



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUIMICAS Y FARMACEUTICAS

CENTRO DE ESTUDIOS FOTOSINTETICOS Y BIOQUIMICOS

**MEJORAMIENTO DE LA CALIDAD NUTRICIONAL Y  
PANADERA DEL TRIGO POR INGENIERIA GENETICA**

MARIA LUCRECIA ALVAREZ

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR

DIRECTOR: Dr. RUBÉN H. VALLEJOS

2000

*Dedico esta tesis a mis padres, por el gran apoyo que siempre me brindaron, y por ser los principales responsables de todos mis logros.*

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento, fundamentalmente, al Dr. Rubén Vallejos por haberme dirigido en la elaboración de esta Tesis, así como también, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas que me dio la oportunidad de realizarla, a través del otorgamiento de una Beca de Iniciación (1995-1997) y de Perfeccionamiento en la investigación científica (1997-1999), y a la Fundación Antorchas gracias al otorgamiento de una beca durante el año 2000.

Al Dr. Peter Shewry, por proporcionarnos los plásmidos conteniendo los genes de las subunidades de glutenina de APM 1Ax1 y 1Dx5, que fueron empleados en el bombardeo.

Al Dr. Nigel Halford, por su colaboración en el diseño de la construcción de los plásmidos conteniendo el gen Cl-2, que realicé durante mi estadía en el Long Ashton Research Station, de Bristol, Reino Unido.

A la British Council – Fundación Antorchas, por el apoyo al proyecto “*Improvement of the Nutritional and Processing Properties of Wheat by Genetic Engineering*”, que incluyó mi trabajo en IACR-Long Ashton Research Station, de Bristol, Reino Unido.

A todos mis compañeros de trabajo del CEFOTI, especialmente a aquellos que han participado del proyecto PID N° PMT-SID-0174 (1996- 1998): a los licenciados Sebastián Guelman y Juliana Stein, a los ingenieros Silvina Lustig y Martín Reggiardo, a los doctores Ricardo Ravizzini y Hugo Permingeat.

A la Dra. Natacha Ryabushkina, del Institute of plant Physiology, Genetics and Bioengineering; Almaty, Kazakstan, por su colaboración en el análisis de proteínas de semillas, durante su estadía de 3 meses en el CEFOTI.

A la Sra. Raquel Bruno, bibliotecaria y secretaria del CEFOTI, por su cooperación en las búsquedas bibliográficas realizadas.

A mis amigos Pablo, Ariel, Nelson, Alejandro, Gustavo, y a mi hermana, Ma. Eugenia, por el continuo apoyo que siempre me dieron, especialmente en los momentos de desánimo en los que, la culminación de este trabajo de Tesis, parecía sólo un sueño inalcanzable.

Y, finalmente, un agradecimiento muy especial a mi amiga y compañera, la Ing. Silvina Lustig, por la ayuda que me brindó en todo momento, y por su estímulo constante.

## COLABORACIÓN EN EL TRABAJO EXPERIMENTAL

Este trabajo de Tesis estuvo enmarcado dentro del proyecto de "Obtención de trigo transgénico con resistencia a *Fusarium* y de mayor calidad", PID N° PMT-SID-0174, en el que participó un equipo interdisciplinario, entre ellos, se destacan los siguientes: el Ing. Martín Reggiardo y el Dr. Ricardo Ravizzini, que realizaron los experimentos de transformación estable de trigo; las ingenieras Silvina Lustig, Mónica López, Silvina Bacigaluppo, Mónica Morata, Cintia Heisterborg y Valeria Romagnoli, que participaron en el cultivo *in vitro* de embriones inmaduros, la selección, rusticación y cuidado de las plantas experimentales. La Ing. Silvina Lustig tuvo a su cargo los ensayos de resistencia *in vivo* al herbicida glufosinato y al antibiótico higromicina.

En los análisis de proteínas de semillas, por electroforesis en geles de poliacrilamida, se contó con la colaboración de Dra. Natasha Ryabushkina.

La estrategia utilizada en la construcción de los plásmidos conteniendo el gen CI-2 de cebada, que fueron posteriormente empleados en el bombardeo, fue diseñada en colaboración con el Dr. Nigel Halford, del Long Ashton Research Institute de Bristol, Reino Unido.

Una parte de los resultados que se describen en la presente Tesis han sido previamente dados a conocer en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

#### **A. PUBLICACIONES**

1. RH Vallejos ; ML Alvarez ; GD Cervigni ; CM Heisterborg ; MM Morata ; JL Morre ; JP Ortiz ; CM Palena ; HR Permingeat ; RA Ravizzini ; GL Rossi and MA Spitteler (1996). "*Genetic Engineering of Cereals : Transgene Expression in Maize and Wheat*". *Biotecnología Aplicada*, Vol. 13, N° 4, 288.
2. M. L. Alvarez ; S Guelman ; N.G. Halford ; S. Lustig ; M.I. Reggiardo ; N.Ryabushkina ; P. Shewry ; J. Stein ; R.H. Vallejos (2000). *Silencing of HMW glutenins in transgenic wheat expressing extra HMW subunits*. *Theoretical and Applied Genetics*, en prensa (Vol. 100, issue nº 2, january, 2000).

#### **B. REUNIONES CIENTÍFICAS**

1. Vallejos, R.H. ; Alvarez, M.L. ; Cervigni, G. ; Heisterborg, C.M. ; Morre, J.; Ortiz, J.P.; Palena, C. ; Permingeat , H. ; Romagnoli , M.V. ; Rossi, G. and Zanol, M.I. "*Genetic Engineering of Cereals*". First International Symposium on "Novel and non-Conventional Plants : Prospects of their Practical Use". Puschino, Moscú, Rusia, agosto de 1995.
2. Vallejos, R.H. ; Alvarez, M.L. ; Cervigni, G. ; Heisterborg, C.M. ; Morre, J.; Morata, M. ; Ortiz, J.P.; Palena, C. ; Permingeat, H. ; Ravizzini, R. ; Rossi, G. and Spitteler, M. *Genetic Engineering of Cereals: Transgene Expression in Maize and Wheat*. *Biotecnología Habana '95 : New Opportunities in Plant, Animal and Industrial Biotechnology*. La Habana, Cuba, noviembre de 1995.

3. Vallejos, R.H. ; Alvarez, M.L. ; Halford, N.G.\* ; ; Heisterborg, C.M. ; Morata, M.; Ravizzini, R. and Shewry, P. “ *Wheat Genetic Transformation As A Tool Contributing To Breeding For Quality* ”. 10<sup>th</sup> International Cereal and Bread Congress, Chalkidiki, Greece, June 1996.\* Investigadores pertenecientes a la Universidad de Bristol, Long Ashton Research Station, Bristol, Reino Unido.
4. Vallejos, R.H. ; Alvarez, M.L. ; Bacigaluppo, S. ; Halford, N.G.\* ; Heisterborg, C.M. Morata, M.; Ravizzini, R. and Shewry, P. “ *Genetic Engineering of Wheat HMW Glutenin for Improving Bread-Making Quality* ”. VIII congreso de la Asociación Panamericana de Sociedades de Bioquímica y Biología Molecular (PABMB), Pucón (Chile), noviembre de 1996.
5. Alvarez, M.L. ; Lustig, S. ; Stein, J. ; López, M. ; Reggiardo, M. ; Vallejos, R.H. *Silenciamiento de Subunidades de Glutenina de Alto Peso Molecular Endógenas por Transformación con los Genes de las Subunidades 1Ax1 y 1Dx5*. XXXIV Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, noviembre de 1998, Mendoza.
6. M. L. Alvarez ; S Guelman ; N.G. Halford ; S. Lustig ; M.I. Reggiardo ; N.Ryabushkina ; P. Shewry ; J. Stein ; R.H. Vallejos. *Transgene-induced silencing of endogenous hmw glutenin subunits genes in wheat*. Symposium in Common Themes in Transcription and RNA processing (ICGEB meeting). Buenos Aires, septiembre de 1999.
7. M. L. Alvarez ; S Guelman ; N.G. Halford ; S. Lustig ; M.I. Reggiardo ; N.Ryabushkina ; P. Shewry ; J. Stein ; R.H. Vallejos. *Silenciamiento de los genes endógenos de las subunidades de glutenina de alto peso molecular inducido por la introducción de transgenes homólogos en trigo*. IV Simposio de Biotecnología Vegetal. REDBIO Argentina. Buenos Aires, noviembre de 1999.

# **DICTAMEN DEL JURADO**

## Escuela de Graduados

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Suipacha 531

2000-Rosario República Argentina

Tel: 0341 - 4804594

Fax 0341- 4804598

E-mail gradu-bio@fbioyf.unr.edu.ar

En la ciudad de Rosario a los siete días del mes de abril del año dos mil, en la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, se reúne el Jurado designado para dictaminar sobre el Trabajo de Tesis de la Bioq. MARIA LUCRECIA ALVAREZ , sobre el tema "Mejoramiento De La Calidad Nutricional Y Panadera Del Trigo Por Ingeniería Genética", integrado por la Ing. Qca. Martha B. Cuniberti, Dra. Estela M. Valle y Dr. Juan Pablo Amelio Ortiz.

Luego de escuchar la exposición oral de la Bioq. Alvarez sobre el tema de Tesis, este Jurado considera que fue excelente y con un muy buen uso del material visual. Finalizada la misma la Bioquímica Alvarez respondió con acierto y solvencia las preguntas del jurado, demostrando amplios conocimientos sobre el tema.

El trabajo de tesis representa un aporte original e importante para futuros trabajos relacionados con el mejoramiento de la calidad panadera de los trigos argentinos y con el estudio de un fenómeno de reciente descripción como es el silenciamiento génico en los cereales.

Los objetivos del trabajo han sido perfectamente interpretados, las modificaciones realizadas a las técnicas analíticas para lograr una mejor resolución e interpretación de los resultados fueron adecuados, el desarrollo de los planteos propuestos, los criterios utilizados y las conclusiones arribadas han sido apropiadas. Así mismo, destacamos que los criterios de búsqueda y aplicación bibliográfica fueron correctos y acordes a los objetivos planteados.

Por todo lo anteriormente expuesto, este Jurado considera, por unanimidad, que la tesis de la aspirante Bioq. María Lucrecia Alvarez merece la calificación de SOBRESALIENTE.

No siendo para más, se da por finalizado el acto y se labra la presente acta, firmándose tres ejemplares de igual tenor y a un sólo efecto.

Ing. Qca. Martha B. Cuniberti

Dra. Estela M. Valle

Dr. Juan Pablo A. Ortiz

## INDICE

	<b>Pág.</b>
<b>I. INTRODUCCION.....</b>	<b>12</b>
1. Importancia del cultivo de trigo en la Argentina y en el mundo.....	13
2. Principales usos y subproductos.....	18
3. Clasificación de los distintos tipos de trigos.....	20
4. Calidad panadera del trigo.....	25
4.1. Factores que influyen en la calidad panadera.....	26
4.2. Metodologías de análisis de calidad de trigo.....	27
4.3. Composición del grano de trigo.....	30
4.4. Proteínas de almacenamiento del grano.....	32
4.4.1. Clasificación de las prolaminas en las tritíceas.....	33
4.4.2. Relaciones estructurales y evolutivas de las prolaminas.....	37
4.4.3. Prolaminas de trigo: gliadinas y gluteninas.....	39
4.4.4. Síntesis, ensamblaje y transporte de gliadinas y gluteninas....	43
4.5. Subunidades de glutenina de alto peso molecular .....	45
4.5.1. Caracterización genética y estructural.....	46
4.5.2. Relación entre estructura y propiedades elásticas.....	51
4.5.3. Efecto cuali y cuantitativo en la calidad panadera.....	55
4.5.4. Polimorfismo presente en cultivares de trigos argentinos.....	60
5. Calidad nutricional del trigo.....	63
5.1. Contenido de proteínas y composición de aminoácidos del trigo.....	64
5.2. Proteínas de cebada con alto contenido de lisina.....	67

	<b>Pág.</b>
6. Ingeniería genética de plantas.....	70
6.1. Métodos de transformación de plantas.....	71
6.2. Transformación transiente y estable de cereales.....	73
7. Objetivos del trabajo de tesis.....	76
8. Abreviaturas y símbolos.....	77
 <b>II. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	 <b>79</b>
 9. MATERIALES Y METODOS.....	 80
9.1. Transformación genética de trigo.....	80
9.2. Plásmidos utilizados en la transformación.....	81
9.3. Análisis moleculares y estudio de la expresión de los transgenes.....	83
9.3.1. Obtención de ADN por el método de CTAB modificado.....	83
9.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa.....	85
9.3.3. Hibridización Southern: método radioactivo y no radioactivo.....	86
9.3.4. Marcación de sonda y detección.....	88
9.3.5. Análisis de proteínas de semillas utilizando SDS-PAGE.....	94
9.3.6. Análisis densitométricos de geles de SDS-PAGE y Southern.....	99
9.3.7. Ensayo de histoquímica para actividad de $\beta$ -glucuronidasa.....	100
9.3.8 . Ensayos de resistencia a glufosinato e higromicina <i>in vivo</i> .....	100
 10. RESULTADOS .....	 101
10.1. Expresión de transgenes de subunidades de glutenina de A.P.M.....	101
10.1.1. Sobreexpresión de la subunidad 1Dx5.....	103
10.1.2. Sobreexpresión de la subunidad 1Ax1.....	109

	<b>Pág.</b>
10.1.3. Expresión del transgén de la subunidad 1Ax1.....	114
10.1.4. Expresión de transgenes asociado al silenciamiento génico de todas las SG- APM endógenas.....	121
10.2. Cotransformación con genes selectores y /o marcadores.....	141
10.3. Transformación de trigo con el gen CI-2 de cebada .....	155
10.3.1. Estrategia general para la construcción de los plásmidos.....	157
10.3.2. Búsqueda de posibles plantas transgénicas: análisis por PCR...	164
10.3.3. Medida de actividad <i>hpt</i> in vivo.....	166
 <b>III - DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....</b>	 <b>167</b>
11. DISCUSION DE RESULTADOS.....	168
11.1. Sobreexpresión de subunidades de gluteninas de A.P.M. ....	168
11.1.1 Sobreexpresión de la SG-APM 1Dx5.....	168
11.1.2 Sobreexpresión de la SG-APM 1Ax1.....	170
11.2. Expresión de nuevas subunidades.....	171
11.3. Expresión de transgenes asociado al silenciamiento de las SG-A.P.M. endógenas.....	177
11.4. Cotransformación con genes selectores y o marcadores.....	183
12. CONCLUSIONES.....	186
 <b>IV – RESUMEN.....</b>	 <b>187</b>
13. Calidad panadera y nutricional del trigo: breve introducción.....	188

	<b>Pág.</b>
14. Objetivos propuestos.....	189
15. Resultados más importantes.....	189
16. Conclusiones.....	191
<b>V – BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>192</b>

## 1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE TRIGO EN LA ARGENTINA Y EN EL MUNDO

El trigo es uno de los cereales más cultivados del mundo y representa una de las principales fuentes de alimento para el consumo humano y animal. Su importancia deriva de las propiedades físicas y químicas del grano que permiten su empleo en la alimentación humana y en la elaboración de un gran número de subproductos (1). Tanto en volumen como en valor, el trigo es tradicionalmente el rubro más importante del comercio externo de productos agrícolas (2). La superficie mundial ocupada anualmente con este cultivo es de, aproximadamente, 220 millones de hectáreas y la producción total del grano, durante la campaña 1998 /1999, ascendió a 592 millones de toneladas (tabla 1). El valor anual de la producción supera los 60.000 millones de dólares (3).

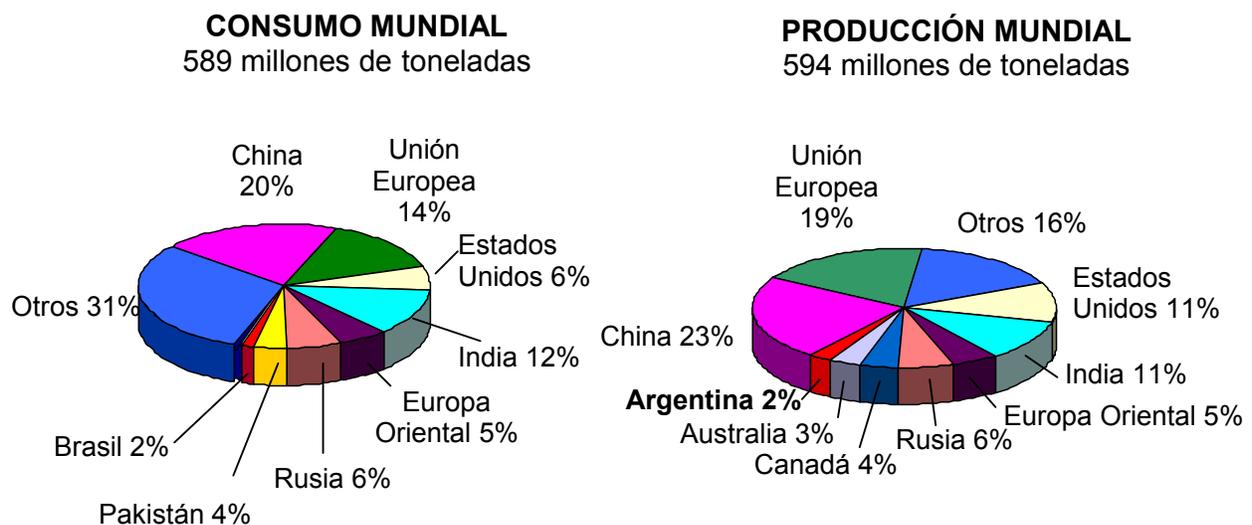
**Tabla 1: Producción, consumo y comercio de trigo en el mundo**

Campaña	90/91	91/92	92/93	93/94	94/95	95/96	96/97	97/98	98/99
Área (millones de has.)	229	221	222	219	215	219	230	229	223
Producción (millones de ton.)	593	543	562	557	526	541	582	609	592
Consumo (millones de ton.)	574	558	552	561	547	553	581	588	599
Exportación (millones de ton.)	91	109	105	93	92	90	95	96	98

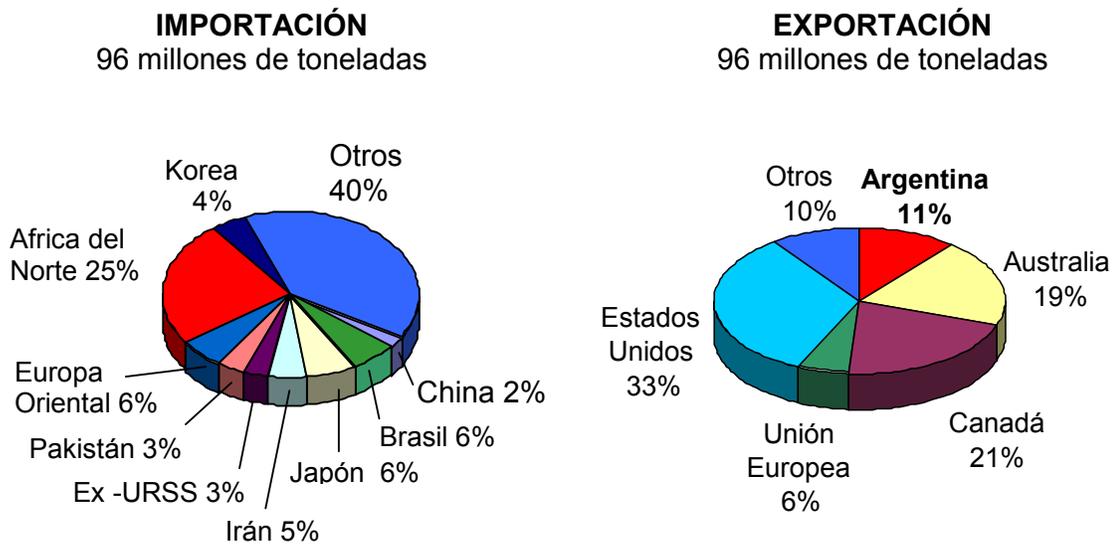
Fuente: C.I.C. (Consejo Internacional de Cereales) y U.S.D.A. (Departamento de Agricultura de Estados Unidos). Informe junio de 1999.

Se cree que el trigo es originario de Asia menor de donde se expandió a la cuenca del Mediterráneo y a algunos países asiáticos. Más tarde se difundió al resto de Europa y luego, casi inmediatamente después de su descubrimiento y colonización, a América y Oceanía. En la actualidad constituye el cultivo más adaptado a las distintas condiciones agrícolas del mundo. Los trigos invernales se cultivan en el centro y sur de los Estados Unidos, en el oeste de Europa, en los Balcanes, en el sur de la ex URSS y en China debido a que pueden resistir las temperaturas invernales. Los trigos primaverales se cultivan en el norte de los Estados Unidos y Canadá, el norte y centro de la ex URSS, (donde los inviernos son demasiado severos para que los trigos invernales puedan sobrevivir) y en Argentina, Australia, Brasil e India (donde los inviernos son demasiado benignos para lograr la vernalización de los trigos invernales) (4 y 5).

Los principales países productores son China, Estados Unidos, India, Rusia, Canadá, la Unión Europea, Australia y Argentina (figura 1) y los principales exportadores son Estados Unidos, la Unión Europea, Canadá, Australia y Argentina (figura 2). (6, 7 y 8).



**Figura 1:** Producción y consumo mundial de trigo. Se consideró el promedio de las 3 últimas campañas.



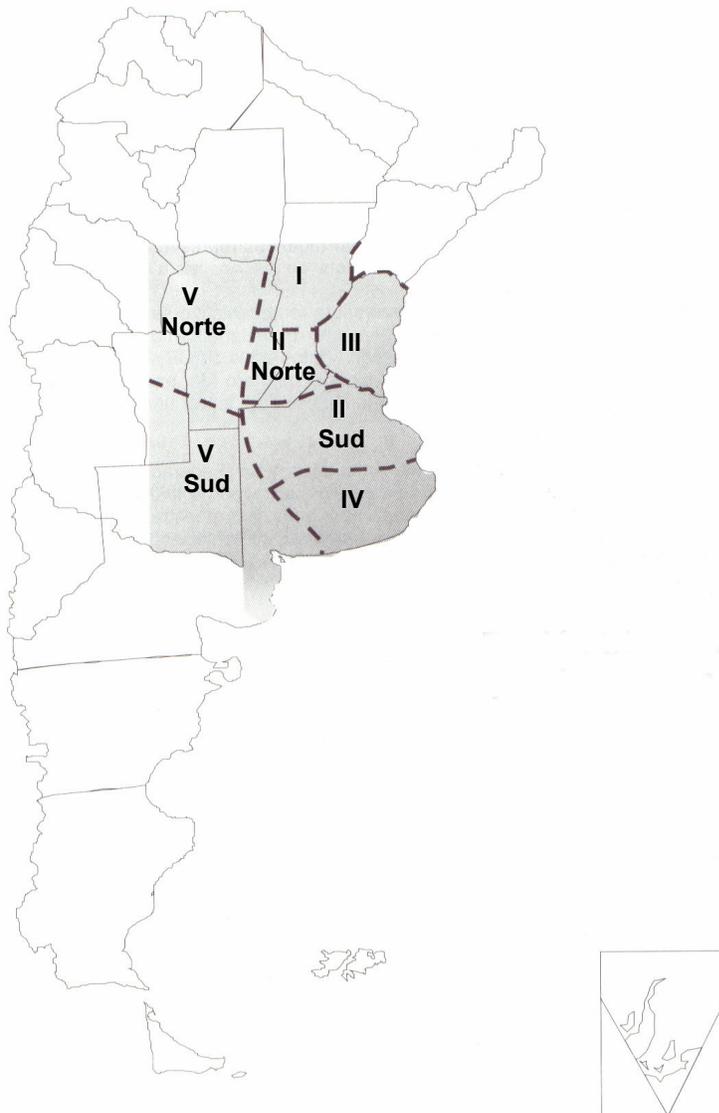
**Figura 2:** Comercio mundial de trigo por países. Se consideró el valor promedio de las 3 últimas campañas.

### El trigo en la Argentina

El trigo, a diferencia del maíz que es originario de América, fue traído por los conquistadores. De acuerdo con referencias históricas, Gaboto fue el primero en introducirlo en el Río de la Plata en 1527, cuando fundó el fuerte Sancti Spiritus, en la desembocadura del río Carcarañá. Durante tres siglos y medio se lo siguió cultivando en pequeñas parcelas en los alrededores de las aldeas, sin embargo, el consumo interno era muy limitado dado que la población era muy reducida y su alimento básico era la carne vacuna. Recién en la década de 1870 se produce una verdadera expansión del cultivo, cuando las colonias agrícolas comenzaron a extenderse por las provincias de Santa Fe, Córdoba, La Pampa y Entre Ríos (4). El trigo fue el cultivo fundador de la colonización agrícola de la región pampeana, de allí que, en cierta forma, la historia del trigo en el país, es la de la agricultura argentina, con todas sus implicaciones económicas, financieras, políticas y sociales.

Actualmente, la región triguera argentina se halla localizada en la región pampeana y se divide en siete subregiones ecológicas de acuerdo a las características locales de clima y suelo. Las subregiones se denominan: Subregión Ecológica Triguera I, II norte, II sur, III, IV, V norte y V sur (figura 3). Esta amplia región posee un clima templado, con dos áreas bien diferenciadas: una húmeda, con un promedio de 800 milímetros anuales, y otra semiárida, con 600 milímetros (1).

**Figura 3: REGIÓN TRIGUERA Y SUBREGIONES**



En los últimos años, la superficie total sembrada anual osciló entre 4,7 y 7,3 millones de hectáreas, ocupando, principalmente, las provincias de Buenos Aires y Santa Fe. Los rendimientos y la producción total se han mantenido entre los 1900 y 2600 kg/ha, y los 9 y 16 millones de toneladas anuales, respectivamente (tabla 2). En general, el destino de la producción se reparte entre el consumo interno de, aproximadamente, 5 millones de toneladas, y la exportación del resto de lo producido. La Argentina es uno de los principales países exportadores de trigo, junto con Australia, Canadá, Estados Unidos y la Unión Europea (figura 2). Los países compradores más importantes son Brasil, Perú, Chile, Paraguay, Egipto, Irán e Indonesia. De todos ellos se destaca Brasil que compra alrededor del 70% del total del saldo exportable argentino.

<b>TRIGO</b>	<b>1995/96</b>	<b>1996/97</b>	<b>1997/98</b>	<b>1998/99</b>
Área sembrada (miles de has.)	5088	7367	5919	4770
Producción (miles de toneladas)	9450	15904	15800	11200
Rendimiento (Kg/ha)	1936	2241	2596	2309
Exportación (miles de toneladas)	4200	10500	9000	6100
Forraje (miles de toneladas)	150	150	150	170
Consumo total (miles de toneladas)	4700	5000	5200	5000

**Tabla 2:** El trigo en la Argentina. Oferta y demanda en las últimas campañas. Según informe de la SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la República Argentina).

## 2. PRINCIPALES USOS Y SUBPRODUCTOS

Si bien el uso más importante y generalizado del trigo es en la elaboración del pan, su rango de utilización es prácticamente tan amplio como el número de regiones en las que se lo cultiva en el mundo. Los productos derivados del trigo que se elaboran en los diferentes lugares, son altamente determinados por la cultura de los pueblos y han asumido un significado religioso, así como también, importancia económica y nutricional (9). El comercio panadero se impulsó en la Edad Media, cuando empezaron a producirse distintos tipos de pan. El tipo de pan tenía implicaciones sociales: el pan blanco era privilegio de los ricos y el negro estaba reservado para los pobres (10).

Además del pan con levadura, un amplio rango de otros productos ha sido desarrollado por diferentes culturas. Estos incluyen distintos tipos de pan chato (principalmente en la India), tortillas (panecillos redondos, pequeños y aplastados, sin levadura, característicos de México y América Central), pizzas y más de 60 diferentes tipos de pastas, con distinto color, forma y sabor, entre los que se encuentran los noodles (especie de tallarines de China y el sudeste asiático) y otros tipos de fideos como los macarrones y los espaguetis (11). También se le emplea en la elaboración de especialidades de panadería, confitería y repostería como tortas, galletitas, panqueques, budines, conos de helados, pan dulce, etc. (10).

Además de ser el principal cereal destinado al consumo humano directo, junto con el arroz, el trigo también tiene importancia como grano forrajero. Si bien se destina sólo un 15-20% de la producción mundial a ese uso, esto equivale a un volumen que oscila alrededor de 100 millones de toneladas y que representa, aproximadamente, el 15% del total de granos destinados a la

alimentación animal. De allí que su importancia como forraje sea muy relevante, y se encuentre en el tercer lugar después del maíz y la cebada. En nuestro país, sólo 150.000 toneladas al año son destinadas a este uso (tabla 2).

El gluten del trigo (formado cuando se combinan con agua las proteínas, gliadinas y gluteninas, presentes en la harina), de consistencia elástica y adherente, es utilizado en el estampado de los tejidos, en la preparación de adhesivos, en la industria del papel, etc. También se lo emplea en la elaboración de glutamato monosódico cuyo consumo, para acentuar el sabor de las comidas, se encuentra bastante difundido, especialmente en los países de Oriente (2).

### 3. CLASIFICACION DE LOS DISTINTOS TIPOS DE TRIGOS

El trigo no es un producto homogéneo, ya que existe una marcada diversidad de clases o tipos que dependen de la especie y variedad que se cultive, y del medio donde se lo cultive (suelo y clima). Existen, también, variaciones en sus características físicas y/o químicas que son de naturaleza accidental, ya que se originan por factores climáticos o sanitarios anormales o bien por el manejo de la cosecha y el deficiente acondicionamiento y almacenaje posterior del grano (2).

Los factores o criterios que se usan más frecuentemente a los efectos de clasificación son:

- a) El botánico (especie y variedad)
- b) La época de siembra (de invierno o primavera)
- c) El color del grano (rojo, blanco, claro , oscuro, etc.)
- d) La dureza del grano (blando, semiduro, duro)
- e) El peso hectolítrico (peso de un volumen de 100 litros de trigo, expresado en kg/hl). A mayor peso hectolítrico, mayor rendimiento de harina.
- f) La sanidad del grano y la mayor o menor presencia de cuerpos extraños
- g) Por su uso o destino (pan, fideos,etc).

Para lograr una clasificación más precisa pueden tomarse dos o más de los factores enumerados. Las normas de calidad comercial o tipificación, especialmente en los países desarrollados, se basan en una combinación de factores o criterios diferenciadores de las características relacionadas con la aptitud de uso de este grano. Las dos clasificaciones más utilizadas y de mayor

valor práctico son las que se basan en el aspecto botánico y en la dureza del grano.

### **Clasificación botánica**

El trigo se clasifica dentro de la División Angiospermas, la Clase Monocotiledóneas, el Orden Glumiflorales, la Familia *Poáceas* (Gramíneas), la tribu *Triticeas* y el género *Triticum* (29). Si bien se conocen unas quince especies de este género, las cultivadas son solamente tres:

a) *Triticum aestivum* L.: se lo conoce comercialmente como trigo pan o común. Es el más difundido en el mundo y el más apto para panificación. Dentro de esta especie existe una muy amplia gama de variedades y una marcada variabilidad entre éstas en cuanto a dureza del grano, contenido de proteínas, características del gluten, etc.

b) *Triticum durum*: se lo conoce internacionalmente como “durum” y en nuestro país como “trigo para fideos” o “candeal”. Se caracteriza por la dureza de su grano y el alto contenido de proteínas. Cuando se lo muele se obtiene una harina de granulación gruesa o sémola cuyo mayor empleo es en la fabricación de fideos. Su producción a nivel mundial es poco importante (del 4 al 5 %) y se lo cultiva en Estados Unidos, Canadá, Argentina, países del Mediterráneo, Rusia, etc.

c) *Triticum compactum*: comercialmente se lo conoce en muchos países como trigo club. Su producción a nivel mundial es limitada. Los principales productores son Estados Unidos y algunas regiones de Oriente. En la Argentina no se lo cultiva. Su grano es de textura dura, semejante al trigo pan. Se caracteriza por producir una harina granular, con bajo tenor de proteínas y poca

absorción de agua, por lo que no es apto para panificación y se lo emplea, especialmente, en repostería (2).

A su vez, dentro de cada una de estas tres especies, existe una amplia gama de variedades (a las que se agregan las que se van creando en los campos experimentales), cuyas características intrínsecas difieren en cada caso. Las semillas empleadas en la Argentina son de origen local, contando entre las principales empresas semilleras a Produsem (comercializadora de las variedades del INTA), el Semillero J. Buck S.A. y el Semillero Klein S.A. Entre las variedades más difundidas en la actualidad se encuentran: ProINTA Oasis, ProINTA Federal, Buck Poncho, Buck Charrúa, Klein Orion y Klein Cacique.

### **Clasificación por la dureza del grano**

El factor dureza se halla muy asociado a determinadas características del grano, especialmente, a la cantidad y calidad de las proteínas. Este aspecto tiene mucha importancia en cuanto a la aptitud para uno u otro uso de la harina.

De acuerdo con su dureza, se los clasifica en duros y blandos. En el primero la contextura del grano es mucho más firme, con un contenido de proteínas oscilando entre 10 y 17 %, y un gluten más fuerte, reuniendo las mejores condiciones para panificación. En cambio, los trigos blandos, son de menor consistencia, con un contenido de proteínas entre 7 y 10 %, un gluten más débil y menos estable, siendo más apto para la elaboración de galletitas, productos de repostería elaborados a base de leudantes, etc. Existen, además, trigos con características intermedias que se los conoce como semiduros (2).

La producción de uno u otro trigo con frecuencia se encuentra muy condicionada por factores climáticos. En las regiones de clima relativamente húmedo y con poca amplitud térmica se comportan relativamente mejor los trigos blandos, mientras que en las regiones menos húmedas y con clima continental se cultivan de preferencia los duros.

No existen pautas o criterios de valor universal para la clasificación de los trigos en duros y blandos. En algunos países, tales como Estados Unidos, Canadá y Japón, el criterio que se utiliza es el de su adaptación a ciertos productos, más que la textura en sí del grano o su contenido de proteínas. Se considera a un trigo como duro cuando se comporta adecuadamente en la elaboración del pan, y blando cuando se adapta para la elaboración de galletitas, productos de repostería, etc.

En la Argentina se clasifica el trigo pan en duro y semiduro sobre la base del comportamiento del gluten, ya que existe una marcada correlación entre dureza del grano y tipo de gluten.

Dentro de los trigos considerados como duros es frecuente su clasificación en correctores y de panificación directa (1).

**Trigos correctores o de fuerza:** se conocen como tales los que, dada la cantidad de gluten, son empleados en gran medida para efectuar cortes o mezclas para mejorar la calidad panadera en los países en cuya producción predominan los trigos blandos, como los países del oeste de Europa.

**Trigos de panificación directa:** son aquellos cuya harina puede emplearse directamente, sin mezclas o cortes previos, en la panificación. Se los conoce

también como trigos equilibrados desde el punto de vista de sus características plásticas (elasticidad, tenacidad, etc.) y aptitud fermentativa. Las variedades actualmente difundidas en nuestro país, especialmente en la región centro-norte, pertenecen a este tipo. Son los trigos demandados por los países que prácticamente no tienen producción propia.

#### 4. CALIDAD PANADERA DEL TRIGO

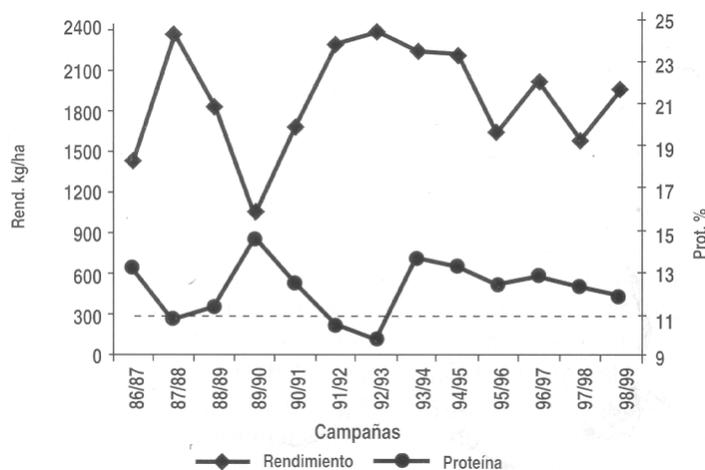
Una de las formas de biotecnología más antiguas de la humanidad es la utilización de la harina de trigo en la producción de pan, encontrándose ya bien establecida en el antiguo Egipto, hace más de 4000 años (9). Con el transcurso del tiempo, el hombre ha ido seleccionando las mejores variedades de trigo en función de su calidad panadera, la adaptación a una región en particular, el rendimiento y la resistencia a determinadas enfermedades.

La calidad panadera del trigo está determinada por la cantidad y propiedades de las principales proteínas de almacenamiento del grano: gliadinas y gluteninas. Estas se depositan en el endosperma en desarrollo, y proveen una fuente de aminoácidos para la germinación (12). Cuando el endosperma es molido y la harina resultante, mezclada con agua, las proteínas de almacenamiento se unen para formar una red proteica continua llamada gluten. De esta forma, se obtiene una masa cohesiva, con características viscoelásticas únicas, como resultado de una adecuada combinación de dos propiedades físicas: elasticidad y extensibilidad, cruciales para la elaboración del pan. Las proteínas del gluten son responsables, no sólo de estas propiedades de la masa, sino también de la habilidad de la masa para retener gas ( $\text{CO}_2$ ), producido por las levaduras durante la fermentación. Esto permite que la red de gluten se expanda, resultando en una estructura liviana, porosa y desmenuzable, la cual es fijada por cocción. El gluten debe poseer un balance preciso de estas propiedades, ya que una elasticidad excesiva limitaría la expansión, mientras que con una insuficiente elasticidad fallaría la retención de ( $\text{CO}_2$ ) (10).

#### 4.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD PANADERA

Los factores que influyen en la calidad panadera son aquellos que afectan a la calidad y cantidad de las proteínas del grano y, más específicamente, del gluten (2). Si bien la aptitud genética de una variedad es fundamental, ya que determinaría el nivel máximo de calidad panadera que puede alcanzar, existen una serie de otros factores que harían que responda en forma variada. Ellos son: la fertilidad del suelo (13), la disponibilidad de agua durante el ciclo de cultivo, las temperaturas al momento de formación y llenado del grano, y las condiciones ambientales en las cuales se desarrolla la cosecha (14 y 15).

Desde el punto de vista genético o botánico, existe una marcada diferencia en cuanto al contenido de proteína entre las distintas variedades de trigo pan, que no es mayor al 3% (cuando se las compara en iguales condiciones ambientales). Es así como, dentro de las variedades actualmente en difusión, se dispone de distintas calidades coincidiendo, en general, cultivares de alta producción con baja calidad, debido a la relación inversa que existe entre rendimiento y proteína (figura 4).



**Figura 4:** Rendimiento y porcentaje de proteína de trigos, de las campañas 86/87 a 98/99, en los departamentos Marco Juárez y Unión (según estudio realizado por INTA Marco Juárez) (14).

En base a su diferente contenido de proteínas es posible clasificar a los trigos panaderos argentinos en:

A) Tipo duro

- Clase A: muy buena calidad, más del 12% de proteínas o alrededor de 30% de gluten
- Clase B: calidad aceptable, 10-12% de proteína o alrededor del 25% de gluten

B) Tipo blando

- Menos del 9% de proteína

En nuestro país, a partir de 1996, se bonifica con un 2% al trigo que supera el 11% de proteína y se rebaja en la misma proporción al que tiene menos del 11%. Esta disposición tiende a mejorar la calidad de la producción triguera argentina.

#### **4.2. METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS DE CALIDAD DE TRIGO**

Para evaluar la calidad industrial del trigo se tienen en cuenta las características del grano, el comportamiento en la molienda, distintos valores analíticos de la harina (humedad, contenido de gluten, etc.), propiedades reológicas de la masa y cualidades panaderas que, en conjunto, determinan la calidad de un trigo.

Las características del grano constituyen factores importantes de calidad en la valoración de un trigo. El peso hectolítrico es un importante factor de calidad en todas partes del mundo y está influenciado por la uniformidad, forma, densidad y tamaño del grano, además del contenido de materias extrañas y granos quebrados de la muestra. Se define como el peso de 100 litros de trigo (expresado en kg/hl.) y se determina mediante la balanza Schopper. A un peso

hectolítrico bajo corresponde una molienda pobre, bajo rendimiento de harina y de inferior calidad. El comportamiento en la molienda es otro aspecto de importancia dentro del criterio de calidad. Trigos de baja extracción de harina o alto contenido de cenizas en las mismas constituyen un problema desde el punto de vista molinero (16).

La calidad panadera del trigo está determinada por la capacidad de absorción de agua de la harina, tiempo de amasado, aspecto de la masa, volumen de pan, porosidad y blancura de la miga. Todas estas características constituyen el valor panadero de un trigo y dependen, fundamentalmente, de la cantidad y calidad de las proteínas del endosperma (17). La cantidad de proteínas de la harina se determina por el método de Kjeldhal, mientras que en el grano se cuantifica por métodos rápidos basados en transmitancia de infrarrojo (NIRT). Además, los análisis reológicos de la masa permiten realizar determinaciones indirectas de la calidad panadera. Para ello se construyen curvas llamadas farinograma, mixograma y alveograma según el aparato empleado y la información que suministran (16).

**Farinograma:**

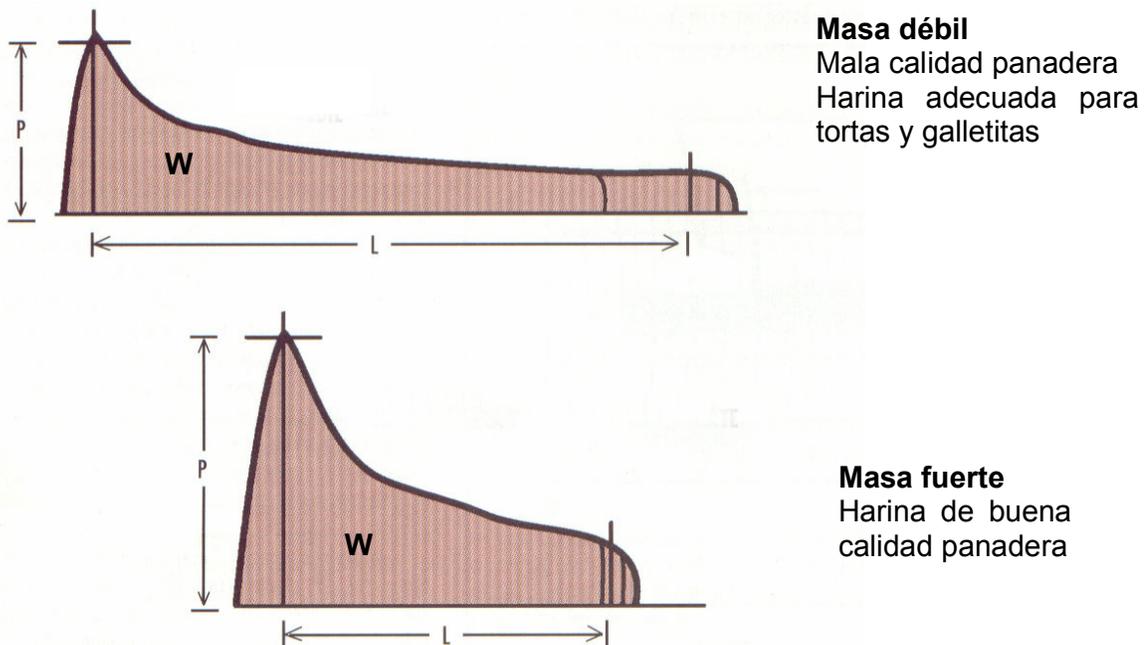
Se utiliza un aparato llamado Farinógrafo de Brabender. Permite probar dinámicamente las propiedades de amasado, con el fin de evaluar la calidad de la harina y las propiedades de procesamiento de la masa. Los parámetros registrados durante el análisis evidencian el comportamiento en el amasado, la capacidad de absorción de agua, el tiempo que tarda la masa en alcanzar la consistencia óptima y la estabilidad o tolerancia al amasado.

**Mixograma:**

Se utiliza un Mixógrafo Swanson (18 y 19). Determina el tiempo de mezcla o desarrollo (TD) y estabilidad, a través de una banda que va graficando el equipo en función de la resistencia que ofrece la masa. Bajo TD es índice de mala calidad panadera (ver figura 20). Los mixogramas se clasifican mediante una escala que va desde 1 (masas muy débiles) a 9 (muy fuertes) (20 y 21).

### Alveograma:

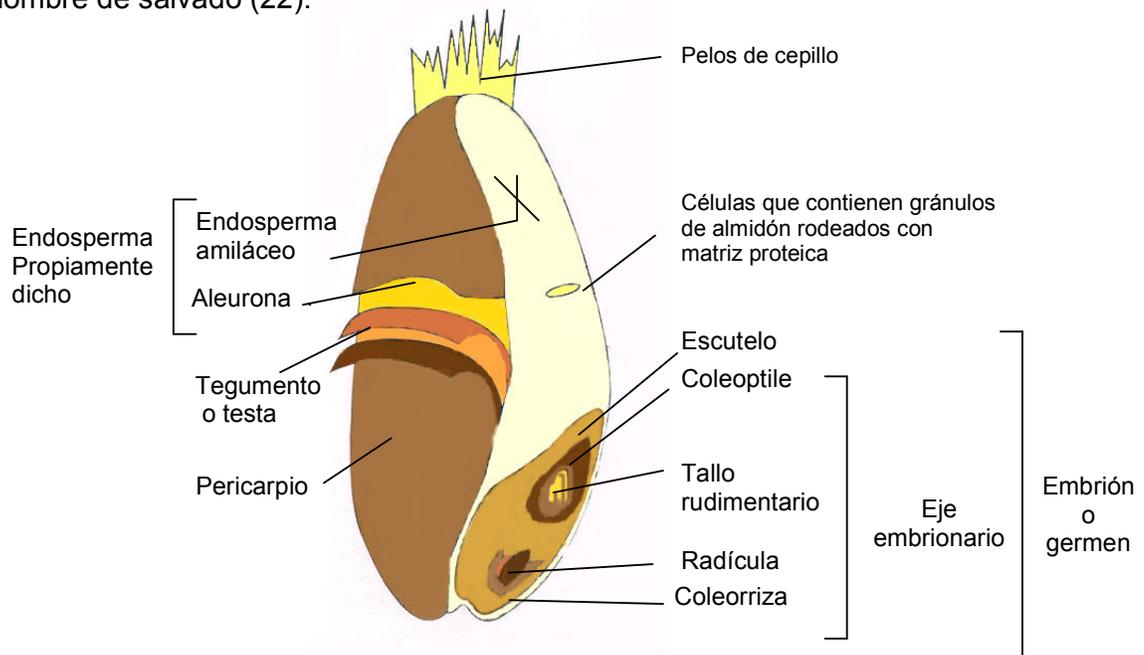
Se emplea un aparato llamado Alveógrafo de Chopin. El ensayo simula, gráficamente, el comportamiento de la masa en la fermentación, imitando, en gran escala, la formación de alvéolos originados por el CO<sub>2</sub> que producen las levaduras. Mide la resistencia a la deformación y extensibilidad insuflando aire sobre una lámina de masa que se hincha hasta su rotura, dando curvas llamadas alveogramas, donde la superficie bajo la misma indica la fuerza panadera (W), la altura mide la tenacidad (P) y el largo de la curva la extensibilidad (L) o índice de hinchamiento (G). La relación P/L o P/G expresa el equilibrio de la masa.



**Figura 5:** Alveogramas de harinas de buena y mala calidad panadera. P: tenacidad. L: extensibilidad. W (área bajo la curva): energía que se necesita para la ruptura de la masa = fuerza panadera.

### 4.3. COMPOSICIÓN DEL GRANO DE TRIGO

Al igual que todos los cereales, el trigo produce un fruto seco, indehisciente, constituido por una única semilla revestida por un fino pericarpio soldado a ella. Este tipo de fruto es una cariósipide pero es comúnmente llamado grano. Tiene un tamaño promedio de 8 mm y un peso de 35 mg. Está formado, desde afuera hacia adentro, por una cubierta frutal o pericarpio (que a su vez consta de varias capas: epidermis, hipodermis, células intermedias, células cruzadas y células tubulares); una cubierta seminal, llamada tegumento o testa, que puede o no contener pigmentos que colorean al grano (usualmente blanco o rojo, pero también se conocen púrpuras) y la aleurona, que consta de una única capa celular, que rodea completamente al endosperma amiláceo y al embrión (figura 6). Si bien la capa de aleurona es, desde el punto de vista botánico, parte del endosperma propiamente dicho, es removida durante la molienda, junto con la cubierta seminal y el pericarpio, formando con ellos lo que se conoce con el nombre de salvado (22).



**Figura 6:** Esquema de las partes que constituyen el grano de trigo.

El embrión o germen de trigo consiste, principalmente, de dos partes: el eje embrionario (raíz y tallo rudimentarios), y el escutelo que funciona como órgano de almacenamiento.

El endosperma amiláceo constituye el 85% del grano y contiene las reservas para el desarrollo del embrión. Es de gran importancia en la nutrición humana, ya que constituye la fracción del grano utilizada para la elaboración de harina. Está compuesto de tres tipos de células: periféricas, prismáticas y centrales, que varían en tamaño, forma y localización dentro del grano. Estas células están llenas de gránulos de almidón, embebidos en una matriz proteica, que consiste, principalmente, de gluten, la proteína de almacenamiento del grano de trigo (10). Existen diferencias en la textura (dureza) y apariencia del endosperma de los distintos cultivares de trigo. En general, una apariencia traslúcida o vítrea ha sido asociada con dureza y alto contenido de proteínas; mientras que opacidad se relaciona con trigos blandos y de bajo contenido de proteínas. La dureza se halla controlada genéticamente y es causada por la fuerza de unión entre las proteínas y el almidón del endosperma. Por otro lado, la apariencia o vitreosidad resulta de la carencia de espacios de aire en el grano. El mecanismo que lo controla no es claro pero parece estar relacionado con la cantidad de proteína (22).

### **Origen**

El grano de trigo se desarrolla a partir de un proceso de doble fertilización. El embrión es producto de la fertilización de la oófera con un núcleo reproductivo de polen; mientras que el endosperma deriva de la fusión de los dos núcleos polares con un núcleo reproductivo de polen. Tanto el pericarpio como la

cubierta seminal se originan exclusivamente de tejidos maternos. De esta forma, sólo el embrión y el endosperma contienen genes de ambos padres.

#### **4.4. PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO DEL GRANO**

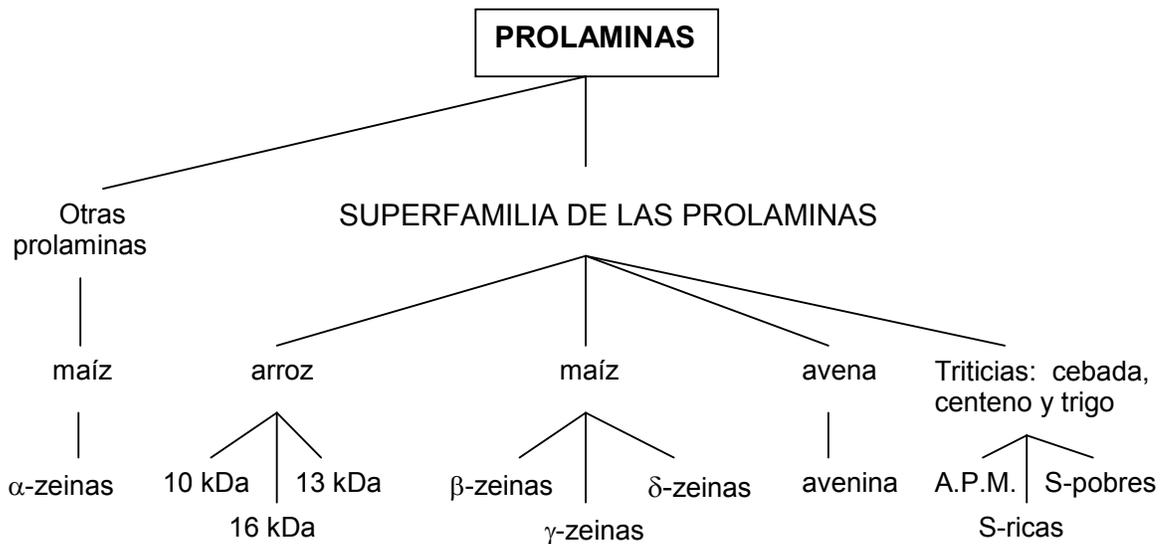
Entre un 10 a un 15%, del peso seco del grano de trigo, son proteínas que participan en el desarrollo de la semilla (funciones metabólicas, de defensa, estructurales, etc.) o constituyen depósitos de nitrógeno y energía durante la germinación. Estas últimas son las llamadas proteínas de almacenamiento y representan, aproximadamente, el 50% del contenido total de proteína del grano maduro (23). Se caracterizan porque son sintetizadas únicamente en las semillas, depositadas en cuerpos proteicos, y eficientemente degradadas y movilizadas al embrión durante la germinación, cumpliendo la función de depósitos de nitrógeno, carbono y azufre (24). También constituyen la fuente más importante de proteínas en la dieta humana y del ganado, además de determinar muchas de las propiedades de procesamiento de las semillas como, por ejemplo, la habilidad de elaborar pan a partir del endosperma del grano de trigo. Se las clasifica, tradicionalmente, en tres grupos, según sean solubles en agua (albúminas), en soluciones salinas diluidas (globulinas) o en soluciones alcohólicas diluidas (prolaminas) (25). Mientras que las proteínas de almacenamiento de legumbres y oleaginosas son, fundamentalmente, albúminas y globulinas; las de los principales cereales cultivados (excepto avena y arroz) son prolaminas que reciben diferentes nombres triviales basados en el nombre genérico del cereal en latín: hordeínas en cebada (*Hordeum vulgare*), secalinas en centeno (*Secale cereale*), zeínas en maíz (*Zea mays*) (26). Por el contrario, en trigo, la nomenclatura de las prolaminas no guarda relación con el nombre

genérico del cereal y se las clasifica en dos grupos: gliadinas y gluteninas, que juntas forman el gluten. Esta división se basa en sus diferentes habilidades para formar polímeros: mientras que las gliadinas son proteínas monoméricas sin puentes disulfuro o sólo puentes intracadenas, las subunidades de gluteninas se ensamblan en polímeros de alto peso molecular estabilizados por puentes disulfuro intercadenas (27).

#### **4.4.1. Clasificación de las prolaminas en las tritíceas**

Las prolaminas han sido descritas únicamente en semillas de cereales. Fueron tradicionalmente reconocidas como grupo, en base a su solubilidad en mezclas de alcohol y agua (60-70 % de etanol o 50% de isopropanol), y a sus altos niveles de glutamina y prolina. Sin embargo, la comparación de las secuencias de aminoácidos, ha demostrado que esta definición debe ser ampliada para incluir componentes que son insolubles en soluciones acuosas, en el estado nativo, debido a la presencia de puentes disulfuro ínter cadenas (pero se solubilizan en este medio si se las trata con un agente reductor). Además, es importante destacar, que todas las prolaminas de los distintos cereales se hallan relacionadas (excepto las  $\alpha$ -zeinas de maíz) y forman un solo grupo conocido como la superfamilia de las prolaminas (figura 7) (28). Dentro de ellas, existe un subgrupo de prolaminas muy relacionadas que es el de las tritíceas (cebada, trigo y centeno). Consisten en mezclas altamente polimórficas de componentes con pesos moleculares entre 30000 y 90000. Es posible clasificarlas en tres grupos, en función de su composición y secuencia de aminoácidos, llamados "S-ricos" (ricos en azufre), "S-pobres" (pobres en azufre) y prolaminas de A.P.M. (alto peso molecular) (figura 8). Las prolaminas pobres en

azufre representan entre un 10-20 % del total de proteínas, mientras que las de alto peso molecular y las ricas en azufre constituyen menos del 10% y 80%, respectivamente. Los tres grupos muestran un amplio rango de diversidad estructural, con distintas familias y subfamilias que se diferencian en sus secuencias de aminoácidos y capacidad de agregación (tabla 3) (26).

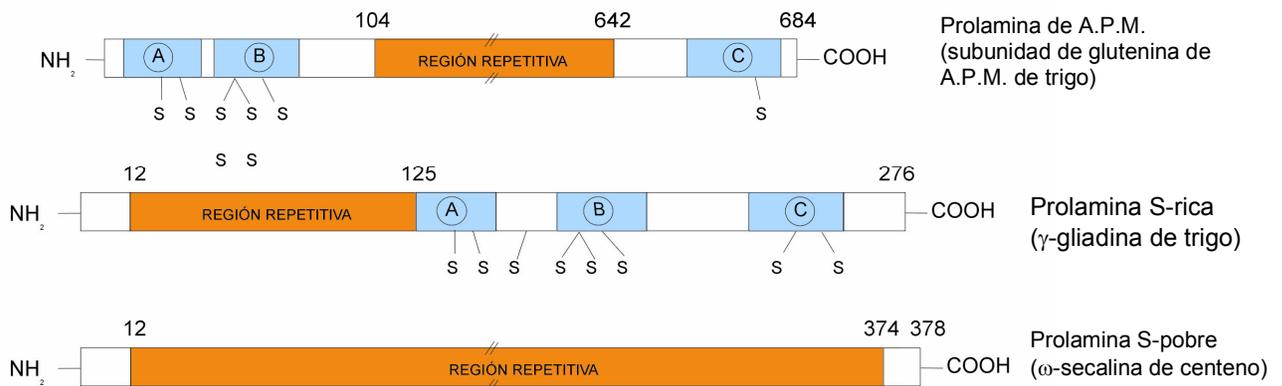


**Figura 7:** Clasificación y nomenclatura de los principales grupos de prolaminas en los distintos cereales (28).

A pesar de la existencia de una considerable diferencia en la secuencia y estructura dentro de los tres grupos de prolaminas de las tritíceas, tienen dos características en común. La primera es que sus secuencias pueden ser divididas en dos o más dominios, que difieren en composición de aminoácidos, conformación y, probablemente, orígenes evolutivos. La segunda es que, al menos uno de estos dominios, consiste en secuencias repetitivas basados en uno o más motivos peptídicos cortos. Estructuras esquemáticas de proteínas típicas, pertenecientes a cada uno de estos tres grupos, se muestran en la figura 8.

TIPO DE PROLAMINA	CEBADA	CENTENO	TRIGO
POLIMÉRICA DE ALTO PESO MOLECULAR (A.P.M.)	D hordeinas	Secalinas de A.P.M.	Subunidades de glutenina de A.P.M.
S-POBRES	C hordeinas	$\omega$ -secalinas	$\omega$ -gliadinas
S-RICAS			
• Monoméricas tipo $\gamma$	$\gamma$ -hordeinas	$\gamma$ -secalinas (40kDa)	$\gamma$ -gliadinas
• Polimérica tipo $\gamma$	—	$\gamma$ -secalinas (75kDa)	—
• Monoméricas tipo $\alpha$	—	—	$\alpha$ -gliadinas
• Polimérica tipo agregado	B hordeinas	—	Subunidades de gluteninas de B.P.M.

**Tabla 3:** Grupos de prolaminas presentes en las tritíceas (cebada, trigo y centeno). A.P.M.: alto peso molecular. B.P.M. : bajo peso molecular.



**Figura 8:** Estructuras esquemáticas de los tres tipos de prolaminas presentes en tritíceas: prolaminas de A.P.M., S- ricas y S-pobres. Las tres regiones conservadas en prolaminas S-ricas y de A.P.M. se indican en celeste con las letras A, B y C. NH<sub>2</sub>- y COOH- representan los extremos amino y carboxilo terminal de las proteínas, respectivamente.

Las **prolaminas pobres en azufre (S-pobres)** comprenden las C hordeínas de cebada, las  $\omega$ -gliadinas de trigo y las  $\omega$ -secalinas de centeno. Tienen una inusual composición de aminoácidos, con altos niveles de glutamina (40-50%), prolina (20-30 %) y fenilalanina (7-9 %), bajo contenido en residuos cargados y ausencia de residuos de cisteína. Sus pesos moleculares varían entre 44.000 y 73.000 daltons (30). Son proteínas monoméricas consistentes, casi completamente, de secuencias repetitivas (figura 8), basadas en un solo motivo octapeptídico (Pro.Gln.Gln.Pro.Phe.Pro.Gln.Gln). Presentan una inusual estructura secundaria consistente en una espiral ancha con giros  $\beta$  reversos y hélice II de poli-L-prolina (26).

Las **prolaminas ricas en azufre (S-ricas)** se subdividen en dos tipos, en cebada y centeno, y en tres tipos, en trigo (tabla 3). Pueden ser monoméricas (como las  $\alpha$  gliadinas) o poliméricas (B hordeínas,  $\gamma$  secalinas y subunidades de glutenina de bajo peso molecular). Consisten de dos dominios estructurales, con un dominio repetitivo próximo al extremo amino terminal y un dominio carboxilo terminal no repetitivo (figura 8). Además, una corta secuencia amino terminal única puede estar presente. La región repetitiva abarca de un tercio a la mitad de la proteína, que consiste de 250 a 300 residuos de aminoácidos. Se basan en repeticiones en tandem de uno o dos motivos, con pequeñas variaciones en las repeticiones. Uno de ellos consta del tetrapéptido Pro.Gln.Gln.Pro. que se halla relacionado con el motivo repetitivo octapeptídico presente en las prolaminas S-pobres (24). El dominio carboxilo terminal de las prolaminas ricas en azufre no contiene secuencias repetitivas pero existen cortos fragmentos, ricos en glutamina, que están presentes en las  $\alpha$ -gliadinas de trigo. Aparentemente, los dos dominios se pliegan en forma independiente y

asimétrica: mientras el dominio repetitivo forma una estructura extendida y más abierta, el dominio C-terminal se halla plegado mucho más compacto y estabilizado por puentes disulfuro intra cadena (26 y 31).

Las **prolaminas de alto peso molecular (A.P.M.)** consisten de una o dos subunidades individuales en cebada (D hordeínas) y centeno (secalinas de A.P.M.), y tres, cuatro o cinco subunidades de glutenina de A.P.M. en el trigo panadero hexaploide. Estas últimas constituyen importantes determinantes de la calidad panadera de los diferentes cultivares de trigo, de allí que hayan sido estudiadas en detalle a pesar de encontrarse en baja cantidad en el grano. Las proteínas consisten de 627- 827 residuos, con dominios repetitivos centrales (481-666 residuos), flanqueadas por cortos dominios no repetitivos en los extremos amino y carboxilo terminal. Los dominios repetitivos consisten de dos o tres motivos, ninguno de los cuales parece estar relacionado con los motivos repetitivos presentes en las prolaminas ricas y pobres en azufre. Los dominios amino y carboxilo terminal tienen una estructura en  $\alpha$ -hélice, mientras que la región repetitiva central adopta una espiral  $\beta$  constituida por repetitivos giros  $\beta$  reversos, apilados y estabilizados por puentes de hidrógeno (26).

#### **4.4.2. Relaciones estructurales y evolutivas de las prolaminas**

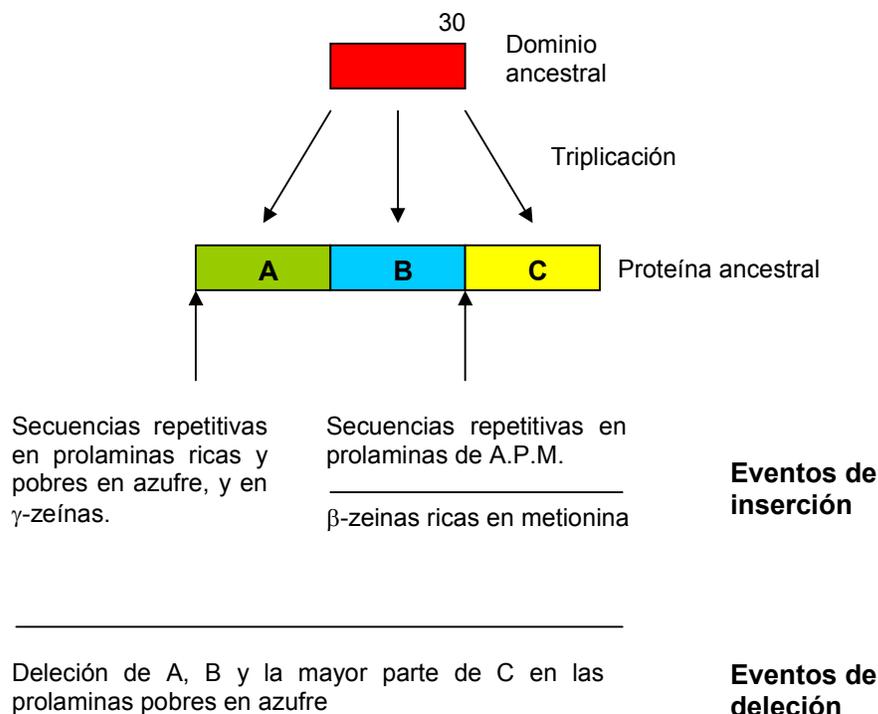
Al realizar comparaciones de las secuencias de aminoácidos de las prolaminas ricas en azufre de cebada, centeno y trigo se halló un alto grado de homología, particularmente en tres regiones conservadas de entre 20 y 30 residuos, llamadas A, B y C (figura 8). El número y espaciado de los residuos de cisteína, dentro de estas regiones, se hallan particularmente bien conservados. Esta similitud en secuencia no fue inesperada debido a la estrecha asociación

existente entre las tritíceas (trigo, cebada y centeno) (28). Sin embargo, hubo dos observaciones que resultaron sorprendentes. La primera fue que las regiones A, B y C tienen secuencias similares entre sí, indicando que pueden haberse originado por triplicación de una corta secuencia ancestral. La segunda es que regiones relacionadas con A, B y C o secuencias específicas conservadas dentro de estas regiones se hallan presentes en otras prolaminas y en otras proteínas de semillas (30).

Secuencias relacionadas a las regiones A, B y C, de las prolaminas ricas en azufre, se hallan presentes, también, en las prolaminas de alto peso molecular, con las regiones A y B en el dominio N-terminal, y la región C, en el dominio C-terminal. Por lo tanto, es probable, que las proteínas ricas en azufre y las prolaminas de A.P.M. , provengan de una única proteína ancestral consistente, esencialmente, sólo de regiones A, B y C. Los eventos evolutivos podrían haber incluido inserciones de bloques de secuencias repetitivas (en la región adyacente a A, en las prolaminas ricas en azufre, o entre las regiones B y C, en las prolaminas de A.P.M.). Las prolaminas pobres en azufre consisten, fundamentalmente, de regiones repetitivas y carecen de las regiones A, B y C. Sin embargo, los motivos repetitivos están claramente relacionados a los presentes en las prolaminas ricas en azufre, y las prolaminas pobres en azufre podrían haber evolucionado de las ricas en azufre, por amplificación de las repeticiones y delección del dominio C-terminal (26 y 30). Estos eventos se hallan resumidos en la figura 9.

Regiones correspondientes a A, B y C se hallan también presentes en las  $\beta$  y  $\gamma$  zeinas de maíz, las aveninas de avena y las prolaminas de 10 kd. de arroz (pobremente conservadas en este último caso). De esta forma, parecería

que todas las prolaminas (con excepción de las  $\alpha$ -zeínas podrían estar relacionadas, habiendo evolucionado a partir de una proteína ancestral común, por un rango de eventos que incluyen inserción y delección de secuencias, amplificación de repeticiones, y sustituciones de aminoácidos (figura 9) (26).



**Figura 9:** resumen de los eventos que pueden haber contribuido a la divergencia de los miembros de la familia de las prolaminas. Tomado de Shewry (1995) (26).

#### 4.4.3. Prolaminas de trigo: gliadinas y gluteninas

Las prolaminas del trigo, gliadinas y gluteninas, constituyen las principales proteínas del gluten y tienen características fisicoquímicas diferentes. Las **gliadinas** son cadenas polipeptídicas simples estabilizadas por puentes disulfuro intracadena. Es posible clasificarlas en gliadinas tipo  $\alpha$  (que comprende las  $\alpha$  y  $\beta$  gliadinas) ,  $\gamma$  y  $\omega$  gliadinas según sus diferentes movilidades en un gel

de electroforesis con buffer lactato de aluminio (pH = 3) (30 y 31). Tienen una particular composición de aminoácidos que consiste en grandes cantidades de glutamina (38-56 % del total de residuos de aminoácidos), prolina (15-30 %) y una muy baja cantidad de lisina. Mientras que las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  gliadinas tienen casi la misma composición de aminoácidos, pesos moleculares entre 30 y 45 kDa, y secuencias amino terminales semejantes; las  $\omega$  gliadinas tienen pesos moleculares entre 44 y 73 kDa y, en general, no contienen cisteína ni metionina (tabla 4). Combinando el análisis por isoelectroenfoque, en la primera dimensión, con electroforesis en geles de almidón a pH 3,2, en la segunda dimensión, ha sido posible obtener 46 componentes diferentes en una misma variedad, demostrando su alto grado de polimorfismo (10 y 32).

Las **gluteninas** constituyen enormes agregados de peso molecular variable, entre 100 y 10.000 kDa, que contienen dos tipos diferentes de subunidades unidas por puentes disulfuro: las subunidades de bajo peso molecular o SG-BPM de 35 a 51 kDa (33) y las de alto peso molecular o SG-APM de 67 a 88 kDa (34 y 35) (tabla 4). Estas proteínas gigantes son las más grandes que se conocen en la naturaleza (36).

Los dos tipos de prolaminas del trigo le imparten diferentes propiedades a la masa: las gliadinas son viscosas y le otorgan extensibilidad permitiendo que la masa aumente durante la fermentación, mientras que las gluteninas le confieren elasticidad, evitando que la masa se extienda demasiado y colapse, ya sea durante la fermentación como en la etapa de cocción (37). La elasticidad del gluten se conoce también como fuerza de la masa, y se ha demostrado que las llamadas “masas fuertes” son requeridas para la elaboración

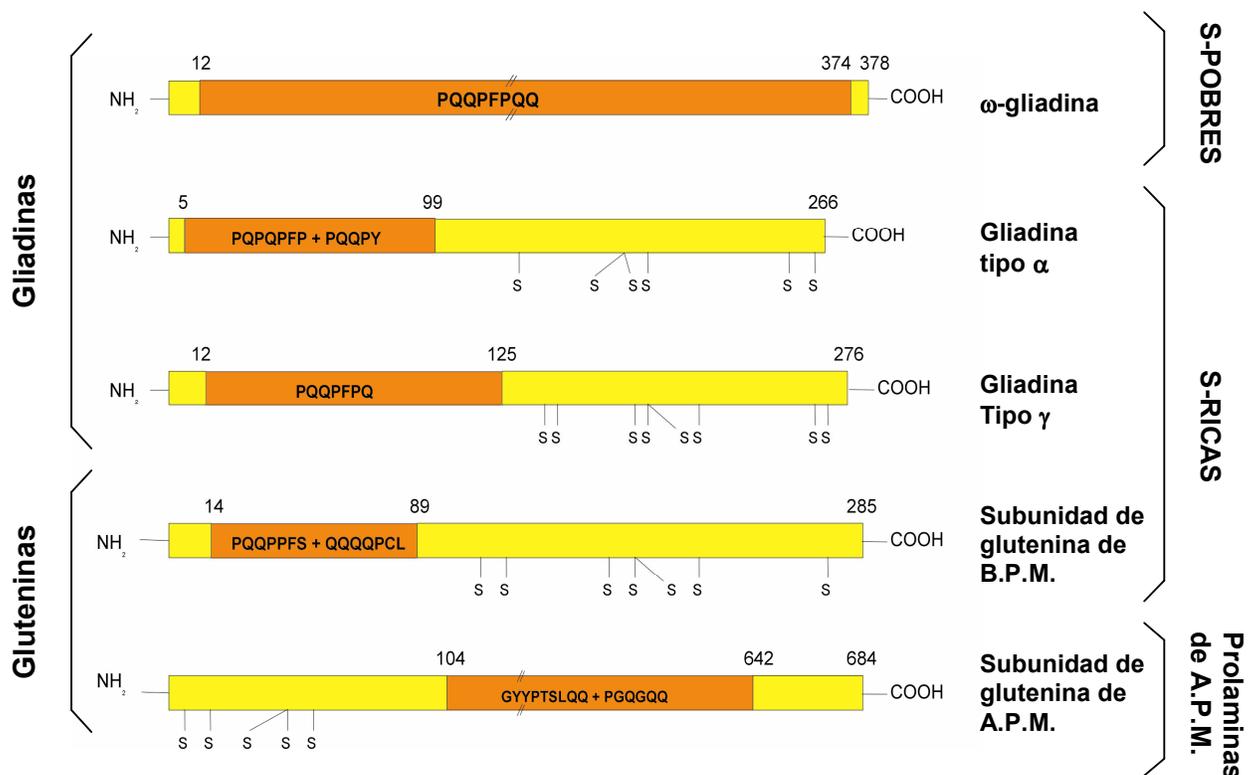
de pan y pastas (9). En contraste, glútenes menos elásticos o “débiles”, pero con buena extensibilidad, son preferidos para la fabricación de tortas y galletitas (38).

**Tabla 4:** CUADRO COMPARATIVO DE LAS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE GLIADINAS Y GLUTENINAS.

CARACTERÍSTICAS	GLIADINAS	GLUTENINAS
Se subdividen en:	$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ y $\omega$ gliadinas según la movilidad en un gel de electroforesis con buffer lactato de aluminio ( pH 3,1 - 3,3 ).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SG-APM o subunidades de alto peso molecular</li> <li>• SG-BPM o subunidades de bajo peso molecular</li> </ul>
Pesos moleculares	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\alpha</math>, <math>\beta</math> y <math>\gamma</math> gliadinas : 30 - 45 kDa</li> <li>• <math>\omega</math> gliadinas : 44 - 73 kDa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Subunidades de A.P.M. : Tipo x = 83 - 88 kDa. Tipo y = 67 - 74 kDa</li> <li>• Subunidades B.P.M. : 36 - 44 kDa</li> <li>• Gluteninas nativas : 100 - 10000 kDa</li> </ul>
Estructura	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monoméricas</li> <li>• Con puentes disulfuro intracadenas o ausentes.</li> <li>• Con interacciones puente de H<sub>2</sub> e hidrofóbicas entre los monómeros de gliadinas, y entre éstos y los polímeros de gluteninas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poliméricas</li> <li>• Las subunidades se unen entre sí por puentes disulfuro intercadenas.</li> <li>• Existen interacciones puente de H<sub>2</sub> e hidrofóbicas con los monómeros de gliadinas.</li> </ul>
Propiedades físicas que confieren a la masa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• viscosidad o cohesividad</li> <li>• extensibilidad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• elasticidad o fuerza de la masa (resistencia a la extensión).</li> </ul>
Cantidad relativa en la cariósida	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 30-40 % de las prolaminas</li> <li>• 15-20 % de las proteínas totales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 60-70 % de las prolaminas</li> <li>• Aprox. 35 % de las proteínas totales.</li> </ul>

Además de la clasificación de las prolaminas de trigo en gliadinas y gluteninas, basada en su habilidad para formar polímeros, también es posible

dividir las, según la clasificación de las prolaminas de las tritíceas (figura 8 y tabla 3). Esta última consiste en tres grupos: las **prolaminas de A.P.M.** y **prolaminas pobres en azufre (S-pobres)**, a las que pertenecen las subunidades de gluteninas de A.P.M. y las  $\omega$ -gliadinas, respectivamente; y las **prolaminas ricas en azufre (S-ricas)**, que comprenden las subunidades de gluteninas de B.P.M., las gliadinas tipo  $\alpha$  (que se subdividen en  $\alpha$  y  $\beta$  gliadinas) y las gliadinas tipo  $\gamma$  (figura 10) (27).



**Figura 10:** Estructura esquemática de los distintos tipos de prolaminas del trigo. Los rectángulos anaranjados indican regiones repetitivas de las secuencias consenso indicadas en cada caso. S: residuos de cisteína. A.P.M: alto peso molecular. B.P.M.: bajo peso molecular. S-ricas: prolaminas ricas en azufre. S-pobres: prolaminas pobres en azufre.

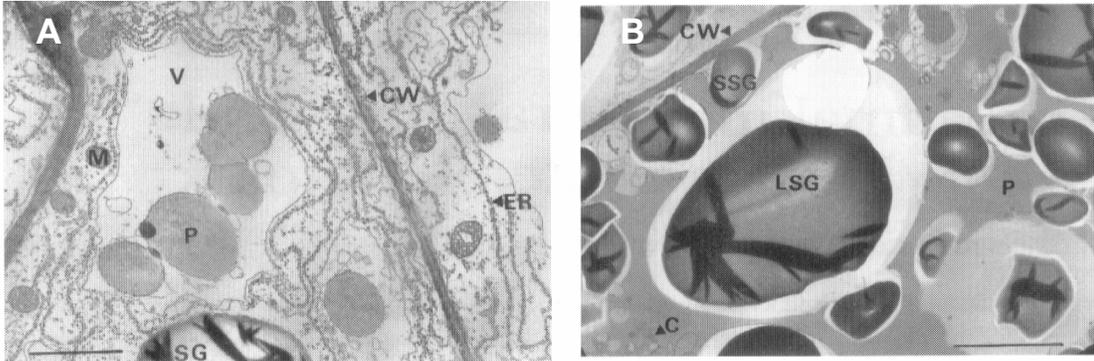
Todas las prolaminas de trigo contienen secuencias repetitivas que abarcan entre un 30% de la proteína entera, en las prolaminas ricas en azufre, hasta cerca del 95% en las prolaminas pobres en azufre (27). Además, las

secuencias repetitivas en ambos tipos de prolaminas se hallan claramente relacionadas, basándose en uno o dos motivos peptídicos cortos que son ricos en prolina y glutamina. Por el contrario, las repeticiones que presentan las prolaminas de A.P.M. (a las que pertenecen sólo las subunidades de gluteninas de A.P.M.), no están relacionadas con secuencias presentes en ninguno de los otros tipos de prolaminas (24) (figura 10). Se cree que estas repeticiones adoptan una configuración en giro  $\beta$ , mientras que las regiones no repetitivas, se disponen en  $\alpha$ -hélice o  $\beta$ -lámina plegada (27).

#### **4.4.4. Síntesis, ensamblaje y transporte de gliadinas y gluteninas**

Las prolaminas de trigo son sintetizadas en ribosomas unidos a membranas, y cotraduccionalmente secuestradas en el retículo endoplásmico de las células del endosperma en desarrollo. Todas estas proteínas presentan un péptido señal, que dirige la cadena polipeptídica dentro del lumen del retículo endoplásmico, y es clivada por una peptidasa, ya sea durante o inmediatamente después de la traslocación (28). El plegado de las proteínas y la formación de los puentes disulfuro probablemente ocurre también dentro del lumen, asistidos por proteínas luminales tales como chaperonas moleculares, de la familia de HSP70/BiP (proteína de shock térmico 70 / proteína de unión), y la disulfuro isomerasa (25). La mayoría de las proteínas de almacenamiento de trigo son depositadas en cuerpos proteicos dentro de vacuolas. Inicialmente, estos cuerpos proteicos (de unas 20  $\mu\text{m}$  de diámetro) son secuestrados dentro de pequeñas vacuolas, pero luego se fusionan unas con otras para dar una gran vacuola central, que ocupa la mayor parte del volumen de la célula (figura 11 A) (39 y 40). A medida que las células del endosperma se llenan de almidón, los cuerpos

proteicos coalescen para formar una matriz de proteínas de almacenamiento que rodea los gránulos de almidón en el tejido seco maduro (fig. 11 B) (9).

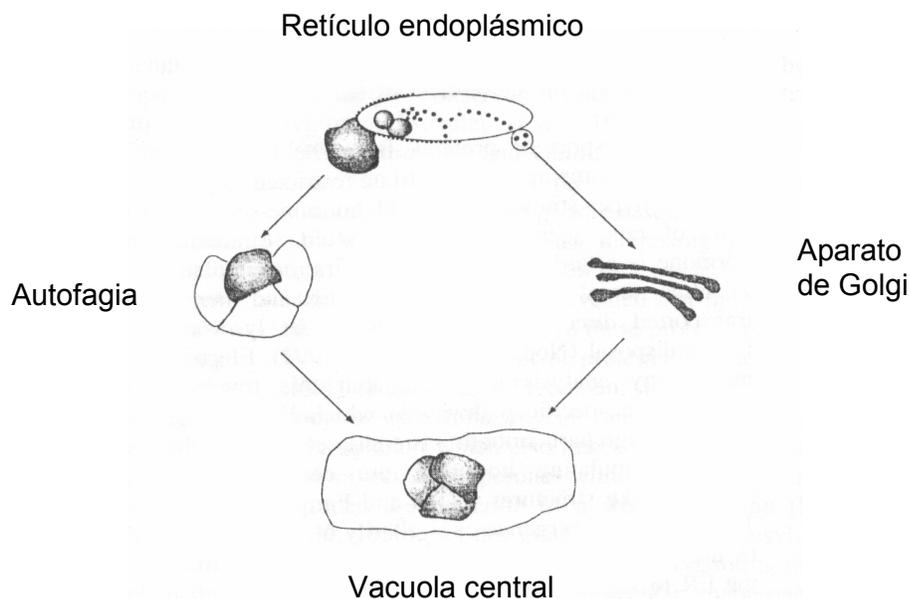


**Figura 11:** A) Microscopía electrónica de transmisión de una célula de endosperma de un cariósipide joven de trigo (13 días después de la antesis). P: cuerpos proteicos. V: vacuola central. SG: gránulo de almidón. CW: pared celular. ER: retículo endoplásmico rugoso. M: mitocondrias. La barra de escala (abajo a la izquierda) es de 2  $\mu$ m.

B) Microscopía electrónica de una célula en un estadio posterior del desarrollo (46 días después de la antesis) mostrando una matriz proteinásea (P). LSG: gránulos de almidón grandes. SSG: gránulos de almidón pequeños. CW: pared celular. C: citoplasma. La barra de escala (abajo a la derecha) es de 5  $\mu$ m. Tomado de referencia 9.

El transporte de las prolaminas de trigo a las vacuolas ha sido estudiado, extensivamente, usando análisis de inmunocitoquímica de secciones delgadas de granos de trigo en desarrollo. Estos estudios han identificado vesículas asociadas al Golgi conteniendo gliadinas (41), sugiriendo que está involucrado en el transporte de las gliadinas a las vacuolas (figura 12, ruta mostrada esquemáticamente a la derecha). Sin embargo, el complejo de Golgi no fue abundante en las micrografías electrónicas, sugiriendo que su función en el transporte de las proteínas de almacenamiento a las vacuolas estaría limitado, y que significativas cantidades de proteínas podrían ser transportadas por una ruta alternativa que no utilice el complejo de Golgi (figura 12, ruta mostrada esquemáticamente a la izquierda) (23). Estas se ensamblarían en cuerpos

proteicos dentro del retículo endoplásmico (42) y luego serían internalizadas en vacuolas, por un proceso específico análogo a la autofagia (41). Mientras que las gliadinas serían transportadas, principalmente, vía aparato de Golgi, las gluteninas se acumularían directamente en el lumen del retículo endoplásmico y usarían la vía alternativa para llegar a las vacuolas (27).



**Figura 12:** Representación esquemática de las dos diferentes rutas de transporte, de las prolaminas de trigo, desde el retículo endoplásmico a la vacuola. Tomado de referencia 23.

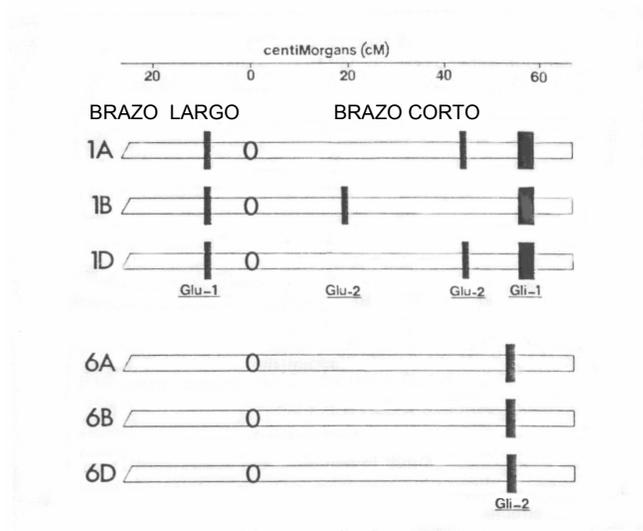
#### 4.5. SUBUNIDADES DE GLUTENINAS DE ALTO PESO MOLECULAR

Parece ser que todas las prolaminas del trigo contribuyen, en alguna forma, a las propiedades funcionales totales del gluten (9, 43 y 44). Sin embargo, las subunidades de glutenina de alto peso molecular (SG-APM), aunque cuantitativamente son componentes menores, son funcionalmente muy importantes, ya que constituyen las principales determinantes de la elasticidad del

gluten, propiedad que se correlaciona directamente con la calidad panadera de la harina (9). De allí que, desde 1980, se han llevado a cabo una serie de estudios detallados de estas proteínas, a nivel genético, molecular y bioquímico, en distintos laboratorios del mundo (35, 45, 46).

#### **4.5.1. Caracterización genética y estructural**

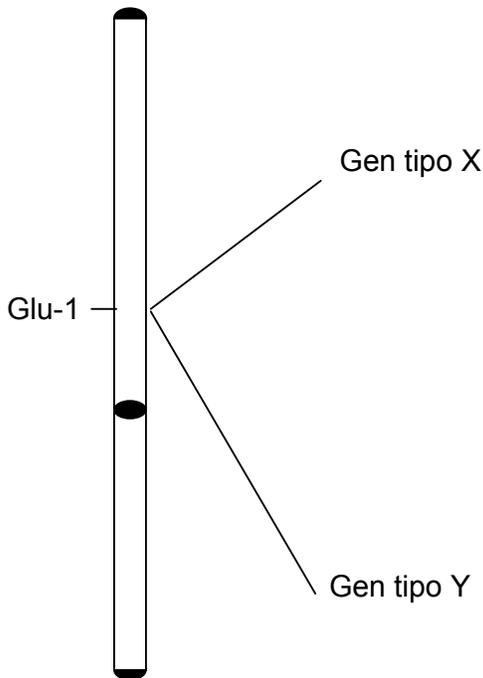
La especie de trigo usada en panificación (*Triticum aestivum*) es hexaploide y contiene tres genomas, diferentes pero relacionados, de 7 pares de cromosomas llamados arbitrariamente A, B y D ( $2n = 6x = 42$  cromosomas). Deleciones cromosómicas espontáneas, parciales o totales, son comunes en trigo, pero gracias a que la información genética se halla efectivamente triplicada, generalmente no son letales (45). Las  $\alpha$  y  $\beta$ -gliadinas se hallan codificadas por genes en los brazos cortos del grupo 6 de cromosomas (es decir, 6 A, 6 B y 6 D) en el loci Gli-2. Los genes que codifican las SG-BPM están en el loci Glu-3, en el brazo corto del grupo 1 de cromosomas (es decir, en los cromosomas 1A, 1B y 1D), donde también se encuentra el loci Gli-1 con los genes que codifican para las  $\omega$  y  $\gamma$ -gliadinas. Las SG-APM están codificadas por el loci Glu-1, en los brazos largos del mismo grupo de cromosomas (figura 13). Cada locus consiste de dos genes, codificando una subunidad de peso molecular más alto tipo "x" y otra subunidad de peso molecular más bajo tipo "y" (figura 14). Por lo tanto, los trigos hexaploides podrían, en teoría, contener seis subunidades diferentes. Pero, en realidad, sólo tres, cuatro o cinco subunidades están presentes en cultivares de trigos panaderos, como consecuencia de un silenciamiento de algunos genes (12). Todos los cultivares contienen subunidades 1Bx, 1Dx y 1Dy, mientras que sólo algunos presentan también 1By y/o 1Ax, pero nunca expresan 1Ay (39 y 45).



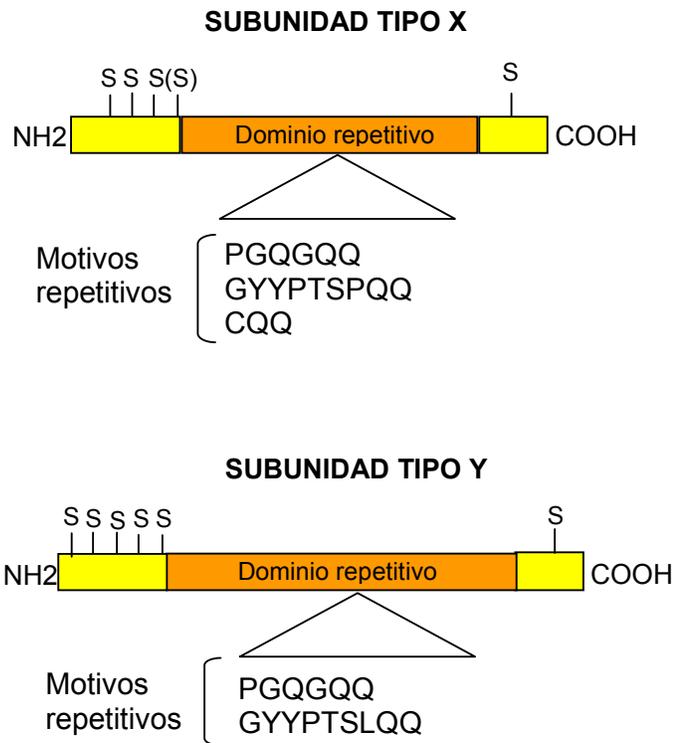
**Figura 13:** Posición cromosómica de los genes que codifican para las prolaminas de trigo.

En el loci Glu-1 están los genes que codifican para SG-APM ; en el loci Glu-3 los de las SG-BPM, y en los loci Gli-1 y Gli-2, las  $\gamma$  y  $\omega$ -gliadinas; y las  $\alpha$  y  $\beta$ -gliadinas, respectivamente. El grosor relativo de las barras verticales refleja el número de genes en cada locus.

**GRUPO 1 DE CROMOSOMAS**



**SUBUNIDADES DE GLUTENINA DE A.P.M.**



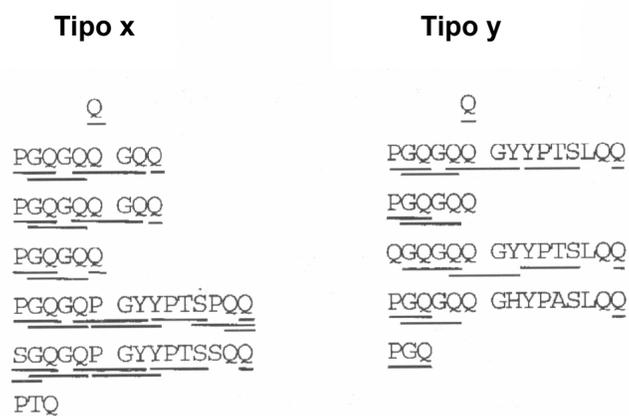
**Figura 14:** Localización cromosómica de los genes que codifican para las subunidades de glutenina de alto peso molecular (SG-APM) y la estructura de los polipéptidos codificados. S: puentes disulfuro. La subunidad tipo X, 1Dx5 (asociado con buena calidad panadera), es diferente de su alelo 1Dx2 (asociado con mala calidad panadera), en la presencia de un residuo de cisteína adicional ("S" de puente disulfuro, entre paréntesis).

Debido a que las subunidades de glutenina de alto peso molecular (SG-APM) se hallan codificadas por una pequeña familia multigénica, ha sido

posible purificar y caracterizar muchas de las subunidades que se presentan más comúnmente en el trigo pan (1Ax1, 1Ax2\*, 1Dx5, 1Dy10, 1Dx2, 1Dy12, 1Bx7, 1By9 y 1Ay), e identificar y clonar los genes que las codifican (30). Nueve subunidades de gluteninas de APM fueron inicialmente purificadas y sus composición de aminoácidos, secuencias amino-terminal y mapas de péptidos, comparados (47). Posteriormente, se aislaron y caracterizaron los nueve genes que codifican para estas SG-APM (38, 48, 49, 50, 51), todos con un alto grado de homología entre si, debido a que han evolucionado a partir de un único gen ancestral común (47). Las proteínas maduras por ellos codificadas tienen pesos moleculares entre 67500 y 88000 daltons. Todas son ricas en glutamina (35%), glicina (20%) y prolina (10%), y consisten de tres dominios: uno repetitivo central, flanqueado por un dominios amino y otro carboxilo terminal, no repetitivos. El dominio central varía, considerablemente, en longitud (entre 440 y 680 residuos de aminoácidos), y es responsable de las diferencias en pesos moleculares entre las proteínas enteras. Los dominios amino y carboxilo terminal consisten de 81-104 residuos y 42 residuos, respectivamente. Estos contienen la mayoría de los residuos de cisteína: tres ( en subunidades tipo X) o cinco (en subunidades tipo Y), en el dominio terminal; y uno (en todas las subunidades), en el dominio carboxilo terminal (30). Además, pueden hallarse residuos de cisteínas extras en el dominio repetitivo (próximo al extremo carboxilo terminal) de algunas subunidades como 1By9, 1Dy10 y 1Dy12 ; o próximo al extremo amino terminal en 1Dx5 (35) (figura 14). Las subunidades de glutenina de A.P.M. tipo X e Y difieren, también, en sus motivos repetitivos. Ambas contienen hexapéptidos (consenso Pro.Gly.Gln.Gly.Gln.Gln) y nonapéptidos (consenso tipo X: Gly.Tyr.Tyr.Pro.Thr.Ser.Pro.Gln.Gln y un consenso tipo Y muy similar:

Gly.Tyr.Tyr.Pro.Thr.Ser.**Leu**.Gln.Gln). Además, las subunidades tipo X contienen tripéptidos (consenso Gly.Gln.Gln), que siempre sigue a los motivos hexapeptídicos (figura 14) (26 y 30).

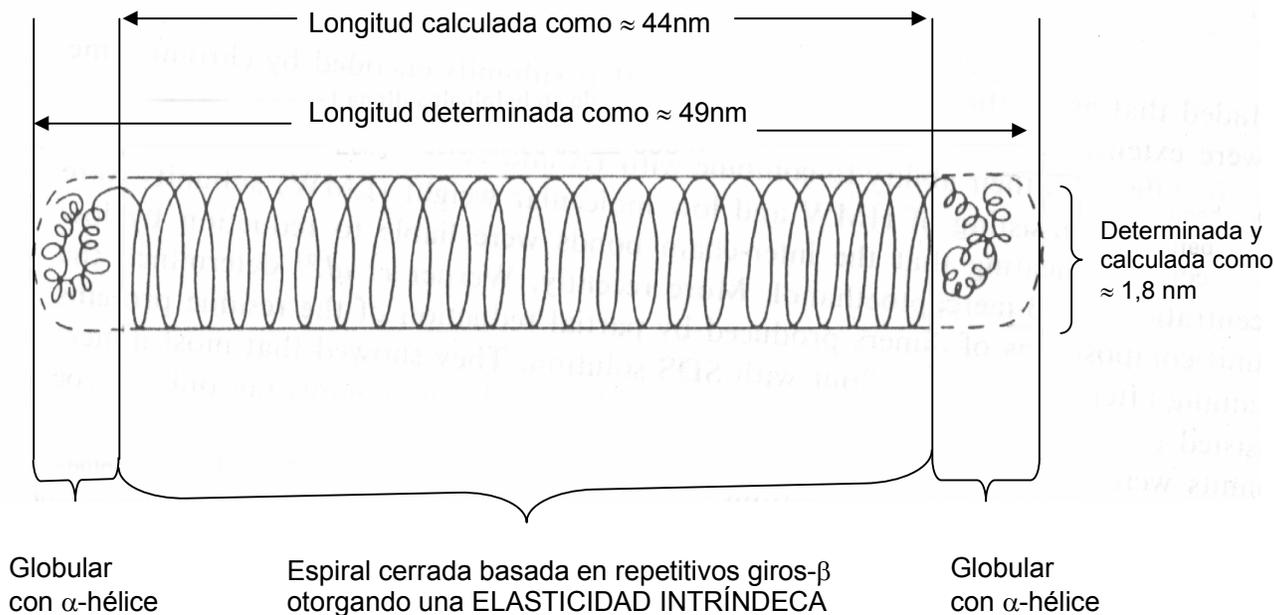
Las estructuras secundarias de las subunidades de glutenina de APM han sido estudiadas utilizando métodos predictivos (52), y por análisis espectroscópicos (dicroísmo circular) de una subunidad purificada (subunidad 1Bx20) (53) y de péptidos sintéticos correspondientes a los motivos repetitivos (54). Utilizando el método de Chou y Fasman (55), se predijo una estructura secundaria en la que los dominios repetitivos adoptan un giro- $\beta$  reverso, que ocurriría dentro de los motivos individuales, o como puente entre los motivos adyacentes (figura 15). En contraste, se predijo que los dominios amino y carboxilo terminal (no repetitivos) consisten, predominantemente, de estructura en  $\alpha$ -hélice (9 y 30).



**Figura 15:** Predicción de la estructura secundaria de los dominios repetitivos, de las subunidades de glutenina de APM tipo “x” e “y”. Las secuencias, derivadas de los dominios repetitivos, se hallan alineadas para demostrar la estructura repetitiva. Los giros- $\beta$  reversos predichos, involucrando cuatro residuos de aminoácidos, se hallan subrayados. Se utiliza el código estándar de una letra para residuos de aminoácidos. Tomado de referencia 9.

El estudio por dicroísmo circular y del espectro infrarrojo de péptidos sintéticos, correspondientes a los motivos repetitivos, también indican la presencia de giros- $\beta$  en reversa (30 y 54).

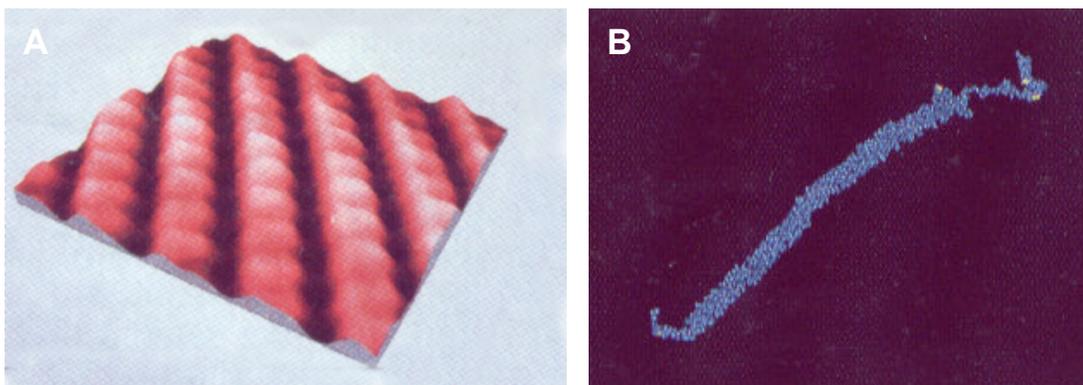
Las dimensiones y la forma en solución de una subunidad de glutenina de APM, purificada de trigo pasta (llamada 1Bx20), fueron determinadas, inicialmente, por medidas de viscosidad intrínseca. Los datos indican una estructura tipo barra, con dimensiones, variando según el solvente y la temperatura, de 49 X 1.8 nm (en una solución al 50% v/v de isopropanol) (30). En base a todos estos resultados, se propuso un modelo estructural para una subunidad de glutenina de APM típica que se resume en la figura 16 (9).



**Figura 16:** Modelo estructural para una subunidad de glutenina de APM típica. Tomado de referencia 9.

Mediante el análisis de la subunidad 1Bx20, depositada sobre grafito, utilizando microscopia electrónica de barrido, ha sido posible observar un

arreglo de moléculas alineadas en dos dimensiones, mostrando una espiral de 1.8 nm de diámetro, con estriaciones diagonales separadas 1.5 nm, consistente con la existencia de secuencias repetitivas formando giros- $\beta$  reversos. Sin embargo, los dominios amino y carboxilo terminal no son resueltos por esta técnica (figura 17 A) (30). Utilizando software de simulaciones moleculares, también ha sido posible observar conformaciones similares, con las secuencias repetitivas formando una estructura en espiral ancha, mientras que los dominios amino y carboxilo terminal son ricos en  $\alpha$ -hélice (figura 17 B) (9).



**Figura 17:** A) Microscopía electrónica de barrido de una subunidad de glutenina de APM purificada, depositada sobre un sustrato de grafito, en estado sólido hidratado. B) Análisis de la subunidad 1Dx5 con software de simulaciones moleculares. Se distingue claramente un dominio central formando una estructura en espiral ancha, mientras que los dominios amino y carboxilo terminal son ricos en  $\alpha$ -hélice. Los residuos de cisteína se muestran en amarillo. Tomado de referencia 9.

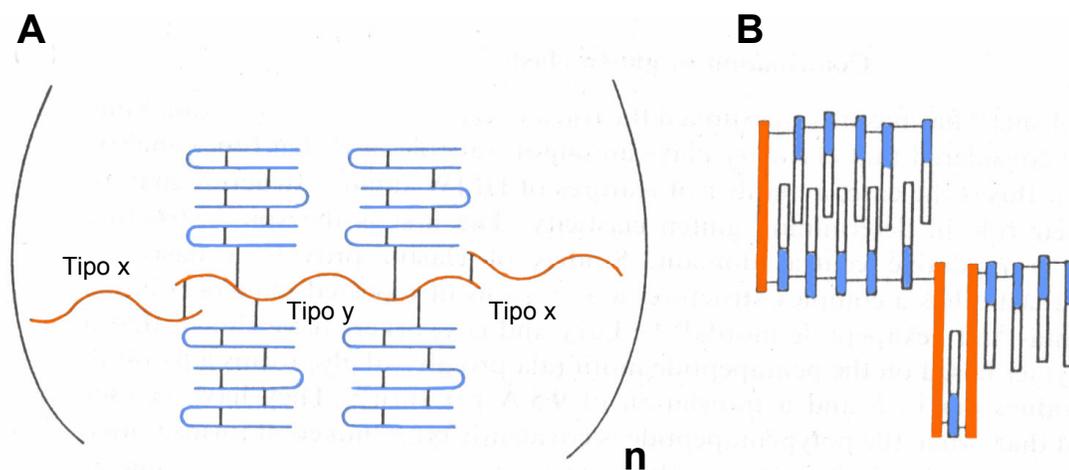
#### 4.5.2. Relación entre estructura y propiedades elásticas

La elasticidad de la masa de la harina de trigo depende, principalmente, del contenido, composición en subunidades y masa molecular de las subunidades de glutenina de APM., estando estrechamente relacionada a la calidad panadera de los distintos cultivares de trigo. Masas con alta elasticidad y razonable extensibilidad son ideales para la elaboración del pan (56).

La relación entre la estructura de las subunidades de glutenina de APM y la elasticidad del gluten es aún incierta, pero existen dos características fundamentales. La primera es la conformación en espiral adoptada por los dominios repetitivos (12). Esta estructura secundaria sería común en proteínas elásticas de diverso origen y le conferiría una elasticidad intrínseca a estas proteínas (52). Esta es una propiedad inusual, y no se conocen otros ejemplos de proteínas elásticas en plantas. En el reino animal, por el contrario, existen varios casos, de los cuales el mejor documentado es el de la elastina del tejido conectivo. Esta proteína se encuentra en vertebrados, y se halla ampliamente distribuida como componente de piel, arterias, venas y cartílagos. Se han encontrado repeticiones tetra, penta y hexapeptídicas en su secuencia de aminoácidos. Las repeticiones pentapeptídicas forman estructuras elásticas, tipo espiral- $\beta$ , basadas en repetitivos giros- $\beta$  reversos (9). Se ha demostrado que las repeticiones de polipentapéptidos sintéticos son sumamente elásticas, y se ha propuesto que estas estructuras contribuyen a la elasticidad de la elastina a través de mecanismos entrópicos (57).

La segunda característica que permite correlacionar la estructura de las subunidades de glutenina de alto peso molecular con la elasticidad que aportan al gluten, es el número y distribución de los puentes disulfuro disponibles para formar uniones intermoleculares (12). Esto se debe a que el grado de unión determinará, en parte, las propiedades elásticas del polímero de gluteninas. Con un bajo número de puentes disulfuro intermoleculares, la extensibilidad será alta, pero a medida que éstas se incrementan, el polímero se vuelve más elástico, tipo goma. Las subunidades de APM tienen residuos de cisteína, predominantemente, a cada extremo de la molécula, permitiendo que ocurra la deformación/

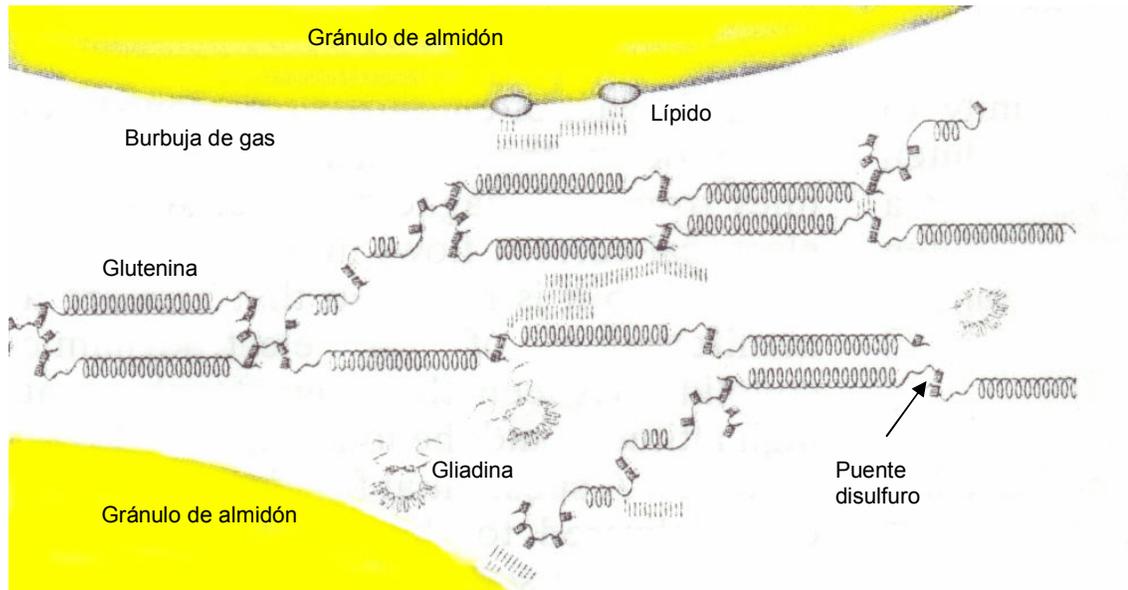
reformación en el dominio central. Se esperaría que cambios en el número de puentes disulfuro tendrían importantes efectos en las propiedades físicas de los polímeros de glutenina. Se han propuesto distintos modelos tendientes a explicar la forma en que las subunidades de glutenina de alto y bajo peso molecular, se unen por puentes disulfuro para formar el polímero de glutenina, de los cuales, los dos más aceptados se muestran en la figura 18 (35).



**Figura 18:** Modelos de polímeros de glutenina propuestos. A) Modelo de Graveland. Líneas anaranjadas: subunidades de gluteninas de APM; líneas celestes: subunidades de gluteninas de BPM; líneas negras: puentes disulfuro intra e intercadenas. B) Modelo de Kasarda. Barras anaranjadas: subunidades de glutenina de APM. Barras celestes y blancas: subunidades de glutenina de BPM (parte celeste: región repetitiva). Líneas negras: puentes disulfuro intercadenas. Tomado de referencia 35.

El tipo de puente cruzado es diferente en distintos tipos de proteínas con propiedades semejantes. Mientras que en las moléculas de gluteninas se forman puentes disulfuro entre residuos de cisteína, en otras proteínas elásticas (elastina, resilina y abductina, del tejido conectivo de vertebrados, pulgas y moluscos bivalvos, respectivamente) las uniones covalentes se establecen por condensación de residuos de lisina o tirosina. Mientras que estos últimos no son afectados por la adición de agentes reductores, los puentes disulfuro sí, ya que

manifiestan la habilidad para intercambiarse o, aún, romperse bajo condiciones de estrés, resultando en cambios en la elasticidad y la viscosidad del gluten (figura 19) (35).



**Figura 19:** Estructura polimérica de la glutenina de trigo, ensamblada por puentes disulfuro, formando una matriz proteica entre los gránulos de almidón y las burbujas de gas en la masa. Gliadinas y gluteninas interaccionan entre si confiriéndole las propiedades viscoelásticas características del gluten. Tomado de referencia 36.

Recientemente, la aplicación de técnicas moleculares y bioquímicas ha comenzado a aportar una importante información sobre la función de las subunidades de glutenina de APM., con un cuidadoso análisis de los patrones de puentes disulfuro, y los estudios de resonancia magnética nuclear de sus estructuras físicas, y de la formación de la red polimérica de gluten (58). Los sistemas de expresión heterólogos han hecho importantes contribuciones en la determinación del rol de las subunidades de gluteninas de APM en la funcionalidad de la masa. Un sistema bacteriano ha sido usado para expresar una

única subunidad de glutenina de APM en grandes cantidades, aportando nueva información sobre la relación entre la estructura y la función de las subunidades de glutenina de APM (59 y 60). Este sistema es también la base para la construcción y expresión de un gen análogo al de las subunidades de glutenina de APM, completamente sintético, diseñado para una disección molecular de la función de las gluteninas (56 , 61 y 62).

#### **4.5.3. Efecto cuali y cuantitativo en la calidad panadera**

Existe un alto grado de polimorfismo en las subunidades de glutenina de alto peso molecular, debido a la mutación del loci Glu-1 en muchas formas alélicas, conociéndose tres para el locus Glu-A1, catorce para el Glu-B1 y seis para el Glu-D1 (35, 63). Las subunidades individuales son numeradas, en orden de movilidad creciente, en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Este polimorfismo provee las bases para correlacionar la presencia de alelos específicos, con diferencias en la calidad panadera de los distintos cultivares. Los trabajos de Payne y colaboradores (37, 63) han demostrado claramente que dichas diferencias se correlacionan con variaciones alélicas, en el número (tres, cuatro o cinco) y movilidad en electroforesis en geles de poliacrilamida, de las subunidades de glutenina de alto peso molecular. En base a ello, ha sido posible asignar un puntaje de calidad a las subunidades que se presentan más comúnmente, y predecir la calidad panadera de cada cultivar con sólo conocer su composición en subunidades de gluteninas de alto peso molecular (9). Hasta un 69 % de la variación de calidad panadera observada entre harinas procedentes de diferentes variedades de trigo, pueden ser atribuidas a la variación alélica en el número y/o estructura y propiedades de las subunidades de glutenina de APM

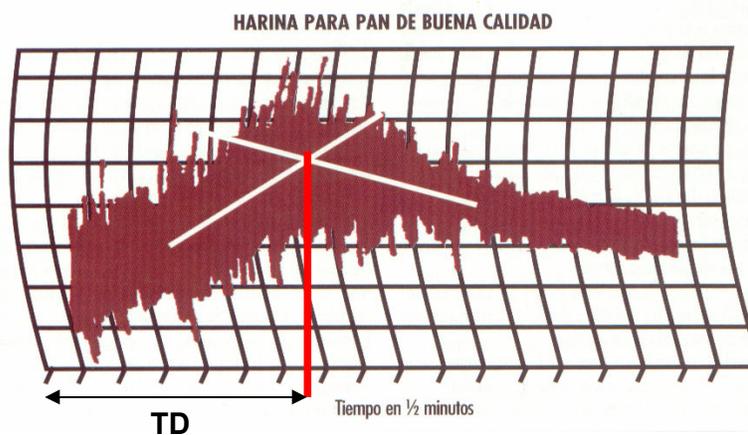
(45). Las subunidades que se han correlacionado con buena calidad son el par 1Dx5 + 1Dy10 (cuando se lo compara con 1Dx2/3/4 + 1Dy12) (64, 65), y las dos formas alélicas de la subunidad 1Ax, llamadas 1Ax2\* y 1Ax1, con respecto a su alelo nulo (50). Sin embargo, es difícil asignarle un puntaje de calidad, en forma individual, a todas las subunidades tipo “x” e “y” codificadas por los cromosomas 1B y 1D, debido a que son heredados como pares fuertemente ligados.

Los efectos cualitativos de las distintas subunidades en la calidad panadera pueden resultar de diferencias entre subunidades alélicas, ya sea en sus estructuras y/o en sus habilidades para formar polímeros con otras subunidades de gluteninas de APM y de BPM. (35). La comparación de la secuencia de aminoácidos de la subunidad 1Dy10 (asociada con buena calidad panadera), con la subunidad 1Dy12 (relacionada con mala calidad) mostró una serie de diferencias interesantes. Si bien los dominios amino y carboxilo terminal de ambas subunidades son idénticos, los dominios repetitivos difieren en la sustitución de 12 aminoácidos, la delección de dos hexámeros y dos residuos adyacentes en la subunidad 1Dy10, y la delección de dos residuos adyacentes en la subunidad 1Dy12. Estas diferencias resultan en una mayor proporción de unidades de repetición consenso en la subunidad 1Dy10, lo que se traduciría en un patrón más regular de giros- $\beta$ , una mayor elasticidad intrínseca de la proteína y, por ende, una mejor elasticidad de la masa (46). Curiosamente, este hecho sería también responsable de la anormalmente lenta movilidad de la subunidad 1Dy10 comparado con la 1Dy12, en las electroforesis de geles de poli(acrilamida) con SDS. A pesar de que el peso molecular de la subunidad 10 es menor que el de la 12, la primera adopta una estructura secundaria ligeramente diferente, con una conformación en espiral  $\beta$  más continua, responsable de su menor movilidad

en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (64). Por otro lado, cuando se compara la subunidad 1Dx5 (asociada con buena calidad panadera), con la subunidad 1Dx2 (relacionada con mala calidad), la característica distintiva más interesante es que la primera posee un residuo de cisteína adicional en el dominio amino terminal, cerca del límite con el dominio repetitivo (figura 14). Esto le confiere una mayor habilidad para formar polímeros con otras subunidades de glutenina de APM y BPM, otorgándole a la masa una mayor fuerza y superior calidad, al aumentar la proporción de polímero elástico (65).

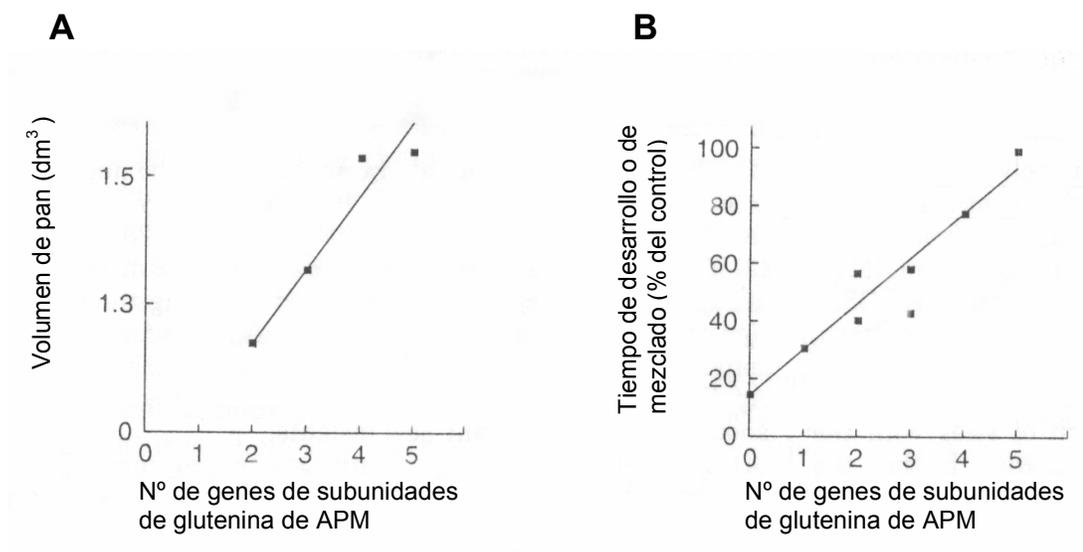
Existen también efectos cuantitativos, de las subunidades de glutenina de APM, en la calidad panadera. Los diferentes cultivares de trigo pan pueden presentar tres, cuatro o cinco subunidades de APM, aunque todos ellos tienen seis genes de subunidades de APM (dos genes -uno tipo "x" y otro tipo "y" - en el cromosoma 1 A, dos en el 1B y dos en el 1D). La variación en el número de SG-APM es el resultado de un específico silenciamiento génico mediante el cual, el gen 1Ay es silente en todos los cultivares de trigo pan, y los genes 1By y/o 1Ax se expresan sólo en algunos cultivares (45). Esta variación en la expresión génica tiene un gran impacto en la cantidad proteica total de las SG-APM. Por ejemplo, la presencia de la subunidad 1Ax se asocia con mayor calidad cuando se compara con líneas en las cuales este gen no se expresa (9). Este hecho se correlaciona con un incremento en la cantidad de subunidades de glutenina de APM desde, aproximadamente, un 8% del total de proteínas extraíbles, en líneas en las que se expresan sólo cuatro subunidades, hasta, aproximadamente, un 10%, en líneas conteniendo cinco subunidades (50 y 66). Esto implica que la asociación de la subunidad 1Ax con calidad es, principalmente, cuantitativa, con mas cantidad de proteína resultando en una mayor cantidad de polímero elástico y, por ende, una

mejor calidad de la masa (9). El efecto cuantitativo de las subunidades de glutenina de APM, en la calidad de la masa, pudo también comprobarse, mediante la producción de líneas casi-isogénicas que variaban sólo en el número de genes de las SG-APM activos. Con estas líneas pudo demostrarse que, a medida que el número de genes activos se reduce, importantes características de la masa son negativamente afectadas (56). Por ejemplo, el volumen de pan, una medida de la habilidad de la masa para retener burbujas de gas durante el levantamiento y la cocción, disminuye notablemente cuando se reduce el número de subunidades de glutenina de APM (figura 21 A). Resultados equivalentes se obtuvieron al determinar el tiempo de desarrollo o de mezclado, de las distintas líneas, utilizando un mixógrafo. Este aparato emula la acción de las mezcladoras comerciales de alta velocidad, desarrollando la masa rápidamente y registrando la resistencia de la masa al mezclado, que tiende a aumentar hasta alcanzar un máximo. El tiempo de mezclado corresponde al tiempo necesario para alcanzar dicho valor máximo en la curva desarrollada por el aparato (figura 20).



**Figura 20:** Mixograma. TD: tiempo de desarrollo o de mezclado. Las líneas en la gráfica representan incrementos de medio minuto. Una harina de calidad para pan requiere, al menos, 3 minutos de TD, y una harina débil tiene un tiempo más corto. Un ángulo ancho entre las líneas trazadas indica buena tolerancia en el mezclado, mientras que un ángulo agudo es el resultado de una descomposición de la masa más rápida.

A medida que disminuye el número de subunidades de glutenina de APM sintetizadas, el TD (tiempo de desarrollo) se acorta con la consiguiente disminución de la calidad de la masa (figura 21 B).



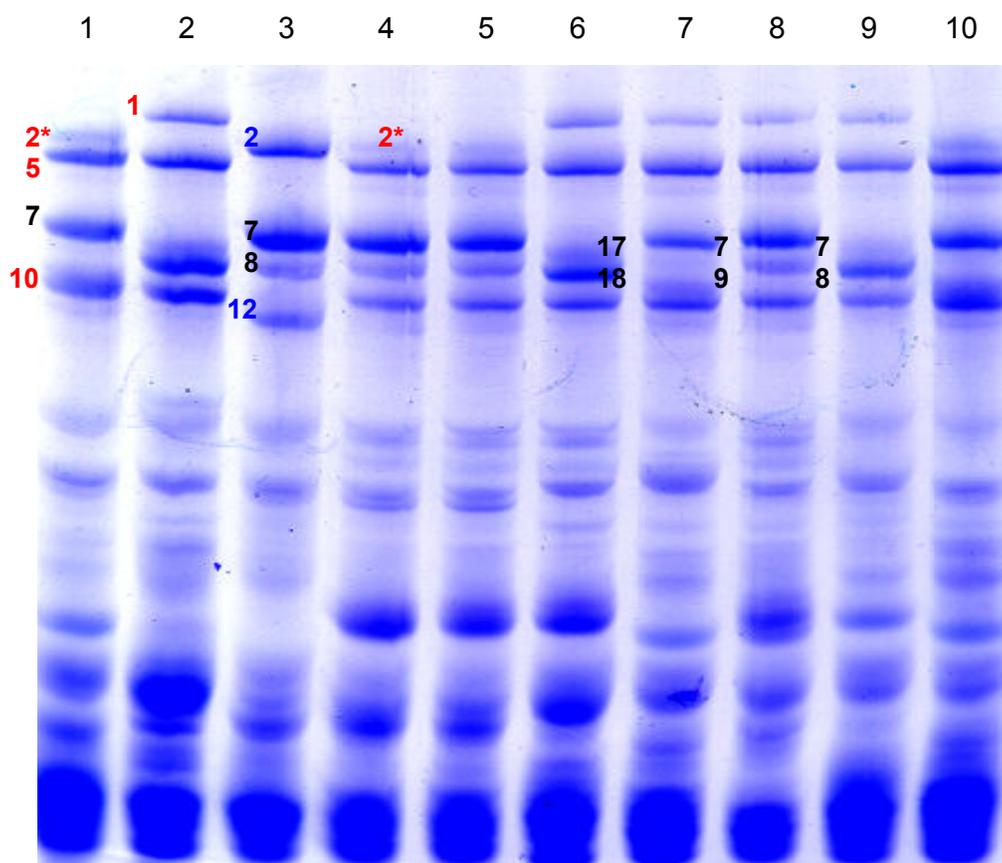
**Figura 21:** Efecto cuantitativo de las subunidades de glutenina de APM sobre las características de procesamiento de la masa. A) A medida que se reduce el número de subunidades de glutenina de APM, disminuye el volumen de pan. B) A medida que disminuye el número de subunidades de glutenina de APM, el tiempo de desarrollo o de mezclado se acorta, empeorando la calidad de la masa. Tomado, en parte, de referencia 56.

El hecho de que la calidad panadera, de los distintos cultivares de trigo, está determinada por la dosis génica y la presencia de alelos específicos de las subunidades de glutenina de APM, sugiere que podrían lograrse importantes mejoras en las propiedades reológicas de la masa y, por ende, en la calidad panadera, incrementando el número de estos genes mediante su introducción por técnicas de ingeniería genética (56), como fue demostrado recientemente (67).

#### 4.5.4. Polimorfismo presente en cultivares de trigos argentinos

Las variedades de trigo pan que existen en cada país, tienen una composición de subunidades de glutenina de APM diferente y, en cierta forma, característica, que determina, en gran medida, la calidad panadera de la harina que producen (68, 69, 70 y 71).

En nuestro país, los alelos de subunidades de glutenina de APM encontrados más frecuentemente son: 1Ax1; 1Ax2 ; 1Bx7+ 1By8 ; 1Bx7+ 1By9 ; 1Bx17 + 1By18 ; 1Bx13+ 1By16 ; 1Dx5 + 1Dy10 ; 1Dx2+ 1Dy12 (figura 22) (72).



**Figura 22:** Polimorfismo en la composición de SG-APM de diferentes variedades de trigos argentinos. Los números al lado de cada banda indican la subunidad correspondiente. Se utilizó como nomenclatura sólo el número final de la subunidad (1= 1Ax1 ; 2\*= 1Ax2\* ; 5= 1Dx5 ; 7= 1Bx7 ; 8= 1By8; 9= 1By9 ; 10= 1Dy10 ; 12= 1Dy12 ; 2= 1Dx2 ; 17= 1Bx17 ; 18= 1By18). Los números en rojo indican SG-APM asociadas con buena calidad panadera, mientras que, los que están en azul, son de mala calidad.

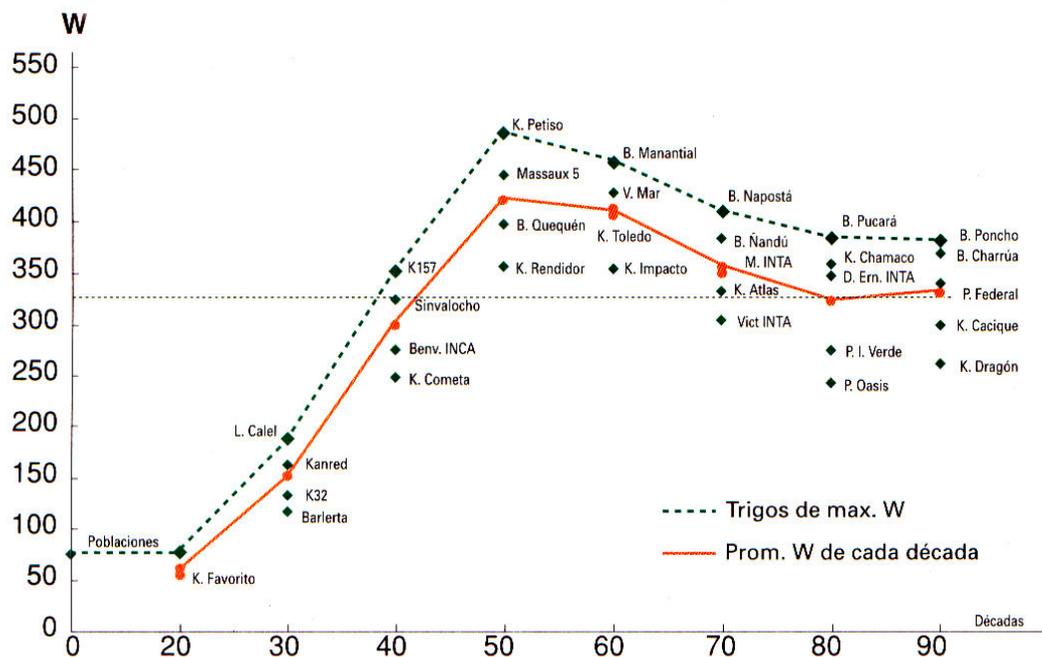
### **Evolución de la calidad de los trigos argentinos**

Desde la introducción de las primeras poblaciones de trigo en nuestro país, a fines del siglo pasado, hasta nuestros días, existen algunas etapas que fueron fundamentales por su incidencia en el progreso del mejoramiento fitogenético de la calidad. En 1920 surgen las primeras variedades, fruto de los trabajos de fitotecnia tanto de criaderos privados como oficiales, teniendo en cuenta, básicamente, el rendimiento y la resistencia a enfermedades, subestimando la calidad molinera y panadera. El principal mercado de entonces eran los países del oeste de Europa, que demandaban trigos correctores para mejorar la producción interna de trigos blandos (gluten débil). Comienza entonces la intervención del Estado que, en 1935, promulga la Ley de Granos, tendiente a lograr una mayor uniformidad y calidad de nuestros trigos, y estimulando al productor a sembrar variedades de tipo duro, desapareciendo los trigos blandos y semiduros en su totalidad. Con esta nueva política se logró en muy pocos años mejorar la calidad de los trigos argentinos y satisfacer la demanda europea de trigos correctores, de gluten fuerte y tenaz (2).

A principios de la década del '60 se introducen germoplasmas, de origen mejicano, en los programas de mejoramiento tanto oficiales como privados. Al cruzar estos trigos con variedades nacionales se obtuvieron cultivares de mayor potencial de rendimiento pero de menor calidad panadera (figura 23). En la actualidad, los trabajos de mejoramiento que se vienen realizando han producido un gran número de variedades, algunas de ellas de notable difusión por sus características agronómicas. Los programas de mejoramiento actuales prestan especial atención a la capacidad productiva de las nuevas variedades pero sin descuidar la calidad. En la actualidad encontramos un W de Alveograma

(W = medida de fuerza panadera: figura 5) de 330, en promedio (figura 23, línea punteada) (14).

Es muy importante tener en cuenta que Brasil, el principal mercado externo actual de los trigos argentinos, demanda trigos con cada vez mayor contenido de proteínas, con niveles de fuerza de gluten superiores al actual de buena panificación, para satisfacer los requerimientos de mezclas con la producción local. De allí la importancia de obtener variedades de trigo pan, tipo corrector, con muy buena calidad panadera y cada vez mayor fuerza de gluten (73).



**Figura 22:** Evolución de la fuerza panadera de variedades argentinas de trigo. Décadas 1910-1990. W: fuerza panadera. W> 330%, buena calidad panadera. W entre 250 y 330 %: calidad aceptable. W<250 %: calidad inferior. Tomado de referencia 14.

## 5. CALIDAD NUTRICIONAL DEL TRIGO

Los derivados del trigo, encabezados por el pan, y seguido por un amplio rango de otros productos alimenticios como pastas, pizzas, tortas, galletitas, etc., se han convertido en los alimentos más difundidos y consumidos en todo el mundo. Se calcula que proveen la nutrición básica a más de un billón de personas o, aproximadamente, al 35 a 40% de la humanidad (10). El grano de trigo es muy rico en hidratos de carbono, calcio, fósforo y proteínas. Desafortunadamente, los granos de los cereales más importantes no son ricos en vitaminas, y las partes del grano que si lo son, con frecuencia, no son las que se ingieren (tabla 5) (74).

Cereal	Tiamina	Riboflavina	Niacina	B6	Acido fólico
TRIGO					
Grano	0,57	0,12	7,4	0,35	78
Germen	2,01	0,68	4,2	0,92	328
Salvado	0,72	0,35	21,0	1,38	223
Harina	0,13	0,04	2,1	0,05	25
ARROZ					
Integral	0,34	0,05	4,7	0,62	20
Pulido	0,07	0,03	1,6	0,04	16

Tabla 5: Contenido de vitaminas de los granos de trigo y arroz, y de sus productos. Los datos se expresan en mg de vitamina/100g de alimento, excepto para el ácido fólico que se expresa en µg. El "arroz pulido" consiste en el grano sin las capas externas. Tomado de referencia 75.

Existen dos formas de solucionar estas deficiencias vitamínicas. La primera es la ingestión de una dieta variada en la que otros alimentos suplan las carencias de los cereales. La segunda forma es agregarles vitaminas artificialmente mediante un proceso llamado fortificación. Por ejemplo, en muchos países desarrollados, las harinas de trigo (blancas y marrones) son fortificadas con vitaminas tales como tiamina, riboflavina, niacina y piridoxina. Este proceso hace que los productos derivados de estas harinas se conviertan en una buena fuente de vitaminas, incluso mejor que el grano entero.

### **5.1. Contenido de proteínas y composición de aminoácidos del trigo**

El aporte proteico del trigo a la dieta es de particular importancia, ya que se considera que el hombre consume más proteínas procedentes del trigo que de cualquier otra fuente (45). El contenido de proteínas de los principales cultivos se muestra en la tabla 6. En general, el contenido de proteínas de los cereales no excede el 15%. Los granos de trigo y avena son los más ricos en proteínas, mientras que maíz y arroz son los más pobres. Las legumbres y las oleaginosas contienen mucha más proteína que los cereales, raramente menos del 20%, destacándose la soja con más del 30% (37).

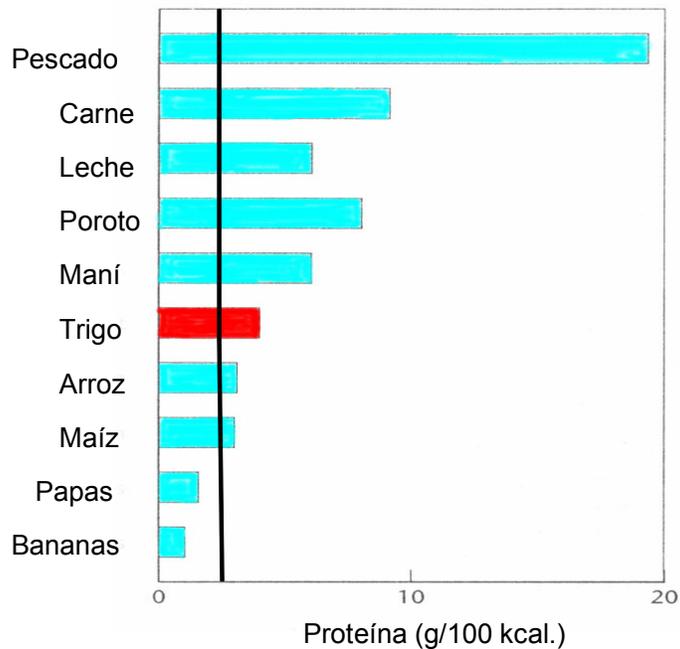
La relación entre proteínas y carbohidratos es generalmente expresada como gramos de proteínas por 100 kcal. Un adulto debe obtener diariamente un promedio de 50 g de proteína y 2500 kcal. de los alimentos (o 2 g de proteína por 100 kcal.). Por lo tanto, una dieta que se base en un alimento que contenga más de 2 g de proteína por 100 kcal. constituye, en principio, una buena fuente de proteínas. El trigo provee una suficiente cantidad de proteínas a la dieta, siempre que las calorías necesarias sean alcanzadas (figura 23 bis) (74).

**Tabla 6: Contenido de proteínas de los distintos tipos de granos.**

El contenido de proteína es calculado para 100g de peso seco de semillas. Tomado de referencia 37.

CULTIVO	CONTENIDO DE PROTEÍNA EN %
<b>CEREALES</b>	
Cebada	8,2 – 11,6
Maíz	7,2 – 9,4
Avena	12,1 – 14,2
Arroz	7,5 – 9,0
<b>Trigo</b>	<b>11 - 14</b>
<b>LEGUMBRES</b>	
Garbanzo	20 – 28
Lenteja	23 – 29
Poroto	19 – 21
Arveja	21 – 28
<b>OLEAGINOSAS</b>	
Algodón	17 – 21
Nabo	20 – 25
Maní	25 – 28
Sésamo	25
Soja	32 – 42
Girasol	27

El valor nutricional de los alimentos ricos en proteínas depende, no sólo de su digestibilidad (no todas las proteínas pueden ser digeridas igualmente bien), sino también, principalmente, de la relativa abundancia de los 9 aminoácidos esenciales. Este criterio puede ser usado para evaluar las proteínas aportadas por distintos alimentos en función de los requerimientos dietéticos humanos. Se considera que las proteínas de la leche humana y de los huevos de



**Figura 23 bis:** Relación proteína- calorías de varios alimentos. La línea negra muestra los requerimientos dietéticos diarios de proteínas de un adulto. Los tres principales alimentos básicos (trigo, arroz y maíz) proveen suficiente cantidad de proteína, si las calorías necesarias son alcanzadas. Datos de la FAO (Food and Agriculture Organization). Tomado de referencia 74.

gallina contienen los aminoácidos esenciales en las proporciones exactas requeridas para el cuerpo humano, por lo que se les asigna un puntaje de valor proteico de 100. La composición de aminoácidos y los puntajes proteicos del trigo y otros alimentos se encuentran en la tabla 7 (74). En general, las proteínas animales tiene un puntaje proteico mayor que las proteínas de origen vegetal, debido a que estas últimas tienden a tener un bajo contenido de los aminoácidos esenciales triptofano, lisina y metionina.

La calidad nutricional de las proteínas del trigo, tanto para el hombre como para otros animales monogástricos (como cerdos y aves de corral) que se alimentan de paja de trigo, se ve limitada por el bajo contenido de dos aminoácidos esenciales: treonina y lisina (74). El trigo destinado al alimento de animales debe suplementarse con lisina, lo que involucra una inversión de unos

1000 millones de dólares anuales. Por otro lado, el contenido de lisina de las proteínas del trigo es de 198 mg/g de proteína (1,98 g %) (tabla 7), lo que constituye sólo el 40 % de los valores recomendados por la Organización Mundial de la Salud (76). Estos bajos niveles son un reflejo del bajo contenido de lisina de las prolaminas, que constituyen más del 50% de las proteínas del grano de trigo (34).

**Tabla 7: Composición de aminoácidos de diferentes alimentos.**

Los valores se expresan en miligramos de aminoácidos por gramo de nitrógeno proteico. Se considera que los huevos de gallina tienen un contenido perfecto de proteínas (en azul), por lo que se comparan con ellos las proteínas de los demás alimentos y, en base a ello, se les otorga un puntaje. Fuente: FAO (Food and Agriculture Organization) . Tomado de referencia 74.

Alimento	Isoleu.	Leucina	Lisina	Metion.	Fenilal.	Threon.	Tript.	Valina	Puntaje
Huevos	393	551	550	210	358	320	93	428	100
Carne de vaca	301	507	556	169	275	287	70	313	80
Leche de vaca	295	596	487	157	336	278	88	362	79
Pollo	334	460	497	157	250	248	64	318	72
Pescado	299	480	569	179	245	286	70	382	70
Maíz	230	783	167	120	305	225	44	303	49
<b>Trigo</b>	204	417	<b>198</b>	94	282	<b>183</b>	68	276	<b>62</b>
Arroz	238	514	237	145	322	244	78	344	69
Porotos	262	476	450	66	326	248	63	287	44
Soja	284	486	399	79	309	241	80	300	67
Papa	236	377	299	81	251	235	103	292	34

## 5.2. Proteínas de cebada con alto contenido de lisina

El grano de cebada también posee un pobre valor nutricional como alimento para el hombre y animales monogástricos. Esto se debe al bajo

contenido de aminoácidos esenciales en las hordeinas, las principales proteínas de almacenamiento, que constituyen un 40% del contenido proteico total del grano de cebada, pero contienen menos del 1 mol % de lisina (77). La deficiencia más importante es la de lisina, con 326 mg/g de proteína (3,26g %), lo que constituye sólo el 60% de los valores recomendados por la OMS (Organización mundial de la Salud). Sin embargo, existen varias proteínas sal solubles con un contenido relativamente alto de lisina (78). Ellas son la  $\beta$ -amilasa (5,0 g % de lisina), proteína Z (7,1 g % de lisina), y los llamados inhibidores de quimiotripsina CI-1 (9,5 g % de lisina) y CI-2 (11,5 g % de lisina). De estas, CI-1 y CI-2 han sido los más estudiados debido a su contenido de lisina más elevado (12). Ambas son proteínas monoméricas, sin residuos de cisteína, y con un bajo peso molecular (8.800 para CI-1 , 9.400 para CI-2). Su rol biológico es desconocido, pero se cree que pueden conferir protección contra insectos u otros microorganismos invasores, por inhibición de serinproteasas.

CI-2 representa, normalmente, sólo el 0,25% del total de proteínas sal solubles del grano de cebada. Sin embargo, un mutante espontáneo de cebada, con alto contenido de lisina, llamado Hiproly, tiene un incremento de 20 veces del contenido de CI-2. Debido al alto contenido de lisina de esta proteína, esta variedad mutante de cebada experimenta una importante mejora en la calidad nutricional del grano. Este incremento en el contenido de CI-2 en Hiproly es controlado por un solo gen recesivo llamado *lys* localizado en el cromosoma 7, mientras que los genes estructurales para CI-2 se encuentran en el locus *lca-2* en el cromosoma 5 (79). Se desconoce cómo el producto del gen *lys* afecta la regulación de la expresión del locus *lca-2*, aunque un estudio reciente sugiere que el aumento de CI-2 en Hiproly podría deberse a un incremento de la transcripción

génica y/o a una mayor estabilidad de los transcritos (79). En general, los mutantes de cebada conocidos, se caracterizan por presentar una reducción en la síntesis de las prolaminas y un incremento en el contenido de proteínas ricas en lisina (proteínas sal solubles) (12 y 80).

Los genes que codifican para CI-1 y CI-2 ya han sido clonados y secuenciados (79, 81, 82), lo que facilitaría la introducción de cualquiera de ellos en trigo, mediante la manipulación de técnicas de ingeniería genética. Para ello, sería necesario colocar el gen CI-2 bajo el control de un promotor fuerte, específico de endosperma, como el de uno de los genes que codifican para las subunidades de glutenina de APM. Se cree que con este promotor, sólo una copia del gen CI-2 podría tener un impacto en el contenido de lisina del grano de un trigo transgénico (12).

## 6. INGENIERÍA GENÉTICA DE PLANTAS

La manipulación genética de plantas ha sido practicada durante cientos de años con gran éxito por los mejoradores y, actualmente, el mejoramiento genético de plantas se ha convertido en una rama sofisticada de la genética aplicada. Los mejoradores han desarrollado elegantes esquemas de cruzamiento de plantas para introducir un determinado carácter y, gracias a ello, entre otras cosas, el rendimiento de cultivos como el trigo y el maíz, se ha incrementado constantemente en los últimos 60 años. Sin embargo, los métodos de mejoramiento de plantas clásicos son lentos e inciertos. Para introducir un gen o un grupo de genes por los métodos convencionales se requiere un cruzamiento sexual entre dos líneas, y luego, repetidas retrocruzas entre la descendencia del híbrido y uno de los padres, hasta que la planta con las características deseadas sea obtenida. Sin embargo, este proceso se halla restringido sólo a plantas que pueden cruzarse sexualmente y, en algunos casos, se transfieren también otros genes indeseables junto con el gen de interés (83).

La ingeniería genética de plantas supera estas limitaciones identificando y clonando genes específicos para un determinado carácter, como resistencia a patógenos, e introduciendo, sólo estos genes, en variedades útiles de plantas. La compatibilidad sexual se torna irrelevante, y el proceso se vuelve más rápido debido a que las plantas transgénicas que expresan el gen pueden ser seleccionadas directamente (83 y 84). Además, es también posible introducir genes útiles, procedentes de otras especies, permitiendo la creación de nuevas variedades vegetales que nunca podrían haber sido obtenidas por medio del mejoramiento genético tradicional (85).

## 6.1. Métodos de transformación de plantas

Existen dos clases de tecnologías utilizadas para la transformación de plantas: métodos "no naturales" o *in vitro*, y "naturales". Entre las tecnologías *in vitro* están la incorporación directa de ADN en protoplastos (con o sin electroporación), infiltración de ADN en semillas bajo vacío, microinyección de ADN en tejidos específicos (muy poco usada), y bombardeo con microproyectiles (86). Las tecnologías "naturales" incluyen el uso de vectores virales (resultando en una transiente pero no estable transformación), y del T-ADN de *Agrobacterium tumefaciens* (87). Cada una de estas tecnologías tiene ventajas y desventajas. Utilizando técnicas *in vitro*, las plantas transformadas obtenidas tienden a incorporar un alto número de transgenes, generalmente concatenados o rearrreglados, los cuales pueden resultar en silenciamiento de dichos transgenes y/o genes endógenos homólogos (silenciamiento génico inducido por transgenes). Además, la tecnología de electroporación depende de la habilidad de regenerar los protoplastos transgénicos en una planta entera, un proceso que es complejo o imposible para muchas especies de plantas (88). La desventaja de los métodos naturales es la necesidad de que la planta a transformar sea susceptible a la infección con lo que, en principio, se limitaría notablemente el número de especies de plantas que pueden ser transformadas.

Los primeros informes sobre la transformación genética de plantas datan de 1984, cuando el tabaco (*Nicotiana tabacum*) fue genéticamente modificado mediante el empleo de *Agrobacterium tumefaciens* (87 y 89). Este microorganismo es una bacteria del suelo, gram-negativa, que penetra por heridas en los tejidos y causa un tumor conocido como "agalla de la corona" en la mayoría de las especies dicotiledóneas y en algunas monocotiledóneas (90). Las

células de las agallas producen sustancias de bajo peso molecular, denominadas opinas, que no están presentes en las células normales y tienden a proliferar indefinidamente en un medio de cultivo sin el agregado de hormonas. El agente inductor de tumores de *Agrobacterium* es un plásmido circular, de doble hebra, llamado Ti, que existe en las células de estas bacterias y se replica como una unidad genética independiente (91). Este plásmido contiene los genes de las opinas, aminoácidos inusuales que las células de la planta infectada son inducidas a sintetizar, pero que ellas no pueden utilizar, y actúan como nutrientes para *Agrobacterium*. Durante la infección, una parte de este plásmido, llamado fragmento T o T-ADN, se integra al genoma nuclear y dirige la síntesis de las opinas, así como también, de las auxinas y citocininas responsables del crecimiento tumoral. Para la integración de dicho fragmento en el ADN de la célula infectada es indispensable una secuencia de 25 pares de bases, en ambos extremos del fragmento, llamadas bordes, que están involucradas en la escisión de dicho fragmento. También son fundamentales una serie de genes denominados *vir* (por virulencia), que no son transferidos al genoma del hospedante, pero codifican proteínas esenciales para la transformación de las células de las plantas (92).

El conocimiento del proceso de infección permitió la construcción de cepas no oncogénicas de *Agrobacterium tumefaciens*, mediante el reemplazo de los genes de la región T, por marcadores de selección y genes de interés. Estos vectores “desarmados” son empleados para transferir fragmentos de ADN a las células, sin interferir en su crecimiento ni en la diferenciación celular (93). Actualmente existen dos sistemas de transferencia. Uno de ellos contiene el plásmido Ti modificado (sin los oncogenes), con el marcador de selección y el

gen de interés. El otro, denominado comúnmente “sistema binario”, posee la región T en un segundo plásmido que funciona en *trans* con los genes *vir* del Ti dentro de la cepa de *Agrobacterium* (94).

La manipulación genética del tabaco fue seguida por la de otras especies dicotiledóneas como petunia (*Petunia híbrida*), papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), alfalfa (*Medicago sativa*), arábido (*Arabidopsis thaliana*), etc. (95).

## **6.2. Transformación transiente y estable de cereales**

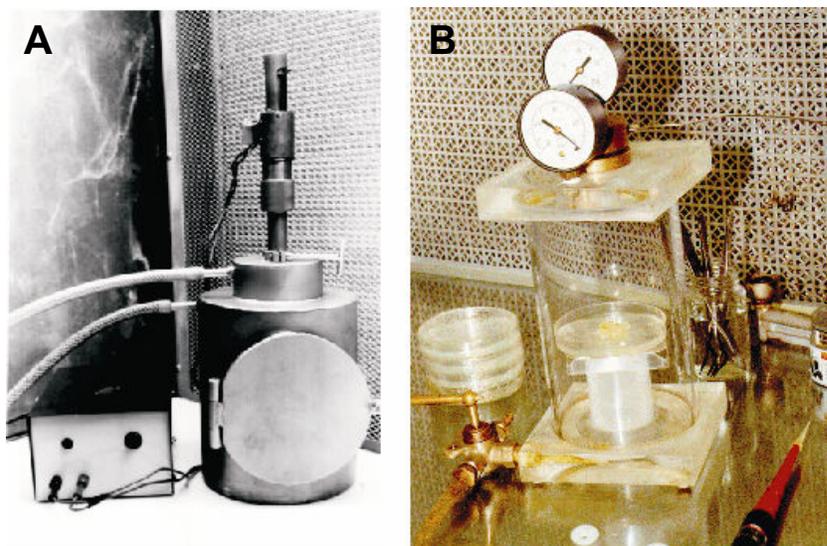
Los cereales no se encuentran entre los hospedantes naturales de *Agrobacterium tumefaciens* y han resultado ser recalcitrantes a la transformación genética por esta vía (96). Aunque algunos trabajos describen la transformación de maíz (97), arroz (98) y trigo (99) mediante el empleo de *Agrobacterium*, varios de ellos no han podido ser reproducidos y otros no cuentan con una evidencia experimental concluyente (96). En el trabajo más convincente sobre transformación estable de trigo por este medio, utilizaron embriones inmaduros y callos como explantos, y la adición de un surfactante al medio de inoculación fue uno de los factores más críticos para aumentar la eficiencia de transformación (100). Potrykus propuso que la dificultad de *A. tumefaciens* para infectar a los cereales es debida a que estas especies presentan mecanismos de respuesta a heridas diferentes al de las especies susceptibles (101). Al parecer, cuando los tejidos de gramíneas son heridos no se generan señales conducentes a la división o a la diferenciación de las células adyacentes a la zona afectada, sino que en su lugar las células mueren. Por lo tanto, aunque *Agrobacterium* puede transferir el fragmento T, no se obtienen clones celulares transgénicos.

Ante la necesidad de contar con una metodología eficiente para la transferencia de genes a las especies que, como los cereales, no se encuentran dentro del rango de hospedantes de *Agrobacterium*, se desarrollaron los llamados métodos directos de transformación. Entre estos, la transformación de protoplastos mediante polietilenglicol (PEG) (102) ó electroporación (103), la electroporación de tejidos intactos (104) y el bombardeo con micropartículas aceleradas (105) han sido los que mejores resultados han arrojado.

La transformación estable de los cereales progresó notablemente con la aparición del método biolístico o de bombardeo con microproyectiles desarrollado por Sanford y col. (106 y 107). Esta metodología emplea micropartículas metálicas aceleradas a alta velocidad, en una atmósfera de vacío, para transportar vectores de ADN al interior de células intactas. De esta forma, es posible introducir ADN en células embriogénicas, tejidos u órganos constituyendo, hasta el presente, el mejor método para alcanzar la transformación estable de muchas especies, independientemente del genotipo. La combinación de un procedimiento de transformación relativamente sencillo con protocolos eficientes de transformación de plantas, permitieron la obtención de plantas transgénicas de los principales cereales (3, 85, 106, 108).

En el primer dispositivo, descrito por Sanford y col. (109a y 109b), las micropartículas son aceleradas por la explosión de una carga de pólvora. La detonación impulsa un macroproyectil que transporta las micropartículas a altas velocidades por el cañón, hasta que es detenido por una placa que solamente permite el paso de las micropartículas. Estas siguen su trayectoria en una atmósfera de vacío, hasta el tejido dispuesto sobre una placa de Petri. Las partículas pueden atravesar la pared celular, la membrana plasmática y entrar en

la célula. A partir del primer dispositivo de Sanford, varios aceleradores han sido descritos hasta el presente, entre ellos los que utilizan como impulsores helio comprimido o una descarga eléctrica, han producido los mejores resultados (110). En nuestro laboratorio fueron desarrollados dos dispositivos, en los que las partículas son aceleradas por la explosión de una carga de pólvora (111) (figura 24 A) o por helio comprimido (figura 24 B), con los que se llevó a cabo la transformación transiente y estable de maíz (112, 113, 114), la transformación estable de una línea celular de alfalfa (115) y de algodón (116). También se logró la transformación estable de trigo, en forma rápida y eficiente, con dos marcadores de selección que confieren resistencia al herbicida Basta (glufosinato de amonio) y al antibiótico higromicina, respectivamente (5, 117, 118, 119).



**Figura 24:** Dos modelos de aceleradores de micropartículas o “pistolas génicas”, desarrollados en nuestro laboratorio, que utilizan dos métodos de aceleración diferentes: explosión de pólvora (A) y helio comprimido (B).

## 7. OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS

El objetivo general del trabajo de tesis fue mejorar la calidad panadera y nutricional, de variedades comerciales de trigos argentinos, mediante la utilización de técnicas de ingeniería genética. Para ello, fueron perseguidos los siguientes objetivos particulares:

- A – Introducir el transgén 1Ax1 en variedades de trigos argentinos que no poseen el gen, con el fin de incrementar el número de SG-APM diferentes, que se expresan, de cinco (valor máximo hallado en la naturaleza) a seis.
  
- B- Lograr la sobreexpresión de las subunidades 1Ax1 y 1Dx5 mediante la introducción de copias adicionales de sus genes, en variedades comerciales de trigos argentinos, con el fin de obtener mejoras en la calidad panadera.
  
- C- Transformar distintas variedades de trigo con el gen del inhibidor de quimi tripsina de cebada (CI-2), para incrementar el contenido de lisina del endosperma de trigo, con la consiguiente mejora de su calidad nutricional.

## 8. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

2,4-D: ácido 2,4-dicloro fenoxiacético

ABA: ácido abscísico

ADN: ácido desoxirribonucleico

Amp: ampicilina

APM : alto peso molecular

ARN: ácido ribonucleico

BPM: bajo peso molecular

CTAB: bromuro de hexadeciltrimetil amonio

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

EDTA: ácido etilen-diamino-tetraacético.

GUS: actividad enzimática de la  $\beta$ -glucuronidasa.

Hpt: higromicina fosfotransferasa

Kb: kilopares de bases

kDa: kilodalton

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEG: polietilenglicol

r.p.m.: revoluciones por minuto

SDS: dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

SG-APM: subunidades de glutenina de alto peso molecular

SG-BPM: subunidades de glutenina de bajo peso molecular

SGT: silenciamiento génico a nivel transcripcional

SGPT: silenciamiento génico a nivel post-transcripcional

TE: Tris-EDTA

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica.

## 1. MATERIALES Y METODOS

### 1.1. Transformación genética de trigo

Se llevó a cabo la transformación de callos embriogénicos de trigo (*Triticum aestivum* L.), derivados de embriones inmaduros. Estos últimos, fueron aislados 15 a 21 días después de la antesis, y colocados en medio Murashige-Skoog (121), 30 g/l con sacarosa y 2mg/l 2,4-D, durante 7 a 9 días, en oscuridad, antes del bombardeo, según se detalla en Ortiz et al. (117).

Las variedades de trigo panadero (*Triticum aestivum* L.) utilizadas en los experimentos de calidad panadera fueron: Pro INTA Federal y Pro INTA Oasis. Por el contrario, en los experimentos de calidad nutricional, se emplearon variedades de trigo candeal (*Triticum durum*), conocidas como Cristal y Ambar.

Para la transformación se usó un acelerador de micropartículas, impulsado a helio comprimido, desarrollado en nuestro laboratorio (111, 119 y 120). El ADN plasmídico (plásmido de interés agronómico y plásmido selector, en cantidades equimoleculares) fue coprecipitado sobre partículas de oro (1,5 – 3  $\mu\text{m}$ , Bio Rad), a una relación de 2  $\mu\text{g}$  de ADN por mg de partículas (5 y 120).

Después del bombardeo, los callos fueron cultivados en el mismo medio, en presencia de agente selectivo (con 25 mg/l de higromicina o 1mg/l de glufosinato, según el plásmido selector empleado), durante 4 a 6 semanas. Luego fueron transferidos a un medio semejante, pero reemplazando el 2,4-D por ácido indolacético (0,3 mg/l) y cinetina (1 mg/l), y eliminando el agente selectivo. Posteriormente fueron incubados con un fotoperíodo de 14 horas a 26 °C y las plántulas regeneradas a partir de los callos, fueron recuperadas y transferidas a un medio Murashige-Skoog sin hormonas. Finalmente, fueron crecidas hasta

madurez, en cámara de crecimiento Percival, con un fotoperíodo de 14 horas a 19/22°C (116).

## **1.2. Plásmidos utilizados en la transformación**

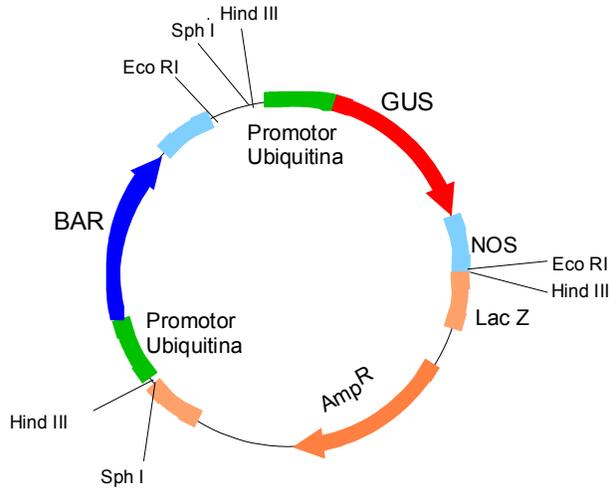
Para llevar a cabo los experimentos de transformación se utilizaron dos tipos de plásmidos: los llamados **plásmidos selectores**, ya que contienen genes que permiten el crecimiento diferencial de las células transformadas e, inclusive, la regeneración de plantas a partir de ellas, luego de un período de selección; y los **plásmidos de interés agronómico**, conteniendo los genes involucrados en el mejoramiento genético que se desea introducir. En los distintos experimentos de transformación, se utilizaron dos tipos diferentes de plásmidos selectores, uno llamado pAHC25 (122) conteniendo el gen *bar*, que codifica para la enzima fosfotricina acetil transferasa que brinda resistencia al herbicida BASTA (123), y otro llamado pGL<sub>2</sub> (124), que contiene el gen *hpt* (125), que codifica para la enzima higromicina fosfotransferasa, que confiere resistencia al antibiótico higromicina.

En los experimentos de calidad panadera se emplearon dos plásmidos diferentes. Uno de ellos, llamado pHMW1Dx5 (126), contiene un fragmento genómico de 8.7 Kb, incluyendo la secuencia codificante completa del gen *1Dx5* (48), flanqueada por dos secuencias de, aproximadamente, 3.8 kb y 2.2 kb, en los extremos 5' y 3', respectivamente. El otro plásmido utilizado se denomina pHMW1Ax1 (50), y contiene un fragmento de 7 kb que incluye la región codificante completa del gen *1Ax1*, flanqueada por dos secuencias de, aproximadamente, 2.2 y 2.1 kb, en los extremos 5' y 3', respectivamente. En

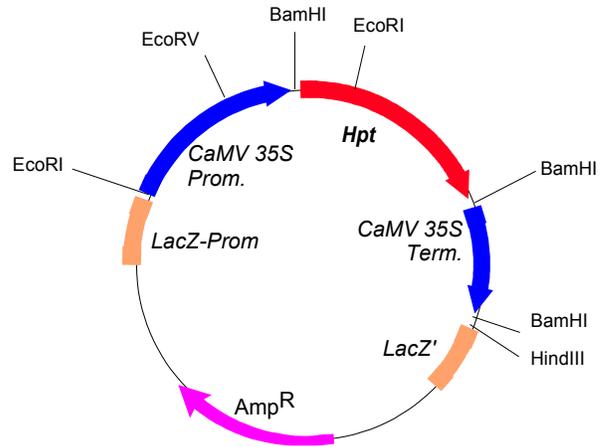
ambos casos, los genes que codifican para subunidades de glutenina de A.P.M. se encuentran bajo su propio promotor, que es específico de endosperma.

**PLASMIDOS SELECTORES**

**pAHC25 9706 pb**

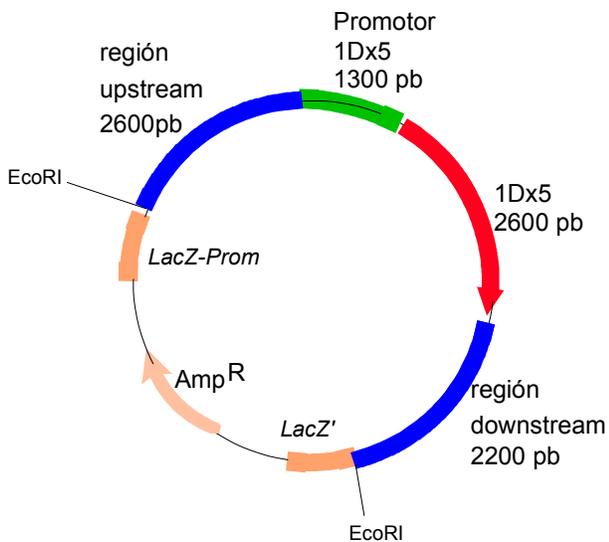


**pGL2 4500 pb**

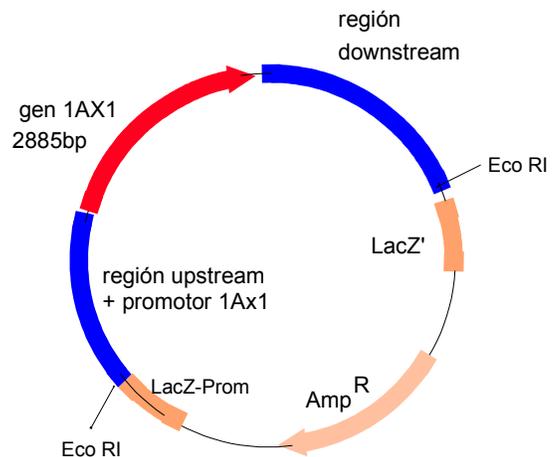


**PLASMIDOS DE INTERÉS AGRONÓMICO**

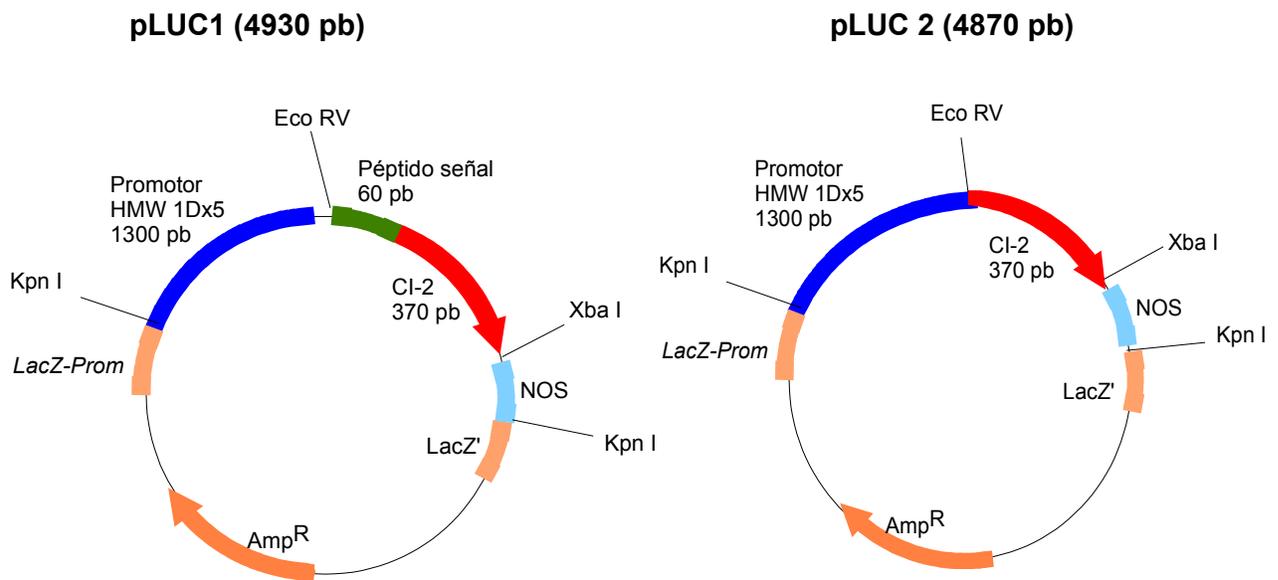
**pHMW1Dx5 11392 pb**



**pHMW1Ax1 9871pb**



En los experimentos de calidad nutricional se utilizaron dos plásmidos diferentes, llamados pLUC 1 y pLUC 2, ambos conteniendo el gen *Cl-2* (que codifica para el inhibidor de quimi tripsina de cebada), con y sin péptido señal, respectivamente. Estos plásmidos fueron construidos en el laboratorio, según la estrategia que se detalla en la sección de resultados.



### 1.3. ANÁLISIS MOLECULARES Y ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSGENES

#### 1.3.1. Obtención de ADN por el método de CTAB modificado

Este método permite la obtención de ADN de buena calidad para su posterior utilización en hibridaciones Southern (127, 128 y 129).

El ADN genómico se obtuvo a partir de, aproximadamente, 0.1g de hojas de trigo. Inmediatamente después de cortadas, fueron envueltas en papel de aluminio y hundidas en hielo, como una forma de mejor conservación de las

muestras hasta su posterior procesamiento. Luego, el tejido fue inmerso en N<sub>2</sub> líquido y pulverizado en mortero, hasta obtener un polvo fino, blanquecino y seco. Cuando el tejido se comenzó a descongelar, se agregó 1 ml de buffer de extracción de CTAB (2% CTAB ; 0.02 M EDTA ; 0.1M Tris-HCl, pH = 8.0 ; 1.4M NaCl ; 0.4% de β-mercaptoetanol), previamente incubado a 65 °C. Se transvasaron las muestras a tubos eppendorf de 2 ml y se incubaron a 65°C durante, al menos, 30 minutos. Luego se agregó, aproximadamente, 1 ml de cloroformo a cada tubo o el volumen necesario para completar los 2 ml y se agitó hasta obtener una suspensión homogénea. Se centrifugó durante 7 minutos a 13.000 r.p.m. y se transfirió la fase superior a otro tubo eppendorf de 2 ml, usando tips cortados y tratando de evitar las impurezas. Se agregaron, aproximadamente, 1 ml de etanol al 95% (o completar a un volumen final de 2 ml) y se colocaron las muestras 20 minutos a (-20 °C) o 1 hora a 4 °C. Luego se invirtieron los eppendorfs para mezclar el buffer y el etanol y, posteriormente, se pescó el ADN utilizando una pipeta Pasteur con la punta doblada en forma de gancho. Se lo colocó en un eppendorf de 1.5 ml conteniendo 1 ml de 75% etanol/ 0.2M NaOAc, durante 10 minutos, para lavar el ADN. Se dejó la pipeta Pasteur, con el gancho hacia arriba, secándose durante 10 minutos. Finalmente, se la colocó en un eppendorf, conteniendo 50-200 µl de buffer TE pH 7.4 - 8.0, dependiendo de la cantidad de ADN obtenido durante, al menos, 15 minutos. Se agregó 2.5 µl de la enzima ARNasa (10 mg/ml) por 100 µl de suspensión de ADN y se incubó a 37°C, durante 30 minutos. La concentración del ADN extraído se determinó midiendo su absorbancia a 260 nm. La relación de absorbancia 260nm / 280 nm es una medida del grado de pureza del ADN obtenido y debe tener un valor entre 1.8 y 1.9 .

### 1.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa

El ADN de plantas resistentes y controles fue purificado de acuerdo al método rápido descrito por Edwards y col. (130), a partir de 100-200 mg de tejido, o por el método de CTAB modificado, ya detallado. Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo, según se describe en Sambrook y col. (128), en un volumen final de 50 µl, con 1.5 U de Taq polimerasa Promega y los siguientes oligonucleótidos:

- Para el gen *bar* : 5' CCGGCGGTCTGCACCATCGT 3'  
5' ATCTCGGTGACGGGCAGGAC 3'
- Para el gen *hpt* : 5' GTAGAAGAAGACCTCCGGCACCA 3'  
5' ACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCCG 3'
- Para el gen *fbp*: 5' CTCGGTCATCTTCGTGCTCACCATCG 3'  
5' CTACCACTCGTGCTTCTACTGGCT 3'
- Para el gen *uidA*: 5' TACAGCGAAGAGGCAGTCAACGGG 3'  
5' CGGTTTCAGGCACAGCACATCAAAG 3'
- Para el gen *Cl-2*: 5' GGAGGAGGCCAAGAAGGTGATTCT 3'  
5' CTTGCTATAGCCAAGAAGAGATGGTGAA 3'
- Para el gen *amp*: 5' TCCGCCTCCATCCAGTCTATTAA 3'  
5' TCTGCTATGTGGCGCGGTATTA 3'

PCR de	Desnaturalización	Apareamiento	Extensión	Peso molecular del producto
<i>hpt</i>	60" a 95°C	60" a 61°C	60" a 72°C	412 pb
<i>uidA</i>	60" a 95°C	60" a 67°C	60" a 72°C	275 pb
<i>bar</i>	60" a 95°C	60" a 65°C	60" a 72°C	494 pb
<i>fbp</i>	60" a 95°C	60" a 67°C	60" a 72°C	317 pb
<i>amp</i>	60" a 95°C	60" a 61°C	60" a 72°C	420 pb
<i>ci-2</i>	60" a 95°C	60" a 65°C	60" a 72°C	350 pb

**Tabla 8:** Etapas que se repiten en cada ciclo de amplificación por PCR para los distintos genes analizados. En todos los casos los ciclos se repitieron 35 veces y se realizó una etapa inicial de 5 minutos a 95°C y una final de 10 minutos a 72°C.

### 1.3.3. Hibridización Southern: método radioactivo y no radioactivo

El ADN genómico de las plantas experimentales y de controles, fue obtenido a partir del método de CTAB modificado, como ya se describió anteriormente. Se realizó la digestión de 10 µg de ADN, con las correspondientes enzimas de restricción, durante 4 horas a 37°C. Los fragmentos obtenidos fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 0.7%, durante 48 horas, empleando una corriente de 30 mA (en el caso de las hibridaciones Southern realizados para la detección de los genes de las subunidades de glutenina de A.P.M.) ó en geles al 1%, durante 24 horas, a 30 mA, para las hibridaciones Southern realizadas para los demás genes. Luego de la corrida, se realizó un tratamiento de los geles que consta de una etapa de depurinación del ADN, con HCl 0.25M, durante 10 minutos, seguida de una desnaturalización, con 0,5N de

NaOH y 1.5 M Na Cl, durante 30 minutos y, finalmente, una neutralización con 0.5M Tris-HCl, pH 7.5, y 1.5M NaCl, durante 30 minutos. Finalmente se realizó la transferencia salina según protocolo estándar (128), a una membrana de nylon Hybond N (Amersham), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La transferencia se realizó durante, aproximadamente, 24 horas. Se utilizó 10 X SSC (1.5 M Na Cl ; 150 mM citrato de sodio, pH 7) como buffer de transferencia . Luego se tiñó el gel con bromuro de etidio para chequear que todo el DNA haya sido transferido. La fijación del ADN se llevó a cabo colocando la membrana, 2 horas, en estufa a 80°C.

Como se detalla a continuación, se utilizaron dos tipos de soluciones de hibridización diferentes, según si el método de marcación y detección de sonda fuese radiactivo o no radiactivo.

**Método no radioactivo**

- 7 % SDS
- 50 % formamida
- 5 X SSC
- 2 % agente bloqueante (cat. 1096176)
- 50 mM fosfato de sodio, pH 7.0
- 0,1 % N-laurilsarcosina

**SSC**

- 0.3 M de citrato de sodio
- 3.0 M de cloruro de sodio

**Método radiactivo**

- 0.56 % SDS
  - 5 X Denhardtts
  - 5 X SSC
- Denhardtts**
- 10 % ficoll
  - 10 % polivinilpirrolidona
  - 10 % albúmina sérica bovina



Utilizando el software Oligo 4, se diseñaron un par de oligonucleótidos (5'AGATGACTAAGCGGTTGGTTC3' y 5'CCTTGTCCTGGTTGCTGTCTTTGT3'), que amplifican 600 pb de la porción amino terminal de la región codificante del gen 1Ax1. Estos oligonucleótidos fueron empleados en la marcación de la sonda con la técnica de PCR.

Concentraciones finales de los reactivos utilizados en la PCR :

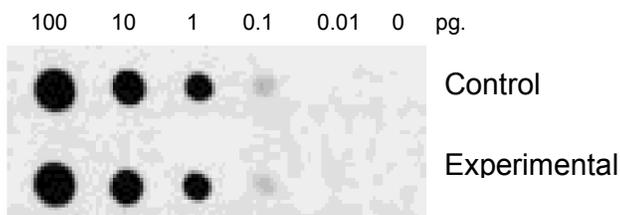
- Oligonucleótidos : 0,5  $\mu$ M
- $Cl_2Mg$  : 2mM
- Buffer : 1 X
- dNTPs : 300 $\mu$ M de dATP , dCTP , dGTP
- dTTP : 210  $\mu$ M
- Dig-11-dUTP : 90  $\mu$ M
- Templado : 10 - 100 pg
- Taq. DNA polimerasa : 2,5 U
- Volumen final : 100  $\mu$ l
- Aceite mineral : 100  $\mu$ l

Se utilizó una relación 1 : 2 de DIG-11-dUTP : dTTP, que es la recomendada para obtener sondas suficientemente sensibles para la detección de genes de una copia en hibridaciones Southern estándares (131) . Las condiciones de ciclado fueron:

- Etapa inicial: 10 minutos a 95 °C

- Desnaturalización : 1 minuto a 95 °C
  - Annealing : 1 minuto a 65°C
  - Extensión : 1 minuto a 72 °C
- 35 ciclos
- Extensión final: 10 minutos a 72 °C

Una adecuada cuantificación de la cantidad de sonda obtenida es de suma importancia para obtener resultados óptimos y reproducibles. Una concentración de sonda demasiado elevada en la solución de hibridización es una frecuente causa de background, mientras que si es demasiado baja produce señales débiles, con la consiguiente pérdida de sensibilidad. Para realizar la semicuantificación de la cantidad de sonda obtenida, el kit de detección quimioluminiscente (DIG Luminiscent Detection kit 1363514) provee un ADN control (pBR328, de concentración conocida, marcado con digoxigenina) al que se le realizan diluciones adecuadas y se las siembra en una membrana de nylon (1µl de cada dilución) . También se hacen diluciones de la sonda marcada y se la siembra en una segunda fila (1µl de c/u). Luego se procede a la detección quimioluminiscente y se estima la concentración de la sonda comparando las intensidades de sus diluciones con las del control, como se muestra en la figura 24 bis.



**Figura 24bis:** Semicuantificación de la cantidad de sonda obtenida (indicada como experimental), en comparación con un testigo de concentración conocida (control).

### **Deteccción quimioluminiscente**

La detección quimioluminiscente consta de tres etapas :

1. Tratamiento de la membrana con agente bloqueante para prevenir la unión no específica del anticuerpo a la membrana.
2. Incubación de la membrana con anti- digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina.
3. Acción de la fosfatasa alcalina sobre un sustrato, produciendo un producto quimioluminiscente cuya señal se detecta en placas radiográficas.

#### Reactivos utilizados:

- DIG Luminescent Detection Kit ( Boehringer Mannheim- cat. Nº 1363514 )
- Buffer 1: 0.1 M ácido maleico ; 0,15 M NaCl pH 7,5
- Buffer de lavado : buffer 1 + 0,3 % Tween 20
- Solución bloqueante stock ( 10 X ) : se obtiene disolviendo el reactivo bloqueante (provisto por el kit) en buffer 1, agitando constantemente a 65 °C.
- Buffer 2 : solución bloqueante 1 X (la dilución debe hacerse con buffer 1)
- Buffer 3 ( buffer de detección) : 0.1 M Tris- HCl ; 50 mM Mg Cl<sub>2</sub> , pH 9.5

#### Técnica :

1. Inmediatamente después de la hibridización y los lavados, enjuagar la membrana brevemente ( 1 - 5 minutos ) en washing buffer.
2. Incubar por 30 minutos en 100 ml buffer 2.
3. Diluir el anticuerpo ( provisto por el kit ) a 38 mU/ml ( 1 : 5000 ) en buffer 2.
4. Incubar la membrana durante 30 minutos en 20 ml de solución de anticuerpo.

5. Hacer dos lavados de 15 minutos cada uno con buffer de lavado con agitación.
6. Equilibrar 2-5 minutos en 20 ml de buffer 3.
7. Diluir CSPD ( sustrato quimioluminiscente provisto por el kit ) 1 : 100 en buffer 3.
8. Incubar la membrana durante 5 minutos en 10 ml de solución de CSPD.
9. Eliminar el exceso de líquido de la membrana dejándola unos minutos sobre un whatman 3MM.
10. Sellar la membrana en bolsa e incubar 15 minutos a 37 °C para favorecer la reacción de quimioluminiscencia.
11. Exponer 1 hora ( dentro de las primeras 8 hs luego de realizada la detección ) a temperatura ambiente, en placa radiográfica X-OMAT MR o 15 minutos, si han pasado más de 8 hs y menos de dos días de realizada la detección.
12. Revelar la placa por el método estándar (128) .

### **Lavado de la membrana luego de la detección**

Para eliminar la sonda de la membrana, se realizan dos lavados de 10 minutos a 37°C, con solución alcalina (0.2 N NaOH ; 0.1 % SDS) . Luego se enjuaga la membrana con 2 X SSC. Se guarda a (-20 °C), envuelta en papel Whatmann 3MM o se comienza con una nueva prehibridización.

## **MÉTODO RADIOACTIVO**

### **Marcación de sonda**

Se realizó la marcación de sonda por PCR utilizando dATP marcado con [<sup>32</sup>P] y las siguientes concentraciones finales de reactivos:

- Oligonucleótidos 1 y 2 : 250 nM de cada uno
- $\text{Cl}_2\text{Mg}$  : 2,5 mM
- Buffer : 1 X
- dNTPs : 1,6  $\mu\text{M}$  de dGTP , dCTP , dGTP
- $[\alpha^{32}\text{P}]$  dATP : 5  $\mu\text{l}$  (50 $\mu\text{Ci}$ ) [0,825 $\mu\text{M}$ ]
- Templado : 300 pg
- Taq DNA polimeras: 1,25U
- Volumen final : 20  $\mu\text{l}$
- Aceite mineral : 50  $\mu\text{l}$

Se utilizó una relación 2: 1 de dNTPs :  $[\alpha^{32}\text{P}]$  dATP, para obtener sondas con elevada actividad específica y suficientemente sensibles para la detección de genes de una copia en hibridaciones Southern estándares (132) .

Se obtiene un producto de amplificación de 600 pb. Los oligonucleótidos y el templado son los mismos que los utilizados en la marcación de sonda por métodos no radioactivos (ver “ marcación de sonda no radioactiva”, página 89) .

Condiciones de ciclado :

- Hot start : 10 minutos a 95 °C
  - Desnaturalización : 1 minuto a 95 °C
  - Annealing : 1 minuto a 65°C
  - Extensión : 1 minuto a 72 °C
  - Extensión final : 10 minutos a 72 °C
- } 35 ciclos

### **Detección**

Luego de los lavados post-hibridización se expone la membrana con placa radiográfica X-OMAT MS (Kodak) a (-80°C) durante 3 días. Finalmente se realiza el revelado de la placa por el método estándar (128).

### **Lavado de la membrana luego de la detección**

Para eliminar la sonda de la membrana se la coloca en un recipiente con tapa y se le agrega una solución hirviendo de SDS 0.1 %. Se agita durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se lava la membrana con una solución de 2 X SSC. Se guarda a (-20 °C) envuelta en Whatmann 3 MM o se comienza con una nueva prehibridización.

### **1.3.5. ANALISIS DE PROTEINAS DE SEMILLAS UTILIZANDO SDS-PAGE**

Se siguió básicamente el protocolo de Shewry et al. (133) , pero introduciendo algunas modificaciones, logrando mejoras en el grado de resolución y definición de las bandas de proteínas.

### **Extracción de proteínas de semillas**

#### Buffer de extracción utilizado

- 0.0625 M Tris - HCl, pH 6.8
- 2 % p / v de S.D.S.
- 20 % v / v de glicerol

- 0.9 % p / v de DTT
- 0.002 % p / v de azul de bromofenol

Se duplicó el porcentaje de glicerol (20 %), con respecto a la técnica original (10%), logrando mejoras en el grado de definición de las bandas. También se redujo la cantidad de agente reductor, obteniendo una mejora en la resolución de las bandas, principalmente entre las subunidades de glutenina de A.P.M. 1Ax2\* y 1Dx5.

Para la extracción de proteínas se utilizó sólo la mitad del grano, lo que permitió sembrar la otra mitad, conteniendo el embrión, para obtener descendencia y así poder estudiar la segregación del gen introducido.

Primeramente, utilizando un mortero, se convierte la media semilla en un polvo blanco, luego se transfiere a un tubo Eppendorf, se agregan 20  $\mu$ l de buffer por mg de peso de la semilla, y se dejan una hora en reposo a temperatura ambiente. Esta relación, en realidad, se modifica según las características de las semillas analizadas, encontrándose que las de más bajo peso presentan, en proporción, un mayor contenido relativo de proteínas, por lo que se colocan 25 $\mu$ l de buffer por cada mg con el objeto de diluirlas (es fundamental tratar que los extractos tengan concentraciones de proteínas semejantes entre sí, para evitar que la corrida se distorsione, con la consiguiente deformación de las bandas ). Luego se mezcla (utilizando un vortex) unos segundos hasta resuspender totalmente el polvo blanco en el extracto, y se deja reposar durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, se colocan los tubos en un baño de agua hirviendo durante un minuto, se dejan enfriar, se centrifugan al menos 5 minutos a 14.000 r.p.m. y se siembran 10  $\mu$ l de extracto en un gel de SDS-PAGE.

Modificaciones introducidas en el método : se redujo el lapso de reposo del extracto, a temperatura ambiente, de 2 a 1 hora, para disminuir el tiempo de exposición de la muestra a posibles proteasas que podrían estar presentes en el medio. Además, de esta forma, se logra reducir en una hora el tiempo necesario para la preparación de los extractos, sin cambios observables en el rendimiento debido a un menor tiempo de exposición al buffer de extracción. También se redujo el tiempo de hervor de las muestras, de 2 a 1 minuto, para evitar la agregación selectiva de proteínas que puede ocurrir por calentamiento excesivo a 100 °C, con la consiguiente generación de artefactos en el gel (134).

### **Preparación de geles**

Para la resolución de las proteínas de endosperma del grano se utilizaron geles discontinuos, desnaturalizantes, empleando el sistema Tris-borato.

#### Reactivos utilizados :

- Buffer del gel de separación : 1,25 M Tris-borato + 1 % P / V SDS ( pH = 8.9)
- Buffer del gel de stacking : 1\_M Tris-HCl pH 6.8 + 10 % P / V SDS
- Buffer de corrida : buffer de separación diluido 10 X .
- Acrilamida (40 % p / v )
- Bisacrilamida (2 % p / v)
- Persulfato de amonio (10 % p / v )
- TEMED (tetrametiletilendiamina)

#### Solución de tinción

- 0,2 % de azul brillante de Coomassie R250
- 40 % etanol
- 10 % ácido acético

Se deja toda la noche, a temperatura ambiente, con agitación.

#### Solución decolorante

- 10 % HAc
- 20 % etanol

Se deja decolorando aproximadamente 5 hs, con agitación, y renovando periódicamente la solución.

#### Equipo

Unidad de electroforesis vertical, dual, refrigerada, Hoefer SE 600

#### **Armado y preservación de geles**

##### Modificaciones introducidas

Se redujo la cantidad de TEMED y persulfato de amonio en un 20 % con respecto a la técnica original (133), debido a la presencia de bandas difusas, poco definidas (Operating Instructions of Gel Electrophoresis Units SE 600. Hoefer Pharmacia Biotech Inc.), lográndose una importante mejora.

	Stacking Gel 3 %	Separating Gel 10%
Acrilamida (40 %)	1 , 5 0 ml	1 5 , 0 0 ml
Bisacrilamida (2%)	0 , 8 0 ml	3 , 1 2 ml
Buffer gel de separación	–	6 , 0 0 ml
Buffer gel de stacking	2 , 4 8 ml	–
10 % SDS P / V	0 , 0 2 ml	–
Agua	1 4 , 8 0 ml	3 5 , 3 0 ml
Persulfato de amonio	0 , 2 0 ml	0 , 4 6 ml
TEMED	0 , 0 2 ml	0 , 0 2 ml
Volumen final	2 0 , 0 0 ml	6 0 , 0 0 ml

**Tabla 9:** Volúmenes requeridos para la preparación de dos geles de poliacrilamida con SDS de 18 cm x 16 cm x 1,5 mm

Los geles se conservan mejor secos, y además, de esta forma, se hace más fácil su manipulación. Para ello se utiliza un sistema de secado comercial (Gel-Air Drying Frame Assembly , BioRad). Consiste en colocar el gel entre dos membranas de celofán mojadas, manteniéndolas unidas entre dos marcos cerrados con clips. Luego se deja de 8 a 10 hs en estufa a 37 °C o toda la noche a temperatura ambiente. Luego se desmontan los marcos y se archiva el gel.

### **1.3.6. Análisis densitométricos de geles de SDS-PAGE y autorradiografías de hibridaciones Southern**

Los análisis densitométrico se llevaron a cabo utilizando el software Image Pro, versión 1.1. para Windows, y un escáner Hewlett Packard Scan Jet 3c color, de página completa.

#### **Cuantificación de SG-A.P.M**

Los valores densitométricos de cada calle completa (proteínas totales) fueron corregidos descontando el ruido de fondo. En el caso de las densitometrías practicadas a bandas individuales, se les restó el valor correspondiente a la zona entre las bandas de subunidades de glutenina de APM.

Aunque las proteínas menores de 20 kDa. se perdieron en las condiciones usadas para resolver las subunidades 1Dx5 y 1Ax2\*, la mayor parte de las proteínas de endosperma quedaron en el gel, y fueron usadas para normalizar la expresión de las subunidades de glutenina de APM dentro de una calle determinada.

#### **Determinación del número de copias en autorradiografías de hibridaciones Southern**

Se sabe que los genes endógenos de subunidades de glutenina de APM son de copia única. Debido a que, como ya ha sido mencionado, todas las sondas de subunidades de glutenina utilizadas, dan hibridación cruzada con los genes de las distintas subunidades endógenas, fue posible utilizar las bandas correspondientes a ellas como patrones internos de genes de copia única. De esta forma, el cociente entre el valor densitométrico (corregido para el ruido de fondo), de las bandas pertenecientes a los transgenes, y el de la banda

correspondiente a un gen endógeno de la misma planta, permitió semicuantificar, en forma bastante precisa, el número de copias de los transgenes introducidos.

### **1.3.7. Ensayo de histoquímica para actividad de $\beta$ -glucuronidasa**

La actividad  $\beta$ -glucuronidasa fue determinada histoquímicamente en callos embriogénicos y semillas de plantas experimentales y controles, de acuerdo a Jefferson (135). El material vegetal fue incubado en buffer fosfato pH 7.5 con el reactivo X-Glu (5-bromo-4-cloro-3-indolyl glucurónico), a 37°C, durante 6 a 24 horas.

### **1.3.8. Ensayos de resistencia a glufosinato e higromicina *in vivo***

Se cortaron trozos de hojas experimentales y controles, y se sumergieron en pocillos de una placa tipo Elisa conteniendo 0.5 ml de una solución con 100 mg/l de funguicida (Benlate), 0.01% de Tween 20 y 200 mg/l de higromicina o 3 mg/l de glufosinato de amonio. De cada planta se tomó un trozo de hoja que fue dividido en tres partes (0.5 cm de largo), dos de los cuales fueron colocados en líquido con agente selectivo (duplicado de tratamiento) y el tercer trozo, en el mismo medio, pero sin agente selectivo (sin tratamiento). Este ensayo se practicó tanto en plantas experimentales como en plantas controles, no transformadas, pero pertenecientes a la misma variedad (controles negativos).

## 2. RESULTADOS

### 2.1. EXPRESIÓN DE TRANSGENES DE SUBUNIDADES DE GLUTENINA DE ALTO PESO MOLECULAR (SG-APM)

Con el propósito de obtener trigo transgénico de mayor calidad panadera, se realizaron 14 experimentos de transformación diferentes, en los que se bombardearon un total de 2029 callos embriogénicos, a partir de los cuales se regeneraron 393 plantas de trigo. En el bombardeo se utilizaron los plásmidos pHMW1Ax1 y pHMW1Dx5, conteniendo los genes que codifican para las subunidades de glutenina de APM 1Ax1 y 1Dx5, respectivamente, bajo sus propios promotores. Como plásmidos selectores se emplearon el pGL2 ó el pAHC25, que contienen el gen *hpt* (que confiere resistencia al antibiótico higromicina), y los genes *bar* (que otorga resistencia al herbicida glufosinato) y *gus* (que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa de *E. coli*), respectivamente. Los mapas de los cuatro plásmidos utilizados en los distintos experimentos de bombardeo se detallan en la sección "Materiales y métodos".

Analizando las proteínas totales de endosperma de las semillas procedentes de las 393 plantas obtenidas, por electroforesis en geles de poliacrilamida, fue posible hallar 7 eventos de transformación independientes, en los que se estudió la expresión de las subunidades de glutenina de APM transgénicas y endógenas. En la tabla 10 se indican las principales características de los eventos obtenidos que serán luego analizadas en detalle en la presente sección.

Evento	Genes introducidos por transform.	Silenciamiento	Nº de copias	Nivel de expresión de los transgenes
A	1Dx5	Ninguno	Bajo (3)	Sobreexpresión fuerte de 1Dx5
B	1Dx5	Ninguno	n.d	Sobreexpresión débil de 1Dx5
C	1Ax1	1Bx7 y 1By9	Bajo (1)	Sobreexpresión débil de 1Ax1.
D	1Ax1	1Ax2*	Bajo (3)	Expresión fuerte de 1Ax1 y banda X (**)
E	1Ax1	1Ax2*	Bajo (3)	Expresión fuerte de 1Ax1
F	1Ax1 1Dx5	SG-APM endógenas	Alto (30)	Expresión débil de 1Ax1 y 1Dx5
G	1Ax1 1Dx5	SG-APM endógenas	Alto (50)	Expresión fuerte de 1Ax1 y 1Dx5

**Tabla 10: Diferentes eventos de transformación con los genes 1Ax1 y 1Dx5.**

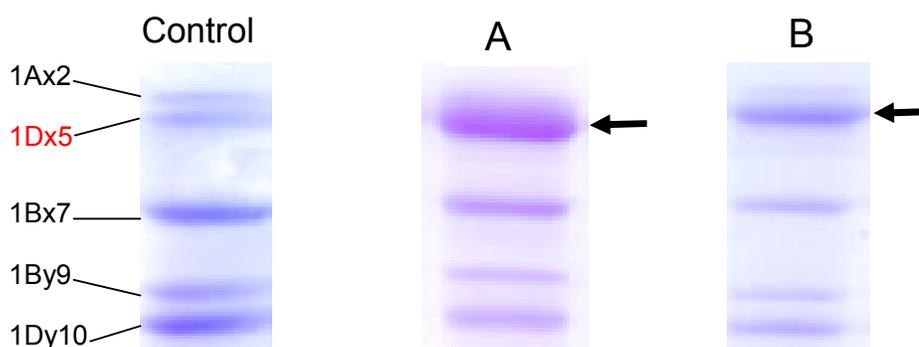
Los números indicados entre paréntesis, en la cuarta columna, corresponden al número de copias de transgenes totales (independientemente de si se trata del transgén 1Ax1 o 1Dx5). N.d.: no determinado. (\*\*) La banda X es el nombre dado a la correspondiente a un polipéptido, con una movilidad diferente en un campo electroforético, a la esperada para los genes endógenos o los transgenes de las SG-APM (probablemente corresponde a un producto truncado de uno de los transgenes). En todos los casos la variedad de trigo transformada fue ProINTA Federal (que contiene las SG-APM 1Ax2\*, 1Dx5, 1Bx7, 1By9, 1Dy10), excepto en el evento C en el que se utilizó la variedad ProINTA Oasis (que presenta las SG-APM 1Ax1, 1Dx5, 1Bx7, 1By9 y 1Dy10).

Sucintamente, de los 7 eventos hallados, dos presentan un diferente grado de sobreexpresión de la subunidad 1Dx5 (eventos A y B); otros dos (D y E), tienen una fuerte expresión de 1Ax1; los eventos F y G, expresan 1Ax1 y sobreexpresan 1Dx5; y, por último, el C, muestra una débil sobreexpresión de 1Ax1. En algunos casos, la expresión de los transgenes estuvo asociada al silenciamiento de la subunidad endógena 1Ax2\* (eventos D y E), o con la disminución en la expresión de las subunidades 1Bx7 y 1By9 (en C). Hubo, además, otros dos eventos (F y G), en los que la introducción simultánea de 1Ax1 y 1Dx5 se acompañó del silenciamiento de todas las SG-APM endógenas (tabla 10).

Un hallazgo inesperado fue la presencia de un polipéptido, de naturaleza desconocida (al que llamamos "X"), con una movilidad electroforética ligeramente mayor que la subunidad 1Dx5, y que sólo se encontró en las semillas del evento D. Este polipéptido podría corresponder a un producto truncado de alguno de los transgenes introducidos, como ya se discutirá posteriormente.

### **2.1.1. SOBREEXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD 1DX5**

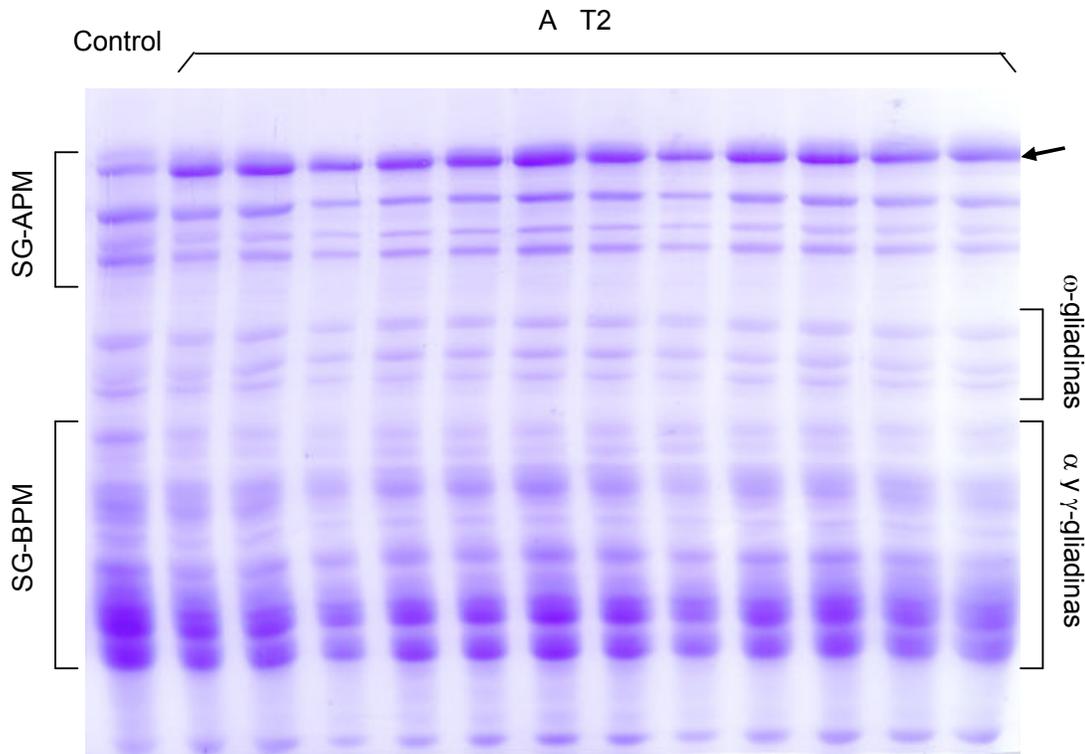
Se obtuvieron dos eventos de transformación independientes llamados, arbitrariamente, A y B (tabla 10). La figura 25 (calles A y B) muestra el diferente grado de sobreexpresión, de la subunidad de glutenina de A.P.M. 1Dx5, alcanzado por cada uno de estos eventos.



**Figura 25: Sobreexpresión de la subunidad de glutenina de APM 1Dx5**

Geles de poliacrilamida de proteínas totales de endosperma, de semillas de la primera generación (T1), de los eventos transgénicos A y B, y de un control sin transformar. Las flechas indican la subunidad sobreexpresada (1Dx5).

Se realizó un estudio de la segregación y estabilidad del transgén introducido, a través de las sucesivas generaciones, con un mayor énfasis en el análisis del evento A que en el B, debido a que el primero reviste un mayor interés por haber alcanzado un nivel más alto de expresión. Para ello, las semillas T1 (primera generación), de estos dos eventos, que resultaron positivas, fueron sembradas con el objeto de hallar las plantas homocigotas para el transgén introducido. Es así como pudo comprobarse la segregación mendeliana del transgén (25% homocigotas, 50% heterocigotas y 25% negativas). En la figura 26 se muestra un gel de poliacrilamida de los extractos de proteínas totales de endosperma, de 12 semillas (indicadas como "A T2"), procedentes de una de las plantas homocigotas del evento A, en las que se aprecia claramente el alto grado de sobreexpresión alcanzado por el transgén 1Dx5 (señalado con una flecha). Además, se logró comprobar la estabilidad del transgén introducido, a través de las sucesivas generaciones.



**Figura 26: Análisis de semillas T2 de una planta homocigota del evento A**

Gel de poliacrilamida, de proteínas totales de endosperma, de semillas T2 (o sea, de semillas de la segunda generación) procedentes de una planta homocigota del evento A (A T2), y de una semilla control sin transformar. SG-APM: subunidades de glutenina de alto peso molecular. SG-BPM: subunidades de glutenina de bajo peso molecular. La flecha indica la subunidad sobreexpresada (1Dx5).

En la tabla 11 se muestran los resultados del análisis densitométrico de los gels de poliacrilamida realizados para el estudio de la expresión del transgén 1Dx5, en las distintas generaciones de semillas, de los dos eventos.

En el caso del evento A, gracias a la introducción de copias extras del gen que codifica para la SG-APM 1Dx5, por transformación, se logró incrementar la expresión de dicha subunidad de 2% a 4,8%, o sea, un 140%, más del doble de los valores hallados en los controles (tabla 11). Como resultado de ello, la contribución de las subunidades de glutenina de APM al total de proteínas

del endosperma se incrementó de 11% a 13,1% (un 20% por encima de los valores de los controles) (tabla 11).

Evento	Nºde semillas	SG-APM / P.T. (%)	1Ax2*/ P.T.(%)	1Dx5/ P.T.(%)	P. 1Bx7/ P.T.(%)	1By9/ P.T. (%)	1Dy10/ P.T. (%)
Control	25	11.0 ± 0.19	1.2 ± 0.06	2.0 ± 0.05	2.9 ± 0.07	2.0 ± 0.05	2.8 ± 0.05
A	11 T1	13.4 ± 0.28	1.4 ± 0.07	4.8 ± 0.24	2.9 ± 0.09	1.8 ± 0.08	2.6 ± 0.12
	12 T2	13.1 ± 0.29	1.5 ± 0.08	4.8 ± 0.11	2.6 ± 0.10	1.9 ± 0.10	2.4 ± 0.09
B	21 T1	12.1 ± 0.20	1.3 ± 0.08	2.7 ± 0.05	3.0 ± 0.06	2.3 ± 0.06	2.9 ± 0.09
	12 T2	12.0 ± 0.10	1.1 ± 0.05	2.8 ± 0.05	2.9 ± 0.09	2.2 ± 0.07	3.0 ± 0.08

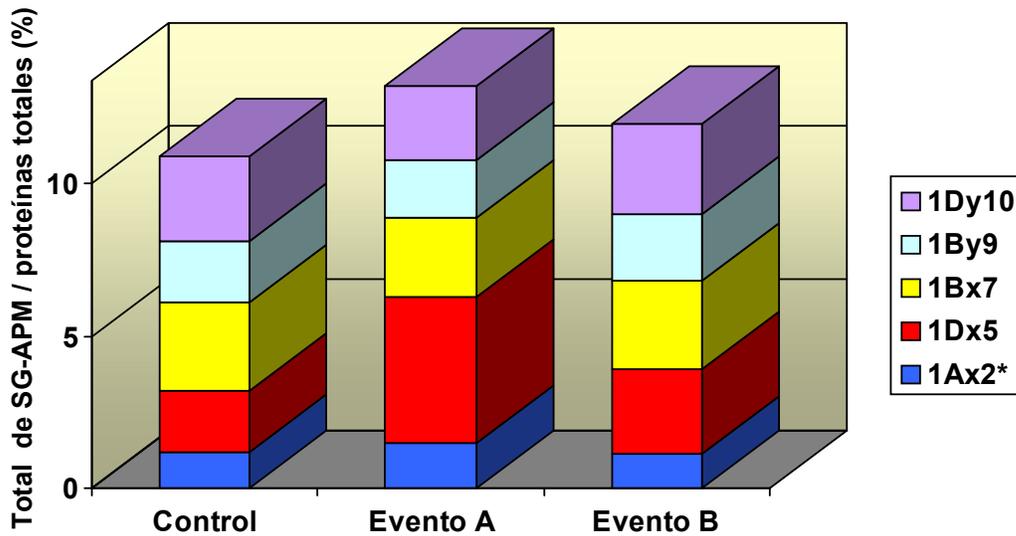
**Tabla 11: Análisis densitométricos de geles de poliacrilamida, de proteínas totales de endosperma, de semillas de los eventos A y B.** T1 y T2: primera y segunda generación de semillas transgénicas, respectivamente. Los valores de la tercera a la octava columna representan el promedio ± error estándar de las medidas realizadas. P.T.: proteínas totales. SG-APM: subunidades de glutenina de alto peso molecular.

En el evento B, la sobreexpresión de la subunidad 1Dx5 fue menor, con valores que aumentaron de 2 a 2,8%, un 40% por encima de los valores de los controles (tabla 11). Con ello se logró un incremento del total de subunidades de glutenina de APM de 11% a 12%, un 9% por arriba de los valores de las semillas de plantas controles sin transformar (tabla 11).

Tanto en el evento A como en el B, los valores hallados para semillas de la primera y la segunda generación son bastante similares (tabla 11), lo que permite comprobar la estabilidad del transgén introducido. Además, la sobreexpresión de la subunidad 1Dx5, en las semillas de plantas transgénicas, no se acompaña de un cambio significativo en la expresión de las demás subunidades de glutenina de APM (tabla 11), ni en el patrón de expresión de las

subunidades de glutenina de BPM o de las gliadinas, comparado con las semillas controles (como es posible observar en la figura 26).

En la figura 27, se han graficado los principales resultados obtenidos, mostrándose, claramente que, el incremento observado en el total de subunidades de glutenina de APM, sobre el total de proteínas, tanto en el evento A como en el B, es consecuencia de la sobreexpresión de la subunidad 1Dx5 (no observándose modificaciones importantes de las demás subunidades de glutenina de APM).



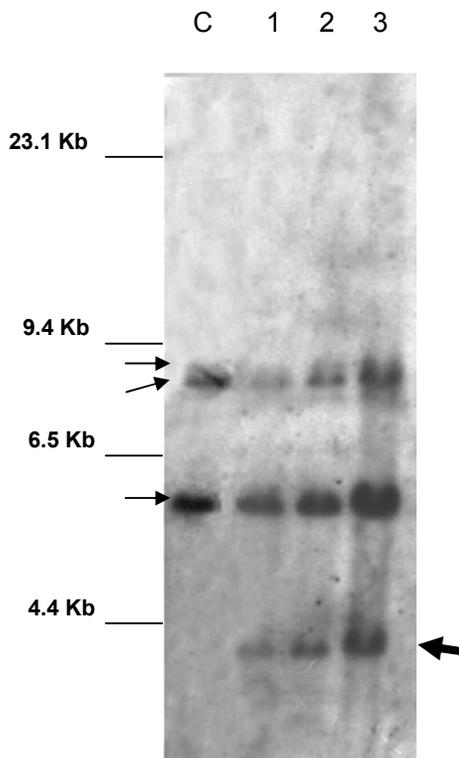
**Figura 27:** Comparación del contenido total de SG-APM con respecto a las proteínas totales de endosperma (en %), entre semillas controles y semillas homocigotas, de los eventos A y B. Cada color representa el aporte de cada SG-APM al total de SG-APM (con referencia a los valores promedio de los datos que se muestran en la tabla 11).

**Análisis por hibridización Southern**

Con el objeto de confirmar la transformación del evento A con el trasngén 1Dx5, así como también, determinar el número de copias introducidas,

se llevó a cabo el análisis por hibridación Southern de ADN de plantas transgénicas, de la primera y la segunda generación, del evento A.

El ADN fue digerido con la enzima *EcoRV*, que corta sólo una vez al plásmido pHMW1Dx5 utilizado en la transformación, pero no dentro del gen 1Dx5. Debido al alto grado de homología existente entre las distintas subunidades de gluteninas de A.P.M, la sonda 1Dx5 empleada da una hibridación cruzada con las demás subunidades. De allí que el ADN control (calle C, figura 28) presente 3 bandas, de 5.9 kb (que en algunos casos se logra resolver en dos bandas de 5.8 y 6.0 kb), 7.6 y 8.0 kb. Debido a que los transgenes se insertan en el genoma al azar, pero en una posición diferente a la de los genes endógenos, es de esperar que las bandas de hibridación con los transgenes se ubiquen en una posición distinta a las del patrón de bandas endógeno, permitiendo su fácil identificación.

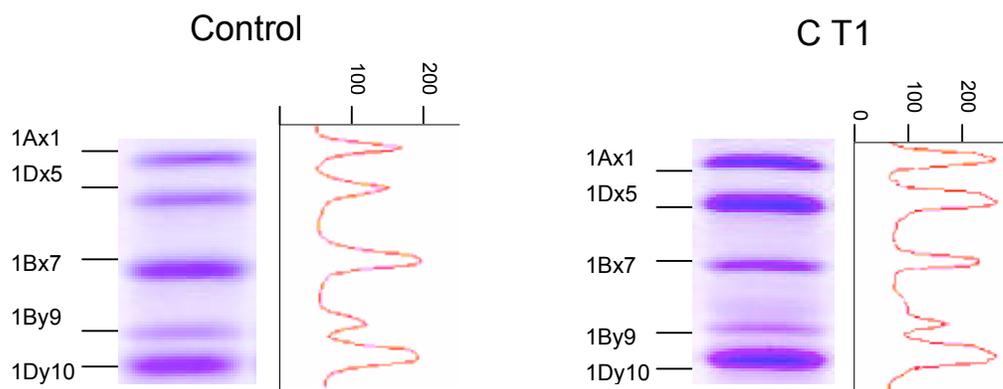


**Figura 28:** Análisis por hibridación Southern de ADN, digerido con *EcoRV*, de una planta transgénica T1 (calle 1) y de dos de sus hijas T2 (calles 2 y 3), pertenecientes al evento A. C: planta control. Las flechas pequeñas indican las bandas de hibridación cruzada con genes endógenos de subunidades de gluteninas de A.P.M. La flecha grande señala la posición de la banda extra correspondiente a los transgenes introducidos.

En la figura 28, se indica con una flecha grande, una banda extra, de 4.2 kb, tanto en la calle 1 (correspondiente a una planta de la primera generación), como en las calles 2 y 3 (perteneciente a dos hijas de la planta de calle 1). Esta banda extra al patrón de bandas que dan los genes endógenos, que no aparece en el ADN control (calle C), corresponde al transgén 1Dx5, y permite comprobar la transformación del evento A. Además, mediante el análisis densitométrico de la autorradiografía, fue posible determinar que el número de copias del transgén 1Dx5 es bajo, de aproximadamente 3.

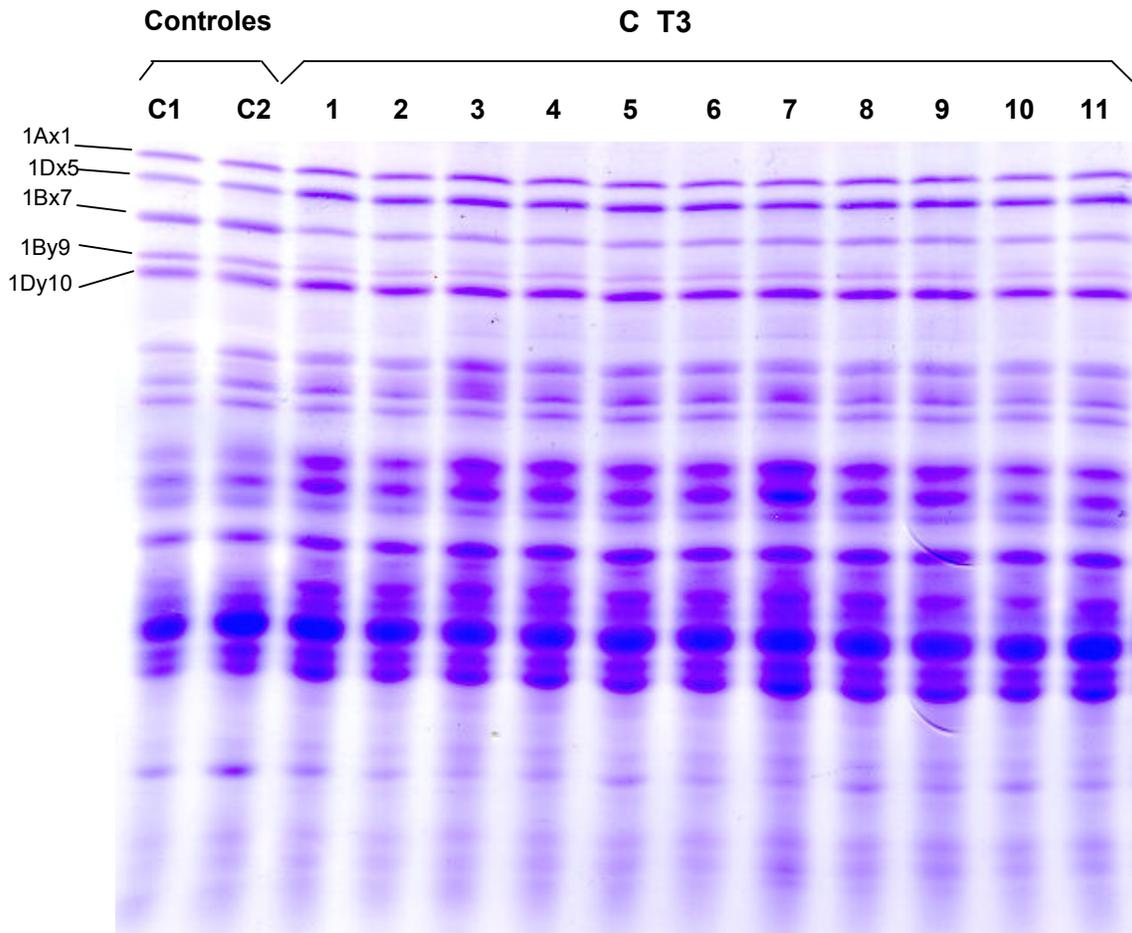
### 2.1.2. SOBREEXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD 1AX1

Se logró sobreexpresar la subunidad de glutenina de alto peso molecular 1Ax1, en la variedad comercial argentina ProINTA Oasis. Esta variedad expresa, naturalmente, 5 subunidades diferentes: 1Ax1; 1Dx5; 1Bx7; 1By9 y 1Dy10. Sin embargo, se observó que el incremento en la expresión de 1Ax1, fue acompañado por una notable disminución en la expresión de las subunidades 1Bx7 y 1By9, en un evento al que llamamos C (tabla 10 y figura 29).



**Figura 29:** Geles de poliacrilamida, de proteínas totales de endosperma, de una semilla control y una transgénica, y sus patrones densitométricos. C T1: semilla transgénica de la primera generación (T1) del evento C.

Los extractos proteicos, de semillas procedentes de distintas generaciones de plantas, del evento C, fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida. En la figura 30 se muestra uno de esos geles, con las proteínas de endosperma de 11 semillas T3 (calles 1-11, indicadas como C T3), procedentes de una planta homocigota del evento C. En todas ellas se observa el mismo patrón de expresión, con un aumento débil en los niveles de 1Ax1, y una disminución de las subunidades endógenas 1Bx7 y 1By9, cuando se las compara con las semillas controles de plantas sin transformar (calles c1 y c2).



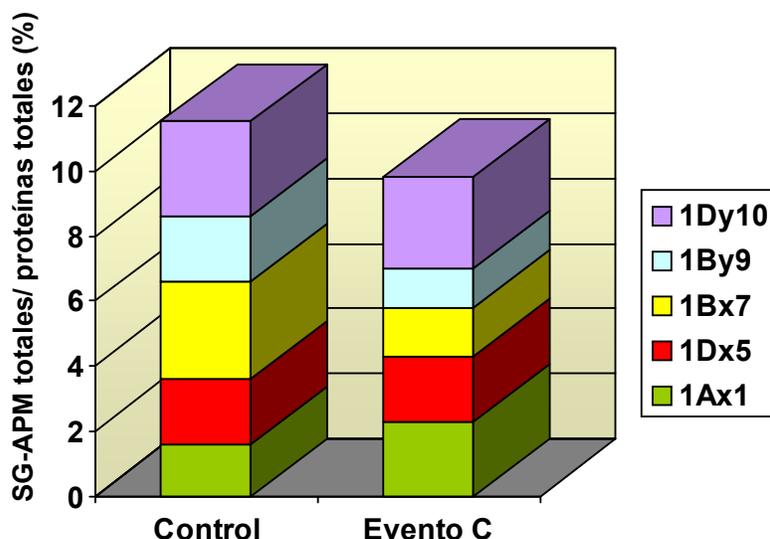
**Figura 30:** Gel de poliacrilamida, de proteínas totales de endosperma, de semillas de la tercera generación, del evento C (C T3), procedentes de una planta homocigota para el transgén 1Ax1. C1 y C2: extractos proteicos de semillas de dos plantas controles diferentes, de la misma variedad que las plantas experimentales (ProINTA Oasis).

En la tabla 12, se muestran los resultados de las densitometrias de geles de poliacrilamida, realizados para el análisis de semillas de plantas homocigotas para el transgén 1Ax1, de 3 generaciones (T2, T3 y T4). Con la introducción de copias extras de la subunidad 1Ax1, se logró incrementar la misma de 1,6% a 2,3% (un 44% por encima de los valores hallados en las semillas controles). Sin embargo, este aumento se acompañó de una disminución significativa de las subunidades 1Bx7 y 1By9, en un 50 y 40%, respectivamente (tabla 12). Es importante destacar que el aumento de 1Dx5 y 1Dy10, observado en las semillas transgénicas de la figura 28 (calles 1-11), es sólo aparente, y se debe a la presencia de una mayor cantidad de extracto proteico, por calle, que en los controles. Esto puede deducirse del hecho de que los valores densitométricos hallados para 1Dx5 y 1Dy10 (tabla 12), no difieren de los encontrados para los controles.

Nº de semillas	SG-APM/ P.T.(%)	1AX1/ P.T.(%)	1DX5/ P.T.(%)	1Bx7/ P.T.(%)	1By9/ P.T.(%)	1Dy10/ P.T.(%)
Controles (20)	11.5 ± 0.12	1.6 ± 0.05	2.0 ± 0.05	3.0 ± 0.07	2.0 ± 0.05	2.9 ± 0.07
T2 (12)	10.5 ± 0.37	2.0 ± 0.10	2.2 ± 0.07	2.0 ± 0.05	1.4 ± 0.18	2.9 ± 0.12
T3 (12)	9.6 ± 0.10	2.2 ± 0.09	2.1 ± 0.08	1.4 ± 0.03	1.1 ± 0.03	2.8 ± 0.05
T4 (12)	9.7 ± 0.12	2.3 ± 0.09	2.0 ± 0.07	1.5 ± 0.08	1.2 ± 0.07	2.8 ± 0.07

**Tabla 12:** Análisis densitométricos de geles de poliacrilamida. Los valores entre paréntesis indican el número de semillas analizadas. T2, T3 y T4 se refieren a la primera, segunda y tercera generación de semillas transgénicas, respectivamente. P.T.: total de proteínas extraíbles. SG-APM: subunidades de glutenina de alto peso molecular. Los números en azul indican valores disminuidos, y los números en rojo, valores aumentados con respecto a los controles. Los valores de la segunda a la séptima columna son el promedio ± error estándar de las medidas realizadas.

Se esperaba que la sobreexpresión de la subunidad 1Ax1, por introducción de copias extras del gen por transformación, llevase a un incremento del total de SG-APM con respecto al total de proteínas. Sin embargo, disminuye de un 11,5 a un 9,7%, o sea, un 16% con respecto a los valores hallados en semillas de plantas controles (tabla 12). Como se aprecia claramente en el gráfico de la figura 31, esto se debe a que el incremento en la expresión de la subunidad 1Ax1, logrado por la introducción de copias extras del gen, es menor (en valor absoluto) que la disminución de la expresión de las subunidades 1Bx7 y 1By9. Como consecuencia de ello, se produce un descenso en el contenido total de SG-APM de las semillas transgénicas, con respecto a los valores de los controles.

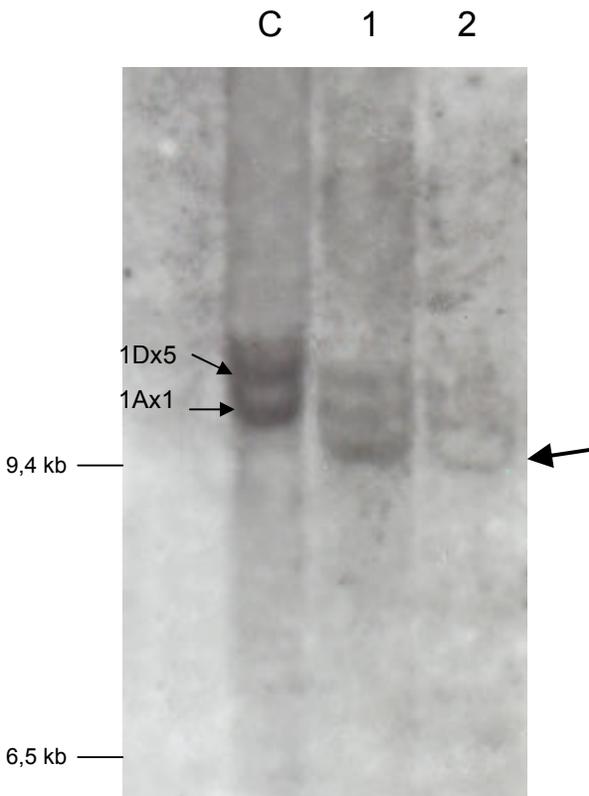


**Figura 31:** Comparación del contenido total de SG-APM con respecto a las proteínas totales de endosperma (en %), entre semillas controles y semillas homocigotas, del evento C. Cada color representa el aporte de una SG-APM diferente al total de SG-APM (con referencia a valores de la tabla 12).

### Análisis por hibridización Southern

Al realizar el análisis, por hibridización Southern, del ADN de plantas T4 del evento C, se halló una banda de hibridización extra al patrón dado por los

genes endógenos, de 9,6 kb (indicada por una flecha grande en la figura 32). De esta forma fue posible confirmar la transformación de este evento con el gen 1Ax1. El ADN fue digerido con la enzima *Bam*HI que linealiza los plásmidos pHMW1Ax1 y pHMW1Dx5, pero no descuelga ni corta los genes 1Ax1 y 1Dx5 contenidos en dichos plásmidos. El patrón de bandas endógenas, para una variedad con la composición de SG-APM de ProINTA Oasis, era previamente conocido gracias a los trabajos de Harberd y col. (136). Estos autores analizaron diferentes mutantes, para las distintas SG-APM, por hibridización Southern, mediante las cuales pudieron asignar cada banda hallada, a un gen endógeno particular. Así fue posible identificar a las bandas de 11,5 y 10 kb como correspondientes a las subunidades 1Dx5 y 1Ax1, respectivamente. Para lograr una mejor resolución de las bandas de alto peso molecular, se dejaron caer los fragmentos menores de 3 kb, razón por la cual, no es posible visualizar las bandas correspondientes a los demás genes endógenos de las SG-APM.



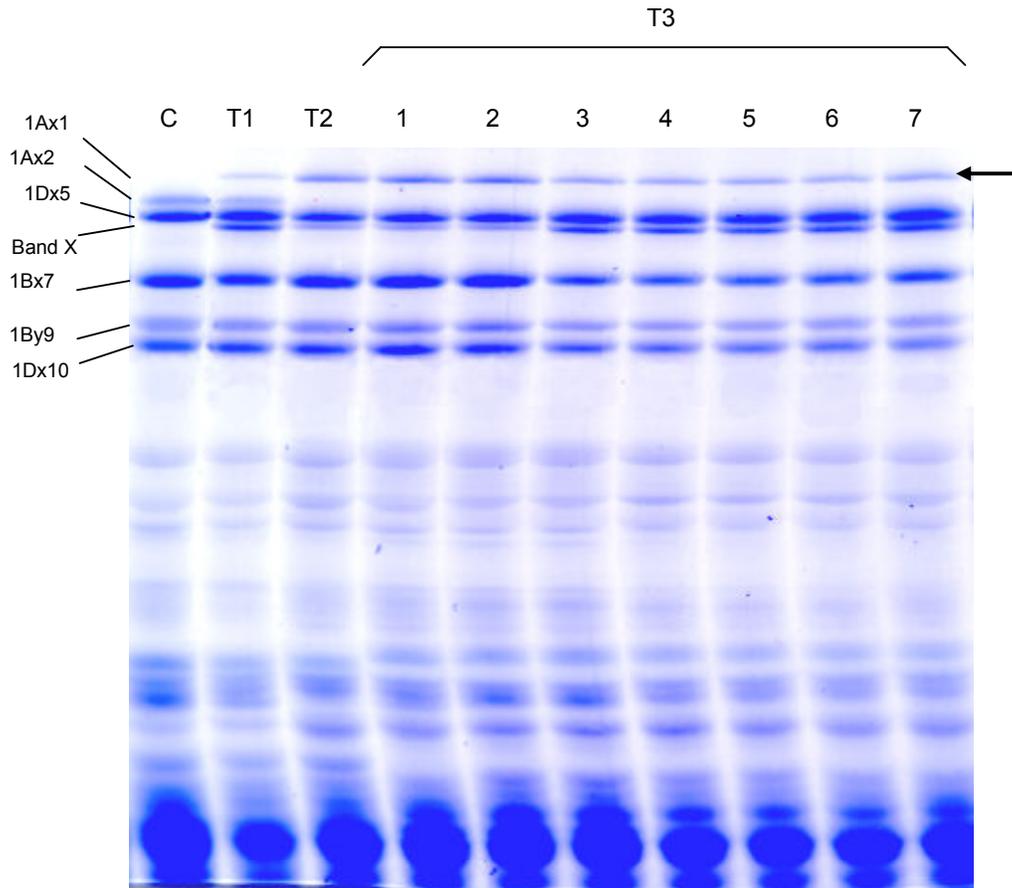
**Figura 32:** Hibridización Southern, de ADN genómico, de plantas de trigo. C: ADN de planta control. 1y 2: ADN de plantas T4 del evento C. Las flechas pequeñas indican la hibridización cruzada, de la sonda 1Ax1, con los genes de SG-APM endógenas. La flecha grande señala la banda de hibridización correspondiente al transgén 1Ax1. El ADN fue digerido con la enzima *Bam*HI. Se utilizó el método no radioactivo para la marcación y detección de la sonda.

### 2.1.3. EXPRESIÓN DEL TRANSGEN DE LA SUBUNIDAD 1AX1

Mediante la transformación de la variedad comercial ProINTA Federal con el gen 1Ax1, se logró incrementar el número de subunidades de glutenina de APM, de cinco a seis.

#### **Evento D**

En la figura 33, se muestra un gel de poliácridamida, de los extractos proteicos de semillas T1, T2 y T3, de un nuevo evento de transformación con el transgén 1Ax1, al que llamamos D (tabla 10).

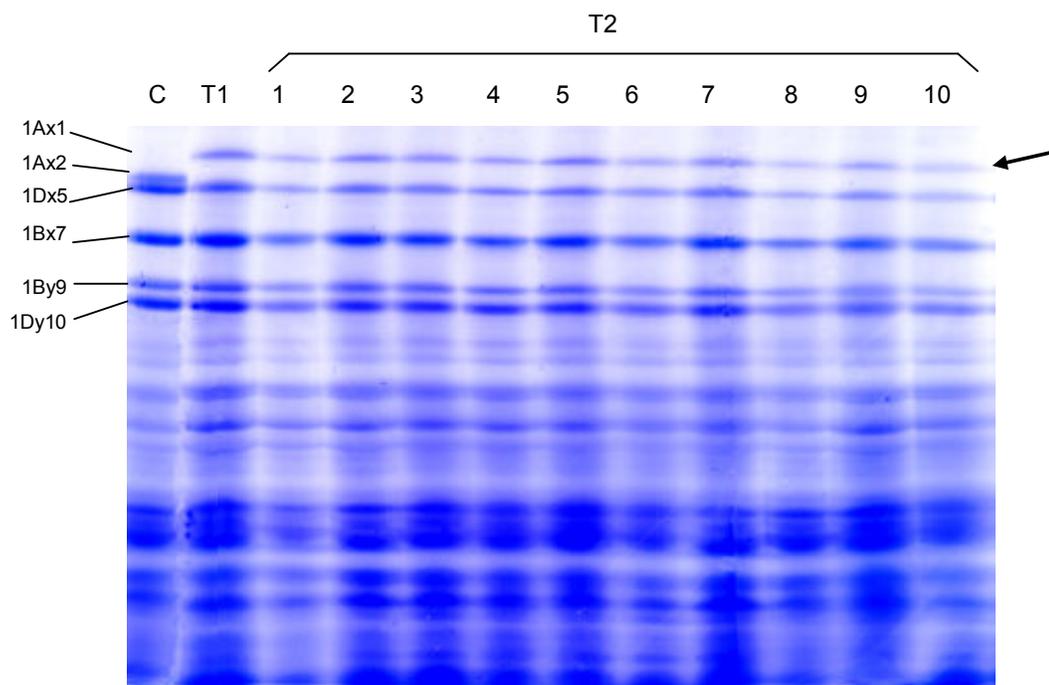


**Figura 33:** Gel de poliácridamida, de proteínas totales de endosperma, de semillas del evento D. C: semilla control de planta sin transformar. T1, T2 y T3 semillas de la primera, la segunda y la tercera generación de plantas transgénicas, respectivamente. T2 y T3 son semillas de plantas homocigotas. La flecha indica el producto del transgén 1Ax1 introducido.

Del análisis de la figura 33, surgen dos observaciones importantes. En primer lugar, la presencia de otra banda extra (además de la correspondiente al transgén 1Ax1), a la que se le llamó “ X”. Esta banda tiene una movilidad ligeramente mayor que la subunidad 1Dx5 y pudo comprobarse que no es un artefacto por falta de agente reductor. Además, presentó una segregación mendeliana en la descendencia, independiente del gen 1Ax1. En segundo lugar, se observa que la subunidad 1Ax2\* se silencia completamente en las semillas de plantas homocigotas para el transgén 1Ax1(semillas T2 y T3, figura 33). Este fenómeno es similar al “silenciamiento génico dependiente de homología” mediante el cual, la introducción de un transgén con un alto grado de homología a un gen endógeno, puede inducir el silenciamiento de este último (ver sección “Discusión de resultados”).

### **Evento E**

En la figura 34, se muestra un gel de poliacrilamida de proteínas totales de semillas, de otro evento de transformación independiente, con el transgén 1Ax1, al que llamamos E (tabla 10). Se observa que, tanto la semilla T1 como las 10 semillas T2 presentan, una fuerte expresión del transgén 1Ax1 se acompaña del silenciamiento total de la subunidad endógena 1Ax2\*, un fenómeno semejante al hallado en el evento D. La flecha indica el producto del transgén introducido (1Ax1).



**Figura 34:** Gel de poliacrilamida, de proteínas totales de endosperma, de semillas del evento E. C: semilla de planta control, no transformada. T1 y T2: semillas de la primera y la segunda generación de plantas transgénicas. La flecha indica el producto del transgén introducido.

En la tabla 13, se muestran los resultados del análisis densitométrico de geles de poliacrilamida de proteínas totales, de semillas de diferentes generaciones, de los eventos D y E.

En las semillas homocigotas del evento D, tanto el transgén 1Ax1 como la banda X, alcanzan un nivel de expresión alto, de 1.8 y 1.5%, respectivamente, comparable al de la subunidad endógena 1Dx5 (D T3, tabla 13). Sin embargo, en dichas semillas, la expresión del transgén 1Ax1 se acompaña de un silenciamiento total de la subunidad endógena 1Ax2\*. Esto no sucedió en las semillas de esta misma familia que sólo expresaron la banda X, como se deduce claramente de la figura 36.

Nº	SG-APM/	1Ax1/	1Ax2*/	1Dx5/	X/	1Bx7/	1By9/	1Dy10/
Semillas	P.T. (%)	P.T.(%)	P.T. (%)	P.T. (%)	P.T.(%)	P.T. (%)	P.T.(%)	P.T.(%)
Control(25)	11 ± 0.19	0.0 ±0.0	1.2±0.06	2.0±0.05	—	2.9±0.05	2.0±0.05	2.8±0.05
D T1 (1)	12.3	1.4	1	1.8	1.4	2.3	2.2	2.2
D T2 (1)	12.1	1.6	0	1.8	1.4	2.5	1.8	3.0
D T3 (13)	12.6±0.23	1.8±0.05	0.0±0.0	1.7±0.07	1.5±0.06	2.8±0.08	1.8±0.06	2.9±0.06
E T1 (1)	12.7±0.29	1.9±0.19	0.0±0.0	2.4±0.04	—	3.3±0.07	2.0±0.03	2.9±0.01
E T2 (24)	13.3±0.24	2.0±0.05	0.0±0.0	2.5±0.06	—	3.3±0.09	2.3±0.05	3.2±0.08

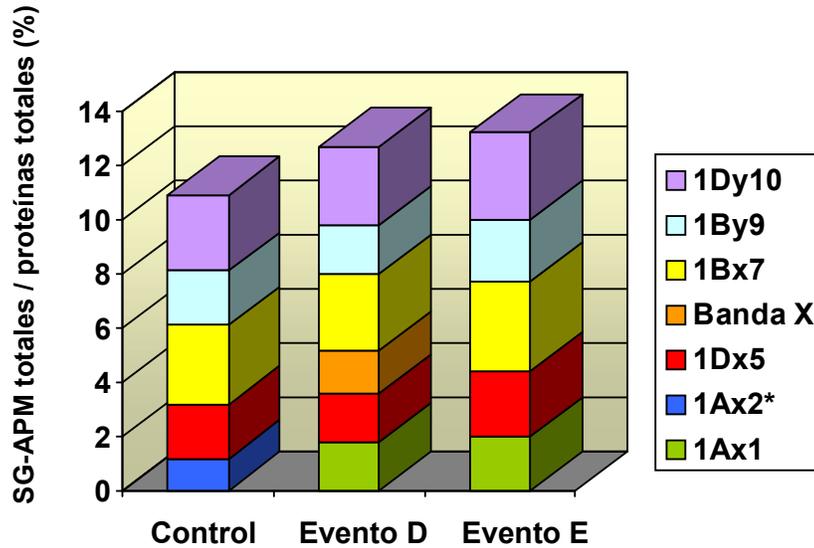
**Tabla 13: Análisis densitométricos de geles de poliacrilamida de los eventos D y E.**

D T1, D T2 y D T3: semillas de la primera, la segunda y la tercera generación del evento D, respectivamente. E T1 y E T2: semillas de la primera y la segunda generación del evento E, respectivamente. Los números entre paréntesis indican números de semillas. Los valores de la segunda a la novena columna corresponden al promedio ± error estándar de las medidas realizadas. Los números en rojo indican valores aumentados con respecto a los controles. Los números en azul muestran valores disminuidos con respecto a los controles. SG-APM: subunidades de glutenina de alto peso molecular. P.T.: proteínas totales.

En las semillas del evento E, la expresión del transgén 1Ax1 es del 2% del total de proteínas extraíbles de endosperma, y se halla asociada al silenciamiento total de la subunidad endógena 1Ax2\*, en todas las semillas transgénicas analizadas (tabla 13).

En el gráfico de la figura 35, se representa el efecto de la expresión de los transgenes sobre el contenido total de subunidades de glutenina de APM. En el evento D, a pesar del silenciamiento de la subunidad endógena 1Ax2\*, la expresión del transgén 1Ax1 y de la banda X producen un incremento del 14%,

del total de SG-APM con respecto a los valores controles. En el evento E, el aumento del total de SG-APM es del 21%, con respecto a los controles.



**Figura 35:** Comparación del porcentaje de SG-APM totales, con respecto a las proteínas totales de endosperma, entre semillas controles y semillas homocigotas de los eventos D y E. Cada color representa el aporte de cada SG-APM al total de SG-APM (con referencia a valores de la tabla 13).

En ambos eventos, la expresión de los transgenes afecta sólo a la subunidad 1Ax2\*, no registrándose cambios importantes de las demás SG-APM endógenas (figura 35).

### **Análisis de la segregación de los transgenes en la descendencia**

#### **Evento D**

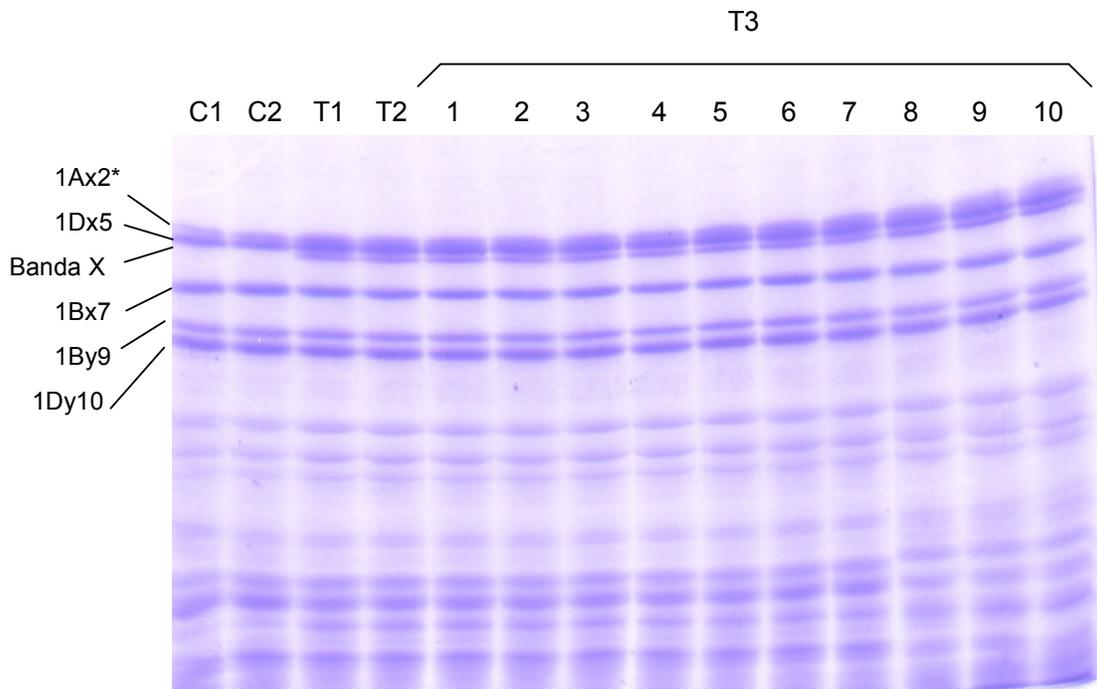
Se analizaron 128 semillas T1 del evento D, y las que resultaron positivas fueron sembradas para estudiar la segregación de los transgenes en las dos generaciones siguientes (T2 y T3), y para la obtención de plantas homocigotas para los transgenes. Es así como se hallaron 8 plantas T2 homocigotas para los transgenes. Es así como se hallaron 8 plantas T2 homocigotas para 1Ax1; una para banda "X" (el análisis de 10 de sus semillas T3 se muestra en la figura 36), y dos para 1Ax1 y banda "X" (figura 33). Además se

confirmó que la segregación de los transgenes es mendeliana (25% de semillas negativas y 75% de positivas para el transgén 1Ax1 y/o la banda "X").

### **Evento E**

Se sembró la única semilla T1, positiva para 1Ax1, de este evento, y se obtuvo una planta fértil que dio 23 semillas T2. Estas semillas fueron sembradas en su totalidad y se obtuvieron plantas fértiles que dieron 329 semillas T3. Mediante el análisis de un 5% de dichas semillas, por electroforesis en geles de poliacrilamida, pudo comprobarse la estabilidad del transgén introducido.

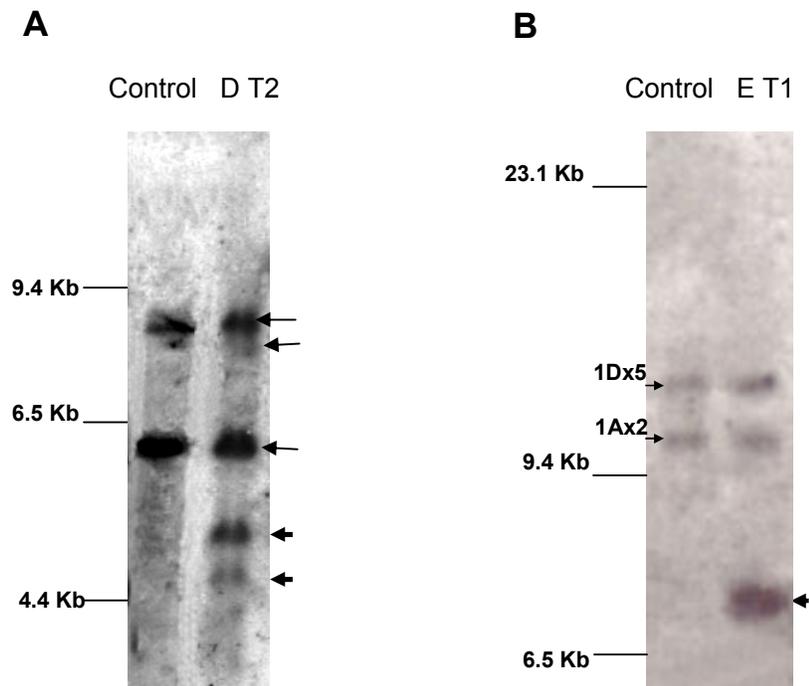
En la figura 36 se muestra un gel de poliacrilamida de proteínas totales, de semillas de 3 generaciones (T1, T2 y T3), del evento D. Las 10 semillas T3 proceden de la única planta T2 que resultó ser homocigota para la banda "X".



**Figura 36:** Gel de poliacrilamida de proteínas totales de endosperma, de semillas del evento D. C1 y C2: extractos de semillas de una planta control sin transformar. T1, T2 y T3: primera, segunda y tercera generación de semillas del evento D. Las semillas T3 proceden de una planta homocigota para la banda X.

### Análisis por hibridización Southern de los eventos D y E

Mediante el análisis, por hibridización Southern, de ADN de plantas de los eventos D y E, fue posible, en ambos casos, confirmar la transformación con el transgén 1Ax1, así como también, determinar el número de copias introducidas. En la figura 37 A se observan dos bandas extras al patrón que dan las SG-APM endógenas, de 4.5 y 4.9 kb, pertenecientes a dos sitios de inserción diferentes (probablemente uno corresponde al transgén 1Ax1 y, el otro, al que codifica para la banda "X") (calle D T2). En la figura 37 B, calle E T1 (ADN de una planta transgénica T1, del evento E), se observa la presencia de una banda extra, de 7.4 kb, correspondiente al transgén 1Ax1 introducido. Tanto en el evento D como en el E, el número de copias de los transgenes, determinado por densitometría de las autorradiografías, es bajo (de, aproximadamente, 3).



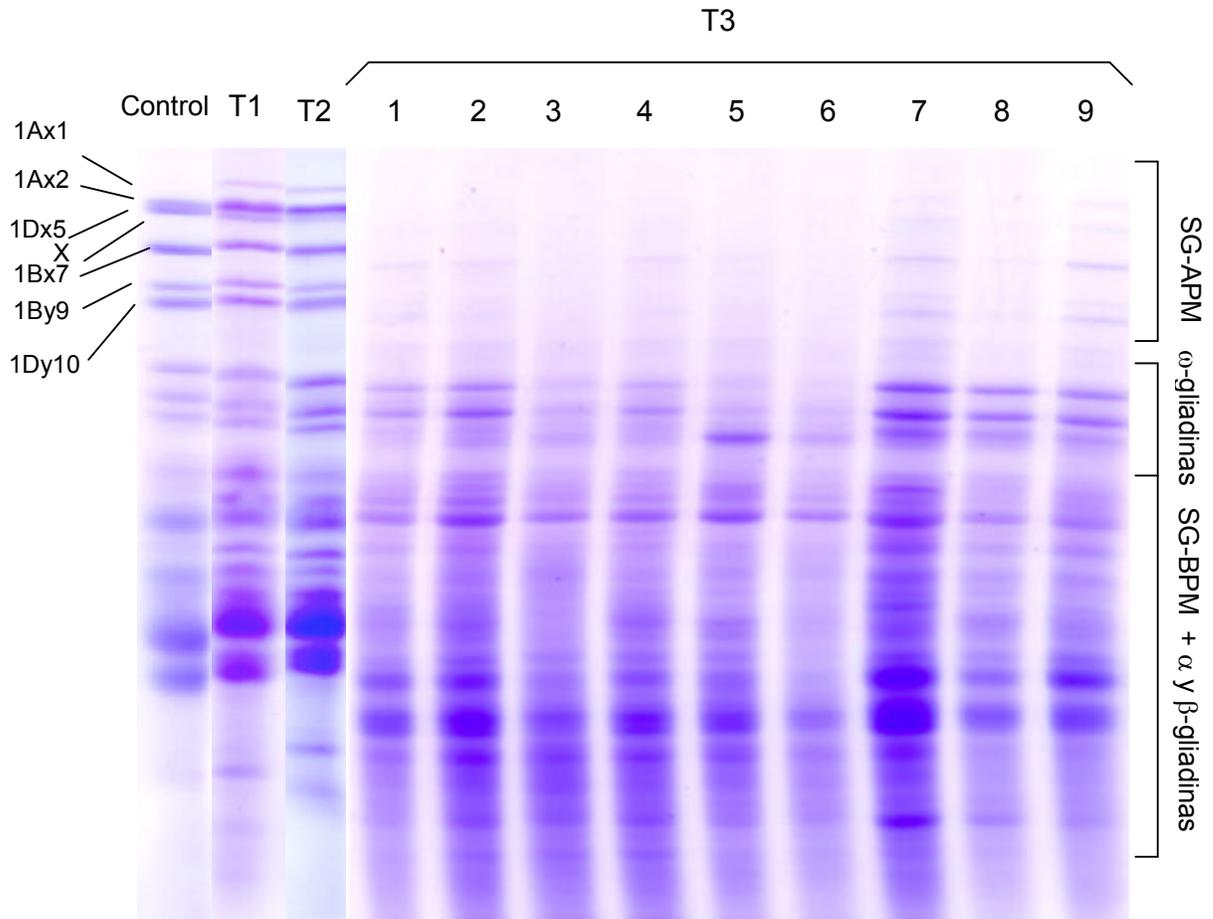
**Figura 37: Autorradiografías de hibridaciones Southern de plantas transgénicas de los eventos D y E.** Las flechas pequeñas indican las bandas correspondientes a los genes endógenos de SG-APM. Las cabezas de flecha grandes señalan las bandas correspondientes a los transgenes introducidos. A) D T2: ADN de una planta de la segunda generación (T2) del evento D, digerido con *EcoRV*. B) E T1: ADN de una planta de la primera generación (T1) del evento E, digerido con *BamHI*.

### **2.1.3. Expresión de transgenes asociado al silenciamiento génico de todas las SG- APM endógenas**

En algunos eventos, la expresión de los transgenes 1Ax1 y/o 1Dx5 estuvo asociado al silenciamiento de los genes que codifican para las SG-APM endógenas. Cómo ya se mencionó (para el caso de la disminución en la expresión de la subunidad endógena 1Ax2\*), y se tratará en la sección "Discusión de resultados", este fenómeno es similar al que se conoce como "silenciamiento génico homología dependiente". La introducción de transgenes con un alto grado de homología con genes endógenos y en un número de copias elevado, son los dos factores más importantes asociados al silenciamiento génico inducido por transgenes.

#### **Evento D**

En el evento D, que ya fue descrito, se halló una única planta T2 (procedente de una semilla que expresaba 1Ax1 y banda "X") cuyas semillas T3 presentaron una expresión totalmente anómala, no sólo de las SG-APM endógenas que se hallan casi totalmente silenciadas, sino también del patrón de gliadinas. En la figura 38 se muestra un gel de poliacrilamida de los extractos proteicos de semillas de las tres generaciones de la misma familia, en el que se observa claramente que, mientras las semillas T1 y T2 mostraron un patrón de expresión similar (con una expresión normal de los genes de SG-APM endógenos, excepto de 1Ax2\*), se produjo un cambio inesperado del patrón de expresión de proteínas al pasar a la tercera generación (semillas T3).

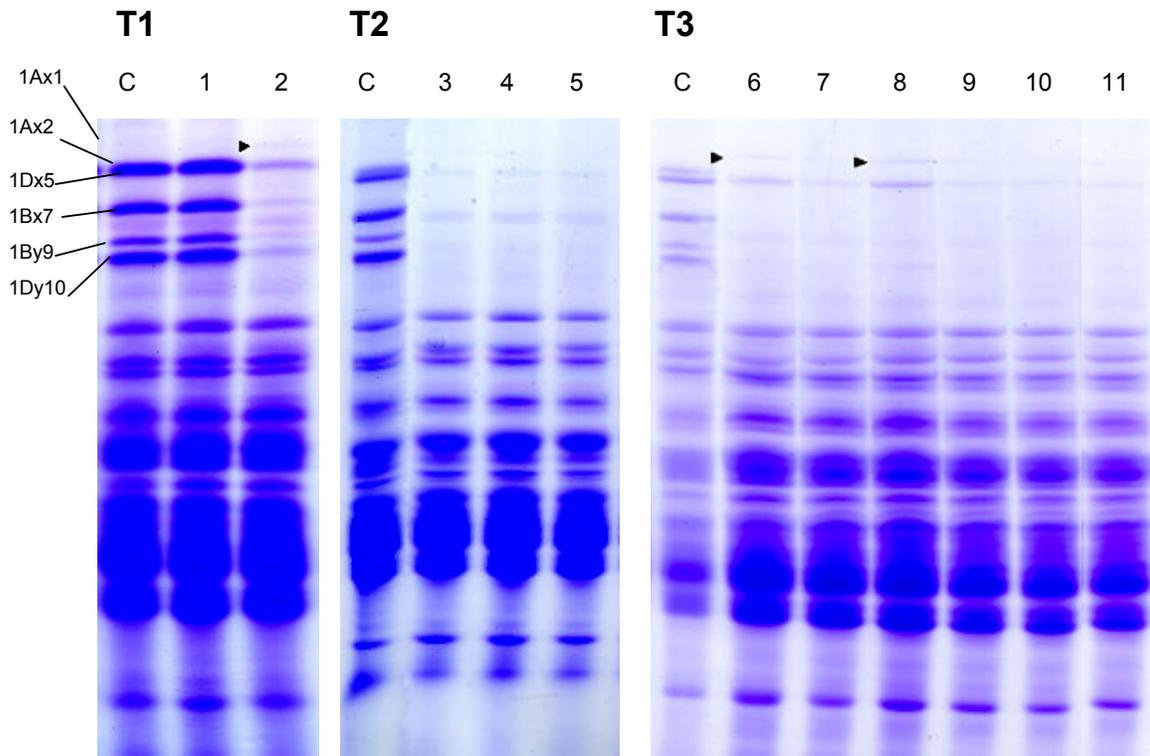


**Figura 38:** Gel de poliacrilamida, de proteínas totales de endosperma, de semillas del evento D. T1, T2 y T3: primera, segunda y tercera generación. SG-APM: subunidades de glutenina de alto peso molecular. SG-BPM: subunidades de glutenina de bajo peso molecular.

### **Evento F**

Se halló un nuevo evento transgénico, al que llamamos F (tabla 10), en el que una débil expresión de los transgenes 1Ax1 y 1Dx5, se acompañó de un silenciamiento casi total de los genes de SG-APM endógenos. En la figura 39 se muestran tres gels de poliacrilamida realizados para el análisis de los extractos proteicos de semillas de la primera, segunda y tercera generación de este evento, paneles T1, T2 y T3, respectivamente. Las calles 1 y 2 (panel T1) corresponden a extractos proteicos de 2 de las 5 semillas T1 que se obtuvieron. Una es negativa

(calle1), con un patrón normal de expresión de las SG-APM endógenas, y la otra es positiva (calle 2), presentando una débil expresión de la subunidad transgénica 1Ax1 y una notable disminución en la expresión de las SG-APM endógenas. Este hecho estaría indicando la estrecha asociación entre la presencia del transgén y el silenciamiento de los genes de las SG-APM endógenas. La expresión de 1Dx5 parece estar menos silenciada que la de las demás subunidades, pero esto se debe a que este evento está transformado también con 1Dx5, por lo que se supone que es el transgén el que se está expresando. En los paneles T2 y T3, donde se muestra el análisis de las semillas T2 y T3, respectivamente, se observa, claramente, como se acentuó el silenciamiento de los genes de SG-APM endógenos en la segunda y tercera generación.



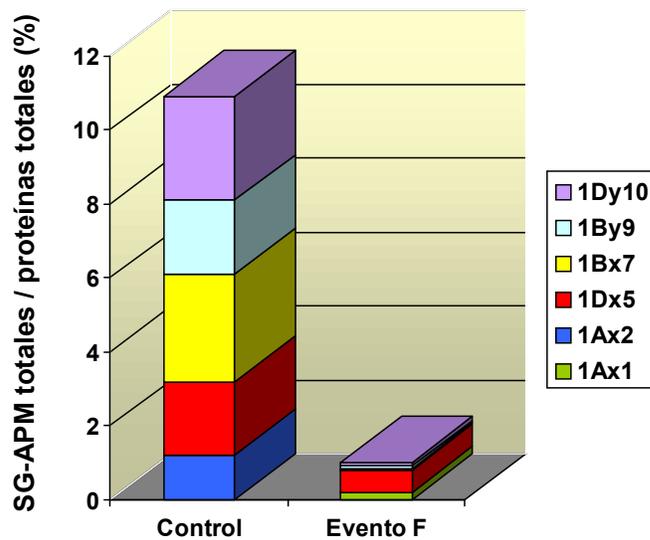
**Figura 39:** Geles de poliacrilamida, de proteínas totales de endosperma, de semillas del evento F. Las puntas de flechas indican la expresión débil de los transgenes. T1, T2 y T3: primera, segunda y tercera generación, respectivamente. C: semillas de plantas controles (sin tratamiento).

En la tabla 14 se muestra el análisis densitométrico de los geles de poliacrilamida, de los extractos de proteínas de endosperma, de semillas del evento F. La expresión del transgén 1Ax1 es baja, de sólo 0.2% del contenido total de proteínas. Mientras que los niveles de expresión de las subunidades endógenas, en las semillas T3, están todos por debajo del 0.1% del total de proteínas (o sea, de 0 a 5% del valor alcanzado por los controles), la expresión de la subunidad 1Dx5 es del 0.6% del total de proteínas, lo que representa el 30% del valor promedio hallado en los controles. El hecho de que la expresión de la subunidad 1Dx5 no haya disminuido en el mismo grado que las demás SG-APM endógenas estaría indicando que este evento ha sido transformado, también, con el transgén 1Dx5, que se estaría expresando débilmente, al igual que el transgén 1Ax1.

Nº de semillas	SG-APM/ P.T.(%)	1Ax1/ P.T.(%)	1Ax2*/ P.T. (%)	1Dx5/ P.T. (%)	1Bx7/ P.T. (%)	1By9/ P.T. (%)	1Dy10/ P.T. (%)
Control (25)	11.0 ± 0.19	0.0 ± 0.0	1.2 ± 0.06	2.0 ± 0.05	2.9 ± 0.07	2.0 ± 0.05	2.8 ± 0.05
F T1 (1)	4.0 ± 0.12	0.5 ± 0.03	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.03	0.9 ± 0.06	0.6 ± 0.05	1.1 ± 0.4
F T2 (13)	1.0 ± 0.12	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.08	0.6 ± 0.05	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
F T3 (27)	1.0 ± 0.17	0.2 ± 0.04	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.05	0.05 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.1 ± 0.05

**Tabla 14:** Análisis densitométricos de geles de poliacrilamida de proteínas totales de endosperma del evento F. F T1, F T2 y F T3: semillas de la primera, segunda y tercera generación del evento F, respectivamente. Los números entre paréntesis indican el número de semillas analizadas en cada caso. Los valores de la segunda a la octava columna son los promedios ± error estándar de las medidas realizadas. SG-APM: subunidades de gluteninas de alto peso molecular totales. P.T.: proteínas totales. Números en rojo, valores aumentados con respecto a los controles y, números en azul, valores por debajo del promedio de los hallados para los controles.

En el gráfico de la figura 40, es posible comparar el contenido total de las SG-APM, entre semillas controles y semillas T3, del evento F. En estas últimas, a pesar de la expresión de los transgenes (aunque en forma débil), el contenido total de SG-APM disminuye de 11% a 1% (o sea, cae un 91% con respecto al valor promedio hallado en los controles), debido al silenciamiento de los genes de SG-APM endógenos.

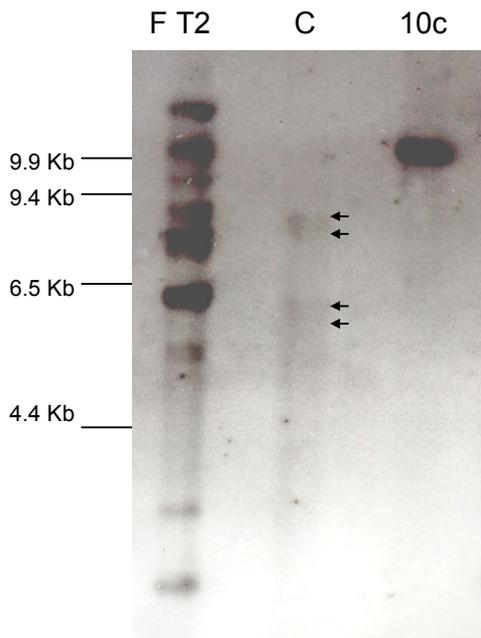


**Figura 40:** Comparación del porcentaje de SG-APM totales con respecto a las proteínas totales de endosperma, entre semillas controles y semillas homocigotas del evento F. Cada color representa el aporte de cada SG-APM al total de SG-APM (con referencia a valores de la tabla 14).

### Análisis por hibridización Southern

Se realizó el análisis, por hibridización Southern, del ADN de una planta del evento F. En la autorradiografía, que se muestra en la figura 41, es posible observar, en la calle F T2 (conteniendo el ADN, digerido con *EcoRV*, de una planta T2, del evento F), la existencia de múltiples sitios de inserción y un alto número de copias de los transgenes introducidos. Se distinguen, al menos, 9

bandas extras (al patrón de bandas que dan los genes de SG-APM endógenas), de los siguientes pesos moleculares: 11.6 kb, 10.2 kb, 9.0 kb, 7.3 kb, 5.9 kb (fuerte), 4.9 kb, 2.95 kb y 2.1 kb. Según el análisis densitométrico de la autorradiografía, pudo determinarse la existencia de, aproximadamente, 30 copias de los transgenes.

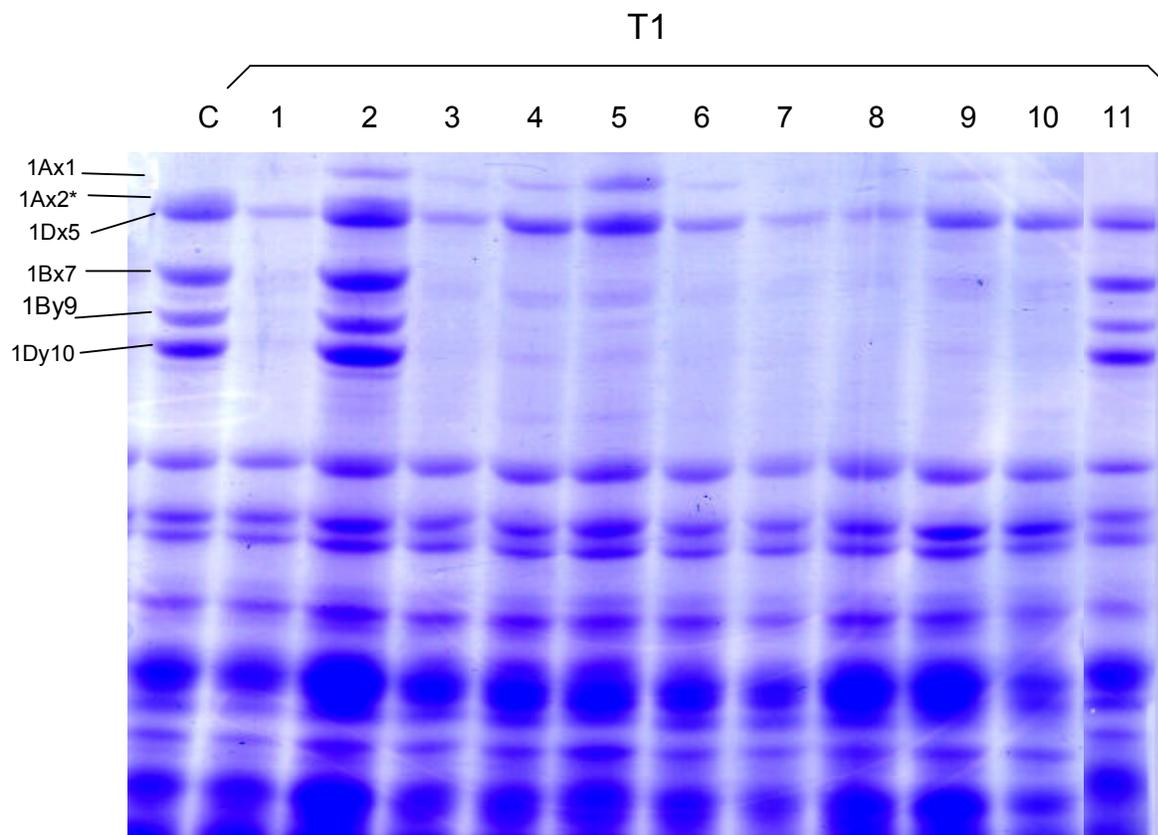


**Figura 41:** Hibridización Southern del evento F. F T2: ADN de una planta de la segunda generación (T2) del evento F. C: planta control sin transformar. 10C : 10 copias. Las flechas indican las bandas correspondientes a los genes endógenos. El ADN fue digerido con *EcoRV* que linealiza los plásmidos pHMW1Ax1 y pHMW1Dx5, sin cortar ni descolgar los genes.

### **Evento G**

En otro experimento de transformación, se halló un nuevo evento, al que llamamos G (tabla 10). En la figura 42 se muestra un gel de poliacrilamida de las proteínas totales de endosperma de 11 semillas T1 procedentes de la misma madre T0. Se hallaron 97 semillas (de un total de 103 analizadas), con una expresión fuerte de los transgenes 1Ax1 y 1Dx5 acompañada por un silenciamiento total de las SG-APM endógenas (figura 42, calle 1, 3-10), 5 fueron

negativas para los transgenes, con un patrón normal de expresión de las SG-APM endógenas (figura 42, calle 11) y, sólo 1 semilla, expresó el transgén 1Ax1 con un patrón normal de las subunidades de glutenina de APM endógenas (figura 42, calle 2).

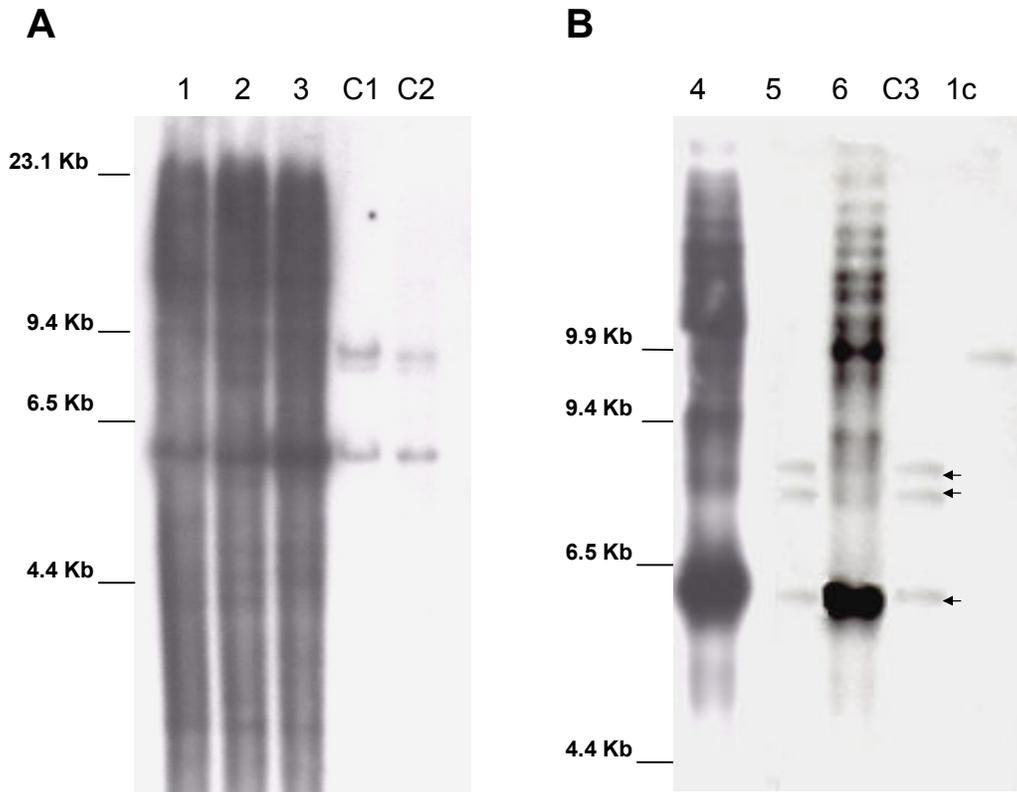


**Figura 42:** Diferentes patrones de expresión de SG-APM, en semillas T1, del evento G. Gel de poliacrilamida, de proteínas totales de endosperma, de semillas T1 (primera generación). C: semilla de planta control sin transformar de la misma variedad que las transgénicas (ProINTA Federal).

### **Análisis por hibridización Southern de plantas T1 del evento G**

Las semillas T1 que presentaron una fuerte expresión de los transgenes introducidos (SG-APM 1Ax1 y 1Dx5), llamadas “T1 silenciadas”, fueron sembradas, y el ADN de las plantas obtenidas fue analizado por

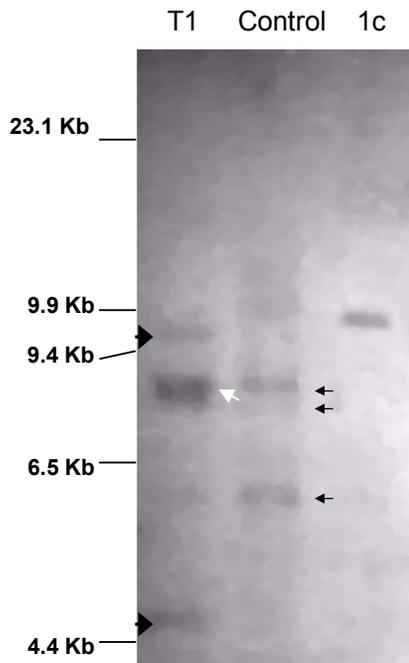
hibridización Southern con el objeto de confirmar la transformación con los transgenes y determinar el número de copias introducidas. En las autorradiografías de las hibridaciones Southern de la figura 43, se muestran dos patrones de bandas diferentes, hallados en distintas plantas T1 silenciadas hermanas (procedentes de las semillas analizadas en la figura 42, calles 3, 4, 5, 9 y 10). De la comparación de los patrones de bandas de las calles 1, 2 y 3 del panel A, con los de las calles 4 y 6 del panel B, surgen claras diferencias en el número de sitios de inserción y, también, en el número de copias de los transgenes introducidos. Esto estaría indicando la segregación, en la progenie, de las múltiples copias introducidas.



**Figura 43:** Autorradiografías de hibridaciones Southern, de ADN genómico, de plantas T1 del evento G. La digestión se llevó a cabo con la enzima *EcoRV*. C1, C2 y C3: plantas controles sin transformar. Las flechas pequeñas indican las bandas de hibridación cruzada de la sonda con los genes endógenos. Panel A: plantas T1 silenciadas (calles 1-3). Panel B: planta T1 negativa (calle 5) y plantas T1 silenciadas (calles 4 y 6).

En el ADN de 3 de las plantas T1 silenciadas (figura 43, panel A, calles 1, 2 y 3) es posible identificar, al menos, 20 bandas extras al patrón endógeno, de pesos moleculares entre 3 y 18 kb. Las más intensas son de: 17.9 kb; 15.8 kb; 11.1 kb; 8.9 kb; 5.9 kb (muy fuerte) y 3.0 kb. El número de copias, estimado por densitometría, fue de 50, aproximadamente. Por otro lado, en el ADN de otras dos plantas T1 silenciadas (figura 43, panel B, calles 4 y 6) se observan, al menos, 15 bandas extras de pesos moleculares entre 15 y 4 kb, siendo las más intensas de 9.7 y 5.9 kb (muy fuerte). El número de copias estimado es de 40. En la calle 5 (figura 43), se encuentra el ADN digerido de una planta T1, negativa para los transgenes, en la que, como era de esperar, sólo se observa el patrón de bandas correspondientes a las SG-APM endógenas (al igual que en los controles, calles C1, C2 y C3).

En la figura 44 se muestra la autorradiografía del análisis por hibridación Southern, del ADN de una planta T1, procedente de la única semilla que expresó el transgén 1Ax1, con un patrón normal de expresión de las SG-APM endógenas (figura 42, calle 2).



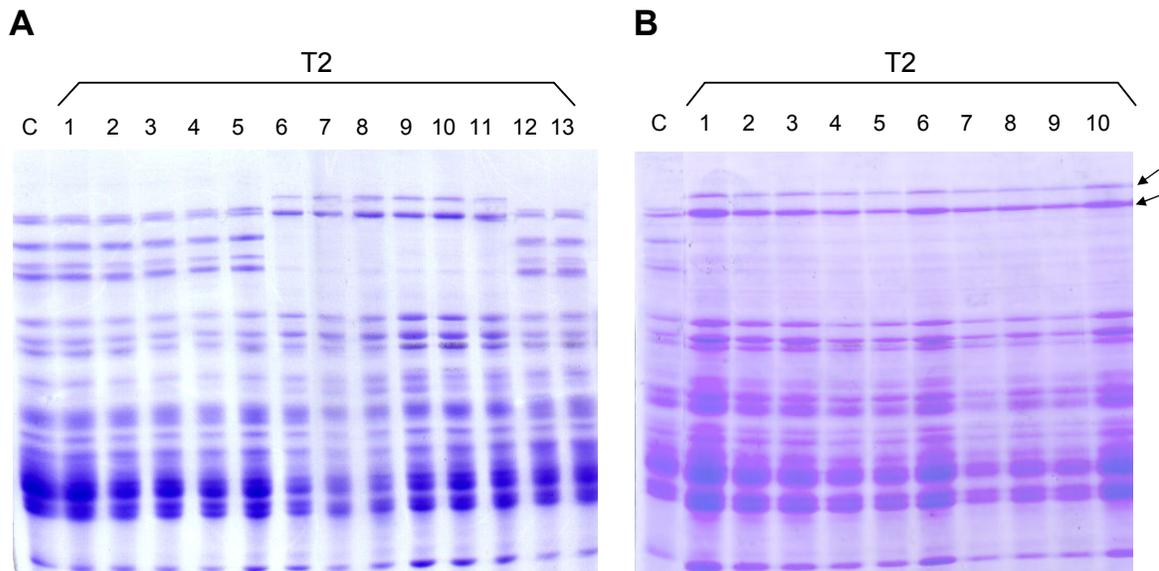
**Figura 44:** Autorradiografía de una hibridación Southern, del ADN de una planta T1, del evento G, (procedente de la única semilla T1 que expresa el transgén 1Ax1 con un patrón normal de expresión de SG-APM endógenas). El ADN fue digerido con la enzima *EcoRV*, que linealiza el plásmido pHMW1Ax1, pero no corta ni descuelga al gen. Las flechas negras pequeñas indican las bandas correspondientes a los genes endógenos. Las puntas de flechas señalan las bandas extras pertenecientes a los transgenes. La flecha blanca indica un aumento de intensidad de una de las bandas endógenas, por superposición con otra copia del transgén. 1c: 1 copia de plásmido pHMW1Ax1.

En la calle T1 (figura 44), las cabezas de flechas señalan dos bandas extras al patrón endógeno, de 9.5 y 4.5 kb, que no se encuentran en el control, y que corresponden a los transgenes introducidos. Además, existe un notable incremento de la banda de 7.6 kb del patrón endógeno (flecha blanca) lo que podría indicar una superposición con otra banda de los transgenes. El número total de copias de los transgenes (estimado por densitometría), es de 3, en claro contraste con el alto número de copias hallado en plantas T1 hermanas (figura 43, paneles A y B, calles 1, 2, 3, 4 y 6), procedentes de semillas en las que los genes que codifican las SG-APM endógenas se hallan silenciados (figura 42, calles 3, 4, 5, 9 y 10). De esta forma, es posible deducir que, el alto número de copias de los transgenes presentes en la planta T0, estaría segregando en la descendencia, dando lugar a plantas T1 que conservan 50 copias (figura 43, panel A, calle 1, 2 y 3), otras con 40 copias (figura 43, panel B, calle 4 y 6) y, una sola, con sólo 3 copias (figura 44, calle T1). En aquellas que mantienen un alto número de copias se conserva el silenciamiento de las SG-APM endógenas, mientras que, en la que perdió gran parte de las copias, el silenciamiento revierte.

### **Análisis de segregación de los transgenes en la descendencia**

Se sembraron 16 semillas T1 que presentaban una fuerte expresión de los transgenes, 1Ax1 y 1Dx5, acompañada de un silenciamiento de las SG-APM endógenas (T1 silenciadas), obteniéndose plantas fértiles en todos los casos. Se analizaron las semillas T2 procedentes de cada una de las 16 plantas T1 silenciadas, y se pudo comprobar que el silenciamiento se conservó en las semillas procedentes de 14 de las 16 plantas analizadas. En la figura 45 se muestran dos de estas familias, una procedente de una planta T1 heterocigota

para los transgenes introducidos (figura 45, panel A), y otra “homocigota” para dichos transgenes (figura 45, panel B). De las 13 semillas T2 de la planta heterocigota, 7 son negativas para los transgenes y, como era de esperar, presentan un patrón normal de expresión de las SG-APM endógenas. Las 5 semillas restantes (calles 6-11, panel A, figura 45), al igual que las 13 semillas de la planta homocigota (calles 1-13, panel B, figura 45), tienen una fuerte expresión de los transgenes 1Ax1 y 1Dx5, acompañada de un silenciamiento total de las SG-APM endógenas.



**Figura 45:** Geles de poliacrilamida de proteínas totales de endosperma.

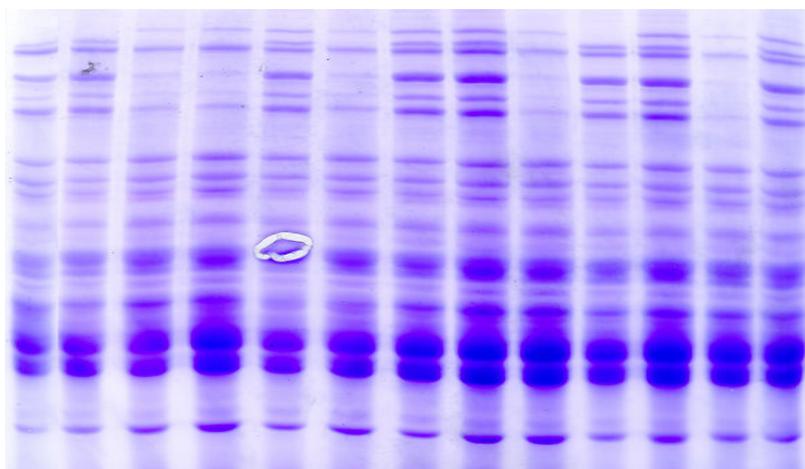
A) Semillas T2 procedentes de una misma T1 silenciada (figura 42, calle3) que resultó ser heterocigota para los transgenes introducidos. B) semillas T2 de una misma planta T1 silenciada (figura 42, calle 5), que es homocigota para los dos transgenes introducidos. C: semilla de una planta control sin transformar. Las flechas indican los productos de expresión de los transgenes introducidos (SG-APM 1Ax1 y 1Dx5).

De las 16 plantas procedentes de semillas T1 silenciadas, hubo 2 cuyas semillas T2 no conservaron el patrón de silenciamiento de las

madres, observándose una reversión del silenciamiento (figura 46, panel A, calles 4, 6, 7, 10 y 12, y panel B, calle 10).

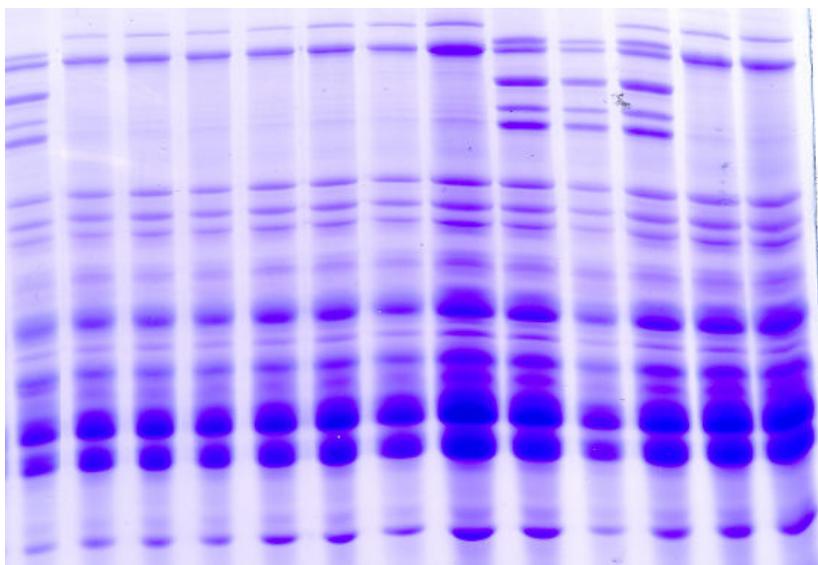
**A**

C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



**B**

C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



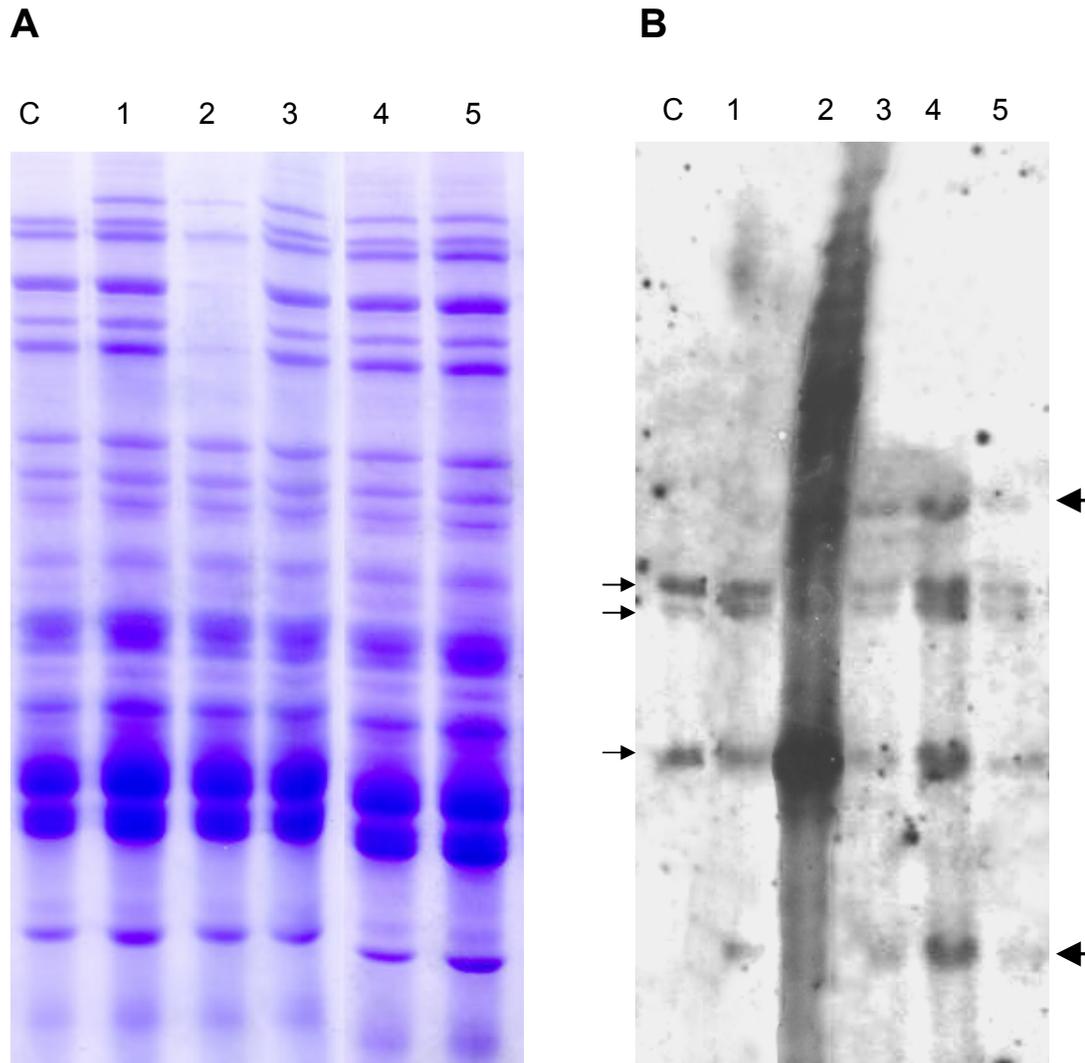
**Figura 46:** Geles de poliacrilamida de proteínas totales de endosperma. Cada gel consiste de 12 semillas T2 procedentes de una misma T1 silenciada (calles 1-12, paneles A y B). C: semillas controles de plantas sin transformar.

El grado de reversión observado en las dos familias es diferente. Mientras que en una sólo se halló reversión del silenciamiento en 1 semilla T2 de 12 (figura 46, panel B, calle 10); en la otra hubo una reversión total del silenciamiento en 5 semillas de 12 (figura 46, panel A, calles 4, 6, 7, 10 y 12), y distinto grado de reversión parcial en otras 5 semillas T2 (figura 46, panel B, calles 2, 3, 5, 8 y 11). Las 2 semillas restantes del panel A (procedentes de la misma planta T1) son negativas para los transgenes y, como es de esperar, la expresión de las SG-APM endógenas es normal.

### **Análisis por hibridización Southern de ADN de plantas T2**

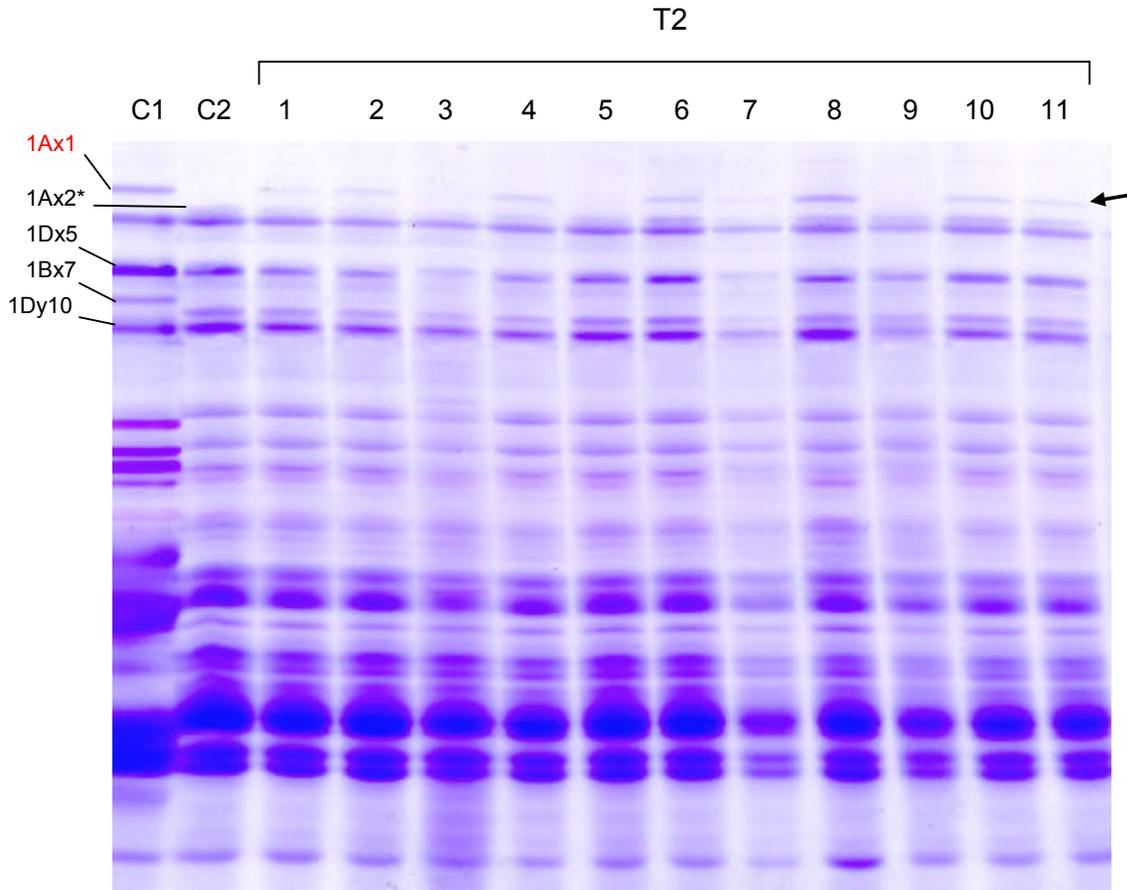
Se observó que cuando una semilla T2 con silenciamiento (figura 47, calle 2, panel A) es sembrada, y se analiza el ADN de la planta obtenida por hibridización Southern, el número de copias sigue siendo muy alto (de, aproximadamente, 40), conservándose el mismo patrón de bandas de la madre (comparar figura 43, panel B, calle 4 con figura 47, panel B, calle 2). Sin embargo, cuando semillas que tuvieron una reversión del silenciamiento (figura 47, panel A, calles 1, 3, 4 y 5) son sembradas, y se analiza el ADN de las plantas resultantes, el número de bandas extras, correspondientes a los transgenes, desciende bruscamente a 2, y los análisis densitométricos indican que el número de copias es de, aproximadamente, 3. De esta forma, es posible confirmar en la segunda generación (T2), el mismo hecho que ya se había observado en la primera generación (T1), y es que, cuando los transgenes segregan en la descendencia, en aquellas hijas que pierden la mayor parte de las copias de los transgenes introducidos, se produce una reversión del fenómeno de silenciamiento de los genes que codifican para las SG-APM endógenas, permitiendo comprobar la

estrecha asociación existente entre la presencia de este fenómeno y un alto número de copias.



**Figura 47: Panel A:** gel de poliacrilamida de 4 semillas T2 con reversión (calles 1, 3, 4 y 5) y una silenciada (calle 2), procedentes de la misma planta T1 silenciada. **Panel B:** Autorradiografía de una hibridización Southern, de ADN genómico, de las plantas T2, procedentes de las mismas semillas T2 analizadas en el panel A (en la misma posición). La digestión se realizó con la enzima *EcoRV*, que no corta ni descuelga los transgenes. Las flechas pequeñas indican las bandas de hibridación cruzada con los genes endógenos. Las puntas de flecha grandes señalan las bandas extras, correspondientes a los transgenes introducidos, en el ADN de las plantas con reversión..

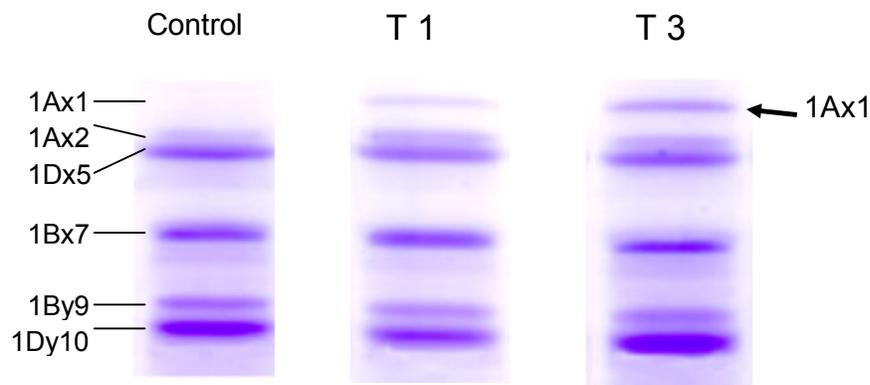
La única semilla T1 de este evento, que expresó el transgén 1Ax1 junto con un patrón normal de expresión de las SG-APM endógenas (figura 42, calle 2), fue sembrada, obteniéndose una planta fértil. En la figura 48 se muestra un gel de poliacrilamida, de los extractos proteicos de 11 semillas T2 procedentes de esta planta, hemicigota para el transgén 1Ax1.



**Figura 48:** Gel de poliacrilamida de proteínas totales de endosperma. Calles 1-11. semillas T2, del evento G, procedentes de una planta T1 hemicigota para el transgén 1Ax1. C2: semilla control, de planta no transformada, de la misma variedad que las transgénicas (ProINTA Federal). C1: semilla control, de planta no transformada, de una variedad diferente que presenta la subunidad 1Ax1 en forma natural (ProINTA Oasis). La flecha indica la nueva subunidad expresada, producto del transgén 1Ax1 introducido.

Para una mejor identificación de la banda correspondiente a la subunidad 1Ax1 (producto del transgén introducido), es mejor contar con un

control positivo, que utilizar marcadores de peso molecular. Esto se debe a que la movilidad electroforética de las subunidades de glutenina de alto peso molecular, en geles de poliacrilamida, es bastante anómala y no siempre guarda relación con sus pesos moleculares, debido a la inusual composición de aminoácidos y a la estructura secundaria, rica en giros- $\beta$ , que tienen dichas subunidades (137). De allí que se haya utilizado la variedad ProINTA Oasis como control positivo de la expresión del gen 1Ax1, ya que dicho cultivar presenta esta subunidad en forma natural. El control negativo es una semilla de una planta sin tratar, de la misma variedad que las transgénicas (ProINTA Federal) (figura 48).



**Figura 49:** Gel de poliacrilamida de proteínas totales de endosperma. T1 y T3, semillas de la primera y la tercera generación. T1 es la única semilla T1 del evento G que expresó el transgén 1Ax1 junto con un patrón normal de expresión de los genes de SG-APM endógenas (ver también figura 42, calle 2).

En la figura 49 se observa una diferente intensidad de la banda correspondiente a la subunidad 1Ax1, entre la semilla T1 y la T3, debido a que la semilla T3 procede de una planta T2 homocigota. En este caso, al duplicarse la dotación génica del transgén, pasando del estado de hemocigota al de homocigota, se duplica también la cantidad de proteína que se expresa. Este

hecho se comprueba claramente, mediante el análisis densitométrico de los geles de poliacrilamida (tabla 15, T1-6b y T3-6b).

### **Análisis densitométricos**

En la tabla 15 se muestran los resultados del análisis densitométrico de los geles de poliacrilamida, de los extractos proteicos, de semillas T1, T2 y T3, con y sin reversión, del evento G.

Semillas	SG-APM/ Prot. tot. (%)	1Ax1/Prot. tot. (%)	1Ax2*/Prot. tot.(%)	1Dx5/Prot. tot.(%)	1Bx7 /Prot. tot.(%)	1By9/Prot. tot.(%)	1Dy10/Prot. tot.(%)
Control	11.0 ± 0.19	0.0 ± 0.0	1.2 ± 0.06	2.0 ± 0.05	2.9 ± 0.07	2.0 ± 0.05	2.8 ± 0.05
T1-6b (1)	12.6 ± 0.2	0.9 ± 0.05	1.1 ± 0.04	2.4 ± 0.04	3.0 ± 0.10	2.2 ± 0.05	3.0 ± 0.05
T1S (97)	3.1 ± 0.09	1.2 ± 0.04	0.0 ± 0.0	1.9 ± 0.05	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T2S (24)	4.0 ± 0.11	1.3 ± 0.04	0.0 ± 0.0	2.8 ± 0.09	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T2R (5)	11.5 ± 0.5	1.0 ± 0.02	1.1 ± 0.04	1.9 ± 0.07	3.0 ± 0.17	1.9 ± 0.11	2.6 ± 0.18
T3-6b (9)	13.3 ± 1.2	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1	2.8 ± 0.3	3.1 ± 0.4	2.1 ± 0.3	3.1 ± 0.3

**Tabla 15: Análisis densitométricos de geles de poliacrilamida, de extractos de proteínas totales, de semillas del evento G.**

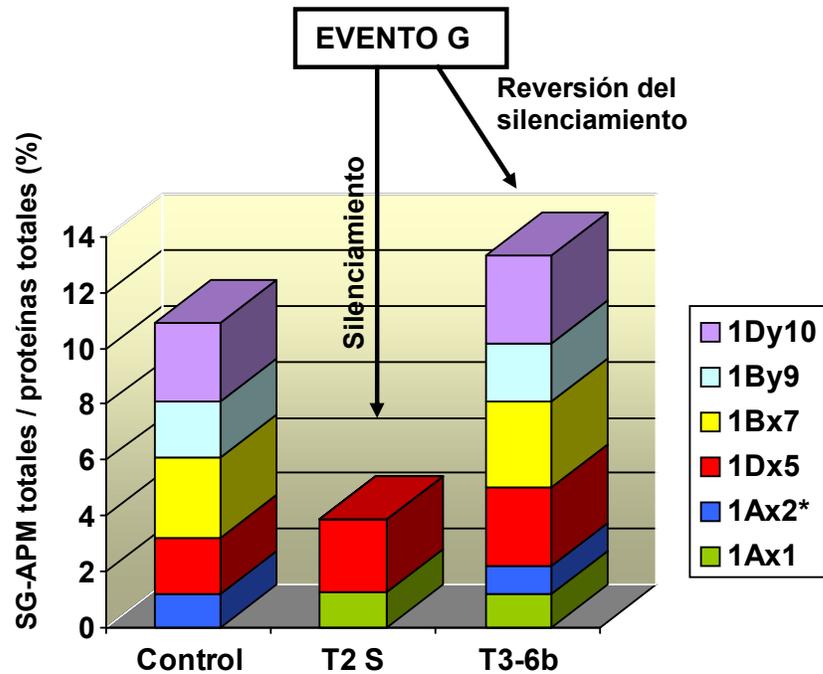
Los valores entre paréntesis (primera columna) son los números de semillas analizadas. Los números en las demás columnas representan el valor promedio ± error estándar de las semillas analizadas. T1S y T2S: semillas silenciadas de la primera y la segunda generación, respectivamente. T2R: semilla T2 con reversión (procedentes de una planta T1 silenciada). T1-6b: única semilla T1, del evento G, con 6 bandas (transgén 1Ax1 + 5 bandas de SG-APM endógenas). T3-6b: semillas de la tercera generación, proveniente de una planta T2-6b homocigota (esta última, a su vez, es una hija de T1-6b). Los números en rojo son valores aumentados con respecto a los hallados en los controles, y los que están en azul, se hallan significativamente por debajo de los valores controles.

De los datos mostrados en la tabla 15 pueden obtenerse conclusiones importantes. La primera es que el transgén 1Ax1, en las semillas T3 6b (que presentan 6 bandas - 6b -, ya que expresan el transgén 1Ax1 + 5 bandas de SG-APM), ha alcanzado un buen nivel de expresión (1,2% sobre el total de proteínas), comparable al de una de las subunidades endógenas (1Ax2\*). La segunda es que existe una sobreexpresión débil de la subunidad 1Dx5 (aumenta de 2 a 2,8%, es decir, un 40% por encima de los valores de los controles), que se hace más evidente recién en las semillas T3-6b (comparado con los valores hallados para la semilla T1-6b) . Esto se debe a que las semillas T3-6b proceden de una planta homocigota para los transgenes 1Ax1 y 1Dx5 y, el nivel de expresión alcanzado por los transgenes es, generalmente, mayor en las homocigotas.

Como ya se mencionó anteriormente, hubo 97 semillas T1 que expresaron los transgenes 1Ax1 y 1Dx5, junto con un silenciamiento de los genes que codifican para las SG-APM endógenas. En la tabla 15 es posible observar diferencias entre los niveles de expresión alcanzado por las distintas SG-APM, entre las semillas T1S y T2S (particularmente en el nivel de expresión de la subunidad 1Dx5). Esto se debe a que las semillas T2S proceden todas de una misma planta homocigota para los transgenes introducidos y, como ya se mencionó, el nivel de expresión alcanzado por los transgenes es, generalmente, mayor en las homocigotas. En estas semillas T2S, la expresión del transgén 1Ax1 es buena, del 1.3% con respecto al total de proteínas de endosperma (comparable a la expresión de la subunidad endógena 1Ax2\* en las semillas de plantas controles). Además, existe una sobreexpresión de la subunidad 1Dx5, del 30% por encima de los valores hallados en los controles.

Es importante destacar que, las semillas indicadas como T2R, en la tabla 15, proceden de una planta T1 silenciada en la que, durante la meiosis, se produjo una segregación del alto número de copias de los transgenes introducidos, dando lugar a semillas con diferentes patrones de expresión (que se muestran en la figura 46, panel A). De esta forma, las 5 semillas T2R, a las que se hace mención en la tabla 15, no proceden de una planta homocigota para los transgenes. De allí que, al comparar los niveles de expresión promedio que alcanzaron los transgenes en ellas, con los valores de las semillas homocigotas T3-6b (que también revirtieron el fenómeno de silenciamiento, pero en la primera generación), la expresión de los transgenes sea menor, en las semillas T2R, que en las T3-6b.

En el gráfico de la figura 50 es posible comparar el contenido total de SG-APM de semillas controles, con semillas procedentes de plantas homocigotas para los transgenes 1Ax1 y 1Dx5 pero, con silenciamiento de los genes de SG-APM endógenas (T2S), en un caso y, con reversión del fenómeno de silenciamiento, en el otro (T3-6b). En las semillas T2S, se muestra claramente que, a pesar de una buena expresión de los transgenes, el contenido de SG-APM total cae un 64% con respecto al valor de los controles (de 11% a 4%), debido al silenciamiento de los genes de las SG-APM endógenas. En cambio, en las semillas con T3-6b, procedentes de plantas del mismo evento, pero que han perdido gran parte de las copias de los transgenes, se revierte el fenómeno de silenciamiento, por lo que, una buena expresión de los transgenes se suma a un patrón normal de expresión de las SG-APM endógenas, llevando a un incremento del contenido total de SG-APM del 21 %, por encima de los valores controles (figura 50).



**Figura 50:** Comparación del porcentaje de SG-APM totales con respecto a las proteínas totales de endosperma, entre semillas controles y semillas homocigotas del evento G. T2 S: semillas T2 silenciadas (procedentes de una planta T1 silenciada y homocigota para los transgenes 1Ax1 y 1Dx5). T3-6b: semillas de la tercera generación (T3) que expresan 6 bandas de SG-APM (el transgén 1Ax1 + 5 SG-APM endógenas). Las semillas T3-6b proceden de una planta T2-6b, homocigota para los transgenes 1Ax1 y 1Dx5 (esta última, a su vez, es hija de la única T1-6b, que expresó el transgén 1Ax1 sin modificar la expresión de las SG-APM endógenas). Cada color representa el aporte de una SG-APM diferente al total de SG-APM (con referencia a valores de la tabla 15).

Con respecto a la segregación de los transgenes en el evento G, ha sido posible comprobar que, una vez que se produce la reversión del fenómeno de silenciamiento (por pérdida de gran parte de las copias introducidas), los transgenes 1Ax1 y 1Dx5 tienen una segregación mendeliana en la descendencia (75% de positivas-25% homocigotas y 50% hemocigotas- y un 25% de negativas). Además, a partir de la reversión del fenómeno de silenciamiento, los transgenes comienzan a transmitirse en forma estable a la descendencia, manteniéndose un número de copias constante de, aproximadamente, 3.

## 2.2. Cotransformación de genes de SG-APM con genes selectores y/o marcadores

Como ya se mencionó en la sección Materiales y métodos, en los experimentos de transformación de trigo para mejorar la calidad panadera (mediante la introducción de los genes de SG-APM 1Ax1 y 1Dx5), se utilizaron, también, los plásmidos pAHC25 ó pGI<sub>2</sub>, que contienen los genes *bar* y *gus* (en el caso del primero) o el gen *hpt* (en el segundo plásmido). En la tabla 16 se muestran los genes introducidos en cada uno de los 7 eventos de transformación obtenidos. Se hallaron 3 eventos (A, E y F) transformados con el gen *bar* (que confiere resistencia al herbicida glufosinato) y el gen *gus* (un gen marcador que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa de *E. coli*). Mientras que, los eventos B, D y G resultaron transformados con el gen *hpt* (que otorga resistencia al antibiótico higromicina).

Evento	1Ax1	1Dx5	<i>uidA</i>	<i>bar</i>	<i>hpt</i>	Silenciamiento génico
<b>A</b>	-	+	+	+	n.c.	No se halló
<b>B</b>	-	+	n.c.	n.c.	+	No se halló
<b>C</b>	+	-	n.c.	n.c.	n.d.	1Bx7 y 1By9
<b>D</b>	+	-	n.c.	n.c.	+	1Ax2*
<b>E</b>	+	-	+	+	n.c.	1Ax2*
<b>F</b>	+	+	+	+	n.c.	SG-APM
<b>G</b>	+	+	n.c.	n.c.	+	SG-APM y <i>hpt</i>

**Tabla 16:** Eventos de transformación con genes marcadores, selectores y de SG-APM. *Bar*: gen de resistencia al herbicida glufosinato. *uidA*: gen que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa de *E.coli*). *Hpt* : gen que confiere resistencia al antibiótico higromicina. N.c.: no corresponde. N.d.: no determinado.

Con respecto a la expresión de los genes marcadores o selectores introducidos por transformación, pudo asociarse, nuevamente, la presencia de un alto número de copias del transgén (en este caso del transgén *hpt*, en el evento G), con silenciamiento, como ya se discutirá más adelante.

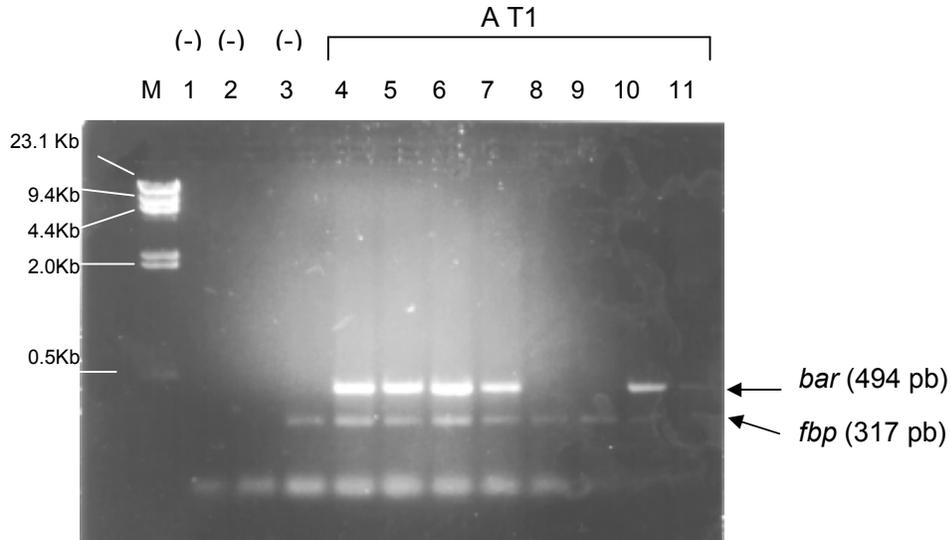
A continuación, se describen los análisis realizados por evento y la segregación de los transgenes en la descendencia.

### **Evento A**

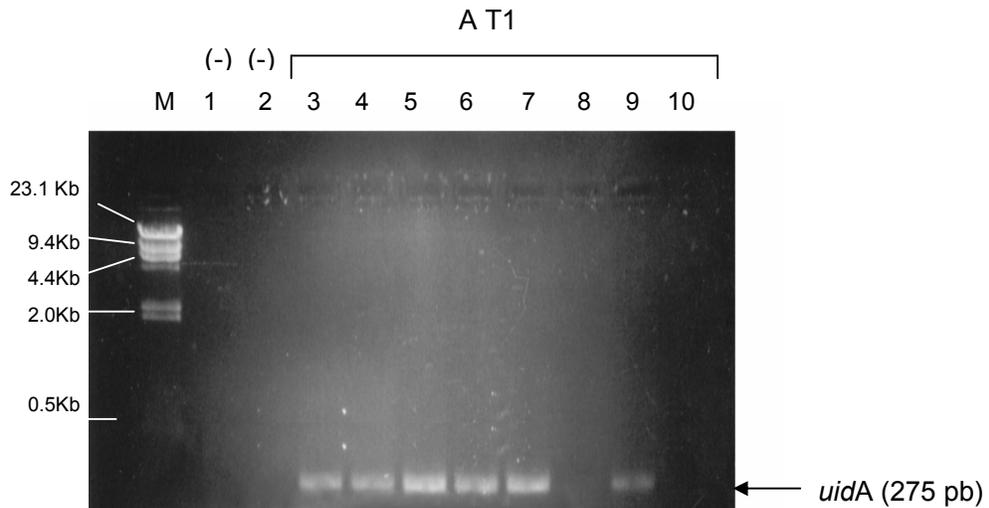
Se realizó el análisis del ADN de plantas T1, del evento A, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el gen *bar*, según se detalla en la sección "Materiales y métodos". Las mismas muestras fueron también analizadas para el gen endógeno *fbp*, que codifica para la enzima fructosabisfosfatasa y que, al hallarse presente en todas las plantas de trigo, se utiliza como control de amplificación interno (para descartar falsos negativos por presencia de inhibidores de la Taq. polimerasa en la muestra y/o por degradación del ADN extraído). En la figura 51 se muestra un gel de agarosa con los productos de amplificación esperados para los genes *bar* y *fbp*, de 494 y 317 pares de bases, respectivamente (utilizando los cebadores que se detallan en la sección materiales y métodos). Se muestra el análisis del ADN de sólo 8 de las plantas T1 analizadas (calles 4-11), dos de las cuales resultaron negativas para el gen *bar* y homocigotas para el transgén 1Dx5 (calles 8 y 9).

Como era de esperar, las mismas plantas que resultaron positivas para el gen *bar*, lo fueron también para el gen *uidA* (figura 52), ya que los genes *uidA* y *bar* se encuentran en el mismo plásmido utilizado en la transformación

(pAHC25). Además, pudo comprobarse que ambos genes cosegregan en la descendencia, debido a la proximidad con que se insertaron en el genoma.



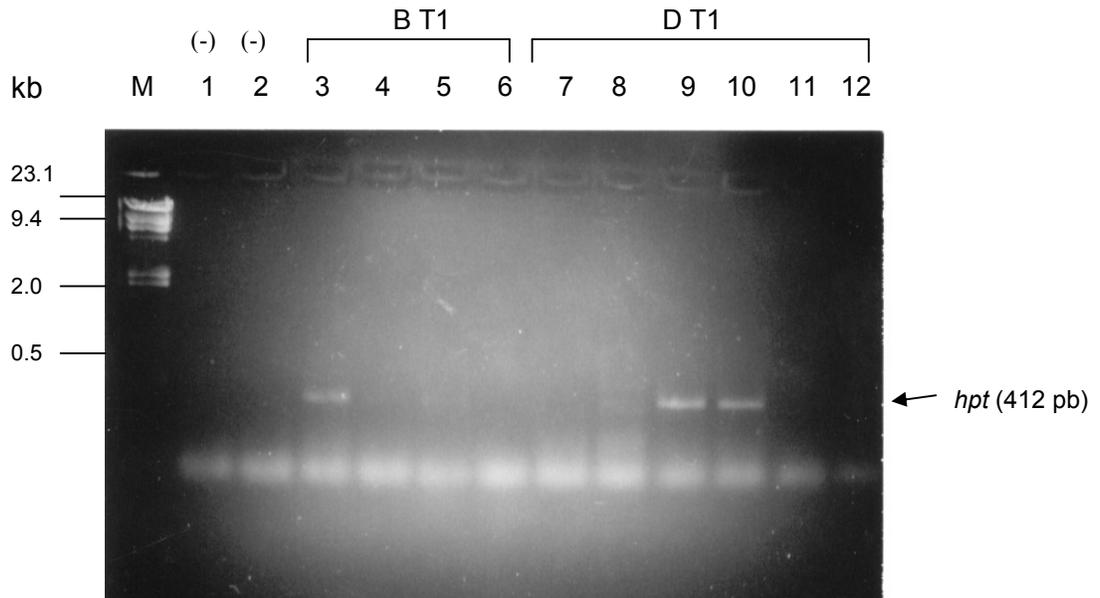
**Figura 51: PCR para los genes *bar* y *fbp*.** Gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio, con los productos de amplificación de los genes *bar* y *fbp*. M: marcador de peso molecular. Calles 1 y 2: controles negativos (sin ADN). Calle 3: control negativo (con ADN de plantas controles). Calles 4-11: productos de amplificación de ADN de plantas experimentales de la primera generación (T1) del evento A.



**Figura 52: PCR para el gen *uidA*.** Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, con los productos de amplificación (por PCR) del gen *uidA*, que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa de *E. coli*. Calles 3-10: productos de amplificación, de ADN genómico, de plantas T1 del evento A. Las muestras de las calles 3, 4, 5, 6, 7 y 9 corresponden a ADN de las mismas plantas que las de las calles 4, 5, 6, 7, 10 y 11 de la figura 51, respectivamente. También se amplificó la misma muestra de ADN en las calles 8 y 10, que en las calles 8 y 9 de la figura 51. M: marcador de peso molecular.

**Eventos B y D**

En la tabla 16 se mencionó que los eventos B y D resultaron transformados, también, con el gen selector *hpt*, que confiere resistencia al antibiótico higromicina. En la figura 53 se muestra un gel de agarosa, con los productos de amplificación, por PCR, de este gen, partiendo de muestras de ADN genómico, de plantas T1, de estos dos eventos.

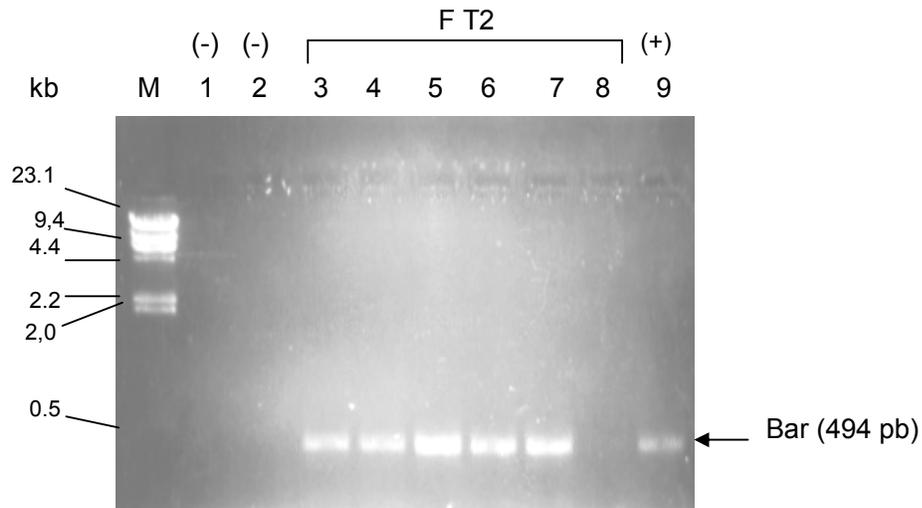


**Figura 53: PCR para el gen *hpt*.** Gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio, mostrando los productos de amplificación por PCR del gen *hpt*. Calle 1: amplificación sin ADN. Calle 2: amplificación de ADN de una planta control. Calles 3-6: amplificación de ADN de 4 plantas T1 del evento B. Calles 7-12: amplificación de ADN de 6 plantas T1 del evento D. M: marcador de peso molecular.

Tanto las 4 plantas T1 del evento B, como las 6 del evento D que fueron analizadas por PCR para el gen *bar*, eran positivas para el transgén 1Ax1 ó 1Dx5, respectivamente. Sin embargo, sólo algunas de ellas resultaron positivas para el gen *hpt* (calles 3, 9 y 10, figura 53), lo que estaría indicando una segregación independiente de los transgenes de SG-APM y el gen selector *hpt*, en ambos eventos.

**Evento F**

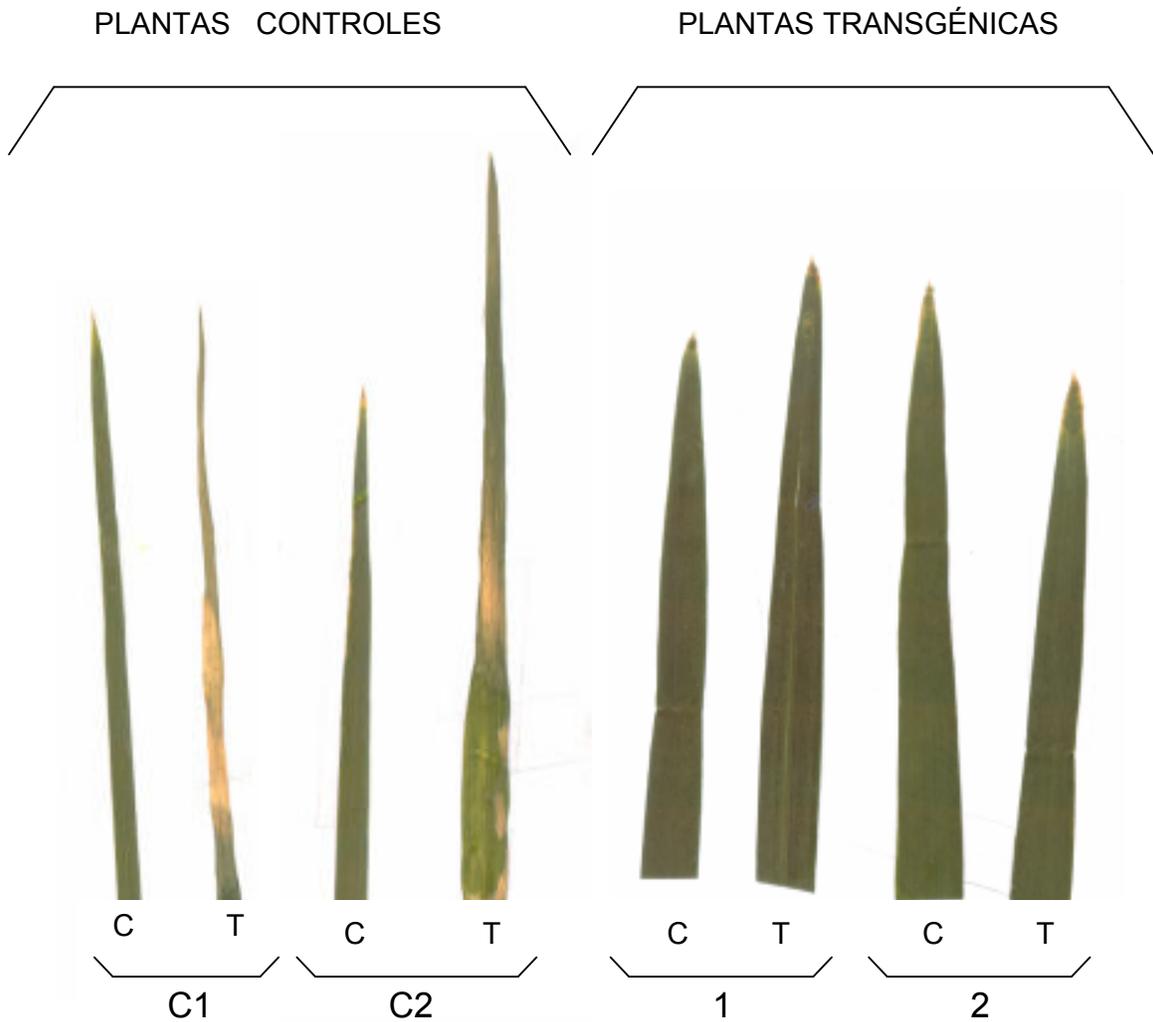
Se llevó a cabo el estudio de la presencia del transgén *bar* en el evento F, mediante análisis por PCR. En la figura 54 se muestra un gel de agarosa, con los productos de amplificación del gen *bar*, del ADN genómico de 7 plantas T2, 6 de las cuales resultaron positivas para el transgén (calles 3-7).



**Figura 54: PCR para el gen *bar*.** Gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio, mostrando los productos de amplificación por PCR para el gen *bar*. M: marcador de peso molecular. Calle 1: amplificación sin ADN; calle 2: amplificación de ADN de planta control, sin transformar. Calles 3-8: amplificación de ADN de plantas T2 del evento F. Calle 9: control (+).

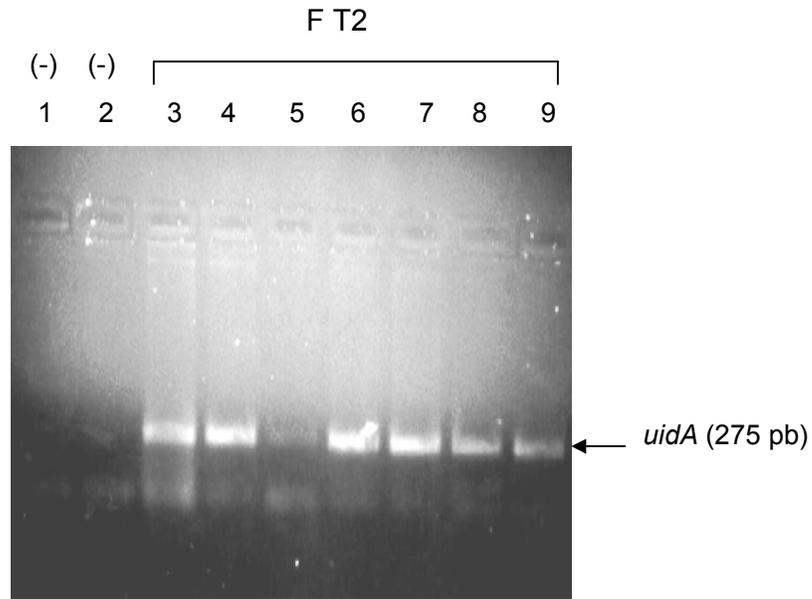
Se realizó el estudio de la expresión del gen *bar*, mediante un ensayo de resistencia al herbicida glufosinato, *in vivo*, que consistió en aplicar una solución acuosa del mismo sobre las hojas de plantas tratamiento y control. En la figura 55 se muestra el efecto de la aplicación del herbicida en dos plantas control (C1 y C2, figura 55) y en dos plantas transgénicas para el gen *bar*, del evento F (1 y 2, figura 55). Mientras que en las dos plantas controles, existe una clara diferencia entre las hojas tratadas (T) y no tratadas (C), ya que las primeras

fueron severamente afectadas por el herbicida, esto no ocurre en las dos plantas transgénicas. En estas últimas, no hay diferencias entre hojas con y sin tratamiento, debido a la presencia del producto del transgén *bar*, que confiere resistencia al herbicida aplicado. De esta forma, se pudo comprobar que el transgén *bar* se está expresando, y a un nivel suficientemente alto como para otorgar resistencia al herbicida.



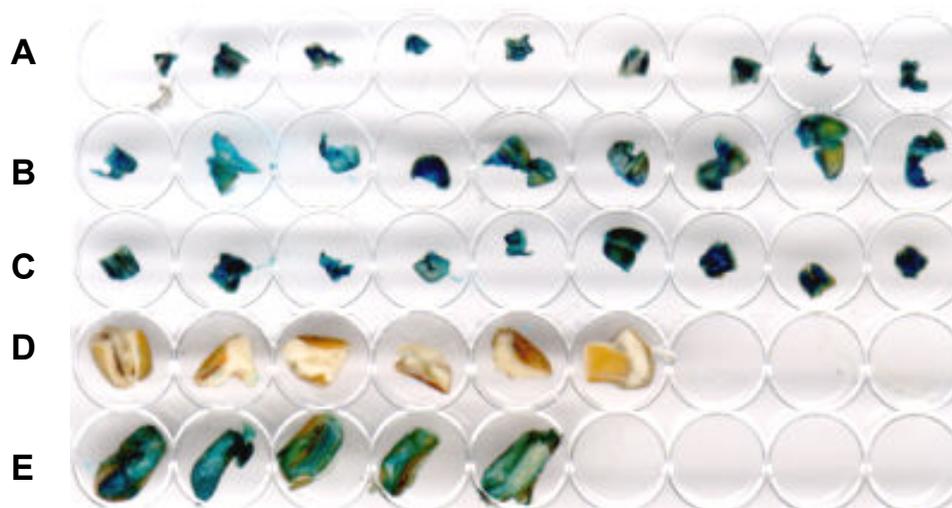
**Figura 55:** Efecto de la aplicación de una solución acuosa de glufosinato (0,005%) sobre hojas del evento F. C: hojas control con solución acuosa de tween. T: hojas tratadas con una solución acuosa de glufosinato (nombre comercial, BASTA) y tween, de la misma planta. C1 y C2: plantas control no transformadas. 1 y 2: plantas T2 hermanas, resistentes al herbicida.

Las plantas del evento F fueron analizadas por PCR para determinar la presencia del gen marcador *uidA* (que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa de *E. coli*). En la figura 56 se muestra un gel de agarosa con los productos de amplificación del ADN de 7 plantas experimentales T2, del evento G, 6 de las cuales resultaron ser positivas para el transgén *uidA* (calles 3, 4, 6, 7, 8 y 9).



**Figura 56: PCR para el gen *uidA*.** Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, mostrando los productos de amplificación por PCR, para el gen *uidA*, de plantas T2 del evento F (F T2). Calle 1: amplificación control sin ADN; calle 2: amplificación de ADN de planta control, sin transformar. Calles 3-8: amplificación de ADN de plantas experimentales. Calle 9: control (+) (amplificación de ADN del plásmido pAHC25 que contiene el gen *uidA*).

La actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (Gus), producto de la expresión del transgén *uidA*, se estudió mediante ensayos de histoquímica de semillas. En la figura 57 se muestran los resultados obtenidos, en donde la expresión de la enzima se pone en evidencia mediante la coloración azul de las semillas T4 (filas A, B y C, figura 57). Estas semillas proceden de plantas T3, homocigotas para el transgén *uidA* y, también, para los transgenes *1Ax1* y *1Dx5*.

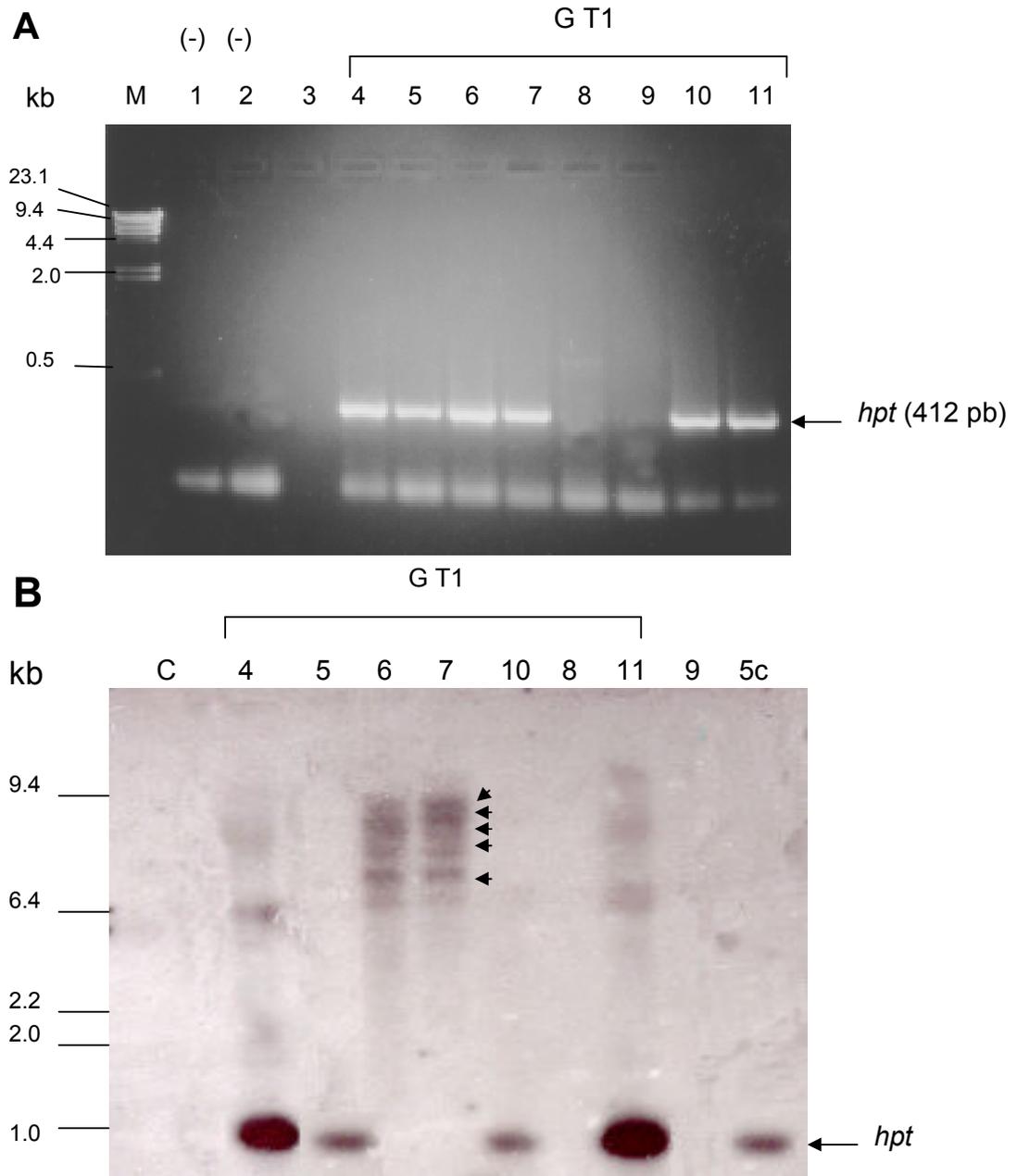


**Figura 57:** Ensayo de actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en semillas (histoquímica de Gus (+): color azul). Fila E: corte longitudinal de semillas controles positivos. Fila D: semillas controles negativos. Filas A, B, C: trozos de semillas T3, transgénicas para el gen uidA (evento F), expresando la enzima  $\beta$ -glucuronidasa.

### **Evento G**

Se estudió la presencia del transgén *hpt* en el evento G. Para ello, el ADN de 8 plantas T1, de dicho evento, fue amplificado por PCR para la presencia del gen selector *hpt*. En la figura 58, panel A, se muestra un gel de agarosa con los productos de amplificación por PCR. De las 8 plantas analizadas, 6 resultaron positivas para el transgén *hpt* (calles 4, 5, 6, 7, 10 y 11). El análisis del ADN, de las mismas plantas T1, por hibridación Southern, permitió comprobar los resultados obtenidos, así como también, determinar el número de copias de los transgenes. Mediante análisis densitométrico de la autorradiografía de la figura 58, pudo determinarse que dos de las plantas (figura 58, panel B, calles 4 y 11) tienen, aproximadamente, 20 copias, y las otras 4 plantas, unas 7 copias (calles 5,

6, 7 y 10). Además, en las calles 6 y 7 se observa la presencia de reordenamiento de las copias introducidas.

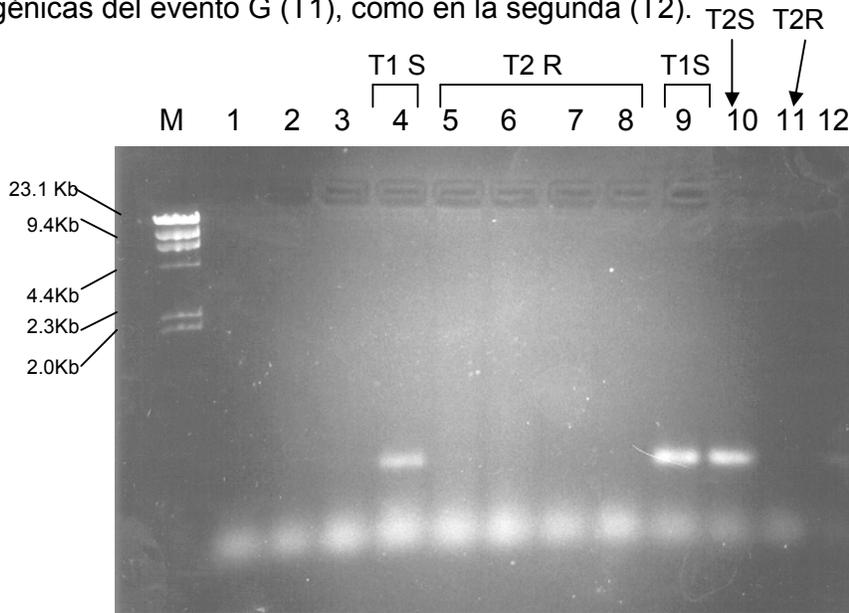


**Figura 58: Análisis moleculares, de plantas T1 del evento G, transformadas con el gen *hpt*.** **Panel A:** gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, de los productos de amplificación por PCR para el gen *hpt*, de ADN de plantas del evento G. Calle 1: control sin ADN; calle 2: planta control sin transformar. Calles 4-11: plantas experimentales T1 del evento G. M: marcador de peso molecular. **Panel B:** análisis por hibridización Southern, para el gen *hpt*, de las mismas plantas experimentales T2 que fueron analizadas por PCR (los números de calles, en los paneles A y B, corresponden al ADN de las mismas plantas). El ADN fue digerido con la enzima *Bam*HI que descuelga el gen *hpt* completo (1.0 kb). C: planta control. 5c: 5 copias. Las flechas pequeñas señalan bandas de hibridización de peso molecular mayor del esperado para *hpt* (1 kb), debido a un reordenamiento de los transgenes en el genoma (calles 6 v 7).

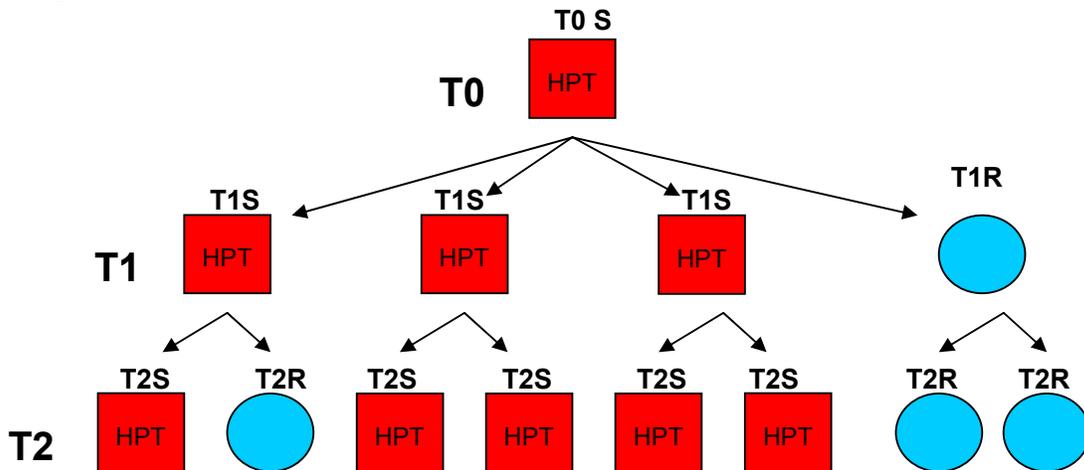
De las dos plantas negativas para *hpt* (figura 58, paneles A y B, calles 8 y 9), una lo es también para los genes *1Ax1* y *1Dx5* (procede de la semilla analizada en la figura 42, calle 11), y la otra es la planta que resultó de sembrar la única semilla T1 positiva para la subunidad *1Ax1*, pero con una expresión normal de los genes que codifican para las SG-APM endógenas (figura 42, calle 2). Las 6 plantas T1, positivas para *hpt* (con alto número de copias), también presentan los transgenes *1Ax1* y *1Dx5* (40-50 copias), junto con un silenciamiento de los genes que codifican para las SG-APM endógenas.

En la figura 59 se muestra un gel de agarosa con los productos de amplificación, por PCR, del gen *hpt*, en plantas T2, del evento G. Estas plantas proceden de las semillas T2 que tuvieron una reversión del silenciamiento de los genes de SG-APM endógenos, junto con una expresión normal del transgén *1Ax1* (figura 46, panel A, calles 6, 7, 10 y 12; panel B, calle 10). Todas las plantas T2 con dicha reversión del silenciamiento (T2R), resultaron negativas para *hpt* (figura 59, calles 5, 6, 7, 8 y 11), a pesar de que sus respectivas madres T1, silenciadas para los genes de SG-APM endógenos (T1S), fuesen positivas para *hpt* (figura 59, calles 4 y 9). Además, el análisis de una planta T2, que procede de una semilla T2 con silenciamiento de las SG-APM endógenas (T2S), resultó ser positiva para *hpt* al igual que la madre T1 (figura 59, calle 10). Como se esquematiza en la figura 60, todos estos resultados estarían indicando que los transgenes *1Ax1*, *1Dx5* y *hpt* cosegregan en la descendencia, los tres en alto número de copias (plantas representadas por cuadrados rojos), pero que, cuando se pierden la mayor parte de las copias de *1Ax1* y *1Dx5* (produciéndose la reversión del fenómeno de silenciamiento de las SG-APM endógenas), se pierden, también, todas las copias del transgén *hpt* (plantas representadas por

círculos celestes). Este fenómeno de reversión del silenciamiento de los genes de SG-APM endógenos fue observado, tanto en la primera generación de plantas transgénicas del evento G (T1), como en la segunda (T2).

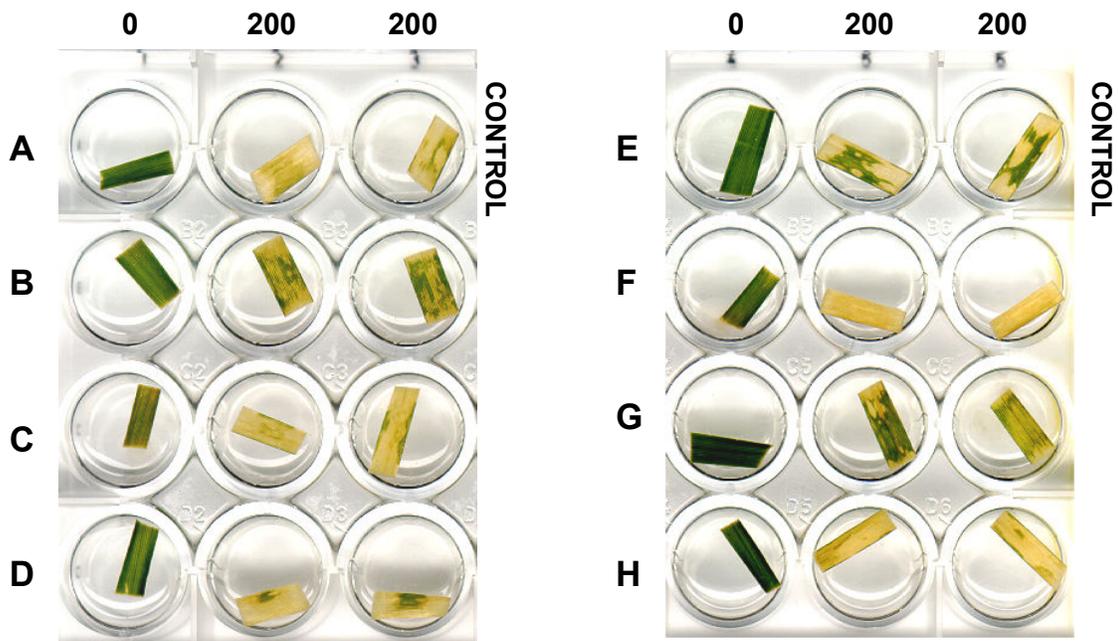


**Figura 59: Análisis por PCR del gen *hpt* del ADN de plantas T1 y T2 del evento G.** Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, con los productos de amplificación del gen *hpt*. M: marcador de peso molecular. Calle 1: amplificación control sin ADN; calle 2 y 3: amplificación de ADN de planta control sin transformar. Calle 4: amplificación de ADN de planta T1silenciada (T1S), madre de cuatro plantas T2 con reversión (T2R) (calles 5, 6, 7, y 8). Calle 9: amplificación de ADN de planta T1 silenciada (T1S) madre de otra planta T2 con reversión (T2R, calle 11) y de una T2 que sigue silenciada (T2S, calle 10). Calle 12: control positivo (amplificación del plásmido pGL2 que contiene el gen *hpt*).



**Figura 60: Esquema de la segregación de los transgenes *1Dx5*, *1Ax1* y *hpt* en el evento G.** Cuadrados rojos: plantas en las que la presencia de los transgenes *1Ax1* y *1Dx5* en alto número de copias (40-50) se asocia al silenciamiento de las SG-APM endógenas. Todas estas plantas contienen, también, el transgén *hpt* en alto número de copias. Círculos celestes: plantas con bajo número de copias de los transgenes *1Ax1* y *1Dx5* (3 copias) (con una expresión normal de las SG-APM endógenas), y negativas para el transgén *hpt*.

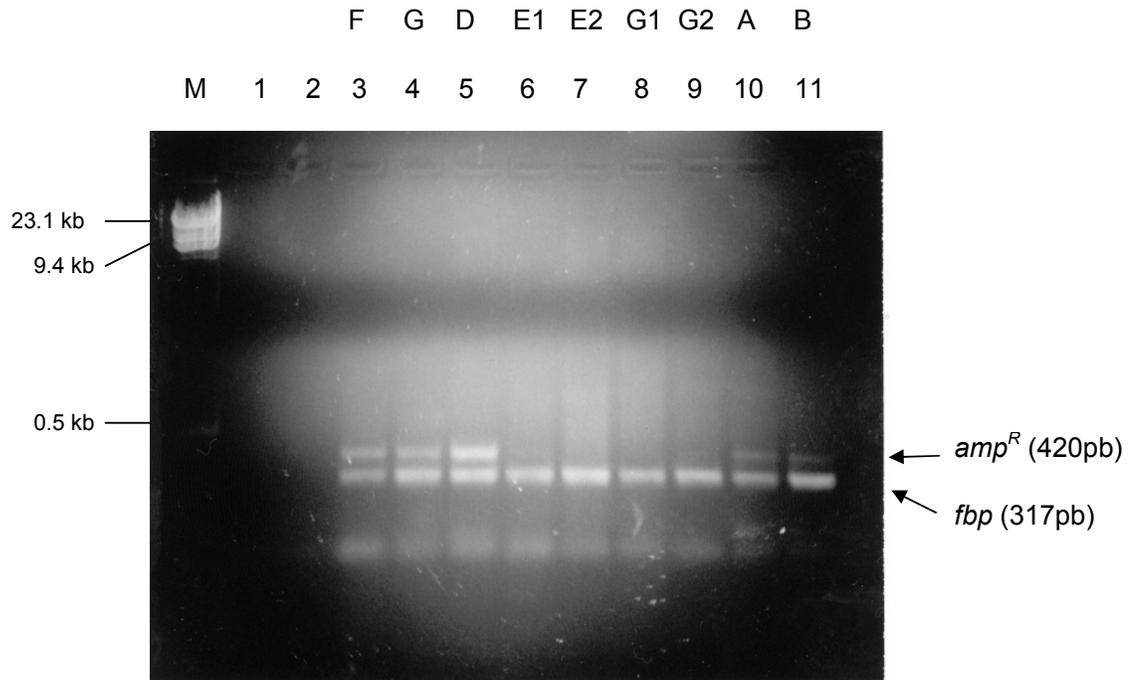
En la figura 61 se muestra el análisis de la expresión del transgén *hpt*, mediante un ensayo de resistencia, *in vivo*, al antibiótico higromicina. Cada fila corresponde a una planta diferente. Las hojas de las filas A y E pertenecen a dos plantas controles sin transformar, y las de las filas B, C, D, F, G y H son hojas de plantas transgénicas para los genes *1Ax1*, *1Dx5* y *hpt*, los 3 en alto número de copias (plantas representadas por cuadrados rojos en la figura 60). En todos los casos, la primer columna corresponde al control, sin tratamiento, para cada planta (columna "0"), mientras que la segunda y la tercera son duplicados de tratamiento, durante 6 días, con una solución de 200 mg/ml de higromicina (columnas indicadas como "200"). La sensibilidad de las plantas tratadas, al antibiótico higromicina, se manifiesta mediante la clorosis de sus hojas luego de 6 días de tratamiento. Este hecho se observa tanto en las filas A y E, correspondientes a los controles, como en las filas B, C, D, F, G y H de las plantas transgénicas para el gen *hpt*, lo que estaría indicando el silenciamiento de dichos transgenes.



**Figura 61:** Ensayo de resistencia *in vivo* al antibiótico higromicina. La primer columna corresponde al control, sin tratamiento, para cada planta (columna "0"), mientras que la segunda y tercera son duplicados de tratamiento, durante 6 días, con una solución de 200 mg/ml de higromicina. Filas A y E: plantas controles sin transformar. Filas B, C, D, F, G y H: plantas transgénicas para *hpt*.

### **Análisis de la presencia del gen *amp<sup>R</sup>* en los distintos eventos obtenidos**

El gen que confiere resistencia a la ampicilina (*amp<sup>R</sup>*) se encuentra en los vectores más comúnmente utilizados en la construcción de plásmidos (pUC). Todos los plásmidos utilizados en el bombardeo (ver “Materiales y métodos”, sección 2.1.) contienen este gen. Existe una creciente ola de rechazo a las plantas transgénicas que contienen genes de resistencia a antibióticos o genes heterólogos, procedentes de otras especies, por temor (muchas veces infundado) de que, al ser expresados en plantas destinadas a alimento humano, podrían resultar perjudiciales a la salud (138, 139 y 140). Por este motivo se procedió a determinar la presencia del gen *amp<sup>R</sup>*, en plantas pertenecientes a los distintos eventos transgénicos obtenidos. En la figura 62, se muestra un gel de agarosa con los productos de amplificación del gen *amp<sup>R</sup>*, obtenidos por PCR. Las 5 plantas positivas de las calles 3, 4, 5, 10 y 11 pertenecen a los eventos F, G, D, A y B, respectivamente, mientras que las plantas negativas de las calles 6-9 corresponden al evento E, y a plantas del evento G en las que se produjo una reversión del fenómeno de silenciamiento de las SG-APM, al perderse la mayor parte del alto número de copias de los transgenes introducidos, durante la segregación. En todos los casos se realizó, también, la amplificación del gen endógeno *fbp*, lo que permitió descartar la presencia de falsos negativos por inactivación de la enzima Taq. polimerasa o por degradación del ADN de la muestra. Los cebadores utilizados para ambas amplificaciones son los que se describen en la sección “Materiales y métodos”, y los productos de amplificación obtenidos, para los genes *amp<sup>R</sup>* y *fbp*, son de 420 y 317 pb, respectivamente.



**Figura 62: Análisis por PCR del gen *amp<sup>R</sup>*** Gel de agarosa al 1.5% con los productos de amplificación del gen *amp<sup>R</sup>*. Calles 1 y 2: amplificación sin ADN. Calles 3 a 11: amplificación de ADN de plantas experimentales de los eventos A, B, D, E, F y G (las letras arriba de los número de calles indican los distintos eventos analizados). G: planta del evento G con silenciamiento de las SG-APM endógenas. G1 y G2: plantas 1 y 2 del evento G, con reversión del fenómeno de silenciamiento de las SG-APM endógenas.



Experimentos de traducción, usando transcriptos de ARNm obtenidos a partir de ADNc, mostraron que la síntesis proteica, *in vitro*, comienza en el segundo ATG. Sin embargo, podría ser que, *in vivo*, la traducción se inicie en el primer ATG y que el codón TAA sea leído a través, gracias a la presencia de un ARNt supresor sin sentido, que ha sido encontrado en plantas, y que se caracterizan por promover la traducción más allá de un codón de terminación (141). Este tipo de ARNt podría estar presente en endosperma de cebada, permitiendo que se sintetice una secuencia proteica con las propiedades de un péptido señal. Debido a que estas suposiciones aún no han sido demostradas y que, además, se desconoce qué podría suceder al tratar de expresar esta secuencia en endosperma de trigo (donde estos ARNt supresores podrían no existir), es que se decidió la construcción de dos plásmidos diferentes, para ser utilizados en la transformación de plantas de trigo, según se detalla a continuación.

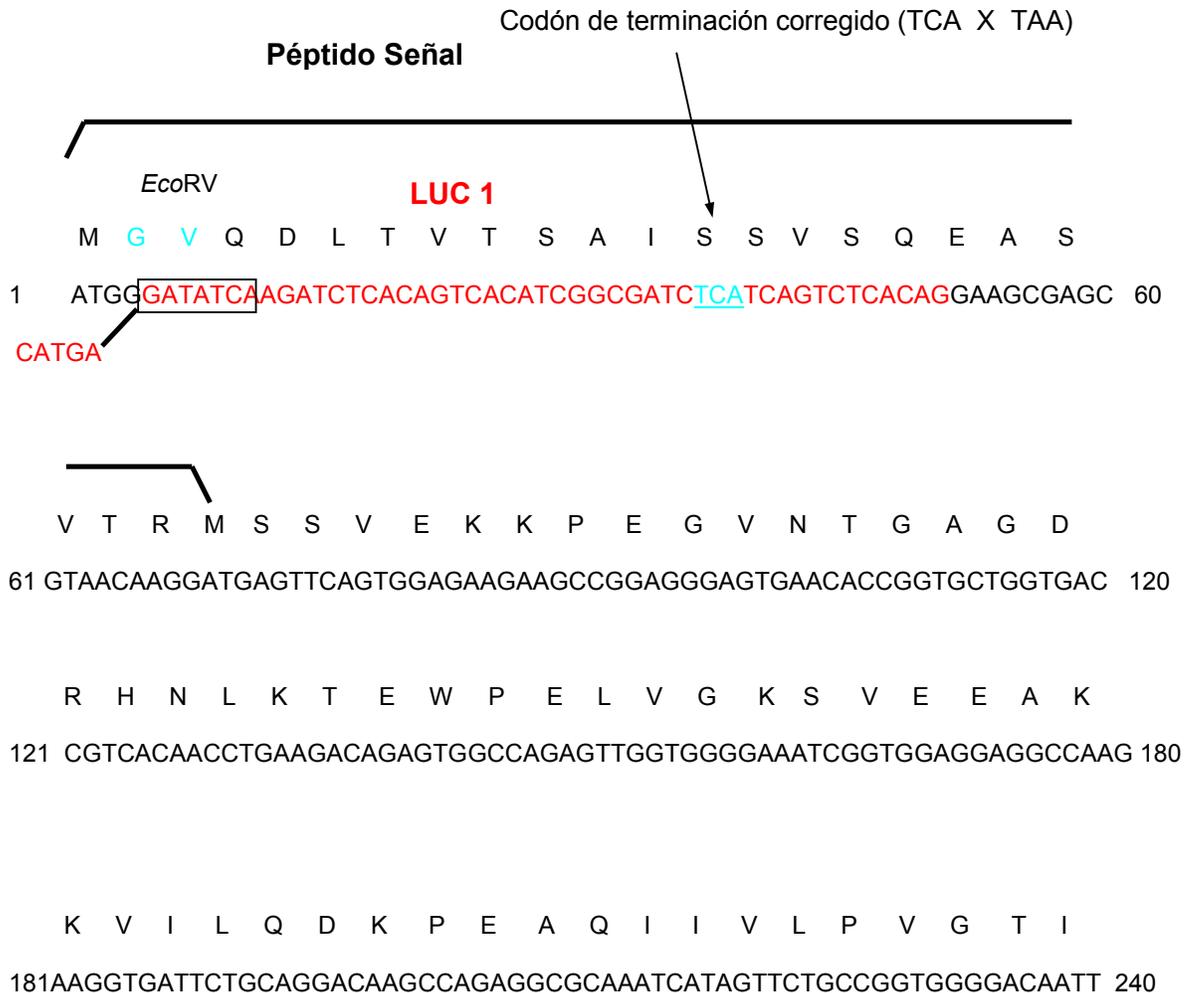
- **pLUC 1:** contiene la región codificante de CI-2 junto con la secuencia corriente arriba que codificaría al posible péptido señal, pero con el codón de terminación mutado por PCR. Se colocó también un promotor fuerte, específico de endosperma, perteneciente al gen de la subunidad de glutenina de alto peso molecular 1Dx5.
- **pLUC 2:** contiene sólo la región codificante de CI-2 bajo el promotor del gen 1Dx5. En caso de que la hipótesis de los ARNt supresores de endosperma de cebada fuese falsa, y que la secuencia corriente

arriba del segundo ATG no fuese un péptido señal, esta sería la construcción más adecuada.

### 2.3.1. Estrategia general utilizada en la construcción de los plásmidos

#### A) CI-2 con péptido señal

Se utilizaron los primers LUC 1 (en rojo) y LUC 3 (en azul) para corregir el codón de terminación e introducir dos sitios de corte para enzimas de restricción.



V T M E Y R I D R V R L F V D K L D N I  
241GTGACCATGGAATATCGGATCGACCGCGTCCGCCTCTTTGTGATAAACTCGACAACATT 300

A Q V P R V G \*  
301GCCCAGGTCCCCAGGGTCGGCTAGCAAGCTTGAGAGCTAGCCTGCTGCTGGCGTGTATGT 360

361 ATTGCAGCTTCACCATCTCTTCTTGGCTATAGCAAGATTGAGATTTATAAATCATATACA 420

XbaI  
421 ATAAGCTCTAGA 431  
ACGCC

LUC 3

Sustituciones realizadas :

- TCA X TAA: reemplazo del codón de terminación del posible péptido señal (TAA) por otro que codifica una serina (TCA).
- GGA X GGT: ambos codones codifican para glicina por lo que no hay cambio de aminoácidos.
- TAT X GTT: aparece una tirosina en lugar de valina, como tercer aminoácido del péptido señal, para formar un sitio *EcoRV* .
- No hay ningún cambio en la secuencia que codifica a la proteína madura.
- Aparece sitio *XbaI* corriente abajo de la región codificante.

**B) CI-2 sin péptido señal**

Se utilizaron los oligonucleótidos LUC 2 (en verde) y LUC 3 (en azul) para introducir dos sitios de corte para enzimas de restricción, según se detalla a continuación:



- Se utilizó como templado el plásmido pClC38 que contiene el gen *Cl-2* y su posible secuencia señal (79b).

#### Condiciones usadas en las PCR

- Oligos 1 y 3 (para *Cl-2* con P.S.): 1  $\mu$ M
- Oligos 2 y 3 (para *Cl-2* sin P.S.): 1  $\mu$ M
- $Cl_2Mg$  : 2,5 mM
- Buffer 1 x
- DNTPs : 0,2 mM de cada uno
- Taq. DNA polimerasa : 2,5 U
- Templado : 100 pg de plásmido pClC38
- Volumen final: 50  $\mu$ l

#### Condiciones de ciclado:

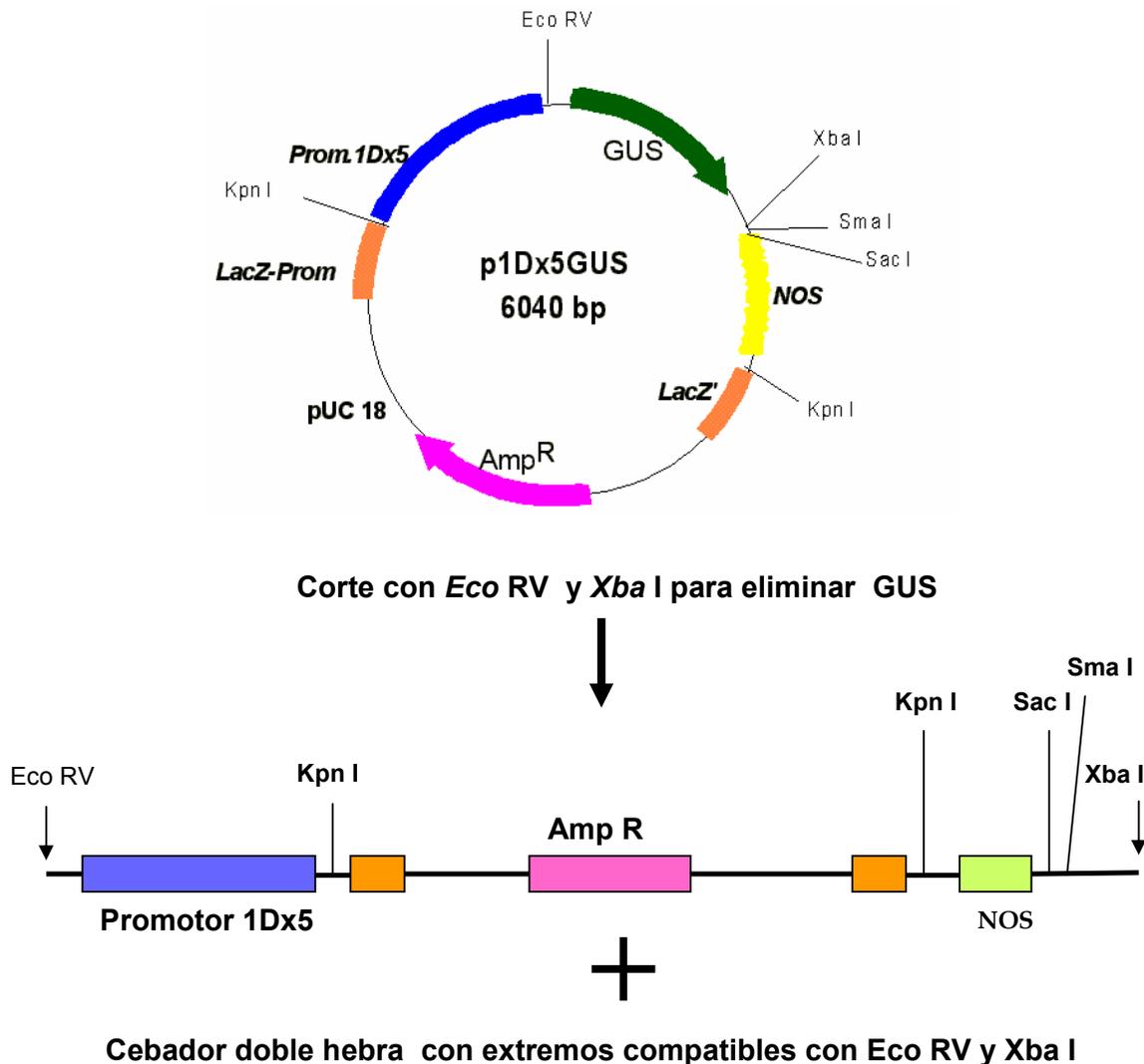
- Hot start: 10 minutos a 95 °C
  - Desnaturalización : 1 minuto a 95 °C
  - Annealing : 1 minuto a 45 °C
  - Extensión : 1 minuto a 72 °C
  - Extensión final: 10 minutos a 72 °C
- } 35 ciclos

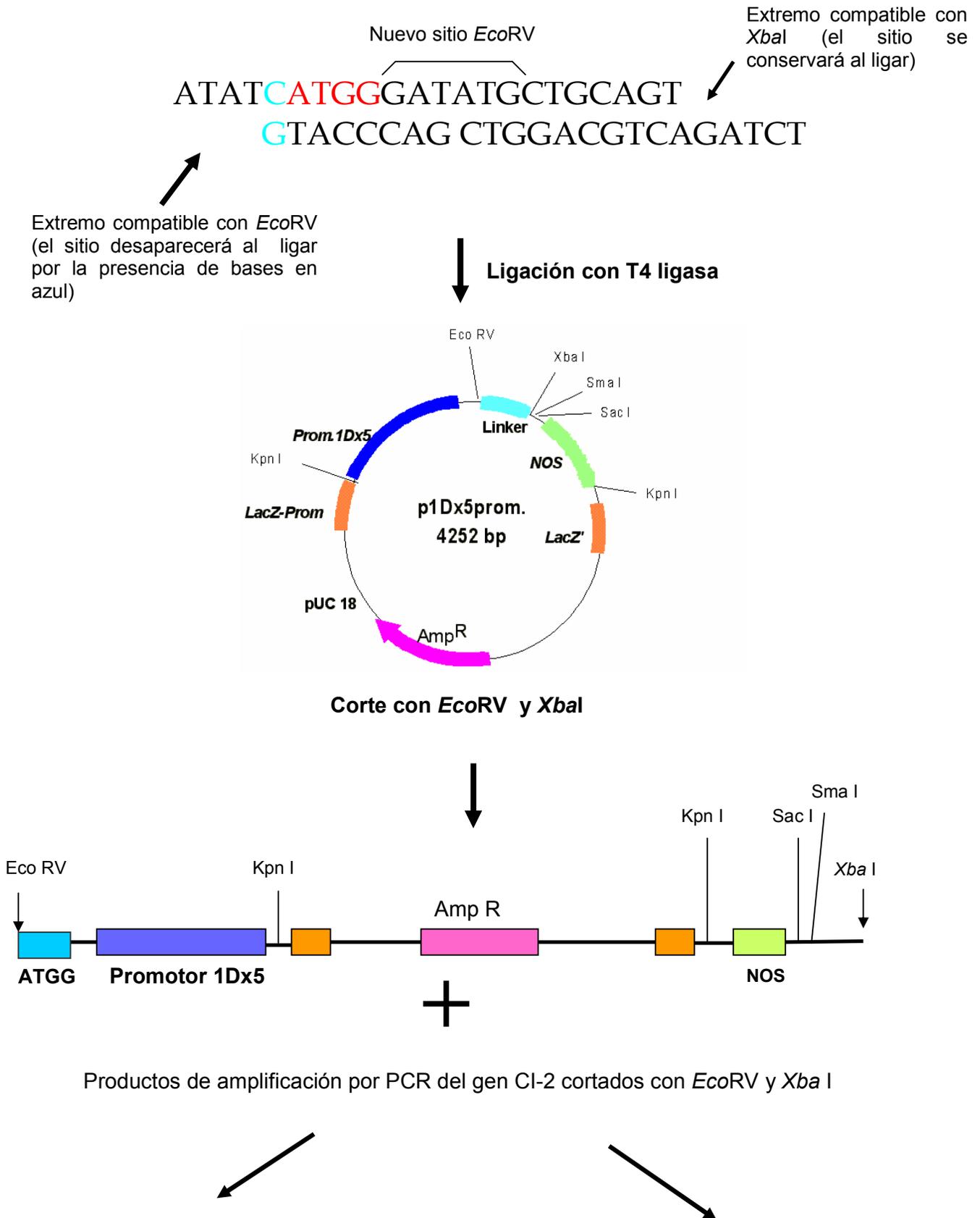
#### Corrección del plásmido p1Dx5GUS

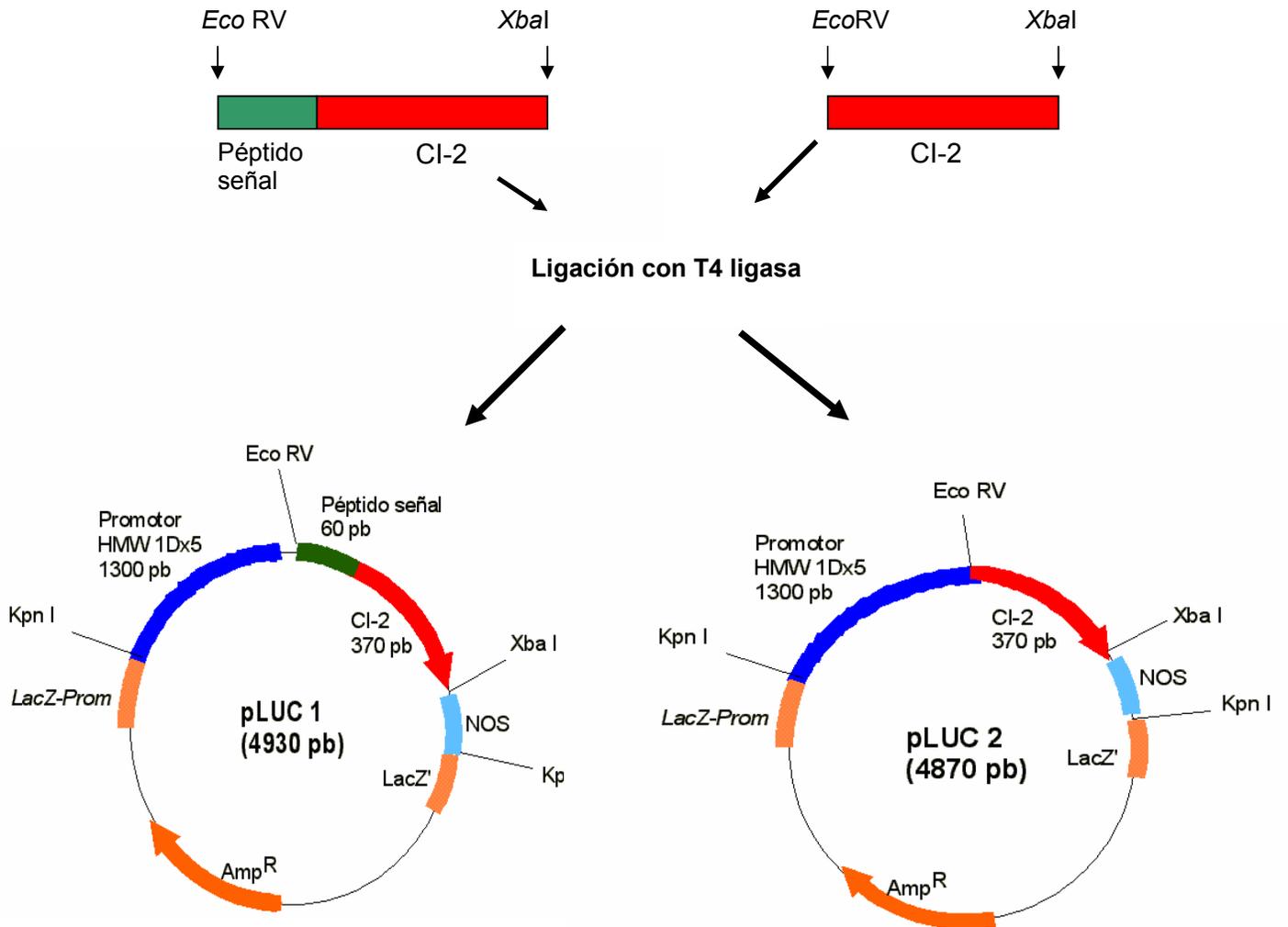
Se contó con el plásmido p1Dx5GUS que contiene, en un vector pUC 18, el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa de *E. coli*, bajo el promotor fuerte, específico

de endosperma, del gen de la subunidad de glutenina de alto peso molecular, 1Dx5.

Se realizaron dos construcciones en las que se reemplazó el gen *uidA* (que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa o Gus), por el gen de CI-2, con y sin la secuencia correspondiente al posible péptido señal. Previamente, fue necesario realizar algunas modificaciones en el p1Dx5Gus, que consistieron en colocar un cebador con el objeto de introducir la secuencia ATGG, con la que deben comenzar las secuencia de CI-2, con o sin péptido señal, junto con nuevos sitios de restricción para facilitar el clonado.

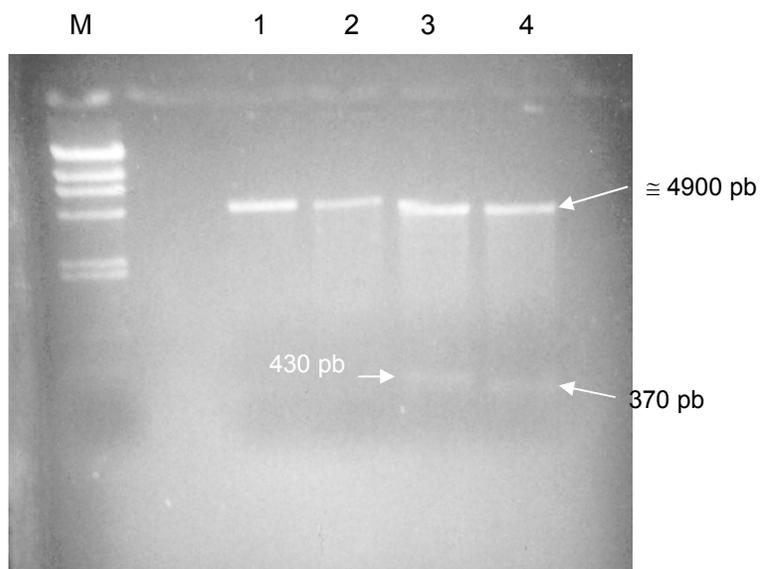






**Chequeo de los plásmidos construidos**

En la figura 64, se muestra el chequeo de las construcciones realizadas, por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. La estimación de los pesos moleculares se llevó a cabo utilizando el programa “Gel “ que es una implementación Turbo Pascal de la rutina Fortran, descrita por Shaffer y Sederoff (142), que aplica el ajuste de mínimos cuadrados para obtener las relaciones recíprocas entre movilidad y longitud del fragmento.



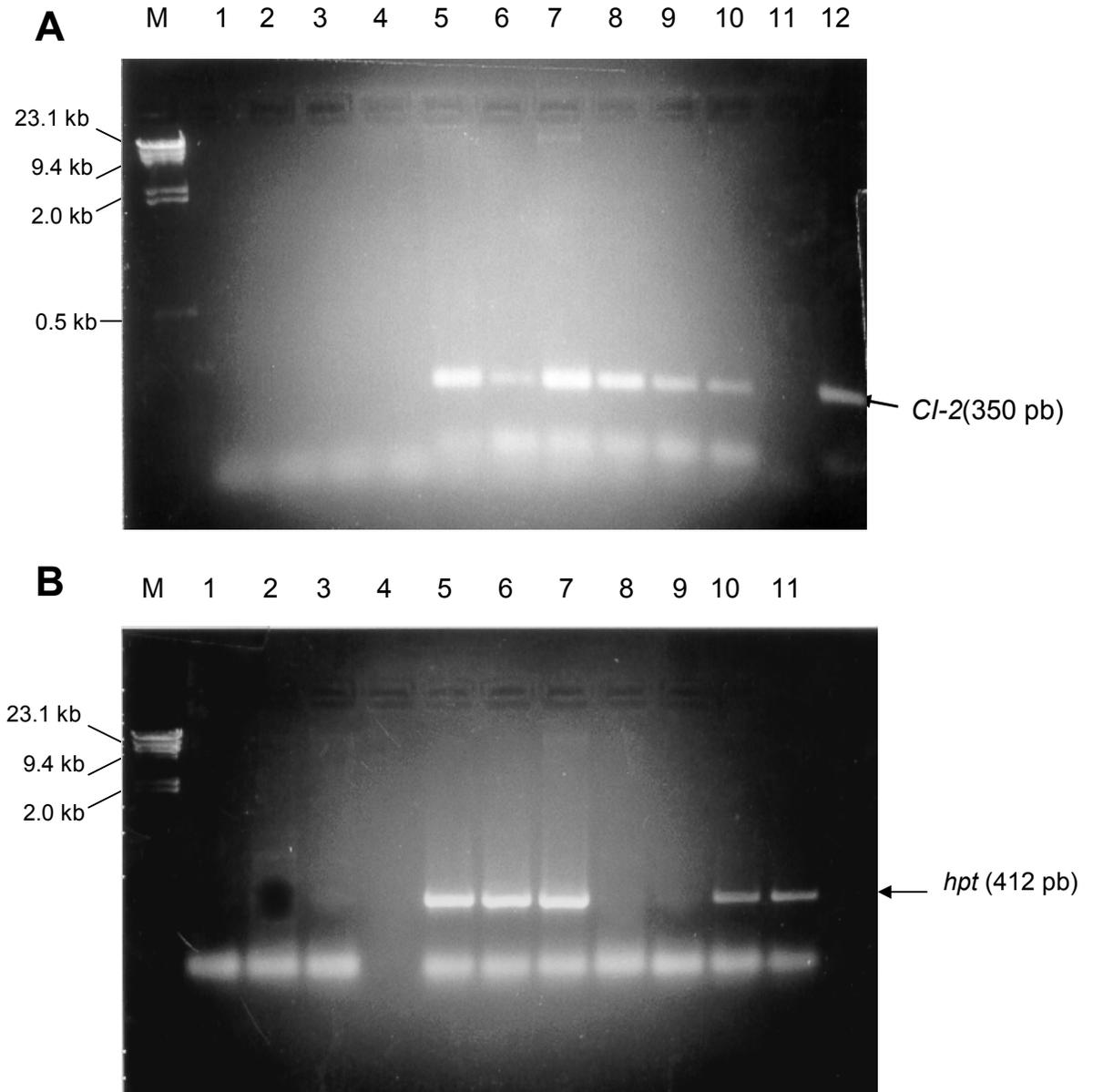
**Figura 64:** Gel de agarosa, al 1%, teñido con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (23.1; 9.4; 6.4; 4.1; 2.2 y 2.0 kb). Calle 1: pLUC1 linealizado con *EcoRV* ; calle 2: pLUC2 linealizado con *EcoRV* ; calle 3: pLUC1 cortado con *EcoRV* y *XbaI* para descolgar el inserto; calle 4: pLUC2 cortado con *EcoRV* y *XbaI* para descolgar el inserto.

Luego de comprobar que ambas construcciones fueron correctamente realizadas, se procedió a utilizar estos plásmidos para la transformación de plantas de trigo. Se realizaron 6 experimentos de bombardeo, tres de ellos con el plásmido pLUC1, y tres con el pLUC2. En todos los casos se utilizó el plásmido pGL2 (que contiene el gen *hpt*, que confiere resistencia a la higromicina), como plásmido selector. En los 6 experimentos se emplearon dos variedades comerciales de trigo pasta o candeal (*Triticum durum*) diferentes, llamadas Ambar y Cristal.

### 2.3.2. Búsqueda de posibles plantas transgénicas: análisis por PCR

De los 6 experimentos de bombardeo mencionados, se obtuvieron 160 plantas que fueron analizadas, en su totalidad, por PCR para el gen selector *hpt* y para el gen *C1-2*, de calidad nutricional. En la figura 65, panel A, se muestra

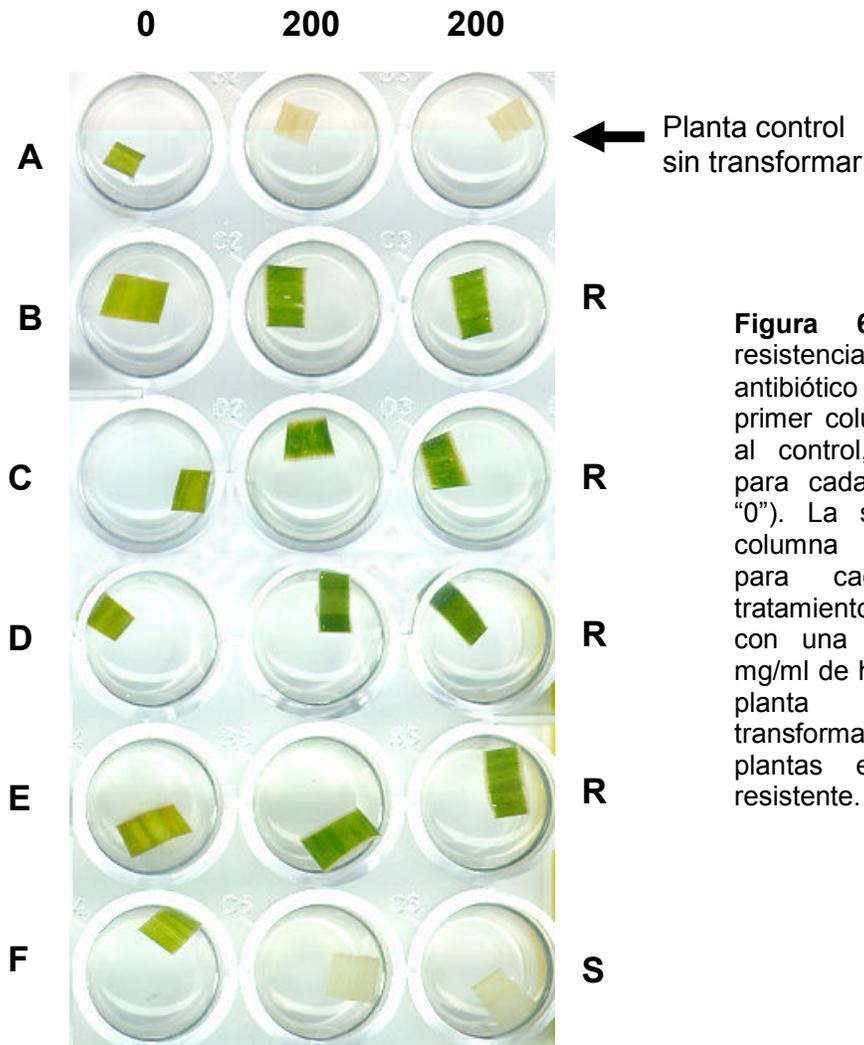
un gel de agarosa con los productos de amplificación por PCR del gen *Ci-2*, en el que se observa la presencia de 6 plantas positivas para el transgén (calles 5 a 10). Estas mismas plantas resultaron ser positivas, también, para la presencia del transgén *hpt*, según los resultados obtenidos por PCR para dicho gen, que se muestran en la figura 65, panel B (calles 5, 6, 7, 10 y 11).



**Figura 65:** Geles de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de etidio, con productos de amplificación del gen *Ci-2* (panel A) y *hpt* (panel B). M: marcador de peso molecular. Para ambos paneles: Calle 1: amplificación control, sin ADN. Calles 2 y 3: productos de amplificación de ADN de dos plantas controles sin transformar. Calles 5-11: productos de amplificación de ADN de 7 plantas experimentales de trigo. Calle 12 (panel A): control positivo (producto de amplificación del plásmido pLUC1).

### 2.3.3. Medida de actividad *hpt* in vivo

Se llevó a cabo la medida de resistencia al antibiótico higromicina, *in vivo*, en las 160 plantas procedentes de los 6 experimentos de calidad nutricional. En todos los casos, existió una muy buena correlación entre los resultados por PCR y los ensayos de resistencia a higromicina. En la figura 66, se muestran 4 plantas positivas (filas B-E), que no se ven afectadas por la presencia del antibiótico, y que ya habían resultado positivas, por PCR del gen *hpt* (figura 65, panel B, calles 5, 6, 7 y 10). En la fila F se observa una planta negativa para el transgén, en la que sus hojas se vuelven cloróticas al exponerse higromicina, el mismo efecto que experimenta la planta control, sin transformar, de la fila A.



**Figura 66:** Ensayo de resistencia *in vivo* al antibiótico higromicina. La primer columna corresponde al control, sin tratamiento, para cada planta (columna "0"). La segunda y tercer columna son duplicados, para cada planta, de tratamiento, durante 6 días, con una solución de 200 mg/ml de higromicina. Fila A: planta control, sin transformar. Filas B-F: plantas experimentales. R: resistente. S: sensible.

## **11. DISCUSION DE RESULTADOS**

### **CALIDAD PANADERA**

Hasta un 69% de la variación de la calidad panadera observada, entre harinas procedentes de diferentes variedades de trigo, puede ser atribuida a la variación alélica en el número y/o estructura y propiedades de las subunidades de glutenina de APM (45). Debido a que se ha demostrado que, el incremento en el número de genes de SG-APM, lleva a un aumento en la proporción de polímero elástico y, por lo tanto, con una mejora de la calidad panadera de la masa (figura 21) (56), se realizaron experimentos de transformación, de variedades de trigos argentinos, con los genes de las SG-APM *1Ax1* y *1Dx5*. En el presente trabajo de tesis, se describen los 7 eventos de transformación independientes obtenidos, en los que se logró expresar o sobreexpresar las subunidades de glutenina de APM *1Ax1* y/o *1Dx5*, asociadas con buena calidad panadera.

#### **11.1. SOBREENPRESIÓN DE SUBUNIDADES DE GLUTENINA DE APM**

##### **11.1.1. Sobreexpresión de la subunidad 1Dx5**

Se obtuvieron dos eventos transgénicos que sobreexpresan la subunidad de glutenina de APM *1Dx5* (eventos A y B, tabla 10). En el caso del evento A, mediante la introducción de 3 copias extras del gen *1Dx5* (determinadas por hibridización Southern, figura 28) se logró incrementar la expresión de dicha subunidad un 140%, o sea, más del doble de los valores hallados en los controles. En el evento B, la sobreexpresión de la subunidad *1Dx5* fue menor,

con valores que aumentaron un 40% por encima de los controles (tabla 11). Como resultado de ello, la contribución de las subunidades de glutenina de APM, al total de proteínas del endosperma, se incrementó un 22% y un 9%, en los eventos A y B, respectivamente (figura 27). En ambos eventos, la sobreexpresión de la subunidad 1Dx5 no se acompañó de un cambio significativo en la expresión de las demás subunidades de glutenina de APM, ni en el patrón de expresión de las subunidades de glutenina de BPM o de las gliadinas, comparado con los controles (tabla 11).

La subunidad de glutenina de APM 1Dx5 que se ha logrado sobreexpresar, se halla asociada con buena calidad panadera. Su característica distintiva más importante es que posee un residuo de cisteína adicional en el dominio amino terminal, cerca del límite con el dominio repetitivo (figura 14). Esto le confiere una mayor habilidad para formar polímeros con otras subunidades de glutenina de APM y BPM, otorgándole a la masa una mayor fuerza y superior calidad, al aumentar la proporción de polímero elástico (65) (efecto cualitativo). Pero también, ha sido demostrado que un incremento en el número de genes que codifican para las SG-APM, llevaría a un aumento en la cantidad absoluta y relativa de SG-APM totales, lo que acrecienta la proporción de polímero elástico y mejora la calidad panadera (efecto cuantitativo) (56) (ver "Introducción", sección 4.5.3). Barro y col. (67) han previamente obtenido la expresión del transgén 1Dx5 en variedades no comerciales de trigo, ya sea en una con 5 SG-APM diferentes (incluyendo 1Dx5), como en otra, que sólo expresa las subunidades 1Bx17 y 1By18. Al analizar las propiedades de mezclado de la masa resultante demostraron que, la expresión del transgén 1Dx5, se correlaciona con un incremento en la fuerza de la masa. Por lo tanto, es de esperar que el aumento

del 22% y 9%, en el contenido total de SG-APM, logrado en los eventos A y B, respectivamente, introduzca mejoras en las propiedades reológicas de la masa, aumentando la calidad panadera de la variedad de trigo transformada.

### **11.1.2 Sobreexpresión de la SG-APM 1Ax1**

Se logró sobreexpresar la subunidad de glutenina de alto peso molecular 1Ax1, en la variedad comercial argentina ProINTA Oasis (evento C, tabla 10). Con la introducción de sólo 1 copia extra del gen *1Ax1* (como se observa en la autorradiografía de la hibridización Southern de la figura 32), la expresión de la SG-APM 1Ax1 se incrementó un 44% por encima de los valores hallados en las semillas controles. Sin embargo, este aumento se acompañó de una disminución significativa de las subunidades 1Bx7 y 1By9, en un 50 y 40%, respectivamente (tabla 12). Este hecho podría deberse a un efecto conocido como “compensación del dosaje génico”, según el cual, el incremento de la expresión de una subunidad, se acompaña de la disminución en la expresión de alguna de las otras que conforman el polímero, en un intento por compensar dicha sobreexpresión, para mantener un valor constante de la cantidad total de SG-APM (143). Lo curioso es que este fenómeno no se da siempre, ya que, por ejemplo, no fue observado en ninguno de los dos casos de sobreexpresión de 1Dx5 (eventos A y B ya mencionados). Además, en este evento, el contenido de SG-APM, con respecto al total de proteínas, disminuye un 16% en relación a los valores hallados en semillas de plantas controles. Es decir que, la disminución de la expresión de las subunidades 1Bx7 y 1By9 estaría compensando, en exceso, la sobreexpresión de la subunidad 1Ax1 (figura 31).

Otra hipótesis, tendiente a explicar el fenómeno observado, es que podría tratarse de un caso de silenciamiento parcial, en el cual la introducción de un transgén (en este caso, *1Ax1*) induciría el silenciamiento de genes endógenos homólogos (*1Bx7* y *1By9*), un fenómeno que se describe con más detalle en la sección 11.3. de “Discusión de resultados”. Este hecho no se daría siempre y dependería, fundamentalmente, del número de copias introducidas (que, en este caso es bajo), y de la posición relativa entre el sitio de inserción del transgén y la ubicación de los genes endógenos homólogos, que podría favorecer el apareamiento ectópico entre ambos (un disparador del fenómeno de silenciamiento).

Independientemente del mecanismo involucrado, el puntaje de calidad panadera otorgado a la subunidad *1Ax1*, es mayor que el de cualquier alelo del genoma B (*1Bx7* y *1By9*, en este caso) (45), por lo que podría esperarse una mejora en la calidad panadera debido a la formación de un polímero más elástico.

## **11.2. Expresión de nuevas subunidades**

Dos eventos independientes, llamados D y E, resultaron transformados con el transgén *1Ax1*. Ambos pertenecen a la variedad comercial ProINTA Federal, que expresa 5 SG-APM diferentes, pero no presenta la subunidad *1Ax1*. De esta manera, como se muestra en las figuras 33 y 34, el número de subunidades aumentó de cinco a seis, algo que nunca hubiese sido posible por los métodos de mejoramiento clásicos.

El máximo nivel de expresión alcanzado por la subunidad *1Ax1* (la expresión del transgén es mayor en las semillas de plantas homocigotas para el

mismo), es de 1.8% y 2%, con respecto al total de proteínas extraíbles, para los eventos D y E, respectivamente (tabla 13). Estos valores son semejantes o, incluso mayores, que los valores promedio de expresión de la SG-APM 1Ax1 en variedades que la presentan en forma natural. Por ejemplo, en la tabla 12, se muestra que en semillas controles de la variedad ProINTA Oasis (que contiene 1Ax1 en forma natural), dicha subunidad representa el 1.6% con respecto al total de proteínas extraíbles. Estas observaciones indican que el transgén ha alcanzado un buen nivel de expresión en los dos eventos.

Una característica peculiar del evento D es la inesperada expresión de una banda extra al patrón de los controles, además de la subunidad 1Ax1, a la que llamamos "X". Esta banda tiene una expresión de 1.5% con respecto al total de proteínas (un nivel ligeramente inferior al alcanzado por la subunidad 1Ax1) (tabla 13). No sólo pudo comprobarse que no se trataba de un artefacto (como podría haber sido una falta de reducción de los puentes disulfuro que unen las subunidades entre si), sino que, además, pudo determinarse que su segregación en la descendencia era mendeliana, hallándose plantas homocigotas para la banda X (figura 36). En cuanto a la procedencia de esta banda, se supone que corresponde a un producto de rearrreglo génico de una de las copias del gen 1Ax1 o 1Dx5 introducidas. Las subunidades de glutenina de alto peso molecular contienen secuencias repetitivas que varían en extensión entre formas alélicas y homeoalélicas. Se cree que la expansión y contracción de estas repeticiones ha ocurrido durante la evolución natural de estas subunidades, a través de un proceso de *crossing over* desigual, durante la meiosis (67). De esta manera, por un mecanismo semejante, podría haberse producido una "contracción" de una de las copias introducidas por transformación, dando lugar a un producto génico de

menor tamaño, que migra más rápidamente en un gel de poliacrilamida (figura 33).

Una característica curiosa, que comparten los eventos D y E, es el silenciamiento total de la subunidad 1Ax2\*, que ocurre sólo en las semillas de plantas homocigotas para el transgén 1Ax1. La secuencia de aminoácidos de la subunidad 1Ax1 es muy similar a la de la subunidad 1Ax2\*, ya que difiere de ésta en la sustitución de sólo siete aminoácidos, y en la inserción de un hexapéptido y un nonapéptido en la región repetitiva (50). De todas las subunidades endógenas, la 1Ax2\* es la más homóloga al transgén 1Ax1 (es el único alelo conocido de 1Ax1) y, por lo tanto, la que tiene más posibilidades de silenciarse mediante un proceso similar al conocido como "**silenciamiento génico inducido por transgenes**" (144 y 145). En la mayoría de los casos en los que ha sido estudiado a nivel molecular, fue posible determinar que este silenciamiento es influenciado por características intrínsecas del transgén como presencia de secuencias repetitivas, homología con genes endógenos e introducción de alto número de copias, pero también, es muy importante el sitio y la forma en que se insertaron los transgenes en el genoma. Cuando la homología de las copias de los transgenes introducidas entre sí y/o, de éstas, con los genes endógenos, actúa como disparador de la inactivación génica (146 y 147), estaría involucrado un proceso de "**silenciamiento génico dependiente de homología**" que ha sido observado en numerosos sistemas de plantas transgénicas. Este fenómeno puede ocurrir cuando dos o más copias de un transgén, o un transgén con homología con un gen de planta endógeno, son integrados en el genoma de la planta produciéndose la inactivación de algunas o todas las copias (148). Aunque los resultados finales sean similares, los casos particulares de silenciamiento

génico homología dependiente pueden responder a mecanismos diferentes, existiendo varios criterios de clasificación. Uno de ellos es según el tipo de interacción entre regiones homólogas, pudiendo ser “**en cis**”, cuando las regiones homólogas están estrechamente ligadas o arregladas en tandem (generalmente es el tipo de interacción entre muchas copias transgénicas integradas en un mismo sitio) o, “**en trans**”, cuando se hayan involucradas regiones presentes en moléculas de ADN separadas (es el que se da entre transgenes insertados en el genoma, en sitios al azar, y su o sus genes endógenos homólogos) (144). Otro criterio es el grado de reciprocidad de la interacción (148). Algunos casos de silenciamiento génico homología dependiente son **recíprocos**, es decir, se produce la inactivación coordinada de los transgenes y los genes endógenos homólogos, y se conoce con el nombre de “**cosupresión**” (149 y 150). Sin embargo, otros efectos son claramente **no recíprocos**, siendo un gen dominante o epistático sobre el otro gen homólogo (148). Otro criterio de clasificación importante es según el nivel al que se produce la inactivación. Si la homología es en la región promotora, el silenciamiento es a nivel transcripcional y se denomina “**silenciamiento génico transcripcional dependiente de homología**” (**SGT**). Se caracteriza por un apareamiento ectópico, de secuencias promotoras homólogas, que lleva a la metilación del promotor y, por lo tanto, a una supresión de la transcripción. En cambio, si la homología es en la región codificante, el silenciamiento es a nivel post-transcripcional, y se denomina “**silenciamiento génico post-transcripcional dependiente de homología**” (**SGPT**). Se produce una disminución de la acumulación de ARNm del transgén, a pesar de que la actividad transcripcional es, aparentemente, normal (146 y 147). Si bien se han propuesto múltiples modelos para explicar el mecanismo del SGPT (151), el más

aceptado es que la interacción de las secuencias homólogas, ya sea en cis o en trans, produciría cambios en la metilación o en la estructura de la cromatina, llevando a la producción de un ARN aberrante, que sería mejor templado, para una ARN polimerasa ARN dependiente, que el ARNm. Esta enzima sintetizaría un ARN complementario (ARNc), que podría interaccionar con el ARNm, formando un ARN doble hebra que sería degradado por una ARNasa ARN doble hebra específica (152, 153 y 154).

En el caso del silenciamiento del gen endógeno 1Ax2\* inducido por el transgén 1Ax1, se cree que la homología no sólo es alta en la región codificante, sino también en las regiones promotoras de ambos genes, aunque estas últimas aún no han sido secuenciadas en su totalidad. De esta forma, no es posible predecir *a priori* (con solo comparar las secuencias), si se trata de un silenciamiento a nivel transcripcional o post-transcripcional. Con respecto al criterio de clasificación por reciprocidad, podría decirse que es “no recíproco”, ya que el transgén 1Ax1 se expresa normalmente y se silencia sólo el gen endógeno 1Ax2\*. Sin embargo, también sería posible que, sólo alguna o algunas de las copias introducidas, estuviesen participando del fenómeno de cosupresión con el gen endógeno 1Ax2\*, y la o las otras copias del o los transgenes se expresasen normalmente. En ambos casos, el resultado final sería el mismo: la expresión del transgén 1Ax1 asociada al silenciamiento del gen endógeno 1Ax2\*. Otra característica importante de este caso de silenciamiento es que, únicamente en las semillas de plantas homocigotas para el transgén 1Ax1, se produce el silenciamiento total de 1Ax2\*, lo que estaría sugiriendo un efecto de dosis del transgén, algo que ya ha sido reportado en la bibliografía para otros casos de silenciamiento génico en plantas (144 y 146).

A pesar de que se ha demostrado una estrecha asociación entre introducción de transgenes en un alto número de copias y silenciamiento génico (155 y 156), tanto en el evento D como en el E, el número de copias es bajo, de aproximadamente 3 (en total), como se muestra en las autorradiografías de la figura 37. En el análisis por hibridización Southern de una planta T2, del evento D (figura 37, panel A, calle DT2), se observa la presencia de dos bandas extras al patrón de SG-APM endógenas, de 4.5 y 4.9 kb. La banda de 4.5 kb podría corresponder al gen que codifica a la banda X debido a que, como ya se mencionó, se supone que procede de un producto truncado del transgén y, por lo tanto, de menor tamaño. Además, esta banda parece corresponder a una única copia (según los análisis densitométricos de la autorradiografía), en cambio la banda de 4.9 kb (que correspondería al transgén 1Ax1 completo), es de dos copias, estando de acuerdo con el mayor nivel de expresión alcanzado por la subunidad 1Ax1 (2 copias, 1.8%) que por la banda X (1 copia, 1.5%). Sin embargo, debido a que la sonda utilizada es incapaz de distinguir entre los genes que codifican para 1Ax1 o banda X, no es posible confirmar totalmente la identidad de cada banda.

Analizando los valores de densitometría de la subunidad 1Dx5, del evento E, mostrados en la tabla 13, parecería que existe una débil sobreexpresión de dicha subunidad, con un 25% por encima de los valores de los controles. Sin embargo, tanto por el análisis de la hibridización Southern (figura 37, panel B, calle ET1), en el que no se observa más que una banda extra al patrón endógeno (correspondiente al transgén 1Ax1), como por los estudios estadísticos, mediante los que no se hallaron diferencias significativas al 1%, con respecto a los valores

de los controles (prueba de Tukey) (157), fue posible descartar esta suposición inicial.

Con la expresión del transgén 1Ax1 y de la banda X, en el evento D, se logró un incremento en el contenido de SG-APM totales, del 14% con respecto a los valores hallados en los controles, a pesar del silenciamiento de la subunidad 1Ax2\*. En el evento E, dicho incremento fue aún mayor, del 21% por encima de los controles (figura 35). Se espera que estos aumentos en el contenido de SG-APM y, por ende, del polímero elástico, introduzcan mejoras en la calidad panadera de la variedad transformada.

### **11.3. Expresión de transgenes asociado al silenciamiento de todas las SG-A.P.M. endógenas**

En el evento D, que se discutió en la sección anterior (11.2 de “Discusión de resultados”), se halló una única planta T2 (procedente de una semilla que expresaba 1Ax1 y banda X), en cuyas semillas T3, las SG-APM endógenas están casi totalmente silenciadas, al igual que los transgenes 1Ax1 y banda X (figura 38). También pudo observarse, claramente, un patrón de expresión de gliadinas y SG-BPM alterado, en todas las semillas T3, con respecto a las semillas controles o, a las T1 y T2, de la misma línea. Esto podría deberse a que esta planta haya sufrido algún tipo de estrés ambiental, que dispararía la metilación de transgenes y/o genes endógenos homólogos o relacionados, a pesar de que ya habían sido expresados normalmente en las dos primeras generaciones. Meyer y col. han demostrado que, transgenes potencialmente

inestables, pueden ser hipermetilados en tejidos en cultivo sometidos a estrés ambiental, real o simulado, mediante el agregado de ácido propiónico o butírico (158). En los eventos F y G, también se produjo un silenciamiento de todos los genes de las SG-APM endógenas junto con la expresión de los transgenes 1Ax1 y 1Dx5 (tabla 10). Sin embargo, en ambos casos, la inactivación génica se manifestó desde la primera generación, y no se observó ninguna modificación en el patrón de expresión de SG-BPM y gliadinas. Mientras que el evento F se caracterizó por una débil expresión de los transgenes 1Ax1 y 1Dx5 (figuras 39 y 40), ya que representan sólo el 10% y el 50%, respectivamente, de los niveles que alcanzaron en los eventos A, C, D y E, en el evento G, la expresión de ambos transgenes fue alta (figuras 42 y 50).

Tanto el evento F como el G, tienen un alto número de copias de los transgenes introducidos, de unas 30, en el F (figura 41), y de 50, en el G (figura 43). Como ya se mencionó (sección 11.2.), los dos factores que más favorecen el fenómeno de "silenciamiento génico inducido por transgenes" son la homología de los mismos con genes endógenos, y la presencia de un alto número de copias. Aunque transgenes de copia única pueden inactivarse o inducir silenciamiento (147), como lo observado en el evento C (ver sección 11.2.), la integración de múltiples copias aumenta la eficiencia del silenciamiento (155 y 156). También es muy importante el sitio y la forma en que se insertaron los transgenes en el genoma. Copias ligadas son más eficientemente silenciadas que copias no ligadas, y loci no ligados muestran diferentes características en su capacidad silenciadora y en susceptibilidad de ser silenciados (146). En la sección 11.2, se mencionaron las diferentes clasificaciones de los distintos mecanismos involucrados en el fenómeno de "silenciamiento génico dependiente de

homología". En los eventos F y G (al igual que en C, D y E, en los que también se halló algún tipo de silenciamiento de genes endógenos), la interacción entre regiones homólogas se cree que es de tipo "*trans*", ya que es muy posible que las regiones homólogas involucradas (o sea, los transgenes, insertados en sitios del genoma al azar, y los genes endógenos homólogos), se encuentren, generalmente, en moléculas de ADN separadas o en sitios alejados. Tampoco es posible decir (al igual que en los demás eventos descritos en esta tesis), si el nivel al que se produce la inactivación es transcripcional o post-transcripcional, ya que es probable, que la homología de los transgenes 1Ax1 y 1Dx5, con los genes de las SG-APM endógenas, no sea sólo en la región codificante, sino también, en el promotor, aunque este último aún no se encuentre totalmente secuenciado para ninguna de las SG-APM. De todas formas, para el caso del transgén 1Dx5, la homología con el gen 1Dx5 endógeno es total, tanto en la región codificante como en el promotor, y no es posible predecir *a priori* a qué nivel será la inactivación. El único medio de saberlo sería a través de un ensayo de la cadena naciente (128) para los genes de SG-APM endógenos, en células de endosperma de semillas, con silenciamiento de dichos genes endógenos. Este es un método para medir la actividad transcripcional de un gen en un momento y lugar determinado. De esta forma, si este ensayo da un resultado negativo, el silenciamiento es a nivel transcripcional, y si da positivo, es post-transcripcional (o sea que, la transcripción es normal pero el ARNm tiene una vida media disminuida).

Con respecto al grado de reciprocidad de la interacción entre las secuencias homólogas, el hecho de que, en el evento F, se observe una débil expresión de los transgenes, junto con un silenciamiento de las SG-APM endógenas, estaría indicando una inactivación coordinada y recíproca de los

transgenes y los genes endógenos homólogos, algo semejante a lo que se conoce con el nombre de "cosupresión". Por el contrario, en el evento G, la expresión de los transgenes se mantiene alta, a pesar del silenciamiento de las SG-APM endógenas. De todas formas, igual podría estarse dando un fenómeno de cosupresión o inactivación recíproca con todos los genes endógenos de las SG-APM, en el que participarían sólo una parte de las copias introducidas. Sin embargo, también existirían copias que se expresarían normalmente, al no estar participando de ningún tipo de silenciamiento génico. Estas copias corresponden a los transgenes que permanecen activos, en las semillas que presentan una expresión alta de los mismos, acompañada de un silenciamiento de los genes endógenos homólogos de las SG-APM.

En lo que hace a la estabilidad del fenómeno de inactivación génica de todas las SG-APM, se hallaron claras diferencias entre los eventos. Mientras que en el D surgió una única planta con dicho silenciamiento, pero recién en la tercera generación, en el evento F, la inactivación de todas las SG-APM, estuvo presente en las semillas de todas las generaciones que se analizaron (en la figura 39 se muestra el análisis de las 3 primeras generaciones). En este caso, el fenómeno parece ser sumamente estable. Sin embargo, no sucedió lo mismo con el evento G, ya que fueron halladas semillas con reversión del fenómeno de silenciamiento de las SG-APM endógenas, tanto en la primera generación (figura 42, calle 2), como en la segunda (figura 47, panel A, calles 1, 3, 4 y 5). En estas semillas se observó una expresión fuerte del transgén 1Ax1 (1.2% del total de proteínas), y una sobreexpresión, del 40% por encima de los valores controles, de la subunidad 1Dx5, junto con un patrón normal de expresión de las SG-APM endógenas (tabla 15). Cuando esas semillas con reversión del silenciamiento de

las SG-APM endógenas fueron sembradas, y el ADN de las plantas resultantes analizado por hibridación Southern, se observó la presencia de sólo dos sitios de inserción diferentes (uno correspondía al transgén 1Ax1 y el otro a 1Dx5), y el número de copias presentes era sólo de 3 (figura 47, panel B, calles 1,2,4 y 5). Por el contrario, siempre que se analizó el ADN de una planta procedente de una semilla con silenciamiento de todas las SG-APM endógenas, se hallaron más de 20 sitios de inserción diferentes y unas 40-50 copias de transgenes (figura 43, panel A, calles 1, 2 y 3, panel B, calles 4 y 6, y figura 47, panel B, calle 3). Así, es posible deducir, nuevamente, que la presencia de un alto número de copias de los transgenes 1Ax1 y 1Dx5 indujo el silenciamiento de los genes endógenos homólogos de las SG-APM. Además, esto también se confirma por el hecho de que, cuando una de las hijas de una planta silenciada recibe sólo un bajo número de copias de los transgenes de la madre (por segregación de los mismos en la descendencia), el fenómeno de silenciamiento de los genes endógenos homólogos, revierte totalmente.

A pesar de la expresión de los transgenes 1Ax1 y 1Dx5, se produce una disminución del 91% del contenido total de SG-APM con respecto a los valores hallados en los controles, en el evento F (figura 40), y de 64%, en el evento G (figura 50, T2S), como consecuencia del silenciamiento de los genes que codifican para las SG-APM endógenas. Es indudable que, debido a la disminución del contenido total de SG-APM, habrá una menor formación del polímero elástico de glutenina, con la consiguiente reducción de la calidad panadera de la masa, por la pérdida de elasticidad. Sin embargo, esta harina podría ser utilizada para la obtención de otros productos. Como ya se mencionó en la sección 4.5.2, la elasticidad del gluten se conoce también como fuerza de la

masa. Mientras que masas fuertes son requeridas para la elaboración de pan, pasta y pizzas, glútenes menos elásticos o débiles son necesarios para la elaboración de galletitas y tortas (9). Payne y col. demostraron que el 25% de la variación en la calidad de la harina, procedente de diferentes cultivares de trigo, para la elaboración de galletitas y tortas, puede ser explicada mediante una relación inversa con el número y tipo de SG-APM presentes en cada cultivar (159). En este caso, a diferencia de lo que ocurre con la calidad panadera, cuanto menor es el número de SG-APM que se expresan, mayor es la calidad de la harina para la obtención de galletitas y tortas (160). De todo lo expuesto se deduce que, la calidad de una determinada variedad de trigo debería definirse en función de su adaptación a distintos usos, calificándolo como buena o mala para un determinado uso industrial. De allí que pueda decirse que la harina procedente de las semillas del evento F podría tener, en función de su baja composición en SG-APM, una mala calidad panadera, pero buena para la elaboración de galletitas y tortas.

En el gráfico de la figura 50 se observa que, en las semillas T3-6b (semillas homocigotas de la tercera generación de plantas con reversión del silenciamiento de las SG-APM), con la expresión de la subunidad 1Ax1 y la sobreexpresión de la 1Dx5, se logró incrementar el porcentaje de las SG-APM totales, con respecto al total de proteínas extraíbles, un 22% por encima de los valores hallados en las semillas de plantas controles. Se espera que este incremento, así como también, la expresión de una nueva subunidad, la 1Ax1 (asociada con buena calidad panadera), introduzca importantes mejoras en la cantidad y elasticidad del polímero de glutenina, mejorando con ello la calidad panadera de la harina elaborada con estas semillas.

#### 11.4. Cotransformación con genes selectores y o marcadores

La mayoría de los eventos transformados con los genes de las SG-APM 1Ax1 y 1Dx5, que se han descrito en esta tesis (llamados, arbitrariamente, A, B, C, D, E, F y G), resultaron también transformados con los genes *bar* y *uidA* (el primero confiere resistencia al herbicida glufosinato y, el segundo, codifica a la enzima  $\beta$ -glucuronidasa), ó con el gen *hpt* (que codifica para la enzima higromicina fosfotransferasa, que otorga resistencia al antibiótico higromicina). Como se muestra en la tabla 16, los eventos A, E y F fueron transformados con los genes *bar* y *uidA* (ambos contenidos en el plásmido pAHC25 que fue utilizado en el bombardeo), mientras que B, D y G, resultaron positivos para el gen *hpt*. Sólo en los dos eventos que presentaron un silenciamiento de todas las SG-APM endógenos, llamados F y G, se estudió la expresión de los genes selectores *bar* y *hpt*, respectivamente. En la figura 55, se muestra un ensayo de resistencia al herbicida glufosinato, en hojas de plantas controles y transgénicas para el gen *bar*. Las hojas tratadas de los controles (T en C1 y C2) se vuelven cloróticas, mientras que las de las plantas transgénicas (T en 1 y 2) no se alteran mediante el agregado del herbicida. De esta forma es posible deducir que el transgén *bar* se está expresando normalmente en el evento F, aunque no fue determinado el número de copias introducidas. Lo mismo ocurrió con la expresión del gen de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, en semillas de plantas transgénicas para el gen *uidA*, del evento F. En la figura 57, se muestra el ensayo de actividad de esta enzima, en el cuál, mediante una reacción histoquímica, la expresión de la enzima se pone en evidencia por la coloración azul de las semillas T4 (filas A, B y C). Estas semillas proceden de plantas T3, homocigotas para el transgén *uidA* y, también, para los transgenes 1Ax1 y 1Dx5.

En la figura 60, se muestra un esquema, a modo de resumen, de la segregación de los transgenes *1Ax1*, *1Dx5* y *hpt* en las primeras dos generaciones. Los cuadrados rojos representan a las plantas que contienen un alto número de copias de los transgenes *1Ax1* y *1Dx5*, y que proceden de semillas con una expresión fuerte de dichos transgenes, junto con el silenciamiento de los genes de SG-APM endógenos (T1 y T2 silenciadas). Mediante el análisis por PCR y la confirmación por hibridización Southern (figura 58, paneles A y B, calles 4, 5, 6, 7, 10 y 11), pudo determinarse la presencia de hasta 20 copias del transgén *hpt* en algunas plantas T1 (calles 4 y 11). De esta forma, las mismas plantas con alto número de copias para los transgenes *1Ax1* y *1Dx5* presentaron, también, un número elevado de copias de *hpt*. Sin embargo, cuando se estudió la resistencia, *in vivo*, al antibiótico higromicina, en hojas de estas plantas (figura 61, filas B, C, D, F, G y H), no se encontró diferencia con las hojas de plantas controles, sin transformar (filas A y B). Estos resultados indicarían que, el transgén *hpt* también estaría silenciado en estas plantas, ya que las hojas se vuelven tan cloróticas como las de los controles, al ser tratadas con el antibiótico. Este gen de resistencia a la higromicina, es un gen bacteriano y, por lo tanto, carece de homología con genes endógenos de plantas. En este caso, los factores que estarían induciendo el fenómeno de silenciamiento son el alto número de copias introducidas y la homología, del 100%, de las copias de *hpt* entre sí. Como ya se mencionó (sección 11.2), aunque transgenes de copia única pueden inactivarse o inducir silenciamiento (161), como lo observado en el evento C (ver sección 11.1.2.), la integración de múltiples copias (como en los eventos F y G), aumenta la eficiencia del silenciamiento (155 y 156).

En los análisis por PCR, para el gen *hpt*, del ADN de plantas T1 y T2 (T1: figura 58, panel A, calle 8; T2: figura 59, calles 5, 6, 7 y 8), procedentes de semillas que presentaron los transgenes 1Ax1 y 1Dx5, junto con una expresión normal de los genes de SG-APM endógenos, se observan resultados claramente negativos para la presencia del transgén *hpt*. En estas plantas, como ya se mencionó, la pérdida de gran parte de las copias de los transgenes 1Ax1 y 1Dx5 introducidos (durante la segregación), permitió la reversión del fenómeno de silenciamiento de las SG-APM endógenas pero, también, se perdieron todas las copias del transgén *hpt*. En el esquema de la figura 60, se las representan como círculos celestes (T1 y T2 con reversión del silenciamiento de los genes de SG-APM endógenas), mientras que, como ya se mencionó, los cuadrados rojos son las plantas con alto número de copias para los transgenes 1Ax1, 1Dx5 y *hpt* (T1 y T2 con silenciamiento de las SG-APM y del transgén *hpt*). Como se deduce claramente de los resultados obtenidos y de este esquema, los tres transgenes estarían cosegregando en la descendencia, lo que reflejaría el alto grado de ligamiento entre ellos, como consecuencia de la proximidad con la que se deben haber insertado en el genoma.

## 12. CONCLUSIONES

El trabajo de tesis permitió la obtención de plantas de trigo transformadas con los genes *1Ax1* y *1Dx5*, que codifican para dos subunidades de glutenina de alto peso molecular (SG-APM), asociadas con buena calidad panadera. Mediante la introducción del transgén *1Ax1* se logró incrementar el número de SG-APM de 5 a 6 (algo que no hubiese sido posible por los métodos de mejoramiento clásico). De esta forma, el contenido total de SG-APM aumentó un 21% por encima de los valores hallados en las semillas controles. En otros eventos, la sobreexpresión de la subunidad *1Dx5*, de hasta un 140%, llevó a un incremento de hasta el 20% en el contenido total de SG-APM.

En algunos eventos, la presencia de los transgenes *1Ax1* y *1Dx5* indujo la inactivación de los genes homólogos que codifican para las SG-APM endógenas, un fenómeno similar al conocido como “silenciamiento génico dependiente de homología”. Pudo comprobarse que, cuanto mayor es el número de copias introducidas y el grado de homología, de los transgenes con los genes endógenos, mayor es la posibilidad de que el fenómeno se manifieste. Se hallaron casos de reversión de este fenómeno, como consecuencia de la pérdida de la mayor parte de las copias de los transgenes introducidos, durante la segregación de las mismas en la descendencia.

Como parte de este trabajo de tesis, se obtuvo, también, trigo transgénico con el gen *Cl-2* de cebada, bajo un promotor de trigo, específico de endosperma. Este gen se caracteriza por su elevado contenido de lisina, un aminoácido esencial del que son deficientes las proteínas de endosperma de trigo.

- 1- Poehlman, J.M. (1979). *Mejoramiento genético de trigo. En: Mejoramiento genético de cosechas*. Limusa (Ed.) México DF, pp. 127-150.
- 2- Coscia, A. (1984). *Comercio internacional*. En: Economía de Trigo. Hemisferio Sur S.A. (Ed.). Buenos Aires, pp 16-21.
- 3- Vasil, V. , Castillo, A.M., Fromm, E.M. and Vasil, I.K. (1992). *Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus*. Biotechnology 10: 667-674.
- 4- Schaeffer, G.W., Lazar, M.D. and Baenziger, P.S. (1984). *Wheat*. In: Handbook of plant cell culture. Sharp, W.R. , Evans, D. A., Amirato, P.V. and Yamada, Y. (Ed.). Macmillan Publishing Company. New York. Vol. 2, cap. 5:119-136.
- 5- Ortiz JP (1995). *Ingeniería genética de cereales: cultivos de tejidos y transformación genética de trigo (Triticum aestivum L)*. Tesis Doctoral. Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.
- 6- USDA. (1999). *World Agricultural Production*. Foreign Agricultural Services. WAP 06- 99. U.S. Department of Agriculture. June.
- 7- USDA (1999). *World Agricultural Supply and Demand Estimates*. Foreign Agricultural Services. United States Department of Agriculture WASDE 351-16. June.
- 8- CIC (1999). *Informe del mercado de cereales*. Londres. Consejo Internacional de Cereales. Informe GMR 280, junio 24.
- 9- Shewry, P ; Tatham, A ; Barro, F; Barcelo, P; Lazzeri, P (1995) . *Biotechnology of Breadmaking : Unraveling and Manipulating the Multi-Protein Gluten Complex*. Biotech. 13, 1185-1189.
- 10- Porceddu, E; Lafiandra, D; Scarascia-Mugnozza, G (1995). *Genetics of Seed Proteins in Wheat*. In: Seed Proteins : Biochemistry, Genetics and Nutritive Value. W.Gottschalk, H.P. Müller editors; 77-127.
- 11- Hosney, R.C. (1994). *Pasta and noodles*. En: Principles of Cereal Science and Technology. Cap. 15, 321-334.
- 12- Shewry, P; Tatham, A ; Haldford, J ; Barker, J. ;Hannappel, U ; Gallois, P; Thomas, M; Kreis, M (1994) . *Opportunities for Manipulating the Seed Protein Composition of Wheat and Barley in Order to Improve Quality*. Transg. Res. 3, 3-12.
- 13- Wieser, H and Seilmeier, W. (1998). *The influence of nitrogen fertilisation on quantities and proportions of different protein types in wheat flour*. J. Sci. Food Agric. 76, 49-55.

- 14- Cuniberti, Martha. (1999). *Factores que influyen en la calidad panadera del trigo*. Trabajo especial realizado por el INTA en la Estación Experimental Marco Juárez. Trigo Suplemento Especial. Revista CREA (Consortio Regional de Experimentación Agrícola) N° 224, 38-44.
- 15- Graybosch, R. , Peterson, J. , Shelton, D. and Baenziger, S. (1996). *Genotypic and environmental modification of wheat flour protein composition in relation to end-use quality*. Crop Science vol. 36, N°2, 296-300.
- 16- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y alimentación (SAGPyA). (1999). *Trigo Argentino*. Informe institucional sobre su calidad. Cosecha 1998/ 99.
- 17- Rodríguez-Quijano, M. And Carrillo, J. M. (1996). *Relationship between allelic variation of Glu-1 and Gli-1/Glu-3 prolamin loci and gluten strength in hexaploid wheat*. Euphytica 91: 141-148.
- 18- Tombetta, E. y Cuniberti, M. (1994). *Utilización del mixógrafo de Swanson para la evaluación de la calidad en los programas de mejoramiento de trigo pan*. Informe técnico N° 105, ISSN 03277046, pág. 1-17. INTA centro Regional Córdoba.
- 19- Stearns, M. and Barta, S. (1990). *Mixograph standardization/ digital acquisition*. The American Association of Cereal Chemists. Cereal Foods World. 35, 485-488.
- 20- Swanson, C. and Johnson, J. (1943). *Description of mixograms*. Cereal Chem. Vol.20, 39-43.
- 21- Neufeld, K. and Walker (1990). *Evaluation of commercial wheat gluten using the mixograph*. The Am. Assoc. of Cer. Chem. 35, 667-669.
- 22- Hosney, R.C. (1994). *Structure of cereals*. En: Principles of Cereal Science and Technology. Cap. 1, 1- 13.
- 23- Galili, G. ; Shimoni, Y. ; Giorini-Silfen, S. ; Levanony, H. Altschuler, Y. and Shani, N. (1996). *Wheat storage proteins: assembly, transport and deposition in protein bodies*. Plant Physiol. Biochem. 34, 245-252.
- 24- Shewry, P. and Mifflin, B. (1984). *Seed storage proteins of economically important cereals*. En: Advances in Cereal Science and Technology, vol. VII, cap. 1, 1-78.
- 25- Richard, G. ; Turner, M. ; Napier, J. and Shewry, P. (1996). *Transport and deposition of cereal prolamin*. Plant Physiol. Biochem 34(2), 237-243.
- 26- Shewry, P. (1995). *Plant Storage Proteins*. Biol. Rev. 70, 375-426

- 27- Shewry, P ; Sayanova, O ; Tatham, AS; Tamas, L; Turner, M; Richard, G; Hickman, D ; Fido,R; Haldford, N; Greenfield, J; Grimwade, B; Thomson, N; Miles, M; Freedman, R; Napier, J (1995) . *Structure, Assembly and Targeting of Wheat Storage Proteins*. Plant Physiol. 145, 620-625.
- 28- Shewry,P. ; Napier, J. and Tatham, A. (1995). *Seed storage proteins: structures and biosynthesis*. Plant cell, 945-956.
- 29- Burkart, A. (1969). *Gramíneas. La familia botánica de los pastos*. En: Flora ilustrada de Entre Ríos. Parte II. Colección científica del INTA. Pp. 111-113.
- 30- Shewry, P; Miles, M ; Tatham, A (1994) . *The Prolamin Storage Proteins of Wheat and related Cereals*. Proq. Biophys. Molec. Biol. 61, 37-59.
- 31- Shewry, P., Sayanova, O., Tatham, A., Tamas, L., Turner, M., Richard, G., Hickman,D. , Fido,R. , Halford, N. , Greenfield, J. , Grimwade, B. , Thomson, N. , Miles, M. , Freedman, R. and Napier, J. (1995). *Structure, assembly and targeting of wheat storage proteins*. J. Plant Physiol. 145, 620-625.
- 32- Nieto- Taladriz, M. and Carrillo, J.M. (1996). *Complexity of Gli-A3 locus in bread wheat*. Plant breed. 115, 192-194.
- 33- Masci, S., D'Ovidio, R., Lafiandra, D. And Kasarda, D. (1998). *Characterization of Low- Molecular- Weight glutenin subunit gene from bread wheat and the corresponding protein that represents a major subunit of the glutenin polymer*. Plant Physiol. 118, 1147-1158.
- 34- Hosene, C. (1994) . *Glutenins Proteins*. In: Principles of Cereal Science and Technology. , 197-210.
- 35- Shewry, P ; Halford , N ; Tatham , A (1992) . *High Molecular Weight Subunits of Wheat Glutenin*. Critical Review Article. J. of Cer. Sci. 15, 105-120.
- 36- Wrigley, C. (1996). *Giant proteins with flour power*. Nature vol. 381,738-739.
- 37- Payne , P. (1983) : *Breeding for Protein Quantity and Protein Quality in Seed Crops*. Ann. Proceed. of Phytochem. Soc. of Eur. 20, 223-249.
- 38- Anderson, O. ; Greene, F. (1989) . *The Characterisation and Comparative Analysis of High-Molecular-Weight Glutenin Genes from Genomes A and B of Hexaploid Bread Wheat*. Theor. Appl. Genet. 77, 689-700.
- 39- Galili, G., Altschuler, Y., Levanony, H., Giorini-Silfen, S., Shimoni, Y., Shani, N. and karchi, H. (1995). *Assembly and transport of wheat storage proteins*. J. Plant Physiol. 145, 626-631.
- 40- Parker, M. L. (1980). *Protein body inclusions in developing wheat endosperm*. Ann. Bot. 46, 29-36.

- 41- Galili, G., Altschuler, Y., and Levanony, H. (1993). *Assembly and transport of seed storage proteins*. Trends Cell. Biol. 3, 437-443.
- 42- Rubin, R. , Levanoy, H. And Galili, G. (1992). *Characterization of two types of protein bodies in developing wheat endosperm*. Plant Physiol. 99, 718-724.
- 43- Nieto-Taladriz, M. , Perretant, M. And Rousset, M. (1994). *Effect of gliadins and HMW and LMW subunits of glutenin on dough properties in the F6 recombinant inbred lines from a bread wheat cross*. Theor. Appl. Genet. 88, 81-88.
- 44- Brett, G.M. , Mills, E. , Tatham, A. S. , Fido, R. , Shewry, P. R. and Morgan (1993). *Immunochemical identification of LMW subunits of glutenin associated with bread-making quality of wheat flours*. Theor. Appl. Genet. 86, 442-448.
- 45- Payne, P (1987): *Genetics of Wheat Storage Proteins and the Effect of Allelic Variation on Bread-Making Quality*. Ann. Rev. Plant Physiol. 38, 141-153.
- 46- Flavell, R. , Goldsbrough, A. , Robert, L. Schnick, D. and Thompson, R. D. (1989). *Genetic variation in wheat HMW glutenin subunits and the molecular basis of breadmaking quality*. Biotechnology 7, 1281-1285.
- 47- Shewry, P. , Field, M. , Faulks, A., Parmar, S. , Miflin, B. , Dietler, M. , Lew, E. and Kasarda, D. (1984). *The purification and N-terminal amino acid sequence analysis of the high molecular weight gluten polypeptides of wheat*. Biochim. et Biophys. Acta 788, 23-34.
- 48- Anderson OD, Greene FC, Yip RE , Halford NG, Shewry PR, Malpica-Romero JM (1989) *Nucleotide sequences of the two high-molecular-weight glutenin genes from the D-genome of a hexaploid bread wheat Triticum aestivum L. Cv. Cheyenne*. Nucl. Acids Res. 17, 461-462
- 49- Halford, N. , forde, J. , Anderson, O. , Greene, F. , Shewry, P. (1987). *The nucleotide and deduced amino acid sequences of an HMW glutenin subunit gene from chromosome 1B of bread wheat (Triticum aestivum L.) and comparison with those of genes from chromosomes 1A and 1D*. Theor. Appl. Genet. 75, 117-126.
- 50- Halford, NG; Field ,J; Blair, H; Urwin, P; Moore, K; Robert, L; Thompson, R; Flavell, R; Tatham, A ; Shewry, P (1992) . *Analysis of HMW Glutenin Subunits Encoded by Chromosome 1A of Bread Wheat Indicates Quantitative Effects on Grain Quality*. Theor. Appl. Genet. 83, 373-378
- 51- Thompson, R. , Bartels, D. and Harberd, N. (1985). *Nucleotide sequence of a gene from from chromosome 1D of wheat encoding a HMW glutenin subunit*. Nucl. Acids Res. 13, 6833-6846.
- 52- Tatham, A , Shewry, P. and Miflin, B. (1984). *Wheat gluten elasticity: a similar mechanism to elastin?*. FEBS Letts. 177, 205-208.

- 53- Miles , M., Carr, H. , Mc Master, T. , l'Anson, K. , Belton, P. , Morris, V. , Field, J. , Shewry , P. and Tatham, A. (1991). *Scanning tunnelling microscopy of wheat gluten protein reveals details of an unusual supersecondary structure*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 68-71.
- 54- Tatham, A. , Drake, A. and Shewry, P. (1990). *Conformational studies of synthetic peptide corresponding to the repetitive regions of the high molecular weight subunits of glutenin*. J. Cereal Sci. 11, 189-200.
- 55- Chou, P and Fasman, G (1978). *Empirical predictions of protein conformations*. A. Rev. Biochem. 47, 251-276.
- 56- Vasil, I. and Anderson, O. (1997). *Genetic engineering of wheat gluten*. Trends in Plant Sci. 2, 292-297.
- 57- Venkatachalam, C. and Urry, D. (1981). *Development of a linear helical conformation from its cyclic correlate.  $\beta$ -spiral model of the elastin polypentapeptide (VPGVG) $_n$* . Macromol. 14, 1225-1231.
- 58- Belton, P. , Colquhoun, I. , Field, J. , Grant, A. , Shewry, P. and Tatham, A. (1994).  *$^1H$  and  $^2H$  NMR relaxation studies of a high Mr subunit of wheat glutenin and comparison with elastin*. J. of Cer. Sci. 19, 115-121.
- 59- Galili, G. (1989). *Heterologous expression of a wheat high molecular weight glutenin gene in Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 7756- 7760.
- 60- D'Ovidio, R. , Anderson, O. , Masci, S. , Skerritt, J. and Porceddu, E. (1997). *Construction of novel wheat high-Mr glutenin subunit gene variability: modification of the repetitive domain and expression in E. coli*. Journal of Cereal Science 25, 1-8.
- 61- Anderson, O. Kuhl, J. and Tam, A. (1996). *Construction and expression of a synthetic wheat storage protein gene*. Gene 174, 51-58.
- 62- Shimoni, Y. , Blechl, A. , Anderson, O. and Galili, G. (1997). *A recombinant protein of two high molecular weight glutenins alters gluten polymer formation in transgenic wheat*. J. Biol. Chem. 272, 15488-15495.
- 63- Payne, P; Lawrence, G (1983) .*Catalogue of Alleles for the Complex Gene loci, Glu-A1, Glu-B1, and Glu-D1 With Code for High-Molecular-Weight Subunits of Glutenin in Hexaploid Wheat*. Cer. Res. Comm. 11, 29-35.
- 64- Goldsbrough, A; Bulleid, N; Freedman, R; Flavell, R (1989) . *Conformational Differences Between Two Wheat (Triticum aestivum) High-Molecular-weight Glutenin Subunits are Due to a Short Region Containing Six Amino Acid Differences*. Biochem.J. 263, 837-842.
- 65- Lafiandra, D. ; D'Ovidio, R. ; Porceddu, E. ; Margiotta, B. and Colaprico, G (1993) . *New Data Supporting High Mr Glutenin Subunit 5 as the Determinant*

- of Quality Differences among the pairs 5+10 vs. 2+12* .J. of Cer. Sci. 18, 197-205 .
- 66- Seilmeier, W. , Belitz, H. And Wieser, H. (1991). *Separation and quantitative determination of high-molecular-weight subunits of glutenin from different wheat varieties and genetic variants of the variety Sicco*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 192, 124- 129.
- 67- Barro, F. ; Rooke, L ; Békés, F. ; Gras, P. ; Tatham, A. , Fido, R. ; Lazzeri, P. ; Shewry, P. ; Barceló, P. (1997) . *Transformation of Wheat With High Molecular Weight Subunit Genes Results in Improved Functional Properties*. Nature Biotechnology. 15,1295-1299.
- 68-Johansson, E. , Henriksson, P. , Svensson, G. and Heneen, W. (1993). *Detection, chromosomal location and evaluation of the functional value of a novel high Mr glutenin subunit found in swedish wheats*. Journal of Cereal Science 17, 237-245.
- 69- Payne, P. , Holt, L. , Krattiger, A. and Carrillo, J. (1988). *Relationships between seed quality characteristics and HMW glutenin subunit composition determined using wheats grown in Spain*. Journal of Cereal Science 7: 229-235.
- 70- Tahir, M. , Hussain, A. , Turchetta, T. and Lafiandra, D. (1995). *The HMW glutenin subunit composition of bread-wheat varieties bred in Pakistan*. Plant Breed. 114, 442-444.
- 71- Lukow, O. , Payne, P. and Tkachuk, R. (1989). *The HMW glutenin subunit composition of Canadian wheat cultivars and their association with bread-making quality*. J. Sci. Food Agric. 46, 451-460.
- 72- Tombetta, E. , Bushuk, W. y M. B. Cuniberti. (1990). *Evaluación de la calidad de cultivares de trigos argentinos mediante electroforesis de gluteninas de alto peso molecular y de metodología tradicional*. Congreso Nacional de Trigo. Cap. III, 43-52.
- 73- Tombetta, E. y Nisi, J. (1994). *Propuestas técnicas para mejorar la calidad*. Revista de la Bolsa de Comercio de Rosario N° 1463, 30-34.
- 74- Chrispeels, Maarten ; Sadava, David (1994) . *Human Energy Requirements Differ Depending on Age, Body Weight, and Activity*. In: Plants, genes and Agriculture; 90-113.
- 75- Salunkhe, D. And Deshpande, S. (1991). *Foods of Plant Origin*. Ed. Van Nostrand Reinhold
- 76- FAO (1973). *Energy and Protein Requirements* . Fao Nutricional Meeting Report Serial N° 52. Who Technical Report Serial N° 522, Rome.

- 77- Shewry, P; Kreis M (1988) . *The development and Composition of barley Grain: Relationship to End Use, and Potential for Manipulation*. *Alternative End Uses of Barley*, 61-66.
- 78- Giese, H. And Hejgaard, J. (1984). *Synthesis of salt-soluble proteins in barley. Pulse-labeling study of grain filling in liquid-cultured detached spikes*. *Planta* 161: 172-177.
- 79a- Rasmussen, U. , Williamson, M. , Mundy, J. and Kreis, M. (1988). *Differential effects of the hiproly lys1 gene on the developmental synthesis of (lysine-rich) proteins from barley endosperm*. *Plant Sci.* 55, 255- 266
- 79b-Williamson, MS; Forde, J; Buxton, B; Kreiss, M (1987) . *Nucleotide Sequence of Barley Chymotrypsin Inhibidor-2 (Ci-2) and its expression in normal and high-lysine barley*. *Eur.J.Biochem.* 165, 99-106.
- 80- Kreis, M. and Doll, H. (1980). *Starch and prolamin level in single and double high-lysine barley mutants*. *Physiol. Plant.* 48, 139-143.
- 81- Williamson, M; Forde, J; Kreis, M (1988) . *Molecular Cloning of two Isoinhibitor Forms of Chymotrypsin Inhibitor 1 (CI-1) From Barley Endosperm and Their Expression in Normal and Mutant Barleys* . *Plant Mol. Biol.* 10, 521-535
- 82- Peterson, D; Forde, J; Williamson, M; Rhode, W; Kreis, M (1991) . *Sequence of Chymotropsin Inhibitor-2 gene of Barley( Hordeum vulgare L.)*. *Plant Physiol.* 96, 1389-1390.
- 83- Watson, J. , Gilman, M. , Witkowski, J. and Zoller, M. (1993). *Genetic engineering of plants*. Chapter 15 in: *Recombinant DNA*. 2<sup>nd</sup> edition. Scientific American ed. New york.
- 84- Birch, r. (1997). *Plant transformation: problems and strategies for practical application*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 297-326.
- 85-Christou, P. (1992). *Genetic transformation of crop plants using microprojectiles bombardment*. *Plant J.* 2, 275-281.
- 86- Christou, P. (1996). *Transformation technology*. *Trends Plant Sci.*1, 423- 431.
- 87- Horsch, R. , Fraley, R. , Rogers, S. , Sanders, P. Lloyd, A. and Hoffman, N. (1984). *Inherence of functional foreign genes in plants*. *Sci.* 223, 496-498.
- 88- Gelvin,S. (1998). *The introduction and expression of transgenes in plants*. *Curr. Op. in Biotech.* 9, 227- 232.
- 89- De Block, M., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., Shell, J. and Zambryski, P. (1984). *Expresión of foreign genes in regenerated plants and their progeny*. *EMBO J.* 3, 1681- 1689.

- 90- De Cleene, M. and De Ley, J. (1976). *The host range of crown gall*. J. Bot. Rev. 42, 289-466.
- 91- Chilton, M. , Drumond, M. , Merlo, D. , Sciaky, D. , Montoya, A. , Gordon, M. and Nester, E. (1977). *Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular bases of crown-gall tumor genesis*. Cell 11, 263-271.
- 92- Hoekema, A. , Hirsch, P. , Hocokaas, P. and Shilpertoort, R. (1983). *A binary plant vector strategy based on separation of vir and T regions of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid*. Nature 303, 179-180.
- 93- Zambrysky, P. , Joos, H. , Genetello, C. , Leemans, J. , Van Montagu, M. and Schell, J. (1983). *Ti plasmid vector for introduction of DNA into plants cells without alteration of their normal regeneration capacity*. EMBO J. 2, 2143-2150.
- 94- Goodman, R. (1993). *Transgenic plants from solanaceae*. En: Transgenic plants, vol. 2. Present status, and social and economic impacts. Kund, S. y Wu, R. (Eds.) pp. 49-78. Academic Press, inc. Nueva York, USA.
- 95- White, F. (1993). *Vectors for gene transfer in higher plants*. En: Transgenic Plants, Engineering and utilization, vol. 1. Kung, K. y Wu, R. (Rds.), pp. 15-48. Academic Press, Inc, New York, USA.
- 96- Vasil, I. (1993). *Molecular genetic improvement of cereal and grass crops*. Newsletter N° 72 pp. 2-10.
- 97- Graves, A. and Goldman, S. (1986). *The transformation of Zea mays seedlings with Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol. Biol. 7, 42-50.
- 98- Raineri, D. , Bottino, P. , Gordon, M. and Nester, E. (1990). *Agrobacterium mediated transformation of rice (Oriza sativa L.)*. Biotech. 8, 33-38.
- 99- Hess, D. , Dressler, K. and Nimmrichtere, R. (1990). *Transformation experiments by pipetting Agrobacterium into spikelets of wheat (Triticum aestivum L.)*. Plant Sci. 72, 233-244.
- 100- Cheng, M. , Fry, J. , Pang, S. , Zhou, H. , Hironaka, C. , Duncan, D. , Conner, T. and Wan , Y. (1997). *Genetic transformation of wheat mediated by Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol. 115, 971-980.
- 101- Potrykus, I. (1990). *Gene transfer to cereals: an assessment*. Biotech. 6, 535-542.
- 102- Shillito, E., Saul, M. , Paszkowski, J. , Muller, M. and Potrykus, I. (1985). *High efficiency direct gene transfer to plants*. Biotech. 3, 1099-1103.
- 103- Fromm, M. , Taylor, L. and Walbot, V. (1986). *Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation*. Nature 319, 791-793.

- 104- Dekeyser, R. , Claes, B. , Marichal, M. Van Montagu, M. And Caplan, A. (1989). *Evaluation of selectable markers for rice transformarion*. Plant Physiol. 90,217-223.
- 105- Klein, T. , Wolf, E. Wu, R. and Sanford, J. (1987). *High velocity microprojectiles for delivery of nucleic acid into living cells*. Nature 327, 70-73.
- 106- Fromm, M. , Morrish, F. , Armstrong, C. , Williams, R. , Thomas, J. and Klein, T. (1990). *Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants*. Biotech. 8, 833-839.
- 107- Sanford, J. , Smith, F. and Russell, J. (1992). *Optimizing the biolistic process for different biological applications*. Meth. Enzymol 6, 223-247.
- 108- Gordon-Kamm, W. , Spencer, T. , Mangano, M. , Adams, T. , Daines, R. , Start, G. , O'Brien, J. , Chambers, S. , Adams, W. , Willets, N. , Rice, T. , Mackey, C. , Krueger, R. , Kausch, A. and Lemaux, P. (1990). *Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants*. Plant Cell 2, 603-618.
- 109a- Sanford, J. , Klein, T. , Wolf, E. and Allen, N. (1987). *Delibery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process*. J. Par. Sci. Tech. 6: 559-563.
- 109b- Sanford, J. (1990). *Biolistic plant transformation*. Physiol. Plant. 79, 206-209.
- 110- Christou, P. (1993). *Particle gun mediated transformation*. Curr. Op. Biotech. 4, 135-141.
- 111- Spitteler, M.A.; Arana, J.L.; Reggiardo, M.I. y Vallejos, R.H. (1990) *Desarrollo de un aparato acelerador de microproyectiles para la transformación genética de células y tejidos*. Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 42, 237-242.
- 112-Reggiardo, M. , Arana, J. , Orsaria, L. , Permingeat, H. , Spitteler, M. and Vallejos, R. (1991). *Transcient transformation of maize tisúes by microparticle bombardment*. Plant Sci. 75, 237-243.
- 113-Permingeat, H. (1995). *Ingeniería genética de maíz (Zea mays L.)*. Tesis Doctoral. Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario
- 114- Arana, J. , Reggiardo, M. , Permingeat, H. , Spitteler, M. , López, M. , Orsaria, L. y Vallejos, R. (1991). *Estudio de la transformación transiente de células de maíz por bombardeo de microproyectiles de alta densidad*. Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 42: 243-250.

- 115- Ortiz, J. P. , Reggiardo, M. , Spitteler, M. y Vallejos, R. (1992). *Transformación estable de alfalfa (Medicago sativa) empleando micropartículas aceleradas*. An. Asoc. Quím. Argent. 80,159-166.
- 116- Romagnoli, M.V.; Heisterborg, C.M.; Morre, J.L.; Permingeat, H.R.; Ravizzini, R.A.; Spitteler, M.A.; Vallejos, R.H. (1994) *Transformación estable de una línea celular argentina de algodón (Gossypium hirsutum L.) mediante bombardeo con micropartículas aceleradas*. Libro de Resúmenes de la XXX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB), Puerto Iguazú, Misiones, 26-29 de Octubre de 1994.
- 117- Ortiz, Juan Pablo ; Reggiardo, Martín ; Ravizzini, Ricardo; Altabe, Silvia; Cervigni, Gerardo ; Spitteler, Marcelo; Morata, Mónica ; Elías, Fernando and Vallejos, Rubén (1996). *Hygromycin Resistance as an Efficient Selectable Marker for Wheat Stable Transformation* . Plant Cell Rep. 15, 877-881.
- 118- Ortiz, J. P. , Reggiardo, M. , Altabe, S. , Cervigni, G. , Spitteler y Vallejos, R. (1994). *Rápida y eficiente transformación estable de trigo (Triticum aestivum L.)*. Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 46, 181-190.
- 119-Spitteler , M. , Arana , J. , Reggiardo , M. , y Vallejos , R. (1994) . *Transgenic Wheat : Rapid and Efficient Method for Stable Transformation*. Annual Wheat Newsletter vol. 40 , p. 46.
- 120- Ortiz JP, Ravizzini RA, Morata MM, Vallejos RH (1997) *A rapid system for studying foreign gene expression in wheat (Triticum aestivum L.)*. J Appl Genet 38, 123-130
- 121-Murashige T, Skoog F. (1962). *A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue culture*. Physiol. Plant. 15, 473-479
- 122- Christensen AH, Quail PH (1996). *Ubiquitin promoter based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants*. Trans. Res. 5, 213-218.
- 123- Thompson, C.J., Mova, R.N., Tizard,R. , Cramieri,R. , Davies, J.E. , Lawreys,M. Y Bottermann, J. (1987). *Characterization of the herbicide-resistance gene bar from Streptomyces hygrosopicus*. EMBO J. 9,2519-2523.
- 124- Shimamoto K, Terada R, Izawa T, Fugimoto H (1989) *Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts*. Nature 338, 274-276
- 125- Waldron C. , Murphy E.B. , Roberts J.L. , Gustafson G.D. , Armour S.L. and Malcom S.K. (1985). *Resistance to hygromycin B, a new marker for plant transformation studies*. Plant Mol. Biol. 5, 103-108.

- 126- Halford NG , Forde J, Shewry PR, Kreis M (1989) *Functional analysis of upstream regions of a silent and an expressed member of a family of wheat seed protein genes in transgenic tobacco*. Plant Sci. 62, 207-216.
- 127- Murray, H ; Thompson, W.(1980). *Rapid Isolation of High Molecular Weight DNA*. Nucl. Acids Res. 8, 4321-4325.
- 128- Sambrook , J. , Fritsch , E. ; Maniatis, T. (1990) . *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 129- Rogers, S. and Bendich, A. (1985). *Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues*. Plant Mol. Biol. 5, 69-76.
- 130- Edwards,K. , Johnstone, C. Y Thompson, C. (1991). *A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis*. Nucl. Acids Res. 19, 1349.
- 131- The DIG system User's Manual (1997) [www.Boehringer-mannheim.com](http://www.Boehringer-mannheim.com)
- 132- Mertz, L. ; Rashtchian, A. (1994) . *Nucleotide imbalance and polymerase chain reaction: effects on DNA amplification and synthesis of high specific activity radiolabeled DNA probes*. Anal. Biochem. 221, 160-165.
- 133- Shewry, P; Tatham, A; Fido, R (1995) . *Separation of Plant Proteins by Electrophoresis*. In: Methods in Molecular Biology. 2nd ed. Vol. XX. (Ed: H.Jones) Humana Press Inc., Totowa,NJ., 1-26.
- 134- Smith, J. and Gallagher, S. (1993). Analysis of Proteins. In : Current Protocols in Molecular Biology 2., 10.0.1-10.2.21.
- 135- Jefferson R.A. (1987). *Assaying chimeric genes in plants: the gus gene fusion system*. Plant Mol. Biol. Rep. 4, 387-405.
- 136- Harberd, N. , Thompson, R. and Bartels, D. (1986). *DNA Restriction-Fragment Variation in the Gene Family Encoding High Molecular Weight (HMW) Glutenin Subunits of Wheat*. Biochem. Genet. 24, 579-596.
- 137- Bunce, N. , White, R. and Shewry, P. (1985). *Variation in estimates of molecular weights of cereal prolamins by SDS-PAGE*. J. of Cer. Sci. 2: 131-142.
- 138- Yoder, J.I. and Goldsbrough, A.P. (1994). *Transformation systems for generating marker-free transgenic plants*. Biotechnology 12, 263-267.
- 139- Goldsbrough, A. (1992) *Marker gene removal: a practical necessity?*. Trends Biotechnol. 10, 417.
- 140- Gressel, J. (1992). *Indiscriminate use of selectable markers - sowing wild oats?*. Trends Biotechnol. 10, 382.

- 141- Beier, H. ; Barciszewska, M. ; Krupp, G. Mitnacht, N. ; Gross, H. (1984). *UAG readthrough during TMV RNA translation: isolation and sequence of two tRNAs<sup>Tyr</sup> with suppressor activity from tobacco plants*. EMBO J. 3, 351-356.
- 142- Schaffer, H and Sederoff, L (1981). *Improved Estimation of DNA Fragment Lengths from Agarose Gels*. Anal. Biochem. 115, 113-122
- 143- Galili, G. ; Avraham, A. ; Feldman, M. (1986) . *Gene- dosage compensation of endosperm proteins in hexaploid wheat Triticum aestivum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38, 6524-6528.
- 144- Vaucheret, H. ; Béclin, C. ; Elmayan, T. ; Feuerbach, F. ; Godon, C. ; Morel, J.B. ; Mourrain, P. ; Palauqui, J.C. and Vernhettes, S. (1998). *Transgene – Induced Gene Silencing in Plants*. Plant J. 16, 651 – 659.
- 145- Finnegan, J. and Mc Elroy, D. (1994). *Transgene Inactivation: Plants Fight Back!*. Biotech. 12 , 883- 888.
- 146- Meyer, P. (1996). *Homology-dependent Gene Silencing in Plants*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47, 23-48.
- 147- Depicker, A. And Van Montagu, M. (1997). *Post-transcriptional Gene Silencing in Plants*. Curr. Op. in Cell Biol. 9, 373-382.
- 148- Matzke, A. ; Neuberger, F. ; Park, Y. ; Ambros, P. and Matzke, M. (1994). *Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes*. Mol. Gen. Genet. 244, 219-229.
- 149- Napoli, C. ; Lemieux, C. And Jorgensen, R. (1990). *Introduction of Chimeric Chalcone Synthase Genes into Petunia Results in Reversible Co-suppression of Homologous Genes in Trans*. Plant Cell 2, 279-289.
- 150- Jorgensen, R. (1990). *Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes*. Tibtech 8, 340- 344.
- 151- Baulcombe, D. (1996). *RNA as a Target and a Initiator of Post-transcriptional Gene Silencing in Transgenic Plants*. Plant Mol. Biol. 32, 125-137.
- 152- Baulcombe, D. And English, J. (1996). *Ectopic Pairing of Homologous DNA and Post-transcriptional Gene Silencing in Transgenic Plants*. Current Opinion in Biotech. 7, 173-180.
- 153- Vaucheret, H. ; Béclin, C. ; Elmayan, T. ; Feuerbach, F. ; Godon, C. ; Morel, J.B. ; Mourrain, P. ; Palauqui, J.C. and Vernhettes, S. (1998). *Transgene – Induced Gene Silencing in Plants*. Plant J. 16, 651 – 659.

- 154- Cogoni,C and Macino,G. (1999). *Gene Silencing in Neurospora Crassa Requires a Protein Homologous to RNA-Dependent RNA Polymerase*. Nature 399, 166- 169.
- 155- Hobbs,S. ; Kpodar,P. And Delong,C. (1990). *The Effect of T-DNA Copy Number, Position and Methylation on Reporter Gene Expression in Tobacco Transformants*. Plant Mol. Biol. 15, 851- 864.
- 156- Assad, F ; Tucker,K. ; Singer, E. (1993). *Epigenetic Repeat- Induced Gene Silencing (RIGS) in Arabidopsis*. Plant Mol. Biol. 22, 1067-85.
- 157- Daniel, W. (1997). *Análisis de la variancia*. En: *Bioestadística para el análisis de las ciencias de la salud*. Tercera edición. Editorial Limusa, S.A., México, D.F. , cap. 7, 367-369.
- 158- Meyer, P. (1995). *Understanding and controlling transgene expression*. Trends Biotech. 13, 332-337.
- 159- Payne, P.; Seekings, J. ; Worland, J. ; Jarvis, M. and Holt, L. (1987). Allelic variations of glutenin subunits and gliadins and its effect on breadmaking quality in wheat: analysis of F5 progeny from Chinese Spring X Chinese Spring (Hope 1A). J. Cer. Sci. 6, 103-118.
- 160- Labuschagne, M. and Van Deventer, C.S. (1995). *The effect of Glu-B1 high molecular weight glutenin subunits on biscuit-making quality of wheat*. Euphytica 83, 193-197.
- 161- Elmayan, T. and Vaucheret, H. (1996). *Expression of Single Copies of Strongly Expressed 35S Transgene Can be Silenced Post-Transcriptionally*. Plant J. 9, 787-797.