



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
INSTITUTO DE HORTICULTURA**

**REGENERACIÓN Y AGROINFECCIÓN DE PLANTAS *in vitro*
DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

PRESENTA:

BEQUER MOISÉS LÓPEZ RUIZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DR. JOSE OSCAR MASCORRO GALLARDO

Chapingo, Estado de México, Junio de 2019



REGENERACIÓN Y AGROINFECCIÓN DE PLANTAS *in vitro*
DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)

Tesis realizada por Bequer Moisés López Ruiz bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

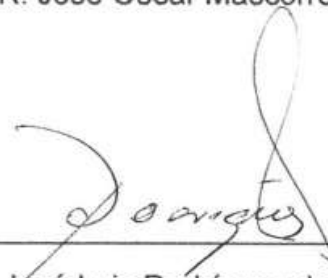
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR:



DR. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESOR:



DR. José Luis Rodríguez de la O

ASESORA:



DRA. Alejandrina Robledo Paz

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	vii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	viii
RESUMEN GENERAL.....	ix
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Generalidades del trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	4
2.1.1 Importancia del trigo en la dieta humana	4
2.1.2 Características genéticas y citogenéticas del trigo.....	4
2.1.3 Descripción Botánica.....	5
2.1.4 Condiciones óptimas de cultivo	5
2.2 Revolución Verde	6
2.3 Biotecnología del trigo	6
2.4 Cultivo <i>in vitro</i> de trigo	7
Embriogénesis somática.....	7
2.4.1 Factores que intervienen en los procesos morfogénico de trigo	8
2.5 Importancia de análisis histológicos en ES.....	11
2.6 Genes que intervienen en la embriogénesis somática de trigo.....	12
2.7 Transformación genética en trigo	13
2.7.1 Biobalística.....	13
2.7.2 Agroinfección	14
2.7.3 Proceso de infección.....	14

2.8	Transgénesis en trigo	16
2.9	Estrés abiótico (sequía y salinidad)	18
2.10	Gen <i>AVP1</i>	19
3	LITERATURA CITADA GENERAL	21
4	ARTÍCULO 1.....	35
4.1	INTRODUCCIÓN.....	37
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
4.2.1	Material vegetal	38
4.2.2	Desinfestación del explante	38
4.2.3	Inducción de callos.....	39
4.2.4	Cinética de crecimiento	39
4.2.5	Regeneración	39
4.2.6	Análisis estadístico.....	41
4.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.3.1	Inducción de callos.....	41
4.3.2	Regeneración.....	43
4.3.3	Enraizamiento	44
4.3.4	Cinética de crecimiento de los callos	45
4.4	CONCLUSIONES	47
4.5	LITERATURA CITADA	47
5	ARTÍCULO 2.....	51
5.1	INTRODUCCIÓN.....	53
5.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	54

5.2.1	Transformación por agroinfección	54
5.2.2	Regeneración	55
5.2.3	Análisis enzimático.....	56
5.2.4	Segundo experimento de selección.	56
5.2.5	Análisis estadístico.....	57
5.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
5.3.1	Ensayos de expresión estable	57
5.3.2	Transformación de <i>AVP1</i> en trigo	59
5.3.3	Selección a NaCl, sorbitol y fosfinotricina	59
5.3.4	Regeneración.....	61
5.3.5	Selección de callos con base a su resistencia al NaCl, fosfinotricina y sorbitol.	62
5.4	CONCLUSIONES	66
5.5	LITERATURA CITADA	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.Composición de los medios de cultivo utilizados en la formación de callos, regeneracion de brotes y raíz de trigo.	40
Cuadro 2. Formación de callos en embriones maduros de dos variedades de trigo.....	42
Cuadro 3.Regeneración brotes a partir de callos morfogenicos de trigo.	43
Cuadro 4. Enraizamiento de los brotes de dos variedades de trigo bajo el efecto de diferentes concentraciones de la auxina (AIA).....	45
Cuadro 5. Selección de resistencia a kanamicina en callos de trigo en un periodo de 30 días.	57
Cuadro 6. Efecto de los agentes selectivos sobre la selección de callos resistentes de trigo.....	60
Cuadro 7. Regeneración de brotes a partir de callos de trigo de la variedad Kronstad resistentes a agentes selectivos.....	61
Cuadro 8. Selección de callos de trigo, posiblemente transformado bajo el efecto de tres agentes selectivo.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

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 germinando en el que varios primordios de los brotes son visibles. Imágenes tomadas de Ozias-Akins y Vasil, (1982) y Ozias-Akins y Vasil, (1983).	8
Figura 2. Estructuras de la semilla de trigo y su germinación (<i>Triticum aestivum</i> 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 estructura del embrión. Imagen tomada de la página http://www.seedbiology.de/	12
Figura 4. Incremento en peso fresco del callo embriogénico obtenido a partir de embriones maduros de las variedades Kronstad F2004 y Rebeca F2000.....	45
Figura 3. Cultivo in vitro de trigo a partir de embriones maduros: proceso morfogénico del inicio y desarrollo de los callos hasta la regeneración de brotes y raíz de las variedades Kronstad F2004 (a,b,c,d,e,f,g,h) y Rebeca F2000 (i,j,k,l,m,n,ñ,o): Semillas asépticas (a,i), aislamiento del embriones maduros bajo un estereoscópico (b,j), inducción de la proliferación celular después de cuatro días (c,k), eliminación de partes no regenerantes a las dos semanas (las líneas rojas muestran la parte a eliminar)(d,l), apariencia nodular y compacta de los callos de color blanco amarillento visibles a las tres semanas obtenido al eliminar estructuras no regenerantes (e,m), síntesis de clorofila (áreas verdes pigmentadas dentro de las estructuras embriogénicas) y desarrollo de órganos (tejido verde en la superficie) a las cinco semanas (f,n) y la regeneración de plántulas (g,ñ) expuestos a la luz después de seis semanas. Formacion de raíz	

a las siete semanas (raíces ligeramente desarrolladas con crecimiento lateral) (h,o).	46
Figura 5. Ensayos de expresión estable del gen <i>GUS</i> en callo agroinfectados con la cepa EHA105 (a, b, c, d). (callos de seis semanas de edad y 30 días después de la agroinfección).	58
Figura 6. Diferenciación de brotes en callos resistentes a kanamicina (a). Expresión estable del gen <i>GUS</i> en brotes (b, c, d).	58
Figura 7. Evaluación de resistencia a diferentes agentes selectivos en callos trigo Kronstad en un periodo de 30 días.	60
Figura 8. Diferenciación de brotes en callos resistentes a los agentes selectivos. NaCl ₂ (200 mM) (a), fosfinotricina (8 mg L ⁻¹) (b).	61
Figura 9. Efecto de tres agentes selectivos en la selección de callos presunatemnte transformados en trigo al segundo mes de exposición.	63
Figura 10. Explantes de trigo con tolerancia a diferentes agentes selectivo después de dos meses de selección (izquierda el control (I) y derecha callo presuntamente transformado (D)). NaCl (a, b), sorbitol (c, d) y fosfinotricina (e,f).	64

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el financiamiento otorgado para llevar a cabo mis estudios de posgrado.

A mi comité asesor: **José Oscar Mascorro Gallardo, Dr. José Luis Rodríguez de la O y la Dra. Alejandrina Robledo Paz**, por su asesoría, correcciones y contribuciones para realizar este trabajo de investigación.

Al equipo técnico del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitotecnia.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Bequer Moisés López Ruiz
Fecha de nacimiento	07 de abril de 1993
Lugar de nacimiento	San Pedro el porvenir, La Trinitaria, Chiapas.
CURP:	LORB930407HCSPZQ03
Profesión:	Ingeniero en Biotecnología
Cédula profesional:	10246489

Desarrollo académico

Bachillerato: 2008 -2011	EMSaD 110 JERUSALEN” Las Margaritas, Chiapas
Licenciatura: 2012- 2016	Ingeniero en Biotecnología. Universidad Tecnológica de la Selva. Ocosingo, Chiapas.

RESUMEN GENERAL

Regeneración y agroinfección de plantas *in vitro* de trigo (*Triticum aestivum* L.)¹

La insuficiencia de agua y altas concentraciones de sales en el suelo son una limitante para la producción del trigo; así el desarrollo de cultivos resistentes a estas condiciones obliga a explorar la ingeniería genética. El objetivo de la presente investigación fue optimizar el sistema de regeneración y transformación genética con el gen *AVP1* por agroinfección de callos derivados de embriones maduros de trigo (*Triticum aestivum* L.). Se logró un alto potencial de callogénesis y una regeneración eficiente en las dos variedades estudiadas (Rebeca y Kronstad). Sin embargo, sólo Kronstad fue seleccionada para el experimento de transformación. Se determinó la efectividad de la cepa EHA105 (pGUSint), al mostrar una mejor expresión durante la agroinfección y luego fue utilizada para transferir el transgen *AVP1* en el vector pTF101, en la selección del mejor agente selectivo que resultó ser NaCl₂ en la etapa de callos, aunque no se logró una regeneración eficiente vislumbra la posibilidad de seguir explorándolo en futuros estudios.

Palabras clave: Agroinfección, gen *AVP1* embriogénesis, embriones maduros, trigo.

¹ Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Bequer Moisés López Ruiz
Director: Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

GENERAL SUMMARY

Regeneration and agroinfection of plants *in vitro* of wheat (*Triticum aestivum* L.)²

Insufficient water and high concentrations of salts in soil are a limiting factor for wheat production; thus, the development of crops resistant to these conditions makes it necessary to explore genetic engineering. The objective of this research was to optimize the system of regeneration and genetic transformation with the AVP1 gene by agroinfection of calluses derived from mature wheat embryos (*Triticum aestivum* L.). High callogenesis potential and efficient regeneration were achieved in the two varieties studied (Rebeca and Kronstad). However, only Kronstad was selected for the transformation experiment. The effectiveness of the EHA105 strain (pGUSint) was determined, showing a better expression during the agroinfection and then it was used to transfer the AVP1 transgen in the pTF101 vector, in the selection of the best selective agent that turned out to be NaCl₂ in the callus stage, although an efficient regeneration was not achieved and the possibility of further exploring it in future studies was foreshadowed.

Key words: Agroinfection, gene *AVP1*, somatic embryogenesis, mature embryos, wheat.

² Thesis of Master of Science in Agricultural Biotechnology, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Bequer Moisés López Ruiz
Advisor: Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Al igual que el arroz (*Oryza sativa*) y el maíz (*Zea mays* L.), el trigo (*Triticum aestivum* L.) es uno de los tres cereales más importantes del mundo, alimentando a más de un tercio de la población mundial principalmente como fuente de energía, proteínas, vitaminas, antioxidantes, fibras y minerales (Poudel y Bhatta 2016). En 2018, el rendimiento mundial del trigo se estimó en 756.8 millones de toneladas, los países líderes en la producción de este grano son EE.UU, Canadá, la Federación de Rusia, Ucrania, la India, Pakistán, Australia, China, Argentina y Brasil (FAO, 2018).

En la actualidad una de las limitantes de la producción de este cereal se debe a estrés abiótico, en particular la sequía y salinidad. La sequía reduce fuertemente el rendimiento de los cultivos y se espera que aumente debido al cambio de clima (Kang *et al.*, 2009). Las altas temperaturas y la falta de lluvia causados por el cambio climático inducen este tipo de ambiente secos que tendrán un grave impacto en la agricultura (Becker *et al.*, 2016; Gupta *et al.*, 2017). Debido a que la agricultura es el mayor consumidor de agua dulce, ya que con un 80% y aproximadamente el 90 % de todo el trigo es irrigado por lo que el estrés por sequía es un factor que limita la producción agrícola (Brown, 2004).

La salinidad es otro factor ambiental que causa pérdidas sustanciales en la productividad (Hauser y Horie 2010), ya que aproximadamente más del 6 % de la superficie terrestre a nivel mundial está constituida por suelos salinos particularmente en áreas agrícolas irrigadas y zonas semiáridas donde se encuentran en mayor proporción (Guan *et al.*, 2014; Rahnama *et al.*, 2011).

Las plantas por sí solas han desarrollado mecanismo de defensa para adaptarse a condiciones ambientales más exigentes (Almeselmani *et al.*, 2012), y la variabilidad generada se sigue aprovechando en los programas de

fitomejoramiento de trigo en un lento progreso para la obtención de nuevas variedades considerando la rapidez con la que se presentan las amenazas causadas por el estrés abiótico. La ingeniería genética es una herramienta importante como complemento a los programas de mejoramiento convencional para este cultivo, especialmente mediante la incorporación de genes de interés provenientes de otros organismos al genoma del trigo para el desarrollo de plantas genéticamente modificadas (Chaves y Oliveira, 2004).

El gen (AVP1) de *Arabidopsis thaliana* es uno de los genes que se han utilizado en los últimos años para generar plantas transgénicas tolerantes a sequía y salinidad; este gen, codifica a la H⁺ pirofosfatasa vacuolar, lo que confiere a las plantas mayor tolerancia a sal y sequía (Gaxiola *et al.*, 2001). El gen AVPI, en forma experimental, se ha expresado en cereales como arroz (Zhao *et al.*, 2007) y cebada (Schilling *et al.*, 2013). Todavía, no existen antecedentes sobre la inserción del gen en trigo por lo que centra el interés en este estudio.

Aunque se ha avanzado significativamente en la generación de organismos transgénicos, el trigo se encuentra entre las últimas especies en ser modificadas genéticamente debido a dificultades metodológicas en la regeneración *in vitro* y la transformación genética. Un sistema de regeneración eficiente, es la base para poder utilizar la ingeniería genética. De acuerdo a estos antecedentes en la presente investigación nos planteamos los siguientes objetivos e hipótesis:

Objetivo general

Optimizar el sistema de regeneración y transformación genética con el gen *AVP1* por agroinfección de callos derivados de embriones maduros de trigo (*Triticum aestivum* L.).

Objetivos particulares:

Optener un protocolo eficiente para la regeneración *in vitro* de trigo mediante embriogénesis somática a partir de embriones maduros.

Determinar la efectividad de *Agrobacterium tumefaciens* mediante ensayos de transformación con el gen reportero GUS

Determinar el mejor método de selección (fosfinotricina, NaCl₂, sorbitol) de los presuntos trasgénicos que contengan el gen *AVP1*.

Hipótesis

Es posible regenerar *in vitro* y agroinfectar callos embriogénicos de trigo.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del trigo (*Triticum aestivum* L.)

2.1.1 Importancia del trigo en la dieta humana

El trigo se estima que fue domesticado en el suroeste de Asia (Gupta, 2004), y durante 8.000 años, ha sido la base de la alimento básico de las grandes civilizaciones de Europa, el Occidente de Asia y África del Norte e introducido en el continente americano desde 1520. Hoy en día este cereal sigue siendo una fuente de granos importantes, alimentando a más de un tercio de la población mundial debido a que cumple con la dieta alimenticia con el 21% de las calorías totales y el 20% de las necesidades de proteínas (Shewry *et al.*, 2013).

En México, el trigo es la tercera especie de granos más cultivado después del maíz y frijol, en el año 2015 la producción reportada alcanzó los 3.9 millones de toneladas, los estados que sobresalen en la producción de este cereal son: Sonora, Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Baja california sur y Sinaloa (SIAP, 2015). Entre las variedades cultivadas en México 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), que son variedades mejoradas con características de interés agronómico: de alto rendimiento y resistencia a enfermedades. Los granos de este cereal no se consumen de manera directa, más bien se utiliza para producir una gran variedad de alimentos, sobre todo en la industria de la panificación en la elaboración de pan, pasteles, galletas, tortillas.

2.1.2 Características genéticas y citogenéticas del trigo

Kihara (1919) y Sax (1922) reportaron que el género *Triticum*, tiene tres genomas diferentes, cada uno de ellos contiene un número básico de cromosomas que es siete. Tanto el género *Aegilops* como el *Triticum* (6 especies y 17 subespecies) pertenecen a un complejo de especies silvestres y

domésticas cuyos miembros alopoliploides evolucionaron a partir de la hibridación (Kimber y Sears, 1987), con el mismo número de cromosómico ($n = 7$), y pueden dividirse en tres niveles de ploidía (es decir, diploide $2n = 2X=14$, tetraploide $2n = 4X= 28$ y hexaploide $2n=6X=42$).

El trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) es una especie allohexaploide con un genoma de gran tamaño ($2n = 6x = 42$, BBAADD; aproximadamente 17 Gb) son ricas en secuencias repetitivas (Hiei et al. 2014; Ozgen et al. 2015; Singh y Prasad, 2015; Tiwari et al. 2016). 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).

2.1.3 Descripción Botánica

El trigo es una planta anual de la clase monocotiledónea, familia de las gramíneas (Poaceae), subfamilia *poideae*, y del género *Triticum* (van Slageren, 1994).

2.1.4 Condiciones óptimas de cultivo

El trigo es adaptado a una amplia gama de condiciones de humedad, y es el más cultivado en la superficie terrestre en todo el mundo que cualquier otro cultivo. Aproximadamente tres cuartas partes de la superficie de cultivo de trigo recibe entre 375 y 875 mm de precipitación anual, este cereal puede cultivarse en territorios donde la precipitación oscila entre 250 y 1.750 mm. La temperatura óptima de crecimiento es de 25 °C, con temperaturas mínimas de 3 a 4°C y máximas de 30 a 32°C respectivamente (Briggle y Curtis, 1987).

El trigo se le clasifica según su hábito de crecimiento en dos estaciones: primavera e invierno. Los trigos de invierno, se siembran en otoño aprovechando la humedad para germinar y convertirse en plantas jóvenes durante el invierno que permanecen en fase vegetativa retomando su

crecimiento a inicios de primavera con la ventaja de adquirir eficazmente el calor del sol, y las lluvias tempranas. El trigo de primavera se planta en este periodo y madura a finales de veranos, pero puede sembrarse en otoño en países con inviernos suaves, como el sur de Asia, el norte de África y el medio Oriente (CIMMyT, 1989).

2.2 Revolución Verde

La aplicación de una serie de avances tecnológicos dentro de esta estrategia global para incrementar el cultivo de trigo, se basó en el impulso del mejoramiento genético y una mejor fertilización. El primer objetivo fue reducir la altura de trigo generando variedades semienanas sustituyendo a los cultivos de trigos más altos y antiguos para aumentar la superficie de plantación a un ritmo de 2 millones de ha al año con un mayor rendimiento de grano en la década de 1980. También se confirió insensibilidad al fotoperíodo y resistencia vertical a la roya. Los rendimientos se incrementaron 3X en 4 ó 5 décadas (Byerlee y Moya, 1993).

2.3 Biotecnología del trigo

Durante las últimas décadas, el desarrollo de cultivos biotecnológicos ha adquirido importancia mediante el desarrollo de la ingeniería genética, que permite la incorporación de características deseadas como la tolerancia a los herbicidas, la resistencia a las enfermedades y la mejora de la calidad en los cultivos de nuestra elección (James, 2003). El primer trigo transgénico producido por ingeniería genética fue desarrollado por Monsanto el evento MON 71800, comercialmente conocido como trigo Roundup Ready TM, este trigo es tolerante a glifosato y lleva el gen CP4-EPSPS modificado (ISAAA, 2010). Hasta ahora, no se cultiva trigo transgénico comercialmente, aunque se han realizado muchas pruebas de campo, como en el caso del CIMMyT quien utilizó el gen (DREB1A) de *Arabidopsis thaliana* para mejorar las características

del trigo hacia la tolerancia a la sequía, baja temperatura y salinidad (ISAAA, 2010). De esta manera, esta tecnología puede ser utilizada con éxito para desarrollar trigo transgénico adaptable a las tensiones ambientales y aumentar la producción de trigo en el actual escenario de cambio climático en beneficio de los agricultores y de las naciones de todo el mundo (GMO, 2016).

2.4 Cultivo *in vitro* de trigo

Las metodologías de transformación de cereales requiere de contar con protocolos eficientes de cultivo *in vitro* de trigo y una de la técnica de propagación *in vitro* más utilizada, es a través de la embriogénesis somática (Jones, 2005; Li *et al.*, 2012).

Embriogénesis somática

La embriogénesis somática, consiste en el desarrollo *in vitro* de embriones completo que no son el producto de una fusión gamética, a partir de cultivos de células-. El embrión somático en una estructura bipolar que cuentan con un meristemo radical y otro apical de manera similar a los embriones zigóticos, y no poseen conexión vascular con el tejido materno; se desarrollan a partir de células somáticas que adquieren competencia embriogénica a través de los estadios embrionarios característicos (Figura 2), bajo condiciones específicas capaces de crecer y formar una planta completa (Deporte *et al.*, 2014; Abdelnour y Escalant, 1994).

Se conocen dos tipos de embriogénesis somática, la directa y la indirecta. La directa se caracteriza por la inducción de embriones somáticos sin la proliferación de callos, mientras que en la indirecta, los embriones somáticos se desarrollan a partir de callos embriogénicos (Quiroz *et al.*, 2006). El callo es una conjunto de células desorganizadas con la capacidad de dividirse que se obtienen con la aplicación de reguladores de crecimiento específicos en el medio nutritivo (Naqvi *et al.*, 2002).

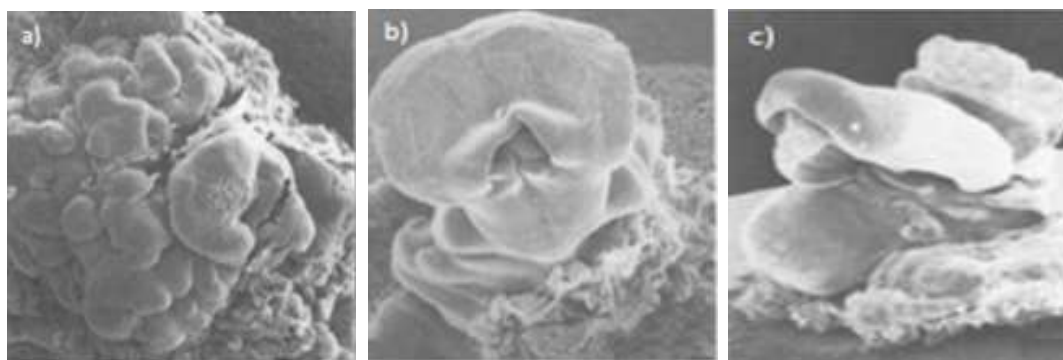


Figura 1. Micrografía electrónica de barrido de estructuras en trigo: a) callos embrionarios a 16 días de edad, forma nodular, b) embrión somático con dos meristemos apicales c) Embrión germinando en el que varios primordios de los brotes son visibles. Imágenes tomadas de Ozias-Akins y Vasil, (1982)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

2.4.1 Factores que intervienen en los procesos morfogénico de trigo

Varios factores intra y extracelulares afectan las respuestas del trigo al cultivo *in vitro*, específicamente en la formación de callos embriogénicos y regeneración de plantas. (Mitić *et al.*, 2006). Los aspectos que más influyen en general, en orden de importancia, son el explante, genotipo y medio de cultivo y sus interacciones. (Chen *et al.*, 2006).

Explantes. Todos los explantes difieren en su respuesta a la inducción y regeneración de callos (Delporte *et al.*, 2001), siendo los embriones inmaduros y maduros los más utilizados. Se han logrado obtener un alto porcentaje de respuesta de regeneración con embriones maduros como explantes superior a la de los embriones inmaduros. (Özgen *et al.*, 1998) y también se han obtenidos plantas transgénicas (Patnaik *et al.*, 2006). Puede ser utilizado como sustituto valioso de los embriones inmaduros debido al fácil acceso en la recolección de embriones maduro, almacenamiento en forma de semillas secas, disponibilidad de todo el año (Ding *et al.*, 2009), y expresan mínima variabilidad en su estado fisiológico importante para el cultivo de tejidos vegetales (Yu *et al.*, 2008). Los embriones maduros (ME) proporcionan una

alternativa de bajo costo y ahorro de tiempo para un sistema de regeneración para el desarrollo de la biotecnología de trigo (Xia *et al.*, 2012).

Genotipo. En especies de cereales el genotipo es de importancia primordial y tiene un gran efecto en la inducción del callo y la regeneración de plantas (Ozgen *et al.*, 1998). En el caso del trigo, el genotipo es determinante en la respuesta *in vitro* a la transformación y regeneración (Zale *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2005). La respuesta del cultivo de tejidos de trigo es de naturaleza poligénica (Bregitzer y Campbell, 2001) y puede transmitirse por herencia (Chevrier *et al.*, 1990).

Medio de cultivo. La composición del medio de cultivo influye de manera significativa los procesos del cultivo de tejidos (Przetakiewicz *et al.*, 2003; Tamas *et al.*, 2004). La formulación de sales básica utilizada en el medio nutritivo propuesto por Murashige y Skoog, (1962), suplementado con vitaminas, reguladores de crecimiento, azúcares, aminoácidos y coadyuvantes tienen un efecto pronunciado en las respuesta morfogénicas *in vitro* de trigo. En la mayoría de las especies monocotiledónea el medio MS es frecuentemente usado para la inducción de la embriogénesis somática (Zaidi *et al.*, 2000). También se ha reportado otros medios como el de Gamborg (medio B5) (Davey y Anthony, 2010.).

a). Reguladores de crecimiento. En la mayoría de las especies vegetales las auxinas y citocininas constituyen uno de los grupos más importantes y de uso frecuente (Pullman *et al.*, 2005). La auxina natural como el ácido indol-3-acético (AIA) y las sintéticas como el ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 4- amino-3,5,6 tricloropicolínico (picloram), ya sea por sí solas o en combinación con las citocininas como 1-Phenyl-3-(1,2,3-Thia-Diazol-5-YL) urea (tidiazurón) (TDZ) favorecen la inducción y regeneración de callos e iniciación de raíces en trigo en concentraciones adecuadas.

En cereales, la auxina sintética 2,4-D es el regulador más utilizado en la inducción y proliferación de callos (Wen *et al.*, 1991). En cultivo de tejidos de trigo, el 2,4-D es efectivo con diferente grado de éxito (Slater *et al.*, 2008). Concentraciones altas de 2, 4-D, pueden generar inestabilidad cromosómica que conduce a la variación somaclonal (Mendoza y Kaeppler, 2002; Satyavathi *et al.*, 2004). En contraste concentraciones muy bajas disminuye la capacidad embriogénica del cultivo (Vasil y Vasil, 1982); una concentración adecuada de 2, 4-mejora la calidad de respuesta de embriogénesis somática (Ozias-Akins y Vasil, 1982; Viertel y Hess, 1996). La combinación de auxinas, especialmente 2,4-D y picloram en el medio han sido buenos inductores en el proceso de embriogénesis somática en diferentes genotipos de trigo al utilizar embriones maduros (Valenzuela *et al.*, 2012).

La aplicación de TDZ en cultivo de tejidos de cereales es reciente (Shan *et al.* 2000; Ganeshan *et al.* 2006; Gairi y Rashid 2004; Sharma *et al.*, 2004, 2005). Biológicamente, el TDZ convierte los nucleótidos de citocinina en nucleósidos más activos (Capelle *et al.*, 1983) y estimula acumulación de citocininas endógenas (Thomas y Katterman 1986).

El TDZ en combinación con el (2,4-D) promovió alta frecuencia de regeneración de trigo (hasta 97%) (10 brotes por explantes) a partir de callos derivados de embriones maduros del trigo (Parmar,*et al.*, 2012). El TDZ debería utilizarse en el cultivo de embriones maduros por su alta eficiencia de regeneración (Chauhan *et al.* 2007).

b) Otros. Los carbohidratos como sacarosa, glucosa, y la maltosa son las fuentes de carbono más utilizadas en el medio de cultivo de tejidos, que influye en gran medida en la embriogénesis somática y la regeneración eficiente de las plantas. Se ha encontrado que la maltosa mejora el crecimiento de los callos y regeneración en trigo (Mendoza y Kaeppler, 2002). La hidrólisis lenta de maltosa a glucosa aumenta una alta osmolaridad y constante en el medio favoreciendo la producción de callos efectivos (Mendoza y Kaeppler, 2002).

La adición de aminoácidos y coadyuvantes en el medio nutritivo como glutamina, hidrolizado de caseína (CH) que es una fuente de nitrógeno orgánico (Mendoza y Kaeppler, 2002), prolina (Ganeshan *et al.*, 2006), prolina (Chauhan *et al.*, 2007), asparagina (Bi y Wang 2008) y ácido aspártico, triptófano (Yu *et al.*, 2008) es importante en la regeneración *in vitro*.

2.5 Importancia de análisis histológicos en ES

La naturaleza física de los callos embriogénicos para regenerar plántulas aun no es un criterio identificativo ya que pueden ser organogénico o embriogénico este hecho por sí solo no proporciona información completa acerca de los mecanismos implicados en la ocurrencia de la embriogénesis somática (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). Es necesario realizar cortes histológicos entre células o agrupaciones embriogénicas y no embriogénicas para dilucidar el mecanismo involucrado en la determinación del tipo celular apropiado en la germinación de plantas.

En el cultivo de embriones maduros de trigo de acuerdo con Delporte *et al.* (2014), al analizar la histología de callo, determino que la regeneración de brotes se generó a partir del embrión globular de las diferentes etapas de la embriogénesis somática y la formación del inicio del callo se originó en las proximidades del nódulo escutelar (mesocótilo) de la semilla (Figura 2).

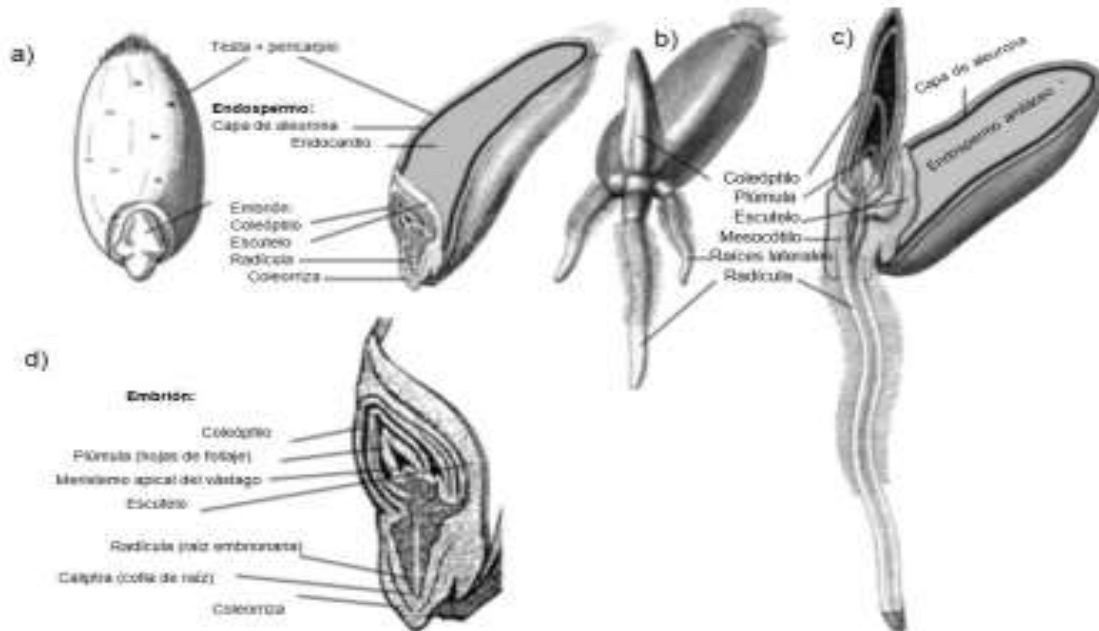


Figura 2. Estructuras de la semilla de trigo y su germinación (*Triticum aestivum* L.):a) estructuras de la semilla de trigos b) germinación del embrión c) estructuras utilizadas en cultivo in vitro: epicotilo (plúmula), y mesocótilo d) desarrollo de la estructura del embrión. Imagen tomada de la página <http://www.seedbiology.de/>

2.6 Genes que te intervienen en la embriogénesis somática de trigo

Se han identificado genes que están potencialmente involucrados en la embriogénesis somática en embriones maduros e inmaduros de trigo mediante estudios de transcriptoma (Chu *et al.*, 2017). Como genes relacionados con la respuesta al estrés (Jin *et al.*, 2014; Tyankova y Zagorska 2001; Salvo *et al* 2014) que desempeñan un papel clave en la embriogénesis somática

Genes como la proteína de choque térmico (*HSP*), proteína germinativa (*GLP*), embriogénesis abundantes tardía (*LEA*), proteína cinasa dependiente de calcio (*CDPK*)/ calmodulina (*CAM*), glutatión s-transferasa (*GST*) y proteína de transferencia de lípidos (*LTP*), que están potencialmente involucrados en la formación de callos embriogénicos en trigo (Chu *et al.*, 2017).

También tres genes de receptores quinasa de embriogénesis somática(*SERK*) , *TaSERK1* , *TaSERK2* y *TaSERK3* han sido aislados y caracterizados en cultivos de base de hoja de *Triticum aestivum* (Singla *et al.*, 2008). Este gen *TaSERK*, también se ha encontrados en callos embriogénicos de trigo en cultivo de embriones maduros de trigo como adquisición / mantenimiento de competencia embriogénica (Delporte *et al.*, 2013).

2.7 Transformación genética en trigo

La mejora del cultivo de trigo con características deseadas por ingeniería genética requiere de procedimientos básicos para poder transferir e integrar establemente y expresar genes foráneos de interés en adecuados explantes regenerarles (Patnaik y Khurana, 2001).

Se han utilizados numerosos métodos para la inserción del material genético al genoma del trigo pero dos métodos predominan: el método de transformación por biobalística (transferencia directa del ADN a través bombardeo de microproyectiles) y la agroinfección mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (Beltrán *et al.*, 2003).

2.7.1 Biobalística

Una técnica que consiste en disparar microproyectiles de oro o tungsteno recubiertos de ADN plasmídico a alta velocidad que atraviesan la pared celular y se pueda integrar y expresar de manera estable en el núcleo de la célula vegetal mediante un dispositivo de aceleración. Vasil *et al.* (1992) obtuvieron las primeras plantas transgénicas de trigo fértil despues de utilizar la técnica de biobalística.

El uso de la biobalística se desarrolló a raíz de la necesidad de lograr la transformación genética en cereales que hasta entonces no se había podido lograr por agroinfección , por que se pensaba que *Agrobacterium* solo podía transformar plantas dicotiledóneas. Luego aparecieron reportes exitosos que era factible transformar las monocotiledóneas mediante agroinfección.

Una de las desventajas de utilizar el sistema de transformación por biobalística, es el daño a las células, el costo de equipo, y los posibles reordenamiento extenso del ADN y múltiples eventos de integración, y alto números de copias que puede llevar a la inactivación posterior de los transgenes (Meyer, 1995; Anand *et al.*, 2003; Howarth *et al.*, 2005).

2.7.2 Agroinfección

Es un sistema de transformación de plantas basado en *Agrobacterium tumefaciens*, esta bacteria es un patógeno vegetal que inicia la formación de tumores en la mayoría de las especies dicotiledóneas y algunas especies monocotiledóneas (DeCleene y DeLay, 1976). Las cepas virulentas de *Agrobacterium* contienen un gran plásmido conocido como Ti (inductor de tumores) en el citoplasma (Benítez, 2005).

Una pequeña porción del plásmido Ti, conocido como ADN-T, se incorpora al ADN cromosómico nuclear de la célula de la planta huésped (Hansen *et al.*, 1977). El ADN-T contiene los genes necesarios para la biosíntesis de hormonas vegetales (auxinas y citocininas) responsables del crecimiento del tumor y la formación de compuestos conjugados de aminoácido-azúcar, denominados opinas que pueden servir como fuentes de carbono y, a veces, de nitrógeno para la bacteria (Tempé y Petit, 1982). La capacidad que tiene *Agrobacterium tumefaciens* para la transferencia de genes hacia las plantas facilita su utilización como un vector para la manipulación genética.

2.7.3 Proceso de infección

La interacción entre *Agrobacterium* y células vegetales es un proceso complejo que involucra varios pasos: reconocimiento, virulencias (Vir), expresión génica, unión a la célula huésped, orientación de los factores Vir y ADN-T en la célula huésped e integración cromosómica del ADN-T (Pitzschke y Hirt, 2010).

Inicia con la unión de *Agrobacterium* a la superficie celular de la planta, se liberan compuestos fenólicos por parte de la célula vegetal (acetosiringona), se

induce la expresión del gen vir A de manera constitutiva y la proteína Vir A (receptor proteina-kinasa que se autofosforila) es activada por compuestos fenólicos y activa entonces al gen Vir G (factor de transcripción) que produce la activación de otros genes de la región vir. Las proteínas VirD1 y VirD2 actúan en forma conjunta como una endonucleasa y liberan la cadena del T-DN. Luego se une la proteína VirE al ADN-T y se forma el complejo T que protege al DNA de la degradación. Las Proteínas codificadas en vir B forman un canal que posibilita la transferencia. Las proteínas VirD2 y Vir E2 permiten el reconocimiento molecular para el ingreso del ADN-T al núcleo y luego se produce la integración al genoma vegetal

En la mayoría de las especies vegetales, la transferencia de genes por *Agrobacterium* es el método de transformación genética de elección, debido que ofrece varias ventajas sobre la biobalística incluida la integración estable de un segmento de ADN en el genoma de la planta ,generalmente resulta en un menor número de copias de genes insertado , menos reordenación del transgén ,mayor estabilidad de la expresión durante generaciones y de menor costo (Hansen et al., 1997; Shibata y Liu 2000 ; Dai et al., 2001).

Se han desarrollado metodologías reproducibles eficientes de transformación por agroinfección en monocotiledóneas particularmente en los principales cereales que alimentan a la humanidad como el arroz (*Oryza sativa* L.) (Hiei et al., 1994; Cheng et al., 1998) y el maíz (*Zea mays* L.) (Ishida et al, 1996), debido a las dificultades que se enfrentó durante mucho en las gramíneas, tras mejoras adicionales finalmente se fueron mejorando este protocolo de transformación mediante el co-cultivo , el empleo de cepas supervirulentas y la presencia de acetosiringona un potente inductor genes de virulencia estos permitieron por primera vez la transformación exitosa en trigo mediada por *Agrobacterium* en callos embriogénicos a partir de embriones inmaduros para producir plantas transgénicas fértiles (Cheng et al.,1997).

2.8 Transgénesis en trigo

Varios factores intervienen en el proceso de transformación por agroinfección en plantas monocotiledóneas, incluidos los cereales (Cheng *et al.*, 2004). Estos factores incluyen la cepa de *Agrobacterium*, tipo de vector, condiciones de densidad celular, tiempo: durante el precultivo, la inoculación y el cocultivo, agentes inductores como acetosiringona, antibióticos, y genes marcadores de selección (Jones *et al.*, 2005; Bhalla *et al.*, 2006; Opabode, 2006; Kumlehn y Hensel, 2009).

Cepa de *Agrobacterium*. Se han realizado muchos estudios para identificar las cepas hospederas en relación con los genotipos de trigo (Jones *et al.*, 2005). Después del primer reporte exitoso de una transformación estable en este cereal usando la cepa de *A. tumefaciens* C58 (Cheng *et al.*, 1997; Haliloglu y Baenziger, 2003), recientemente se han encontrados nuevos reportes de alta eficiencia en transformaciones trigo con cepas de *A. tumefaciens* EHA105 (Bhushan y Kumar 2015), LBA4401 (Patnaik y Khurana, 2006; Wang y colleagues, 2002; Ding *et al.*, 2009; Moghaieb *et al.*, 2010) y GV3101 (Xue *et al.*, 2004).

Vector binario. Se han construidos plásmidos (vectores) Ti binarios adecuados que pueden ser introducidos en las cepas de *A. tumefaciens* y que conducen a una mejor eficiencia de transformación en trigo (Khanna y Daggard, 2003; Cheng *et al.*, 2004). Estos vectores binarios, comprende un plásmido Ti desarmado y un vector de clonación con la región ADN-T modificada, pero la denominación se refiere en la interacción de dos plásmidos (un vector de clonación, denominados binario y un vector Ti desarmado al que se eliminó la región ADN-T silvestre y aporta la región *vir* necesaria para el procesamiento del ADN-T modificado del vector binario, que porta el gen de interés y el gen de selección compatibles que complementan sus funciones en trans.

Precultivo. Se ha descrito una alta eficiencia de transformación en trigo cuando los explantes son pre cultivados durante un tiempo antes de la

inoculación, la tasa de supervivencia fue mayor en contraste en explantes recién aislados (Cheng *et al.*, 1997). Ding *et al.* (2009), al pre cultivar durante dos semanas embriones maduros de trigo logro una mejor tasa de transformación.

Inoculación. Es el proceso de inmersión de los explantes de trigo en una suspensión de cultivo líquido de *Agrobacterium tumefaciens* (Ding *et al.*, 2009), donde intervienen varios factores claves como: tiempo de exposición, temperatura, densidad óptica de *Agrobacterium* y la adición de inductores. Amoah *et al.* (2001); Yang *et al.* (2008) reportaron que hay una disminución de la eficiencia de transformación después de 2 a 3 horas de inoculación. Con respecto a la temperatura de inoculación el intervalo recomendado va de 22 - 28°C (Cheng *et al.*, 2003; Mitic *et al.*, 2004; Supartana *et al.*, 2006

La adición de un compuesto fenólico como la acetosiringona en un intervalo de 100 a 400 µM es factor clave en la transferencia del ADN-T (Xue *et al.*, 2004; He *et al.*, 2010). Se encontró una alta eficiencia de transformación al utilizar una concentración de 200 µM (Wu *et al.*, 2003; Amoah *et al.*, 2001). La densidad óptica de *Agrobacterium* va de 600 nm cerca de 1.0 (Khanna y Daggard, 2003; Jones *et al.*, 2005), a esta absorbancia se ha reportado la mayor eficiencia de transformación.

Co-cultivo. Al transcurrir el tiempo de inoculación, se elimina el exceso de las bacterias de los explantes y son transferidos en un medio de co-cultivo por 2-3 días para una mayor eficiencia de transformación (Wu *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2009). Es necesario, adicionar nuevamente la acetosiringona 200 µM en el medio de co-cultivo para facilitar la transferencia de ADN-T (Wu *et al.*, 2003).

Cuando *Agrobacterium* se inocula a alta densidad, temperaturas altas o durante periodos prolongados puede producirse un crecimiento excesivo de la bacteria que promueve la muerte de los explantes. Por lo que es necesario eliminar por completo a *Agrobacterium* después del co-cultivo adicionando antibióticos en los medios de selección y regeneración. Comúnmente se usan los

antibióticos β -lactámicos que inhiben la síntesis de la pared celular inhibiendo el crecimiento bacteriano (Ogawa y Mii, 2007). como el Meropenem (Yarizade *et al.*, 2012) en la transformación genética en trigo.

Gen reportero. En la agroinfección de trigo es recomendable llevar a cabo ensayos de expresión transitoria y/o estable para determinar los parámetros óptimos para la transformación estable sobre explantes de los que se pueden regenerar plantas completas. El más común es el gen reportero *GUS* que codifica la enzima β -glucuronidasa (Hensel *et al.*, 2009), que por medio de una reacción histoquímica, utilizando el substrato X-Gluc se puede identificar una coloración azul en el explante (Wakui *et al.*, 2003).

Genes de selección. Los genes de selección son comúnmente usados en la transformación en trigo mediado por *Agrobacterium* porque codifican a proteínas que permiten diferenciar de los eventos transformados y los no transformados, las células genéticamente transformadas van a crecer en presencia de los agentes selectivo. La resistencia a los antibióticos y herbicidas son el sistema de selección más utilizado en este cereal. El primero es el gen *nptII* codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia al antibiótico kanamicina y el segundo es el gen *bar* codifica para la enzima fosfinotricina acetil transferasa que confiere resistencia a herbicidas basados en glufosinato de amonio (Jones y Shewry, 2009).

2.9 Estrés abiótico (sequía y salinidad)

La sequía y la salinidad son unos de los principales agentes abióticos que limitan fuertemente la productividad agrícola de las especies de todo el mundo (Dixon *et al.*, 2009). Combinados, ocasionan una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares en las plantas que afectan negativamente el crecimiento y la productividad de los cereales (Dhlamini *et al.*, 2005).

Se necesitan variedades de trigo que confieran tolerancia a estos factores adversos, debido que la mayoría de las especies de cultivo son glicófitas (sensibles a salinidad) entre ellas el trigo (Munns y James, 2003 ;Colmer *et al.*, 2005). El crecimiento y el rendimiento de grano del trigo se ven afectados significativamente por la salinidad del suelo (Garg y Gupta 1999).

La salinidad del suelo expone a la planta, a estrés osmótico, toxicidad de iones y deficiencias iones en cultivos de cereales (Colmer *et al.*, 2005; Munns y Tester, 2008), lo que implica que todas las respuestas fisiológicas, que son involucradas por el estrés salino, también pueden ser observadas en el estrés por sequía (Miller *et al.*, 2002).

En consecuencia, el estrés salino daña a las células vegetales, reduciendo la absorción de agua, la expansión celular, presión de turgencia y el desarrollo. La alta captación de iones Na^+ en las hojas promueve clorosis, necrosis y senescencia de las hojas debido a la reducción de fotosíntesis (Munns, 2002 ; Munns *et al.*, 2006 y Horie *et al.*, 2012)

Una forma de mejorar la tolerancia a salinidad del suelo en algunas plantas glicófitas como el trigo, se basa en la capacidad de expulsar el Na^+ de las células o secuestrándolo en la vacuola (Zhe-Yong *et al.*, 2004), este proceso, evita la acumulación de Na^+ en el citoplasma, que resulta ser tóxico para las proteínas y facilita una mejor absorción de agua en las células vegetales (Blumwald, 2000). La tolerancia a sal es un rasgo complejo que es controlado por múltiples genes como *SOS1*, *NHX* y *AVP1-H⁺* que se han sobre expresado para la obtención de plantas transgénicas y la estrategia que ha dado mejores resultados en los últimos años ha sido el gen *AVP1-H⁺* que codifica la H^+ -pirofosfatasa vacuolar por lo que se presta atención en este estudio.

2.10 Gen AVP1

El gen *AVP1* codifica una H^+ - pirofosfatasa (H^+ -PPasa) (Li *et al.*,2005) , una proteína de membrana vacuolar que realiza el transporte activo primario y

funciona como una bomba de protones y obtiene su energía del hidrólisis de pirofosfato inorgánico (Taiz y Zeiger, 2006).

La sobre expresión del gen *AVP1* en *Arabidopsis* permitio generar plantas trasgenicas con mayor tolerancia a sequía y salinidad (Gaxiola *et al.*, 2001); así como en otras especies como; tomate (Park *et al.*, 2005), arroz (Zhao *et al.*, 2007), alfalfa (Bao *et al.*, 2009), pasto (*Agrostis stolonifera*) (Li *et al.*, 2010), algodón (Pasapula *et al.*, 2011), cacahuete o maní (*Arachis hypogaea*) (Qin *et al.*, 2013) y cebada (Schilling *et al.*, 2014).

La tolerancia a sequía y salinidad de las plantas transformadas con el gen *AVP1* se atribuye a la actividad de la bomba de protones H^+ en la membrana vacuolar para mover más H^+ en las vacuolas, aumentando el gradiente electroquímico de protones que activa antiporte Na^+ / H^+ vacuolar, *AtNHX1* facilitando el secuestro de Na^+ en la vacuola (Duan *et al.*, 2007; Gaxiola *et al.*, 2001). Asimismo favorece el secuestro de otros solutos (iones y azúcares) en la vacuola, disminuyendo el potencial hídrico, que facilitará el movimiento del agua del suelo a las células de la raíz de la planta (Gaxiola *et al.*, 2002)

La sobre expresión de *AVP1* facilita el flujo de auxinas debido a la interacción con el transportador de auxinas PIN 1, que conduce a un mayor crecimiento de raíces, brotes y una mejor captación de fósforo, obteniendo plantas transgénicas más robustas con un mayor cantidad de raíces capaces de absorber el agua de manera más eficiente bajo condiciones de estrés (Li *et al.*, 2005, Yang *et al.*, 2007).

3 LITERATURA CITADA GENERAL

- Almeselmani, M., Saud, A. A., Al-zubi, K., Hareri, F., Al-nassan, M., Ammar, M. A., Al-gazawy, A. (2012). Physiological attributes associated to water deficit tolerance of Syrian durum wheat varieties. *Experimental Agriculture and Horticulture*, 8, 21–41.
- Amoah, B. K., Wu, H., Sparks, C., & Jones, H. D. (2001). Factors influencing Agrobacterium-mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue. *Journal of Experimental Botany*, 52(358), 1135–1142. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.358.1135>
- Anand, A., Trick, H. N., Gill, B. S., & Muthukrishnan, S. (2003). Stable transgene expression and random gene silencing in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 1(4), 241–251. <https://doi.org/10.1046/j.1467-7652.2003.00023.x>
- Bao, A.-K., Wang, S.-M., Wu, G.-Q., Xi, J.-J., Zhang, J.-L., & Wang, C.-M. (2009). Overexpression of the Arabidopsis H⁺-PPase enhanced resistance to salt and drought stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Science*, 176(2), 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.10.009>
- Becker, S. R., Byrne, P. F., Reid, S. D., Bauerle, W. L., McKay, J. K., & Haley, S. D. (2016). Root traits contributing to drought tolerance of synthetic hexaploid wheat in a greenhouse study. *Euphytica*, 207(1), 213–224. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1574-1>
- Beltrán, J. P., Porter, J.-P. (et al) B., Olmedo, F. G., & Pere, P. (2003). *Plantas transgénicas*. Universidad de Salamanca.
- Bhalla, P. L., Ottenhof, H. H., & Singh, M. B. (2006). Wheat transformation – an update of recent progress. *Euphytica*, 149(3), 353–366. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9087-6>
- Bhushan, S. (2015). An Efficient Agrobacterium Mediated Transformation Method in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Trends in Biosciences*, 8, 3131–3134.
- Bi, R., & Wang, H. (2008). Primary studies on tissue culture from mature embryos in diploid and tetraploid wheat. *Frontiers of Agriculture in China*, 2(3), 262–265. <https://doi.org/10.1007/s11703-008-0038-y>
- Blumwald, E. (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(4), 431–434.
- Blumwald, Eduardo. (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(4), 431–434. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00112-5](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00112-5)

- Bo, Y., Liping, D., & Lu, Y. (2008). Effect of seedling ages and inoculation durations with *Agrobacterium tumefaciens* on transformation frequency of the wheat wounded apical meristem. *Molecular Plant Breeding*. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CN2009000308>
- Bregitzer, P., & Campbell, R. D. (2001). Genetic Markers Associated with Green and Albino Plant Regeneration from Embryogenic Barley Callus. *Crop Science*, 41(1), 173–179. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.411173x>
- Brown, L. R. (2012). *Outgrowing the Earth : The Food Security Challenge in an Age of Falling Water Tables and Rising Temperatures*. <https://doi.org/10.4324/9781849772112>
- Burraco, A. B. (2005). *Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas*. Reverte.
- Byerlee, D., & Moya, P. (1993). *Impacts of International Wheat Breeding Research in the Developing World, 1966-1990*. CIMMYT.
- Camacho-Casas, M. A., Figueroa-López, P., Fuentes-Dávila, G., Chávez-Villalba, G., Peña-Bautista, R. J., Valenzuela-Herrera, V., ... 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. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2007-09342010000100012&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Capelle, S. C., Mok, D. W. S., Kirchner, S. C., & Mok, M. C. (1983). Effects of Thidiazuron on Cytokinin Autonomy and the Metabolism of N6-(Δ^2 -Isopentenyl)[8- 14 C]Adenosine in Callus Tissues of *Phaseolus lunatus* L. *Plant Physiology*, 73(3), 796–802. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1066551/>
- Chauhan, H., Desai, S. A., & Khurana, P. (2007). Comparative analysis of the differential regeneration response of various genotypes of *Triticum aestivum*, *Triticum durum* and *Triticum dicoccum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91(3), 191–199. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9285-5>
- Chaves, M. M., & Oliveira, M. M. (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*, 55(407), 2365–2384. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh269>
- Chen, J., Yue, R., Xu, H., & Chen, X. (2006). Study on Plant Regeneration of Wheat Mature Embryos Under Endosperm-Supported Culture. *Agricultural Sciences in China*, 5(8), 572–578. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(06\)60094-1](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(06)60094-1)
- Cheng, M., Fry, J. E., Pang, S., Zhou, H., Hironaka, C. M., Duncan, D. R., ... Wan, Y. (1997). Genetic Transformation of Wheat Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*, 115(3), 971–980. <https://doi.org/10.1104/pp.115.3.971>

- Cheng, Ming, Hu, T., Layton, J., Liu, C.-N., & Fry, J. E. (2003). Desiccation of plant tissues post-Agrobacterium infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 39(6), 595–604. <https://doi.org/10.1079/IVP2003471>
- Cheng, Ming, Lowe, B. A., Spencer, T. M., Ye, X., & Armstrong, C. L. (2004). Factors influencing Agrobacterium-mediated transformation of monocotyledonous species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 40(1), 31–45. <https://doi.org/10.1079/IVP2003501>
- Chevrier, N., Qureshi, J. A., Kartha, K. K., & Hucl, P. (1990). HERITABILITY OF IN VITRO REGENERATION IN WHEAT (*Triticum aestivum* L.). *Canadian Journal of Plant Science*, 70(2), 547–550. <https://doi.org/10.4141/cjps90-067>
- Chu, Z., Chen, J., Sun, J., Dong, Z., Yang, X., Wang, Y., ... Cui, D. (2017). De novo assembly and comparative analysis of the transcriptome of embryogenic callus formation in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology*, 17(1), 244. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1204-2>
- Colmer, T. D., Munns, R., & Flowers, T. J. (2006). Improving salt tolerance of wheat and barley: future prospects. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45(11), 1425–1443. <https://doi.org/10.1071/EA04162>
- Dai, S., Zheng, P., Marmey, P., Zhang, S., Tian, W., Chen, S., ... Fauquet, C. (2001). Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding*, 7(1), 25–33. <https://doi.org/10.1023/A:1009687511633>
- Davey, M. R., & Anthony, P. (2010). *Plant Cell Culture: Essential Methods*. John Wiley & Sons.
- De Cleene, M., & De Ley, J. (1976). The host range of crown gall. *The Botanical Review*, 42(4), 389–466. <https://doi.org/10.1007/BF02860827>
- Delporte, F., Mostade, O., & Jacquemin, J. M. (2001). Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67(1), 73–80. <https://doi.org/10.1023/A:1011697316212>
- Delporte, Fabienne, Muhovski, Y., Pretova, A., & Watillon, B. (2013). Analysis of expression profiles of selected genes associated with the regenerative property and the receptivity to gene transfer during somatic embryogenesis in *Triticum aestivum* L. *Molecular Biology Reports*, 40(10), 5883–5906. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2696-y>
- Delporte, Fabienne, Pretova, A., du Jardin, P., & Watillon, B. (2014a). Morpho-histology and genotype dependence of in vitro morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. *Protoplasma*, 251(6), 1455–1470. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0647-7>

- Delporte, Fabienne, Pretova, A., du Jardin, P., & Watillon, B. (2014b). Morpho-histology and genotype dependence of in vitro morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. *Protoplasma*, 251(6), 1455–1470. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0647-7>
- Dhlamini, Z., Spillane, C., Moss, J. P., Ruane, J., Urquia, N., & Sonnino, A. (2005). Status of research and application of crop biotechnologies in developing countries: preliminary assessment. *Status of Research and Application of Crop Biotechnologies in Developing Countries: Preliminary Assessment*. Recuperado de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20066708707>
- Ding, L., Li, S., Gao, J., Wang, Y., Yang, G., & He, G. (2009a). Optimization of Agrobacterium-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. *Molecular Biology Reports*, 36(1), 29–36. <https://doi.org/10.1007/s11033-007-9148-5>
- Ding, L., Li, S., Gao, J., Wang, Y., Yang, G., & He, G. (2009b). Optimization of Agrobacterium-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. *Molecular Biology Reports*, 36(1), 29–36. <https://doi.org/10.1007/s11033-007-9148-5>
- Dixon, J. (2008). *Overview: Transitioning Wheat Research to Serve the Future Needs of the Developing World*. 46.
- Dixon, J., Braun, H. J., & Crouch, J. H. (2008). *Overview: Transitioning wheat research to serve the future needs of the developing world*. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=QY2016801192>
- Duan, X.-G., Yang, A.-F., Gao, F., Zhang, S.-L., & Zhang, J.-R. (2007). Heterologous expression of vacuolar H⁺-PPase enhances the electrochemical gradient across the vacuolar membrane and improves tobacco cell salt tolerance. *Protoplasma*, 232(1), 87–95. <https://doi.org/10.1007/s00709-007-0268-5>
- E.g, H. (1987). Wheat and wheat improvement. 2nd ed. *Agronomy (USA)*. No. 13. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19900002691>
- Feldman, M., & Levy, A. A. (2012). Genome Evolution Due to Allopolyploidization in Wheat. *Genetics*, 192(3), 763–774. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.146316>
- Gairi, A., & Rashid, A. (2004). TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2,4-D. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76(1), 29–33. <https://doi.org/10.1023/A:1025864605846>
- Ganeshan, S., Chodaparambil, S. V., aga, M. B., Fowler, D. B., Hucl, P. J., Rossnagel, B. G., & Chibbar, R. N. (2005). In vitro regeneration of cereals based on multiple shoot induction from mature embryos in response to thidiazuron.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 85, 63–73.
<https://doi.org/10.1007/s11240-005-9049-z>

- Garg, B. K., & Gupta, I. C. (2000a). Physiology of salt tolerance of arid zone crops VIII. Sorghum. *Current Agriculture*, 24(1/2), 9–22. Recuperado de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013102204>
- Garg, B. K., & Gupta, I. C. (2000b). Physiology of salt tolerance of arid zone crops VIII. Sorghum. *Current Agriculture*, 24(1/2), 9–22. Recuperado de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013102204>
- Gaxiola, R. A., Fink, G. R., & Hirschi, K. D. (2002). Genetic Manipulation of Vacuolar Proton Pumps and Transporters. *Plant Physiology*, 129(3), 967–973. <https://doi.org/10.1104/pp.020009>
- Gaxiola, R. A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L. M., Allen, G. J., Alper, S. L., & Fink, G. R. (2001a). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11444–11449. <https://doi.org/10.1073/pnas.191389398>
- Gaxiola, R. A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L. M., Allen, G. J., Alper, S. L., & Fink, G. R. (2001b). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11444–11449. <https://doi.org/10.1073/pnas.191389398>
- Guan, R., Qu, Y., Guo, Y., Yu, L., Liu, Y., Jiang, J., ... Qiu, L. (2014). Salinity tolerance in soybean is modulated by natural variation in GmSALT3. *The Plant Journal*, 80(6), 937–950. <https://doi.org/10.1111/tpj.12695>
- Gupta, P. K., Balyan, H. S., & Gahlaut, V. (2017). QTL Analysis for Drought Tolerance in Wheat: Present Status and Future Possibilities. *Agronomy*, 7(1), 5. <https://doi.org/10.3390/agronomy7010005>
- Haliloglu, K., & Baenziger, P. (2003). Agrobacterium tumefaciens mediated wheat transformation. *Cereal Research Communications*, 31, 9–16.
- Hansen, G., Shillito, R. D., & Chilton, M.-D. (1997). T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(21), 11726–11730. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11726>
- Hauser, F., & Horie, T. (2010). A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K⁺/Na⁺ ratio in leaves during salinity stress. *Plant, Cell & Environment*, 33(4), 552–565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02056.x>
- He, Y., Jones, H. D., Chen, S., Chen, X. M., Wang, D. W., Li, K. X., ... 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. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq035>

- Hensel, G., Kastner, C., Oleszczuk, S., Riechen, J., & Kumlehn, J. (2009). Agrobacterium-Mediated Gene Transfer to Cereal Crop Plants: Current Protocols for Barley, Wheat, Triticale, and Maize [Research article]. <https://doi.org/10.1155/2009/835608>
- Hiei, Y., Ishida, Y., & Komari, T. (2014). Progress of cereal transformation technology mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00628>
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., & Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6(2), 271–282. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1994.6020271.x>
- Horie, T., Karahara, I., & Katsuhara, M. (2012). Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants. *Rice*, 5(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1939-8433-5-11>
- Hortelano Santa Rosa, R., Villaseñor Mir, H. E., Martínez Cruz, E., Rodríguez García, M. F., Espitia Rangel, E., & Mariscal Amaro, L. A. (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(5), 713–725. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2007-09342013000500005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Howarth, J. R., Jacquet, J. N., Doherty, A., Jones, H. D., & Cannell, M. E. (2005). Molecular genetic analysis of silencing in two lines of *Triticum aestivum* transformed with the reporter gene construct pAHC25. *Annals of Applied Biology*, 146(3), 311–320. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2005.040121.x>
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T., & Kumashiro, T. (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Nature Biotechnology*, 14(6), 745. <https://doi.org/10.1038/nbt0696-745>
- J, D., H.J, B., P, K., & J.H, C. (2009). *Wheat Facts and Futures 2009*. CIMMYT.
- James, C. (2003). Global review of commercialized transgenic crops. *Current Science*, 84(3), 303–309. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/24107414>
- Jin, F., Hu, L., Yuan, D., Xu, J., Gao, W., He, L., ... Zhang, X. (2014). Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. *Plant Biotechnology Journal*, 12(2), 161–173. <https://doi.org/10.1111/pbi.12123>
- Jones, H. D. (2005). Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *Journal of Cereal Science*, 41(2), 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.08.009>

- Jones, H. D., Doherty, A., & Wu, H. (2005). Review of methodologies and a protocol for the Agrobacterium-mediated transformation of wheat. *Plant Methods*, 1(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-1-5>
- Jones, H. D., & Shewry, P. R. (Eds.). (2009). *Transgenic Wheat, Barley and Oats: Production and Characterization Protocols*. Recuperado de <https://www.springer.com/us/book/9781588299611>
- Kang, Y., Khan, S., & Ma, X. (2009). Climate change impacts on crop yield, crop water productivity and food security – A review. *Progress in Natural Science*, 19(12), 1665–1674. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2009.08.001>
- Khanna, H., & Daggard, G. (2003). Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of wheat using a superbinary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium. *Plant Cell Reports*, 21(5), 429–436. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0529-x>
- Kihara, H. (1919). Über Cytologische Studien bei einigen Getreidearten. MITTEILUNG I. *Shokubutsugaku Zasshi*, 33(386), 17–38. https://doi.org/10.15281/jplantres1887.33.386_17
- Kimber, G., & Sears, E. R. (1987). Evolution in the Genus Triticum and the Origin of Cultivated Wheat. *Wheat and Wheat Improvement, agronomy monograph (wheat and wheat im)*, 154–164. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr13.2ed.c6>
- Kumlehn, J., & Hensel, G. (2009). Genetic transformation technology in the Triticeae. *Breeding Science*, 59(5), 553–560. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.59.553>
- Li, Jiarui, Ye, X., An, B., Du, L., & Xu, H. (2012). Genetic transformation of wheat: current status and future prospects. *Plant Biotechnology Reports*, 6(3), 183–193. <https://doi.org/10.1007/s11816-011-0213-0>
- Li, Jisheng, Yang, H., Peer, W. A., Richter, G., Blakeslee, J., Bandyopadhyay, A., ... Gaxiola, R. (2005a). Arabidopsis H⁺-PPase AVP1 Regulates Auxin-Mediated Organ Development. *Science*, 310(5745), 121–125. <https://doi.org/10.1126/science.1115711>
- Li, Z., Baldwin, C. M., Hu, Q., Liu, H., & Luo, H. (2010). Heterologous expression of Arabidopsis H⁺-pyrophosphatase enhances salt tolerance in transgenic creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.). *Plant, Cell & Environment*, 33(2), 272–289. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02080.x>
- Mendoza, M. G., & Kaeppler, H. F. (2002). Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(1), 39–45. <https://doi.org/10.1079/IVP2001250>
- Meyer, P. (1995). Understanding and controlling transgene expression. *Trends in Biotechnology*, 13(9), 332–337. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)88977-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)88977-5)

- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*, 33(4), 453–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>
- Mitić, N., Nikolić, R., Ninković, S., Miljuš-Djukić, J., & Nešković, M. (2004). Agrobacterium-Mediated Transformation and Plant Regeneration of *Triticum aestivum* L. *Biologia Plantarum*, 48(2), 179–184. <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000033442.15611.7d>
- Mitić, Nevena, Dodig, D., & Nikolić, R. (2006). Variability of in vitro culture response in wheat genotypes, genotype and environmental effects. *Genetika*, 38, 183–192. <https://doi.org/10.2298/GENSR0603183M>
- Moghaieb, R. E. A., El-Arabi, N. I., Momtaz, O. A., Youssef, S. S., & 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. <https://doi.org/10.4161/gmcr.1.2.11172>
- Munns, R., & James, R. A. (2003). Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. *Plant and Soil*, 253(1), 201–218. <https://doi.org/10.1023/A:1024553303144>
- Munns, R., James, R. A., & Läuchli, A. (2006). Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1025–1043. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj100>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473–497.
- Naqvi, S. M. S., Yasmin, T., Rashid, H., Z, C., & A, Q. (2002). Callus Induction from Seeds of *Zea mays* Var. EV-2097. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2002.956.958>
- Ogawa, Y., & Mii, M. (2007). Meropenem and moxalactam: Novel β -lactam antibiotics for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Science*, 172(3), 564–572. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.11.003>
- Opabode, J. T. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 1(1), 12–20. Recuperado de <https://academicjournals.org/journal/BMBR/article-abstract/0F759E540214>
- Özgen, M., Türet, M., Altınok, S., & Sancak, C. (1998). Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Reports*, 18(3), 331–335. <https://doi.org/10.1007/s002990050581>
- Özgen, Murat, Birsin, M. A., & Benlioglu, B. (2017). Biotechnological characterization of a diverse set of wheat progenitors (*Aegilops* sp. and *Triticum* sp.) using callus

- culture parameters. *Plant Genetic Resources*, 15(1), 45–50. <https://doi.org/10.1017/S1479262115000350>
- Ozias-Akins, P., & Vasil, I. K. (1982). Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat): Evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma*, 110(2), 95–105. <https://doi.org/10.1007/BF01281535>
- Park, S., Li, J., Pittman, J. K., Berkowitz, G. A., Yang, H., Undurraga, S., ... Gaxiola, R. A. (2005). Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(52), 18830–18835. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509512102>
- Parmar, S. S., Sainger, M., Chaudhary, D., & Jaiwal, P. K. (2012). Plant regeneration from mature embryo of commercial Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18(2), 177–183. <https://doi.org/10.1007/s12298-012-0101-2>
- Pasapula, V., Shen, G., Kuppu, S., Paez-Valencia, J., Mendoza, M., Hou, P., ... Payton, P. (2011). Expression of an Arabidopsis vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (AVP1) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fibre yield in the field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 9(1), 88–99. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00535.x>
- Patnaik, D., & Khurana, P. (2001). Wheat biotechnology: A minireview. *Electronic Journal of Biotechnology*, 4(2), 7–8. <https://doi.org/10.4067/S0717-34582001000200007>
- Patnaik, D., Vishnudasan, D., & Khurana, P. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of mature embryos of *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. *Current Science*, 91(3), 307–317. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/24094136>
- Pitzschke, A., & Hirt, H. (2010). New insights into an old story: Agrobacterium-induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal*, 29(6), 1021–1032. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.8>
- Poudel, R., & Bhatta, M. (2017). Review of Nutraceuticals and Functional Properties of Whole Wheat. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 07(01). <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000571>
- Przetakiewicz, A., Orczyk, W., & Nadolska-Orczyk, A. (2003). The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73(3), 245–256. <https://doi.org/10.1023/A:1023030511800>
- Pullman, G. S., Mein, J., Johnson, S., & Zhang, Y. (2005). Gibberellin inhibitors improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Reports*, 23(9), 596–605. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0880-1>

- Qin, H., Gu, Q., Kuppu, S., Sun, L., Zhu, X., Mishra, N., ... Zhang, H. (2013). Expression of the Arabidopsis vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene AVP1 in peanut to improve drought and salt tolerance. *Plant Biotechnology Reports*, 7(3), 345–355. <https://doi.org/10.1007/s11816-012-0269-5>
- Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(3), 285. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9139-6>
- Rahnama, A., Munns, R., Poustini, K., & Watt, M. (2011). A screening method to identify genetic variation in root growth response to a salinity gradient. *Journal of Experimental Botany*, 62(1), 69–77. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq359>
- Salvo, S. A. G. D., Hirsch, C. N., Buell, C. R., Kaeppler, S. M., & Kaeppler, H. F. (2014). Whole Transcriptome Profiling of Maize during Early Somatic Embryogenesis Reveals Altered Expression of Stress Factors and Embryogenesis-Related Genes. *PLOS ONE*, 9(10), e111407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111407>
- Satyavathi, V. V., Jauhar, P. P., Elias, E. M., & Rao, M. B. (2004). Effects of Growth Regulators on In Vitro Plant Regeneration in Durum Wheat. *Crop Science*, 44(5), 1839. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1839>
- Sax, K. (1922). Sterility in Wheat Hybrids. II. Chromosome Behavior in Partially Sterile Hybrids. *Genetics*, 7(6), 513–552. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1200543/>
- Schilling, R. K., Marschner, P., Shavrukov, Y., Berger, B., Tester, M., Roy, S. J., & Plett, D. C. (2014a). Expression of the Arabidopsis vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (AVP1) improves the shoot biomass of transgenic barley and increases grain yield in a saline field. *Plant Biotechnology Journal*, 12(3), 378–386. <https://doi.org/10.1111/pbi.12145>
- Schilling, R. K., Marschner, P., Shavrukov, Y., Berger, B., Tester, M., Roy, S. J., & Plett, D. C. (2014b). Expression of the Arabidopsis vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (AVP1) improves the shoot biomass of transgenic barley and increases grain yield in a saline field. *Plant Biotechnology Journal*, 12(3), 378–386. <https://doi.org/10.1111/pbi.12145>
- Shan, X., Li, D., & Qu, R. (2000). Thidiazuron promotes <Emphasis>in vitro</Emphasis> regeneration of wheat and barley. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36(3), 207–210. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0038-y>
- Sharma, V. K., Hänsch, R., Mendel, R. R., & 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. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2005.01095.x>
- Sharma, Vijendra K., Hänsch, R., Mendel, R. R., & Schulze, J. (2004). A highly efficient plant regeneration system through multiple shoot differentiation from commercial cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.) using meristematic shoot segments excised from germinated mature embryos. *Plant Cell Reports*, 23(1–2), 9–16. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0800-4>
- Shewry, P. R., Hawkesford, M. J., Piironen, V., Lampi, A.-M., Gebruers, K., Boros, D., ... Ward, J. L. (2013). Natural Variation in Grain Composition of Wheat and Related Cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(35), 8295–8303. <https://doi.org/10.1021/jf3054092>
- Shibata, D., Liu, Y.-G., Shibata, D., Liu, Y.-G., Shibata, D., & Liu, Y.-G. (2000). Technical Focus-Agrobacterium-mediated plant transformation with large DNA fragments. *Trends in Plant Science*, 5(8), 354–357. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01689-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01689-7)
- Singh, R. K., & Prasad, M. (2016). Advances in Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of graminaceous crops. *Protoplasma*, 253(3), 691–707. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0905-3>
- Singla, B., Khurana, J. P., & Khurana, P. (2008). Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Cell Reports*, 27(5), 833–843. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0505-1>
- Slageren, M. W. van. (1994). Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. & Spach) Eig (Poaceae). *Wageningen Agricultural University Papers*, (No. 94-7). Recuperado de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19951602046>
- Slater, A., Scott, N. W., & Fowler, M. R. (2008). *Plant biotechnology: the genetic manipulation of plants*. Oxford University Press.
- Stephens, J. (2011). *Plant Cell Culture: Essential Methods*. Edited by M. R. Davey and P. Anthony. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd (2010), pp. 341, £60.00. ISBN 978-0-470-68648-5. *Experimental Agriculture*, 47(2), 414–415. <https://doi.org/10.1017/S0014479710001249>
- Supartana, P., Shimizu, T., Nogawa, M., Shioiri, H., Nakajima, T., Haramoto, N., ... Kojima, M. (2006). Development of simple and efficient in Planta transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using Agrobacterium tumefaciens. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(3), 162–170. <https://doi.org/10.1263/jbb.102.162>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. Universitat Jaume I.
- Tamás, C., Szűcs, P., Rakszegi, M., Tamás, L., & Bedő, Z. (2004). Effect of Combined Changes in Culture Medium and Incubation Conditions on the

- Regeneration from Immature Embryos of Elite Varieties of Winter Wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79(1), 39–44. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000049447.81409.ed>
- Tanner, D. G., & International Maize and Wheat Improvement Center (Eds.). (1990). *The Sixth Regional Wheat Workshop for Eastern, Central and Southern Africa, Addis Ababa, Ethiopia, October 2 - 6, 1989*. Mexico, DF: International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT).
- Tarafdar, A., & Padaria, J. (2016). Genetic Transformation and Transgenic Wheat Development: An Overview. *Cloning and Transgenesis*, 5, 1000147. <https://doi.org/10.4172/2168-9849.1000147>
- Tempé, J., & Petit, A. (1982). 16 - Opine Utilization by Agrobacterium. En G. Kahl & J. S. Schell (Eds.), *Molecular Biology of Plant Tumors* (pp. 451–459). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394380-4.50022-0>
- Thomas, J. C., & Katterman, F. R. (1986). Cytokinin Activity Induced by Thidiazuron. *Plant Physiology*, 81(2), 681–683. <https://doi.org/10.1104/pp.81.2.681>
- Tiwari, V. K., Heesacker, A., Riera-Lizarazu, O., Gunn, H., Wang, S., Wang, Y., ... Leonard, J. M. (2016). A whole-genome, radiation hybrid mapping resource of hexaploid wheat. *The Plant Journal*, 86(2), 195–207. <https://doi.org/10.1111/tpj.13153>
- Tyankova, N. D., & Zagorska, N. A. (2001). Genetic control of in vitro response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37(5), 524–530. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0091-1>
- Vasil, V., Castillo, A. M., Fromm, M. E., & Vasil, I. K. (1992). Herbicide Resistant Fertile Transgenic Wheat Plants Obtained by Microprojectile Bombardment of Regenerable Embryogenic Callus. *Bio/Technology*, 10(6), 667. <https://doi.org/10.1038/nbt0692-667>
- Vasil, V., & Vasil, I. K. (1982). Characterization of an Embryogenic Cell Suspension Culture Derived from Cultured Inflorescences of *Pennisetum americanum* (Pearl Millet, Gramineae). *American Journal of Botany*, 69(9), 1441–1449. <https://doi.org/10.2307/2443105>
- Viertel, K., & Hess, D. (1996). Shoot tips of wheat as an alternative source for regenerable embryogenic callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44(3), 183–188. <https://doi.org/10.1007/BF00048522>
- Wakui, C., Akiyama, H., Watanabe, T., Fitch, M. M., Uchikawa, S., Ki, M., ... Maitani, T. (2004). A histochemical method using a substrate of beta-glucuronidase for detection of genetically modified papaya. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 45(1), 19–24.
- Wang, Y. Q., Xiao, X. G., & Zhang, A. M. (2002). [Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.)]. *Yi chuan*

- xue bao = *Acta genetica Sinica*, 29(3), 260–265. Recuperado de <http://europepmc.org/abstract/med/12182083>
- Wen, F. S., Sorensen, E. L., Barnett, F. L., & Liang, G. H. (1991). Callus induction and plant regeneration from anther and inflorescence culture of Sorghum. *Euphytica*, 52(3), 177–181. <https://doi.org/10.1007/BF00029394>
- Wu, H., Sparks, C., Amoah, B., & Jones, H. D. (2003). Factors influencing successful Agrobacterium-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Reports*, 21(7), 659–668. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0564-7>
- Xia, L., Ma, Y., He, Y., & Jones, H. D. (2012). GM wheat development in China: current status and challenges to commercialization. *Journal of Experimental Botany*, 63(5), 1785–1790. <https://doi.org/10.1093/jxb/err342>
- Xue, Z.-Y., Zhi, D.-Y., Xue, G.-P., Zhang, H., Zhao, Y.-X., & Xia, G.-M. (2004a). Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na⁺. *Plant Science*, 167(4), 849–859. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.05.034>
- Xue, Z.-Y., Zhi, D.-Y., Xue, G.-P., Zhang, H., Zhao, Y.-X., & Xia, G.-M. (2004b). Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na⁺. *Plant Science*, 167(4), 849–859. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.05.034>
- Xue, Z.-Y., Zhi, D.-Y., Xue, G.-P., Zhang, H., Zhao, Y.-X., & Xia, G.-M. (2004c). Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na⁺. *Plant Science*, 167(4), 849–859. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.05.034>
- Xue, Z.-Y., Zhi, D.-Y., Xue, G.-P., Zhang, H., Zhao, Y.-X., & Xia, G.-M. (2004d). Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na⁺. *Plant Science*, 167(4), 849–859. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.05.034>
- Yang, H., Knapp, J., Koirala, P., Rajagopal, D., Peer, W. A., Silbart, L. K., ... Gaxiola, R. A. (2007). Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H⁺-pyrophosphatase. *Plant Biotechnology Journal*, 5(6), 735–745. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00281.x>
- Yarizade, A., Aram, F., Niazi, A., & Ghasemi, Y. (2012). Evaluation of Effect of β -Lactam Antibiotics on Suppression of Different Strains of *Agrobacterium tumefaciens* and on Wheat Mature Embryo Culture. *Iranian Journal of*

Pharmaceutical Sciences, 8(4), 267–276. Recuperado de http://www.ijps.ir/article_6494.html

- Yu, Y., Wang, J., Zhu, M.-L., & Wei, Z.-M. (2008). Optimization of mature embryo-based high frequency callus induction and plant regeneration from elite wheat cultivars grown in China. *Plant Breeding*, 127(3), 249–255. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01461.x>
- Zaidi, N., Khan, N. H., Zafar, F., & Zafar, S. I. (2000). Bulbous and cormous monocotyledonous ornamental plants in vitro. *Quarterly Science Vision*, 6(1), 58–73.
- Zale, J. M., Borchardt-Wier, H., Kidwell, K. K., & Steber, C. M. (2004). Callus Induction and Plant Regeneration from Mature Embryos of a Diverse Set of Wheat Genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76(3), 277–281. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000009248.32457.4c>
- Zhao, F.-Y., Zhang, X.-J., Li, P.-H., Zhao, Y.-X., & Zhang, H. (2006). Co-expression of the Suaeda salsa SsNHX1 and Arabidopsis AVP1 confer greater salt tolerance to transgenic rice than the single SsNHX1. *Molecular Breeding*, 17(4), 341–353. <https://doi.org/10.1007/s11032-006-9005-6>

4 ARTÍCULO 1

Regeneración de trigo (*Triticum aestivum* L.) por embriogénesis somática a partir de embriones maduros¹

RESUMEN

Un sistema de regeneración eficiente es requisito previo para la aplicación de la transformación genética en trigo. El objetivo de la presente investigación fue obtener el protocolo de regeneración *in vitro* de dos variedades de trigo (Kronstad y Rebeca) mediante embriogénesis somática a partir de embriones maduros. Para ello, durante cinco semanas, se cultivaron embriones maduros en el medio de Murashigue y Skoog (1962), MS con vitaminas Gamborg (MSG), 0.5 mg L⁻¹ de 2-4D y 2.4 mg L⁻¹ de picloram, en oscuridad total. Bajo estas condiciones más de 95 % de los explantes de ambas variedades formaron callos embriogénicos. Para la variedad Rebeca F2000, se logró la regeneración de brotes en el medio MSG con 0.2 mg L⁻¹ de 2-4D y 1.0 mg L⁻¹ TDZ y para la variedad Kronstad en medio MSMS con 0.2 mg L⁻¹ 2-4D y 2.0 mg L⁻¹ TDZ ambas bajo fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Asimismo, se logró un enraizamiento eficiente de las dos variedades con la adición de AIA en el medio MS con vitaminas Gamborg con el 50% de las sales minerales.

Palabras clave: Embriogénesis somática, regeneración, embriones maduros, trigo.

¹ Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Bequer Moisés López Ruiz
Director: Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

Wheat regeneration (*triticum aestivum* L.) by somatic embryogenesis from mature embryos ²

ABSTRACT

An efficient regeneration system is a prerequisite for the application of genetic transformation into wheat. The objective of this research was to opt for the in vitro regeneration protocol of two varieties of wheat (Kronstad and Rebeca) by somatic embryogenesis from mature embryos. For this, for five weeks, mature embryos were grown in the media of Murashigue and Skoog (1962), MS with vitamins Gamborg (MSG), 0.5 mg L⁻¹ of 2-4D and 2.4 mg L⁻¹ of picloram, in total darkness. Under these conditions more than 95 % of the explants of both varieties formed embryogenic calluses. For the Rebeca F2000 variety, regeneration of shoots was achieved in the MSG medium with 0.2 mg L⁻¹ of 2-4D and 1.0 mg L⁻¹ TDZ and for the Kronstad variety in MSMS medium with 0.2 mg L⁻¹ 2-4D and 2.0 mg L⁻¹ TDZ both under 16 hours of light and 8 hours of darkness photoperiod. An efficient rooting of the two varieties was also achieved with the addition of AIA in the MS medium with Gamborg vitamins with 50% of the mineral salts.

Key words: Somatic embryogenesis, regeneration, mature embryos, wheat.

² Thesis of Master of Science in Agricultural Biotechnology, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Bequer Moisés López Ruiz
Advisor: Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

4.1 INTRODUCCIÓN

El trigo harinero (*Triticum aestivum* L.), es el cereal más cultivado y consumido a nivel mundial como fuente de calorías y proteínas. Este cereal sigue siendo un reto importante para la biotecnología debido a que una especie recalcitrante en la regeneración *in vitro* (Ganeshan *et al.*, 2006), Por ello, ha surgido una necesidad evidente en el empleo de herramientas biotecnológicas para establecer un eficiente sistema de regeneración de trigo que permita, emplearse en la ingeniería genética (Miroshnichenko *et al.*, 2016).

La técnica comúnmente utilizada en la regeneración y transformación *in vitro* de trigo se basa en la embriogénesis somática (Jones, 2005; Li *et al.*, 2012). La embriogénesis consiste en el desarrollo de estructuras bipolares (un polo radical y otro apical) similares a los embriones zigóticos, a partir de células somáticas sin que se lleve a cabo la fusión de gametos. Estos embriones bajo condiciones específicas son capaces de crecer y formar una planta completa (Deporte *et al.*, 2014). Si la respuesta inicial es la formación de callo antes de que los embriones somáticos se diferencien se habla de embriogénesis indirecta (Quiroz *et al.*, 2006). La auxina sintética 2,4-D es el regulador de crecimiento más utilizada en la inducción y proliferación de callos en trigo (Slater *et al.*, 2008).

Sin embargo, se ha reportado que la fuente de explantes, el genotipo y la composición del medio de cultivo influyen en la inducción y regeneración de callos de trigo (Mitić *et al.*, 2006). En particular, el genotipo y tipo de explante son los factores más determinantes para la formación y regeneración de callos embriogénicos (Machii *et al.*, 1998). En estudios recientes; han utilizados los embriones maduros como sustitutos valioso de otros tipos de explantes, en particular los embriones inmaduros, ofreciendo ventajas como la disponibilidad de recolección y almacenamiento de las semillas (Xia *et al.* 2012) y un alto porcentaje de respuesta de regeneración superior a la de los embriones

inmaduros (Özgen *et al.*, 1998). Por lo anterior, se sugiere la utilización de los embriones maduros como fuente de explantes en la regeneración *in vitro*.

La morfogénesis *in vitro* es un proceso complejo en la expresión del potencial embriogénico para regenerar plántulas en trigo donde se ha identificado distintos genes que están potencialmente involucrados (Chu *et al.*, 2017 ;Singla *et al.*, 2008). La naturaleza física de los callos aun no es un criterio identificativo ya que pueden ser organogénicos o embriogénicos. Con base a lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue optimizar un protocolo de regeneración *in vitro* mediante embriogénesis somática de dos variedades de trigo a partir de embriones maduros.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México.

4.2.1 Material vegetal

Se utilizaron embriones maduros de dos variedades de trigo: Kronstad F2004 y Rebeca F2000, proporcionadas del Campo Experimental del Valle de México del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

4.2.2 Desinfestación del explante

En la campana de flujo laminar, las semillas se lavaron con etanol al 70% durante 10 min, a continuación, un lavado de 30 min con una solución de 30% (v/v) de hipoclorito comercial (cloralex ®) más 10 gotas de surfactante Tween 20 y después con 70% de hipoclorito de sodio por 30 min. Posteriormente, las semillas se lavaron 3 veces sucesivas por 15 min con agua esterilizada para finalmente dejarlas reposar en agua esterilizada por 2 horas, con el fin de suavizar el endospermo y facilitar la extracción de los embriones maduros.

4.2.3 Inducción de callos

Los embriones maduros fueron extraídos de las semillas en condiciones asépticas con el apoyo de un microscopio estereoscópico. Los embriones fueron colocados con el escutelo hacia abajo en cajas petri de 90 x 15 mm con 25 mL de medio de inducción CM4C (Cuadro 1); las cajas, se cultivaron durante 2 semanas a 26°C en oscuridad. El medio CM4C contenía 2,4-D 0.5 mg L⁻¹ y picloram 2.4 mg L⁻¹. Se eliminaron las estructuras (extremo plumular y radicular) y los de tipo suaves acuosas que emergieron durante ese tiempo para forzar la formación de callo, y se subcultivó en el mismo medio por tres semanas. Se evaluó la tasa de formación de callos “TFC” como (número de embriones que formaban callo/ número total de embriones) X (100).

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con diez repeticiones con dos tratamientos. La unidad experimental fue una caja petri con 25 embriones.

4.2.4 Cinética de crecimiento

Cada cuatro semanas durante tres meses se determinó el peso fresco del callo. Se seleccionaron 20 callos de manera aleatoria para cada variedad, así se obtuvo la biomasa promedio, sumando: el peso ganado del punto de inicio al último, dividido entre el número total de callos, en el medio de cultivo empleado. Además los medios de cultivo fueron renovados cada 15 días.

4.2.5 Regeneración

Los callos formados durante cinco semanas, se transfirieron al primer medio de regeneración (PMR) (Cuadro 1), y se incubaron durante 2 semanas, bajo fotoperiodo de 16 h de luz. Se utilizaron dos medios de cultivo, las sales son al 100% con sus respectivas concentraciones de auxina-citocinas para cada variedad. Para la variedad Rebeca F2000, se utilizó el medio MS suplementado con vitaminas Gamborg (MS-G), con 0.2 mg L⁻¹ 2-4D y 0.1 mg L⁻¹ TDZ, mientras que para Kronstad se empleó el medio MS con vitaminas MS (MSMS) con 0.2 mg L⁻¹ 2-4D y 2.0 mg L⁻¹ TDZ. Se empleó un diseño completamente al azar con diez repeticiones, la unidad experimental consistió

de 10 callos. Se evaluó la tasa de regeneración “TR” (número de callos que formaron brotes/ número total de callos) X (100). Además, se obtuvo el número promedio de brotes “NPB” (número de brotes) / (número de callos con brotes) y la capacidad de formación de brotes “CFB” (TR) X (NPB / 100) (Valenzuela *et al.*, 2012).

Posteriormente, los brotes, se transfirieron al segundo medio de enraizamiento (SME) (Cuadro 1) por tres semanas. Se evaluaron diferentes concentraciones de Ácido Indolacético (AIA) (0, 0.5, 1, 2 mg L⁻¹). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 5 repeticiones para cada tratamiento. La unidad experimental fue un tubo que contenía un brote.

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo utilizados en la formación de callos, regeneración de brotes y raíz de trigo.

Reactivo	Medios de cultivo		
	(CM4C)	(PMR)	(SME)
Sales MS-G (g L ⁻¹)	4.44	-	2.22
Sales MS-MS (g L ⁻¹)	--	-	
Maltosa (g L ⁻¹)	40	40	40
Glucosa (g L ⁻¹)	10	--	--
Hidrolizado de caseína (g L ⁻¹)	--	100	100
MES (g L ⁻¹)	1.95	1.95	1.95
MgCl ₂ (g L ⁻¹)	0.75	--	--
PPM (μ L ⁻¹)	750	750	750
*Ácido ascórbico (mg L ⁻¹)	100	100	100
*Ácido cítrico (mg L ⁻¹)	150	150	150
Agar (g L ⁻¹)	7	7	7
pH	5.8	5.8	5.6

El medio MS es procedente de Murashige y Skoog, (1962). Los medios CM4C y PMR las sales son al 100% y en el SMR son al 50%. MSMS= Medio MS suplementado con vitaminas MS, MSG= Medio MS suplementado con vitaminas Gamborg, CM4C= Medio de formación de callo,

PMR= Primer medio de regeneración, SME= Segundo medio de enraizamiento. PPM = Plant Cell Tech., Cat. No. PPM-100).

Todos los medios se esterilizarón por autoclave a 121 °C por 15 min.

4.2.6 Análisis estadístico

La realización de los análisis estadísticos fue similar en ambas pruebas para cada variable registrada, se realizaron análisis de varianza y comparaciones de medias mediante la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$. Se usó el paquete estadístico Minitab, versión 17.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Inducción de callos.

Debido a las ventajas que ofrecen los embriones maduros como explantes, fueron utilizados en el presente estudio en las variedades Rebeca F2000 y Kronstad F2004 en la regeneración de callos, bajo condiciones de cultivo reportadas por Valenzuela *et al.* (2012) con 0.5 mg L^{-1} 2,4-D y 2.4 mg L^{-1} picloram. Los resultados muestran la formación de callo en más de 95% de los explantes de ambas variedades (Cuadro 2). No hubo diferencias significativas, por efecto de los medios de cultivos entre los genotipos probados. Se observó una mayor tasa de formación de callo (TFC) en comparación a lo reportado por Valenzuela *et al.* (2012) utilizando los mismos genotipos, composición del medio, y concentraciones de fitoreguladores. La aplicación de reguladores específicos como las auxinas sintéticas (2,4-D y picloram) han sido evaluadas y reportadas en la inducción eficiente de callo en trigo (Filippov *et al.*, 2006; Mendoza y Kaeppler 2002; Miroshnichenko *et al.*, 2016; Parmar *et al.*, 2012).

Cuadro 2. Formación de callos en embriones maduros de dos variedades de trigo.

Medio de Inducción	Variedad	Tasa de Formación de callos
CM4C Vitaminas Gamborg	Rebeca F2000	95.20 A
	Kronstad F2004	97.60 A

Medias con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha \leq 0.05$)

El 2,4-D es la auxina más utilizada en la inducción y proliferación de callos en trigo (Slater *et al.*, 2008), mientras que la adición de picloram promueve la formación de callos embriogénicos somáticos en adecuadas concentraciones (Sharma *et al.*, 2007).

La iniciación de callos se observó después de 3-4 días de cultivo bajo el efecto de las auxinas 2,4-D, y picloram con el hinchamiento de los embriones (Figura 1 c,k). A las dos semanas los callos proliferaron activamente triplicando su volumen, seguido de la extensión del extremo plúmular y radicular en el embrión (Figura 1 d,l). Asimismo hubo alta proliferación que otras partes del explante que fueron nombradas como estructuras no regenerantes por lo que fueron eliminado asépticamente de acuerdo con Parmar *et al.* (2012), al igual que el callo considerado “no embriogénicos” de color blanco, de apariencia acuosa y formados por grandes células vacuoladas (Figura1), dejando el callo con apariencia nodular y se subcultivo durante tres semanas más. La diferenciación entre los callos embriogénicos y no embriogénicos se debe a su morfología y color (Redway *et al.*, 1990).

Los callos embriogénicos se observaban compactos con forma nodular y globulosa y tenían coloración cremosa y eran translucidos (que va del blanco al amarillo pálido), formada por células densamente proliferantes (Figura 1 e, m), como lo observaron Parmar *et al.*, (2012) y Souza & Beck (2013) en *Triticum aestivum* L. Después de cinco semanas aparecieron grupos con estructuras de tamaño creciente y se consideraban embriogénicas, en todos los callos

formados, con la aparición de secciones verdes pigmentadas y desarrollo de tejido verde en la superficie (llamados como callos regenables) (Figura 1f,n), que posteriormente se convirtieron en brotes, lo que coincide con lo reportado por otros autores (Valenzuela *et al.* 2012; MackinNon *et al* 1987; Delporte *et al.* 2014; Parmar *et al.*,2012).

4.3.2 Regeneración.

Después de la transferencia de los callos morfogenicos a condiciones regenerativas y su exposición a las luz, no se encontraron diferencias significativas para número promedio de brotes (NPB), tasa de regeneración (TR) y capacidad de regeneración(CR) entre las dos variedades, por efecto del medio de cultivo (Cuadro 3). Los genotipos respondieron de forma similar en el medio optimizado, previamente reportado por Ramos, (2016), para la variedad Rebeca F2000 (medio MSG suplementado con 0.2 mg L⁻¹ 2-4D y 1.0 mg L⁻¹ TDZ) y Kronstad (medio MSMS con 0.2 mg L⁻¹ 2-4D y 2.0 mg L⁻¹ TDZ) las cuales mostraron una tasa de regeneración y número de brotes por explante parecidos a los encontrados en éste estudio. Al igual que lo observado por Parmar *et al.*, (2012), al utilizar el TDZ en combinación con 2,4-D se registro alta eficiencia de regeneración y numero promedio de brotes por explante derivados de embriones maduros. Probablemente la incorporación de TDZ al medio de cultivo estimuló la producción de citocininas endógenas las cuales promovieron las respuesta morfogénica (Thomas y Katterman 1986). La alta eficiencia de regeneración va de acuerdo a niveles más altos de citocininas sin auxinas o niveles bajos (Hassan *et al.*, 2009).

Cuadro 3.Regeneración brotes a partir de callos morfogenicos de trigo.

PMR	Variedad	Regeneración		
		TR	NPB	CFB
MS (vitaminas MS)	Kronstad F2004	95 A	8. 4 A	7.6 A
MS (vitaminas Gamborg)	Rebeca F200	91 A	7.1 A	6.6 A

PMR, primer medio de regeneración; TR, tasa de regeneración; NPB, numero promedio de brotes; CFB, capacidad de formación de brotes. Medias con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

Se ha reportado que en trigo el genotipo utilizado tiene una gran influencia en la respuesta al cultivo *in vitro* (Zale *et al*, 2004; Jones *et al*, 2005) .En este estudio, las condiciones de cultivo probadas , permitieron superar las diferencias entre los genotipos utilizados. La alta frecuencia de regeneración de las variedades con la baja dependencia, puede deberse también a la eliminación de las estructuras no regenerantes y de los callos no embriogénicos identificadas durante la fase de formación temprana de los callos (Mac Kinnon *et al.*, 1987) y al uso de una combinación de reguladores de crecimiento correcta durante la fase de regeneración. El medio optimizado permitió el desarrollo de brotes a la primera semana después de ser transferido al medio de regeneración (Figura 1 g, ñ). Sin embargo, los brotes no formaron raíces, por ello fueron expuestos a diferentes concentraciones de la auxina (AIA) para inducir la formación de raíz.

4.3.3 Enraizamiento

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre las concentraciones de la auxinas utilizadas entre las variedades utilizadas. Para la variedad Rebeca F2000 la mayor tasa de formación de raíz (TFR)(100 %) ocurrió con (0.5 mg L⁻¹ AIA) con 4.8 raíces en promedio por brotes ; lo mismo ocurrió con la capacidad de formación de raíz (CFR). Para la variedad Kronstad F2004 con (0.5 mg L⁻¹ AIA) indujo a que 100% de los explantes formaron raíces de raíces con 4.6 raíces promedio por brotes y capacidad de formación de raíces (Cuadro 4). En ambas variedades se utilizó el mismo medio de enraizamiento (MS con vitaminas Gamborg con las sales al 50%). A la segunda semana los brotes generaron raíces, seguidas de raíces con crecimiento lateral (Figura 1 h, o). Se ha demostrado que las auxinas incorporados al medio nutritivo juega un papel clave en la formación de raíces adventicias (Vidoz *et al.*, 2010), como la auxina natural ácido indol-3-acético (AIA) (Uribe *et al.*, 2012), utilizada en este estudio.

Cuadro 4. Enraizamiento de los brotes de dos variedades de trigo bajo el efecto de diferentes concentraciones de la auxina (AIA).

SME (50%)	Variedad	Concentración de AIA (mg L ⁻¹)	Enraizamiento		
			TFR	NPR	CFR
MSG	Kronstad F2004	0	0 B	0.0 B	0.0 B
		0.5	40 AB	0.8 B	0.8 B
		0.7	100 A	4.6 A	4.6 A
		1	20 A	0.6 B	0.6 B
	Rebeca F200	0	60 A	1.6 B	1.6 B
		0.5	100 A	4.8 A	4.8 A
		0.7	40	0.8 B	0.8 B
		1	20	0.4 B	0.4 B

SME, segundo medio de enraizamiento; TFR, tasa de formación de raíz; NPR, número promedio de raíces; CFR, capacidad de formación de raíces; AIA, Ácido Indolacético; MSG, (medio MS vitaminas Gamborg) .Medias con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

4.3.4 Cinética de crecimiento de los callos

La biomasa fresca promedio obtenida después de 12 semanas de cultivo de los callos en el medio MS con vitaminas Gamborg fue 0.38 g para la variedad y de 0.71 g para la variedad Kronstad F2004 (Figura 4). Factores como el tiempo, la composición del medio y subcultivo de los callos a medio fresco cada 15 días fue de vital importancia para el crecimiento celular.

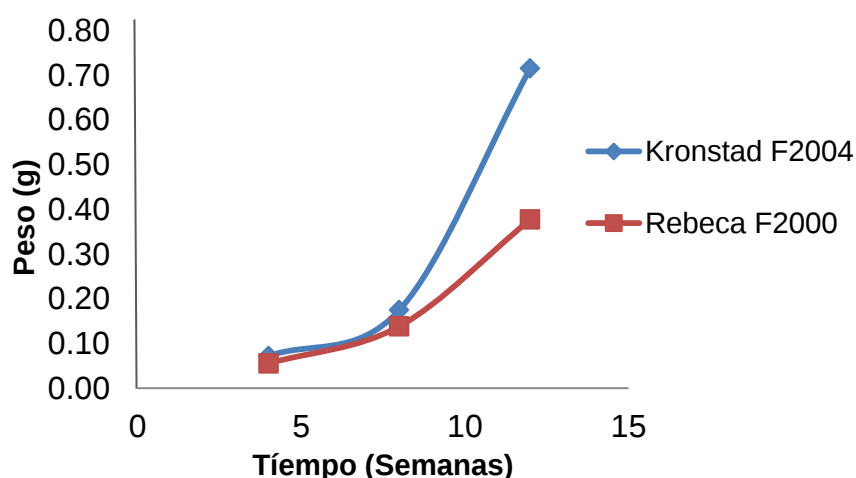


Figura 3. Incremento en peso fresco del callo embriogénico obtenido a partir de embriones maduros de las variedades Kronstad F2004 y Rebeca F2000.

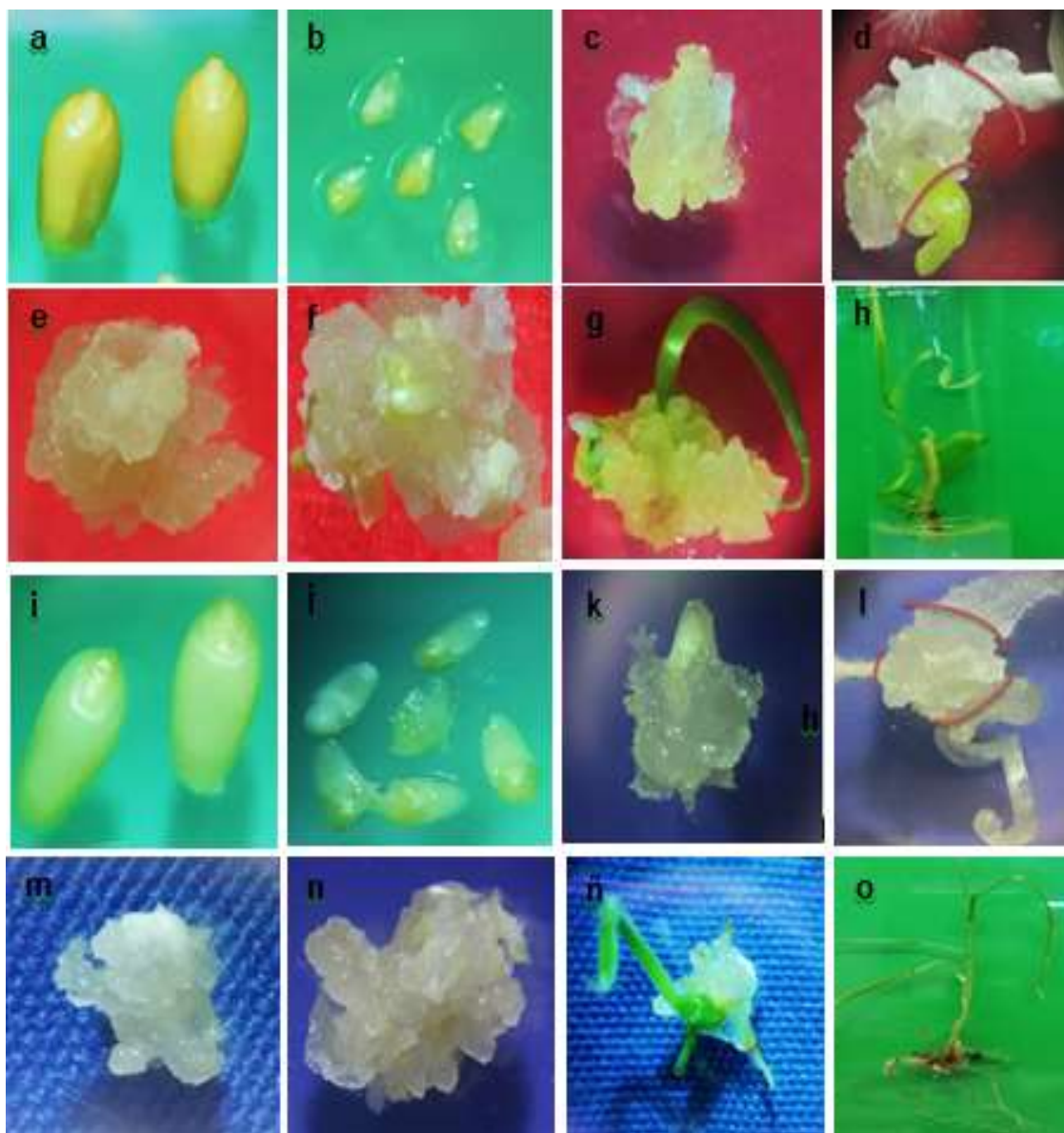


Figura 4. Cultivo in vitro de trigo a partir de embriones maduros: proceso morfogénico del inicio y desarrollo de los callos hasta la regeneración de brotes y raíz de las variedades Kronstad F2004 (a,b,c,d,e,f,g,h) y Rebeca F2000 (i,j,k,l,m,n,ñ,o): Semillas asépticas (a,i), aislamiento del embriones maduros bajo un estereoscópico (b,j), inducción de la proliferación celular después de cuatro días (c,k), eliminación de partes no regenerantes a las dos semanas (las líneas rojas muestran la parte a eliminar)(d,l), apariencia nodular y compacta de los callos de color blanco amarillento visibles a las tres semanas obtenido al eliminar estructuras no regenerantes (e,m), síntesis de clorofila (áreas verdes pigmentadas dentro de las estructuras embriogénicas) y desarrollo de órganos (tejido verde en la superficie) a las cinco semanas (f,n) y la regeneración de plántulas (g,ñ) expuestos a la luz después de seis semanas. Formacion de raíz a las siete semanas (raíces ligeramente desarrolladas con crecimiento lateral) (h,o).

4.4 CONCLUSIONES

Las variedades Rebeca F2000 y Kronstad F2004 utilizados en el presente estudio, mostraron una excelente eficiencia de formación de callo y regeneración de brotes a partir de embriones maduros como explantes; esta puede ser alternativa al uso de los embriones inmaduros, superando la influencia del genotipo bajo el protocolo optimizado.

Se logró un protocolo eficiente de enraizamiento, para la variedad Rebeca F2000, hubo 100% de formación de raíces y 4.8 de promedio de raíces por brote suplementado con 0.5 mg L^{-1} AIA, mientras que para la variedad Kronstad F2004 con 0.7 mg L^{-1} AIA, presento 100% de formación de raíces y 4.6 raíces por brotes, bajo el mismo medio MS con vitaminas Gamborg con el 50% de las sales minerales.

4.5 LITERATURA CITADA

- Chu, Z., Chen, J., Sun, J., Dong, Z., Yang, X., Wang, Y. Cui, D. (2017). De novo assembly and comparative analysis of the transcriptome of embryogenic callus formation in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology*, 17(1), 244. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1204-2>
- Delporte, F., Pretova, A., du Jardin, P., & Watillon, B. (2014). Morpho-histology and genotype dependence of in vitro morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. *Protoplasma*, 251(6), 1455–1470. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0647-7>
- Filippov, M., Miroshnichenko, D., Vernikovskaya, D., & Dolgov, S. (2006). The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84(2), 213–222. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9026-6>
- Ganeshan, S., V. Chodaparambil, S., Båga, M., Fowler, D. B., Hucl, P., Rossnagel, B. G., & Chibbar*, R. N. (2006). In vitro regeneration of cereals based on multiple shoot induction from mature embryos in response to thidiazuron. *Plant*

Cell, Tissue and Organ Culture, 85(1), 63–73. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9049-z>

- Hassan, M., Ahmed, Z., Munir, M., Malik, S. I., & Shahzad, K. (2009). Effect of sorbitol in callus induction and plant regeneration in wheat. *African Journal of Biotechnology*, 8(23). Recuperado de <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/66179>
- Jones, H. D. (2005). Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *Journal of Cereal Science*, 41(2), 137–147.
- Jones, H. D., Doherty, A., & Wu, H. (2005). Review of methodologies and a protocol for the Agrobacterium-mediated transformation of wheat. *Plant Methods*, 1(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-1-5>
- Li, J., Ye, X., An, B., Du, L., & Xu, H. (2012). Genetic transformation of wheat: current status and future prospects. *Plant Biotechnology Reports*, 6(3), 183–193. <https://doi.org/10.1007/s11816-011-0213-0>
- Machii, H., Mizuno, H., Hirabayashi, T., Li, H., & Hagio, T. (1998). Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53(1), 67–74. <https://doi.org/10.1023/A:1006023725640>
- MacKinnon, C., Gunderson, G., & 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*, 23(6), 443–448. <https://doi.org/10.1007/BF02623861>
- Mendoza, M. G., & Kaeppler, H. F. (2002). Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(1), 39–45. <https://doi.org/10.1079/IVP2001250>
- Miroshnichenko, D., Chernobrovkina, M., & Dolgov, S. (2016). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Triticum timopheevii* Zhuk. and *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch, wheat species with G genome. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 125(3), 495–508. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0965-x>
- Mitic, N., Dodig, D., & Nikolic, R. (2006). Variability of in vitro culture response in wheat genotypes, genotype and environmental effects. *Genetika*, 38(3), 183–192.
- Naqvi, S. M. S., Yasmin, T., Rashid, H., Chaudary, Z., & Qureshi, A. (2002). Callus induction from seeds of *Zea mays* var. EV-2097. *Pakistan J. Biol. Sci*, 5, 956–8.

- Özgen, M., Türet, M., Altınok, S., & Sancak, C. (1998). Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant cell reports*, 18(3–4), 331–335.
- Parmar, S. S., Sainger, M., Chaudhary, D., & Jaiwal, P. K. (2012). Plant regeneration from mature embryo of commercial Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18(2), 177–183. <https://doi.org/10.1007/s12298-012-0101-2>
- Patnaik, D., Vishnudasana, D., & Khurana, P. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of mature embryos of *Triticum aestivum* and. *Current science*, 91(3).
- Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(3), 285.
- Redway, F. A., Vasil, V., Lu, D., & Vasil, I. K. (1990). Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 79(5), 609–617.
- Sharma, V. K., Hänsch, R., Mendel, R. R., & Schulze, J. (2007). Node-derived cultures with high-morphogenic competence in barley and wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 88(1), 21–33. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9172-5>
- Singla, B., Khurana, J. P., & Khurana, P. (2008). Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Cell Reports*, 27(5), 833–843. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0505-1>
- Slater, A., Scott, N. W., & Fowler, M. R. (2003). The genetic manipulation of plants. *Plant Biotechnology Oxford, England: Oxford University Press*.
- Souza, D. (s/f). *Embryogenic callus induction on the scutellum and regeneration of plants as basis for genetic transformation of spring wheat (triticum aestivum l.) cultivars from argentina*.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. 3rd. *England: Sinauer Associates*.
- Thomas, J. C., & Katterman, F. R. (1986). Cytokinin activity induced by thidiazuron. *Plant Physiology*, 81(2), 681–683.
- Uribe, M. E., Ulloa, J., Delaveau, C., Sáez, K., Muñoz, F., & Cartes, P. (2012). Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento in vitro de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana. Botánica*, 69(1), 105–112.
- 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.

Vidoz, M. L., Loreti, E., Mensuali, A., Alpi, A., & Perata, P. (2010). Hormonal interplay during adventitious root formation in flooded tomato plants. *The Plant Journal*, 63(4), 551–562.

Xia, L., Ma, Y., He, Y., & Jones, H. D. (2011). GM wheat development in China: current status and challenges to commercialization. *Journal of experimental botany*, 63(5), 1785–1790.

Zale, J. M., Borchardt-Wier, H., Kidwell, K. K., & Steber, C. M. (2004). Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76(3), 277–281.

5 ARTÍCULO 2

Ensayos para transformar trigo *triticum aestivum* L.) por agroinfección con el gen *Atavp1* de la H⁺- pirofosfatasa vacuolar ¹

RESUMEN

La productividad del trigo se ve afectada seriamente por la sequía y salinidad. Es por ello la gran importancia de poder generar plantas genéticamente modificadas que muestren resistencia a estos factores adversos. El objetivo de la presente investigación fue determinar el mejor método de selección de células de presuntamente transformadas con el gen quimérico 35S::AVP1 de *Arabidopsis thaliana*. Se determinó la efectividad de la cepa EHA105 (pGUSint), al mostrar una mejor expresión durante la agroinfección tanto en callos como en brotes de la variedad Kronstad F200 regenerados *in vitro*. LA misma cepa que fue utilizada para el experimento con el transgen 35S::AVP1 en el vector pTF101, siendo el NaCl₂ el mejor agente de selección en la etapa de callos, sin embargo no se logro una selección y regeneración eficientes en este proceso.

Palabras clave: Agroinfeccion, callos, cepa, trigo.

¹ Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Bequer Moisés López Ruiz
Director: Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

Trials to transform wheat (*Triticum aestivum* L.) by agroinfection with the *Atavp1* gene of vacuolar H⁺- pyrophosphatase

ABSTRACT

Wheat productivity is seriously affected by drought and salinity. This is why it is so important to be able to generate genetically modified plants that show resistance to these adverse factors. The objective of the present investigation was to determine the best method of selection of cells presumably transformed with the chimeric gene *35S::AVP1* of *Arabidopsis thaliana*. The effectiveness of the strain EHA105 (pGUSint) was determined, showing a better expression during the agroinfection both in calluses and in shoots of the variety Kronstad F200 regenerated in vitro. The same strain that was used for the experiment with transgen *35S::AVP1* in the vector pTF101, being NaCl₂ the best selection agent in the callus stage, however an efficient selection and regeneration was not achieved in this process.

Key words: Agroinfection, callus, strain, wheat.

² Thesis of Master of Science in Agricultural Biotechnology, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Bequer Moisés López Ruiz
Advisor: Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

5.1 INTRODUCCIÓN

Al igual que el maíz y el frijol, el trigo es uno de las tres especies de grano más cultivado y consumido en México; en 2015 se produjeron 3.9 millones de toneladas (SIAP, 2015). La producción de este cereal se ve afectado seriamente por el estrés abiótico, en particular la sequía y salinidad que afectan negativamente el crecimiento y el rendimiento del cultivo (Dhlamini *et al.*, 2005). Se necesitan variedades de trigo que muestren tolerancia a estos factores adversos y una manera de generarlas es mediante ingeniería genética.

La metodología más recomendable para la inserción del material genético al genoma del trigo es la agroinfección mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Este método ofrece ventajas adicionales sobre otras técnicas de transformación genética como, la posibilidad de transferir grandes segmentos de ADN dentro de las células, con bajo número de copias y estabilidad de la expresión durante generaciones (Dai *et al.*, 2001). Sin embargo, el proceso se ve afectado por diversos factores como: la cepa de *Agrobacterium*, tipo de vector, uso de inductores de virulencia, densidad del cultivo, y agentes selectivos (Jones *et al.*, 2005; Bhalla *et al.*, 2006; Opabode, 2006; Kumlehn y Hensel, 2009).

Por medio de la ingeniería genética, se han sobre expresados genes que confieren tolerancia a sequía y salinidad. Dentro de los genes, que se han explorado se encuentra el gen *AVP1* el cual ha dado mejores resultados en los últimos años. El gen *AVP1*, codifica una H^+ pirofosfatasa vacuolar que funciona como una bomba de protones H^+ , que incrementa la actividad del antiporte Na^+/H y otros sistemas de transporte del tonoplasto, facilitando el secuestro de Na^+ en la vacuola. Asimismo la sobreexpresión del gen *AVP1* facilita el transporte auxina, generando plantas transgenicas con una mayor cantidad de raíces capaces de absorber el agua de manera más eficiente bajo condiciones de estrés, dando como resultado una mayor tolerancia a

salinidad y sequía (Gaxiola *et al.*, 2001; Duan *et al.*, 2007). El gen *AVPI*, se ha expresado en cereales como arroz (Zhao *et al.*, 2007) y cebada (Schilling *et al.*, 2013). Lo anterior abre la posibilidad de poder transformar el trigo para generar plantas transgénicas resistentes a la salinidad y sequía. Un sistema eficiente de selección es muy importante para obtener plantas transformadas, que evite tener falsos transformantes. Con base en lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue determinar el mejor método de selección para los transformantes del trigo con el gen quimérico 35S::*AVP1* de *Arabidopsis thaliana*.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Transformación por agroinfección

Se utilizo la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* con base en , lo reportado por Ramos , (2017), quien determinó la efectividad de la cepa, al mostrar un mejor expresión durante la agroinfección en callos de trigo de la variedad Kronstad con el uso del gen reportero *GUS* en el vector binario pGUSint y el gen de selección a kanamicina (*NPTII*). Asimismo, se corroboró la efectividad de la cepa EHA105 es este estudio, bajo condiciones similares a los mencionado anteriormente con una modificación de la dosis del agente selectivo (70 mgL⁻¹ de kanamicina).

Una vez confirmada la efectividad de la cepa EHA105, se hicieron experimentos con el transgen *AVP1*, utilizando como agente selectivos: fosfonitricina, sorbitol y NaCl. Se utilizó el vector binario: pTF101.1 que llevaba el gen de selección *bar* y el gen quimérico 35S::*AVP1::nos* de la H⁺ pirofosfatasa vacuolar de *Arabidopsis*, en cual se introdujo en la cepa EHA105. La cepa fue resuspendida en un volumen de 18 mL de medio de agroinfección CM4C (sin agar, ni PPM, suplementado con 200 µM de acetosiringona), se cultivo a 25 ° C hasta que alcanzo una absorbancia 1.0 a A600nm =.

Callos embriogénicos de cuatro semanas de edad de la variedad Kronstad F2004 fueron sumergidos en el cultivo bacteriano durante una hora. Para eliminar el exceso de la bacteria, los explantes fueron colocados en papel secante estéril durante 4 min, posteriormente se transfirieron en medio de co-cultivo (CM4C) que contenía 2,4-D 0.5 mg L^{-1} y Picloram 2.4 mg L^{-1} , $200 \mu\text{M}$ de acetosiringona y sin PPM por 3 días en oscuridad, transcurrido el tiempo los callos fueron enjuagados con el antibiótico meropenem (80 mg L^{-1}) por 1 min. Los callos fueron secados y transferidos a un medio de selección con meropenem (50 mg L^{-1}) y distintos agentes selectivos; fosfotricina (5 mg L^{-1}), sorbitol (300 mM) y NaCl_2 (150 mM). El experimento tuvo un testigo positivo (callos sin agroinfectar en el medio de selección con meropenem). Los cultivos se incubaron durante dos semanas a 26°C en oscuridad. Esta metodología descrita, fue igual al primer experimento realizado con el agente selectivo kanamicina.

Al ver que los callos agro infectados se comportaban igual al control positivo en sus respectivos medios selectivos después de dos semanas, sin poder diferenciar los transformados de los no transformados, se procedió a aumentar la dosis de los agentes selectivos: fosfotricina (8 mg L^{-1}), sorbitol (400 mM) y NaCl (200 mM).

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones y un testigo para cada agente selectivo. La unidad experimental fue una caja petri de con 10 callos embriogénicos. Treinta días después la agroinfección se evaluó la tasa de transformación "TT" (número de callos con supervivencia/número total de callos agro infectados) $\times 100$).

5.2.2 Regeneración

Una vez seleccionados los callos que sobrevivieron en sus respectivos medios de selección fueron transferidos al medio de regeneración "PMR" (medio MS con vitaminas MS con 0.2 mg L^{-1} 2-4D y mg L^{-1} TDZ). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con diferentes repeticiones y un testigo. La unidad experimental consistió en 5 callos. Posteriormente, los callos que

regeneraron se subcultivaron al segundo medio de enraizamiento "SME" (Medio MS suplementado con vitaminas Gamborg las sales son al 50% con la adición de 0.5 mg L^{-1} AIA).

5.2.3 Análisis enzimático.

La actividad de la enzima β -Glucuronidasa (expresado por el gen *GUS*) se determinó histo-químicamente, seleccionado cinco callos que lograron crecer en un medio de selección con kanamicina después de dos semanas de la agroinfección; la actividad de la enzima también se evaluó en los brotes regenerados. Para tal efecto, los callos y brotes regenerados se colocaron en una solución de X-gluc como sustrato a temperatura ambiente (26°C). La tinción de los explantes seleccionados se observó al tercer día en un microscopio estereoscópico.

5.2.4 Segundo experimento de selección.

Se realizó un segundo experimento, debido a problemas de contaminación por la bacteria que se presentó durante la fase anterior en el medio de selección y regeneración. Utilizando la cepa EHA105 con el vector binario: pTF101.1 que contenía el gen de selección *bar* y gene quimérico *35S::AVP1::nos*. Se modificó el tiempo de enjuague de los explantes con el antibiótico aumentando a 2 min, y un incremento en la dosis del antibiótico meropenem a 60 mg L^{-1} en los medios de selección para radicar el crecimiento excesivo de la bacteria. Las demás condiciones fueron establecidas bajo las mismas condiciones físicas que en la etapa anterior partiendo de la dosis de los agentes selectivos: fosfotricina (8 mg L^{-1}), sorbitol (400 mM) y NaCl (200 mM), al igual que sus respectivos testigos.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones y un testigo para cada medio selectivo. La unidad experimental consistió de una caja petri con 10. A las ocho semanas después de la agroinfección se evaluó la tasa de transformación "TT" (número de callos con supervivencia/número total de callos agro infectados) X100). Los medios de

selección fueron renovados cada dos semanas. Los callos que sobrevivieron en los medios de selección se sembraron en el medio de regeneración “PMR”.

5.2.5 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza y comparaciones de medias mediante la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$ para cada variable evaluada. Se usó el paquete estadístico Minitab, versión 17.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Ensayos de expresión estable

Para corroborar, si la cepa EHA105 es efectiva en la agroinfección se realizó un ensayo de expresión estable del gen reportero *GUS* (pGUSint). Treinta por ciento de los callos agroinfectados crecieron en un medio con 70 mg L^{-1} de kanamicina; en tanto los callos testigos se oxidaron. No se detectaron diferencias significativas estadísticas en el porcentaje supervivencia de los callos transformados con respecto al testigo (Cuadro 5). El uso de la kanamicina como agente selectivo, ha tenido éxito en la transformación de cereales como el trigo (He *et al.*, 2010), y el maíz (Assem *et al.*, 2009).

Cuadro 5. Selección de resistencia a kanamicina en callos de trigo en un periodo de 30 días.

Variedad	Agente selectivo (mg L^{-1})	Supervivencia (%)
Kronstad	Kanamicina (70 mg L^{-1})	30.00 A
F2004	C+	40.00 A

Medias con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha \leq 0.05$)

La expresión estable del gen reportero *GUS*, fue observada después de un mes después del co-cultivo en los callos seleccionados al azar (cinco) que lograron crecer en kanamicina. A las 48 de iniciado el bioensayo con X-gluc, el 80 % de los explantes zonas azules con lo que se comprueba que la cepa

EHA105 logro infectar los callos de la variedad Kronstad (Figura 6). Esta observación es similar a los resultados reportados por Bhushan y Kumar, (2015) y Sarker y Biswas, (2002), quienes lograron una alta eficiencia de expresión del gen *GUS* en callos de trigo utilizando la cepa EHA105. La presencia de acetosiringona tanto en la inoculación como en el medio de cocultivo a una concentración 200 μ M, resulto esencial en la expresión estable del gen reportero *GUS*. De acuerdo Wu *et al.* (2003), el uso de este inductor fenólico incrementa la eficiencia de transferencia de T-DNA.

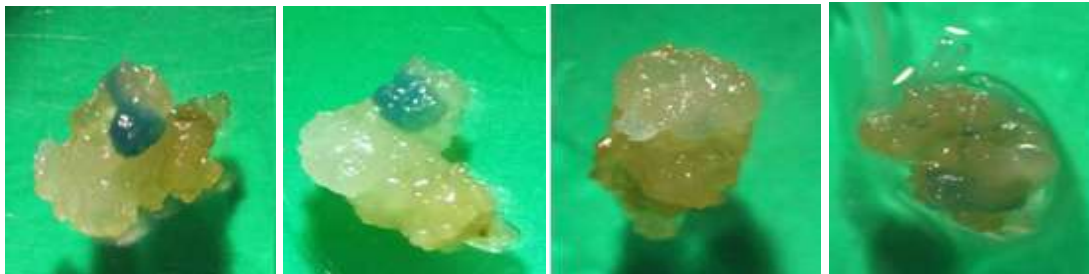


Figura 5. Ensayos de expresión estable del gen *GUS* en callo agroinfectados con la cepa EHA105 (a, b, c, d). (callos de seis semanas de edad y 30 días después de la agroinfección).

Los callos que sobrevivieron en el medio de selección, fueron transferidos a medio de regeneración. Dos semanas después, los callos regeneraron brotes (Figura 6, a). Se obtuvieron tres plantas a partir de 14 callos seleccionado que se pusieron en contacto con X-gluc y que mostraron coloración azul en los brotes regenerados (Figura 6 b, c, d), lo que indica que la cepa EHA105 de *Agrobacterium* puede transferir con éxito ADN en explantes regenerables de trigo de la variedad Kronstad.

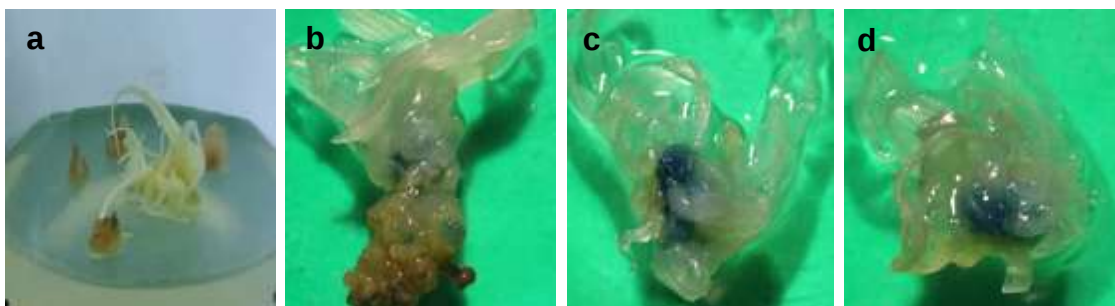


Figura 6. Diferenciación de brotes en callos resistentes a kanamicina (a). Expresión estable del gen *GUS* en brotes (b, c, d).

5.3.2 Transformación de *AVP1* en trigo

Con el fin de investigar el potencial del gen *AVP1* en la mejora de la tolerancia a sequía y salinidad en trigo, dicho gen fue clonado en el vector binario: pTF101.1, que llevaba el gen de selección *bar* y luego incorporado a la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* (Gaxiola et al., 2001). Una de las técnicas que nos permiten identificar los eventos transformados de los no transformados se fundamentan en los genes de selección que se podría determinar su presencia por la resistencia a agentes químicos o selectivos (Mendoza, 2014).

Callos de la variedad Kronstad de cuatro semanas de edad derivados de embriones maduros, después de la inoculación y co-cultivo con la cepa EHA105 de *Agrobacterium*, fueron cultivados con diferentes agentes selectivo en el medio CM4C: 7 mg/l de Fosfinotricina, 300 mM de sorbitol y 150 mM de NaCl, con el fin de determinar el mejor método de selección para la transformación. El uso de algún otro gen seleccionable a parte del agente de selección correspondiente puede mejorar aún más el método y aumentar la eficiencia de la transformación. Como el gen de interés *AVP1* confieren tolerancia a sequía y salinidad (Gaxiola et al., 2001), en este estudio, para su detección se emplearon los agentes selectivos sorbitol y NaCl.

5.3.3 Selección a NaCl, sorbitol y fosfinotricina

Los callos agroinfectados no presentaron resultados a las dos semanas de cultivo cuando se utilizaron los agentes selectivos en concentraciones de: fosfinotricina (5 mg L^{-1}), sorbitol (300 mM) y NaCl (150 mM). Por este motivo se procedió subcultivarlos nuevamente en un medio con dosis más alta de los agentes selectivos: fosfinotricina (8 mg L^{-1}), sorbitol (400 mM) y NaCl_2 (200 mM). Después de un mes de subcultivo en medio de selección, se observó la oxidación y oscurecimiento de los explantes. Al realizar la comparación entre los medios de selección con el, testigo, estadísticamente no se observaron diferencia significativa con respecto al porcentaje de supervivencia de los callos (Cuadro 6), por lo que fue difícil la elección del mejor agente de selección.

Cuadro 6. Efecto de los agentes selectivos sobre la selección de callos resistentes de trigo.

Variedad	Agente selectivo	Porcentaje de Supervivencia (%)
Kronstad F2004	NaCl2	30 A
	C+	30 A
	Sorbitol	22 A
	C+	50 A
	Fosfinotricina	28 A
	C+	30 A

Medias con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha \leq 0.05$)

Sin embargo, con el aumento de la dosis de los agentes selectivos, se logró diferenciar los explantes que supuestamente no adquirieron el gen de selección que fueron los que se oxidaron en comparación con los callos que sobrevivieron (Figura 7).

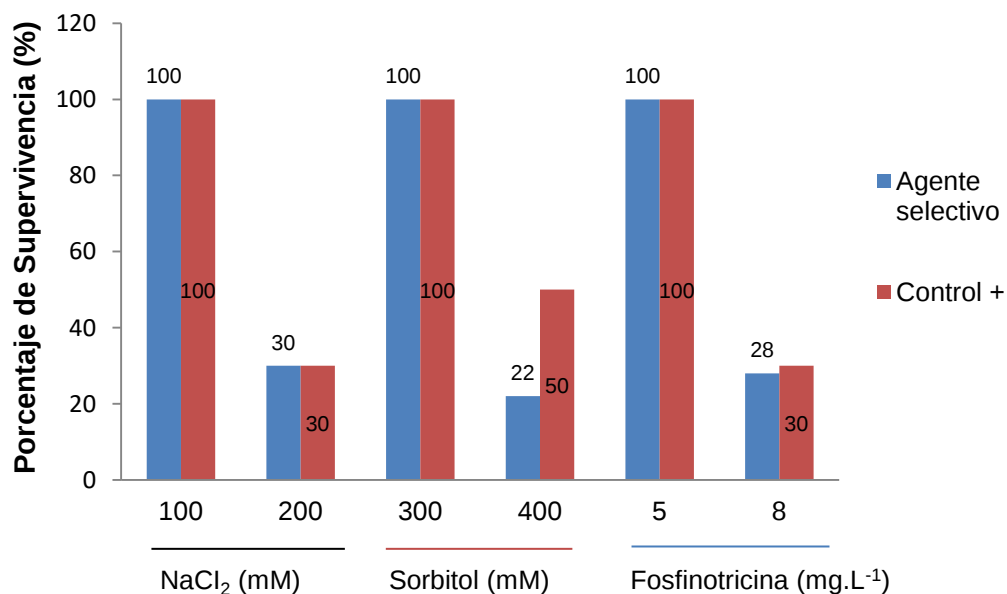


Figura 7. Evaluación de resistencia a diferentes agentes selectivos en callos trigo Kronstad en un periodo de 30 días.

5.3.4 Regeneración

Después de cinco rondas de selección (dos semanas), los callos que sobrevivieron, fueron transferidos a medio de regeneración. A las dos semanas, los callos regeneraron brotes en baja eficiencia, por lo que, no existió diferencias significativas entre los agentes selectivos para esta variable, mientras que los callos seleccionados con sorbitol y los no transformados (controles), no lograron formar brotes y a las dos semanas se necrosaron (Cuadro 7).

Cuadro 7. Regeneración de brotes a partir de callos de trigo de la variedad Kronstad resistentes a agentes selectivos.

Variedad	Agente Selectivo	Numero de explantes	Frecuencia de Regeneración (%)
Kronstad F2004	NaCl ₂	16	6.67 A
	C+	3	0.00 A
	Sorbitol	10	0.00 A
	C+	5	0.00 A
	Fosfinotricina	11	13.33 A
	C+	5	0.00 A

Medias con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha \leq 0.05$)

En NaCl₂ una planta sobrevivió y en fosfinotricina dos plantas, estas plántulas presuntamente transformada fueron transferida a medio de enraizamiento y a la tercera semana formaron raíces (Figura 8).

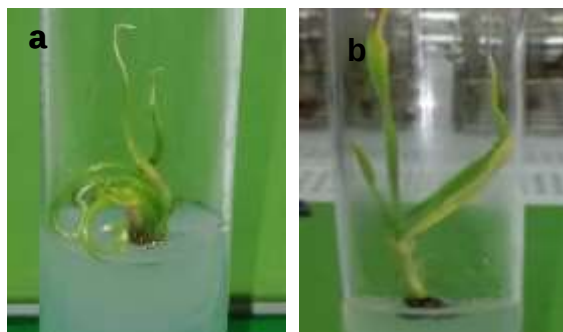


Figura 8. Diferenciación de brotes en callos resistentes a los agentes selectivos. NaCl₂ (200 mM) (a), fosfinotricina (8 mg L⁻¹) (b).

La pérdida de potencial de regeneración en el presente estudio, posiblemente se debe a que los explantes son propensos a sufrir daños durante la fase de lavado con el antibiótico meropenen, ya que fueron expuestos a dos lavados, , necesarios para la eliminación de *Agrobacterium*, uno después del co-cultivo y el otro a las dos semanas de cultivo en los medios de selección , debido a la re-colonización de la bacteria y este puede tener efecto negativo en la pérdida de células competentes resultando en un subsecuente decremento en la regeneración (Yarizade *et al.*, 2012; Pérez-Piñeiro *et al.*, 2012).

5.3.5 Selección de callos con base a su resistencia al NaCl, fosfotricina y sorbitol.

La selección es crítica en la transformación de plantas y la eficacia de un sistema de selección depende de la elección de un agente de selección. A partir del estudio realizado, se realizó otro experimento similar, bajo la misma metodología y condiciones de transformación. Partiendo de inicio con la dosis determinada de cada uno de los agentes selectivo para una selección más eficiente de callos transformados y con la modificación en el tiempo de lavado de los explantes a 1:45 min y un aumento de la dosis del antibiótico meropenen a 60 mg L⁻¹ en el medio de selección. Después de colocar los callos en los medios de selección, presentaron resultados a los 2 meses de cultivo . Con un $\alpha=0.05$, se demostró que existen diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de supervivencia de los callos que generaron resistencia a la dosis aplicada de cada agente selectivo (Cuadro 8).

Cuadro 8. Selección de callos de trigo, posiblemente transformado bajo el efecto de tres agentes selectivo.

Variedad	Agente selectivo (concentración)	Numero de Explantos	Porcentaje de Supervivencia (%)
Kronstad F2004	NaCl (200 mM)	100	61.00 A
	C+	20	25.00 B
	Sorbitol (400mM)	100	40.00 B
	C+	20	35.00 B
	Fosfinotricina (8 mg L ⁻¹)	100	45.00 B
	C+	20	30.00 B

Medias con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha \leq 0.05$)

Siendo la selección con 200 mM de NaCl, el mejor resultado con un 61 % de supervivencia de callos, en comparación con los resultados obtenidos en 400 mM de sorbitol y 8 mg L⁻¹ de fosfinotricina (Figura 7).

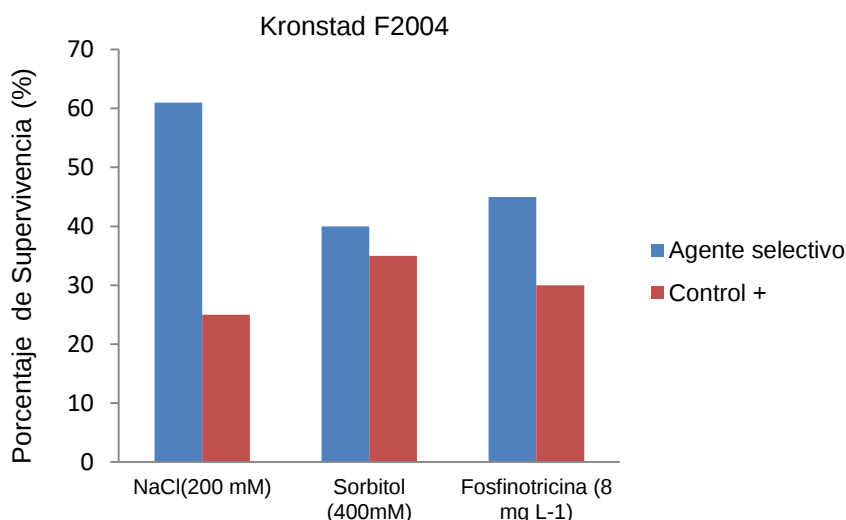


Figura 9. Efecto de tres agentes selectivos en la selección de callos presunatemnte transformados en trigo al segundo mes de exposición.

También se observó un decremento en la supervivencia de los callos sin transformar, sometidos a las mismas condiciones de cultivo de cada agente selectivo, que fueron los controles, presentado susceptibilidad a la dosis aplicada de cada agente, con el necrosamiento de los callos y la muerte de

algunos, que fue factor clave de referencia en la selección de callos posiblemente transformados que adquirieron el gen de selección para no tener falsos transformantes (Figura 8).

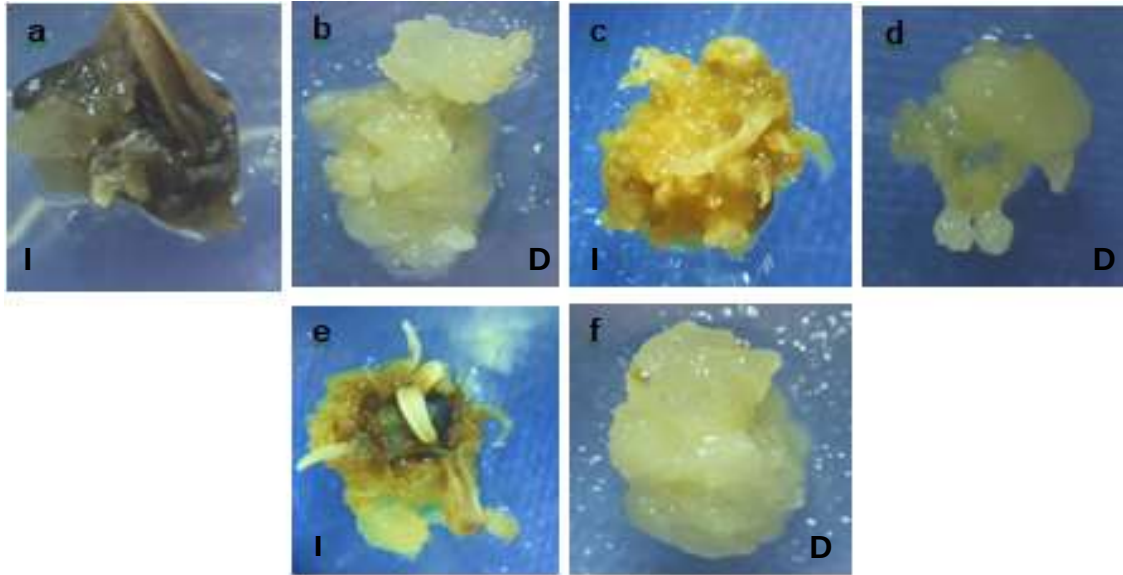


Figura 10. Explantes de trigo con tolerancia a diferentes agentes selectivo después de dos meses de selección (izquierda el control (I) y derecha callo presuntamente transformado (D)). NaCl (a, b), sorbitol (c, d) y fosfinotricina (e,f).

Los callos que sobrevivieron, fueron trasferidos a medio de regeneración, después de dos meses de selección, en ninguno de los explantes hubo formación de brotes, lo que pudiera explicarse, por los periodos de tiempo de cultivo prolongado, durante la selección, perdiendo la capacidad de regeneración de los explantes. Situación prevista por Barakat, (1985), quien reportó que las células de los explantes pierden su capacidad de regeneración después de varios subcultivos; debido que la células contienen frecuentemente núcleos que muestran varios grados de poliploidía, aneuploidía y anomalías cromosómicas. Asimismo, en otro estudio similar de acuerdo a Domelles *et al.*, (1997), al mantener callos durante periodo de tiempo largos de subcultivos reduce la eficiencia de regeneración en trigo.

Otro factor, podría ser la dosis, utilizada de los agentes selectivos, que resultó ser toxica para el explante y en consecuencia inhibió la regeneración de brotes. En relación con otros estudios reportados, en comparación con el NaCl que fue

el mejor método de selección sin formación de brotes. Zair *et al.*, (2003), señalaron, que bajo condiciones salinas, el número de plantas regenerantes en trigo decrece con el aumento de cloruro de sodio. Asimismo Mehta *et al.* (2010), indicaron que concentraciones superiores a 100 mM, inhiben la tasa de transporte de electrones debido al estrés salino que propicia una disminución en el índice de rendimiento se asemejan a lo encontrado en este estudio.

Con respecto a la fosfinotricina, en la mayoría de los trabajos de selección de callos transformados de *Triticum aestivum* L, reportan una dosis de 2-4 mg L⁻¹, en este rango, no tiene efecto negativo en la regeneración de plantas (Patnaik *et al.*, 2006; Wu *et al.* 2003), en contraste a nuestros resultados, que se utilizó una dosis más alta y eso pudo haber afectado en la eficiencia de regeneración. En relación al sorbitol, ha sido reportado que actúa como un elemento osmoactivo y crea un estrés osmótico, además favorece la formación y regeneración de callo de trigo (Benkirane *et al.*, 2000; Hassan *et al.*, 2009), dicho efecto, pudo haber sido aprovechado en la selección con el gen *AVP1*, sin embargo, no se obtuvieron respuestas satisfactorias en la formación de brotes

El factor clave para la regeneración de plantas transformadas es la optimización de las concentraciones del agente selectivo y los periodos de selección. Al parecer en nuestro experimento, no se logro una buena estandarización de estos parámetros de selección que permita la regeneración de brotes. Nuestro trabajo hace hincapié en las perspectivas para mejorar la formación de brotes y una de las estrategias es aumentar gradualmente el agente selectivo en la etapa de callos o hacer dos periodos de selección (de quince días) en la fase de callo, acompañado con la disminución o el retiro del agente selectivo durante la regeneración y el enraizamiento esto en relación con las observaciones de otros investigadores que han logrado una selección eficiente en trigo (Barakat y Abdel 1996; Karadimova y Djambova 1993; Patnaik y Khurana 2006).

5.4 CONCLUSIONES

Se corroboró la eficiencia de la cepa EHA105, en la expresión estable del gen *GUS* tanto en callos y brotes regenerados por el método de agroinfección a partir de embriones maduros de la variedad de trigo Kronstad F2004.

Se logró una mayor eficiencia de selección de callos resistentes a NaCl, mediante agroinfección utilizando la cepa EHA 105, aunque no se logró una regeneración exitosa, podría utilizarse en forma preliminar en la transformación y acortar el tiempo de selección como un mes para permitir la formación de brotes.

5.5 LITERATURA CITADA

- Assem, S. K., Hussein, E. H., Hussein, H. A., & Basry, M. (2009). Genetic transformation of the Nicotiana protein kinase (NPK1) gene confers osmotic tolerance in Egyptian maize. *Australian journal of basic and applied sciences*, 3(2), 828–835.
- Barakat, M. N., & Abdel-Latif, T. H. (1996). In vitro selection of wheat callus tolerant to high levels of salt and plant regeneration. *Euphytica*, 91(2), 127–140. <https://doi.org/10.1007/BF00021062>
- Benkirane, H., Sabounji, K., Chlyah, A., & Chlyah, H. (2000). Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61(2), 107–113. <https://doi.org/10.1023/A:1006464208686>
- Bhalla, P. L., Ottenhof, H. H., & Singh, M. B. (2006). Wheat transformation – an update of recent progress. *Euphytica*, 149(3), 353–366. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9087-6>
- Bhushan, S., Kumar, r., & kumar, h. (s/f). An Efficient Agrobacterium Mediated Transformation Method in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Trends in Biosciences*, 3131.
- Dai, S., Zheng, P., Marmey, P., Zhang, S., Tian, W., Chen, S., ... Fauquet, C. (2001). Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding*, 7(1), 25–33. <https://doi.org/10.1023/A:1009687511633>

- Dhlamini, Z., Spillane, C., Moss, J. P., Ruane, J., Urquia, N., & Sonnino, A. (2005). Status of research and application of crop biotechnologies in developing countries: preliminary assessment. *Status of Research and Application of Crop Biotechnologies in Developing Countries: Preliminary Assessment*.
- Dornelles, A. L. C., De Carvalho, F. I. F., Federizzi, L., Lange, C. E., Handel, C. L., & Bered, F. (1997). Genetics of regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Brazilian Journal of Genetics*, 20, 293–297.
- Duan, X.-G., Yang, A.-F., Gao, F., Zhang, S.-L., & Zhang, J.-R. (2007). Heterologous expression of vacuolar H⁺-PPase enhances the electrochemical gradient across the vacuolar membrane and improves tobacco cell salt tolerance. *Protoplasma*, 232(1), 87–95. <https://doi.org/10.1007/s00709-007-0268-5>
- Gaxiola, R. A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L. M., Allen, G. J., Alper, S. L., & Fink, G. R. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11444–11449. <https://doi.org/10.1073/pnas.191389398>
- Gyves, E. M. D. (2014). *Plantas Transgenicas: Beneficios y Riesgos*. Place of publication not identified: Lulu.com.
- Hassan, M., Ahmed, Z., Munir, M., Malik, S. I., & Shahzad, K. (2009). Effect of sorbitol in callus induction and plant regeneration in wheat. *African Journal of Biotechnology*, 8(23). Recuperado de <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/66179>
- He, Y., Jones, H. D., Chen, S., Chen, X. M., Wang, D. W., Li, K. X., ... 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. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq035>
- Jones, H. D., Doherty, A., & Wu, H. (2005). Review of methodologies and a protocol for the Agrobacterium-mediated transformation of wheat. *Plant Methods*, 1(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-1-5>
- Karadimova, M., & Djambova, G. (1993). Increased NaCl-tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L. and *T. durum* Desf.) through in vitro selection. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 29(4), 180–182. <https://doi.org/10.1007/BF02632032>
- Kumlehn, J., & Hensel, G. (2009). Genetic transformation technology in the Triticeae. *Breeding Science*, 59(5), 553–560. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.59.553>
- Kumlehn y Hensel - 2009 - Genetic transformation technology in the Triticeae.pdf. (s/f). Recuperado de https://www.istage.ist.go.jp/article/jsbbs/59/5/59_5_553/pdf

- Mehta, P., Jajoo, A., Mathur, S., & Bharti, S. (2010). Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(1), 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.10.006>
- Opabode, J. T. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 1(1), 12–20.
- Patnaik, D., Vishnudasan, D., & Khurana, P. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of mature embryos of *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. *Current Science*, 91(3), 307–317.
- Pérez-Piñeiro, P., Gago, J., Landín, M., & P. Gallego, P. (2012). Agrobacterium-Mediated Transformation of. *Transgenic Plants - Advances and Limitations*. <https://doi.org/10.5772/35232>
- Pesquera, S. de I. A. y. (s/f). Producción Agrícola. Recuperado el 4 de mayo de 2019, de gob.mx website: <http://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>
- Sarker, R., & Biswas, A. (2002). In vitro Plantlet Regeneration and Agrobacterium mediated Genetic Transformation of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 12. (2):155- 165
- Schilling, R. K., Marschner, P., Shavrukov, Y., Berger, B., Tester, M., Roy, S. J., & Plett, D. C. (2014). Expression of the Arabidopsis vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (AVP1) improves the shoot biomass of transgenic barley and increases grain yield in a saline field. *Plant Biotechnology Journal*, 12(3), 378–386. <https://doi.org/10.1111/pbi.12145>
- Wu, H., Sparks, C., Amoah, B., & Jones, H. D. (2003). Factors influencing successful Agrobacterium-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Reports*, 21(7), 659–668. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0564-7>
- Yarizade, A., Aram, F., Niazi, A., & Ghasemi, Y. (2012). Evaluation of Effect of β -Lactam Antibiotics on Suppression of Different Strains of Agrobacterium tumefaciens and on Wheat Mature Embryo Culture. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(4), 267–276.
- Zair, I., Chlyah, A., Sabounji, K., Tittahsen, M., & Chlyah, H. (2003). Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of in vitro selection pressure. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73(3), 237–244. <https://doi.org/10.1023/A:1023014328638>
- Zhao, F.-Y., Zhang, X.-J., Li, P.-H., Zhao, Y.-X., & Zhang, H. (2006). Co-expression of the Suaeda salsa SsNHX1 and Arabidopsis AVP1 confer greater salt tolerance to transgenic rice than the single SsNHX1. *Molecular Breeding*, 17(4), 341–353. <https://doi.org/10.1007/s11032-006-9005-6>