación pasiva y parcialmente a través del transporte activo. El alcance de los dos mecanismos puede variar. La absorción activa de los protones ( $H^+$ ) del medio. La compensación de la carga se efectúa por la excreción de un catión (generalmente  $H^+$ ) (George *et al.*, 2008).

Las hormonas son mensajeros químicos que permiten a las células comunicarse una con la otra. Existen varias clases de hormonas vegetales, empleadas en el cultivo *in vitro* las más importantes son las auxinas y citocininas (Hopkins y Huner, 2009).

**Auxinas.** Las auxinas se sintetizan en las regiones meristemáticas y otros órganos en crecimiento activo como el coleoptilo. El ácido indol-3-acético (AIA) es la auxina más distribuida en la naturaleza. Pero también existen auxinas sintéticas como el ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D). El precursor de las auxinas es el triptófano. La aplicación del 2,4-D comercial en gran parte es debido a su resistencia a la oxidación por las enzimas que degradan AIA, además de su mayor estabilidad (Hopkins y Huner, 2009).

Una auxina es generalmente requerida para la inducción de un explante a callo. Aplicando auxinas se puede alterar fundamentalmente la fisiología programada genéticamente de los tejidos vegetales enteros, que se encontraba en un estado diferenciado. Las células, que responden a la auxina, se revierten a un estado desdiferenciado y comienzan a dividirse. La reprogramación sólo se entiende en un grado muy limitado. Se conoce que las auxinas hacen que el ADN sea metilado más de lo habitual y podría esto ser necesario para la reprogramación de las células. Así, los programas específicos de tejidos asociada con la diferenciación serían erradicadas por

hipermetilación, además en presencia de 2,4-D inhibe la formación de clorofila (George *et al.*, 2008).

El proceso de embriogénesis somática es a menudo iniciado en medios que contienen altos niveles de auxinas, especialmente 2,4-D y picloram (ácido 4-amino-3,5,6 tricloropicolínico) en menores cantidades (George *et al.*, 2008). La auxina estimula formación de masas proembriogénicas (MPE), que son grupos de células dentro de la población de células que son competentes para formar embriones somáticos (Figura 1). Una vez que las MPEs se forman, pueden desarrollar a la etapa globular de la embriogénesis, pero entonces su desarrollo es bloqueado por la auxina. La eliminación o reducción de auxina en el medio de cultivo permite a las PEM se conviertan en embriones somáticos. Algunas especies de plantas son capaces de formar embriones somáticos utilizando auxina como el único crecimiento regulador (Davey y Anthony, 2010).

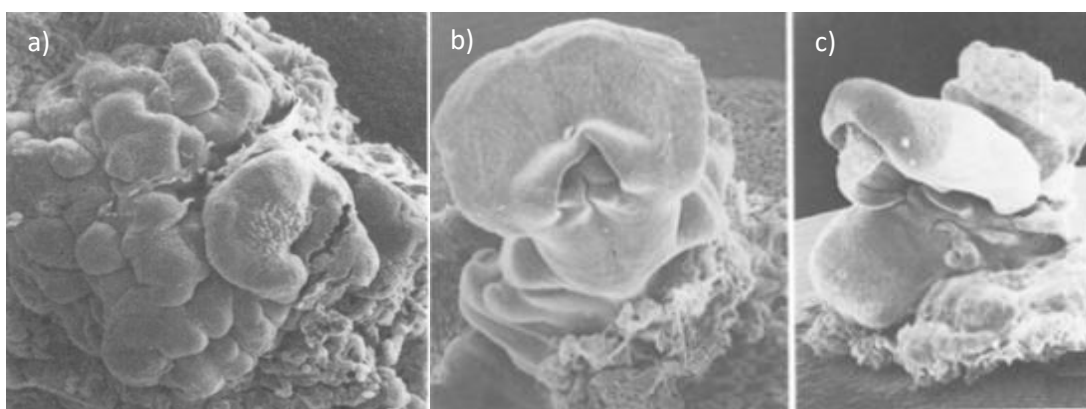


Figura 1 Micrografía electrónica de barrido de estructuras en trigo: a) callos embrionarios a 16 días de edad, forma nodular, b) embrión somático con dos meristemas apicales c) Embrión germinante en el que varios primordios de los brotes son visibles. Imágenes tomadas de Ozias-Akins y Vasil, (1982) y Ozias-Akins y Vasil, (1983).

Las auxinas son rápidamente absorbidas por los tejidos vegetales cultivados en medios con un pH de 5-6. Estas hormonas entran a las células como moléculas enteras (mediante difusión pasiva), una vez dentro ocurre una disociación lo cual impide que sean expulsadas del citoplasma, porque la

membrana plasmática es impermeable a los aniones de auxina (George *et al.*, 2008).

**Citocininas.** Las citocininas son derivados de adenina ya sea con una cadena lateral relacionada isopreno o una cadena lateral aromático (cíclico). La citocinina, kinetina, es un derivado sintético que aún no se ha identificado en plantas (Davey y Anthony, 2010). Estas hormonas estimulan particularmente la síntesis de proteínas, participan en el control del ciclo celular y están implicadas en el metabolismo del azúcar.

Las citocininas aparecen como moléculas libres en las plantas, pero también se encuentran en los ARN-t del citoplasma y cloroplasto, en las plantas enteras, las raíces parecen ser sitios de la biosíntesis natural de las citocininas, el ápice de la raíz, y particularmente las células de su centro quiescente, podrían ser sitios importantes de síntesis. Aunque se utilizan en la investigación, las citocininas naturales isopenteniladenina (IP) y zeatina (Z), no son utilizados por laboratorios comerciales rutinariamente, debido a su costo. Afortunadamente, varios análogos químicos de citocininas naturales aparte de cinetina que se han encontrado altamente activos. Las citocininas sintéticas más utilizadas en la micropropagación son además de la cinetina, la bencilaminopurina (BA) y las fenilureas como el tidiazurón (TDZ) (George *et al.*, 2008).

Para la división celular se requieren auxinas y citocininas, la ausencia de alguna de ellas detiene el paso de la fase  $G_1$  a  $G_2$  (Hopkins y Huner, 2009), debido que inducen la ciclina CycD3 de tipo D y por lo tanto estimula la progresión del ciclo celular de  $G_1$  a la fase S, y posiblemente también la transición  $G_2 / M$  por la inducción de la expresión del gen CDC2 de la histon-quinasa H1 y estimula de su desfosforilación por Cdc25 (George *et al.*, 2008).

Un modelo para la transducción de señales de citocinina a través de un sistema de fosforilación multietapa. La detección de citocinina ocurre cuando estas se unen con el dominio de entrada en el espacio extracelular. La unión a la citocinina induce la dimerización y autofosforilación de la histidina quinasa aceptor cuyo dominio está situado en el lado citoplasmático de la membrana. El sistema de fosfotransferencia comienza con la transferencia del grupo fosforilo primero a un residuo de ácido aspártico (D) en el dominio receptor y después a un residuo de histidina, una proteína separada, de histidina fosfotransferasa (HPT). La HPT fosforilada migra al núcleo en el que el grupo fosforilo se transfiere a un regulador (RR) de respuesta de tipo B o tipo A (Davey y Anthony, 2010). El regulador de respuesta de tipo B activado a continuación activa la transcripción de los genes de respuesta primaria a citocinina de los cuales todavía no son muchos los genes identificados que puedan clasificarse. Sin embargo, se conocen los siguientes: el gen *CKX* (citocinina oxidasa/deshidrogenasa), dos genes *CRF* (codifican para factores de transcripción del grupo AP2/ERF, perteneciente a la familia de respuesta al etileno) y el regulador de respuesta de tipo A (Azcón-Bieto y Talón, 2013). Los reguladores de respuesta de tipo A pueden regular negativamente las respuestas de la citocinina suprimiendo la activación de los reguladores de respuesta de tipo B (Davey y Anthony, 2010).

La captación de citocininas en tejidos cultivados es rápido. El metabolismo de citocininas es complejo y generalmente consiste en conversiones entre bases de citocinina, ribosidos, ribótidos, conjugación y degradación (George *et al.*, 2008)

**Vitaminas.** Las vitaminas son necesarias por las células de las plantas como intermediarios esenciales o cofactores metabólicos. Las vitaminas de uso frecuente en cultivo de tejidos son tiamina (Vit. B<sub>1</sub>), ácido nicotínico (niacina), piridoxina (Vit. B<sub>6</sub>), y *myo*-inositol (George *et al.*, 2008).

La tiamina en la forma de pirofosfato de tiamina, es un cofactor esencial en el metabolismo de los carbohidratos y está directamente involucrada en la biosíntesis de algunos aminoácidos. El ácido nicotínico y la piridoxina se ha observado participan en el desarrollo de raíces en diferentes cultivos. La molécula de *myo*- inositol tiene seis grupos hidroxilo, puede reaccionar con hasta seis moléculas de ácido formando diversos ésteres. Parece que el inositol fosfato actúan como segundo mensajero, en la síntesis de polioles y componentes de pared celular, para la acción de la auxina en las plantas. Otra vitamina utilizada es la Vitamina C. (ácido L-ascórbico) se utiliza durante el aislamiento del explante y para prevenir la oxidación. Además, esta implicados en la división y elongación celular (George *et al.*, 2008).

Reguladores de pH. Los tampones convencionales no son metabolizados por la planta, y uno de ellos es el MES (Ácido 2- (-N-morfolino) etanosulfónico) es un buffer comercialmente disponible con capacidad de amortiguador en el rango de pH 5-6 a los que se ajustan los medios de cultivo de las plantas. No es tóxico para la mayoría de las plantas, aunque hay algunas que son sensibles.

### 2.3 Mejoramiento clásico y Revolución Verde

El termino revolución verde fue utilizado para indicar un nuevo sistema surgido para mejorar la producción agrícola en gran parte del mundo entre los años cuarenta y los setenta del siglo pasado (Mendoza, 2014). México ha sido escenario principal de los dos acontecimientos agrícolas modernos más importantes las llamadas revoluciones verdes: en la década de los sesenta comenzó una nueva manera de producir cultivos como el maíz y trigo. Con la aplicación del mejoramiento genético y el apoyo de justas cantidades de fertilizantes y plaguicidas la producción agrícola tuvo un incremento. La segunda fue en 1994, por primera vez se plantaron a nivel comercial tomates genéticamente modificados (Blanco, 2012).

La base genética disponible para la mejora tradicional de las plantas cultivadas está constituida por mutaciones aparecidas espontáneamente, recombinación genética y poliploidia. En general, los métodos convencionales dependen del carácter alógamo o autógeno del cultivo, para las plantas autóginas como el trigo, la fijación de caracteres deseables puede conseguirse mediante diferentes tipos de cruzamientos o bien por autofecundación. Además, existen métodos rápidos como el SSD (single seed descendent) o la haplo- diploidización (Benítez, 2005).

En las últimas décadas se han desarrollado técnicas biotecnológicas que han incrementado la efectividad de la selección y el rendimiento de los programas de mejora convencional, entre los más importantes se encuentra el uso de marcadores moleculares, cultivo de anteras y polen, selección *in vitro*, cultivo de tejidos y obtención de plantas libres de virus. Sin embargo, la mejora biotecnológica mediante el uso de la ingeniería genética pretende la modificación de la expresión de genes naturalmente presentes en el organismo, introducir genes de interés en genotipos mejorados evitando problemas de retrocruzamiento, introducir genes nuevos a partir de especies vegetales con las que no es posible obtener híbridos y conseguir la producción de compuestos de interés independientemente de cual sea su origen (Benítez, 2005).

#### 2.4 Biotecnología del trigo

Hasta 2015 millones de agricultores, en 28 países plantaron 179.7 millones de hectáreas, así la superficie mundial de cultivos biotecnológicos se ha multiplicado por 100, desde 1996. Los últimos datos de 1996 a 2014 mostraron que los cultivos biotecnológicos contribuyeron a la seguridad alimentaria, la sostenibilidad y el cambio climático al aumentar la producción de cultivos por

valor \$ 150.000 millones de dólares y en el período 1996-2014 se ahorró 152 millones de hectáreas de tierra (Clive, 2015).

El primer trigo tolerante a herbicidas producido por ingeniería genética fue desarrollado por Monsanto, el evento MON 71800, comercialmente conocido como trigo Roundup Ready <sup>TM</sup>, este trigo es tolerante a glifosato. El gen introducido codifica para la producción de la enzima 5-enolpiruvilshikimato -3-fosfato sintasa (EPSPS) responsable de la síntesis de aminoácidos aromáticos y otros compuestos aromáticos que son vitales para crecimiento y supervivencia; esta variedad no ha sido comercializada hasta la fecha (ISAAA, 2010).

En la biotecnología del trigo se ha realizado investigaciones relacionadas con resistencia a plagas, tolerancia a salinidad y sequía. Se sabe que el trigo se ve afectado por una serie de enfermedades fúngicas, y Syngenta ha estado trabajando en el trigo modificado genéticamente resistente a *Fusarium*. Syngenta también se asoció con el Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo (CIMMYT) para desarrollar variedades de trigo resistentes al óxido del tallo mediante el mejoramiento asistido por marcadores moleculares. Además, en 2009, en Gran Bretaña se revelaron por separado dos genes de resistencia a la roya del trigo. El gen Lr34 podría ser responsable en la lucha contra la enfermedad, y el gen Yr36, confiere resistencia a la roya de la raya (*Puccinia striiformis*). Asimismo, los investigadores de la organización de investigación científica e industrial (CSIRO, por sus siglas en inglés) ya han aislado dos genes de trigo tolerantes a la sal (Nax1 y Nax2), que provienen del antiguo trigo *Triticum monococcum*. Ambos genes inhiben el sodio, que puede ser tóxico para las plantas, al limitar su paso de las raíces a los brotes. Basado en los ensayos de campo realizados en Australia en 2009, las líneas con el gen Nax2 produjeron un 25 % más de rendimiento que aquellas sin el gen en condiciones salinas. En 2007, se probaron 30 líneas transgénicas de trigo en Australia, cada línea de trigo contenía seis genes diferentes de

tolerancia a la sequía, estos genes codifican a proteínas que regulan las vías bioquímicas para promover el crecimiento normal bajo cantidades reducidas de agua. Del mismo modo, CIMMyT utilizó un gen (DREB1A) de *Arabidopsis thaliana* para mejorar las características del trigo hacia la tolerancia a la sequía, baja temperatura y salinidad (ISAAA, 2010).

La aceptación de trigo biotecnológico ha cambiado a lo largo de los años desde que las empresas de cultivo postergaron sus planes de comercializar el trigo transgénico en 2003 y 2004 debido a la amplia oposición. Una encuesta de 2009 realizada por la Asociación Nacional de Productores de Trigo (NAWG) mostró que el 76 % de los encuestados está a favor de la petición de apoyo a la comercialización de la biotecnología en trigo. Nueve asociaciones relacionadas con el trigo de los principales productores de trigo de Australia, Canadá y Estados Unidos publicaron una Declaración trilateral del trigo transgénico, anunciando la necesidad de más inversiones en trigo (ISAAA, 2010)

## 2.5 Transformación genética

Una planta transgénica es aquella en cuyo material genético se ha incorporado uno o más genes foráneos (Blanco, 2012). Donde se fundamenta en cortar y unir piezas de ADN mediante el uso de ingeniería genética. Se han desarrollado métodos de transformación genética de trigo mediante dos mecanismos: el método basado en transferencia directa de ADN conocida como biobalística y el que utiliza un vector biológico conocido como *Agrobacterium Tumefaciens* (Beltrán *et al.*, 2003).

### 2.5.1 Biobalística

Una técnica que permite introducir genes exógenos a tejidos vegetales. En este procedimiento el ADN es introducido en células intactas en cultivo, por medio de partículas microscópicas aceleradas a alta velocidad que atraviesan la pared y la membrana celular sin causar por lo general efectos letales. Los

microprojectiles están hechos de tungsteno u oro y se cubren de ADN (Fernández, 1994).

El uso de la biolística fue muy significativo en la modificación genética de cereales, porque se creía que los cereales eran altamente recalcitrantes a la infección por *Agrobacterium* y que la inserción del ADN transferido (ADN-T) no ocurría.

La biolística fue útil en el estudio de expresión transitoria y una herramienta para el establecimiento de protocolos de transformación en cereales. El uso de los cultivos embriogénicos dio como resultado la producción de plantas transgénicas fértiles en trigo por varios grupos a principios de los años noventa (Jones y Shewry, 2009)

### 2.5.2 Agroinfección

Método biológico para transformar genéticamente a plantas, el cual es basado en el empleo de *Agrobacterium tumefaciens* ya que esta bacteria es un patógeno vegetal que da lugar a un proceso tumoral en la corona de diversas especies vegetales. La proliferación celular se induce gracias a la presencia de un plásmido, denominado Ti (inductor de tumores) en el citoplasma de la bacteria (Benítez, 2005). El plásmido Ti contiene dos regiones involucradas en la formación de tumores: i) región ADN-T, segmento de 23 kb que comprende entre 8 y 13 genes y se encuentra flanqueado por bordes repetidos de 25pb, ii) región de virulencia (*vir*) que abarca cerca de 35pb y es responsable del procesamiento y transferencia del ADN-T. La primera incluye dos conjuntos de genes: unos que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de citocininas y auxinas, hormonas cuya acumulación causa la proliferación de células indiferenciadas. La región de virulencia, por otra parte, codifica para funciones implicadas en la excisión y transferencia del ADN-T (Fernández, 1994).

El mecanismo general de transferencia del ADN-T y genes de virulencia a la planta, consta de 8 pasos en un proceso estable de transformación (seis de ellos ocurren para transformación transitoria). Inicia con la unión de *Agrobacterium* a la superficie celular de la planta donde por lo general se forma un biopelícula. Segundo, el ADN-T y proteínas efectoras Vir son transportadas de la bacteria a través de la membrana plasmática de la planta. Tercera y cuarta, VirD2/ hebras-T transitan a través del citoplasma de la planta y se dirigen al núcleo. Quinto y sexto, una vez dentro del núcleo, el DNA-T tiene como objetivo la cromatina de la planta (no se requiere para transformación transitoria), y las proteínas asociadas deben ser despojadas de la hebra-T. Séptimo, las hebras- T son integradas en el genoma del hospedero (este paso no es requerido durante la transformación transitoria), y octava, Se produce la expresión de transgenes codificados por ADN-T (Gelvin, 2010) (Anexo 1).

El primer ejemplo exitoso de la expresión de un transgen en células vegetales usando esta tecnología fue reportado en 1983 y al año siguiente se obtuvo la primera planta transgénica de tabaco (Muñoz *et al.*, 2004). En 1995, hubo buenas pruebas de la transformación estable por agroinfección en arroz y maíz, tras mejoras adicionales a factores de transformación se produjo en 1997 una exitosa transformación por agroinfección del trigo (Jones y Shewry, 2009).

## 2.6 Transgénesis en trigo: características de interés

La transgénesis es el proceso de incorporar genes en un organismo, es decir, proceso para generar plantas transgénicas (Mendoza, 2014). Diversos factores afectan la transformación por agroinfección, tales como: la cepa de *Agrobacterium*, tipo de vector, uso de inductores como acetosiringona, densidad del cultivo y tiempo de co-cultivo (Jones y Shewry, 2009).

Cepa *Agrobacterium*. El primero reporte de una transformación estable en trigo fue usando la cepa de *A. tumefaciens* C58 (ABI) (Cheng *et al.*, 1997) y en la actualidad se han realizado reportes de transformaciones exitosas en trigo con cepas de *A. tumefaciens* EHA105, LBA4401 (Li *et al.*, 2012) y GV3101 (Xue *et al.*, 2004).

Vector binario. Los plásmidos (vectores) son moléculas de DNA con doble hebra en forma circular, y son elementos genéticos extracromosomales, que pueden ser introducidos en *Agrobacterium tumefaciens* (Luque y Herráez, 2008). En nuestros días lo más usado es el vector binario el cual se basa en la interacción de dos plásmidos compatibles: uno que transporta los genes Vir y otro que transporta el ADN-T y las secuencias que le confieren la capacidad de replicación en bacterias del genero *Escherichia* y *Agrobacterium*. (Roca y Mroginski, 1991).

Inoculación y co-cultivo. La inoculación es el proceso que consiste en la inmersión de explantes en un cultivo líquido de *Agrobacterium tumefaciens* (Patnaik *et al.*, 2006; Ding *et al.* 2009; Sarker y Biswas, 2002), con absorbancia óptica entre 0.5-2.0 y tiempo de exposición es 15 a 60min. Al transcurrir este tiempo, los explantes son colocados en medio de co-cultivo por un periodo 2-4 días. Además, se agrega un compuesto fenólico de bajo peso molecular presente en los exudados vegetales (Fernández, 1994) conocido como acetosiringona, esta puede estimular a la bacteria para transferir T-DNA más eficientemente al huésped celular. La acetosiringona puede resultar útil para mejorar las tasas de transformación en especies vegetales al promover la activación de los genes *vir* del plásmido (Sheikholeslam y Weeks, 1987) (Anexo 2).

Posteriormente al co-cultivo es necesario eliminar a *Agrobacterium* para permitir el desarrollo del callo y comunmente se usan los antibióticos  $\beta$ -

lactámicos los cuales inhiben la síntesis de la pared celular específicamente y inhibiendo el crecimiento bacteriano, muestran poco efecto perjudicial sobre las células vegetales (Ogawa y Mii, 2007). Y de acuerdo con Yarizade *et al.*, (2012) el Meropenem (ácido carboxílico - (4R, 5S, 6S) - 3 - [(3S, 5S) - 5- (dimetilcarbamoil) pirrolidin - 3 - il] sulfanil - 6 - [(1R) 1 - hidroxietil] - 4 - metil - 7 - oxo - - azabicyclo [3.2.0] hept - 2 - eno - 2) e imipenem (ácido carboxílico - (5R, 6S) -3- [2- (aminometilidenamino) etilsulfanil] - 6 - [(1R) - 1 - hidroxietil] - 7 - oxo - 1 - azabicyclo [3.2.0] hept - 2 - eno - 2 ) podría ser utilizado eficazmente como un antibiótico alternativo en proyectos de transformación genética en trigo debido a que la concentración mínima inhibitoria es de menos de 50 mg L<sup>-1</sup> y concentración bactericida mínima es menos de 250 mg L<sup>-1</sup> contra cepas de *Agrobacterium*.

Los genes reporteros y de selección son usualmente utilizados en la transformación de cereales porque codifican a proteínas que permiten la identificación de eventos no transformados y así se permite que las células genéticamente transformadas crezcan preferentemente. Por lo general, el sistema de selección comprende dos componentes: un agente químico, como un herbicida, un antibiótico o una fuente de carbono específica que se añade al medio de cultivo de tejidos; y un gen incorporado. En la transformación genética son utilizados comúnmente genes como; el gen bar, gen nptII y gen GUS, el primero codifica para una acetil transferasa que confiere resistencia a herbicidas basados en glufosinato de amonio, el segundo codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia al antibiótico kanamicina (Jones y Shewry, 2009) y el tercero codifica para una enzima  $\beta$ -glucuronidasa que por medio de una reacción histoquímica (Figura 1), utilizando el sustrato X- Gluc se puede identificar una coloración azul en el explante (Wakui *et al.*,2003).

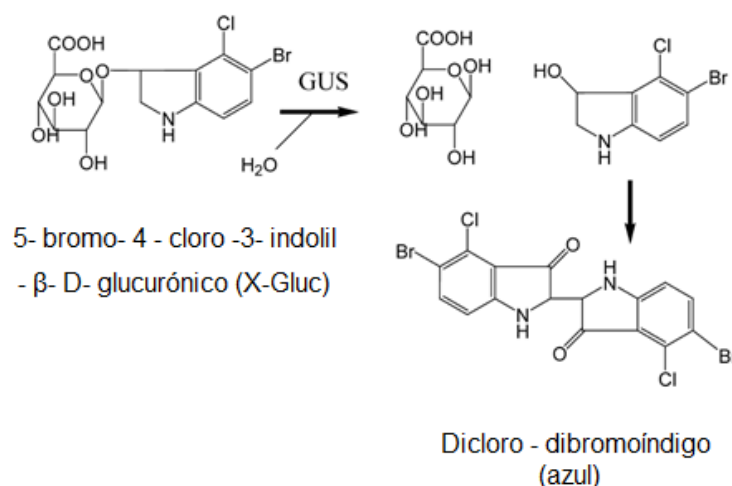


Figura 2 Reacción de gen GUS y X- Gluc, Imagen tomada de Wakui et al. (2003)

La selección para el caso de la fosfinitricina se realiza con una dosis de 1-4 mg L<sup>-1</sup> durante 3-6 semanas, el mecanismo de acción de la fosfonitricina y el efecto del gen de selección se muestran en la figura 3, y kanamicina en dosis de 50-100 mg L<sup>-1</sup>, la selección continua hasta el tiempo de regeneración (anexo 3).

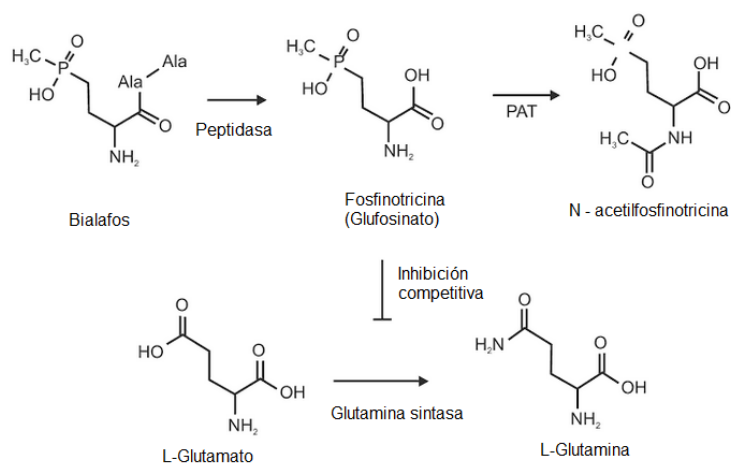


Figura 3 Formación, modo de acción y detoxificación de fosfinitricina. La conversión de bialafos a fosfinitricina, involucra la remoción de dos residuos de anilina por una peptidasa. Los compuestos actúan como un inhibidor competitivo de glutamina sintasa porque la estructura es similar entre la fosfinitricina y el L- glutamato. También, es mostrada la detoxificación reacción catalizada por la fosfinitricina acetiltransferasa (PAT). Imagen tomada de Rashid, (2009).

## 2.7 Estrés abiótico (sequía y salinidad)

El objetivo de establecer condiciones de regeneración y transformación del trigo es porque en última instancia se pretende generar plantas transformadas con genes que confieren tolerancia a estrés abiótico, en particular sequía y salinidad mediante la transformación con el gen AVP1 que codifica la pirofosfatasa vacuolar. Esto es debido a que la salinidad del suelo es uno de los principales factores que afectan la productividad agrícola. Porque la mayoría de las especies de cultivos son glicófitas (sensibles a salinidad) entre ellas el trigo (Zhe-Yong *et al.*, 2004). El estrés salino expone a la planta al estrés osmótico, lo que implica que todas las respuestas fisiológicas, que son involucradas por el estrés por sequía, también pueden ser observadas en el estrés salino (Miller *et al.*, 2002).

El daño a las plantas debido a la alta salinidad incluye: reducción de la expansión foliar, cierre estomático, reducción de fotosíntesis y pérdida de biomasa debido al déficit hídrico causada por el desequilibrio osmótico (James *et al.*, 2011). La tolerancia a sal es un rasgo complejo que es controlado por múltiples genes e involucra diversos procesos bioquímicos y mecanismos fisiológicos (Zhang y Shi, 2013). Algunas plantas glicófitas han logrado la tolerancia a la salinidad del suelo ya sea expulsando  $\text{Na}^+$  de las células o secuestrándolo en la vacuola (Zhe-Yong *et al.*, 2004).

### 2.7.1 Gen AVP1

Las proteínas de membrana que realizan el transporte activo primario se les llama bombas (Taiz y Zeiger, 2006). Las plantas tienen 3 distintas bombas de  $\text{H}^+$  capaces de generar gradientes de pH (fig. 2): El tipo P,  $\text{H}^+$ -adenosin trifosfatasa (P-ATPasa), la vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPasa (V-ATPasa) y la  $\text{H}^+$ -pirofosfatasa ( $\text{H}^+$ -PPasa) (Li *et al.*, 2005), esta última utilizada para generar plantas tolerantes a sal y sequía al sobre-expresar el gen codificante.

La P-ATPasa, se encuentra en la membrana plasmática y vacuolar. Las ATPasas hidrolizan ATP y usan la energía libre negativa para bombear protones de un lado de la membrana a otro contra un gradiente electroquímico para el transporte activo de solutos (cationes, aniones, aminoácidos y azúcares), regulación del pH citoplasmático, apertura estomática y la elongación celular mediada por hormonas. La V ATPasa transporta dos protones por cada molécula de ATP que se hidroliza. La función de la ATPasa vacuolar es bombear protones desde el citosol al interior de la vacuola (Hopkins y Hüner, 2009).

Las H<sup>+</sup>-PPasas obtienen su energía del hidrolisis de pirofosfato inorgánico (Taiz & Zeiger, 2006). Existen dos tipos: tipo I se aisló por primera vez de vacuolas y se considera como marcador vacuolar y el tipo II su localización y función es en el aparato de Golgi (Segami *et al.*, 2010). La H<sup>+</sup> pirofosfata tipo I (AVP1), en un inicio se sobre expresó en cepas de levadura con canales de cloro (Gef1) e intercambiadores de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Nhx1) y fueron tolerantes a salinidad (Gaxiola *et al.*, 1999).

La sobre expresión del mismo gen en la planta modelo *Arabidopsis* ha dado como resultado tolerancia a sequía y salinidad porque la acumulación de sodio es debido a la actividad del antiporte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> vacuolar, AtNHX1 (Gaxiola *et al.*, 2001). Asimismo, se le atribuye la regulación del pH apoplásico, el transporte y regulación de los procesos de desarrollo relacionados con auxinas (Li *et al.*, 2005). En base a este conocimiento se ha expresado AVPI en especies como: Tomate (Park *et al.*, 2005), arroz (Yang *et al.*, 2007), alfalfa (Bao *et al.*, 2009) y algodón (Zhang *et al.*, 2011), y cebada (Schilling *et al.*, 2013).

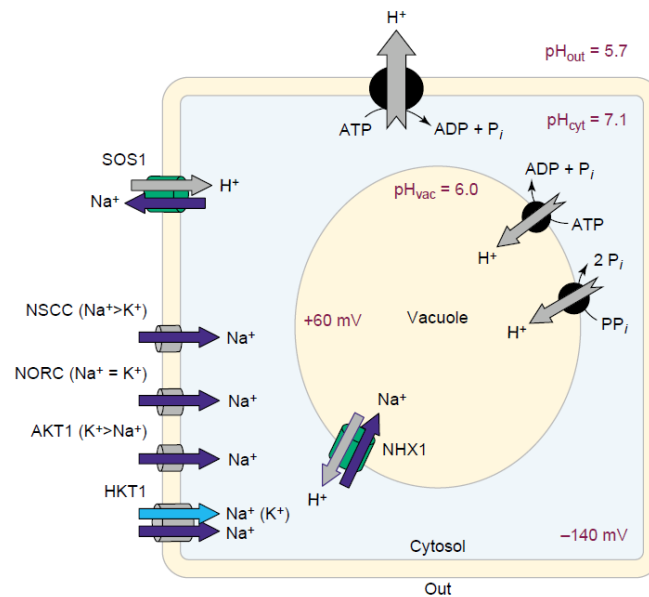


Figura 4 Representación esquemática del transporte de  $\text{Na}^+$  en células vegetales, tomada de Yamaguchi & Blumwald (2005). El transporte electrogénico de  $\text{H}^+$  ( $\text{H}^+$ -ATPasa en la membrana plasmática y membrana vacuolar,  $\text{H}^+$ -PPasa en la membrana vacuolar) genera gradientes de pH y diferencia de potencial eléctrico a través de las membranas celular y vacuolar. Los iones  $\text{Na}^+$  entran en la célula a través de diferentes canales (AKT1, NORC, NSCC) o portadores (HKT1) y pueden ser translocados fuera de la célula o dentro de la vacuola por la acción de un antiportador  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  de membrana plasmática (SOS1) o antiporter de  $\text{Na}^+$  vacuolar /  $\text{H}^+$  (NHX1).

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Material biológico

Se utilizaron dos variedades de trigo: Kronstad F2004 y Rebeca F2000, material biológico proporcionado por el Dr. Eduardo Villaseñor Mir del Campo Experimental del Valle de México del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

#### 3.2 Explante

Se utilizó como explante embriones maduros (Figura 5) de las variedades Kronstad F2004 y Rebeca F2000 estos embriones fueron separados del

endospermo en condiciones asépticas y colocados con el escutelo hacia abajo, ligeramente incrustado en el medio de cultivo.

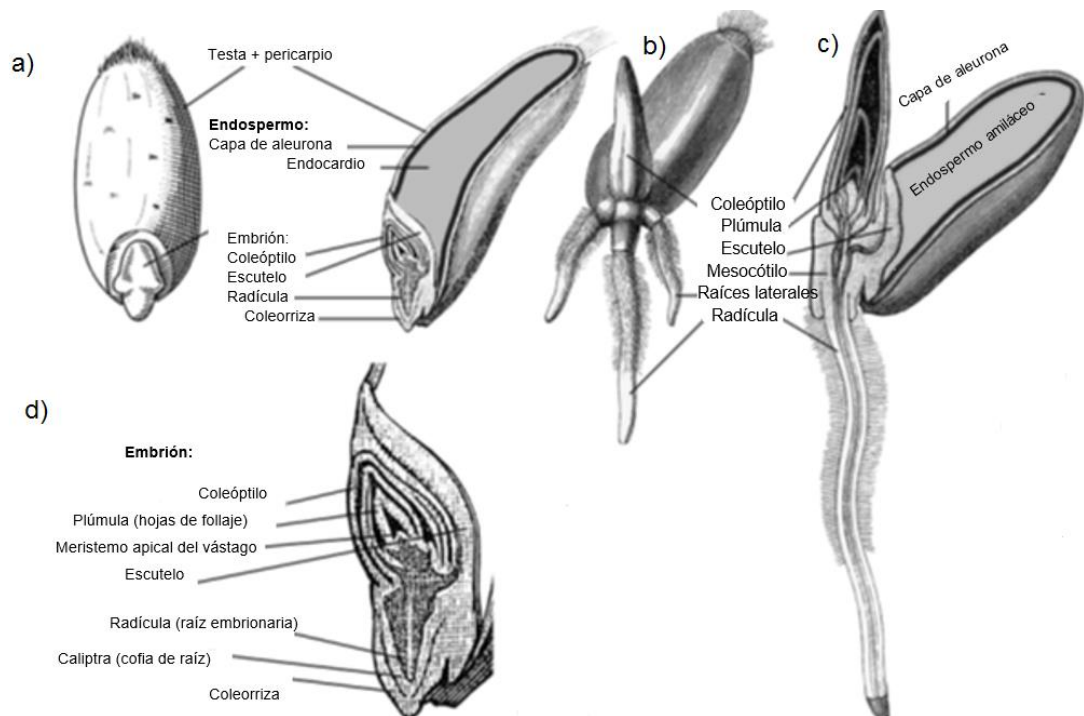


Figura 5 Estructuras de la semilla de trigo y su germinación (*Triticum aestivum* L.), a) estructuras de la semilla de trigos b) germinación del embrión c) estructuras utilizadas en cultivo *in vitro*: epicotilo (plúmula), y mesocótilo d) desarrollo de las estructuras del embrión. Imagen tomada de la página <http://www.seedbiology.de/>

### 3.3 Medios de cultivo

Se utilizaron dos medios de cultivo para mejorar el desarrollo de las variedades Kronstad F2004 y Rebeca F2000 en el cultivo *in vitro*, el primero, medio basal MS (MSMS), y el segundo que contenía las sales del medio MS y vitaminas Gamborg (MSG), en todos los medios empleados (ver tabla 3) y en el caso del primer medio de regeneración se probaron 5 tratamientos, el primero y segundo, según a Valenzuela *et al.* (2012) y Palmar *et al.* (2012), para la inducción de raíz el segundo medio de regeneración fue suplementado con 4 auxinas diferentes (Cuadro 4.)

Cuadro 3 Composición de medios utilizados

| Medio                              | Componentes                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Murashige & Skoog (MS)             | Macronutrientes: Nitrato de amonio 1650 mg L <sup>-1</sup> Cloruro de calcio 440 mg L <sup>-1</sup> , Sulfato de magnesio 370 mg L <sup>-1</sup> , Fosfato de potasio 170 mg L <sup>-1</sup> , Nitrato de potasio 1900 mg L <sup>-1</sup><br>Micronutrientes: Ácido bórico 6.2 mg L <sup>-1</sup> cloruro de cobalto 0.025 mg L <sup>-1</sup> Sulfato cúprico 0.025 mg L <sup>-1</sup> Sulfato ferroso 27.8 mg L <sup>-1</sup> Sulfato de manganeso 22.3 mg L <sup>-1</sup> Yoduro de potasio 0.83 mg L <sup>-1</sup> Molibdato de sodio 0.25 mg L <sup>-1</sup> Sulfato de zinc 8.6 mg L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O 37.2 mg L <sup>-1</sup> |
| Medio de formación de callo (CM4C) | 4.4 g L <sup>-1</sup> Sales MS (Phytotechnology LaboratoriesTM., Cat. No. M519), o 4.33 g L <sup>-1</sup> Sales MS (Phytotechnology LaboratoriesTM., Cat. No. M524 más G219) más 1 mL stock vitaminas Gamborg en el segundo medio, 40 g L <sup>-1</sup> Maltosa, 10 g L <sup>-1</sup> glucosa, 1.95 g L <sup>-1</sup> MES, 0.75 g L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub> , 0.5 mg L <sup>-1</sup> 2-4D, 2.4 mg L <sup>-1</sup> picloram, 750 µl L <sup>-1</sup> PPM (Plant Cell Tech., Cat. No. PPM-100), 100 mg L <sup>-1</sup> Ácido ascórbico, 150 mg L <sup>-1</sup> Ácido cítrico, 7 g L <sup>-1</sup> Agar, 5.8 pH                                                      |
| Primer medio de regeneración(PMR)  | 4.4 g L <sup>-1</sup> Sales MS (Phytotechnology LaboratoriesTM., Cat. No. M519) ), 4.33 g L <sup>-1</sup> Sales MS (Phytotechnology LaboratoriesTM., Cat. No. M524 más G219) más 1 mL stock vitaminas Gamborg en el segundo medio, 40 g L <sup>-1</sup> Maltosa, 100 mg L <sup>-1</sup> Hidrolizado de caseína, 1.95 g L <sup>-1</sup> MES, 0.2 mg L <sup>-1</sup> 2-4D, 750 µl L <sup>-1</sup> PPM (Plant Cell Tech., Cat. No. PPM-100), 100 mg L <sup>-1</sup> Ácido ascórbico, 150 mg L <sup>-1</sup> Ácido cítrico, 7 g L <sup>-1</sup> Agar, 5.8 pH                                                                                                                 |
| Segundo medio de regeneración(SMR) | 3.0 g L <sup>-1</sup> , Sales MS (Phytotechnology LaboratoriesTM., Cat. No. M519), 2.95 g L <sup>-1</sup> Sales MS (Phytotechnology LaboratoriesTM., Cat. No. M524 más G219) más 1 mL stock vitaminas Gamborg en el segundo medio, 40 g L <sup>-1</sup> Maltosa, 100 mg L <sup>-1</sup> Hidrolizado de caseína, 1.95 g L <sup>-1</sup> MES, 750 µl L <sup>-1</sup> PPM (Plant Cell Tech., Cat. No. PPM-100), 100 mg L <sup>-1</sup> Ácido ascórbico, 150 mg L <sup>-1</sup> Ácido cítrico, 7 g L <sup>-1</sup> Agar, 5.6 pH                                                                                                                                              |

Los medios CM4C, MMSOC-2 y MMSOC fueron tomados y modificados de Valenzuela et al., (2012). El medio MS es procedente de Murashige y Skoog, (1962). En el medio de formación de callo y regeneración las sales MS son al 100% y en el segundo medio de regeneración las sales MS son al 68%. El stock de vitaminas Gamborg se elaboró a 1000x

### 3.4 Embriogénesis somática de trigo

Se realizó mediante el cultivo de embriones de semilla madura de trigo, las semillas se lavaron con etanol al 70% en agitación suave durante 10 min, a continuación, un lavado de 30 min con una solución de 30% (v/v) de hipoclorito comercial (cloralex ®) y 0.05% SDS (dodecil sulfato de sodio), después un segundo lavado con 70% hipoclorito de sodio y 0.05% SDS. Posteriormente

las semillas se enjuagaron 3 veces por 15 min con agua bidestilada estéril para finalmente dejarlas reposar en agua bidestilada estéril por 12 horas lo cual permitió suavizar el endospermo y facilitar la extracción de los embriones maduros. Los embriones maduros se extrajeron de las semillas en condiciones asépticas utilizando una hoja de bisturí y eliminando el endospermo, y fueron colocados en cajas petri de 90 x 15 mm con medio CM4C (Cuadro 3), 25 embriones en cada caja, con el escutelo hacia abajo (Valenzuela *et al.*, 2012)

Las cajas permanecieron durante 2 semanas a 26 °C en oscuridad, transcurrido este tiempo en condiciones de asepsia se eliminaron estructuras no regenerantes. Es decir, estructuras de tipo: suaves acuosas (Redway *et al.*, 1990), friables, las formada con células altamente vacuoladas (Delporte *et al.*, 2001), además de los extremos; plumular y radicular que suelen ser de rápido desarrollo (Palmar *et al.*, 2012), y solo dejando el callo nodular con organización visible, formadas del epicótilo y mesocótilo del embrión (figura 5), todo esto con la ayuda de un bisturí y subcultivar en medio CM4C por 3 semanas. A la segunda semana de iniciar el cultivo se evaluó el porcentaje de formación de estructuras no embriogénicas por cada tratamiento, y se inició el peso de los callos para realizar la cinética de crecimiento.

Para la diferenciación de callo en brotes, los callos cinco semanas de edad se transfirieron a los tratamientos correspondientes al primer medio de regeneración (Cuadro 4) por un periodo de dos semanas, bajo fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h oscuridad. Posteriormente, los callos se subcultivaron al segundo medio de regeneración (MMSOC- RA0) por 3 semanas (Cuadro 4).

Cuadro 4 Concentración de fitohormonas de los medios empleados

| Medio de cultivo            | Composición                                                               |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Medio de formación de callo |                                                                           |
| CM4C                        | MSMS o MSG+ 0.5 mg L <sup>-1</sup> 2-4D + 2.4 mg L <sup>-1</sup> picloram |

---

Primer medio de regeneración

|           |                                                                            |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------|
| MMSOC-2   | MSMS o MSG + 0.2 mg L <sup>-1</sup> 2-4D + 2.4 mg L <sup>-1</sup> picloram |
| MMSOC-2-1 | MSMS o MSG + 0.1 mg L <sup>-1</sup> 2-4D + 1.0 mg L <sup>-1</sup> TDZ      |
| MMSOC-2-2 | MSMS o MSG + 0.2 mg L <sup>-1</sup> 2-4D + 0.1 mg L <sup>-1</sup> TDZ      |
| MMSOC-2-3 | MSMS o MSG + 0.2 mg L <sup>-1</sup> 2-4D + 1.0 mg L <sup>-1</sup> TDZ      |
| MMSOC-2-4 | MSMS o MSG + 0.2 mg L <sup>-1</sup> 2-4D + 2.0 mg L <sup>-1</sup> TDZ      |

Segundo medio de regeneración

|            |                             |
|------------|-----------------------------|
| MMSOC- RA0 | MSMS o MSG sin fitohormonas |
|------------|-----------------------------|

Tratamientos para enraizamiento

|              |                                     |
|--------------|-------------------------------------|
| MMSOC- RA1.1 | MSMS con 0.3 mg L <sup>-1</sup> ANA |
| MMSOC- RA1.2 | MSMS con 1.0 mg L <sup>-1</sup> ANA |
| MMSOC- RA1.3 | MSMS con 1.5 mg L <sup>-1</sup> ANA |
| MMSOC- RA2.1 | MSMS con 0.3 mg L <sup>-1</sup> AIB |
| MMSOC- RA2.2 | MSMS con 1.0 mg L <sup>-1</sup> AIB |
| MMSOC- RA2.3 | MSMS con 1.5 mg L <sup>-1</sup> AIB |
| MMSOC- RA3.1 | MSMS con 0.3 mg L <sup>-1</sup> AIA |
| MMSOC- RA3.2 | MSMS con 1.0 mg L <sup>-1</sup> AIA |
| MMSOC- RA3.3 | MSMS con 1.5 mg L <sup>-1</sup> AIA |
| MMSOC- RA4.1 | MSMS con 0.3 mg L <sup>-1</sup> 2IP |
| MMSOC- RA4.2 | MSMS con 1.0 mg L <sup>-1</sup> 2IP |
| MMSOC- RA4.3 | MSMS con 1.5 mg L <sup>-1</sup> 2IP |

MSMS= Medio MS suplementado con vitaminas MS, MSG= Medio MS suplementado con vitaminas Gamborg, 2,4D= Ácido 2,4-diclorofenoxiacético, TDZ= Tidiazuron, ANA= Ácido Naftalenacético, AIB= Ácido indolbutírico, AIA= Ácido Indolacético, 2IP= Ácido 6-γ-γ-dimethylallylaminopurina. Todas las hormonas empleadas son de la marca: Sigma – Aldrich.

Finalmente, las plántulas fueron colocadas en macetas con una mezcla estéril con diferentes sustratos; peatmoss con: agrolita, vermiculita y tezontle en relación 1:1, 1:2, 1:3 (Cuadro 5) cubiertas con bolsas de plástico por tres semanas y regadas con una solución que contenía 0.05 % del fertilizante 17:17:17 cada 3 días.

Cuadro 5 Sustratos utilizados para el trasplante de las plantas de trigo regeneradas

| Tratamiento | Composición               |
|-------------|---------------------------|
| T0R         | Peatmoss únicamente       |
| TC1         | 1:1(Peatmoss: agrolita)   |
| TC2         | 1:2(Peatmoss: agrolita)   |
| TC3         | 1:3(Peatmoss: agrolita)   |
| TE1         | 1:1(Peatmoss:vermiculita) |
| TE2         | 1:2(Peatmoss:vermiculita) |

|     |                           |
|-----|---------------------------|
| TE3 | 1:3(Peatmoss:vermiculita) |
| TS1 | 1:1(Peatmoss:tezontle)    |
| TS2 | 1:2(Peatmoss:tezontle)    |
| TS3 | 1:3(Peatmoss:tezontle)    |

---

### 3.5 Descripción de variables

Se calculó la tasa de regeneración “TR” como (número de callos que formaron brotes/ número total de callos) X (100). Además, se obtuvo el número promedio de brotes “NPB” dividiendo (número de brotes) / (número de callos con brotes) y la capacidad de formación de brotes “CFB” multiplicando (TR) X (NPB / 100) (Valenzuela *et al.*, 2012).

Para la cinética de desarrollo, se realizó la toma del peso fresco de los callos cada cuatro semanas, así se obtuvo la biomasa promedio, sumando: el peso ganado del punto de inicio al último, dividido entre el número total de callos, en los medios de cultivo empleados.

Para inducir la formación de raíz, los brotes fueron subcultivados en los tratamientos para enraizamiento por una semana y se calculó tasa de formación de raíces TFR (número de raíces que se formaron planta/ número total de plantas) X (100). y número promedio de raíces NPR dividiendo (número de raíces) / (número de plantas con raíces) y capacidad de formación raíces CFR multiplicar TFR X (NPR / 100).

Adaptación *ex vitro*, el porcentaje de supervivencia fue evaluado a las plantas que fueron sometidas a adaptación *ex vitro* en diferentes sustratos, bajo la siguiente ecuación: (número de plantas sobrevivientes / número de plantas introducidas al tratamiento) x 100.

### 3.6 Transformación por agroinfección

#### 3.6.1 Establecimiento de condiciones para la agroinfección

La transformación se realizó mediada por *Agrobacterium tumefaciens* probando 3 cepas: LBA4404, EHA105 y GV3101, utilizando callos embriogénicos de cinco semanas de edad como explantes, para observar la expresión transitoria y estable del gen GUS mediante el vector binario pGUSint con el gen de selección a kanamicina (NPTII) y gen quimérico CaMV35S::gusint. También, con el vector binario: pTF101.1 con el gen de selección BAR y gene quimérico 35S::AVP1::nos de la pirofosfatasa vacuolar de *Arabidopsis* para la expresión del gen AVP1. Ambos experimentos a una absorbancia del cultivo bacteriano de  $A_{600nm} = 1.0$ , con un tiempo de exposición a la cepa bacteriana de 1 hora en medio de agroinfección CM4C (sin agar, ni PPM, suplementado con 200  $\mu$ M de acetosiringona y sin acetosiringona) posteriormente fueron pasados a papel secante durante 5 min y después sembrados en medio de co-cultivo (CM4C sin PPM suplementado con 200  $\mu$ M de acetosiringona y sin acetosiringona) por 3-4 días, transcurrido el tiempo los callos fueron enjuagados con el antibiótico meropenem (50 mg L<sup>-1</sup>) 3 min, fueron secados y transferidos a medio CM4C con meropenem (50 mg L<sup>-1</sup>) y kanamicina (25 mg L<sup>-1</sup>), para el segundo experimento se siguió el mismo procedimiento y fueron sembrados en medio CM4C suplementado con meropenem (50 mg L<sup>-1</sup>) y fosfotricina (0.5 mg L<sup>-1</sup>).

#### 3.6.2 Selección (kanamicina, fosfotricina, sorbitol, NaCl)

Los callos embriogénicos de cinco semanas de edad, fueron sometidos a presión de selección usando kanamicina, fosfotricina, sorbitol y NaCl para poder identificar la dosis necesaria en la selección de callos transformados (Cuadro 6). Después de la selección se contabilizó el número de callos que

sobrevivieron y se obtuvo el porcentaje de supervivencia a cada uno de los tratamientos.

Cuadro 6 Tratamientos de presión de selección

| Tratamiento | Factor de selección y concentración |                                       |                  |              |
|-------------|-------------------------------------|---------------------------------------|------------------|--------------|
|             | Kanamicina<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Fosfotricina<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Sorbitol<br>(mM) | NaCl<br>(mM) |
| T0          | 0                                   | 0                                     | 0                | 0            |
| T1          | 20                                  | 1                                     | 100              | 100          |
| T2          | 40                                  | 2                                     | 200              | 200          |
| T3          | 60                                  | 3                                     | 300              | 300          |
| T4          | 80                                  | 4                                     | 400              | 400          |
| T5          | 100                                 | 5                                     | 500              | 500          |
| T6          | 120                                 | 6                                     | 600              |              |
| T7          | 140                                 | 7                                     | 700              |              |
| T8          |                                     | 8                                     | 800              |              |
| T9          |                                     | 9                                     |                  |              |
| T10         |                                     | 10                                    |                  |              |

### 3.6.3 Selección *in vitro* de transformantes

La actividad de la enzima  $\beta$ -Glucuronidasa (expresado por el gen GUS) se determinó histoquímicamente en embriones maduros de 5 semanas de edad, después de una incubación a 37 °C por 24 h, utilizando X-gluc como sustrato (Jefferson *et al.*, 1987). La expresión transitoria y estable se observó al tercer día (Cheng *et al.*, 1997; Mitic *et al.*, 2004) y después de 20 días respectivamente. Para el mismo vector una forma alternativa de selección es la resistencia a kanamicina (NPTII), donde se seleccionaron los sobrevivientes a la dosis letal la cual es en base a los resultados de los tratamientos del punto anterior.

La selección de los callos transformantes con la actividad del gen de selección BAR de resistencia a fosfonitricina, fue observado después de someter a los callos a una presión de selección progresiva en base a los resultados obtenidos en la selección del punto anterior.

### 3.7 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en bloques completamente al azar y la comparación de medias por prueba de Duncan usando el software para análisis estadístico de aplicación general desarrollado bajo la plataforma Windows: InfoStat versión 2016.

Fase de inducción de callo, se colocaron 25 embriones en cada caja Petri, dado que estos compartían una caja, una caja es una repetición, de un total de cuatro repeticiones, de donde hubo dos tratamientos, en ambas variedades.

Cada explante represento una unidad experimental. En la fase de regeneración en total se hicieron quince repeticiones en los cinco tratamientos. La fase de enraizamiento, tuvo cinco repeticiones para cada uno de los doce tratamientos y en la adaptación *ex vitro*, se utilizaron cinco repeticiones y cinco tratamientos.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Embriogénesis somática y regeneración de trigo a partir de embriones maduros

La embriogénesis somática fue obtenida mediante el empleo de embriones maduros (Deporte *et al.*, 2014; Parmar *et al.*, 2012; MacKinnon *et al.*, 1987). Las variedades Rebeca F2000 Y Kronstad F2004 fueron cultivada bajo las condiciones reportadas por Valenzuela *et al.* (2012) es decir con 0.5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D y 2.4 mg L<sup>-1</sup> picloram (figura 9 a y f). Todo esto basado en la expresión del potencial embriogénico, al inducir a las células competentes del explante a embriogénesis, mediante el suplemento de 2,4-D (Elhiti y Stasolla, 2011), porque la incorporación de esta auxina al medio de cultivo estimula la producción endógena del ácido indolacético, la cual se ha asociado con un incremento en la respuesta a embriogénesis. Además, el 2,4-D también aumentan la expresión de niveles de etileno y genes de biosíntesis de ácido

abscísico, y se consideran hormonas de estrés, para el inicio del proceso embriogénico (Elhiti y Stasolla, 2011).

El medio de cultivo también fue suplementado con diferentes vitaminas: vitaminas MS (MSMS), y vitaminas Gamborg (MSG) dio como resultado el desarrollo del callo embriogénico en las variedades Kronstad F2004 y Rebeca F2000 superior o igual al 95 %, y se observó una mayor tasa de formación de callo (TFC) en la variedad Rebeca de 95 % (MSMS) y 97 % (MSG), en comparación al 91 % reportado por Valenzuela *et al.* (2012). Con respecto a la variedad Kronstad se observó la misma tasa de 95 % para ambos medios. Al realizar la comparación entre medios y genotipos empleados, estadísticamente no se observó diferencia significativa, es decir, que se podría utilizar cualquiera de los genotipos y medios y se obtendría el mismo resultado de TFC bajo esta metodología (Cuadro 7). El efecto de las dos auxinas diferentes empleadas: 2,4-D, y picloram, sobre la inducción a callo, fue observado después de 2-3 días de cultivo, con el hinchamiento de los embriones para posteriormente la extensión del extremo plúmula o coleóptilo (fenómeno más común de proliferación rápida) (Figura 9 b y g).

Las características de los callos obtenidos en medio CM4C para las dos variedades, haciendo referencia a sus estructuras morfológicas presentaron consistencia friable con coloración cremosa translúcida y una sección organizada con estructuras embriogénicas, en todos los callos formados, al igual que lo reportado por Valenzuela *et al.* (2012) (Figura 7 b). Además, de las características morfológicas y una alta inducción a callo se espera que el genotipo presente una alta capacidad de regeneración. Sin embargo, se ha encontrado que no existe la relación entre la inducción a callo y regeneración de plantas, porque no hay correlación significativa, se atribuye a otros factores (Chowdhury *et al.*, 1991). Entre ellos se encuentran el genotipo, el medio de cultivo (Yu *et al.*, 2008), y callos no embriogénicos. Los callos no embriogénicos son identificados a partir de su morfología y color, generalmente se eliminan durante el subcultivo del callo y su distinción no

siempre es clara, las características mencionadas se ven influenciado por el cultivar y el tipo de auxina empleado, por ello este enfoque es orientado al aislamiento de tejidos con capacidad de regeneración de las estructuras no regenerantes (Parmar *et al.*, 2012). En la figura 6, se muestra la manera de eliminar las estructuras suaves acuosas, los extremos plumular y radicular, y solo dejando el callo nodular con organización visible.

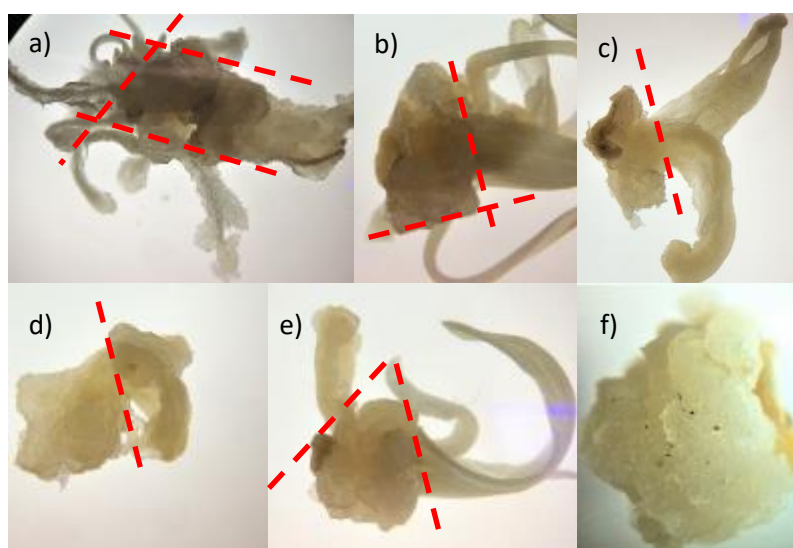


Figura 6 Eliminación de partes no regenerantes: a, b, c, d y e muestran las estructuras no regenerantes comunes en los medios de cultivo empleados y f) el callo característico obtenido que formara brotes después de tres semanas (las líneas punteadas muestran la parte a eliminar).

Las estructuras no regenerantes en los callos de las dos variedades objeto de interés, se representaron en los siguientes porcentajes promedio: variedad Rebeca F2000 80 % (MSMS), 22 % (MSG) y variedad Kronstad F2004 79 % (MSMS), 47 % (MSG) en este caso al realizar la comparación entre genotipos y medios solo se observa diferencia significativa en medios, donde el mejor medio es el MSG ya que presenta menos partes no regenerantes. Al eliminar las estructuras no regenerantes se obtuvo un callo compacto, nodular con partes verdes desarrolladas al igual como lo mostrado por Parmar *et al.*, (2012) y Souza & Beck (2013). Los callos con estructuras no regenerantes a las 2 semanas en cada medio de cultivo (Fig. 7 a, b, d y e) y el desarrollo

después de eliminar estas estructuras trascurridas 3 semanas (Figura 7 c y f) para Rebeca F2000 y Kronstad F2004.

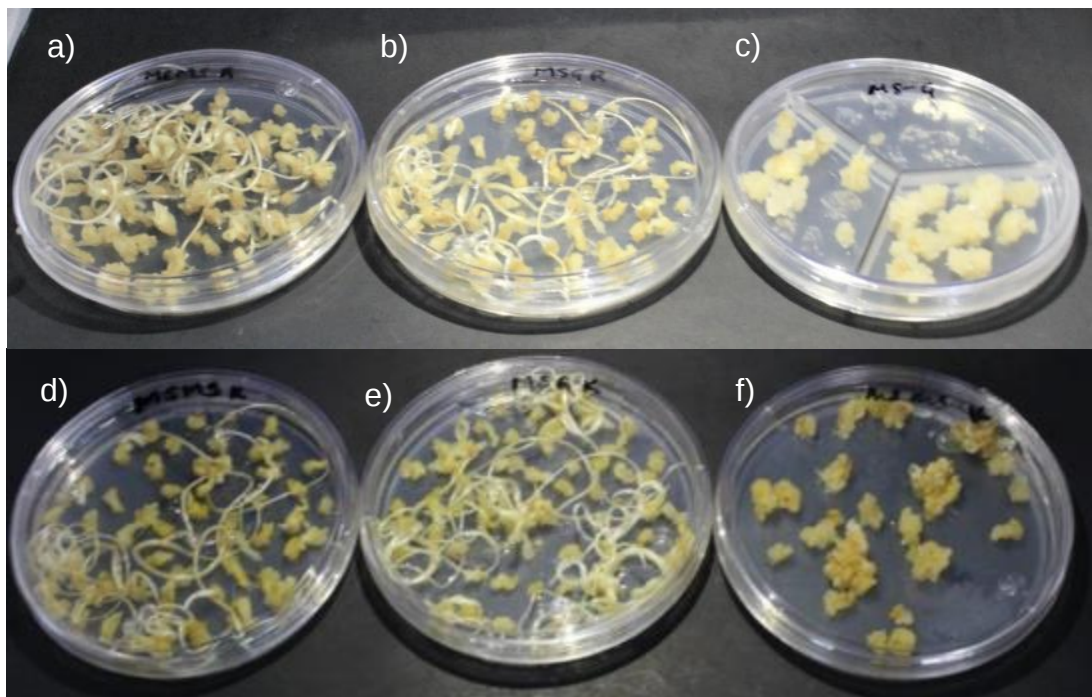


Figura 7 Formación de estructuras no regenerantes en callos: a) y d) MSMS, b) y e) MSG a las 2 semanas para la variedad Rebeca F2000 y Kronstad F2004 respectivamente. Desarrollo de callos después de 3 semanas de eliminar partes no regenerantes c) MSG Rebeca F2000 y f) MSMS Kronstad F2004.

Un análisis del crecimiento celular en los bioprocesos normalmente se centra en tiempo y medios utilizados, estos factores son descritos por su biomasa (Chi *et al.*, 1991). La biomasa promedio obtenida en estas variedades después 12 semanas fue: variedad Rebeca F2000: 0.15 g (MSMS), 0.11 g (MSG), y variedad Kronstad F2004: 0.19 g (MSMS), 0.14 g(MSG), en la figura 8, ilustra el desarrollo de las variedades en cada medio de cultivo y se puede notar un incremento homólogo de biomasa.

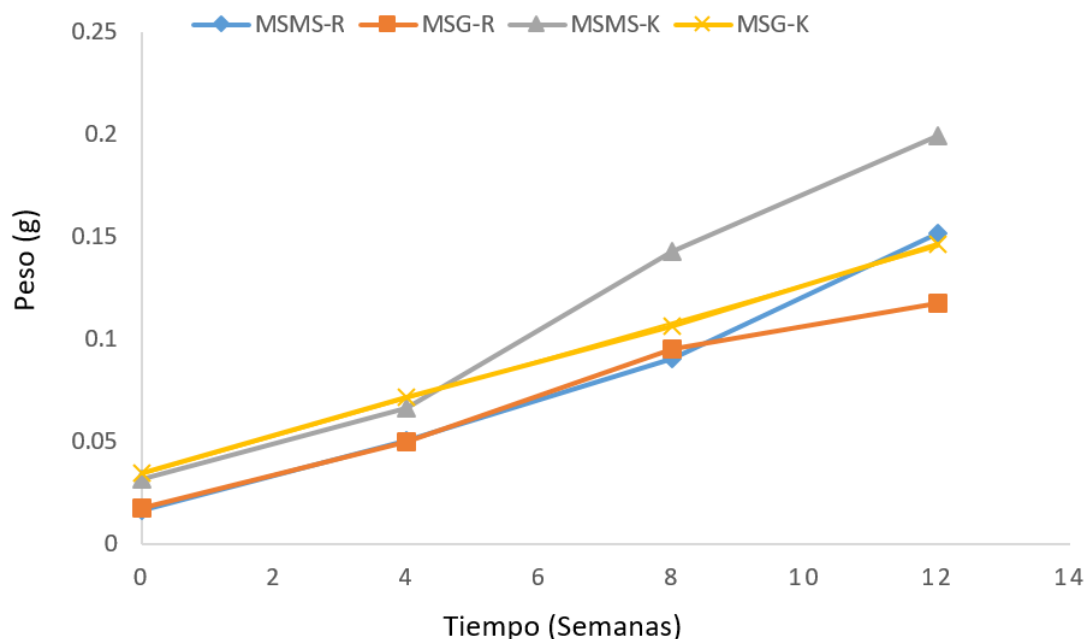


Figura 8 Cinética de desarrollo de callos: Rebeca F2000 y Kronstad F2004. Medio MS con vitaminas MS variedad Rebeca (MSMS-R), medio MS con vitaminas Gamborg variedad Rebeca (MSG-R), medio MS con vitaminas MS variedad Kronstad (MSMS-K), medio MS con vitaminas Gamborg variedad Kronstad (MSG-K).

Los dos mejores resultados en cuanto a números promedio de brotes (NPB) y tasa de regeneración (TR) para cada una de las variedades Rebeca y Kronstad, fueron: 1.9 (33 %), 14.8 (93 %), 7.9 (93 %), y 8.4 (67 %) para los medios MS-MMSOC-2-2 ( $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  2-4D +  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ), MSG-MMSOC-2-3 ( $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  2-4D +  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ), MS-MMSOC-2-4 ( $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  2-4D +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ), y MSG-MMSOC-2-4 ( $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  2-4D +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ) respectivamente. No existe diferencia significativa entre variedades ni en medios, solo entre tratamientos; MSG-MMSOC-2-3 (Rebeca F2000) y MS-MMSOC-2-4 (Kronstad F2004) (Figura 9 d, i) presentaron una mayor media; en tasa de regeneración. El tratamiento correspondiente a Valenzuela *et al.* (2012) ( $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  2-4D +  $2.4 \text{ mg L}^{-1}$  picloram) difiere de los mejores resultados porque tuvo un NPB Y TR menor (los datos se muestran en cuadro 7). El medio propuesto por Palmar *et al.* (2012) se vio influenciado por el genotipo (Ummara *et al.*, 2015) al presentar una baja regeneración. Sin embargo, los genotipos utilizados por el autor muestran una TR similar al presente estudio bajo la influencia del fitoregulator TDZ porque es capaz de promover la regeneración del callo en trigo (Shan *et al.*, 2000). Además de la influencia del

genotipo, la auxina 2,4-D es considerado un factor crítico para la inducción y formación de callos embriogénicos (Bi *et al.*, 2007). Por esta razón el segundo medio de regeneración fue suplementado con 2,4-D a una concentración de  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  (Zhou *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 2003) (anexo 4). Aunque, los mejores resultados obtenidos se observaron al eliminar el picloram en la regeneración, porque de acuerdo Sharma *et al.* (2007) en los medios que contienen niveles más altos de picloram ( $1.9 - 2.9 \text{ mg L}^{-1}$ ) meristemoide puede mantenerse sin promover brotes.

Los genotipos de trigo empleados en este trabajo, bajo los mejores tratamientos pueden tener alta tasa de regeneración y por ello pueden ser empleados para la transformación genética al igual que lo realizado por Patnaik *et al.* (2009) en el mismo género y especie.

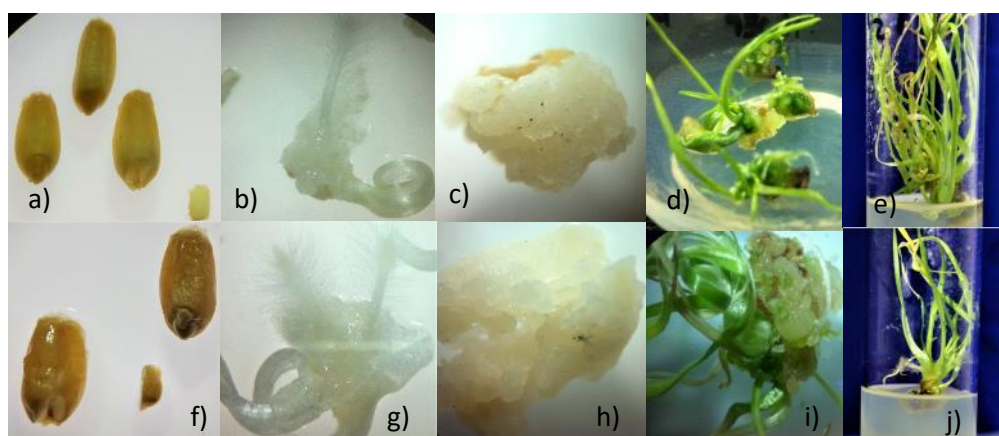


Figura 9 Proceso de regeneración *in vitro* de trigo Rebeca (a,b,c,d,e) y Kronstad(f,g,h,i,j): a y f extracción de embriones maduros, b y g) desarrollo del embrión maduro con partes no regenerantes, c y h) callo de 5 semanas de edad obtenido al eliminar partes no regenerantes, d), i) formación de brotes a la segunda semana de cultivar callos en los medios MMSOC-2-3 y MMSOC-2-4, e, j) desarrollo de los brotes en medio MMSOC-0.

Cuadro 7 Formación de callo y regeneración de las variedades Rebeca F200 y Kronstad F2004

| Formación de callo |                              |                 | Regeneración  |                   |      |                    |
|--------------------|------------------------------|-----------------|---------------|-------------------|------|--------------------|
| Variedad           | Medio                        | TFC             | Tratamiento   | TR                | NPB  | CFB                |
| Rebeca F2000       | CM4C<br>vitaminas<br>MS      | 95 <sup>a</sup> | MS-MMSOC-2-3  | 67 <sup>abc</sup> | 2.8  | 1.4 <sup>de</sup>  |
|                    |                              |                 | MS-MMSOC-2-4  | 60 <sup>abc</sup> | 2    | 1.2 <sup>e</sup>   |
|                    |                              |                 | MS-MMSOC-2-1  | 47 <sup>abc</sup> | 1.3  | 0.6 <sup>e</sup>   |
|                    |                              |                 | MS-MMSOC-2    | 40 <sup>abc</sup> | 1    | 0.4 <sup>e</sup>   |
|                    |                              |                 | MS-MMSOC-2-2  | 33 <sup>abc</sup> | 6    | 1.9 <sup>cde</sup> |
|                    | CM4C<br>vitaminas<br>Gamborg | 97 <sup>a</sup> | MSG-MMSOC-2-3 | 93 <sup>a</sup>   | 16   | 14.8 <sup>a</sup>  |
|                    |                              |                 | MSG-MMSOC-2-2 | 73 <sup>ab</sup>  | 10.6 | 7.7 <sup>bc</sup>  |
|                    |                              |                 | MSG-MMSOC-2-1 | 60 <sup>abc</sup> | 3.4  | 2 <sup>cde</sup>   |
|                    |                              |                 | MSG-MMSOC-2   | 60 <sup>abc</sup> | 1.6  | 1 <sup>e</sup>     |
|                    |                              |                 | MSG-MMSOC-2-4 | 47 <sup>abc</sup> | 16.1 | 7.5 <sup>bcd</sup> |
| Kronstad F2004     | CM4C<br>vitaminas<br>MS      | 95 <sup>a</sup> | MS-MMSOC-2-4  | 93 <sup>a</sup>   | 8.5  | 7.9 <sup>bc</sup>  |
|                    |                              |                 | MS-MMSOC-2-3  | 80 <sup>ab</sup>  | 6.3  | 5 <sup>bcd</sup>   |
|                    |                              |                 | MS-MMSOC-2-2  | 73 <sup>ab</sup>  | 5.6  | 4 <sup>bcd</sup>   |
|                    |                              |                 | MS-MMSOC-2-1  | 60 <sup>abc</sup> | 6    | 3.6 <sup>bcd</sup> |
|                    |                              |                 | MS-MMSOC-2    | 60 <sup>abc</sup> | 3    | 1.8 <sup>cde</sup> |
|                    | CM4C<br>vitaminas<br>Gamborg | 95 <sup>a</sup> | MSG-MMSOC-2-4 | 67 <sup>abc</sup> | 12.6 | 8.4 <sup>b</sup>   |
|                    |                              |                 | MSG-MMSOC-2-3 | 60 <sup>abc</sup> | 8    | 4.8 <sup>bcd</sup> |
|                    |                              |                 | MSG-MMSOC-2   | 60 <sup>abc</sup> | 1.7  | 1 <sup>e</sup>     |
|                    |                              |                 | MSG-MMSOC-2-1 | 47 <sup>abc</sup> | 7.2  | 3.3 <sup>bcd</sup> |
|                    |                              |                 | MSG-MMSOC-2-2 | 47 <sup>abc</sup> | 6.8  | 3.1 <sup>bcd</sup> |

TCF, tasa de formación de callos; TR, tasa de regeneración; NPB, número promedio de brotes; CFB, capacidad de formación de brotes. <sup>1</sup> Literales diferentes indican diferencias significativas entre variedades y tratamientos (calculado por prueba de Duncan,  $p > 0.05$ ). MS(medio MS vitaminas MS), MSG (medio MS vitaminas Gamborg), MMSOC-2 (0.2 mg L<sup>-1</sup> 2-4D + 2.4 mg L<sup>-1</sup> picloram), MMSOC-2-1 (0.1 mg L<sup>-1</sup> 2-4D + 1.0 mg L<sup>-1</sup> TDZ), MMSOC-2-2 (0.2 mg L<sup>-1</sup> 2-4D + 0.1 mg L<sup>-1</sup> TDZ), MMSOC-2-3 (0.2 mg L<sup>-1</sup> 2-4D + 1.0 mg L<sup>-1</sup> TDZ), y MMSOC-2-4 (0.2 mg L<sup>-1</sup> 2-4D + 2.0 mg L<sup>-1</sup> TDZ).

El medio MMSOC permitió el desarrollo de brotes por 3 semanas (Figura 9 e, j). Sin embargo, no presentaron raíces, por ello fueron utilizados auxinas para inducir la formación de raíz. A pesar de presentar mayor cantidad de brotes la variedad Rebeca F2000 con respecto a Kronstad F2004, presento susceptibilidad a pequeños cambios de temperatura, por esta razón no se disponía de material para ser evaluado el enraizamiento y realizó solo para Kronstad F2004.

La utilización exógena de auxinas naturales como ácido indol-3-acético (AIA) o sintéticas como ácido naftalenacético (ANA) y ácido 3-indolbutírico (AIB), permiten estimular células indiferenciadas que promueven la iniciación del

enraizamiento o emergencia de raíces adventicias (Uribe *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en el enraizamiento que corresponden a la variedad Kronstad F2004, se muestra en el cuadro 8. Existe diferencia significativa entre tratamientos; el mejor de ellos corresponde a MMSOC- RA3.2 (1.0 mg L<sup>-1</sup> AIA) porque presenta 100 % tasa de formación de raíz (TFR) y una capacidad de formación de raíz (CFR) de 2.4 (Figura 10 a, b). El resultado obtenido se explica de la siguiente manera: la aplicación exógena de auxinas afecta la biosíntesis apical y el transporte basípeto de auxinas endógenas. Las auxinas libres permanecen en altos niveles durante la fase de inducción del enraizamiento y decrecen justo al comenzar la fase de iniciación. En contraste, se muestran baja actividad de AIA-oxidasa durante la inducción, seguida de un aumento durante la iniciación del desarrollo de raíces adventicias (Flores *et al.*, 2009)

Cuadro 8 Enraizamiento de los brotes de la variedad Kronstad F2004 después de 8 días

| Tratamientos | TFR              | NPR               | CFR  |
|--------------|------------------|-------------------|------|
| MMSOC- RA3.2 | 100 <sup>a</sup> | 2.4 <sup>a</sup>  | 2.4  |
| MMSOC- RA0   | 80 <sup>a</sup>  | 1.2 <sup>ab</sup> | 0.96 |
| MMSOC- RA3.3 | 60 <sup>ab</sup> | 1.4 <sup>ab</sup> | 0.84 |
| MMSOC- RA4.1 | 60 <sup>ab</sup> | 1 <sup>ab</sup>   | 0.6  |
| MMSOC- RA1.2 | 60 <sup>ab</sup> | 1.6 <sup>ab</sup> | 0.96 |
| MMSOC- RA3.1 | 40 <sup>ab</sup> | 0.4 <sup>b</sup>  | 0.16 |
| MMSOC- RA4.2 | 40 <sup>ab</sup> | 0.6 <sup>b</sup>  | 0.24 |
| MMSOC- RA1.1 | 40 <sup>ab</sup> | 0.8 <sup>ab</sup> | 0.32 |
| MMSOC- RA2.1 | 40 <sup>ab</sup> | 0.8 <sup>ab</sup> | 0.32 |
| MMSOC- RA2.2 | 40 <sup>ab</sup> | 0.6 <sup>b</sup>  | 0.24 |
| MMSOC- RA2.3 | 40 <sup>ab</sup> | 0.4 <sup>b</sup>  | 0.16 |
| MMSOC- RA1.3 | 0 <sup>b</sup>   | 0 <sup>b</sup>    | 0    |
| MMSOC- RA4.3 | 0 <sup>b</sup>   | 0 <sup>b</sup>    | 0    |

TFR, tasa de formación de raíz; NPR, número promedio de raíces; CFR, capacidad de formación de raíces. <sup>1</sup> Literales diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (calculado por prueba de Duncan,  $p > 0.05$ ). MMSOC- RA1.1 (0.3 mg L<sup>-1</sup> ANA) MMSOC- RA1.2(1.0 mg L<sup>-1</sup> ANA), MMSOC- RA1.3(1.5 mg L<sup>-1</sup> ANA), MMSOC- RA2.1(0.3 mg L<sup>-1</sup> AIB) MMSOC- RA2.2(1.0 mg L<sup>-1</sup> AIB) MMSOC- RA2.3 (1.5 mg L<sup>-1</sup> AIB) MMSOC- RA3.1(0.3 mg L<sup>-1</sup> AIA), MMSOC- RA3.2 (1.0 mg L<sup>-1</sup> AIA) MMSOC- RA3.3(1.5 mg L<sup>-1</sup> AIA), MMSOC- RA4.1(0.3 mg L<sup>-1</sup> 2IP), MMSOC- RA4.2 (1.0 mg L<sup>-1</sup> 2IP) y MMSOC- RA4.3 (1.5 mg L<sup>-1</sup> 2IP).

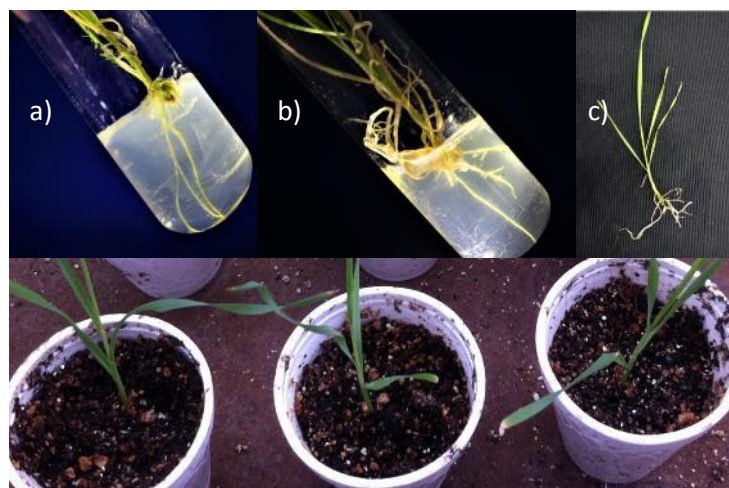


Figura 10 Formación de raíz y adaptación *ex vitro* de la variedad Kronstad F2004: a) y b) plantas en medio suplementado con  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  AIA, c) planta sin medio de cultivo lista para ser introducida en sustrato, d) plantas adaptadas *ex vitro* 1:1 Peatmoss: vermiculita

Las plántulas al formar raíces fueron colocadas en distintos sustratos (cuadro 5). La supervivencia *ex vitro* está influenciada por el funcionamiento de las raíces por eso las plántulas se protegen por 2-3 semanas a  $26^\circ\text{C}$  lo cual permite que las raíces inicien a funcionar, emitir raíces secundarias y evitar la pérdida de agua porque las estomas no tienen buen funcionamiento y de esta forma facilitar su adaptación. Se observó diferencia significativa entre los tratamientos en tasa de supervivencia, donde TE3 (1:3 Peatmoss: vermiculita) tuvo 100% (Cuadro 9) y la mayor media en longitud promedio desarrollada (LPD). Debido a que la vermiculita es un sustrato que permite: actuar como depósito de reserva de los nutrientes aportados mediante la fertilización (Beltrano & Gimenez, 2015).

Cuadro 9 Tratamientos para adaptación *ex vitro* de Kronstad F2004

| Tratamiento | TS               | LPD               |
|-------------|------------------|-------------------|
| TC3         | 100 <sup>a</sup> | 4.62 <sup>a</sup> |
| TE3         | 100 <sup>a</sup> | 5.52 <sup>a</sup> |
| TC1         | 100 <sup>a</sup> | 5.06 <sup>a</sup> |
| TE2         | 80 <sup>ab</sup> | 4.88 <sup>a</sup> |
| TS2         | 80 <sup>ab</sup> | 7.76 <sup>a</sup> |
| TC2         | 80 <sup>ab</sup> | 1.54 <sup>a</sup> |
| TE1         | 80 <sup>ab</sup> | 1.7 <sup>a</sup>  |
| TS3         | 80 <sup>ab</sup> | 2.28 <sup>a</sup> |
| TS1         | 40 <sup>bc</sup> | 3.98 <sup>a</sup> |
| T0R         | 20 <sup>c</sup>  | 1.22 <sup>a</sup> |

TS, tasa de sobrevivencia; LPD, longitud promedio desarrollada (cm). <sup>1</sup> Literales diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Duncan,  $p > 0.05$ ). La tasa de supervivencia fue evaluada después de tres semanas de haberse pasado a los tratamientos. La longitud promedio desarrollada fue tomada después de 4 semanas de desarrollo en los diferentes sustratos.

#### 4.2 Agentes selectivos y selección (fosfonitricina, sorbitol, NaCl y kanamicina)

En los vectores para la transformación genética existen genes de selección que nos permiten identificar las células vegetales transformadas de las no transformadas, se fundamenta en genes que confieren resistencia a agentes químicos (Mendoza, 2014). Algunos de ellos son el gen bar y el gen NPTII que se podría determinar su presencia por la resistencia a fosfonitricina y a kanamicina respectivamente. El gen AVP1 que codifica para un pirofosfatasa vacuolar y confieren tolerancia a sequía y salinidad (Gaxiola *et al.*, 2001), para su detección se podría emplear como agentes selectivos el sorbitol o NaCl. Para poder utilizar los genes antes mencionados se debe conocer la concentración tóxica a la que se inhibe por completo el desarrollo del explante mediante la elaboración de curvas de sensibilidad.

##### 4.2.1 Sensibilidad a fosfinotricina, sorbitol, NaCl

Los callos de las variedades Rebeca y Kronstad presentaron resultados después de haber transcurrido 3 meses en subcultivo, Sorbitol y NaCl en medio CM4C, mientras que la fosfinotricina al segundo mes en medio MMSOC-RA0.

Después de haber colocado los callos en el medio de presión de selección se observó; la oxidación de los callos en sorbitol a partir de 300mM en variedad Rebeca y 200mM para variedad Kronstad y dosis letal en 400mM para Rebeca F2000 y 300mM para Kronstad F2004 (Figura 11 a.). Estos resultados son debido a que el sorbitol ha sido reportado que actúa como un elemento osmoactivo y crea un estrés osmótico (Hassan *et al.*, 2009) datos que pueden ser utilizados como selección de callos transformados con el gen AVP1.

En cloruro de sodio inicio la oxidación de los callos a 100mM y su dosis letal fue de 200mM en las dos variedades (Figura 11 b). Estos resultados son similares a lo descrito por Mehta *et al.* (2010) donde se muestra que a partir de 100mM y el aumento de NaCl propicia una disminución significativa en el índice de rendimiento y el alto estrés salino inhibe la tasa de transporte de electrones. También, Munns *et al.* (2006) describieron que a un nivel de salinidad equivalente a 100 mM de NaCl mostro que el rendimiento en trigo se redujo en 7 % en comparación a una reducción del 38 % a una salinidad más alta, equivalente a 150 mM.

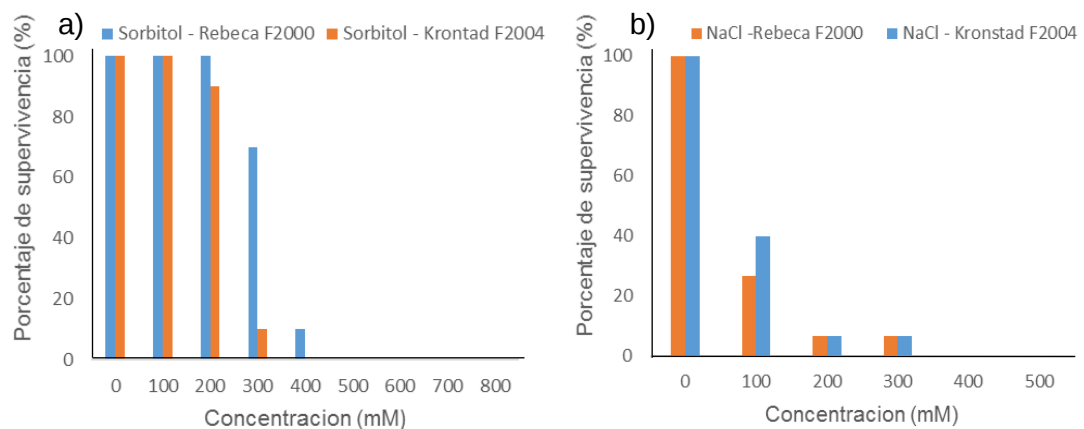


Figura 11 Gráfica de sensibilidad: a) Grafica de sensibilidad a sorbitol, b) Grafica de sensibilidad a NaCl de las variedades Rebeca F2000 y Kronstad F2004 al 2<sup>do</sup> mes

En fosfinotricina (PPT) la inhibición de la regeneración se observó a partir de 3 mg L<sup>-1</sup> (Rebeca F2000) y 4 mg L<sup>-1</sup> (Kronstad F2004), con un 60-70 % tasa de supervivencia (Figura 12). Al transcurrir un mes esta dosis se volvió letal, lo cual coincide con lo observado por Wu *et al.* (2003) quienes utilizan la selección de callos transformados de *Triticum aestivum* L. en un rango de 2-4 mg L<sup>-1</sup>. Así, la supervivencia de los callos en el presente estudio al 100 % fue en 1 mg L<sup>-1</sup> y 2 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, la cual coincide con la dosis usada por Mitic *et al.* (2004) para selección.

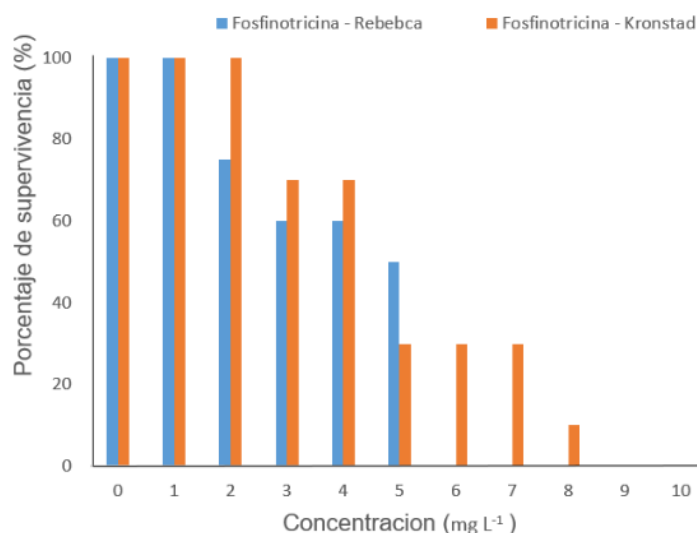


Figura 12 Gráfica de sensibilidad a fosfinotricina al segundo mes de exposición

#### 4.2.2 Sensibilidad a kanamicina

Se evaluó la tolerancia a kanamicina en variedad Kronstad la cual mostro 40 % de supervivencia a 60 mg L<sup>-1</sup> y una dosis letal a partir de 80 mg L<sup>-1</sup> a la cuarta semana (Figura 13). Esta concentración es similar a la usada en la selección de callos transformados en *Triticum aestivum* L. por Ding *et al.* (2009) (anexo 5).

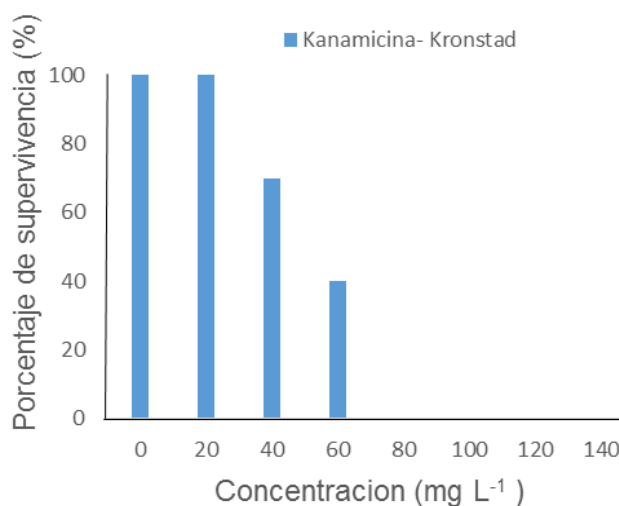


Figura 13 Gráfica de sensibilidad a Kanamicina después de un mes de exposición.

La toxicidad del meropenem(mp). Los efectos tóxicos del meropenem en los callos de trigo de la variedad Kronstad F2004 fueron examinados por la

incubación de estos explantes a diferentes concentraciones de meropenem ya que este antibiótico es utilizado para la eliminación de la cepa EHA105 después del proceso de agroinfección.

Se observó que a partir de 80 mg L<sup>-1</sup> de mp, el 20 % de los callos presentan pequeñas zonas con oxidación al mes de exposición, lo que sugiere que los callos inician a ser sensibles a partir de esta dosis.

#### 4.3 Efecto de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens*

Para determinar cuál cepa podría ser más efectiva para la transformación genética, se probaron las cepas LBA4404 (pGUSint), GV3101 (pGUSint) y EHA105 (pGUSint) usando el vector binario con el gen reportero 35S::GUSint (Viancaneyt *et al.*, 1990). Las agroinfecciones se probaron a una densidad óptica de cultivo  $A_{600} = 1$  con un tiempo de exposición a la cepa bacteriana de una hora en medio de agroinfección CM4C (sin agar, ni PPM, suplementado con 200  $\mu$ M de acetosiringona y sin acetosiringona) como lo proponen Patnaik *et al.* (2006), posteriormente fueron pasados a papel secante durante cinco min y después sembrados en medio de co-cultivo (CM4C sin PPM suplementado con 200  $\mu$ M de acetosiringona y sin acetosiringona) por 3-4 días. La expresión transitoria del gen reportero se registró en el lapso de 3 a 4 días después del co-cultivo para expresión transitoria y después de 20 días para expresión estable.

Las cepas LBA4404 y GV3101 no se observó reacción histoquímica, este resultado difiere a lo obtenido por Patnaik *et al.* (2006) bajo las mismas condiciones, pues no se logró observar la expresión del gen GUS en los callos de Kronstad F2004 agroinfectados después de tres días después del co-cultivo, en ambos tratamientos con y sin acetosiringona. Mientras que la cepa EHA105 usando acetosiringona mostro ser virulento en 28 %, porque hubo una coloración azul al someterlos a la reacción histoquímica con x-gluc, debido a la expresión de la enzima  $\beta$ -Glucuronidasa, este resultado se puede deber al uso de 200 $\mu$ M de acetosiringona en el medio de infección y co-cultivo porque de acuerdo Wu *et al.* (2003) el uso de este inductor fenólico incrementa

la eficiencia de transferencia de T-DNA, además del tipo de cepa empleada. El porcentaje obtenido de callos con expresión transitoria es similar a lo reportado por Ditt *et al.* (2005). Así, de primer momento la cepa EHA105 tuvo mayor virulencia en comparación a las dos cepas (Figura 14.)

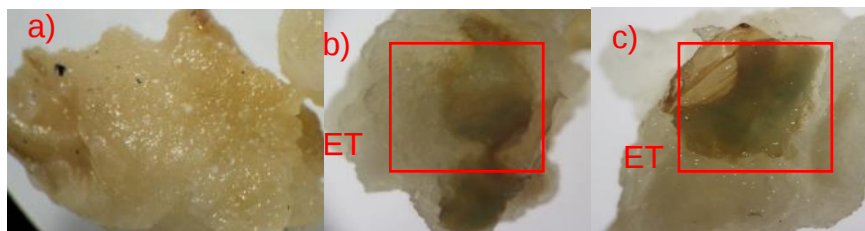


Figura 14 Expresión transitoria (ET) del gen GUS en callos de Kronstad F2004: a) corresponde al callo agroinfectado con LBA4404 sin expresión transitoria, b) y c) corresponden a callos agroinfectados con cepa EHA105 con expresión transitoria (ET).

La actividad de la enzima  $\beta$ -Glucuronidasa dada por la expresión del gen GUS fue observada a los 20 días después del co-cultivo para expresión estable. Los callos inoculados con la cepa LBA4404 no presentaron reacción en ninguno de los tratamientos (con y sin acetosiringona), mientras que la cepa GV3101 hubo 14 % de callos con coloración azul, a pesar, que en la primera prueba de expresión transitoria no presento reacción. Con la cepa EHA105 30 % de los callos ambos suplementados con acetosiringona mostraron actividad enzimática (Figura 15). Acorde con los resultados obtenidos la cepa con mayor virulencia es la EHA105 para la variedad Kronstad F2004 y es la que podría dar una mayor eficiencia de transformación.

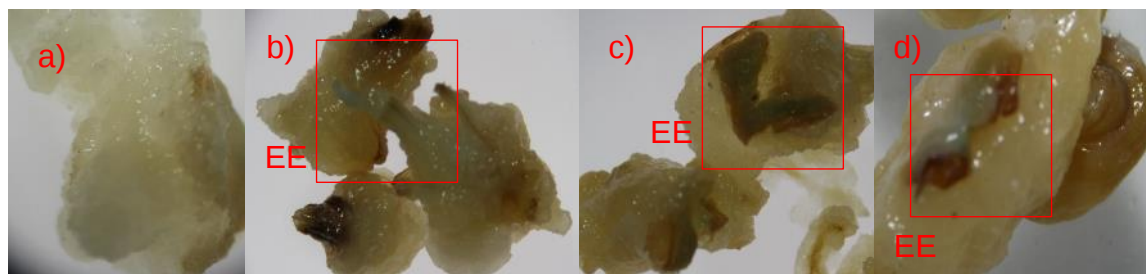


Figura 15 Expresión estable (EE) del gen GUS en callos de Kronstad F2004: a) callo agroinfectado con la cepa LBA4404 sin expresión estable, b) y c) callos agroinfectados con cepa EHA105 y d) callos infectados con la cepa GV3101.

#### 4.4 Selección para transformación estable

Se realizaron agroinfecciones en la variedad Kronstad F2004 con las cepas EHA105 y GV3101, a una absorbancia óptica bacteriana de  $A_{600nm}=1.0$ , para ambas cepas las siguientes construcciones: el vector binario pGUSint con el gen de selección a kanamicina (NPTII) y gen quimérico *CaMV35S::gusint*, el segundo con vector binario pTF101.1 con el gen de selección BAR y gene quimérico *CaMV35S::AVP1*.

La selección de callos agroinfectados fue iniciada después de tres días en co-cultivo. Las dosis de los agentes de selección se aumentaron en el segundo medio de regeneración (MMSOC-RA0) y la concentración utilizada de meropenem en todos los medios fue de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ .

Inicialmente los explantes se mantuvieron en medio CM4C por cuatro semanas, para el gen GUS a una dosis de  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de kanamicina y el gen AVP1 con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de PPT, similar a lo propuesto por He *et al.* (2010). Después los callos fueron transferidos al primer medio de regeneración suplementado con  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ (MMSOC-2-4) con las mismas dosis de agentes de selección, por dos semanas con fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Posteriormente los callos se subcultivado en el segundo medio de regeneración (MMSOC- RA0), las dosis de los agentes de selección se aumentaron a  $50 \text{ mg L}^{-1}$  km y  $1 \text{ mg L}^{-1}$  PPT respectivamente, por tres semanas.

Transcurridas tres semanas se obtuvieron los siguientes resultados: ninguno de los callos presento oxidacion procedente de la agroinfección de las cepas EHA105-GUS y GV3101-GUS, y para los callos infectados con EHA105-AVP1 el 39 % y GV3101-AVP1 el 27 % se oxidaron. Sin embargo, no hubo formación de brotes. A excepción de los testigos; 38 % ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  PPT) y 10 % (gen GUS). Esto se debió a la re-colonización de la bacteria porque si no se tiene control de los contaminantes microbianos ocurre una reducción de las tasas de multiplicación y enraizamiento o inducir la muerte de las plantas (Estopà *et al.*, 2001). Para eliminarla se utilizaba una solución liquida de medio CM4C con

50 mg L<sup>-1</sup> de meropenem, pero solo era efectiva de 2-3 semanas, pues volvía a presentarse una nueva contaminación. Posteriormente al incrementar la concentración de meropenem a 70 - 80 mgL<sup>-1</sup> por 30 segundos en el lavado, se erradico este problema (datos no presentados), dato similar al propuesto por Yarizade *et al.*, (2012). Además, se debe considerar que los callos fueron expuestos a varios lavados con meropenem, y este puede un efecto negativo sobre el tejido vegetal y regeneración (Leamkhang & Chatchawankanphanich, 2005; Yarizade *et al.*, 2012). Tal vez se deba probar otros antibióticos β-lactama, porque el meropenem funciona bien con la cepa LBA4404, la C58C1 y AGL0 (Yarizade *et al.*, 2012) pero al parecer no es tan efectivo con la EHA105.

## 5. Conclusiones

Fue posible obtener un protocolo eficiente de regeneración mejor a lo reportado por Valenzuela *et al* (2012), para la variedad Rebeca F2000, se obtuvo hasta 14.8 brotes por explante en promedio con el medio MSG suplementado con 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2-4D y 1.0 mg L<sup>-1</sup> TDZ, mientras que para la variedad Kronstad se empleó el medio MSMS con 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2-4D y 2.0 mgL<sup>-1</sup> TDZ, logrando hasta 7.9 brotes por explante en promedio.

El mejor resultado obtenido en el enraizamiento fue con 1.0 mg L<sup>-1</sup> AIA ya que hubo el 100 % de formación de raíces, y cada planta presentaba hasta 2.4 raíces en promedio.

Se logró determinar que la relación 1:3 de los sustratos Peatmoss con vermiculita fue el más efectivo al lograr el 100% de adaptación ex vitro.

Se determinaron algunas condiciones necesarias para la transformación genética, mediante el uso de presión de selección a fosfinotricina, Kanamicina, NaCl y Sorbitol.

Para la agroinfección se identificó que la cepa EHA 105 presento la mayor virulencia y con ella se consiguió la expresión transitoria y estable del gen GUS para la variedad de. trigo Kronstad F2004

### Perspectivas

A partir de los estudios y discusiones presentados en este trabajo, las perspectivas futuras se orientan en los siguientes puntos:

Se debe someter a inducción de raíz a la variedad Rebeca F2000 con los mismos tratamientos a los que fue sometido la variedad Kronstad F2004. Además, se debe probar la adaptación *ex vitro* a diferentes sustratos a para su desarrollo.

La variedad Rebeca F2000 cultivarse bajo presión de selección con Kanamicina, y observar la toxicidad que presenta el antibiótico meropenem en los callos.

Para la regeneración de callos agroinfectados se debe estudiar interacción del antibiótico, cepa bacteriana y callos en el protocolo de transformación y aumentar gradualmente de agente selectivo para permitir la formación de brotes. Además, se pueden probar, PPM como agente antibacteriano y diferentes antibióticos (cefotaxima, carbenicillina, ticarcilina, etc) para eliminar a *Agrobacterium tumefaciens*.

## 6. Bibliografía consultada

- Abdelnour A., y Escalant J.V. (1994) Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Costa Rica: Orton IICA/ CATIR.
- Almeselmani, M., Al-rzak, S. A., Al-zubi, K., Hareri, F., Al-nassan, M., Ammar, M., Kanbar Osama.,... Al-sael, H., (2012) Physiological Attributes Associated to Water Deficit Tolerance of Syrian Durum Wheat Varieties. *Experimental Agriculture & Horticulture*, 1, 21-41.
- Azcón-Bieto, J., y Talón, M. (2013) Fundamentos de fisiología vegetal (2ª ed.) España: McGRAW-HILL.
- Bao, A.K., Wang, S.M., Wu, G.Q., Xi, J.J., Zhang, J.L., y Wang, C.M. (2009) Overexpression of the Arabidopsis H<sup>+</sup>-PPase enhanced resistance to salt and drought stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Sci*, 176, 232–240.
- Beltrán, P. J., Porter, B., Olmedo, G. F. y Puigdomènech, P. (2003) Plantas transgénicas. España: Universidad de Salamanca.
- Beltrano, J., y Gimenez, D. O. (2015) Cultivo en hidroponía. Argentina: UNLP.
- Benítez, B. A. (2005) Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas. España: Reverte.
- Bi, R. M., Kou, M., Chen, L. G., Mao, S. R., y Wang, H. G. (2007). Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*. *Plant Breeding*, 126(1), 9-12.
- Blanco, C.A. (2012) Cultivos transgénicos para la agricultura latinoamericana: la ciencia para todos. México: Fondo de Cultura Económica.
- Camacho-Casas, M. A., Figueroa-López, P., Fuentes-Dávila, G., Chávez-Villalba, G., Peña-Bautista, R. J., Valenzuela-Herrera, V., ... y Mendoza-Lugo, J. A. (2010). Kronstad F2004, nueva variedad de trigo harinero

para el sur de Sonora. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 1(1), 111-113.

Caswell, K. L., Leung, N. L., y Chibbar, R. N. (2000). An efficient method for in vitro regeneration from immature inflorescence explants of Canadian wheat cultivars. *Plant cell, tissue and organ culture*, 60(1), 69-73, doi: 10.1023/A:1006357501737

Chaves, M. M. y Oliveira, M. M. (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *J Exp Bot*, 55 (407), 2365-2384, doi: 10.1093/jxb/erh269

Cheng, M., Fry, J.E., Pang, S., Zhou, H., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, T. W. y Wan, Y. (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol*, 115, 971–980.

Chowdhury, S. H., Kato, K., Yamamoto, Y., y Hayashi, K. (1991) Varietal variation in plant regeneration capacity from immature embryo among common wheat cultivars, *Japan J. Breed*, 41, 443-450.

Clive, J. (2015) 20th Anniversary of the Global Commercialization of Biotech Crops (1996 to 2015) and Biotech Crop Highlights in 2015. *ISAAA Brief* No. 51. NY: ISAAA.

CYMMYT (1989) CIMMYT 1987-1988, hechos y tendencias mundiales relacionados con el trigo: Nuevamente, la revolución del trigo, tendencias recientes y retos futuros. México: CYMMYT

Davey, M. R., y Anthony, P. (2010). *Plant cell culture: essential methods*. USA: John Wiley & Sons.

Delparte, F., Mostade, O., y Jacquemin J.M. (2001) Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 67, 73–80

Delparte, F., Pretova, A., Du, P. J., y Watillon, B. (2014) Morpho-histology and genotype dependence of in vitro morphogenesis in mature embryo

cultures of wheat, *Protoplasma*, 251,1455, doi:10.1007/s00709-014-0647-7.

Ding, L., Li, S., Gao, J., Wang, Y., Yang, G., y He, G. (2009) Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. *Mol Biol Rep*, 36, 29–36, doi: 10.1007/s11033-007-9148-5.

Ditt, R. F., Nester, E., y Comai, L. (2005) The plant cell defense and *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*, 247, 207–213, doi: 10.1016/j.femsle.2005.05.010.

Elhiti, M., y Stasolla, C. (2011). The use of zygotic embryos as explants for in vitro propagation: an overview. *Plant embryo culture: methods and protocols*, 229-255.

Estopà, M., Marfà, V., Melé, E. y Messeguer, J. (2001) Study of different antibiotic combinations for use in the elimination of *Agrobacterium* with kanamycin selection in Carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65, 211–220.

FAO. (2014). Perspectivas alimentarias: resúmenes de mercado. Italia: FAO.

FAO. (2016). Perspectivas alimentarias: resúmenes de mercado. Italia: FAO.

Feldman, M., y Levy, A.A. (2012) Genome Evolution Due to Allopolyploidization in wheat. *Genetics*, 192, 763–774, doi: 10.1534/genetics.112.146316.

Fernández M. (1994) Avances en ingeniería genética. España: ilustrada.

Flores, O. C.M., Cabañas-Cabrera, A., Peñalosa, C. I., Quintanar, Z. R. E., Vázquez, M. J. y Urzúa, M. M. A. (2009) Auxinas endógenas, AIA-oxidasa y enraizamiento en *Vigna radiata* L. wilczek inducido por auxina exógena libre y conjugada. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 32, 61 – 66.

Fox, D. G., DeCoursey, B. G., Wallace, D. G., Watts, W. W., y RD Woodmansee, R. G. (1992). Agricultura sostenible: un enfoque

ecológico, socioeconómico y de desarrollo tecnológico; memoriasThe terrestrial ecosystems regional research and analysis laboratory: regional collaboration to address global change issues. In 2. *Simposio y 1. Reunión Nacional Agricultura Sostenible: Un Enfoque Ecológico, Socioeconómico y de Desarrollo Tecnológico* Dic 1991 Montecillo (México) (No. 333.76063 S612 1991). Colegio de Postgraduados, Montecillo (México). Comisión de Estudios Ambientales IICA, México, DF (México).

García G., Quintero R. y López M. (2004) *Biotecnología Alimentaria*. México: LIMUSA.

Gaxiola, R. A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L. M., Allen, G. J., Alper, S. L., y Fink, G. R. (2001) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump. *PNAS*, 98 (20), 11444–11449, doi: 10.1073/pnas.191389398.

Gaxiola, R. A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, L. S., y Fink, G. R. (1999) The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1480–1485, doi: 10.1073/pnas.96.4.1480

Gelvin, B. S. (2010) Plant Proteins Involved in *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation. *Annu. Rev. Phytopathol*, 48, 45–68.

George, E. F., Hall, M. A., y Klerk, G. (2008) *Plant Propagation by Tissue Culture*. (3<sup>a</sup> ed.) Netherlands: Springer

Halilolu, K., y Baenziger, S.P. (2005) Screening Wheat Genotypes for High Callus Induction and Regeneration Capability from Immature Embryo Cultures. *J. Plant Biochemistry & Biotechnology*, 14, 155-160, doi: 10.1007/BF03263244

Hassan, U.M., Ahmed, Z., Munir, M., Malik, I.S., y Shahzad, K. (2009) Effect of sorbitol in callus induction and plant regeneration in wheat. *African Journal of Biotechnology*, 8 (23), 6529-6535.

- He, Y., Jones, H. D., Chen, S., Chen, X. M., Wang, D. W., Li, K. X., ... y Xia, L. Q. (2010). Agrobacterium-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum cv Stewart) with improved efficiency. *Journal of experimental botany*, 61(6), 1567-1581.
- Hicks G (1994) Shoot induction and organogenesis in vitro: a developmental perspective. *Vitro Cell Dev Biol Plant*, 30 (1), 10–15
- Hopkins, G. W., y Huner, P. N. (2009). Introduction to plant physiology. (4<sup>a</sup> ed.) USA: John Wiley & Sons.
- Hortelano, S.R.R., Villaseñor, M.H.E, Martínez, C.E., Rodríguez., G.F., Espitia, R.E., y Mariscal A.L. (2013) Estabilidad de variedades de trigo recomendadas para siembras de temporal en los valles altos de la mesa central. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(3), 713-725
- Hu, T., Metz, S., Chay, C., Zhou, H., Biest, P., Chen, N., Cheng, X., Feng, M., Radionenko M. y Fry, J. (2003) Agrobacterium-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. *Plant Cell Rep*, 21, 1010–1019, doi:10.1007/s00299-003-0617-6.
- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). (2010) Pocket K No. 38: Biotech Wheat. página web: <http://isaaa.org/resources/publications/pocketk/38/default.asp>. Fecha de consulta: 01 abril 2017
- James, A. R., Blake, C., Byrt, S.C., y Munns, R. (2011) Major genes for Na<sup>+</sup> exclusion, Nax1 and Nax2 (wheat HKT1;4 and HKT1;5), decrease Na<sup>+</sup> accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. *Journal of Experimental Botany*, 62 (8), 2939–2947, doi: doi.org/10.1093/jxb/err003.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T.A. y Bevan, M. W. (1987) GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6, 3901 -3907.

- Jones, D. H. y Shewry, R. P. (2009) Transgenic Wheat, Barley and Oats: Production and Characterization Protocols. UK: Humana Press.
- Jones, D. H., Doherty, A. y Wu, H. (2005) Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Plant Methods* ,**1**, 1-9.
- Leamkhang, S., y Chatchawankanphanich, O. (2005) Augmentin as an alternative antibiotic for growth suppression of *Agrobacterium* for tomato (*Lycopersicon esculentum*) transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82, 213–220, doi: 10.1007/s11240-005-0416-6.
- Li, J., Yang, H., Peer, W., Richter, G., Blakeslee, J., Bandyopadhyay, A., Titapiwantakun, B., Undurraga, S., Khodakovskaya, M., Richards E.L., Krizek, B., Murphy, A. S., Gilroy, S., y Gaxiola, R. (2005) Arabidopsis H<sup>+</sup>-PPase AVP1 Regulates Auxin-Mediated Organ Development. *Science*, 310,121-125, doi:10.1126/science.1115711.
- Li, L., Zheng, M., Deng, G., Liang, J., Zhang, H., Pan, Z., Long, H., y Yu, M. (2016) Overexpression of AtHDG11 enhanced drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) *Mol Breeding* ,36, 23, doi:10.1007/s11032-016-0447-1.
- Liu, W., Zheng, M., y Konzak, C. (2002). Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 20(9), 821-824, doi: 10.1007/s00299-001-0408-x
- Luque J. y Herráez A. (2008) Biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. España: Harcourt.
- MacKinnon, C., Gunderson, G., y Nabors, M. W. (1987). High efficiency plant regeneration by somatic embryogenesis from callus of mature embryo explants of bread wheat (*Triticum aestivum*) and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 23(6), 443-448.

- Mateos B.J., Carrera M. M., Galan S. V. Gonzalez T. F., Hidalgo F. L., Maroto B. J.V., Mateo B.J.M., Navarro F. J., De la Puerta C.C., Rojo H. C. y Zaragoza A. S. (2005) *Prontuario de agricultura: cultivos agrícolas*. España: Mundi-prensa libros
- Mehta, P., Jajo, A., Mathur, S., y Bharti, S. (2010) Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 16-20, doi: doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.10.006.
- Mendoza, G. E. (2014) *Plantas Transgénicas: Beneficios y Riesgos*. UK: Emimem.
- Miller, G., Nobuhiro, S., Sultan., C.Z. y Mittler, R. (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*, 33 (1),453–467, doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x
- Mitić, N., Nikolić, R., Ninković, S., Miljuš-djukić, J. y Nešković, M. (2004) *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration of *Triticum aestivum* L. *Biologia Plantarum* ,48 (2),179-184, doi: 10.1023/B:BIOP.0000033442.15611.7d.
- Moghaieb, R. E. A., Nagwa, I., Arabi, E., Momtaz, O.A., Youssef, S.S., y Soliman, M. H. (2010) Genetic transformation of mature embryos of bread (*T. aestivum*) and pasta (*T. durum*) wheat genotypes. *GM Crops*, 1:2, 87-93, doi: dx.doi.org/10.4161/gmcr.1.2.11172.
- Munns, R., James, R. A. y Läuchli, A. (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany* ,57 (5), 1025 –1043, doi: doi.org/10.1093/jxb/erj100
- Muñoz, R. J., Echeverría, B. A., Herrera, E. L., Martínez, T. M., Covarrubias, R. A., Ribeiro, S., Munguía, L. A., Muñoz, R.J., Padilla, A.J. Olivé M.L., Solleiro, R. J.L. Toledo, M.V.M. y Levidow, L. (2004) *Alimentos transgénicos / Transgenic Food: Ciencia, ambiente y mercado: Un debate abierto*. México: siglo XXI

- Murashige, T., Skoog, y F. 1(962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*; 15, 473-479.
- Ogawa, Y., y Mii, M.(2007) Meropenem and moxalactam: Novel  $\beta$ -lactam antibiotics for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Science*,172, 564–572, doi: doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.11.003
- Özgen, M., Türet, M., Altınok, S., y Sancak, C. (1998) Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Reports*,18, 331–335, doi: 10.1007/s002990050581
- Ozias-Akins P. y Vasil I. K. (1982) Plant Regeneration from Cultured Immature Embryos and Inflorescences of *Triticum aestivum* L. (Wheat): Evidence for Somatic Embryogenesis. *Protoplasma*, 110, 95- 105.
- Ozias-Akins P. y Vasil I. K. (1983) Improved Efficiency and Normalization of Somatic Embryogenesis in *Triticum aestivum* (Wheat). *Protoplasma*, 117, 40 – 44.
- Park, S., Li, J., Pittman, J. K., Berkowit, G. A., Yang,H., Undurraga S., Morris, J., Hirschi, K.D. y Gaxiola, R. A. (2005) Up-regulation of a  $H^+$ -pyrophosphatase ( $H^+$ -PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *PNAS*, 102 (52), 18830–18835, doi: 10.1073/pnas.0509512102.
- Parmar, S.S., Sainger, M., Chaudhary, D., y Jaiwal, P. K. (2012) plant regeneration from mature embryo of comercial indian bread wheat (*triticum aestivum* L.) Cultivars. *Physiol Mol Biol Plants*, 18 (2), 177–183. doi 10.1007/s12298-012-0101-2
- Patnaik, D.,Vishnudasan, D., y Khurana, P. (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryos of *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. *Current Science*,91(3), 307-318

- Peña, B.R.J., Pérez, H.P., Villaseñor, M. E., Gómez, V.M.M., y Mendoza, L.M.A (2008) Calidad de la cosecha de trigo en México: Ciclo primavera-verano 2006. México: CONASIST-CONATRIGO
- Rashid A. (2009) Introduction To Genetic Engineering Of Crop Plants: Aims And Achievements. India: I. K. International Pvt Ltd.
- Redway, F.A., Vasil, V., Lu, D., y Vasil, I.K. (1990) Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from comercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 79, 609–617
- Roca, M.W., y Mroginski, A.L. (1991) Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Colombia: CIAT.
- Sairam, R.K., Rao K.V., y Srivastava, G.C. (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, 163 (1), 1037- 1046, doi:10.1016/S0168-9452(02)00278-9
- Sarker, R. H. y Biswas, A. (2002) *In vitro* Plantlet Regeneration and *Agrobacterium* mediated Genetic Transformation of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Tissue Cult*, 12(2), 155-165,
- Schilling, R. K., Marschner, Petra., Shavrukov, Yuri., Berger, B., Tester M., Stuart J. R., y Plett D. C. (2013) Expression of the Arabidopsis vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase gene (AVP1) improves the shoot biomass of transgenic barley and increases grain yield in a saline field. *Plant Biotechnology Journal*, 1, 1–9, doi : 10.1111/pbi.12145
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)(2015). Consultado 18 - 02 - 2017 en <http://www.gob.mx/sagarpa/articulos/el-buen-pan-se-hace-con-trigo>
- Serres, R. McCown, y B. Zeldin E. (1997) Detectable fl.glucuronidase activity in transgenic cranberry is affected by endogenous inhibitors and plant development. *Plant Cell Reports*, 16, 641-646, doi:10.1007/s002990050294

- Shan, X., Li, D., y Qu, R. (2000) Thidiazuron promotes in vitro regeneration of wheat and barley. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36 , 207–210,doi: 10.1007/s11627-000-0038-y
- Sharma, V. K., Hänsch, R., Mendel, R. R., y Schulze, J. (2005). Influence of picloram and thidiazuron on high frequency plant regeneration in elite cultivars of wheat with long-term retention of morphogenecity using meristematic shoot segments. *Plant Breeding*, 124(3), 242-246, doi: 10.1111/j.1439-0523.2005.01095.x
- Sharma, V. K., Hänsch, R., Mendel, R.F., y Schulze, J., (2007) Node-derived cultures with high-morphogenic competence in barley and wheat. *Plant, Plant cell, tissue and organ culture*, 88, 21–33, doi:10.1007/s11240-006-9172-5
- Sheikholeslam, N. S., y Donald, W. P. (1987) Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, 8, 291-298, doi: 10.1007/BF00021308
- Shewry P. R. (2009) Wheat. *Journal of Experimental Botany* , 60 (6), 1537–1553, doi:10.1093/jxb/erp058.
- Sierra P. J. O. (2005) Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros. Colombia: Universidad de Antioquia
- Songstad, D. D., Petersen, W. L. y Armstrong, C. L. (1992) Establishment of friable embryogenic (type II) callus from immature tassels of zea mays (Poaceae) American. *Journal of Botany*, 79(7), 761-764.
- Souza,C., y Beck, E. (2013) Embryogenic callus induction on the scutellum and regeneration of plants as basis for genetic transformation of spring wheat (*triticum aestivum* L.) cultivars from argentina. *Journal of Basic & Applied Genetic*,24, 55-66.
- Taiz ,L., y Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal (3ª ed.) U.S.A: Universitat Jaume

- Ummara, W. K., Raza A., Irum, S., y Mohmmad, M. S. (2015) Some important Factors Influencing Tissue Culture Response in Wheat. *Sarhad Journal of Agriculture*, 31(4), 199-209, Doi: 10.17582/journal.sja/2015/31.4.199.209
- Uribe, M. E., Ulloa, J., Delaveau, C., Sáez, K., Muñoz, F., y Cartes, P. (2012) Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento in vitro de microtallos de *nothofagus glauca* (phil.) krasser Gayana. *Botánica*, 32, 105-112, doi:10.4067/S0717
- Valenzuela, A. J. P., Mascorro, G. J. O., Iturriaga, G. y Valenzuela, S. E. M. (2012) Embriogénesis somática y regeneración de embriones maduros de variedades de trigo cultivadas en México. *Revista de Ciencia, Ingeniería y Ambiente*, 1, 29-34.
- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L., y Rocha-Sosa, M. (1990). Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular and General Genetics MGG*, 220(2), 245-250, doi: 10.1007/BF00260489
- Villaseñor-Mir, H. E., Espitia-Rangel, E., Huerta-Espino, J., González-Íñiguez, R., Solís-Moya, E., y Peña-Bautista, J. (2004) Rebeca F2000, nueva variedad de trigo para siembras en temporales favorables e intermedios en México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 27 (3), 285 – 287.
- Vishnudasana, D., Tripathi, M.N., Rao, U. y Khurana, P. (2005) Assessment of nematode resistance in wheat transgenic plants expressing potato proteinase inhibitor (PIN2) gene. *Transgenic Research*, 14, 665–675, doi: 10.1007/s11248-005-5696-4
- Wakui, C., Akiyama, H., Watanabe, T., Fitch M.M., Uchikawa, S., Ki, M., Takahashi, K., Chiba R., Fujii A., Hino A., y Maitan, T. (2003) A Histochemical Method Using a Substrate of  $\beta$ -Glucuronidase for Detection of Genetically Modified Papaya. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 45(1), 19-24.

- Wang, Y.L., Xu, M.X., Yin, G.X., Tao, L.L., Wang, D.W. y Ye, X.G. (2009) Transgenic Wheat Plants Derived from *Agrobacterium* mediated Transformation of Mature Embryo Tissues. *Cereal Research Communications*, 37(1), 1–12, doi: 10.1556/CRC.37.2009.1.1
- Wu, H., Sparks, C., Amoah, B., y Jones, H. D. (2003) Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant cell reports*, 21(7), 659–668, doi:10.1007/s00299-002-0564-7
- Xue, Z.Y., Zhi, D. Y., Xue, G. P., Zhang, H., Zhao, Y.X. y Xia, G.M. (2004) Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na<sup>+</sup>. *Plant Science*, 167(4), 849–859, doi: 10.1016/j.plantsci.2004.05.034
- Yang, H., Knapp, J., Koirala, P., Rajagopal, D., Peer, W.A., Silbart, L.K., Murphy, A., y Gaxiola, R.A. (2007) Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Plant Biotechnology Journal*, 5, 735–745, doi: 10.1111/j.1467-7652
- Yarizade A., Aram F., Niazi A. y Ghasemi Y. (2012) Evaluation of Effect of  $\beta$ -Lactam Antibiotics on Suppression of Different Strains of *Agrobacterium tumefaciens* and on Wheat Mature Embryo Culture. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences Autumn*, 8(4), 267-276.
- Yu, Y., Wang, J., Zhu, M.L., y Wei, Z.M. (2008) Optimization of mature embryo-based high frequency callus induction and plant regeneration from elite wheat cultivars grown in China. *Plant Breed*, 127, 249–255, doi: 10.1111/j.1439-0523.2007.01461.x
- Zaidi, N., Habib, N. K., Zafar, F. y Zafar, S. (2000) Bulbous and cormous monocotyledonous ornamental plants in vitro. *Quarterly Science Vision*, 6(1), 58-73.
- Zhang, H., Shen, G., Kupp, S., Gaxiola, R., y Payton, P. (2011) Creating drought- and salt-tolerant cotton by overexpressing a vacuolar

pyrophosphatase gene. *Plant Signaling & Behavior*, 6(6), 861–863, doi: 10.4161/psb.6.6.15223

Zhang, J. y Shi, H. (2013) Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance. *Photosynthesis research*, 115(1), doi:10.1007/s11120-013-9813-6

Zhang, Y., Liang, Z., Zong, Y., Wang, Y., Liu, J., Chen K., Qiu, J.L., y Gao, C.(2016) Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nature Communications*, 7, 1-8, doi: 10.1038/ncomms12617

Zhe-Yong, X., Da-Ying, Z., Gang-Ping, X., Hui, Z., Yan-Xiu, Z. y Guang-Min , X. (2004) Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na<sup>+</sup>. *Plant Science*, 167, 849–859, doi: 10.1016/j.plantsci.2004.05.034

Zhou, H., Arrowsmith, J.W., Fromm, M.E., Hironaka, C.M., Taylor, M.L., Rodriguez, D., Pajeau, M.E., Brown, S.M., Santino, C.G. y Fry J.E. (1995) Glyphosate-tolerant CP4 and GOX genes as a selectable marker in wheat transformation. *Plant Cell Reports*, 15, 159-163, doi:10.1007/BF00193711

Zhu J.K. (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6 (2), 66-71, doi: 10.1016/S1360-1385(00)01838-0

## 7. ANEXOS

Anexo 1. Etapas del proceso de transformación, proteínas/ estructura involucrada, y función en la transformación genética mediada por *A. tumefaciens* de acuerdo a Gelvin (2010).

| Proceso de transformación                       | Proteína de la planta/ estructura involucrada                                       | Función                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fijación bacteriana / formación de biofilm      | Proteína de Arabinogalactan AtAGP17                                                 | Las proteínas arabinogalactan son proteínas altamente glicosiladas que se localizan en las paredes celulares de las plantas o se secretan en el apoplasto. AGP17 es importante para que <i>Agrobacterium</i> pueda unirse a las raíces y la supresión de respuestas de defensa de la célula hospedera.                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                                                 | Celulosa sintasa CsIA-09                                                            | Enzimas biosintéticas de carbohidratos de pared celular. CsIA-09 está altamente expresado en la zona de alargamiento de la raíz, la región preferentemente susceptible de transformación. La interrupción del gen que codifica CsIB-05, aumenta la susceptibilidad a la transformación                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                                                 | Celulosa sintasa CsIB-05                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|                                                 | Reacción de proteínas de defensa de la planta                                       | Las plantas con defensas debilitadas, especialmente a través de la inactivación de la vía de señalización SA, son hipersusceptibles a la transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| T-ADN y transferencia de proteína de virulencia | Proteínas del dominio Reticulon BTI1 (AtRTNLB1), BTI2 (AtRTNLB2), y BTI3 (AtRTNLB4) | Interactuaron específicamente con VirB2. BTI-1 / AtRTNLB1 localiza en la membrana plasmática de la planta, mientras que BTI-2 / AtRTNL2 y BTI- 3 / AtRTNL4 se localizan en el retículo endoplásmico. Las auto- y hetero interacciones entre estas proteínas sugieren que pueden formar un complejo en la membrana plasmática de la planta para mediar la transferencia de proteínas T-DNA y Vir en la planta. Las proteínas del dominio reticulón son ubicuas en eucariotas y pueden servir como receptores para el T-pilus durante las etapas iniciales de la transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> . |
|                                                 | GTPasa Rab8                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Tráfico citoplasmático                          | Microtúbulos / quinasina                                                            | Importin $\alpha$ interactúan con el dominio peptídico de las señales de localización nuclear de VirD2. Identificaron dos proteínas interactivas VirE2, VIP1 y VIP2. VIP1 interactúa específicamente con VirE2, pero no con VirD2. VIP1 es importante para la transformación y las funciones más probables en la importación nuclear, aunque también puede desempeñar un papel en la integración del T-ADN en el genoma vegetal. Las cadenas T se producen como un super complejo – T compuesto de VirD2-T-cadenas, VirE2, VIP1, e importación $\alpha$ . La                                                     |
|                                                 | Actina y Miosina                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|                                                 | Cyclophilina                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Objetivo nuclear                                | Importin $\alpha$                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|                                                 | Importin $\beta$ /Transportador                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|                                                 | Kinasa CAK2Ms                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

|                                                                 |                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                 | Proteína fosfatasa 2C (PP2C)         | fosforilación de componentes súper complejo-T es probablemente importante para esta orientación. VirD2 es una fosfoproteína que se une y se fosforila por CAK2Ms, una quinasa activadora de quinasa dependiente de ciclina. VirD2 también interactúa con una proteína fosfatasa 2C (PP2C), que puede catalizar la desfosforilación de VirD2. La fosforilación de VIP1 también es importante Para la transformación mediada por Agrobacterium. La proteína histona H2A-1 ha sido implicada en la integración del T-DNA en el genoma de la planta. GALLS-FL y GALLS-CT contienen una secuencia de T4SS requerida para la exportación a células vegetales. GIP interactúa con GALLS-FL en el núcleo y con GALLS-CT en el citoplasma.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                                                 | VIP1                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|                                                                 | Caspasa                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|                                                                 | GALLS proteínas de interaccion (GIP) |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| ADN-T con objetivo a cromatina                                  | CAK2Ms                               | CAK2Ms fosforila VirD2, también fosforila la subunidad más grande de ARN polimerasa II. La fosforilación de esta subunidad recluta la proteína de unión a la caja de TATA, y la transcripción puede así iniciar. La fosforilación de esta subunidad recluta la proteína de unión a la caja de TATA, y la transcripción puede así iniciar. VirD2 también puede asociarse con la proteína de unión a TATA. Los autores sugirieron que la asociación de VirD2 con la proteína de unión a la caja de TATA puede guiar a las cadenas T a las regiones transcripcionalmente activas de la cromatina para su integración. hebras T se integran aleatoriamente en el genoma sin tener en cuenta la secuencia del ADN, la actividad transcripcional o el estado de metilación del ADN. Por lo tanto, el direccionamiento de sitios potenciales de integración de ADN-T puede depender más de proteínas de cromatina generales (tales como histonas) que de proteínas específicas para la transcripción. La proteína VIP1 interactúa con varias histonas, La región C-terminal de VIP1 es necesaria para esta interacción. Esta región de VIP1 es también importante para la integración de T-DNA. VIP1 no sólo interactúa con las histonas, sino que también dirige la interacción in vitro de complejos de ADN-T que consisten en ADN de una sola hebra, VIP1 y VirE2 con monómeros de nucleosomas. Por lo tanto, VIP1 puede actuar como un puente molecular para guiar las cadenas T a la cromatina de la planta para su posterior integración. |
|                                                                 | VIP1                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| proteínas de eliminación Vir / ADN-T y proteínas de estabilidad | proteínas Ask/Skp                    | VirF es una proteína de la caja F que es probable que se incorpore en los complejos SCF importante para el marcaje de proteínas con ubiquitina y dirigiéndolos para la proteólisis por el proteosoma 26S. VirF también se asocia con complejos T-strand / VIP1 / VirE2 / nucleosoma, lo que sugiere que VirF está dirigido a nucleosomas para facilitar la                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                                                                 | Caspasa                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|                                                                 | Histonas                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|                                                                 | pCsn5-1                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

|                                     |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                     |                                 | proteolisis de proteínas asociadas al complejo T antes de T-ADN integración en el genoma de la planta                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Integración de T-ADN                | ADN ligasa IV                   | Unión final no homologa (NHEJ). La NHEJ utiliza una serie de proteínas para reparar la ruptura de doble hebra, incluyendo Ku70, Ku80, XRCC4 y ADN ligasa IV. Ku80 desempeña un papel directo en la integración de T-ADN en el genoma de la planta. Las proteínas VIP1 y VIP2 también desempeñan un T-ADN integración. Transformación mediada por Agrobacterium, incluyen histona desacetilasas y acetiltransferasas, factores de ensamblaje de nucleosomas, dominio de proteínas SET y ADN metiltransferasas. |
|                                     | Ku70, Rad50, Mre11, Xrs2, Sir4  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                                     | Ku80                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                                     | VIP1                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                                     | VIP2                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                                     | Histonas                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                                     | Ensamblaje de nucleosomas CAF-1 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                                     | Histona H3 chaperona SGA1       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                                     | Histona desacetilasas           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Expresión de transgén               | Histonas H2A, H3-11, Y H4       | La sobreexpresión de la histona H2A-1 del gen HTA1 produce un aumento de Transformación mediada Agrobacterium. En general, la importancia de las histonas es la estabilidad del transgén entrante y consecuentemente, expresión transgénica                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Susceptibilidad a la transformación | Factor de transcripción Myb     | Este factor de transcripción myb puede reducir la susceptibilidad a Agrobacterium mediada transformación mediante la activación de la defensa del huésped respuestas a Agrobacterium.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

Anexo 2. Factores de importancia para la transgénesis de trigo: la cepa de *Agrobacterium*, vector binario, inoculación y co-cultivo.

| Cultivar o genotipo                                                                                       | Tipo de explante              | Cepa <i>Agrobacterium tumefaciens</i>     | Vector                              | Inoculación                                       | Co-cultivo (días) | Acetosiringona ( $\mu\text{M}$ ) | Referencia                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| Yumai66, Lunxuan208, Bobwhite                                                                             | Embriones maduros             | <i>Agrobacterium</i> cepa C58C1           | pUbiGN                              | $\text{OD}_{650} = 0.7$ , 15min                   | 2                 | 200                              | Wang <i>et al.</i> , (2009)         |
| Triticum aestivum variedades: HD2329, CPAN1676, PBW343 y Triticum durum variedades: PDW215, PDW233, WH896 | Embriones maduros             | <i>Agrobacterium</i> cepa LBA4404         | p35SGUISNT<br>pBI101<br>pCAMBIA3301 | $\text{OD}_{600} = 0.5 - 1.0$ , 60min             | 2-3               | 200                              | Patnaik <i>et al.</i> , (2006)      |
| <i>Triticum aestivum</i> L. variedades: Sourav, Gourav, Kanchan y Protiva                                 | Embriones maduros e inmaduros | <i>Agrobacterium</i> cepa LBA4404, EHA105 | pBI121<br>pCAMBIA1301               | $\text{OD}_{600} = 0.6 - 1.0$ , 50min             | 3-4               | DNM                              | Sarker & Biswas, (2002)             |
| Triticum durum variedad PDW215                                                                            | Embriones maduros             | <i>Agrobacterium</i> cepa LBA4404         | pCAMBIA3301                         | $5 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ células/ml, 60min | 3                 | 200                              | Vishnudasana <i>et al.</i> , (2005) |
| Triticum aestivum L. variedad EM12                                                                        | Embriones maduros             | <i>Agrobacterium</i> cepa LBA4404         | pBI121                              | $\text{OD}_{660} = 1.0 - 2.0$ , 15min             | 2-3               | 200                              | Ding <i>et al.</i> , (2009)         |
| <i>Triticum aestivum</i> L. variedades: cv Hesheng 3, Yan 103 y Yanyou 361.                               | Embriones inmaduros           | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101   | pROK2                               | $\text{OD}_{600} = 1.0$ , 30-45min                | 2-3               | 100                              | Xue <i>et al.</i> (2004).           |
| Triticum aestivum variedad Bobwhite                                                                       | Embriones inmaduros           | A. tumefaciens C58 (ABI)                  | pMON18365                           | $\text{OD}_{660} = 1.0 - 1.5$ , 180min            | 2-3               | 200                              | Cheng <i>et al.</i> (1997).         |
| T. aestivum variedad Chinese Spring                                                                       | Embriones inmaduros           | EHA105                                    | pCB2006                             | $\text{OD}_{660} = 1.0 - 1.5$ , 180min            | 2-3               | 200                              | Li <i>et al.</i> (2016)             |

DNM=Dato no mostrado

Anexo 3. Concentraciones de fosfinotricina y kanamicina en la selección de callos transformados de trigo

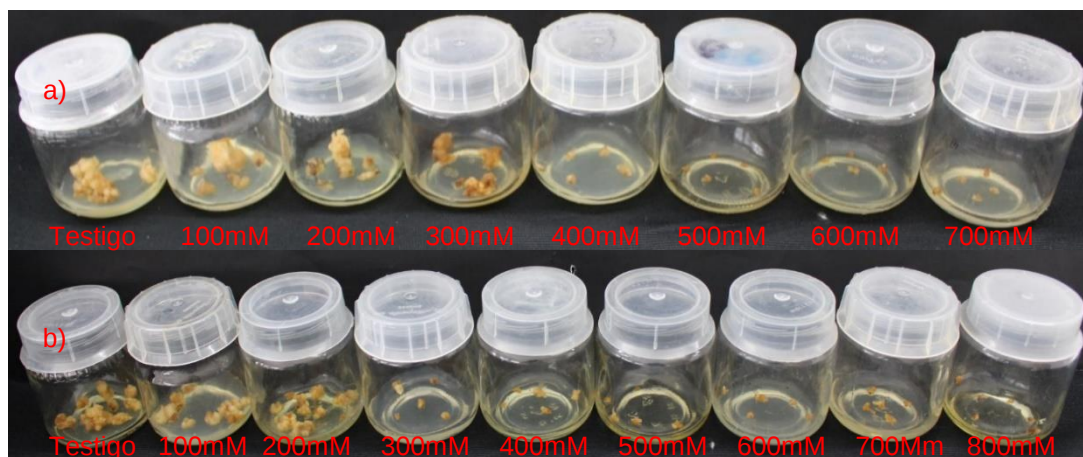
| Tipo de explante    | Gen   | Concentración                         | Periodo         | Referencia                     |
|---------------------|-------|---------------------------------------|-----------------|--------------------------------|
| Embriones maduros   | Bar   | 5 mg L <sup>-1</sup> fosfinotricina   | 6 semanas       | Patnaik <i>et al.</i> , (2006) |
|                     | NPTII | SNU                                   | NSP             |                                |
| Embriones maduros   | Bar   | SNU                                   | NSP             | Ding <i>et al.</i> , (2009)    |
|                     | NPTII | 50 mg L <sup>-1</sup> kanamicina      | 2-3semanas      |                                |
| Embriones inmaduros | Bar   | 2-4 mg L <sup>-1</sup> fosfinotricina | 3-4 semanas     | Wu <i>et al.</i> , (2003)      |
|                     | NPTII | 100 mg L <sup>-1</sup> kanamicina     | 3-4 semanas     |                                |
| Embriones inmaduros | Bar   | 1 mg L <sup>-1</sup> fosfinotricina   | 6 semanas       | Mitic <i>et al.</i> , (2004)   |
|                     | NPTII | SNU                                   | NSP             |                                |
| Embriones inmaduros | Bar   | 10 mg L <sup>-1</sup> fosfinotricina  | 3 semanas(cada) | Jones <i>et al.</i> , (2005)   |
|                     | NPTII | SNU                                   | NSP             |                                |

SNU= Sustancia no utilizada, NSP= No se presenta periodo

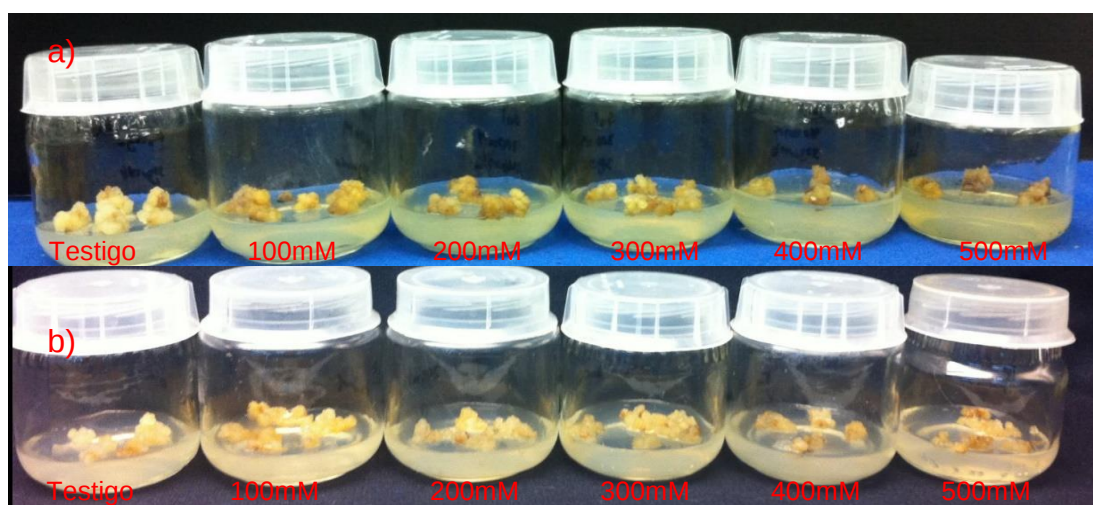
Anexo 4. Comparación del uso de las fitohormonas 2,4-D y picloram de autores en medios de regeneración

| Especie /explante                          | Tipo de fitohormona            | Medio formación de callo | Medio de regeneración |             | Referencia                          |
|--------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------|-----------------------|-------------|-------------------------------------|
|                                            |                                | Medio MS4C               | Medio MMSOC-2         | Medio MMSOC |                                     |
| <i>Triticum aestivum</i><br>Embrión maduro | 2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )    | 0.5                      | 0.2                   | 0.0         | Valenzuela <i>et al.</i> ,<br>2012) |
|                                            | Picloram (mg L <sup>-1</sup> ) | 2.4                      | 2.4                   | 0.0         |                                     |
| Triticum aestivum L.<br>Embrión inmaduro   | 2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )    | 0.5                      | 0.2                   | 0.0         | Cheng <i>et al.</i> ,<br>(1997)     |
|                                            | Picloram (mg L <sup>-1</sup> ) | 2.2                      | 0.0                   | 0.0         |                                     |
| Triticum aestivum L.<br>Embrión inmaduro   | 2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )    | 0.5                      | 0.2                   | 0.0         | Zhou <i>et al.</i> , (1995)         |
|                                            | Picloram (mg L <sup>-1</sup> ) | 2.2                      | 0.0                   | 0.0         |                                     |
| Triticum aestivum L.<br>Embrión inmaduro   | 2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )    | 0.5                      | 2.0                   | 0.0         | Haliloglu y<br>Baenziger, (2005).   |
|                                            | Picloram (mg L <sup>-1</sup> ) | 2.2                      | 0.0                   | 0.0         |                                     |
| Triticum aestivumL.<br>Embrión inmaduro    | 2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )    | 2.0                      | 0.2                   | 0.0         | Hu <i>et al.</i> , (2003)           |
|                                            | Picloram (mg L <sup>-1</sup> ) | 0.0                      | 0.0                   | 0.0         |                                     |
| Triticum aestivum<br>Embrión maduros       | 2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )    | 2.0                      | 0.0                   | 0.0         | Moghaieb <i>et al.</i> ,<br>(2010)  |
|                                            | BA(mg L <sup>-1</sup> )        | 0.0                      | 2                     | 0.0         |                                     |

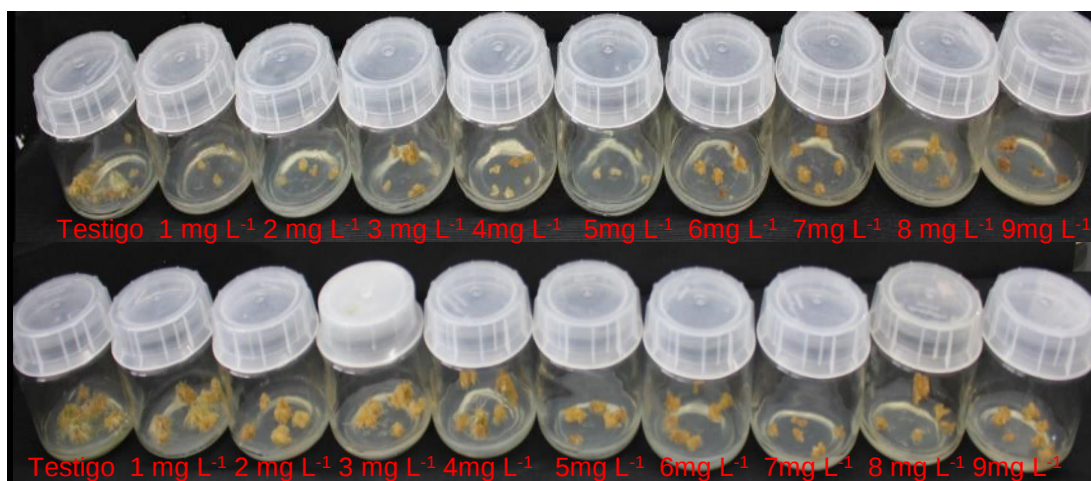
Anexo 5. Figuras referentes a presión de selección a sorbitol, NaCl, fosfotricina, kanamicina y meropenem.



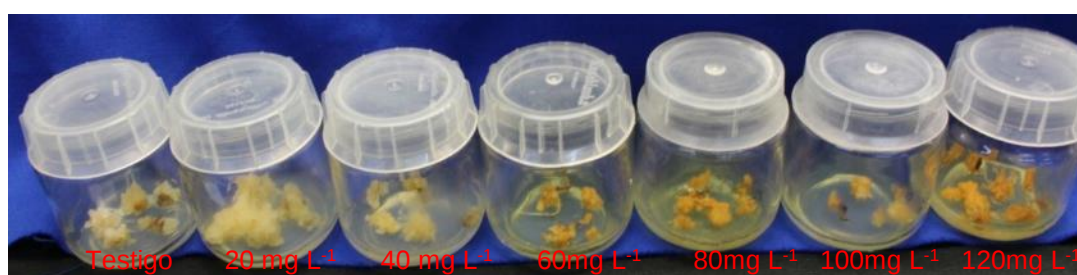
Sorbitol: a) presión de selección a variedad Rebeca F2000, b) presión de selección a variedad Kronstad F2004, al tercer mes de exposición



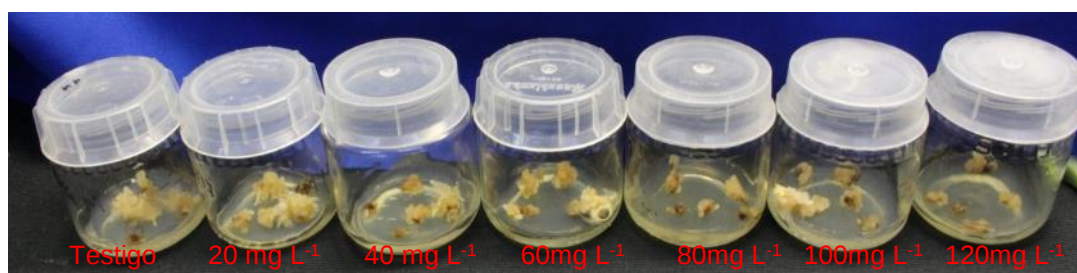
NaCl: a) presión de selección a variedad Rebeca F2000, b) presión de selección a variedad Kronstad F2004, al tercer mes de exposición



Fosfotricina: a) presión de selección a variedad Rebeca F2000, b) presión de selección a variedad Kronstad F2004, al segundo mes de exposición



Kanamicina: a) presión de selección a variedad Kronstad F2004, al primer mes de exposición



Meropenem: a) toxicidad a meropenem de la variedad Kronstad F2004, al primer mes de exposición.