



Universitat de Girona

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS NO INTENCIONADOS DE LOS TRANSGENES EN PLANTAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE (MG) RESISTENTES A PLAGAS Y DISEÑADAS COMO BIOFACTORÍAS DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Maria MONTERO MIRABET

Dipòsit legal: GI. 86-2013

<http://hdl.handle.net/10803/7xxx>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Tesis doctoral

Evaluación de los efectos no intencionados de los transgenes en plantas modificadas genéticamente (MG) resistentes a plagas y diseñadas como biofactorías de péptidos antimicrobianos

Maria Montero Mirabet

Girona, 2012



Tesis doctoral

Evaluación de los efectos no intencionados de los transgenes en plantas modificadas genéticamente (MG) resistentes a plagas y diseñadas como biofactorías de péptidos antimicrobianos

Maria Montero Mirabet

2012

Programa de doctorado:
Tecnología

Dirigida por:
Dra. Maria Pla de Solà-Morales
Dra. Anna Nadal Matamala

Memoria presentada para optar al título de doctora por la Universitat de Girona

Maria Montero Mirabet

Dra. Maria Pla de Solà Morales

Dra. Anna Nadal Matamala



Dra. Maria Pla de Solà-Morales, profesora titular del área de tecnología de los alimentos del departamento de ingeniería química, agraria y tecnología agroalimentaria y directora del instituto de tecnología agroalimentaria de la Universitat de Girona

I

Dra. Anna Nadal Matamala, investigadora del instituto de tecnología agroalimentaria de la Universitat de Girona,

CERTIFICAMOS QUE,

Este trabajo, titulado “Evaluación de los efectos no intencionados de los transgenes en plantas modificadas genéticamente (MG) resistentes a plagas y diseñadas como biofactorías de péptidos antimicrobianos” presentado por Maria Montero Mirabet para la obtención del título de doctora por la Universitat de Girona ha estado realizado bajo nuestra dirección.

Parte de los resultados generados en esta tesis han sido publicados en la revista científica *Plant Biotechnology Journal* con un factor de impacto en el año 2010 de 4.886. El título de la publicación en que Maria Montero Mirabet consta como autora principal es “*Only half the transcriptomic differences between resistant genetically modified and conventional rice are associated with the transgene*” y hace referencia a los estudios realizados con la variedad de arroz Senia modificada genéticamente con el transgén codificante de la proteína antifúngica, AFP. Otra parte de los resultados se ha sometido para su publicación a la revista científica *BMC Plant Biology* con un factor de impacto de 4.090. La publicación lleva por título “*Constitutive expression of transgenes encoding derivatives of the synthetic antimicrobial peptide BP100: impact on rice host plant fitness*” y hace referencia a los estudios de expresión en planta de los péptidos antimicrobianos de la familia de BP100.

Dra. Maria Pla de Solà Morales

Dra. Anna Nadal Matamala

Girona, Enero 2012

La presente tesis se ha podido realizar gracias a la financiación y al soporte de la **Fundación Ramón Areces** por la concesión de una beca pre-doctoral durante los años 2007 a 2010; a los proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación con referencias AGL2010-17181 (AGR) y SEPSAPE (PLANT-KBBE EUI-2008-03769)

*“... good science as a way of life is sometimes difficult.
We must thus believe strongly in our ideas ...”*

Dr. James Watson

An Achim

PUBLICACIONES

Maria Montero, Anna Coll, Anna Nadal, Joaquina Messeguer y Maria Pla (2011). Only half the transcriptomic differences between resistant genetically modified and conventional rice are associated with the transgene. *Plant Biotechnol Journal* 9(6), 693-702.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no se hubiera podido realizar sin la colaboración de muchas personas que me han brindado su ayuda, sus conocimientos y su apoyo. Quiero agradecerles a todos ellos cuanto han hecho por mí, para que este trabajo saliera delante de la mejor manera posible.

En primer lloc m'agradaria donar les gràcies a les meves directores de tesi la Maria Pla i l'Anna Nadal per tot el que han fet per mi i el temps que m'han dedicat. Per acollir-me al grup, per la seva disponibilitat en tot moment, per la seva confiança, la seva paciència, per tot el que m'han ensenyat, tant a nivell personal, professional com científic. És difícil descriure en paraules l'agraïment que sento per elles, per això només puc dir GRÀCIES PER TOT.

Agrair a la Carme Carretero i a la Dolors Parés per donar-me la oportunitat de formar part del grup de tecnologia d'aliments; a les meves companyes de tesi, l'Anna, la Nuri, la Rosa per tots els moments que hem pogut compartir durant els últims anys, per la seva ajuda, suport, ànims i l'amistat que ha sorgit durant aquest temps. Agrair també a tots els membres del grup, l'Elena, la Mònica, l'Eva i l'Anna Maria pel bon ambient de treball.

Un agradecimiento muy especial a la Fundación Ramón Areces por su apoyo y financiación de esta tesis mediante la concesión de una beca pre-doctoral de cuatro años.

A l'Emili Montesinos donar-li les gràcies per el seu suport científic i moral, per permetre la meva col·laboració en el projecte SEPSAPE, per posar a disposició els seus laboratoris i espais sense els quals la realització d'aquesta tesi no hagués sigut possible. A tots els membres del grup de Producció Vegetal, la Lídia, en Jordi, l'Esther, l'Anna B., en Jesús, la Isa, la Laura, la Gemma, la Mireia i l'Anna Ventolà, agrair el treball en equip, el bons moments, la bona companyia, suport i consells.

Donar les gràcies en general a tots el membres de l'INTEA i d'EQATA.

Moltes gràcies al grup de l'IRTA de Cabrils, sobretot a la Quima Messeguer i l'Enric Melé, per ensenyar-me les tècniques de modificació genètica i cultiu *in vitro*. Per posar a disposició les seves instal·lacions i transferir-me tot el seu coneixement. Naturalment agrair també el seu suport i consells. Un agraïment especial també als membres del seu grup, la Vane, la Sandra i la Montse per acollir-me tant amablement i generar bon ambient de treball.

Gràcies a la Dra. Blanca San Segundo i al seu equip del CRAG, la Maria Coca i la Sònia Campo, pel seu suport i per cedir-nos plàsmids i soques molt útils per a la realització d'aquesta tesi.

Un agradecimiento especial va dirigido también a Jesús García Cantalejo y a su grupo de la Unidad Genómica de la Fundación Parque Científico de Madrid por la realización de los *microarrays* y su soporte en la valoración de los datos.

AGRADECIMIENTOS

Moltes gràcies a en Vicenç i tot l'equip del servei tècnic de la UdG per poder comptar amb ells en tot moment.

Moltes gràcies a HIPRA, sobretot a les meves caps Marta Sitjà i Èlia Torroella per haver-me donat flexibilitat d'horari en aquests últims mesos per poder acabar la tesi. Moltes gràcies també als meus companys del departament d' I+D Biol pels seus ànims i suport.

Un agraïment molt especial va dirigit a la meua família, als meus pares, germana, cunyat i nebots i sobretot als meus avis que en pau descansin, pel seu suport moral en tot moment i per estar sempre al meu costat. És difícil definir el que sento per vosaltres en paraules, només puc dir: US ESTIMO MOLT! I GRÀCIES PER TOT.

Mein besonderer Dank geht an Achim, der mit mir durchgehalten und immer an meiner Seite gestanden hat. Achim, ich danke Dir von ganzem Herzen für Deinen Support und Deine Liebe. Ich liebe dich.

Un agraïment molt especial al meu veïns i amics, Omar i Mariona, per la seva amistat, suport, ànims i pel disseny de la portada d'aquesta tesi.

RESUMEN

Los organismos modificados genéticamente (OMGs) destinados a la comercialización están sometidos a estrictas regulaciones en los distintos países, para garantizar la seguridad del consumidor y el medio ambiente. Dichas regulaciones se basan fundamentalmente en el principio de equivalencia sustancial, según el cual un OMG sólo puede comercializarse si no difiere de la variedad no-MG más próxima a nivel composicional y de seguridad, a excepción de la(s) característica(s) conferida(s) por el transgén. En la Unión Europea, se exigen una serie de evaluaciones de los nuevos OMG para su comercialización, que incluyen análisis comparativos a nivel nutricional, caracterización molecular del transgén, lugar de inserción y estabilidad; evaluación de la seguridad alimentaria, evaluación del riesgo ambiental y planes de monitorización post-comercialización. Distintas organizaciones, como la OCDE o la FAO, han recomendado el uso de técnicas de análisis generalistas o de *profiling* (transcriptómica, proteómica, metabolómica), para complementar los análisis específicos de los OMG mediante la evaluación de los posibles efectos no intencionados y no esperados sobre la planta huésped, que deriven de la inserción y/o expresión del transgén. La presente tesis pretende profundizar en los efectos no intencionados derivados de la inserción y/o expresión de transgenes en plantas, utilizando como modelo el cereal arroz. Concretamente se estudiaron tres líneas de arroz MG transformadas con transgenes que les confieren resistencia a situaciones de estrés, básicamente de tipo biótico. S-afp incluye un transgén que codifica una proteína antifúngica, que confiere a la planta huésped un fenotipo de resistencia al hongo *Magnaporthe grisea*, patógeno del arroz de gran importancia económica. S-bp213-5 y S-bp217-1 incluyen transgenes que codifican los péptidos antimicrobianos (PAM) BP213 y BP217, respectivamente. Estas plantas MG se construyeron a lo largo de la presente tesis, con el doble objetivo de evaluar la posibilidad de (i) sintetizar PAM en plantas biofactoría, y (ii) obtener fenotipos de resistencia frente a patógenos mediante la sobre-expresión de este tipo de moléculas, que combinan una fuerte actividad antibacteriana y unas características físico-químicas muy especiales.

Se compararon las líneas de arroz (*Oryza sativa sp. japonica*) S-afp (OMG) y su isogénica convencional Senia a nivel transcriptómico mediante hibridación en *microarray*. Para minimizar los cambios transcripcionales no relacionados con la transgénesis, se analizaron 3 réplicas de 10 plántulas crecidas *in vitro* en condiciones homogéneas. El análisis de un total de 48.564 transcritos reveló que únicamente el 0,4% presentaban expresión diferencial entre S-afp y Senia. No sólo se evaluó la magnitud de esta diferencia transcriptómica, sino que se abordaron sus posibles causas estudiando más a fondo un 20% de los genes con expresión diferencial entre S-afp y Senia. Por una parte, es un hecho ampliamente descrito que la técnica

de cultivo de tejidos induce una cierta variación genética. La obtención de arroz transgénico mediante *Agrobacterium* requiere el cultivo *in vitro* para la des-diferenciación celular previa a la infección, y para su posterior diferenciación y regeneración de una planta MG a partir de una sola célula transformada: estos procesos podrían afectar el transcriptoma de la planta MG. Un 35% de las secuencias con expresión diferencial entre S-*afp* y Senia también lo eran entre Senia y plantas no transgénicas que habían sido sometidas al proceso de transformación en paralelo a S-*afp*, pero no heredaron el transgén [S-*afp*(-)]. Es importante destacar que la infección es frecuente en la naturaleza, y el cultivo *in vitro* se utiliza para liberar material vegetal de virus, para propagación vegetativa, etc., procesos comunes no relacionados con OMG y no cuestionados a nivel social. Por otra parte, la inserción del transgén en el genoma de la planta es un fenómeno que ocurre al azar, pudiendo provocar mayores o menores efectos según el lugar de inserción. El 15% de las secuencias con expresión diferencial entre S-*afp* y Senia se expresaban de igual forma en Senia y otros eventos de transformación de S-*afp* independientes, de forma que su regulación se atribuyó a la interrupción de secuencias génicas y/o reorganizaciones genómicas que pueden ocurrir en el lugar de inserción del transgén. Estos efectos pueden minimizarse mediante la elección del evento óptimo.

Sólo la mitad de las secuencias reguladas en Senia y S-*afp* lo eran también en otros eventos S-*afp* y su expresión diferencial pudo atribuirse directamente al transgén. Se análisis de expresión de 17 de estas secuencias en un línea de arroz MG en que el mismo transgén *afp* se regula con un promotor distinto (*ZmPR4*), dando lugar a niveles de expresión del transgén 400 veces menor que en S-*afp* en condiciones de cultivo estándar, permitió demostrar que la regulación del 60% de las secuencias dependía de la presencia del transgén o de su expresión basal, mientras que la regulación del 40% restante sólo se daba a elevados niveles de expresión de *afp*. Finalmente, se ha observado que la mitad de estas 17 secuencias se inducen en plantas convencionales en respuesta a herida, mientras que en plantas S-*afp* presentan ya elevados niveles de expresión en condiciones normales y no se sobre-expresan en respuesta a este estrés. Ello sugiere que un efecto indirecto del transgén sobre la planta huésped podría ser mayor tolerancia a estrés. De hecho, se ha mostrado en diversas plantas MG un fenotipo de resistencia no sólo al patógeno diana sino también a otros tipos de estrés biótico o abiótico.

La obtención de líneas de arroz que expresen PAMs (concretamente, péptidos de la serie BP100) mostró ser posible, aunque es importante tener en cuenta diversos factores. El impacto transcriptómico de estos transgenes sobre las plantas finalmente obtenidas fue, en cambio, menor de lo esperado. Se eligió BP100 para representar los péptidos de la librería CECMEL11, actualmente constituida por 125 undecapéptidos sintéticos diseñados por química combinatoria a partir de un híbrido de dos péptidos naturales, cecropina A y melitina, muchos de los cuales presentan propiedades de interés. BP100 es muy activo contra especies bacterianas patógenas de plantas como *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas axonopodis* pv.

vesicatoria o *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, de gran impacto económico; a la vez que presentó niveles muy reducidos de toxicidad en ensayos cutáneos en rata. Además del reducido tamaño, BP100 presenta unas características químicas muy especiales, como una estructura α -helicoidal con un carácter fuertemente catiónico ($pI \sim 11$). Con el objetivo de ampliar el tamaño del péptido hasta hacerlo expresable en plantas, se diseñaron 5 derivados de BP100 (derBP100) con estructuras de dímero y trímero, cuyas subunidades se unieron mediante una secuencia puente de 4 aminoácidos que, en cecropina A, otorga flexibilidad estructural a la α -hélice: BP214 (monómero), BP192 (dímero), BP216 (trímero), BP213 (2 unidades de BP100 en sentidos opuestos) y BP217 (2 unidades de BP100 alargado con secuencias de melitina, también en sentidos opuestos). La estrategia de expresión fue constitutiva, con acumulación de los derBP100 al retículo endoplasmático (RE), de forma que se incorporó la secuencia KDEL en el extremo C-terminal de todos ellos. Esta estrategia enmarca un doble objetivo, la protección de la planta frente al derBP100 y la protección del derBP100 frente a proteasas de la planta. Sintetizados químicamente y ensayados *in vitro*, los derBP100 presentaron igual o mejor actividad antibacteriana que BP100, aunque su actividad hemolítica (indicador indirecto de citotoxicidad) fue similar o superior. Se transformaron construcciones génicas que codifican los derBP100 (*derbp100*) a callos de arroz embriogénicos mediante *Agrobacterium*, para la obtención de líneas MG S-*derpb100*. Varios experimentos de transformación evidenciaron el efecto nocivo de los *derbp100* sobre la célula de arroz: con el gen de selección de la proteína verde fluorescente (GFP) únicamente se obtuvieron 2 eventos con *bp217*. Así, se cambió a una estrategia de selección positiva (resistencia a higromicina, *hpt II*) y se monitorizó el proceso de obtención de las líneas MG. Las reducidas eficiencias de transformación de los 5 *derbp100* (globalmente en torno al 3% respecto al transgén control *hpt II*) confirmaron el efecto fitotóxico de *derbp100* sobre las células vegetales huésped. A pesar de obtenerse callos resistentes a higromicina para todos los *derbp100*, no regeneraron plantas MG con *bp192* ni *bp216* (eficiencias <1%); y sólo unas pocas con *bp217*, *bp213* o *bp214* (S-*bp217*, S-*bp213* y S-*bp214*, con eficiencias del 2, 3 y 10%, respectivamente). La expresión masiva de *derbp100* en arroz parece ser altamente tóxica. Los niveles ARNm de *derbp100* en hojas de plantas homocigotas T2 se situaron en el rango de a 1 (*bp217*) hasta 30 (*bp213* y *bp214*) veces por encima del nivel del gen β -*act*, que se utilizó como control: se trata de niveles de expresión moderados, de los derBP100 probablemente menos fitotóxicos. No disponiéndose de un método de detección de derBP100 sintetizados en planta, una serie de evidencias indirectas (además de la fitotoxicidad y la transcripción de *derbp100* mencionados) confirman la expresión de derivados de BP100 en las plantas MG obtenidas. Por ejemplo, todos los eventos S-*bp213* y S-*bp217* obtenidos presentan fenotipos de resistencia a *M. grisea* y tolerancia a estrés oxidativo en comparación con Senia y S-*hgr* (con sólo *hpt II*), directa o indirectamente originados por la expresión del transgén. A pesar de sus particularidades, fue interesante observar que se pueden obtener plantas MG para la expresión de algunos

derBP100 (S-bp217 y S-bp213) resistentes a diversas condiciones de estrés y con características agronómicas no muy distantes de las plantas convencionales Senia (y productividad en torno al 80 y 65%, respectivamente). Ello parece depender de las características de cada derBP100, y del lugar de inserción del transgén, que afecta el nivel de expresión del mismo. Para otros derBP100, los efectos pueden ser marcadamente diferentes: S-bp214 mostró características agronómicas más diferenciadas (productividad del 40%), aunque su resistencia a estrés fue sólo similar a S-hgr.

Contrariamente a lo esperado, los transcriptomas de las líneas S-bp213-5 y S-bp-217-1 mostraron unos efectos no intencionados del transgén prácticamente nulos, con diferencias transcripcionales en sólo el 0,08 y 0,14% de los genes analizados para S-bp213 y S-bp217, respectivamente. Estas diferencias son similares a las de otras líneas MG respecto a las convencionales comparadoras, y menores que las halladas entre variedades convencionales comerciales. Gran parte de las secuencias reguladas lo son en ambos OMG, y la mayor parte de éstas lo son también en S-afp: algunas se han asociado al proceso de obtención del OMG. Las diferencias entre S-bp217-1 y Senia son mayores que entre S-bp213-5 y el control, y sugieren la activación en esta línea de un mecanismo de respuesta a estrés de RE.

De los resultados obtenidos en esta tesis podemos concluir que el impacto del transgén sobre la planta huésped puede variar enormemente, pudiendo desde impedir la viabilidad o fertilidad de la misma hasta ser prácticamente nulo. Sin embargo, las plantas MG viables y fértiles pueden presentar efectos no intencionados del transgén mínimos, incluso si expresan a niveles moderados transgenes que codifican péptidos con características fitotóxicas. El hecho de que sólo la mitad de los efectos no esperados detectados en una planta MG derivan directamente del transgén, abre la posibilidad de limitarlos, bien mediante la selección del mejor evento de transformación, bien utilizando técnicas de transformación en que se minimice el cultivo *in vitro*. Globalmente, los resultados obtenidos en esta tesis indican que es posible obtener un planta MG sustancialmente equivalente a su isogénica convencional y a su vez mejorada.

SUMMARY

To ensure the safety of consumers and the environment, genetically modified (GM) food and feed are submitted to strict regulation in many countries. Such regulation is mainly based on the principle of substantial equivalence, which obliges any GMO intended for commercialization not to differ from the correspondent non-GMO variety at compositional and safety levels, except for the characteristic(s) conferred by the transgene. In particular the European Union regulation requires a series of comparative analyses of new GMOs including molecular characterization of the transgene (with insertion site and stability), compositional, food and feed safety assessment, environmental risk assessment and post-marketing environmental monitoring plan. Some organizations such as OECD and FAO have recommended the use of profiling technologies such as metabolomics, proteomics and transcriptomics to complement targeted analyses in the evaluation of possible unintended and unexpected effects of the insertion and/or expression of the transgene in plants. This Thesis has the main aim of studying in depth these possible unexpected differences between GM and conventional plants, using rice as model cereal. We specifically analysed three GM rice lines transformed with transgenes that confer tolerance to (mainly biotic) stress conditions. S-aft includes a transgene encoding the antifungal protein AFP, which confers the host plant resistance against *Magnaporthe grisea*, a rice pathogen with high economic impact. S-bp213-5 and S-bp217-1 include transgenes encoding the antimicrobial peptides (AMP) BP213 and BP217, respectively. These GM plants were obtained in this Thesis with the double objective of (i) evaluating the possible use of GM crops as biofactories of AMPs of the BP100 series, which display high antibacterial activity and extreme chemical properties; and (ii) evaluating the possibility of obtaining GM rice lines in which overexpression of AMPs of the BP100 series results in a pathogen resistance phenotype.

Transcriptomic comparison of the conventional rice line Senia (*Oryza sativa* spp. *japonica*) and the GM line S-afp was tackled by means of *microarray* hybridization. In order to minimize transcriptional changes not directly associated to transgenesis we analysed 3 replicates of 10 plantlets grown under *in vitro* homogenous conditions. The analysis of a total of 48,564 japonica rice transcripts showed differential expression of 0.4% transcripts in S-afp and Senia. Not only the magnitude of such transcriptomic difference was evaluated but also its possible causes through further analysis of 20% sequences with differential expression in S-afp and Senia. On the one hand, it is reported that tissue culture technologies generate a wide range of genetic variation in plant species. Rice transformation process mediated by *Agrobacterium* requires *in vitro* tissue culture to achieve callus undifferentiated tissue, followed by bacterial infection, cell differentiation and plant regeneration: this whole process can have an impact on

the transcriptome of the final GM plant. Around 35% sequences exhibiting differential expression in Senia and S-afp were as well differentially expressed in Senia and conventional, null segregant S-afp(-) plants. S-afp(-) had undergone *Agrobacterium* based transformation process in parallel to S-afp but did not inherit the transgene. It is important to emphasize that infection is frequent in nature; and *in vitro* culture is a widely used breeding technology with commercial applications not related to GMOs, such as freeing plants from viruses or plant micropropagation, which are not a public concern. On the other hand, transgene insertion into the plant host genome is a random process and can have a different impact as a function of the insertion site. The regulation of 15% sequences with differential expression in Senia and S-afp was event specific, and their regulation was attributed to host gene disruption and associated genome rearrangements at the insertion site; and/or interactions between transgene elements and proximal host sequences. Importantly, these effects can be minimised by selection of the best GM event.

Only half sequences with differential expression in Senia and S-afp were regulated as well in Senia and other independent S-afp events; and thus, their regulation could be associated to the transgene itself. We further studied 17 of these sequences in a GM rice line where *afp* is under the control of a different promoter (*ZmPR4*) and is expressed at ~400-fold lower levels than in S-afp. Differential expression of around 60% analyzed sequences could be associated to the only presence of the *afp* transgene or its basal expression; whereas differential expression of 40% was specifically associated to high levels of *afp* expression in GM plants. We finally observed that half the 17 analyzed sequences (which regulation in S-afp and Senia was attributed to the transgene) were overexpressed in conventional plants after wounding stress, reaching mRNA levels similar to those in not stressed S-afp. This suggested that the *afp* transgene could indirectly result in tolerance to other types of stress, e.g. wounding. In fact, various GM plants have shown phenotypes of resistance not only to the target pathogen but also to other biotic and abiotic stress conditions.

Generation of rice GM lines expressing AMPs (specifically peptides of the BP100 family) could be achieved during this Thesis, although several factors must be taken into account. Nevertheless, the transcriptomic impact of these transgenes on the host plant was lower than expected. BP100 was chosen as leader peptide of the CECMEL11 library, currently composed of 125 synthetic peptides designed by means of combinatorial chemistry from a hybrid of the two natural peptides cecropine A and mellitin. Many of the CECMEL11 library peptides display interesting properties; and BP100 is highly active against the economically relevant plant pathogens *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* and *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*, whereas it showed reduced toxicity on a mouse model. CECMEL11 peptides have very special chemical properties e.g. small size (only 11 amino-acids), α -helix

structure and strong cationic character (pI ~11). From this premise its expression in plants was a challenge. With the purpose of enlarging the peptide we designed 5 BP100 derivatives (derBP100) with dimer and trimer structures, where monomeric units were fused through a 4 amino-acids hinge sequence (AGPA) that confers the natural peptide cecropine A structural flexibility among domains: BP214 (monomer); BP192 (dimer); BP216 (trimer); BP213 (2 BP100 units in reverse orientation) and BP217 (2 units of an enlarged BP100, also in reverse orientation). Our strategy was constitutive expression coupled to accumulation at the endoplasmatic reticulum (ER) by fusing the KDEL sequence at the C-terminus of derBP100. This expression strategy had the double objective of protecting the host plant against derBP100 and at the same time, protecting derBP100 peptides from potential degradation by proteolytic activities *in planta*. Chemically synthesized derBP100 peptides were tested *in vitro* and showed similar or higher antibacterial activities than BP100 against the target bacterial species; although similar or higher hemolytic activities (the hemolytic activity is considered a cytotoxicity indirect indicator). Gene constructs encoding derBP100 were transformed by *Agrobacterium* to embryonic rice calluses to generate S-derpb100 GM lines. Our attempts to generate GM lines quickly evidenced the harmful effect of *derBP100* transgenes on the host rice cell. With the green fluorescence protein (GFP) as a selection marker just 2 GM plants with *bp217* could be obtained. We thus switched to a positive selection strategy (hygromycin resistance, *hpt II*) and monitored the efficiency of the transformation process along the whole process. The reduced transformation efficiency of all 5 *derbp100* sequences (overall around 3% compared to the control transgene *hpt II*) confirmed the phytotoxic effect of *derbp100* on host plant cells. We obtained hygromycin resistant calluses carrying all 5 constructs, but regeneration of GM plants with *bp192* and *bp216* was not possible (efficiencies below 1%); and only a few GM lines with *bp217*, *bp213* or *bp214* were viable and fertile (efficiencies of 2%, 3% and 10%, respectively). Massive expression of *derbp100* in rice cells seems to entail high toxicity. *derbp100* mRNA levels in homozygous T2 plant leaves was in the range of 1 (*bp217*) to 30 (*bp213* and *bp214*)–fold the β -act rice endogenous gene: those can be considered as moderate expression levels, which can probably be achieved only for the less toxic *derbp100* transgenes. The lack of an appropriated detection method for plant produced derBP100 forced us to use indirect evidences to confirm the production of BP100 derivatives in our GM plants (besides the phytotoxicity and transcription of *derbp100*). For instance, all S-bp213 and S-bp217 events obtained showed resistance to *Magnaporthe grisea* and tolerance to oxidative stress, as compared to Senia and S-hgr (with only *hpt II*), either as a direct or indirect effect of the transgene expression. Remarkably, GM plants could be obtained that expressed some *derBP100* (i.e. *bp217* and *bp213*), showed resistance phenotypes and at the same time they had agronomic characteristics not too different from Senia. This seems to depend upon the specific properties of each derBP100 and the transgene insertion site (which affects the expression level). For other derBP100, unintended effects on the host plant may be entirely

different: S-bp214's agronomic values were strongly different from those of Senia (e.g. 40% its productivity) although they showed no clear resistance phenotype.

Unexpectedly, S-bp213-5 and S-bp-217-1 GM lines showed only minor transcriptomic differences compared to Senia, i.e. 0.08% and 0.14% the analyzed sequences, respectively. These differences were quantitatively similar to those described in other GM lines compared to their conventional counterparts, and lower than those observed between different commercial conventional varieties. Most differentially expressed sequences were commonly regulated both in S-bp213-5 and S-bp-217-1 vs. Senia, and many were regulated in S-afp as well: some of them could be attributed to the transformation process. S-bp1217-1 was less similar to Senia than S-bp213-5, and the activation of the ER stress response mechanism was suggested in these plants.

From the results obtained in this Thesis we can conclude that the impact of the transgene on the plant host cell can be largely different in different GMOs, ranging from preventing plant viability or fertility, to barely detectable. Nevertheless, viable and fertile GM plants can be obtained that show minimal unintended effects while expressing (at moderate levels) transgenes encoding peptides with phytotoxic properties. The important demonstration that only around half the unexpected transcriptomic differences between a GM plant and the conventional comparator can be attributed to the transgene opens the possibility of reducing such unexpected differences, both by selection of the best transformation event and by application of transformation technologies which minimize tissue culture. Globally, our results indicate that it is possible to obtain GM plants substantially equivalent to its conventional counterparts, and at the same time with improved characteristics.

ABREVIACIONES

ABA	Ácido abcísico
Ac	Acetosiringona
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGE	Electroforesis en gel de agarosa
AIA	Ácido indol-3-acético
Amp	Ampicilina
ANA	Ácido-naftalenacético
APD	<i>The Antimicrobial Peptide Database</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BA	6-Benzylaminopurina
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAI	Índice de adaptación de codón
CAMP	<i>Collection of Anti-Microbial Peptides</i>
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
CE	Electroforesis capilar
CecA	Cecropina A
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CIP	Alcalina fosfatasa (<i>calf intestinal phosphatase</i>)
CTAB	<i>Cetyltrimethyl ammonium bromide</i>
2DE	Electroforesis bidimensional
2,4-D	2,4-Diclorofenoxiacético
DIGE	Electroforesis diferencial en gel
DMSO	Dimetilsulfóxido
dpi	Días post infección
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etileno diamino tetracetato
ESI	Ionización electrospray
FDR	<i>False discovery Rate</i>
FID	Detector de ionización de llama
FT-ICR	<i>Fourier transform ion-cyclotron resonance</i>
GC	Cromatografía de gases
GFP	Proteína verde fluorescente (green fluorescence protein)
GO	<i>Gene Ontology</i>
IEF	Isoelectroenfoque
IRTA	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries
Kan	Kanamicina
Kb	Kilobases
KDa	KiloDalton
LB	Luria Bertani
LC	Cromatografía líquida

LPS	Lipopolisacáridos
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionisation</i>
MG	Modificado genéticamente
MS	Espectrometría de masas
NBT	<i>Nitronblue tetrazolium</i>
NMR	Resonancia magnética nuclear
OMG	Organismo modificado genéticamente
O/N	<i>Overnight</i>
PAM	Péptido antimicrobiano
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pI	Punto isoelectrico
PIPES	Piperazin-N,N'-bis 2-etansulfónico
PM	Peso molecular
PR	<i>Pathogenesis related</i>
PTS	Proteína total soluble
RE	Retículo endoplasmático
Rif	Rifampicina
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT	Retrotranscripción
RuBisCo	<i>Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa</i>
SA	Ácido salicílico
SAG	O- β -glucosil ácido salicílico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEA	Análisis de enriquecimiento de secuencias
SN	Sobrenadante
TA	Temperatura ambiente
T-ADN	ADN de transferencia por <i>Agrobacterium</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tc	Tetraciclina
TCA	Ciclo del ácido tricarbóxico
TIGR	<i>The Institute for Genomic Research</i>
Tm	Temperatura de disociación (<i>melting temperature</i>)
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
ufc	Unidad formadora de colonia
UPR	<i>Unfolded protein response</i>

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Planta de arroz como modelo de estudio	3
I.2 Transformación genética	6
Transferencia de ADN, 7	
Regeneración, selección y aclimatación, 9	
I.3 Aplicaciones de la transgénesis	12
Investigación básica, 12	
Mejora agronómica y nutricional, 14	
Plantas biofactoría, 17	
I.4 Análisis de plantas MG para la seguridad de alimentos y piensos; y del medio ambiente	21
Principio de Equivalencia Sustancial, 21	
Efectos no intencionados, 23	
<i>Transcriptómica, 24</i>	
<i>Proteómica, 27</i>	
<i>Metabolómica 29</i>	
I.5 Péptidos antimicrobianos	30
II. OBJETIVOS	35
III. MATERIAL Y MÉTODOS	39
III.A. Métodos de manipulación de ácidos nucleicos	41
III.A.1 Amplificaciones de fragmentos de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa	41
Reacciones con <i>Taq</i> ADN Polimerasa, 41	
Reacciones con <i>Expand High Fidelity PCR System</i> , 42	
Reacciones con <i>Taq Gold</i> , 43	
PCR a tiempo real (qPCR), 44	
<i>Diseño de cebadores</i> , 45	
<i>Optimización de sistemas de qPCR</i> , 45	
<i>Construcción de la recta patrón</i> , 46	
III.A.2 Purificación de productos de PCR	47
III.A.3 Electroforesis en gel de agarosa (AGE)	48
III.A.4 Extracción de fragmentos de ADN de gel de agarosa	49
III.A.5 Purificación fenólica y precipitación con etanol de soluciones de ADN	50
III.A.6 Subclonajes	51
Digestión enzimática de secuencias de ADN, 51	
Desfosforilación, 51	
Ligación, 52	
III.A.7 Minipreparaciones de ADN plasmídico	52
III.A.8 Secuenciación de fragmentos de ADN	54
III.A.9 Transformación genética de bacterias	56
Preparación de células competentes por CaCl_2 , 56	
Transformación por choque térmico, 58	

ÍNDICE

III.B. Construcción de plantas de arroz MG	59
III.B.1 Construcción de vectores para expresión en planta	59
Oligonucleótidos, 59	
Síntesis de genes, 60	
<i>PCR Recursiva</i> , 60	
<i>Purificación de genes sintéticos</i> , 62	
Vectores de origen, 63	
Vectores intermediarios, 64	
<i>pAHC16</i> , 64	
<i>Subclonaje de los genes de interés en pAHC16</i> , 65	
Vectores de transformación, 66	
<i>Obtención de la secuencia génica pUBI::derbp100::tNOS</i> , 66	
<i>Obtención del gen marcador gfp</i> , 66	
<i>Construcción del vector pCAMBIAgfp</i> , 66	
<i>Construcción de los vectores finales de transformación:</i> <i>pCAMBIAgfp::derbp100 y pCAMBIA1300::derbp100</i> , 67	
III.B.2 Transformación de plantas de arroz	68
Formación de callo embriogénico, 71	
Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105, 72	
Transformación mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , 74	
III.B.3 Obtención de líneas homocigotas	76
Aclimatación, 76	
Selección de líneas homocigotas para el transgén, 78	
III.C Análisis de plantas de arroz transgénico	79
III.C.1 Cultivo de material vegetal MG	79
Mantenimiento y conservación de callos transgénicos, 79	
Cultivo de plántulas de arroz MG <i>in vitro</i> , 79	
Cultivo de plántulas de arroz MG en invernadero, 79	
III.C.2 Análisis de ADN genómico	80
Extracción de ADN genómico de planta. Método CTAB, 80	
Análisis <i>Southern Blot</i> , 81	
<i>Preparación de la sonda</i> , 82	
<i>Preparación del gel</i> , 83	
<i>Transferencia por capilaridad</i> , 83	
<i>Hibridación</i> , 85	
<i>Post-hibridación</i> , 86	
<i>Detección</i> , 86	
III.C.3 Análisis transcriptómico de plantas de arroz MG	86
Extracción de ARN mensajero, 86	
<i>Extracción de hoja de arroz</i> , 87	
<i>Extracción de callo de arroz</i> , 88	
<i>Tratamiento con ADNasa</i> , 89	
Transcripción reversa. Obtención del ADNc, 89	
Análisis de expresión por qPCR, 90	
Análisis global de transcriptoma mediante <i>microarray</i> , 90	
Herramientas bioinformáticas de análisis de expresión de genes, 91	
<i>Microarray</i> , 91	
<i>qPCR</i> , 91	

ÍNDICE

III.C.4	Análisis de actividad antibacteriana	91
	Extracción de proteína total de material vegetal transgénico, 91	
	Cuantificación de proteínas por el método Bradford, 93	
	Análisis por muerte celular, 94	
III.C.5	Ensayos de resistencia a estrés	96
	Resistencia a estrés oxidativo, 95	
	Resistencia a <i>Magnaporthe grisea</i> PR9, 96	
	<i>Obtención de esporas</i> , 96	
	<i>Infección de hojas de arroz</i> , 97	
III.C.6	Ensayo agronómico. Evaluación de los componentes de producción	98
IV.	RESULTADOS	99
IV.1	Análisis transcriptómico de plantas de arroz resistentes a plagas	101
IV.1.1	Comparación transcriptómica de Senia-afp respecto a Senia mediante hibridación por <i>microarray</i>	101
	Análisis de <i>microarray</i> , 101	
	Validación del <i>microarray</i> , 102	
IV.1.2	Análisis de genes con expresión diferencial sobre-representados en Senia-afp	105
IV.1.3	Evaluación del impacto del proceso de transformación sobre las diferencias transcriptómicas	107
IV.1.4	Evaluación de las diferencias transcriptómicas entre diferentes eventos MG de Senia-afp y Senia	108
IV.1.5	Regulación de las secuencias por el efecto del nivel de expresión del transgén	110
IV.1.6	Regulación de secuencias por el efecto herida en plantas Senia y Senia-afp	113
IV.2.	Construcción de plantas de arroz MG para la síntesis de derivados de BP100	114
IV.2.1	Diseño y construcción de PAM derivados de BP100 para su expresión en planta	115
	Secuencias peptídicas quiméricas, 115	
	Diseño de secuencias génicas, 118	
	Síntesis de secuencias génicas, 120	
IV.2.2	Estrategia de clonaje versátil	124
IV.2.3	Construcción de los vectores intermediarios	126
IV.2.4	Construcción de los vectores de transformación	126
	Obtención del gen marcador <i>gfp</i> que codifica la proteína verde fluorescente, 127	
	Subclonaje de <i>gfp</i> , 127	
	Subclonaje de los genes de interés <i>derbp100</i> , 128	
IV.2.5	Generación de plantas de arroz MG S-derbp100 mediante transformación por <i>Agrobacterium</i>	129
	Análisis molecular de los callos transgénicos, 131	
	<i>Análisis de expresión mediante RT-qPCR</i> , 131	

ÍNDICE

IV.2.6	Análisis del efecto de los transgenes <i>derbp100</i> sobre callos y plantas MG	137
	Construcción de los vectores de expresión de <i>derbp100</i> con el gen de selección <i>hpt II</i> , 137	
	Análisis del efecto de los <i>derbp100</i> sobre el proceso de transformación de arroz, 138	
	Análisis de expresión de los transgenes en callos MG, 141	
IV.2.7	Análisis molecular de plantas MG S- <i>derbp100</i>	143
	Confirmación de la presencia del transgén en plantas S- <i>derbp100</i> y estimación por qPCR del número de copias integradas , 143	
	Análisis de expresión de <i>bp214</i> y <i>bp217</i> en las plantas MG T0, 144	
	Análisis <i>Southern Blot</i> , 146	
	Análisis de expresión de los transgenes en plantas homocigóticas T2, 147	
	Análisis de extractos proteicos de plantas MG, 149	
	<i>Análisis de actividad antibacteriana por ensayo de muerte celular</i> , 149	
IV.2.8	Análisis fenotípicos	151
	Análisis de tolerancia a especies reactivas de oxígeno, 151	
	Análisis de resistencia a <i>Magnaporthe grisea</i> PR9, 152	
IV.2.9	Ensayo de componentes de rendimiento de eventos MG S- <i>derbp100</i>	154
IV.3	Análisis transcriptómico de plantas de arroz MG diseñadas para la síntesis de <i>derBP100</i>	158
IV.3.1	Comparación transcriptómica mediante análisis de hibridación en <i>microarray</i>	158
	Análisis y validación, 158	
	Descripción de los genes regulados en S- <i>bp213-5</i> respecto a Senia, 162	
	Descripción e identificación funcional de los genes regulados en S- <i>bp217-1</i> respecto a Senia, 164	
	Patrones de expresión de los genes reprimidos en S- <i>bp217-1</i> respecto a Senia, en otras líneas S- <i>derbp100</i> , 169	
V.	DISCUSIÓN	173
VI.	CONCLUSIONES	207
VII.	BIBLIOGRAFÍA	213
VIII.	ANEXOS	235
	Anexo 1, 237	
	Anexo 2, 251	
	Anexo 3, 253	

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas modificadas genéticamente (MG) son aquellas cuyo genoma ha sido alterado de forma permanente mediante técnicas de ingeniería genética. Esta modificación resulta en la obtención de nuevas líneas vegetales con características especiales. El desarrollo de plantas MG se basa en una tecnología innovadora cuyo origen se remonta al año 1983 y que desde entonces se ha aplicado a una gran variedad de especies vegetales. En la última década, las plantas MG han adquirido importancia creciente en aplicaciones como resistencia a estreses bióticos o abióticos, investigaciones de genómica funcional, producción de alimentos funcionales; o su uso como biofactorías. Las plantas MG destinadas a la producción de alimentos o piensos están sometidas a una estricta legislación que tiene como objetivo garantizar la seguridad alimentaria y medioambiental; en la que se exige, entre otras cosas, que la línea MG sea sustancialmente equivalente a la línea convencional más próxima, a excepción del carácter derivado del transgén. Puede darse el caso de que una planta MG presente algunas diferencias respecto a la planta comparadora convencional, además de la(s) esperada(s): se trataría de diferencias no intencionadas, que en algunos casos pueden esperarse (por nuestro conocimiento de la fisiología y la genética vegetal) y en otros casos, no. Esta tesis profundiza en el estudio de los efectos no intencionados de transgenes que confieren fenotipos de resistencia a estreses bióticos, utilizando como modelo arroz.

I.1 La planta de arroz como modelo de estudio

La planta de arroz es uno de los cereales más importantes para la humanidad, y supone el alimento principal del 50% de la población mundial. A nivel global, se cultivan básicamente dos especies de arroz: *Oryza sativa* L., la especie asiática, cultivada en la mayor parte del mundo y con dos subespecies muy relevantes: *indica* (*O. sativa* L. ssp. *indica*) y *japonica* (*O. sativa* L. ssp. *japonica*); así como *O. glaberrima* Steud, especie africana menos abundante y cultivada sólo a nivel regional. Debido a la demanda creciente, en los últimos 30 años la producción mundial de arroz se ha doblado mediante la introducción de nuevas variedades mejoradas con mayor

productividad y mayor resistencia a condiciones ambientales adversas. Aun así, la cantidad producida de este cereal se considera todavía insuficiente para cubrir la demanda mundial (Tyagi *et al.*, 2004). Esto ha llevado a la generación, mediante ingeniería genética, de nuevas variedades mejoradas y resistentes que buscan favorecer la productividad y minimizar las pérdidas por estreses bióticos o abióticos (como estrés hídrico o salino). La obtención de nuevas variedades por esta vía requiere un conocimiento amplio sobre la funcionalidad del genoma de la planta. De hecho, el arroz es actualmente una de las especies vegetales más estudiadas; y ya que además esta especie posee unas características ventajosas para estudios biológicos, se ha convertido en una especie vegetal modelo. Por ejemplo, el arroz tiene el genoma de menor tamaño entre las gramíneas. Según el *Rice Genome Annotation Project* (RGAP 6.1, <http://rice.plantbiology.msu.edu/>, consulta realizada en diciembre de 2011; Ouyang *et al.*, 2007), el genoma de arroz tiene un tamaño de ~370 Mb. Éste ha sido secuenciado por completo en la marco de tres proyectos de investigación para su secuenciación masiva (Goff *et al.*, 2002; *International Rice Genome Sequencing Project*, 2005; Yu *et al.*, 2002). El genoma de arroz presenta además una similitud y co-linearidad con genomas de otras especies vegetales importantes como el trigo o el maíz, lo que permite que muchas funciones génicas sean extrapolables a estas especies. Por otra parte, el arroz es fácilmente transformable genéticamente, de forma que el arroz tiene un papel central en los estudios de genómica funcional vegetal. Así, la comunidad científica dispone de herramientas muy valiosas como los bancos de secuencias asociadas a funciones moleculares o procesos biológicos. Se han llevado a cabo por ejemplo en arroz estudios de genómica funcional mediante la construcción de librerías de mutantes. La anulación (*knock-out*), represión (*knock-down*) o sobre-expresión de determinados genes, inserciones de T-ADN mediante transformaciones por *Agrobacterium*, inserciones de transposones y retrotransposones, son algunas de las técnicas aplicadas. La página de acceso público *SIGNAL* (http://signal.salk.edu/RiceGE/RiceGE_Data_Source.html) recoge gran número de bases de datos disponibles de acceso público, con información relevante sobre distintas características del genoma del arroz, así como de librerías de mutantes generadas por T-ADN, transposones, etc. Se han realizado asimismo diversos análisis globales de expresión génica en diferentes tejidos, condiciones ambientales o estadios de crecimiento, utilizando hibridaciones en *microarrays*. Además, se han obtenido gran número de secuencias completas de ADN complementario (ADNc) de clones (*Full-length complementary DNA clones FLcDNA*), que han permitido identificar transcritos, exones e intrones, promotores o predecir genes. La información recogida de la aplicación de estas tecnologías se encuentra a disposición pública en bases de datos. La tabla I.1 muestra algunas de ellas con la información y herramientas disponibles relativas a diferentes genotipos de la especie *Oryza sativa*.

Tabla I.1: Bases de datos de patrones de expresión de arroz

Base de datos	Acceso URL	<i>Oryza sativa</i> sp.	# Muestras
Rice expresión profile database (RiceXPro)	http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/	<i>Japonica</i>	209
Rice array database (RAD)	http://www.ricearray.org/index.shtml	<i>Japonica/ Indica</i>	1790
Rice GE: gene expression atlas	http://signal.salk.edu/cgi-bin/RiceGE	<i>Japonica/ Indica</i>	163
Collection of rice expression profiles (CREP)	http://crep.ncpgr.cn	<i>Indica</i>	190
Virtual center for cellular expression profiling of rice	http://bioinformatics.med.yale.edu/riceatlas/	<i>Japonica</i>	220

La aplicación de estas tecnologías ha servido en la caracterización de genes relacionados con las características agronómicas de la especie *Oryza sativa*. Se han identificado genes relacionados con el rendimiento de producción, resistencia a estrés biótico y abiótico, de uso eficiente de nutrientes así como la calidad del grano (revisión Yiang *et al.*, 2011). Algunos ejemplos se recogen en la tabla I.2.

Sin duda los estudios genómicos de la especie *Oryza sativa* han evolucionado enormemente en la última década. Aun así existe todavía camino por recorrer, por ejemplo en la relación entre el genotipo y el fenotipo, lo que es esencial en programas de mejora agronómica dirigidos a una agricultura sostenible. La magnitud de este camino hace necesaria una investigación coordinada. Con este propósito, Zhang y colaboradores (Zhang *et al.*, 2008) iniciaron el proyecto *International Rice Functional Genomics Project (IRFGP)* con el objetivo (esperado en 2020) de determinar la función de cada gen anotado del genoma de arroz, para identificar la diversidad funcional de alelos de genes de interés agronómico y aplicar estos conocimientos a la mejora genética del arroz. El proyecto conocido como RICE2020 tiene siete puntos clave: (i) generación de herramientas y bases de datos disponibles para la comunidad científica para el desarrollo de investigación genómica funcional en arroz; (ii) asignación de funciones biológicas a cada gen anotado; (iii) epigenómica, patrones de expresión génica y redes reguladoras; (iv) análisis global proteómico e interacción proteína-proteína; (v) variación natural de *Oryza sativa* y sus derivados; (vi) bioinformática e intercambio de información; y (vii) rendimiento del conocimiento generado en la mejora de la especie arroz. Este proyecto surge con la intención de ampliar el conocimiento de una planta modelo como el arroz, cuya información es valiosa por ser extrapolable a otras especies vegetales de interés nutricional, así como por la necesidad de profundizar en la investigación de la especie. El cereal arroz se sigue cultivando en grandes cantidades mediante la aplicación de pesticidas y fertilizantes que causan graves problemas medioambientales. Partiendo de esta premisa Zhang (2007) propuso la generación de la variedad mejorada *Green Super Rice*. Esta nueva variedad debe poseer resistencia a patógenos e insectos, elevada eficiencia de adquisición de nutrientes, resistencia a estrés abióticos/biótico, buena calidad y mayor productividad de grano. Para llegar a tal objetivo es

necesaria la aplicación coordinada de la información recogida en estudios de genómica funcional y de germoplasmas a la mejora genética del arroz.

Tabla I.2: Ejemplos de genes de arroz relacionados con funciones de interés agronómico

Característica Agronómica	Gen	Proteína codificante	Referencia
Ahijamiento	<i>OsTB1/FC1</i>	TCP factor de transcripción	Minakuchi <i>et al.</i> , 2010
	<i>DWARF10</i>	Dioxigensasa 8	Arite <i>et al.</i> , 2007
Número semillas	<i>LOG</i>	Enzima activadora de citoquinina	Kurakawa <i>et al.</i> , 2007
	<i>LRK1</i>	Receptor LRR tipo quinasa	Zha <i>et al.</i> , 2009
Peso de la semilla	<i>GIF1</i>	Invertasa de pared celular	Wang <i>et al.</i> , 2008
	<i>RISBZ1</i>	Factor básico leucin zipper	Kawakatsu <i>et al.</i> , 2009
Resistencia a estrés biótico			
<i>Xanthomonas oryzae</i>	<i>Xa1</i>	NBS-LRR	Yoshiruma <i>et al.</i> , 1998
	<i>Xa13</i>	Tranportadora de azúcar	Chu <i>et al.</i> , 2006
	<i>Xa33</i>	No identificada	Podishetty <i>et al.</i> , 2011
<i>Magnaporthe grisea</i>	<i>Pib</i>	NBS-LRR	Wang <i>et al.</i> , 1999
	<i>Pi37</i>	NBS-LRR	Lin <i>et al.</i> , 2007
	<i>Pi321</i>	Proteína rica en prolinas	Fukuoka <i>et al.</i> , 2009
	<i>Pi54</i>	No identificada	Gupta <i>et al.</i> , 2011
Resistencia a estrés abiótico			
Hídrico	<i>DSM2</i>	Hidroxilasa β-caroten	Du <i>et al.</i> , 2010
	<i>OsGH3.13</i>	Ácido indol acético (IAA) amido sintetasa	Zhang <i>et al.</i> , 2009
Salino	<i>OsKAT1</i>	Canal de potasio	Obata <i>et al.</i> , 2007
	<i>OsCIPK15</i>	Quinasa tipo calcineurin B	Xiang <i>et al.</i> , 2007
Hídrico y salino	<i>SNAC1</i>	Factor de transcripción NAC	Hu <i>et al.</i> , 2006
	<i>DST</i>	Factor de transcripción <i>Zinc finger</i>	Huang <i>et al.</i> , 2009
	<i>OsNAC10</i>	Factor de transcripción NAC	Jeong <i>et al.</i> , 2010
Submerción	<i>Sub1A</i>	Factor de respuesta a etileno	Xu <i>et al.</i> , 2006
	<i>SNORKEL1/2</i>	Factor de respuesta a etileno	Hattori <i>et al.</i> , 2009

I.2 Transformación genética

Un organismo MG (OMG) se define de acuerdo con la directiva de la Unión Europea (2001/18/EC) como un organismo cuyo material genético ha sido modificado por una vía que no ocurre por recombinación genética natural. Sólo organismos que se han obtenido mediante métodos biotecnológicos como ADN recombinante, tecnología de transferencia de ADN celular o técnicas de fusión de protoplastos (la fusión ocurre también por métodos que no ocurren naturalmente) están considerados bajo esta definición. Técnicas como fertilización *in vitro*,

transformación natural e inducción de poliploides, están específicamente excluidas de la definición. Incluso, organismos modificados mediante mutagénesis o fusión celular (con intercambio de material genético) aplicada a la mejora convencional no están considerados OMG.

Aunque las plantas MG están definidas a partir del uso de una técnica mediante la cual se introduce un gen heterólogo en la célula vegetal, la obtención de plantas MG incluye procesos adicionales. La transformación de plantas se divide en dos grandes bloques: (i) inserción del ADN de interés en el genoma de la célula huésped y (ii) propagación y regeneración de la célula transformada en planta. La inserción de un fragmento de ADN de interés en el genoma de una célula huésped se realiza mediante el uso de técnicas de ingeniería genética. Las tecnologías más utilizadas hoy en día se basan en principios diferentes pero todas ellas se han mostrado eficaces. Éstas se dividen en (i) transformación mediada por *Agrobacterium*, vector biológico que participa del proceso de transferencia; y (ii) métodos de transformación genética directa, también llamados físicos, mediante los cuales, por distintos mecanismos, se introduce el ADN en la célula.

Transferencia de ADN

A. tumefaciens y *A. rhizogenes* son especies bacterianas Gram-negativas fitopatógenas, capaces de transferir de manera natural un fragmento de ADN a células huéspedes vegetales. El uso de *Agrobacterium* como herramienta de ingeniería genética vegetal se utilizó por primera vez en el año 1983 (Barton *et al.*, 1983; Herrera-Estrella *et al.*, 1983), después de una larga etapa de investigación y mejoramiento técnico desde el descubrimiento de este género bacteriano. El género *Agrobacterium* comprende cuatro especies fitopatógenas, dos de ellas ampliamente estudiadas (*A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*) e identificadas en el año 1907 (Smith y Townsend, 1907). Ambas especies son capaces de infectar una amplia variedad de especies de dicotiledóneas y tienen como diana de infección las heridas, atacando células individuales y provocando su proliferación. *A. tumefaciens* causa “tumores”, enfermedad que se conoce como agalla de la corona y *A. rhizogenes* induce la proliferación de raíces dando lugar a la enfermedad denominada raíz en cabellera. La capacidad patogénica de estas bacterias está asociada a la presencia de plásmidos mediante los cuales son capaces de introducir fragmentos de ADN en el genoma de la planta huésped. *A. tumefaciens* es la especie más utilizada para la transformación genética de plantas y cuyo mecanismo de acción ha sido más ampliamente estudiado (Gelvin, 2003; Lacroix *et al.*, 2006; Tzfira y Citovsky, 2006; Vasil, 2008; Veluthambi *et al.*, 2003). La transformación genética de la célula huésped ocurre mediante la transferencia de un fragmento de ADN (*T-DNA*, *transfer-DNA*) en el genoma cromosomal de la célula huésped. El *T-DNA* deriva del plásmido Ti (*tumor-inducing*), que se encuentra de forma

natural en *Agrobacterium* y es el responsable del carácter patogénico de la bacteria. *Agrobacterium* es capaz de transformar la célula (transferir el *T-DNA*), hacerla dividir (formación del "tumor") y proliferar ella misma. El detonante de la infección por *Agrobacterium* son los compuestos fenólicos (como la acetosiringona) liberadas por células vegetales heridas, así como moléculas de azúcares liberadas por la células vegetales como respuesta a la infección patógena, las cuales inducen la expresión coordinada de los genes de virulencia (*vir*) presentes en el plásmido Ti de *Agrobacterium* (Stachel *et al.*, 1986). La región de virulencia del plásmido Ti (de alrededor de 30 Kb) está organizada en operones esenciales para la transferencia del *T-DNA* (*vir A*, *vir B*, *vir D*, *vir E*, *vir G*). El fragmento de *T-DNA* incorpora una serie de genes que codifican hormonas vegetales reguladoras del crecimiento, y proteínas de síntesis de opinas. El *T-DNA* está delimitado por dos repeticiones directas imperfectas de 25 pares de bases (pb) que lo flanquean, llamadas bordes izquierdo y derecho (*Left Border*, *LB* y *Right Border*, *RB*): el fragmento de ADN ubicado entre ellos es el que se transfiere al genoma de la planta huésped. Este fenómeno, la transferencia de un fragmento de ADN de un organismo procariota a uno eucariota, se ha utilizado pues en los avances biotecnológicos para la introducción de nuevos genes en plantas. El *T-DNA* se ha substituido por genes codificantes de proteínas de interés y un gen marcador para la selección de las células transformadas. El plásmido Ti de *Agrobacterium* es un megaplásmido de ~200 Kb, motivo por el cual fue necesaria la modificación del sistema para facilitar su manipulación. Un avance muy importante fue la generación de un sistema binario de vectores (Hoekema *et al.*, 1983), aprovechando que las proteínas de virulencia del plásmido Ti pueden actuar en *trans*. Así, se utilizan cepas de *Agrobacterium* que incluyen un plásmido Ti sin *T-DNA* pero que mantiene los genes de virulencia para la transferencia de ADN: estos genes permitirán la transferencia del *T-DNA* de interés, clonado en otro plásmido (lanzadera), motivo por el cual se denomina plásmido *helper*. El plásmido lanzadera es de tamaño relativamente pequeño, de fácil manipulación y presenta un amplio espectro de replicación, pudiéndose trabajar con él en las cepas de *E. coli* más utilizadas para clonajes.

La primera transformación genética se remonta al año 1983, cuando se transfirió y expresó un gen exógeno en tabaco (Herrera-Estrella *et al.*, 1983). En los años posteriores se transformaron distintas especies de plantas dicotiledóneas, huéspedes naturales de *Agrobacterium*. Las monocotiledóneas, en cambio, no son huéspedes naturales de *Agrobacterium*, de forma que especies económicamente importantes como los cereales no pudieron transformarse hasta más tarde. El arroz se transformó en el año 1994 después de varios intentos y del desarrollo de un proceso de transformación eficiente y reproducible (Hiei *et al.*, 1994). Más tarde, plantas como el maíz (Ishida *et al.*, 1996), el trigo (Cheng *et al.*, 1997) o la caña de azúcar (Enríquez-Obregón 1997, 1998; Arencibia *et al.*, 1998) se modificaron genéticamente con éxito.

Existen otros métodos de transformación de células vegetales, como fusión de protoplastos, electroporación y biolística. La biolística, o bombardeo de partículas, ha sido una de las técnicas más utilizadas para la transferencia directa de ADN desde que se utilizó con éxito para la transformación de células de la epidermis de cebolla (Klein *et al.*, 1987). En pocos años se ha aplicado a una gran variedad de especies y tejidos vegetales, como maíz (Fromm *et al.*, 1990), caña de azúcar (Bower y Birch, 1992), trigo (Vasil *et al.*, 1992), arroz (Christou *et al.*, 1991) y algodón (McCabe y Martinell, 1993). Esta tecnología se basa en la transferencia directa de fragmentos de ADN, adheridos a pequeñas partículas de oro o tungsteno, a la célula huésped. Estas partículas son sometidas a un proceso de aceleración, de forma que sean capaces de perforar la pared y membranas celulares y liberar el ADN, en algunos casos sin causar daños irreversibles a la célula (Sandford *et al.*, 1993). El sistema de bombardeo mediante helio comprimido fue el primer sistema de aceleración utilizado en el bombardeo de partículas (Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System) (Kikkert, 1993). Hoy en día existen otras tecnologías, como PIG (*particle inflow gun*) o ACCEL™ (aceleración mediante descarga eléctrica) (Shewry *et al.*, 2008). La biolística ha supuesto la posibilidad de transformar especies vegetales y tejidos que se mostraban difíciles de transformar mediante *Agrobacterium*. Sin embargo, el método presenta algunas limitaciones, ya que se dan con frecuencia fenómenos como la inserción de un número elevado de copias del transgén (enteras y/o truncadas, ya que la secuencia de ADN insertada no es de longitud definida), silenciamiento génico o reordenamientos genómicos. Aunque la inserción de más de una copia también es posible en el caso de *Agrobacterium*, el número de copias que se incorpora acostumbra a ser relativamente bajo (Shewry *et al.*, 2008). Además *A. tumefaciens* posee un mecanismo natural muy eficiente para transferir, al núcleo celular, el *T-DNA* que contiene el transgén y producir una integración en regiones cromosómicas con actividad transcripcional. Generalmente los patrones de inserción de transgenes son más sencillos en comparación a los producidos por el método biolístico. Estas diferencias entre los dos métodos presentados hacen que el método de transformación por *Agrobacterium* sea el más utilizado cuando la especie a transformar lo permite. Tanto para el desarrollo de nuevas variedades comerciales como para la investigación básica de expresión de transgenes, es deseable disponer de inserciones simples y bien definidas molecularmente.

Regeneración, selección y aclimatación

Los protocolos de transformación genómica estable requieren procesos de cultivo *in vitro* para la obtención de una planta a partir de una célula transformada. En plantas, las células de un individuo poseen la capacidad necesaria para permitir el crecimiento y el desarrollo de un nuevo individuo completo, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales (totipotencialidad celular, característica de las células meristemáticas y que disminuye con el

grado de diferenciación de las células, aunque puede revertirse en cultivo). Las células vegetales cultivadas *in vitro* pueden desdiferenciarse mostrando crecimiento tumoral formando callos, que en las condiciones adecuadas pueden generar órganos o embriones somáticos (organogénesis o embriogénesis indirecta); o bien formar directamente órganos (organogénesis) o embriones (embriones somáticos) (Shewry *et al.*, 2008). Dado que la manipulación genética requerida para introducir los transgenes se da a nivel de una célula, es necesario desarrollar una tecnología de cultivo de tejidos *in vitro* adecuada para cada especie vegetal. De este modo, las células inicialmente transformadas regenerarán, mediante propagación vegetativa, una planta completa donde todas las células contendrán el mismo transgén en la misma posición genómica. Este paso es el factor limitante en la obtención de plantas transgénicas de determinadas especies. Las líneas de arroz MG presentadas en esta tesis se obtuvieron mediante la transformación con *Agrobacterium* de callos generados a partir de embriones.

Debido a la baja eficiencia de la integración de ADN, es indispensable la utilización de un sistema de selección de las células transgénicas que se quieren utilizar para regenerar plantas. El objetivo es en general evitar el crecimiento de aquellas células no transformadas y permitir la división de las células que han incorporado y pueden expresar el ADN de interés. Los sistemas de selección requieren la inclusión de un gen de selección en el fragmento de ADN transferido a la célula. Requieren también la visualización de la característica derivada de la expresión del gen de selección, que frecuentemente implica la adición de un agente de selección en el medio de cultivo de las células transformadas (Shewry *et al.*, 2008). Los sistemas de selección positiva se han utilizado ampliamente. Entre los más comunes se encuentran las resistencias a antibióticos y herbicidas (Sundar y Sakthivel, 2008), siendo los genes de selección más utilizados:

- *npt II*: codifica la enzima neomicina fosfotransferasa, que inactiva antibióticos de la familia de los aminoglucósidos (Bevan *et al.*, 1983; Fraley *et al.*, 1983). El antibiótico más común es la kanamicina.
- *hpt II*: aislado de *E. coli*, codifica la enzima higromicina fosfotransferasa, de la familia de los aminoglucósidos fosfotransferasa. Confiere resistencia al herbicida higromicina B (Waldron *et al.*, 1985).
- *bar*, de *Streptomyces hygroscopicus*: codifica la enzima fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) (Waldron *et al.*, 1985; White *et al.*, 1990). Esta enzima acetila el principio activo glufosianato de amonio (PPT), incluido en muchos herbicidas comerciales (p.ej. Bialaphos, Finale o Basta), a una forma no tóxica. Consecuentemente, sólo aquellas células que incorporan el gen son capaces de sobrevivir en presencia de PPT.

Una de las causas de preocupación acerca de los OMG en términos de seguridad humana, animal y ambiental está relacionado con la transferencia horizontal y vertical de transgenes, incluidos los genes de selección, particularmente aquellos que confieren resistencia a antibióticos (Darbani *et al.*, 2007; ISAAA, 2009). El uso de sistemas de selección positiva representa una alternativa. Se trata de genes que permiten p.ej. la fermentación de determinados hidratos de carbono. Así, el gen *manA*, aislado de *E. coli* (Miles y Guest, 1984), codifica la enzima fosfomanosa isomerasa (PMI) que convierte la manosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato, de forma que las células pueden utilizar manosa como fuente de hidratos de carbono (Joersbo *et al.*, 1998).

Otro tipo de selección la presentan aquellos genes que codifican proteínas que mediante su expresión permiten visualizar las células transformadas. Esta aproximación no requiere el uso de aditivos en el medio y consecuentemente las células no transformadas también crecerán el medio de cultivo. La selección de la células transformadas se realiza pues, manualmente (ISAAA, 2009). Los genes de este tipo más usados son:

- *uidA*, aislado de *E. coli*, que codifica la enzima β -glucuronidasa (GUS) (Jefferson *et al.*, 1986). Esta enzima hidroliza el sustrato incoloro 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucósido (X-GLU) a un compuesto que forma el precipitado azul diXH-indigo. Se requiere la adición del sustrato.
- *gfp*, codificante de la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria*, que emite luz verde fluorescente cuando se expone a una fuente de luz ultravioleta (Ormo *et al.*, 1996). Esta aproximación permite la monitorización de la expresión del transgén en células o incluso plantas enteras. Aunque la selección mediante GFP es ampliamente utilizada en la transformación genética, otras proteínas de características similares como AmCyan, ZsGreen, AsRed, DsRed, HcRed y ZsYellow son igualmente aplicables.

Aunque estas proteínas permiten un sistema de selección sostenible, algunas investigaciones se han centrado en el desarrollo de plantas MG libres de genes marcadores, eliminado *a posteriori* el gen marcador del genoma de la planta huésped. El sistema más simple para llegar a este objetivo se basa en la co-transformación de los genes de selección y de interés, de forma que cada uno se integre en un *locus* diferente del genoma. Posteriormente se pueden seleccionar en las generaciones sucesivas aquellos segregantes que únicamente incorporen el transgén de interés. Los métodos utilizados se basan en: i) la introducción de dos *T-DNA* incorporados en dos cepas de *Agrobacterium*, ii) el uso de una cepa de *Agrobacterium* transformada con dos vectores de transformación independientes o iii) la introducción de dos secuencias de *T-DNA* en zonas separadas de un mismo vector de transformación.

Alternativamente, existen formas de eliminar el gen marcador basadas en recombinación específica (*site-specific*), transposones o recombinación intracromosomal (Miki y McHugh, 2004).

Una vez obtenida la plántula MG en cultivo *in vitro*, debe someterse a un cambio de las condiciones de cultivo para seguir su desarrollo en invernadero. Éste es un proceso crítico, especialmente para algunas especies. La plántula cultivada *in vitro* crece en condiciones altamente controladas tanto a nivel de sustratos como ambientales. El medio de cultivo es rico en azúcares y hormonas, por lo que los niveles de fotosíntesis son reducidos y la planta se encuentra en un estado de desequilibrio hormonal. Además, las condiciones ambientales son de humedad elevada y constante, reducida concentración de CO₂ y baja actividad lumínica, lo que conlleva un intercambio gaseoso restringido. El cultivo *in vitro* requiere condiciones de trabajo asépticas, generando un estado de ausencia de bacterias y hongos que no se da en la naturaleza. Todas estas condiciones hacen que la planta se encuentre en un estado anormal, adquiriendo una anatomía distinta p.ej. miniaturización, cutículas más delgadas, cambios fisiológicos como estomas no funcionales o hasta variaciones en los tejidos de los órganos, como la ausencia de raíces. El paso de las condiciones de cultivo *in vitro* a cultivo en invernadero o en campo requiere un proceso de aclimatación, que consiste en propiciar de forma paulatina una serie de cambios en las plántulas provenientes del cultivo *in vitro*, destinados mayoritariamente a aumentar la capacidad fotosintética, controlar la pérdida de agua, la absorción radicular (enraizamiento) y reforzamiento foliar. Para llegar a estos objetivos las plantas se someten a cambios ambientales graduales durante un período de tiempo que, dependiendo de la especie vegetal, puede durar hasta semanas.

I.3 Aplicaciones de la transgénesis

Desde la primera planta MG en el año 1983 (Barton *et al.*, 1983; Herrera-Estrella *et al.*, 1983) ha sido posible la introducción de una gran variedad de genes en plantas, con finalidades muy diversas. La utilización de plantas MG no ha quedado restringida solamente a la obtención de nuevas variedades de interés agronómico, sino que se han obtenido por ejemplo, plantas con mejores características nutricionales o plantas de interés industrial. Además, las plantas MG suponen una herramienta valiosa en la investigación de genómica funcional. En este apartado se presentan diferentes aplicaciones de las plantas MG.

Investigación básica

Las plantas MG constituyen una herramienta de gran importancia en la investigación básica de la biología de plantas. Los principales objetivos de esta aplicación se centran en la

comprensión de las funciones de determinados genes (en relación p. ej. con el metabolismo y los procesos biológicos de la planta), así como en el descubrimiento de genes relacionados con los caracteres fisiológicos, fenotípicos, de respuesta a estímulos exógenos, etc. Para ello se recurre a técnicas de ingeniería genética que permiten la alteración de la expresión de determinados genes para comprender así sus funciones específicas.

Una de las técnicas aplicadas es la mutagénesis insercional, que se basa en la introducción de un elemento transponible en el genoma de la planta huésped, el cual sirve de marcador molecular del gen interrumpido. Esta técnica ha permitido la generación de librerías de mutantes fenotípicos, de las cuales se han podido identificar mutantes de interés para estudiar y comprender la función del gen interferido que se puede identificar mediante la secuenciación de la zona flanqueante del lugar de inserción (*flanking site tag*, FST). Esta técnica se ha aplicado en gran medida en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y se ha extendido también a otras especies como arroz, de gran importancia por la similitud genómica con otros cereales, también de interés nutricional (Schoof y Karlowski, 2003).

Otras tecnologías permiten la reducción de expresión (*knocking-down*) o el silenciamiento de genes así como su completa anulación (*knocking-out*). Las estrategias aplicadas disponibles para tales objetivos se basan en la introducción de secuencias antisentido de ARN (Bourque, 1995), la co-supresión (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990), ARN interferente (ARNi) (Baulcombe, 2000) y silenciamiento de genes mediado por virus (*virus-induced gene silencing*, VIGS) (Fire *et al.*, 1998) las cuales son aproximaciones de silenciamiento post-transcripcional. La interferencia mediante ARN es un fenómeno de silenciamiento de genes a través de la degradación del ARN mensajero (ARNm) o la inhibición de la traducción, para la regulación de la expresión génica, el control del desarrollo, la defensa celular frente a virus, transposones o transgenes. Las moléculas de ARN causantes del silenciamiento pueden ser sintéticas, víricas o genes nucleares transcritos; y pueden distinguirse dos tipos de ARNi: ARN interferente pequeño [(ARNip), en inglés *small interfering RNAs* (*siRNA*)] de virus, transgenes, transposones o loci genómicos de plantas; y microARN (miARN) derivados de regiones genómicas no codificantes. Los ARNip (de 21 a 24 nucleótidos) se forman a partir de moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc) mediante hidrólisis por el enzima *DICER* (Bernstein *et al.*, 2001). La cadena guía de los ARNip se incorpora en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y se une al ARNm diana (por homología de secuencia), de forma que se induce la degradación de la misma por la proteína Argonauta, unidad catalítica del complejo RISC (Liu *et al.*, 2004, Song *et al.*, 2004; Baykal y Zhang, 2010). La tecnología de ARNi se presenta como una herramienta potente de ingeniería genética de plantas para alterar la expresión génica y obtener mejores características como reducción de toxinas o compuestos alergógenos, mejor valor nutritivo o resistencia a estrés sin la expresión de nuevas proteínas. En una primera

aproximación, se introduce un transgén consistente en una molécula de ADN compuesta por las dos cadenas complementarias de una secuencia, separadas por un fragmento de ADN, por ejemplo un intrón. El ARN resultante puede formar una estructura en doble cadena con horquilla (*hairpin*, *hpRNA*). Esta técnica ha resultado efectiva en numerosas especies vegetales (Nunes *et al.*, 2006). Sin embargo, estas largas secuencias *hpRNA* puede causar silenciamiento inespecífico de genes no diana (Xu *et al.*, 2006). Una segunda generación de vectores de ARNi se basa en miARNs, cuya actividad depende no sólo de la secuencia sino también de su estructura secundaria, mostrándose más específicos. Las secuencias de miARN son de cadena sencilla, tienen unos 21 nucleótidos y son generadas enzimáticamente a partir de precursores de RNA más largos, que se pliegan sobre sí mismos formando estructuras reconocidas e hidrolizadas por proteínas de la familia DICER. Interaccionan también con el RISC y se unen por complementariedad de bases con moléculas de ARNm, lo que causa la digestión del ARNm diana o su inhibición traduccional. Recientemente se ha desarrollado una tecnología de miARNs sintéticos basados en secuencias de miARNs naturales con sustituciones que, sin modificar la estructura secundaria de los mismos, sí modifican la especificidad de secuencia. Este método ha demostrado ser eficaz en *Arabidopsis* (Álvarez *et al.*, 2006; Schwab *et al.*, 2006), tabaco (Álvarez *et al.*, 2006), tomate (Álvarez *et al.*, 2006) y arroz (Warthmann *et al.*, 2008).

Mejora agronómica y nutricional

Sin duda la ingeniería genética se ha convertido en una tecnología importante en el campo de la mejora vegetal. La modificación genética, como la mejora clásica, tiene como objetivo la obtención de plantas con mejores propiedades agronómicas, nutricionales y/o de calidad del cultivo. Adicionalmente, permite la introducción de nuevas características que no existían previamente en la especie. Si la característica deseada no está presente en ninguna de las variedades que se pueden cruzar, alternativas a la transformación genética serían la aplicación de agentes mutágenos químicos o radiaciones ionizantes (Ahloowalia y Maluszynski, 2001). Sin embargo, estas técnicas de mutagénesis no dirigida introducen mutaciones no esperadas, lo que podría suponer un riesgo para la salud o el medio ambiente. La transformación génica supone en muchos de estos casos la mejor opción, permitiendo la introducción de un gen de otra especie para obtener una característica deseada.

La mayor parte de las variedades de plantas MG actualmente comercializadas incorporan transgenes destinados a la mejora de características agronómicas (cultivo y/o productividad). Desde el inicio de la comercialización de OMGs en el año 1996 hasta la actualidad, la característica más dominante entre las variedades MG es la resistencia a herbicidas, presente en variedades comerciales de soja, maíz, colza, algodón, remolacha, alfalfa, arroz, tabaco, trigo

entre otros (ISAAA, 2010; *Agbios Database*). Este tipo de variedades ocupan un 61% de superficie cultivada a nivel global. Las variedades con resistencia a insectos y aquellas con dos o tres modificaciones (*stacked events*) ocuparon un 17% y un 22% del área mundial cultivada, respectivamente. Se ha modificado una gran variedad de especies vegetales con transgenes que les confieren resistencia a patógenos, salinidad, estrés hídrico o que presentan madurez retardada. Este tipo de plantas MG, que suponen básicamente una ventaja para los agricultores, constituye una primera aplicación de la ingeniería genética y se conoce como la primera generación de plantas MG. Actualmente existen variedades resistentes a cuatro herbicidas diferentes: glifosato, oxinil, glufosinato e imidazolinon (*Agbios Database*, www.agbios.com). La soja con tolerancia a glifosato fue la primera planta MG tolerante a un herbicida que se comercializó (Padgett *et al.*, 1995). Incorpora el gen de la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (*epsps*), aislada de la bacteria *A. tumefaciens*, que le confiere tolerancia a glifosato, el compuesto activo del herbicida *Roundup*[®]. Hoy en día muchas especies vegetales MG comerciales incorporan un transgén codificante de EPSPS (p.ej. remolacha, colza, algodón, alfalfa, trigo y maíz). Por otra parte, se han desarrollado plantas resistentes a insectos mediante la introducción de distintas formas del gen *cry* de la especie bacteriana *Bacillus thuringiensis* (de Maagd *et al.*, 1999). Este tipo de característica se ha introducido en una gran variedad de especies vegetales comerciales como algodón, tomate, patata o maíz (*Agbios Database*, www.agbios.com). Existen también diversas variedades comerciales MG a las que se ha conferido resistencia a virus. En la última década se han desarrollado líneas MG con más de una característica, como p.ej. resistencia a insectos y tolerancia a herbicida; o con resistencia a distintos tipos de insectos. Estas líneas, conocidas como líneas con genes superpuestos o *stacked events*, resultan del cruzamiento de dos (o más) líneas MG independientes. La expresión de transgenes codificantes de péptidos antimicrobianos (PAM) en plantas como estrategia de mejora agronómica para la autoprotección de la planta ha resultado también eficaz en numerosos casos. Aunque la síntesis de PAM con características extremas puede presentar un reto para la planta (mostrado en esta tesis) la finalidad de dicha estrategia presenta la ventaja de no requerir grandes acumulaciones de proteína ni tampoco su procesado. Existen numerosos ejemplos de variedades vegetales modificadas con resistencia a hongos, bacterias, insectos, herbicidas, estreses salinos o hídricos (tabla I.3).

Algunas variedades MG autorizadas presentan otro tipo de características, concretamente mejoras nutricionales (p. ej. colza o soja con contenidos de ácidos grasos modificados; o maíz con alterada composición en aminoácidos), o modificaciones que afectan el procesado de los frutos (p. ej. tomate o melón con maduración retardada; o maíz con alfa-amilasa termoestable). Más recientemente se han desarrollado variedades con niveles de almidón, aceites y proteínas alteradas. Un ejemplo muy reciente lo presenta la patata *Amflora*,

aprobada para liberación al medio ambiente el 02.02.2010 por la comisión de la Unión Europea (<http://www.gmo-compass.org>). Presenta alterados los porcentajes de amilosa y amilopectina como consecuencia de la inhibición biotecnológica de la expresión de la proteína almidón sintasa unida a gránulos (GBSS), que es responsable de la biosíntesis de la amilosa. Así, el almidón de esta nueva variedad de patata está esencialmente formado por amilopectina, el componente con mayor interés industrial, de forma que no es necesario el procesado del almidón para eliminar la amilosa, lo que supone un ahorro energético y económico importante para la industria del almidón.

Una aproximación que actualmente se encuentra en desarrollo es la inserción de varios genes en el genoma de la planta huésped para la obtención de nuevas variedades de interés mediante la alteración de rutas metabólicas compuestas. Un ejemplo conocido es el Golden Rice, un arroz modificado para sintetizar y acumular la provitamina A (β -caroteno) en el endospermo de la semilla. Ha sido modificado mediante *Agrobacterium* y se han introducido tres enzimas esenciales para la síntesis de β -caroteno codificadas por los genes *phytoene synthase (psy)* de *Narcissus pseudonarcissus*, *phytoene desaturase* de *Erwinia uredovora* y *lycopene β -cyclase* de *Narcissus pseudonarcissus* (Ye *et al.*, 2000). En el año 2005 se mejoró esta variedad mediante la sustitución del gen *psy* de narciso por el *psy* de maíz. Esta modificación generó la variedad Golden Rice2, con mayores niveles de β -caroteno (Paine *et al.*, 2005). La comercialización de Golden Rice está prevista para el año 2013 (ISAAA, 2010). Estas nuevas variedades con propiedades nutricionales mejoradas se conocen como los OMG de segunda generación (Robinson, 2002). Otros ejemplos serían las plantas oleaginosas con elevado contenido en aceite tocoferol en la semilla (Karunanandaa *et al.*, 2005), el maíz con elevados niveles de vitamina C (Chen *et al.*, 2003), el arroz con elevado contenido en hierro (Luca *et al.*, 2006); o la soja con acumulación de ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs) (Chen *et al.*, 2006).

Tabla I.3: Ejemplos de plantas MG como estrategia de autoprotección

Planta huésped	Transgén	Resistencia	Referencia
Proteínas			
Arabidopsis	Dehidroascorbato reductasa	Estrés salino	Ushimaru <i>et al.</i> , 2006
Arroz	<i>cry1Ca1</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Insecto	Zaidi <i>et al.</i> , 2009
Arroz	Superóxido dismutasa de guisante	Estrés hídrico	Wang <i>et al.</i> , 2005
Arroz	Inhibidor de proteasa de maíz (<i>mpi</i>)	Insecto	Vila <i>et al.</i> , 2005
Arroz	<i>Cry1B / Cry1Aa</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Insecto	Breitler <i>et al.</i> , 2004
Cacahuete	Chitinasa de arroz	Hongos	Iqbal <i>et al.</i> , 2011
Remolacha	Acetolactato sintasa de Arabidopsis	Herbicida	Kishchenko <i>et al.</i> , 2011
Álamo	Factor de respuesta etileno de tomate	Estrés salino	Li <i>et al.</i> , 2009
Sandía	HAL1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Estrés salino	Ellul <i>et al.</i> , 2003

Tabla I.3 (Continuación): Ejemplos de plantas MG como estrategia de autoprotección

Planta huésped	Transgén	Resistencia	Referencia
Péptidos antimicrobianos			
Arroz	Tanatina	Hongos	Imamura <i>et al.</i> , 2010
Arroz	Cecropina B	Bacterias	Sharma <i>et al.</i> , 2000
Arroz	Cecropina A	Hongos	Coca <i>et al.</i> , 2006
Arroz	Proteína antifúngica AFP	Hongos	Coca <i>et al.</i> , 2004
Arroz	Defensina DrB1	Insecto	Choi <i>et al.</i> , 2009
Cebada	Metchnikowin	Bacterias	Rahnamaeian <i>et al.</i> , 2009
Cebada	Lactoferrina humana	Herbicida	Tanasienko <i>et al.</i> , 2011
Tabaco	Sarcotoxin IA	Bacterias y hongos	Mitsuhara <i>et al.</i> , 2000
Tabaco	MsrA2 / temporin A	Patologías generales	Yevtushenko <i>et al.</i> , 2007
Tabaco	Análogo de magainina	Patologías generales	Li <i>et al.</i> , 2001
Tabaco	Híbrido CecA-Melitina	Hongos	Yevtushenko <i>et al.</i> , 2005
Tomate	Cecropina B	Bacterias	Jan <i>et al.</i> , 2010
Trigo	Defensina	Bacterias	Li <i>et al.</i> , 2011
Patata	Defensina	Hongos	Gao <i>et al.</i> , 2000
Patata	<i>Stacked</i> : AP24 osmotine/dermaseptin/lisozima	Bacterias y hongos	Rivero <i>et al.</i> , 2011

Plantas biofactoría

La tercera generación de plantas MG se encuentra actualmente en proceso de expansión, y se conoce como *Plant Molecular Farming* (PMF), o uso de plantas como biofactoría o bioreactor para la producción de proteínas recombinantes o metabolitos secundarios de interés farmacológico, industrial, fitopatológico, etc. La primera proteína recombinante expresada en plantas fue una hormona de crecimiento de origen humano en tabaco, y se publicó en 1986 (Barta *et al.*, 1986). El potencial de la plantas MG para su uso como biofactoría no se reconoció hasta el año 1997 cuando se expresó la proteína recombinante avidina (de huevo) en maíz, con un objetivo comercial (Hood *et al.*, 1997). Desde entonces ha sido posible la síntesis en planta de una gran variedad de biomoléculas, como anticuerpos, vacunas, hormonas, citosinas, enzimas o polímeros. El mercado de productos biofarmacéuticos recombinantes representó en el año 2007 el 10 % del mercado global farmacéutico. Estos datos reflejan la necesidad de alternativas innovadoras para la producción de compuestos de valor añadido a bajo coste, puesto que la síntesis química supone un elevado coste económico y resulta inviable para sustancias sin un valor añadido muy elevado. Las técnicas biotecnológicas más consolidadas abarcan cultivos de microorganismos (bacterias, levaduras), cultivos de células vegetales o animales, y plantas MG. Cada uno de estos sistemas tiene por supuesto sus ventajas y desventajas, dependiendo del tipo de proteína a expresar, su finalidad y su aplicación. Los cultivos de células de mamífero MG presentan a menudo ventajas puesto que son capaces de

introducir modificaciones post-traduccionales similares a las que se producen en células humanas: ello es especialmente relevante en el caso de proteínas cuya estructura y modificaciones post-traduccionales son necesarias para la conservación de su actividad, p. ej.: para usos farmacológicos humanos (Andersen y Krummen, 2002). El uso de cultivos microbianos es ventajoso desde un punto de vista económico (Baneyx 1999). Sin embargo, pueden presentar limitaciones en algunos casos, como para la síntesis de péptidos o proteínas con actividad antibacteriana, o si éstas se requieren en grandes cantidades. La expresión de proteínas antibacterianas mediante este sistema requiere modificaciones en la secuencia para reducir su actividad frente a la célula huésped (lo que puede conllevar una disminución considerable de su actividad contra los organismos diana). Existen ejemplos de proteínas de fusión (Li, 2009), o incluso de modificaciones para la acumulación de dichas proteínas en forma de cuerpos de inclusión inactivos (Kim *et al.*, 2006). Estas modificaciones requieren largos y costosos procesos de optimización y purificación de las proteínas recombinantes. Aun así, la expresión recombinante de péptidos antimicrobianos en células *E. coli* ha sido posible en varias ocasiones como para la síntesis de lactoferrina (Feng *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006), adenoregulina (Cao *et al.*, 2005) y un híbrido de cecropina A y magainina (Xu *et al.*, 2007).

Adicionalmente, el uso de plantas MG ha mostrado ser eficiente para la producción de grandes cantidades de diversas proteínas, como vacunas, anticuerpos u hormonas de crecimiento. La capacidad de las plantas de acumular grandes cantidades de biomasa hace posible la producción de moléculas a gran escala y a bajo coste, siendo incluso rentable para proteínas con bajos rendimientos de síntesis (Thymann *et al.*, 2003). El coste de síntesis de proteínas recombinantes en planta se ha estimado en el rango de un 2 a un 10% de los costes que generan los sistemas de fermentación microbiana y en hasta un 0,1% de los generados por cultivos de células de mamífero (Giddings, 2001). Los sistemas de expresión en planta se estiman rentables incluso si la proteína transgénica se sitúa sólo a niveles del 0,1-1% de la proteína total soluble (PTS), así como para productos de poco valor añadido como aquellos destinados a la agricultura.

Aunque los productos farmacéuticos producidos por otros métodos biotecnológicos tienen una amplia aplicación comercial, en las últimas dos décadas se han realizado grandes avances en el uso de plantas como biofactorías (revisiones: Boehm, 2007; Daniell *et al.*, 2009). Algunos ejemplos recientes de proteínas sintetizadas en planta con interés clínico son la vacuna para prevención del linfoma non-Hodgkin (McCormick *et al.*, 2008), la proteína IFN- α 2b para prevenir la hepatitis C (<http://biolex.com>) o la enzima glucocerebrosidasa de origen humano para combatir la enfermedad de Gaucher (Aviezer *et al.*, 2009) (Revisión: Obeme *et al.*, 2011). En relación a los compuestos de interés industrial, la creciente demanda comercial de polímeros y productos químicos provenientes de recursos renovables ha abierto nuevas

posibilidades en el uso de las plantas MG. Algunos ejemplos serían la producción de proteínas fibrinosas como la seda o el colágeno en *Arabidopsis* (Ruggiero *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2005) o la producción de polihidroxiálcanoato (PHAs, potencial sustituto del polipropileno) en colza (Houmiel *et al.*, 1999), remolacha (Menzel *et al.*, 2003) o caña de azúcar (Petrasovits *et al.*, 2007). Entre los compuestos de interés industrial se encuentran además enzimas como endoglucanasa, esenciales para la conversión de celulosa a combustible líquido (Oraby *et al.*, 2007; Ransom, *et al.*, 2007). Industrias biotecnológicas como *Maltagen Forschung GmbH*, *Meristem Therapeutics*, *Saponin Inc.* y *Ventria Bioscience* aplican esta alternativa para la producción del PAM lactoferrina en plantas biofactoría de cebada, maíz, tabaco, patata, arroz o saponaria (Spök *et al.*, 2006). La tabla I.4 muestra algunos ejemplos de la expresión de proteínas de interés farmacéutico en plantas y suspensiones vegetales MG.

Aunque el sistema de expresión en planta tiene un potencial muy elevado, no hay que perder de vista que un sistema de expresión sólo es eficiente si se cumplen los requisitos necesarios. El nivel de expresión de la proteína en cuestión dependerá de la planta huésped escogida, de la secuencia génica de interés y reguladora, del compartimento subcelular y tejido en que se acumula. En plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, se han descrito buenos rendimientos de expresión con los promotores de la ubiquitina de maíz (*p-ubi*) y del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV 35S*), respectivamente (Fisher *et al.*, 2004). Promotores inducibles o específicos de tejido han resultado útiles para acumulación de proteínas que afectan el crecimiento y desarrollo de la planta (Corrado y Karali, 2009). Adicionalmente, la estabilidad de las proteínas es un factor limitante para conseguir su acumulación en grandes cantidades (Schillberg *et al.*, 2005). Una estrategia eficaz es la acumulación de la proteínas recombinantes en el retículo endoplasmático (RE) mediante la fusión a un péptido señal y una secuencia específica de retención en los extremos N- y C-terminal de la proteína, respectivamente (Rademacher *et al.*, 2008). También se utilizan sistemas de acumulación a nivel de semilla, por ejemplo mediante secuencias de proteínas de reserva de endospermo como la γ -zeína de maíz (Torrent *et al.*, 2009), o en arroz la acumulación a endospermo regulada por los promotores y péptidos señales de la globulina y glutelina de arroz (Yang *et al.*, 2003).

Como se ha comentado más arriba el sistema de expresión elegido para la síntesis de proteínas heterólogas en planta es importante para su acumulación en cantidades deseadas. Para ello se recurre a menudo a un análisis previo de funcionalidad de promotores. Las plantas MG se consideran buenas herramientas para tales estudios aplicando la técnica conocida como transformación transitoria. Los ensayos de expresión transitoria poseen la ventaja de ser rápidos y eficientes, y permiten obtener información sobre el comportamiento *in planta* del transgén (Lu *et al.*, 1998). Hoy en día la transformación transitoria mediante *Agrobacterium*, y

concretamente la agroinfiltración de hojas, es una técnica ampliamente aplicada en estudios de biología molecular de plantas (Wroblewski *et al.*, 2005), como la caracterización de promotores y factores de transcripción. Un ejemplo de la aplicación de este sistema de expresión es el estudio realizado en tabaco sobre la aplicabilidad de promotores sintéticos como fitosensores (Lui *et al.*, 2011). En este caso, la aplicación de hormonas o patógenos sobre hojas agroinfiltradas confirmaron la funcionalidad de los promotores en el sistema de expresión escogido. Esta técnica es de gran utilidad en el estudio funcional de promotores y como análisis previo a la transformación estable.

Tabla 1.4: Ejemplos de plantas MG y su uso como biofactorías para la expresión de biomoléculas de interés comercial

Planta huésped	Biomolécula	Aplicación	Estado de los ensayos clínicos	Compañía/ Institución	Referencia
Vacunas					
Tabaco	Vacuna contra el cancer	Linfoma no-Hodgkin (LNH)	Fase II	Large Scale Biologya, USA	www.gmo-safety.eu/article/483
Tabaco	Antígeno	Virus de papiloma	Inicial	Large Scale Biologya, USA	www.lsbc.coma
Espinacas	Proteína quimérica	Rabia	Fase I	Thomas Jefferson University, USA	www.labome.org/expert/usa
Anticuerpos					
Tabaco	CaroRX	Caries dental	Autorizada	Planet Biotechnology, USA	www.planetbiotechnology.com/
Tabaco	Anticuerpos Fv	Linfoma no-Hodgkin (LNH)	Fase I	Large Scale Biology, USA	www.lsbc.coma
Tabaco	Anticuerpo contra hepatitis B	Purificación de vacunas	Autorizada	CIGB, Cuba	Kaiser, 2008
Proteínas terapéuticas					
Maíz	Gastric lipase, Merispase®	Fibrosis cística	Autorizada	Meristem Therapeutics, France	www.meristem-therapeutics.com
<i>Lemnoideae</i>	Lactoferon™ (α-interferon)	Hepatitis B y C	Fase II	Biolex, USA	www.biolex.com/
Suspensión celular de zanahoria	Glucocerebrosidasa humana	Enfermedad de Gaucher	Pendiente de aprobación por USDA	Protalix Biotherapeutics, Israel	www.protalix.com/gluocerebrosidase.html
<i>Carthamus tinctorius</i>	Insulina	Diabetes	Fase III	SemBioSys, Canada	www.sem biosys.com/
Nutraceuticos					
Arroz	Lactoferrina humana	Antiinflamatorio Antiinfectivo	Autorizada	Ventria, USA	www.ventriabio.com/
Arroz	Lisozima humana	Antiinflamatorio Antiinfectivo	Autorizada	Ventria, USA	www.ventriabio.com/
<i>Carthamus tinctorius</i>	Immunosphere™	Aditivo alimentario	Autorizada	SemBioSys, Canada	www.sem biosys.com/

I.4 Análisis de plantas MG para la seguridad de alimentos y piensos; y del medio ambiente

A pesar de que el cultivo y la comercialización de los OMG empezaron hace más de una década, su uso sigue siendo fuente de controversias. Las principales preocupaciones sociales sobre los OMGs se centran en sus posibles efectos dañinos para la salud humana o animal, la seguridad ambiental, es decir, posibles interferencias con la naturaleza en términos de transferencia génica horizontal, así como preocupaciones éticas y socioeconómicas. Así pues, los OMGs destinados a comercialización y/o consumo están sujetos a una legislación que tiene el objetivo asegurar su inocuidad para el consumidor y el medio ambiente. A nivel global, dicha legislación se fundamenta en el principio de equivalencia sustancial.

Principio de Equivalencia Sustancial

Debido a la complejidad composicional de los alimentos, las evaluaciones de seguridad de plantas MG requieren ensayos también muy complejos (Kuiper y Kleter, 2003). Se ha abordado este tema a nivel global a través de la confección de unas guías de trabajo para la evaluación de la seguridad de los alimentos MG o derivados. La estrategia se fundamenta en la asunción de que las especies vegetales y variedades que han sido ampliamente consumidas a lo largo de la historia son seguras (Kok y Kuiper, 2003). Estas variedades se utilizan como variedades de referencia o comparadoras en los análisis de seguridad de las nuevas variedades MG; y se consideró que la ausencia de diferencias sustanciales respecto a las variedades comparadoras es un criterio fundamental para considerar segura una nueva variedad. Este concepto se ha definido como el **Principio de Equivalencia Sustancial** por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE, 1993); y ha sido además desarrollado por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2000), la Organización de Agricultura y Alimentación (FAO, 2000) y el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (*International Life Sciences Institute*, ILSI). La comparación contempla inicialmente análisis composicionales (p.ej. de nutrientes, anti-nutrientes, alérgenos y toxinas naturales) y aspectos fenotípicos y agronómicos. En caso de que las líneas comparadas sean sustancialmente equivalentes, excepto en la característica conferida por el transgén, únicamente se requieren de forma adicional análisis focalizados en la proteína derivada del transgén, como análisis de toxicidad específica y alergenicidad de la misma y su efecto sobre la dieta. Es necesario también estudiar aspectos como la estabilidad del transgén y su expresión a lo largo de las generaciones, y su posible transferencia horizontal. Por otra parte, en ciertos casos, especialmente si se observan diferencias entre un OMG y su comparador no-MG se exigen estudios toxicológicos y nutricionales adicionales.

Para aplicar el principio de la equivalencia sustancial con éxito algunos autores (Cellini *et al.*, 2004; König *et al.*, 2004) describen una serie de puntos críticos que se deben tener en cuenta:

- Disponibilidad de la línea comparadora: la línea comparadora ideal para un OMG es la misma línea no-MG que fue transformada. Sin embargo, ésta no se encuentra siempre disponible. En muchos casos, las variedades MG comerciales resultan del cruce de diversas líneas no-MG con la línea transformada. Éste es el caso por ejemplo del maíz, especie de la que sólo unas pocas líneas pueden transformarse de forma eficiente, y éstas presentan unas características agronómicas extremadamente pobres. En estos casos, las posibles diferencias entre una variedad MG y la no-MG más próxima (*near-isogenic*) no pueden atribuirse directamente a la modificación genética, por lo que se recomiendan comparativas adicionales con otras líneas relevantes.
- Selección de los parámetros a analizar: los análisis comparativos están inicialmente dirigidos a ciertos componentes previamente establecidos, de forma que los resultados dependen evidentemente de qué componentes se hayan analizado. La OCDE ha publicado una serie de documentos consensuados en que se presentan qué parámetros deben analizarse en plantas MG de diferentes especies, en función de sus características y usos (OCDE, 2003). Existen documentos publicados para canola, soja, patata, caña de azúcar, maíz, trigo, arroz, algodón, cebada, girasol y tomate (OCDE, <http://www.oecd.org>). Dependiendo del tipo de modificación y sólo en casos específicos se requerirán análisis adicionales.
- La discriminación entre las diferencias entre plantas MG y no-MG que provienen del transgén y aquellas que han sido introducidas por otro tipo de factores como pueden ser las condiciones ambientales a que se han sometido las plantas a comparar [para reducir en lo posible este tipo de divergencias es necesario cultivar las plantas MG y sus comparadores convencionales en las mismas condiciones climáticas, (Kok y Kuiper, 2003)]; o diferencias inherentes a las plantas MG pero que no derivan del transgén sino por ejemplo del cultivo *in vitro* a que se han sometido durante el proceso de transformación [se conoce que el cultivo *in vitro* causa variación somaclonal (Veilleux *et al.*, 1998)]. Ello es relevante considerando que este tipo de técnicas tiene numerosas aplicaciones consideradas convencionales, como la propagación, la liberación de virus, etc.

Resumiendo, el principio de equivalencia sustancial es una herramienta para determinar diferencias entre OMGs y las plantas convencionales comparadoras, y ha sido reconocido como la aproximación más idónea para el análisis de riesgos de OMGs (FAO/WHO, 2000). El uso de análisis dirigidos a dianas específicas para analizar la seguridad de un OMG implica la selección de un número limitado de dianas. Este concepto ha sido criticado por no considerar inicialmente posibles efectos completamente inesperados de este proceso biotecnológico (Millstone *et al.*, 1999).

Efectos no intencionados

Los efectos no intencionados de los transgenes fueron definidos por Cellini y colaboradores (2004) como diferencias estadísticamente significativas entre un OMG y su comparador, distintas a las directamente provenientes del nuevo gen introducido. Estos efectos pueden ser predecibles, cuando el efecto es esperado y puede explicarse en base a los conocimientos sobre el metabolismo y fisiología de la planta; o no predecibles, cuando estos caen fuera del conocimiento actual. Aunque los efectos no intencionados resultantes de la mejora de variedades mediante técnicas convencionales son significativos, en los últimos años este concepto ha tomado especial relevancia en relación a los OMGs. La integración de un transgén en el genoma de la planta es un proceso que sucede al azar, con cierta preferencia en regiones ricas en genes (Koncz *et al.*, 1992), de forma que un transgén puede truncar, modificar o silenciar genes activos en la región de inserción, pudiendo resultar en alteraciones proteicas y fenotípicas. Este efecto se conoce como efecto específico del lugar de inserción del transgén. Los efectos del transgén pueden extenderse a la modificación de los niveles de expresión de otros genes (físicamente próximos al lugar de inserción o con similares promotores) o a la interacción de la proteína transgénica con la actividad de otras proteínas, es decir, puede tener efectos pleiotrópicos (Miki *et al.*, 2009). Los efectos no intencionados del transgén pueden ser positivos, negativos o tener un efecto nulo sobre la planta. En todo caso, es importante conocerlos y considerarlos.

Los métodos recomendados para evaluar la posible existencia de efectos no intencionados del transgén, y especialmente los inesperados, son los generalistas o de *profiling*, que permiten analizar de forma global la expresión génica (transcriptoma), proteínas (proteoma) o metabolitos (metaboloma) celulares. Es por ello que es el tipo de métodos propuestos como herramientas complementarias en el análisis de riesgo de OMGs (Cellini *et al.*, 2004; FAO/WHO, 2000; König *et al.*, 2004; Kuiper *et al.*, 2001). Recientemente se han publicado diversos estudios que han mostrado su utilidad en la evaluación de los efectos no esperados de diferentes transgenes en distintas especies vegetales (tabla I.5).

Tabla I.5: Técnicas de *profiling* para la detección de efectos no intencionados en plantas MG

Planta huésped	Transgén	Característica	Ensayo	Referencia
Maíz	<i>cry1Ab</i>	Resistencia a insecto	T	Coll <i>et al.</i> , 2008
Maíz	<i>cry1Ab</i>	Resistencia a insecto	T	Coll <i>et al.</i> , 2010
Maíz	<i>cry1Ab</i>	Resistencia a insecto	P	Balsamo <i>et al.</i> , 2011
Maíz	<i>cry1Ab</i>	Resistencia a insecto	P	Coll <i>et al.</i> 2011
Maíz	<i>cry1Ab</i>	Resistencia a insecto	P	Zolla <i>et al.</i> , 2008
Arroz	<i>cry1Ac</i>	Resistencia a insecto	M	Zhou <i>et al.</i> , 2009
Arroz	<i>cry2A</i>	Resistencia a insecto	Metabonomics	Cao <i>et al.</i> , 2011
Arroz	<i>afp</i>	Resistencia a hongo	T	Montero <i>et al.</i> , 2011
Arroz	<i>cecA</i>	Resistencia a hongo	T	Campo <i>et al.</i> , 2008
Patata	<i>W2</i>	Elevado contenido amilopectina	P	Lehesranta <i>et al.</i> , 2005
	<i>mal1</i>	Actividad reducida de glicoproteína II		
	<i>samDC</i>	Número reducido de tubérculos		
Patata	<i>SICDI</i>	Resistencia a insecto	P	Khalf <i>et al.</i> , 2010
<i>Arabidopsis</i>	<i>ABF3</i>	Resistencia a estrés hídrico	T	Abdeen <i>et al.</i> , 2010
<i>Arabidopsis</i>	<i>bar</i>	Gen de selección	P	Ren <i>et al.</i> , 2009
Trigo	<i>bar/nptII</i>	Gen de selección	T	Miki <i>et al.</i> , 2009
Soja	<i>EPSPS</i>	Tolerancia a herbicida	T	Cheng <i>et al.</i> , 2008

T: Transcriptómica; P: Proteómica; M: Metabólica

Transcriptómica

Las técnicas de transcriptómica persiguen el análisis de expresión global de las células a analizar. Aunque recientemente se han desarrollado otras técnicas alternativas o complementarias, como las basadas en secuenciación masiva en plataformas como *Roche 454* o la muy recientemente aparecida *Ion Torrent*, la técnica actualmente más establecida y estandarizada es la que se conoce como hibridación en formato *microarray*. Se basa en la hibridación específica de ARNm sobre gran número de sondas inmovilizadas en un soporte sólido, y permite la cuantificación simultánea de los niveles de expresión de un gran número de genes.

Existen básicamente dos tipos de *microarrays*: (i) los *spotted microarrays*, que se preparan mediante la deposición sobre el soporte sólido de secuencias (sondas) previamente sintetizadas, que acostumbran a ser moléculas de ADN de doble cadena (ADNdc), ADN complementario (ADNc), productos de PCR de entre 250 y 1000 pb, u oligonucleótidos sintéticos (30-75 meros) (Mir y Southern, 1999). La impresión de estas secuencias puede realizarse por contacto (método mecánico) o sin contacto (sistema de *inkjet*). Alternativamente, (ii) los *microarrays* pueden prepararse mediante síntesis de las sondas *in situ*. En este caso, se trata normalmente de oligonucleótidos cortos (20-25 meros) que se sintetizan mediante un proceso fotolitográfico (p.ej. *Affymetrix*, Santa Clara, CA; *Agilent*, Palo

Alto, CA). El sustrato de sílice se cubre con un compuesto químico que evita la unión de nucleótidos y es sensible a la luz. Mediante máscaras litográficas se transmite o bloquea la luz ultravioleta en áreas específicas del *microarray*. Posteriormente, los nucleótidos libres sólo se unirán a las regiones desprotegidas. Estos nucleótidos unidos llevan a su vez un protector fotosensible, de forma que se puede repetir el ciclo (Pease *et al.*, 1994). El marcaje y la hibridación son los primeros pasos en un ensayo de *microarray*. En el caso de los *GeneChip* de *Affymetrix*, se empaquetan densamente oligonucleótidos de 25 bases; y se utilizan varias sondas distintas para cada gen, además de sondas modificadas para cuantificar la hibridación inespecífica. En esta tesis se han utilizado los *microarrays GeneChip* para *O. sativa*, comercializados por *Affymetrix*. Permiten la hibridación simultánea de 51.279 secuencias, de las cuales 48.564 representan la subespecie *japonica* y 1.260, la subespecie *indica*.

El procedimiento analítico consiste en la extracción de ARNm de la muestra de interés, marcaje, hibridación específica de secuencia sobre las sondas inmovilizadas en el chip o soporte sólido (lo que separa físicamente las diferentes secuencias sobre el *microarray* de acuerdo con la posición de la secuencia diana), cuantificación de la fluorescencia asociada a cada secuencia y, en consecuencia, cuantificación del nivel de expresión de cada gen analizado en la muestra inicial. Se obtiene pues, información cuantitativa sobre la expresión de numerosos genes en un único ensayo de hibridación. Además, el uso de diferentes fluorocromos con diferentes longitudes de onda de excitación y emisión permite el análisis simultáneo de dos muestras diferentes (p. ej. muestra control y muestra problema). Los niveles de fluorescencia son normalizados respecto a la muestra control, de forma que se obtienen niveles de expresión de cada gen en la muestra problema respecto al control. Un ejemplo de un sistema con un único marcaje es *GeneChip* de *Affymetrix*. En este caso el proceso de marcaje incluye la síntesis *in vitro* de ARN antisentido complementario (ARNc) biotinilado, su fragmentación e hibridación sobre el chip, para marcar a continuación las moléculas de ARNc hibridadas conjugadas a ficoeritina. La señal de fluorescencia puede amplificarse mediante un anticuerpo biotinilado anti-estreptavidina. Este sistema está diseñado de forma que permite y facilita la comparación entre muestras hibridadas en distintos chips. Alternativamente, en los sistemas que permiten en análisis de dos muestras en un único *microarray*, el ARNm de cada muestra se marca con un fluorocromo diferente (p.ej. Cianina-3 y Cianina-5) durante la síntesis de la primera cadena de ADNc; y el *microarray* se hibrida de forma competitiva con una mezcla de cantidades equivalentes de los dos ADNc. Los valores de fluorescencia obtenidos se deben procesar para calcular el nivel de expresión de cada gen de la muestra analizada. Para ello se encuentran a disposición diferentes métodos, que se aplican en función del tipo de *microarray* utilizado y que permiten obtener valores de expresión relativos o absolutos para *microarrays* hibridados con una o dos poblaciones de ARNm, respectivamente. El software más común para el cálculo de valores absolutos se

conoce como *Robust Multi-array Average* (RMA) el cual incluye una corrección del ruido de fondo, la transformación a escala \log_2 y la normalización por cuantiles (Irizarry *et al.*, 2003). Los ensayos básicos de análisis de transcriptoma se basan en la comparación de dos tipos de muestra, de forma que puedan identificarse secuencias con expresión diferencial. Los resultados se obtendrán en forma de niveles de expresión de cada secuencia en un tipo de muestra respecto a los niveles en el otro tipo de muestra (x-veces la expresión) e irán siempre acompañados de un análisis estadístico como un test *t-Student*. El mayor inconveniente de la aplicación estadística del test *t-Student* para procesar los resultados obtenidos en ensayos de *microarrays* es el elevado número de falsos positivos que deben esperarse debido al gran número de muestras analizadas simultáneamente. Los ensayos de corrección múltiple como Bonferroni o Benjamini y Hochberg *False discovery Rate* (FDR) se aplican para corregir el ratio de error global. Aun así, los ensayos de hibridaciones en *microarray* basados en comparaciones múltiples generan un elevado número de datos, que pueden interpretarse de manera más sencilla mediante la aplicación de análisis estadísticos de multivariantes como el análisis de componentes principales (PCA), mapas auto-organizados (*self-organizing maps*, SOM) o análisis de clústeres jerárquicos (ACJ). Hoy en día, los análisis de expresión génica son la aplicación más extensa de la tecnología de hibridación en *microarrays*. Schena y colaboradores (1995), mostraron por primera vez el uso de esta técnica como herramienta de comparación de los niveles de expresión de 45 genes en dos tejidos diferentes de *Arabidopsis*. Desde entonces se han realizado una gran variedad de ensayos para estudiar los efectos de diferentes factores como por ejemplo expresión diferencial en tejidos, estadios de crecimiento o en distintas condiciones ambientales. En los últimos años, la tecnología del *microarray* se ha aplicado ampliamente al campo de los OMG como herramienta para la detección de efectos no intencionados derivados de técnicas de ADN recombinante en *Arabidopsis* (Abdeen *et al.*, 2009; Abdeen *et al.*, 2010; El Ouakfaoui y Miki, 2005), trigo (Baudo *et al.*, 2006; Baudo *et al.*, 2009; Gregersen *et al.*, 2005), maíz (Coll *et al.*, 2008; Coll *et al.*, 2010, Barros *et al.*, 2010), arroz (Batista *et al.*, 2008; Dubouzet *et al.*, 2007, Montero *et al.*, 2011) y soja (Cheng *et al.*, 2008).

Los resultados de los ensayos de análisis de transcriptoma realizados mediante hibridaciones en formato *microarray* se encuentran a disposición pública en bases de datos como *Miamexpress* (www.ebi.ac.uk/miamexpress/) o *Gene Expression Omnibus GEO* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Los datos recogidos provienen de estudios comparativos a nivel de transcriptoma en diferentes especies vegetales. Las aproximaciones estudiadas incluyen ensayos comparativos entre variedades MG y sus isogénicas, entre variedades convencionales, entre condiciones de cultivo o de estrés, así como análisis comparativos entre tejidos o estadios de desarrollo de una misma planta.

Proteómica

La modificación genética de una célula puede conllevar variaciones en los patrones proteicos globales de la misma, aparte de la proteína expresada a partir del transgén. Una de las estrategias para evaluar cómo una modificación genética puede alterar las proteínas de una planta la presenta la comparación proteómica. Los análisis proteicos permiten evaluar la acumulación total de proteínas en una célula, tejido u organismo. Éstos se han incluido como técnica de evaluación adicional a los análisis de seguridad y riesgos (FAO/WHO, 2002) por presentar un interés especial permitiendo la identificación de posibles toxinas, anti-nutrientes o alérgenos. La aproximación se basa generalmente en la combinación de tres tecnologías: la electroforesis bidimensional (2DE) para la separación mezclas complejas de proteínas, el análisis de imagen para comparar los geles 2-DE y finalmente el análisis de espectrometría de masas para identificar las proteínas expresadas diferencialmente.

Mediante la combinación de isoelectroenfoque (IEF) y electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), la técnica 2DE permite la separación de las proteínas en función de su punto isoelectrónico en la primera dimensión (pI) y de su peso molecular en la segunda dimensión (PM) (O'Farrell, 1975). Las proteínas se pueden visualizar mediante la aplicación de técnicas de tinción con *Coomassie Brilliant Blue* (CCB), cloruro de plata o fluorescencia. Para detectar cambios de expresión entre proteínas de diferentes especies, tejidos o condiciones ambientales, se encuentran a disposición diferentes programas para el análisis de patrones proteicos en geles 2DE (Nishihara y Champion, 2002; Pun *et al.*, 1988). La mayoría de ellos permiten la corrección del ruido de fondo, la superposición de geles y normalización, comparación y cuantificación de los distintos *spots*, de forma que pueden identificarse aquellos con intensidad diferencial. El proceso de identificación de la secuencia de cada *spot* incluye el corte de la zona del gel en cuestión, la digestión y finalmente el análisis por técnicas de espectrometría de masas (MS). El principio de la tecnología MS se basa en la ionización y transferencia de las moléculas a analizar de una fase sólida a una fase gaseosa, lo que permite la identificación del PM y del ratio masa-carga iónica de las mismas. Los espectrómetros de masas consisten en tres módulos: fuente de ionización (para la generación de iones), analizador de masas (separa los iones por masas mediante la aplicación de un campo electromagnético) y detector (que genera los datos para determinar la acumulación de cada ion). Hoy en día hay diferentes tipos de espectrómetros de masas disponibles los cuales permiten combinar diferentes fuentes de ionización y analizadores de masas. Las principales fuentes de iones aplicadas actualmente en estudios de biomoléculas son la ionización electroespray (ESI) y el sistema MALDI (*matrix assisted laser desorption ionisation* (Karas y Hillenkamp, 1988); ambos son especialmente aplicables por la ionización de biomoléculas por reducir la excesiva fragmentación de las mismas. El mecanismo ESI consiste en la dispersión mediante un electroespray de una solución líquida de compuestos de interés a un gas

compuesto de iones con múltiples cargas. Por lo contrario, la ionización mediante el sistema MALDI es iniciada mediante un láser que irradia cristales compuestos de los analitos protegidos mediante una matriz orgánica, la cual a su vez favorece la vaporización e ionización. Los espectrómetros de masas no sólo son capaces de cuantificar el peso molecular de péptidos sino que se aplican además para la identificación de la secuencia de aminoácidos así como de modificaciones post-traduccionales mediante un sistema conocido como espectrometría de masas tándem (MS/MS).

Además de las múltiples aplicaciones en análisis funcionales de plantas, la tecnología 2-DE-MS se ha aplicado como herramienta para la determinación de los efectos no intencionados del transgén en plantas MG como *Arabidopsis* (Ren *et al.*, 2009; Ruebelt *et al.*, 2006b), tabaco (Rocco *et al.*, 2008), tomate (Di Carli *et al.*, 2009; Corpillo *et al.*, 2004), patata (Badri *et al.*, 2009; Goulet *et al.*, 2009; Khalf *et al.*, 2010; Lehesranta *et al.*, 2005), y maíz (Coll *et al.*, 2011; Barros *et al.*, 2010; Zolla *et al.*, 2008). Se ha utilizado también en estudios de la repuesta de plantas a estreses bióticos y abióticos. Un ejemplo muy exhaustivo lo constituye el estudio realizado por Zhang y colaboradores (2011) en que se recogen datos de más de 2.170 proteínas de 34 especies vegetales (incluyendo las plantas modelo *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*) y 9 tejidos. Estos exhaustivos ensayos han permitido avanzar en la comprensión de mecanismos relacionados con la tolerancia a estrés salino, mecanismos de la fotosíntesis, de captación de especies reactivas, traducción de señal, y otras funciones de interés molecular.

Las técnicas de proteómica están avanzando con nuevos ajustes para superar las limitaciones que presentan, como la separación de proteínas muy hidrófobas o de elevado PM y pI; o la variación entre geles, que dificulta a veces su comparación. La electroforesis diferencial en gel (DIGE) presenta mayor reproducibilidad al permitir la separación simultánea de proteínas provenientes de diferentes muestras, marcadas con distintos fluorocromos (Timms y Cramer, 2008). Para el análisis de proteínas hidrófobas y de elevado PM y pI se ha desarrollado la técnica de separación sin gel (*gel-free*), basada en el acoplamiento de una técnica separadora como un cromatógrafo a un espectrofotómetro de masas (MS o MS/MS) que permite detectar las proteínas eluidas a tiempo real. A pesar de los avances en técnicas de proteómica, una de las limitaciones más importantes sigue siendo el reducido número de proteínas que pueden detectarse, lo que implica que la información obtenida sobre el proteoma de la célula analizada es todavía muy parcial. Se estima que sólo se detecta en torno al 2% de las proteínas celulares (Martyniuk y Denslow, 2009), y que además se pierde información sobre modificaciones post-traduccionales (García-Cañas *et al.*, 2010).

Metabolómica

La identificación de cambios en el patrón de metabolitos de la planta, conocido como metaboloma, es el último nivel de análisis mediante técnicas de *profiling* propuesto para complementar los análisis de riesgos de OMGs (FAO/WHO, 2002). Se ha estimado que el número de metabolitos presentes en el reino vegetal se sitúa en torno a los 100.000-200.000 (Oksman-Caldentey y Inze, 2004). Debido a su complejidad, sólo la combinación de diferentes técnicas analíticas permite la descripción del estado metabólico de un organismo. Roessner y colaboradores (2001) presentaron la primera aproximación de análisis de metaboloma de plantas mediante la aplicación de cromatografía de gases (GC) acoplada a la espectrometría de masas en un estudio de comparación simultánea de 88 compuestos en 9 variedades de patatas transgénicas. Además, analizaron los efectos de las condiciones ambientales sobre 86 metabolitos en líneas de patata convencionales. La GC permite la separación de compuestos con elevada resolución y puede ser también acoplada a un detector de ionización de llama (FID). Las técnicas GC-MS y GC-FID son muy sensibles y actualmente tienen gran aplicación en estudios de metaboloma, a pesar de no permitir la detección de compuestos termolábiles. Algunos metabolitos no son volátiles y requieren una derivatización química previa. La cromatografía líquida acoplada a MS (LC-MS) representa una tecnología adicional para el análisis metabólico de plantas ya que permite el análisis de metabolitos secundarios muy presentes en tejidos vegetales (Verhoeven *et al.*, 2006).

Adicionalmente, la técnica de separación en electroforesis capilar (CE) (Sato *et al.*, 2004; Soga *et al.*, 2003) y FT-ICR (*Fourier transform ion-cyclotron resonance*), en combinación con MS, se están utilizando con éxito en ensayos metabolómicos (Hirai *et al.*, 2004; Murch *et al.*, 2004). Alternativamente, las técnicas de resonancia magnética nuclear (NMR) permiten la detección cuantitativa de metabolitos de forma no destructiva, y pueden utilizarse para el análisis de un gran número de muestras (Cellini *et al.*, 2004). Sin embargo, presenta una baja sensibilidad, lo que supone una limitación en el campo de análisis metabolómico de plantas (Kaddurah-Daouk *et al.*, 2009).

La metabolómica de plantas se ha aplicado en un gran número de estudios durante la última década [ver revisiones (Allwood *et al.*, 2008; Fiehn *et al.*, 2000; Hall, 2006)]. Se ha utilizado asimismo en estudios relacionados con el análisis de efectos no intencionados de los transgenes en OMGs. Así, se han analizado variedades de trigo (Beale *et al.*, 2009) y maíz MON810 (Manetti *et al.*, 2006; Piccioni *et al.*, 2009) por NMR. Mediante aproximaciones basadas en MS se han evaluado los efectos no intencionados de variedades de patata MG (Manetti *et al.*, 2006; Piccioni *et al.*, 2009) y arroz MG (Zhou *et al.*, 2009). Kristensen y colaboradores (2005) han aplicado técnicas de metabolómica y transcriptómica para complementar el análisis de efectos no intencionados de diversas líneas de *Arabidopsis* MG.

I.5 Péptidos antimicrobianos

Una gran variedad de patologías tanto humanas como vegetales son generadas por microorganismos, los cuales representan la forma de vida más abundante del planeta. Muchas de estas patologías se siguen combatiendo mediante la aplicación de antibióticos o componentes inorgánicos, que presentan una limitación importante consistente en la capacidad de adquisición de resistencia por parte de dichos patógenos. Para superar esta situación es necesario el desarrollo de nuevas moléculas con propiedades antimicrobianas. Los péptidos antimicrobianos (PAM) son un ejemplo de este tipo de moléculas alternativas. Se conoce que una gran variedad de seres vivos sintetizan PAM en respuesta al ataque por patógenos: se trata de un mecanismo de defensa conocido como inmunidad innata (Boman 1995, 2003; Hancock 1997; Zasloff 2002). Se han descrito PAM en animales (~72%, inclusive la especie humana, ~3%), plantas (~14%) y microorganismos (~8%) (Zasloff, 2002). El modo de acción de los PAM se basa en la interacción específica con componentes de la pared celular como lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram-negativas, glicolípidos de microbacterias, beta-glucanos de levaduras así como dobles cadenas de ARN vírico, y es un factor importante en la no-inducción de resistencias por parte de los microorganismos diana, de forma que los PAM ofrecen una alternativa interesante en aplicaciones terapéuticas (Boman, 2000; Hoffman *et al.*, 2004).

Hasta el momento se han descrito 1.800 PAM naturales (última actualización Enero 2012, *The Antimicrobial Peptide Database (APD)*, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) desglosados en la base de datos ADP según su actividad, básicamente en PAM antibacterianos (78%), antifúngicos (31%), antivirales (~7%), antitumorales (~7%) y antiparasitales (~2%) (cabe notar que algunos PAM son activos contra diferentes tipos de microorganismos). El elevado número de PAM conocidos actualmente contrasta con la situación en 2003, año en que sólo se habían descrito unos 500 PAM. Este avance refleja el interés de los PAM, teniendo en cuenta que se ha potenciado el uso de este tipo de moléculas en tratamientos clínicos en el campo de la medicina y veterinaria, así como en la conservación de productos alimentarios o tratamientos fitopatológicos en agricultura. A continuación se presentan algunos ejemplos de posibles aplicaciones de los PAM. En el campo de la medicina, la magainina, las dermaseptinas y otros PAM aislados de la piel de rana se han aplicado con éxito en tratamientos cutáneos (Mangoni, 2006). Por su parte, análogos del péptido cecropina A (CecA) han mostrado ser eficaces en tratamientos contra infecciones oculares (Mannis, 2002). Especialmente para aplicaciones médicas, es importante considerar el carácter hemolítico y/o citotóxico de algunos PAM a elevadas concentraciones. Se han utilizado PAM como bactericidas en alimentos no procesados para evitar la proliferación de bacterias no deseadas, patogénicas o deteriorantes (Cotter *et al.*, 2005). Así, el recientemente descubierto PAM catiónico de sólo 2,1 KDa hycina

3682, producido por una cepa de *Staphylococcus hyicus*, ha mostrado ser capaz de inhibir el crecimiento de especies bacterianas patógenas como *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* en leche porcina (Fagundes *et al.*, 2011).

Los péptidos antimicrobianos presentan unas características físico-químicas muy específicas. Son moléculas catiónicas debido al elevado contenido en los aminoácidos lisina y arginina; y presentan aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos en posiciones espacialmente determinadas, resultando en la adopción de estructuras terciarias en hoja- β o α -hélice, muy relacionadas a su funcionalidad (Van't Hof *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2005). Un PAM sobre el que se ha estudiado la relación entre estructura y actividad es la CecA. Se trata de un péptido lineal de 37 aminoácidos con estructura en α -hélice, que se ha estudiado ampliamente por utilizarse como modelo para los PAM α -helicoidales. Holak y colaboradores (1988) describieron la conformación de la CecA, que está fuertemente relacionada con su actividad antibacteriana. Así, la CecA sufre un cambio de conformación al ponerse en contacto con la membrana celular de la célula diana, adquiriendo una estructura en doble hélice separada por un puente de unión, que se ha mostrado esencial para su actividad letal. De la interacción péptido-lípido depende la destrucción de la integridad de la pared celular de la célula diana, a través de disrupciones en la misma, o la generación de poros (figura I.1).

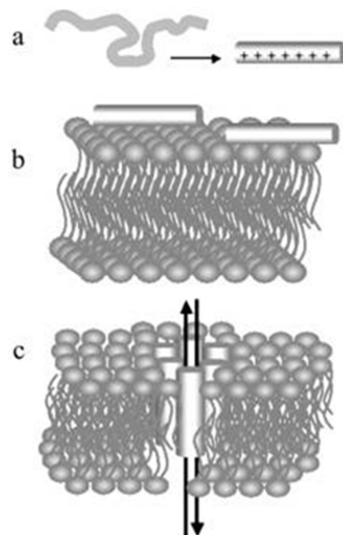


Figura I.1. Esquema del mecanismo de acción de PAM del tipo α -hélice. **a:** el péptido que en solución acuosa tiene una conformación lineal, cuando entra en contacto con una membrana adopta una estructura de α -hélice en que se polarizan los aminoácidos hidrofóbicos y catiónicos. **b:** la interacción electrostática entre los lipopolisacáridos de la membrana microbiana y el PAM hace que éste se oriente paralelamente a la membrana. **c:** al aumentar la concentración del PAM, se posiciona de forma perpendicular a la membrana dando lugar a la formación de canales o poros (Hetru *et al.*, 1998, Huang, 2000; Shai, 1998). Fuente: Montaña-Pérez y Vargas-Albores, 2002.

Este modo de acción es único de los PAM, y explica la dificultad de desarrollar mecanismos de resistencia por parte de los microorganismos diana, pues serían necesarios cambios importantes en la composición / organización de la capa fosfolipídica de sus membranas (Zaslhoff, 2002). El hecho de que la actividad de los PAM no se base en uniones específicas con los microorganismos diana conlleva problemas de especificidad y limitaciones en su aplicabilidad. Así, pueden presentar reducida selectividad, cierta actividad citotóxica y/o hemolítica y elevada susceptibilidad a proteasas (Lui *et al.*, 2010). En algunos casos, además, las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) son elevadas, aumentando así las dosis de aplicación. A todas estas limitaciones se suma el elevado coste de producción cuando se requieren en grandes cantidades. Para superar estos retos se han desarrollado una serie de estrategias de diseño con el objetivo de mejorar los péptidos en términos de selectividad, actividad, toxicidad y estabilidad frente proteasas. Estas estrategias incluyen modificaciones de aminoácidos sobre secuencias de PAM naturales así como el diseño de nuevos péptidos manteniendo ciertas características de los PAM nativos homólogos (Badosa *et al.*, 2009). Estos nuevos diseños han aumentado el número de PAM descritos en la actualidad hasta más de 4.000 (CAMP: *Collection of Anti-Microbial Peptides*, <http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial/stat.php>, última actualización de la base de datos en Abril 2010).

Un ejemplo de PAM natural que se ha utilizado para el diseño de otros PAM con características mejoradas es la CecA. La CecA tiene actividad lítica contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, a la vez que no presenta claros efectos citotóxicos contra eritrocitos humanos o células eucariotas (Hultmark *et al.*, 1982; Steiner *et al.*, 1981), por lo que es un péptido de interés con aplicaciones potenciales, por ejemplo en protección vegetal, si bien su tamaño encarece considerablemente su producción mediante síntesis química y su susceptibilidad a proteasas no es óptima. Con el objetivo de desarrollar un péptido de menor tamaño, con mejor estabilidad y actividad comparable a CecA se diseñó el péptido Pep3, un híbrido de CecA y melitina, de sólo 11 aminoácidos y actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos fitopatógenos (Cavallarin *et al.*, 1998; Ali *et al.*, 2000). La modificación de PAMs en búsqueda de nuevas secuencias con características mejoradas puede significar un trabajo de larga duración y de baja eficacia si no se establece un método rápido, sistemático y racional, como el basado en química combinatoria. Así, se han generado librerías de péptidos sintéticos, por ejemplo lineales derivados de Pep3, o cíclicos; que se han rastreado para identificar péptidos mejorados, por ejemplo específicos contra determinadas especies bacterianas fitopatógenas de interés (López-García *et al.*, 2000 y 2002; Monroc *et al.*, 2006; Badosa *et al.*, 2007 y 2009). En base a esta técnica el grupo de E. Montesinos y E. Bardají de la Universidad de Girona modificaron la secuencia del híbrido Pep3 con el objetivo de desarrollar péptidos capaces de combatir el fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*), una fuerte amenaza en perales y manzanos,

de enormes consecuencias económicas y que actualmente únicamente puede combatirse utilizando antibióticos o compuestos de cobre (Ferré *et al.*, 2006; Badosa *et al.*, 2007). En una primera aproximación el grupo diseñó una librería de 22 péptidos y ensayó su eficacia y selectividad *in vitro* contra *Erwinia amylovora* (fuego bacteriano), así como contra otras especies bacterianas fitopatógenas, concretamente *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (mancha negra de la tomatera) y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (capaz de atacar una gran variedad de especies vegetales). En base a los resultados obtenidos se seleccionó el péptido BP76, que combinaba la mejor actividad antibacteriana *in vitro* y la mejor estabilidad frente a proteasas. Debido a que la actividad demostrada *in vitro* no corresponde necesariamente a la actividad *in vivo*, es necesaria la generación de librerías con mayor número de péptidos para seleccionar aquellos que presenten mejor actividad *in vitro* y finalmente seleccionar aquellos cuya actividad *in vivo* sea la más conveniente. Partiendo de esta base, Badosa y colaboradores generaron una librería de 125 péptidos derivados de BP76. La aproximación utilizada en este trabajo consistió en la incorporación de aminoácidos con distintos grados de hidrofobicidad e hidrofiliidad en las posiciones 1 y 10 de BP76. En base a la actividad *in vitro* contra las bacterias *E. amylovora*, *P. syringae* pv. *syringae* y *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, actividad hemolítica y estabilidad frente proteasas, se seleccionaron 7 derivados de BP76 que presentaron el mejor balance de estas características. Adicionalmente se realizaron ensayos *in vivo* en flores de manzanos y perales infectadas con *E. amylovora*. El péptido BP100 fue capaz de inhibir el 63-73% de las bacterias a una concentración de 100 μ M, siendo pues más potente que BP76, y presentando una actividad sólo ligeramente menor que la estreptomycin, antibiótico actualmente aplicado para el control del fuego bacteriano (Badosa *et al.*, 2007 y 2009). La utilización de este tipo de péptidos en el ámbito fitosanitario requiere la obtención de éstos en elevadas cantidades. La producción de PAM puede realizarse mediante síntesis química, aunque el coste es demasiado elevado para aplicaciones sin un elevado valor añadido, como es el caso de los productos fitosanitarios (en comparación, por ejemplo, con los farmacéuticos). El hecho de tratarse de productos fitosanitarios las plantas presentan el sistema idóneo para su síntesis, además con una doble aplicación: su uso como biofactoría, y la consecución de un fenotipo de resistencia. Se ha estimado que, en los sistemas de expresión adecuados, los rendimientos de plantas biofactoría pueden conllevar una reducción de costes de producción de PAM respecto a la síntesis química, de hasta 10–20 US\$/g (Montesinos y Bardají, 2008). Un ejemplo del rendimiento potencial de las plantas biofactoría es el arroz MG que produce hasta 3 g de una proteína de polen de 13 kDa por kg de semilla (Takagi *et al.*, 2005).

La generación de plantas MG para la síntesis de PAM es pues de gran importancia para aquellos PAM destinados a tratamientos fitopatológicos que han mostrado ser eficaces contra patógenos naturales de las plantas a modificar. Se ha observado que estas plantas pueden

adquirir asimismo resistencia a otras fitopatologías o condiciones de estrés (Campo *et al.*, 2008). Cabe destacar que estos fenotipos de resistencia no requieren necesariamente elevados niveles de expresión de los PAM. En la literatura existen varios ejemplos de utilización de PAM para obtener plantas MG resistentes a patógenos. Por ejemplo, la expresión de un híbrido CecA-melitina en tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *xanthi*) confiere resistencia al hongo *Fusarium solani* (Yevtushenko *et al.*, 2005). El gen que codifica el PAM β -purotionina de trigo confiere a *Arabidopsis* resistencia a la bacteria *Pseudomonas syringae* así como al hongo *Fusarium oxysporum* incluso a niveles bajos de expresión (Oard y Enright, 2006). La expresión de CecA en arroz le confiere resistencia al hongo *Magnaporthe grisea* (Coca *et al.*, 2006). Otros ejemplos de la utilización de PAM en el campo de la fitopatología se muestran en la tabla I.3 (en el apartado I.3 Aplicaciones de la transgénesis. Mejora agronómica y nutricional). La expresión de PAM derivados de BP100 en planta de arroz, presentada en esta tesis, sirve también de ejemplo de la viabilidad de generar plantas MG con fenotipos mejorados de resistencia, ya sea por el efecto directo o indirecto del transgén.

II. OBJETIVOS

El **principal objetivo** de la presente tesis fue la evaluación de los posibles efectos no intencionados de transgenes que codifican proteínas o péptidos antimicrobianos en plantas, usando como modelo el arroz.

A tal efecto se definieron los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis de las diferencias transcripcionales, obtenidas mediante hibridación en *microarray*, entre una línea MG (S-afp, resistente a *Magnaporthe grisea* por expresión constitutiva de la proteína antifúngica AFP) y la línea convencional más próxima (Senia). Evaluación de la proporción de estos cambios que pueden atribuirse directamente a la presencia y expresión del transgén.
2. Determinación de la posibilidad de obtener plantas MG (con fenotipos de resistencia o como biofactorías) que expresen de forma constitutiva péptidos antimicrobianos derivados del undecapéptido sintético BP100, fuertemente catiónico y muy activo contra especies bacterianas diana, si bien altamente biocompatible. Diseño de derivados de BP100 expresables en planta, estudios de actividad antimicrobiana *in vitro* y fitotoxicidad sobre la célula huésped.
3. Evaluación de las diferencias transcripcionales (mediante hibridación en *microarray*) y fenotípicas (características agronómicas) entre líneas que expresan de forma constitutiva transgenes que codifican derivados de BP100, y la línea convencional más próxima (Senia). Comparación de los efectos no intencionados de transgenes que codifican distintas proteínas o péptidos antimicrobianos en plantas, concretamente AFP y derivados de BP100

III. MATERIAL y MÉTODOS

III.A. Métodos de manipulación de ácidos nucleicos

III.A.1 Amplificaciones de fragmentos de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa, diseñada por Kary Banks Mullis en 1986, es una técnica que permite la amplificación específica y exponencial de una secuencia de ADN. Esta técnica se fundamenta en la replicación de fragmentos de ADN generados por el enzima ADN polimerasa. Para ello son necesarias dos secuencias cortas nucleotídicas, oligonucleótidos o cebadores de entre 18 y 22 nucleótidos, que hibriden específicamente a ambos extremos del ADN molde donde la polimerasa iniciará la replicación. El proceso consiste en ciclos repetitivos de variaciones de temperatura en que se producen los tres fenómenos básicos de esta técnica: desnaturalización, hibridación y elongación. Durante todo el proceso el sistema trabaja a temperaturas altas o moderadas requiriendo un enzima resistente a éstas. Así, la introducción en ésta técnica de una ADN polimerasa termoestable (*Taq* ADN polimerasa, *Thermus Aquaticus*) mejoró notablemente la eficiencia, sensibilidad y especificidad respecto su primera versión (Saiki RK *et al.*, 1988). Actualmente existen diferentes tipos de polimerasas mejoradas con capacidad de corrección como *Thermococcus gorgonarius* (*Tgo*) o *Thermococcus litoralis* (*Vent*) que se utilizan a menudo en combinación con la *Taq* ADN polimerasa por su eficiencia.

Reacciones con *Taq* ADN Polimerasa

La *Taq* ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* es un enzima resistente a temperaturas elevadas con una temperatura óptima de trabajo de 72 °C. A esta temperatura y a condiciones óptimas se reducen reacciones inespecíficas así como errores en la síntesis de los fragmentos de ADN. Dependiendo de la región a amplificar variará el número de ciclos, el tiempo de elongación e incluso la concentración de magnesio. La temperatura de la fase de hibridación es

también un parámetro importante ya que dependerá de la temperatura de disociación (T_m , T^a *melting*) de los cebadores. Todos estos parámetros se establecerán y optimizarán en cada caso.

La composición de las reacciones de PCR y las condiciones del termociclador aplicadas para la amplificación de fragmentos en esta tesis con *Taq* ADN polimerasa se detallan en la tabla III.1 y III.2, respectivamente.

Tabla III.1: Reactivos para una PCR con *Taq* ADN polimerasa

Reactivo	Conc. Madre	Conc. Final	V [μ L/reacción]
Tampón Invitrogen	10 x	1x	5
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	1,5
dNTPs	2,5 mM	200 μ M	4
Cebador sentido	10 μ M	200 nM	1
Cebador antisentido	10 μ M	200 nM	1
<i>Taq</i> ADN Polimerasa	5 U/ μ L	1 U	0,2
ADN molde (\sim 10 ng/ μ L)			1
Agua hasta			50

Los parámetros descritos en la siguiente tabla sirven de referencia para el diseño de las condiciones de una reacción de PCR. Las condiciones exactas para cada amplificación se detallan más adelante en su correspondiente apartado.

Tabla III.2: Condiciones de referencia del termociclador para una reacción de PCR con *Taq* ADN Polimerasa

Ciclos	T [$^{\circ}$ C]	tiempo	Objetivo
1	94	3 min	Desnaturalización
1-10	94	30 s	Desnaturalización
	50-60 ^a	30 s	Hibridación
	72	1 min /Kb	Elongación
30-40	94	30 s	Desnaturalización
	50-60 ^b	30 s	Hibridación
	72	1 min /Kb	Elongación
1	72	10 min	Elongación

a) y b): T-hibridación = $T_m - 5$ $^{\circ}$ C. a) Para cebadores que hibriden parcialmente al molde, se programa una T-hibridación considerando solo la secuencia que hibrida. b) La T-hibridación se programa en función de la T_m de la secuencia completa del cebador.

Reacciones con *Expand High Fidelity PCR System*

El sistema de PCR *Expand High Fidelity* (Roche Diagnostics, Barcelona, España) es un sistema optimizado para amplificar fragmentos de ADN de hasta a 5 Kb con una eficiencia elevada. La síntesis de ADN está dirigida por dos enzimas, *Taq* ADN Polimerasa y *Tgo* ADN Polimerasa, esta última también termoestable y con capacidad de corrección, disminuyendo así el número de

posibles mutaciones introducidas durante la amplificación. En esta tesis, se utilizó este sistema para amplificar fragmentos para ser subclonados así como para la síntesis de los genes *derbp100* mediante la técnica de PCR recursiva.

La composición y las condiciones del termociclador orientativas de las reacciones de PCR realizadas con *Expand High Fidelity* se detallan en la tabla III.3 y III.4 respectivamente.

Tabla III.3: Reactivos per reacciones de PCR con *Expand High Fidelity*

Reactivo	Conc. Madre	Conc. Final	V [μ L/reacción]
Tampón (+ MgCl ₂)	10 x (+ 15 mM)	1x (+ 1,5 mM)	5
dNTPs	2,5 mM (de cada)	200 μ M	4
Cebador sentido	10 μ M	200 nM	1
Cebador antisentido	10 μ M	200 nM	1
Ex. High Fid. Polimerasa	3,5 U/mL	2,6 U	0,75
ADN molde (~10 ng/ μ L)			1
Agua hasta			50

Los parámetros descritos en la siguiente tabla sirven de referencia para el diseño de las condiciones de una reacción de PCR. Las condiciones exactas para la amplificación de los fragmentos en concreto se detallan más adelante.

Tabla III.4: Condiciones del termociclador para reacciones de PCR con *Expand High Fidelity*

Ciclos	T [$^{\circ}$ C]	Tiempo	Objetivo
1	94	2 min	Desnaturalización
10	94	15 s	Desnaturalización
	45 - 55 ^a	30 s	Hibridación
	72 o 68	1 min / 1,5 Kb	Elongación
20	94	30 s	Desnaturalización
	50 - 65	30 s	Hibridación
	72 o 68 ^b	1 min + 5 s ^c / 1,5 Kb	Elongación
1	72	7 min	Elongación

a) La T-hibridación óptima dependerá de la T_m de los cebadores.

b) Para productos de PCR hasta a 3 Kb la T-elongación = 72 $^{\circ}$ C y para fragmentos superiores a 3 Kb la T-elongación = 68 $^{\circ}$ C. c) Para cada ciclo se aumenta el tiempo de elongación 5 s.

Reacciones con *Taq Gold*

El sistema *AmpliTaq Gold GeneAmp* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) se utilizó para la generación de productos de PCR utilizados para la construcción de rectas patrón en el sistema de PCR a tiempo real (qPCR). El enzima utilizado en este sistema es una *Taq* ADN Polimerasa modificada, la cual está inactivada y requiere elevadas temperaturas para su activación. Las

condiciones de trabajo de este sistema hacen que el enzima reaccione específicamente y con elevados rendimientos produciendo así menos artefactos que otros sistemas.

Tabla III.5: Reactivos para reacciones de PCR con *AmpliTaq Gold GeneAmp*

Reactivo	Conc. Madre	Conc. Final	V [μ L/reacción]
Tampón <i>Amplitaq Gold II</i>	10 x	1x	2
MgCl ₂	25 mM	5 mM	4
dNTPs	2,5 mM de cada (5mM dUTP)	200 mM	1,6
Cebador sentido	10 μ M	*300 nM	0,6
Cebador antisentido	10 μ M	*300 nM	0,6
TaqGold	5 U/ μ L	1 U	0,2
ADN molde**			1
Agua hasta			20

* La concentración de los cebadores se deberá optimizar para cada sistema. Como ejemplo se muestra la concentración 300 nM. La concentración madre siempre será la misma por lo que solo se ajustará el volumen necesario para cada mezcla.

** Como ADN molde se utilizó el cADN generado en la reacción de retrotranscripción III.C.3

Tabla III.6: Condiciones de referencia del termociclador para una reacción de PCR con *AmpliTaq Gold GeneAmp*

Ciclos	T [$^{\circ}$ C]	tiempo	Objetivo
1	95	10 min	Desnaturalización
50	95	15 s	Desnaturalización
	60	1 min	Hibridación/Elongación

PCR a tiempo real (qPCR)

La PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR) se caracteriza por su monitorización de detección de fluorescencia durante el proceso de amplificación de un producto de PCR. La fluorescencia que emite durante la reacción es proporcional a la cantidad de producto generado (Higuchi *et al.*, 1993; Heid *et al.*, 1996). La formación de producto y la detección de la fluorescencia se producen simultáneamente teniendo siempre acceso a la cinética de la reacción de amplificación.

La cuantificación inicial del ADN diana se realiza en los primeros ciclos de la qPCR, donde la eficiencia de reacción es siempre constante. En este punto de la reacción se obtiene el valor Ct (*threshold cycle*). Este ciclo corresponde a aquel donde por primera vez se produce un aumento significativo de la fluorescencia normalizada (ΔR_n), sobrepasando el umbral. El número de ciclos necesarios para llegar a un determinado Ct es inversamente proporcional a la cantidad de ácidos nucleicos que había originalmente dentro de la muestra (Walker, 2006). La

cuantificación de la muestra se hace siempre en la fase exponencial, donde la amplificación es más eficiente y no se ve limitada por factores como concentración de reactivos o la actividad enzimática.

Los termocicladores diseñados para qPCR, incorporan un lector de fluorescencia capaz de detectar en todo momento la cantidad de fluorescencia emitida. Las químicas de detección basadas en fluorescencia pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes, o sondas específicas marcadas con fluorocromos. En esta tesis se han utilizado únicamente agentes intercalantes que incrementan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen al ADN de doble cadena. Concretamente se ha utilizado el *SYBR Green I* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). Este reactivo comercial se aplica en forma de mezcla, la cual incorpora el enzima *Taq* ADN Polimerasa, el tampón de reacción y el fluorocromo. Los agentes intercalantes como *SYBR Green I* no solo se unen a la molécula de ADN generada específicamente, sino también a moléculas generadas inespecíficamente e incluso a dímeros de cebadores. Para evitar este inconveniente, la técnica requiere un sistema de cebadores diseñado minuciosamente, unas condiciones óptimas de reacción y concentración de cebadores. Todas las PCR a tiempo real se realizaron en el Termociclador 7500 *Fast Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). Esta técnica se utilizó para el análisis de expresión de genes con expresión diferencial en líneas MG comparándolas con su isogénica. Así mismo se utilizó para determinar el nivel de expresión de los diferentes transgenes analizados.

Diseño de cebadores

Los cebadores específicos se diseñaron siempre sobre la secuencia diana a analizar y mediante la aplicación de la herramienta *Primer Blast* de la base de datos NCBI. Esta herramienta diseña los cebadores bajo condiciones específicas de longitud y temperatura de disociación de los mismos así como la longitud de amplicón. Adicionalmente comprueba la especificidad de los cebadores sobre el tipo de secuencia (ARNm, genómico) del organismo deseado. Así pues en función del tipo de análisis, cuantificación de número de copias o análisis de expresión la especificidad los cebadores se analizó sobre el genoma o ARNm de *Oryza sativa ssp. japonica*, respectivamente.

Optimización de sistemas de qPCR

Para cada pareja de cebadores es importante optimizar la concentración de trabajo para evitar reacciones inespecíficas y artefactos que puedan enmascarar el resultado real. Las combinaciones de concentración fueron 50/50, 300/300 y 900/900 nM. Para cada pareja de cebadores se prepararon las mezclas de reacción con el reactivo *SYBR Green I PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) y el ADN molde. Para cada combinación de

cebadores se preparó una mezcla para analizar dos réplicas de PCR y un control negativo, el cuál tiene como objetivo descartar aquellas combinaciones de cebadores que generan artefactos.

Tabla III.7: Reactivos para la optimización de cebadores

Concentración		Volumen [μ L]				
Final [nM]	Inicial [μ M]	Cebador sentido	Cebador antisentido	Agua	PCR master Mix 2X	ADN Molde
50-50	1-1	3	3	21	30	2*
300-300	10-10	1,8	1,8	23,4	30	2*
900-900	10-10	5,4	5,4	16,2	30	2*

* El ADN molde se añadió a la mezcla una vez aplicada a la placa de PCR (*MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction*, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y solo en dos replicas de PCR. La tercera replica fue el control negativo y se añadió agua.

Tabla III.8: Condiciones de referencia del termociclador para una reacción de PCR con *SYBR Green*

Ciclos	T [$^{\circ}$ C]	tiempo	Objetivo
1	95	10 min	Desnaturalización
50	95	15 s	Desnaturalización
	60	1 min	Hibridación/Elongación
1	95	15 s	Curvas de disociación
	60	1 min	
	95	Aumento de T ^a progresivo	

Una vez obtenidos los resultados de PCR se escogieron aquellas concentraciones de cebadores que mostraban un *threshold cycle* (Ct) menor (es decir, mayor concentración de producto) y una mayor intensidad de fluorescencia normalizada (Δ Rn); y para la réplica blanco una menor señal de artefactos. De la combinación de estos tres factores se escogió la concentración óptima.

Construcción de la recta patrón

La recta patrón en la PCR a tiempo real se utilizó para cuantificar tanto el número de copias de los transgenes *derbp100* como para los niveles de expresión en los análisis transcriptómicos. La preparación y generación de la recta patrón es en ambos casos la misma. Los productos de PCR se generaron o bien de plásmido para los *derbp100* o bien de ADNc de Senia. Se generaron diluciones seriadas de 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 moléculas/reacción. Para cada dilución se realizaron tres replicas de PCR. El software del termociclador *ABIprism* permite generar una recta patrón mediante la pendiente y ordenada en el origen y obtener así una relación directa entre el valor Ct y el número de copias iniciales en la reacción. El coeficiente de linealidad R^2 muestra la fiabilidad de la regresión lineal.

$$[1] \quad \text{Log}_{10}(C) = a \cdot \text{Ct} - b$$

a = pendiente
b = ordenada en el origen.

El número de copias (C) de ARN o ADN (según el ensayo) de un determinado gen en una muestra problema se calculó a partir de la ecuación de primer grado [1] mediante la introducción del valor Ct obtenido de la reacción de qPCR. Para la comparación entre muestras el valor C se relativizó respecto al número de copias de un gen endógeno de la muestra. El valor resultante corresponde a la expresión relativa del gen en estudio.

La recta patrón permite también determinar la eficiencia (E) de una reacción de qPCR. Aplicando la fórmula de Rasmussen (2001) se obtiene el valor E de la reacción [2]. Éste se utilizó para corregir los Cts obtenidos para cada gen mediante el programa *Genex v.4.3.1*.

$$[2] \quad E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1 \quad (\text{Rasmussen, 2001})$$

III.A.2 Purificación de productos de PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó mediante columnas de afinidad *QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN, Hilden, Alemania)*. Las columnas de afinidad son capaces de retener en la membrana de sílice el ADN con un elevado contenido en sales y después de un proceso de lavado eluirlo en una solución pobre en sales. Con este método se pueden purificar fragmentos entre 100 pb y 10 Kb eliminando así cebadores, nucleótidos, polimerasas y sales presentes en la solución. Los tampones y las minicolumnas vienen incluidos en el “kit” de la casa comercial.

El protocolo seguido incluye algunas modificaciones:

1. Añadir 5 volúmenes de tampón PB por 1 volumen de reacción de PCR y mezclar.
2. Aplicar la mezcla a la columna (volumen máximo 650 μL).
3. Centrifugar a 4.000 rpm durante 3 min. En el caso de que no haya bajado toda la muestra, repetir la centrifugación.
4. Centrifugar a 13.000 rpm durante 30 s y descartar el eluido.
5. Lavar la muestra añadiendo 700 μL de tampón PE.
6. Centrifugar a 4.000 rpm durante 3 min. En el caso de que la muestra no haya bajado completamente, repetir la centrifugación.
7. Descartar el eluido.

8. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min para eliminar completamente los restos de etanol presentes en la columna. En caso contrario el rendimiento de purificación y la calidad del ADN disminuirá. Restos de etanol pueden inhibir posteriores reacciones enzimáticas.
9. Transferir la columna a un tubo siliconizado de 1,5 mL.
10. Añadir 50 μL de agua o tampón de elución EB (10 mM Tris HCl; pH 8,5) en el centro de la columna.
11. Incubar durante 15 min a TA.
12. Eluir el ADN centrifugando a 5.000 rpm durante 5 min. Finalmente centrifugar a 13.000 rpm durante 30 s.
13. Cuantificar 2 μL de muestra al espectrofotómetro *NanoDrop D100*.

III.A.3 Electroforesis en gel de agarosa (AGE)

La electroforesis en gel de agarosa es un método simple y efectivo para separar, analizar y purificar fragmentos de ADN. En esta tesis se utilizó este método para comprobar las reacciones de PCR, purificar fragmentos de ADN de interés y analizar las digestiones con enzimas de restricción. La concentración de la solución de agarosa depende de los tamaños de los fragmentos de ADN a analizar. La tabla III.9 representa una correlación entre la concentración del gel y los tamaños de los fragmentos a separar para obtener una resolución adecuada.

Tabla III.9: Concentraciones recomendadas para la resolución de ADN de doble cadena

Agarosa (% p/v)	Tamaño de los fragmentos a separar (Kb)
0,5	10 - 30
0,7	0,8 - 12
1	0,5 - 10
1,2	0,4 - 7
1,5	0,2 - 3
2	0,05 - 2

Tampón TAE 50X (Tris/Acetato/EDTA)

Tris Base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
Na ₂ EDTA .2H ₂ O	37,2 g

Tampón TAE 1X

Enrasar 20 mL de tampón TAE 50X en 1000 mL de agua destilada.

Solución tinción SYBR Safe (Invitrogen, Life Technologies, New York, USA)

Disolver 10 μL de SYBR Safe en 100 mL de tampón TAE 1X nuevo.

Tampón de muestra:

Azul de bromofenol	250 mg
Xilen-cianol	250 mg
Glicerol	30 mL
Agua	enrasar a 100 mL

El procedimiento seguido fue el siguiente:

1. Pesar la cantidad necesaria de agarosa y disolver en tampón TAE 1X.
2. Calentar la solución en el microondas hasta que la agarosa esté completamente disuelta.
3. Dejar enfriar la solución hasta 50 °C.
4. Llenar el molde para formar el gel y dejar polimerizar un mínimo de 30 min.
5. Preparar las muestras con el tampón de muestra y cargarlas al gel.
6. Correr el gel a 100 mA (para geles pequeños 10 x 6 cm) o 150 mA (para geles grandes 10 x 15 cm) hasta que el colorante azul de bromo fenol haya recorrido el 80% de la longitud del gel.
7. Teñir el gel en 100 mL de una solución de SYBR Safe (1:10.000) durante 10-15 min.
8. Fotografiar el gel según las instrucciones de la cámara *UVICHEM Cas6000* (Uvitec, Cambridge, UK).

III.A.4 Extracción de fragmentos de ADN de gel de agarosa

La extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa se realizó mediante columnas de afinidad con el *QIAquick Gel Extraction kit* (QIAGEN, Hilden, Alemania). Éstas se basan el mismo principio que las presentadas en el apartado de purificación de productos de PCR. Con este método se pueden purificar fragmentos entre 70 pb y 10 Kb de trozos de geles de hasta 400 mg. Los tampones utilizados y las minicolumnas vienen incluidos en el “kit” de la casa comercial.

El procedimiento seguido presenta algunas modificaciones respecto al de la casa comercial:

1. Preparar el gel y teñir con *SYBR safe* (III.A.7).
2. Recortar la banda deseada y determinar el peso.
3. Añadir por 100 mg de gel de agarosa 1% (el doble para geles del 2%) 300 μ L de tampón QG.
4. Incubar a 50 °C y con agitación durante 10 min o hasta que se disuelva el gel.
5. Aplicar la mezcla a la columna (volumen máximo 650 μ L).
6. Centrifugar a 4.000 rpm durante 3 min. En el caso de que no haya bajado toda la muestra, repetir la centrifugación.
7. Centrifugar a 13.000 rpm durante 30 s y descartar el eluido.
8. Lavar la muestra añadiendo 700 μ L de tampón PE (contiene etanol).

9. Centrifugar a 4.000 rpm durante 3 min. En el caso de que la muestra no haya bajado completamente, repetir la centrifugación.
10. Descartar el eluido.
11. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min para eliminar completamente los restos de etanol presentes en la columna. En caso contrario el rendimiento de extracción y la calidad del ADN disminuirá. Restos de etanol pueden inhibir posteriores reacciones enzimáticas.
12. Transferir la columna a un tubo siliconizado de 1,5 mL.
13. Añadir 50 μ L de agua o tampón de elución EB (10 mM Tris HCl; pH 8,5) al centro de la columna.
14. Incubar durante 15 min a temperatura ambiente.
15. Eluir el ADN centrifugando a 5000 rpm durante 5 min. Finalmente centrifugar a 13.000 rpm durante 15 s.
16. Cuantificar 2 μ L de muestra al espectrofotómetro *Nanodrop* D100.

III.A.5 Purificación fenólica y precipitación con etanol de soluciones de ADN

La purificación fenólica de soluciones de ADN se realizó después de digestiones de fragmentos de ADN superiores a 10 Kb para eliminar sales y restos de enzima. La purificación siempre fue seguida de una precipitación y un lavado con etanol para concentrar las soluciones de ADN.

El procedimiento seguido fue el siguiente:

1. Añadir 1 volumen de fenol/cloroformo/isoamilalcohol (25:24:1) a 1 volumen de solución de ADN a purificar.
2. Vortexar 1 min y centrifugar a 13.000 rpm durante 3 min para separar las dos fases.
3. Aspirar la fase acuosa (superior) y transferirla a un microtubo.
4. Añadir 0,9 volúmenes de agua respecto el volumen inicial de la solución de ADN sobre la fase orgánica y repetir los pasos 2 y 3.
5. Determinar el volumen total de la solución acuosa.
6. Añadir 0,1 volúmenes de acetato sódico y vortexar.
7. Añadir 2,5 volúmenes de etanol 100% y vortexar.
8. Precipitar el ADN a 20 °C un mínimo de 2 h.
9. Centrifugar durante 30 min a 13.000 rpm.
10. Retirar rápidamente el sobrenadante.
11. Lavar el pellet añadiendo 500 μ L de etanol 70% (v/v) y mezclar suavemente.
12. Centrifugar durante 10 min a 13.000 rpm.
13. Retirar rápidamente el sobrenadante con una pipeta *Pasteur* de punta estirada.

14. Secar el *pellet* invirtiendo el tubo con el tapón abierto para eliminar completamente los restos de etanol.
15. Resuspender el ADN con 30 – 50 μL de agua.
16. Cuantificar 2 μL de muestra al espectrofotómetro Nanodrop D100.

III.A.6 Subclonajes

Digestión enzimática de secuencias de ADN

La digestión de fragmentos de ADN para los clonajes se llevó a cabo mediante enzimas de restricción. En esta tesis se utilizaron únicamente enzimas de restricción que generan extremos cohesivos, de la casa comercial Roche (*Roche Diagnostics*, Barcelona, España). Las condiciones de reacción se establecieron para cada enzima y según las recomendaciones de la casa comercial. El volumen añadido de fragmento a digerir debe situarse entre el 10% y el 50% del volumen total de reacción. Así mismo el volumen del enzima no deberá superar el 10% del volumen total, en caso contrario el glicerol podría inhibir la reacción. Las digestiones se incubaron a 37 °C entre 1 hora y O/N dependiendo de la finalidad y la cantidad de ADN a digerir. Finalmente la purificación de los fragmentos digeridos se llevó a cabo mediante las columnas de afinidad (III.A.2) o mediante purificación fenólica para fragmentos > 10 kb (III.A.5).

Desfosforilación

La desfosforilación de los plásmidos digeridos se realizó mediante incubación con el enzima fosfatasa alcalina (*Roche Diagnostics*, Barcelona, España). Las condiciones de reacción se establecieron según las recomendaciones de la casa comercial.

Para determinar la cantidad de enzima necesaria se deben calcular los picomoles de extremos 5' presentes en la reacción. Para moléculas de doble cadena se aplica la siguiente fórmula [3].

$$[3] \quad \text{pmol } 5' = \frac{X}{Y \times 660 \text{ g/mol/pb}} \times 10^{12} \text{ pmols/mol} \times 2 \text{ extremos } 5' / \text{moléculas}$$

X = cantidad de ADN (g)

Y = tamaño del fragmento (pb)

Finalmente la purificación de los fragmentos desforilados se llevó a cabo mediante las columnas de afinidad (III.A.2) o mediante purificación fenólica para fragmentos > 10 kb (III.A.5).

Ligación

Las ligaciones entre el inserto y el vector se realizaron mediante incubación con el enzima T4 ADN Ligasa (*Roche Diagnostics*, Barcelona, España). Las condiciones de la reacción se establecieron según las recomendaciones de la casa comercial. Un factor importante para una ligación óptima entre inserto y vector es la relación molar de éstos en la mezcla de reacción (fórmula [4]). La relación molar variará en función del tamaño de los fragmentos a ligar. Para fragmentos de tamaños similares se recomienda una relación molar inserto:vector de 10:1, contrariamente, es decir, para fragmentos de tamaños que difieren mucho entre sí se aplicará una relación molar inserto:vector de 2:1. Otro factor importante es la concentración de ADN total dentro de la mezcla, que debe estar entre 10 y 20 ng/ μL , así como el volumen de la mezcla, el cual no debe superar los 25 μL . Una concentración superior a 20 ng/ μL podría dar lugar a reacciones inespecíficas. Respecto al volumen de la mezcla es importante que no supere los 25 μL ya que podría disminuir la eficiencia del posterior proceso de transformación. Para cada ligación realizada en esta tesis se especifican las condiciones aplicadas en su apartado correspondiente. Todas la ligaciones se incubaron 16 h y a una temperatura gradual de 4 °C a 16 °C. Una vez finalizada la ligación se desactivó el enzima T4 ADN ligasa incubando la mezcla de reacción durante 10 min a 65 °C. En caso de no desactivar el enzima podría disminuir la eficiencia (o incluso inhibir) del proceso de transformación.

$$[4] \quad \text{Cantidad inserto [ng]} = \frac{\text{cantidad vector [ng]} \times \text{tamaño inserto [Kb]}}{\text{tamaño vector [Kb]}} \times \text{relación } \frac{\text{inserto}}{\text{vector}}$$

III.A.7 Minipreparaciones de ADN plasmídico

Las extracciones de plásmidos de células de *E. coli* transformadas se realizaron mediante el *kit* de extracción *NucleoSpin* (*Macherey-Nagel*, Düren, Alemania) principio de purificación se basa en la adsorción de las moléculas de ADN a membranas de sílice en presencia de una concentración elevada de sales caotrópicas. Bajo estas condiciones el ADN tiene mayor afinidad para los iones de sílice pudiendo así proceder con el lavado etanólico sin que éste se desprenda. La elución del ADN se llevará a cabo mediante la adición de agua o tampón pobre

en sales, p.ej. 10 mM Tris HCl pH 8,5. Todos los reactivos necesarios así como las minicolumnas de sílice están incluidos en el *kit*. Con este método se pueden purificar plásmidos < 15 Kb con un rendimiento máximo del 80% y obteniendo cantidades de hasta a 25 μg .

El procedimiento seguido difiere ligeramente del de la casa comercial y fue el siguiente:

1. Inocular en 5 mL de medio LB con antibiótico de selección de colonia aislada obtenida mediante transformación genética y que contenga el plásmido a purificar.
2. Incubar toda la noche a 37 °C y a 200 rpm.
3. Centrifugar las células 30 s a 13.000 rpm y descartar el sobrenadante.
4. Resuspender el pellet en 250 μL tampón A1 que incluye ARNsa A.
5. Proceder con la lisis alcalina añadiendo 250 μL de tampón A2 (contiene SDS) e invertir el microtubo de 6 a 8 veces. No vortexar.
6. Incubar durante un máximo de 5 min a TA.
7. Añadir 300 μL de tampón A3 (contiene hidrocloreuro de guanidina) para neutralizar la solución y permitir que el ADN se adhiera bien en el interior de la columna.
8. Invertir el microtubo de 6 a 8 veces.
9. Centrifugar 15 min a 13.000 rpm para precipitar las proteínas complejadas con SDS y los restos celulares.
10. Aplicar el sobrenadante a la columna de sílice para adsorber el ADN.
11. Centrifugar a 4.000 rpm durante 3 min y finalmente 30 s a 13000rpm.
12. Descartar el eluido.
13. Se recomienda lavar el ADN con 500 μL tampón AW (contiene hidrocloreuro de guanidina) centrifugando 1 min a 13.000 rpm. Este paso es importante para la optimización de posteriores reacciones enzimáticas o de secuenciación, ya que se eliminarán los restos de nucleasas.
14. Para eliminar contaminantes como sales, metabolitos u otros componentes celulares solubles, lavar la columna aplicando 600 μL de tampón A4 (contiene etanol).
15. Centrifugar 3 min a 4.000 rpm y descartar el eluido.
16. Centrifugar 1 min a 13.000 rpm para eliminar totalmente los restos de etanol.
17. Aplicar la columna en un microtubo de 1,5 mL.
18. Aplicar sobre la columna 50 μL de tampón de elución AE (10 mM Tris HCl, pH 8,5).
19. Incubar durante 15 min a TA.
20. Centrifugar 5 min a 4.000 rpm y finalmente 15 s a 13.000 rpm.
21. Cuantificar la concentración de ADN con el espectrofotómetro *NanoDrop D100*.

III.A.8 Secuenciación de fragmentos de ADN

Las secuenciaciones de fragmentos de ADN se realizaron con la mezcla comercial *BigDye*[®] *Terminator* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) cuya técnica se basa en el método desarrollado por Sanger en los años setenta. El método dideoxy de secuenciación está catalizado por el enzima ADN polimerasa y utiliza como sustrato los análogos de nucleótidos 2', 3'-dideoxinucleótidos (ddNTPs). A medida que el enzima incorpora al extremo 3' de la cadena creciente un ddNTP la elongación termina selectivamente con una base A, C, G o T debido a la falta de un grupo hidroxilo en ddNTP. La mezcla de *BigDye*[®] *Terminator* utiliza ddNTP marcados cada uno con un fluorocromo diferente que se van añadiendo a la cadena durante cada ciclo de la reacción de secuenciación. Durante la reacción se generan moléculas de ADN, cada una terminada y marcada a una base distinta y consecutiva a la anterior. Los productos de reacción se aplican en un secuenciador (*ABI PRISM TM 310 Genetic Analyzer*, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) para la obtención de la secuencia final. Con esta técnica se pueden secuenciar moléculas de ADN tanto de doble como de simple cadena. En esta tesis se secuenciaron moléculas de doble cadena procedentes de productos de PCR o de plásmidos.

Se prepararon las reacciones con los siguientes reactivos (añadidos por orden) en tubos de propileno de 200 μL :

Tabla III.10: Reactivos para reacción de secuenciación

Reactivo	Volumen (μL)
BigDye buffer ^a	1
Cebador (10 μM)	1
<i>BigDye terminator</i> ^a	3
ADN ^b	1-5
Agua	hasta 10

a) *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA

b) Plásmidos: 100 ng de ADN; Productos de PCR: 10 ng de ADN

Las condiciones del termociclador se indican en la tabla III.11.

Tabla III.11: Condiciones de termociclador para la reacción de secuenciación

Ciclos	T [$^{\circ}\text{C}$]	tiempo
1	95	3 min
25	96	10 s
	50	5 s
	60	4 min

Purificación del producto de secuenciación:

1. Vortexar brevemente la mezcla y añadir por orden: 1 μL EDTA 125 mM; 1 μL acetato sódico 3 M pH 5,2 y 25 μL etanol 100% (v/v).
2. Proteger la mezcla de la luz tapando el microtubo con papel de aluminio. Invertir aproximadamente 4 veces.
3. Incubar a TA durante 15 min.
4. Transferir las soluciones a microtubos de 1,5 mL y centrifugar a 13.000 rpm durante 30 min.
5. Rápidamente, aspirar el sobrenadante con una pipeta *Pasteur* estirada.
6. Lavar el *pellet* añadiendo 30 μL de etanol 70% (v/v) y mezclar suavemente.
7. Centrifugar durante 15 min a 13.000 rpm.
8. Rápidamente, aspirar el sobrenadante con una pipeta *Pasteur* de punta estirada.
9. Secar las muestras dejando los tubos abiertos y protegidos de la luz (30 °C durante 15 min).
10. Resuspender el sedimento en 30 μL de *Template Suppression Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, Foster City, CA, USA)* y rehidratar durante 20 min a TA.
11. Vortexar y desnaturalizar en un baño a 94 °C durante 3 min.
12. Transferir inmediatamente sobre gel.
13. Transferir los 30 μL a microtubos ABI 310 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) y aplicar las reacciones de secuencia a ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer.
14. Una vez obtenidas las secuencias estas se analizaron con el programa *Chromas Lite v2.01*. El programa permite visualizar las secuencias y exportarlas en formato FASTA para su posterior análisis.

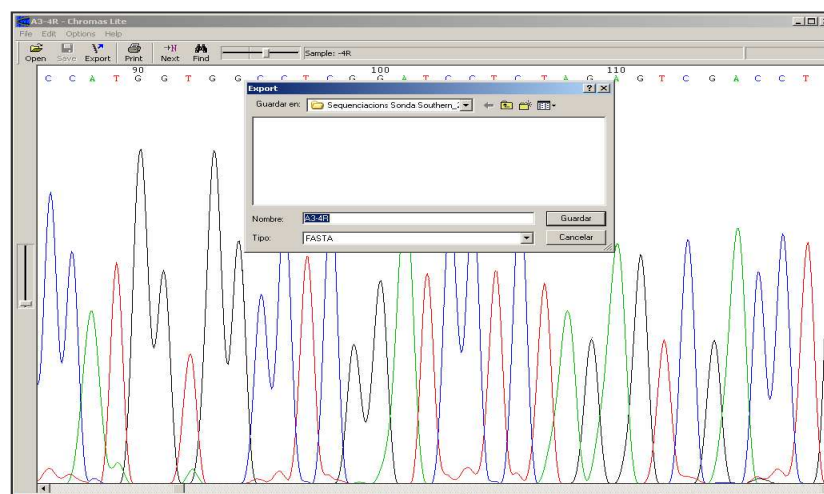


Figura III.1: Ejemplo del programa *Chromas Lite v2.01* para la visualización de las secuencias obtenidas con el secuenciador *ABI Prism*. Como ejemplo se muestra la función de exportación en formato FASTA.

III.A.9 Transformación genética de bacterias

La transformación genética de bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) es una técnica muy común en biología molecular. El objetivo de ésta técnica puede ser la expresión de proteínas recombinantes o bien simplemente la amplificación de plásmidos para la obtención de éstos en grandes cantidades. *E. coli* es capaz de replicar el ADN plasmídico por reconocimiento de la secuencia de origen de replicación ORIC. La cepa *E. coli* XL1 Blue se utilizó únicamente para la amplificación de vectores durante los procesos de clonaje. Por el contrario la transformación genética de *Agrobacterium tumefaciens* tuvo como objetivo la modificación de la cepa con el vector de expresión para proceder con la transformación genética de arroz. En todo caso, para llevar a cabo una transformación genética las células bacterianas deben ser competentes, es decir, con la pared celular modificada para favorecer la introducción del material genético. La competencia de bacterias se mide por la eficiencia de transformación siendo ésta el número de transformantes obtenidos por mg de plásmido transferido. En esta tesis se utilizaron células *E. coli* XL1 Blue y *A. tumefaciens* EHA105 químicamente competentes por CaCl_2 (Seidman, 1977).

Preparación de células competentes por CaCl_2

El método utilizado para la obtención de células competentes fue por incubación con CaCl_2 descrito por Seidman (1977). La cepa de *E. coli* XL1 Blue utilizada posee el gen de resistencia a la tetraciclina (Tc) y *A. tumefaciens* EH105 a la rifampicina (Rif). Éstos son útiles para evitar contaminaciones durante la preparación.

Tampón TB

PIPES (piperazin-N,N'-bis 2-etansulfónico)	10 mM
MnCl ₂	55 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
Ajustar pH a 6,7 con KOH 5 N antes de adicionar el MnCl ₂	

SOB

Triptona	20 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	0,5 g/L
MgSO ₄	5 g/L
KCl	0,186 g/L
Agar (solo para placas)	15 g/L
Autoclavar 20 min a 121 °C	

Medio de cultivo y placas LB

Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Cloruro sódico (NaCl)	10 g/L
Agar (para placas)	15 g/L
Autoclavar 20 min a 121 °C	

Medio YEB (líquido o sólido)

<i>Beef Extract</i>	5 g/L
Extracto de levadura	1 g/L
Peptona	5 g/L
Sacarosa	5 g/L
MgSO ₄	0,48 g/L
Agar (para medio sólido)	15 g/L
Autoclavar 20 min a 121 °C	

Tabla III.12: Antibióticos utilizados

<i>Antibiótico</i>	<i>Concentración Final [μg/mL]</i>
Tetraciclina (Tc)	15
Ampicilina (Sal de Na) (Amp)	100
Kanamicina (Kan)	50
Rifampicina (Rif)	50

El procedimiento seguido fue el siguiente:

- Sembrar en estría una placa LB con antibiótico e incubar según cepa:
 - E. coli* XL1 Blue (LB+ Tc), incubar 16-20 h a 37 °C.
 - A. tumefaciens* EHA105 (LB+ Rif), incubar 48 h a 28 °C.
- Preparar un inóculo de 5 mL en LB con antibiótico a partir de una ufc de la placa e incubar 16-20 h a 37 °C (*E. coli*) o 28 °C (*A. tumefaciens*).
- Inocular de 0,83–1 mL del inóculo a 250 mL de medio SOB sin antibiótico. Incubar a 37°C (*E. coli*) o 28 °C (*A. tumefaciens*) con agitación a 175 rpm hasta llegar a una OD₆₀₀ = 0,6. El nombre de células viables no debe superar 10⁸ células/mL (1 OD₆₀₀= 8 x 10⁸ cel. /mL).
- Transferir el cultivo celular a tubos de centrifuga estériles fríos.
- Mantener en hielo durante 10 min.
- Centrifugar entre 4.000-5.000 rpm durante 10 min a 4 °C.
- Eliminar el sobrenadante y mantener los tubos invertidos durante 1 min.
- Resuspender las células en 80 mL de la solución TB, previamente enfriada, pipeteando y agitando suavemente. Durante este proceso trabajar sobre hielo. Finalmente incubar 10 min sobre hielo.
- Centrifugar entre 4.000-5.000 rpm durante 10 min a 4 °C.
- Decantar el sobrenadante.
- Resuspender las células en 18,6 mL de TB frío en hielo.

12. Añadir DMSO temperado a TA a una concentración final del 7% (v/v).
13. Incubar en hielo 10 min.
14. Alicuotar la suspensión en 200 μL , congelar con nitrógeno líquido y conservar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Transformación por choque térmico

Para la transformación de bacterias químicamente competentes se utiliza el método del choque térmico. Éste puede ser por calor a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ o bien por contacto con nitrógeno líquido. Ambos métodos tienen como objetivo la desestabilización de la membrana bacteriana para posibilitar la transferencia del ADN al interior de la célula.

La transformación de células ***E. coli XL1 Blue*** se realizó por calor. El procedimiento seguido fue el siguiente:

1. Añadir a una alícuota de células competentes una alícuota de la reacción de ligación o bien 100 ng de plásmido y mezclar suavemente.
2. Incubar las células sobre hielo durante 30 min para que el ADN se adhiera a la pared celular.
3. Incubar 90 s a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ para producir el choque térmico y permitir así la entrada del ADN al interior de las células.
4. Incubar sobre hielo durante 1-2 min.
5. Añadir 500 μL de medio SOB (III.A.9).
6. Incubar 1 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para que las células sinteticen la resistencia al antibiótico que las confiere el plásmido introducido.
7. Sembrar en superficie 100-300 μL sobre placas LB que contengan el antibiótico de selección.

Las células de ***Agrobacterium tumefaciens*** se transformaron por contacto con nitrógeno líquido:

1. Descongelar una alícuota de 200 μL (aproximadamente 10^9 ufc /mL) de células químicamente competentes.
2. Añadir 100-200 ng del vector de transformación y congelar rápidamente en N_2 líquido.
3. Incubar 5 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
4. Añadir 800 μL de LB líquido e incubar 3-4 h a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$.
5. Centrifugar 1 min a 13.000 rpm.
6. Eliminar el SN y resuspender el sedimento en 100 μL de medio LB agitando suavemente.
7. Sembrar en superficie en una placa de medio YEB con kanamicina.
8. Incubar las placas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h.

III.B. Construcción de plantas de arroz MG

III.B.1 Construcción de vectores para expresión en planta

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para la síntesis de genes y construcción de vectores de expresión fueron sintetizados por la casa comercial (*Fisher Scientific*, Madrid, España). En la tabla III.13 están resumidos los cebadores necesarios para la síntesis de genes, obtención de secuencias de interés así como selección de vectores positivos.

Tabla III.13: Oligonucleótidos utilizados para la construcción de los vectores de clonaje

Oligonucleótidos	Secuencia/Descripción
Síntesis mediante PCR recursiva de las secuencias codificantes de <i>bp214</i> , <i>bp192</i> y <i>bp216</i> fusionadas con el péptido señal <i>pr1a</i> (extremo 5') y al con la secuencia de retención a retículo endoplasmático <i>KDEL</i> (extremo 3'):	
<i>PR1a.1_for</i>	5'-ATAG GGATCCGAGGCCACCATGGGCTTCGTCCTCTTCTCC CAACTCCCATCCTTCTCTCTCGTCTCCACCCTCTCTGT-3'
<i>BP100.1_rev</i>	5'-GTACTTGAGGATCTTCTTGAAGAGCTTCTTGGCGGGCA GGAGTGGGAGATCACGAGGAACAGGAGGAGGGTGGA-3'
<i>BP100.2_for</i>	5'-GAAGCTCTTCAAGAAGATCCTCAAGTACCTCGCCGGCCC AGCCAAGAAGCTCTTCAAGAAGATCCTCAAGTACCTCGCC-3'
<i>BP100.3KDEL_rev</i>	5'-TATAGGATCCATTATCAGAGCTCGTCCTTGAGGTACTTG AGGATCTTCTTGAAGAGCTTCTTGGCTGGGCGGCGAGGTAC TTGAGG-3'
Clonaje de las secuencias <i>derbp100</i> al vector intermediario <i>pAHC16</i> :	
<i>PR1a_for</i>	5'- ATAGGGATCCGAGGCCACCAT- 3' Obtención de las secuencias codificantes de <i>derbp100</i>
<i>KDELbam_rev</i>	5'-TATAGGATCCATTATCAGAGCTCGTC-3' Obtención de las secuencias codificantes de <i>derbp100</i> y determinación de su orientación en el vector intermediario <i>pAHC16</i>
<i>UBIfi_for</i>	5'-AACCTCGTGTGTTTCGGAGC-3' Determinación de la orientación de las secuencias codificantes de <i>derbp100</i> en el vector intermediario <i>pAHC16</i> Determinación de la orientación del gen de interés en el vector de transformación
<i>NOS_rev</i>	5'-CCATCTCATAAATAACGTCATGC-3' Determinación de la orientación de las secuencias codificantes de <i>derbp100</i> en el vector intermediario <i>pAHC16</i>
Obtención, clonaje y selección del fragmento: <i>gos2-gfp-rrbc</i>	
<i>GOS-GFP_for</i>	5'-ATAGAAGCT TTCGGTACCCGGGGAT-3' Amplificación del fragmento <i>gos2-gfp-rrbc</i> del vector <i>pCAMBIA5300</i>
<i>RBC-GFP_rev</i>	5'-GACGGCCAGTGCCAAGCT-3' Amplificación del fragmento <i>gos2-gfp-rrbc</i> del vector <i>pCAMBIA5300</i>

Continuación tabla III.13: Oligonucleótidos utilizados para la construcción de los vectores de clonaje

<i>GGFSc_for</i>	5'-GGCATCCAAGCCAAGAAGAG-3' Selección de los clones con el inserto <i>gos2::gfp::rrbcs</i> en <i>pCAMBIAgfp</i>
<i>GGFSc_rev</i>	5'-ATCGCAAGATTCCGATCCCTA-3' Selección de los clones con el inserto <i>gos2::gfp::rrbcs</i> en <i>pCAMBIAgfp</i>
Determinación de la orientación del <i>cassette</i> de expresión de GFP en <i>pCAMBIAgfp</i>	
<i>pUCGF_for</i>	5'- TGATGACAATTATGGCTACCTCG -3'
<i>pUCGF_rev</i>	5'-TCTACCATGGTGGACTCCTTAG- 3'
Selección de clones positivos <i>pCAMBIAgfp::derbp100</i> y <i>pCAMBIA1300::derbp100</i>	
<i>seqUBI_rev</i>	5'-GTCCTTTAGACCATGTCTAACTGTTTC -3'
<i>T35SKB_for</i>	5'-GTAGGGATCCGGGTACCTTAACGCCGAATTAATTCG -3'
Construcción de la sonda necesaria para la detección por <i>Southern Blot</i>	
<i>SouthUBI_for</i>	5'-ACATGTGATGTGGGTTTACTGATG-3'
<i>SouthBP_rev</i>	5'-GAGGACTTGAGGATCTTCTTGAAG-3'
Determinación de los niveles de expresión de los ARN diana codificantes de <i>gfp</i> , <i>hpt II</i> y <i>derbp100</i>	
<i>SYGFP_for</i>	5'-AAGCAGAAGAACGGCATCAAGG-3'
<i>SYGFP_rev</i>	5'-TAGTGGTTGTCGGGCAGCAG-3'
<i>SYPR1a_for</i>	5'-TCCTCGTGATCTCCCACTCCTG-3'
<i>SYKDEL_rev</i>	5'-CGGATCCATTATCAGAGCTCGT-3'
<i>SyHygro_for</i>	5'-CGAAATTGCCGTCAACCAAGC-3'
<i>SyHygro_rev</i>	5'-CTGGAGCGAGGCGATGTTTC-3'

Síntesis de genes

PCR Recursiva

La técnica de la PCR recursiva fue diseñada por Promodrou y Pearl en el año 1992 para la síntesis de genes utilizando la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). La síntesis de genes mediante esta técnica requiere el uso cebadores de longitudes comprendidas entre 50 y 90 nucleótidos con secuencias comunes entre ellos, los cuales serán los puntos de inicio de síntesis de ADN mediante ADN polimerasa sin la necesidad de introducir en la mezcla de reacción un ADN molde. Así, mediante esta técnica es posible la construcción de secuencias génicas a bajo coste y con una eficiencia notablemente más elevada que con otros métodos de síntesis. Además, la PCR recursiva a diferencia de otras técnicas no requiere pasos intermedios como la fosforilación y la ligación. El primer resultado obtenido por Promodrou y Pearl fue un gen de 522 bp a partir de 10 cebadores.

Para la síntesis de las secuencias *derbp100* (*bp214*, *bp192* y *bp216*) se requirieron concretamente 4 cebadores (tabla III.13), los cuales fueron sintetizados por Ramón Eritja (CSIC, Barcelona). Los cebadores *PR1a.1_for* (externo) y *BP100.2_for* (interno) hibridan en dirección sentido y *BP100.1_rev* (interno) y *BP100.3KDEL* (externo) en dirección antisentido. Los cebadores externos hibridan por su extremo 3' a los internos. Éstos últimos tienen zonas de hibridación en ambos extremos. La figura III.2 representa esquemáticamente la reacción de la PCR recursiva, en la cual se puede observar la orientación e hibridación de los cebadores así como el proceso hasta la obtención de los productos finales.

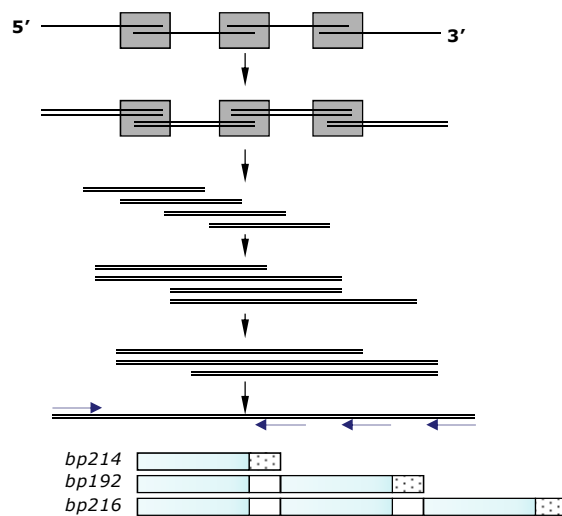


Figura III.2: Representación esquemática de la síntesis de genes mediante una PCR recursiva.

El enzima utilizado para la síntesis fue *Expand High Fidelity* polimerasa de la casa comercial Roche (*Roche Diagnostics*, Barcelona, España). Las condiciones del termociclador se adaptaron en función de las recomendaciones de la casa comercial y fueron: 3 min 94 °C; 10 ciclos: 15 s 94 °C, 30 s 54 °C, 3 min 30 s 72 °C; 20 ciclos: 15 s 94 °C, 30 s 58 °C, 3 min 30 s + 5 s 72 °C; 10 min 72 °C. La composición de la reacción para la construcción del gen fue la siguiente:

Tabla III.14: Reactivos para la reacción de PCR recursiva para la síntesis de *bp214*, *bp192* y *bp216*

Reactivo	Conc. Madre	Conc. Final	V[μ L/reacción]
Tampón + MgCl ₂	10 x (+15 mM)	1x (+1.5 mM)	10
dNTPs (TTP)	2,5 mM (de cada)	300 μ M	12
Cebador Externo (1)	30 μ M	30 pmol	1
Cebador Interno (2)	0,2 μ M	0,2 pmol	1
Cebador Interno (3)	0,2 μ M	0,2 pmol	1
Cebador Externo (1)	30 μ M	30 pmol	1
Ex. High Fid. Polimerasa	3.5 U/ μ L	1,75 U	0,5
Agua hasta			100

Purificación de genes sintéticos

Debido a la repetición de la secuencia *bp134* en los genes *bp214*, *bp192*, *bp216*, el producto de la PCR recursiva se compone de una mezcla de éstos. No fue posible el uso de técnicas electroforéticas para la separación de secuencias génicas ya que el tamaño de los tres genes no era suficientemente distinto (su tamaño difiere solo de 45 nucleótidos). Se optó por la técnica del subclonaje mediante el sistema T/A utilizando el vector *pGEM® T-Easy* (Promega, Madison, USA). La ADN polimerasa introduce a los extremos 3' de la secuencia tres adenosinas trifosfato consecutivas de manera que hace posible la clonación de un producto de PCR en un vector lineal con tres timidinas a los extremos 3'.

Tabla III.15: Composición de la mezcla de la reacción de ligación para la purificación de genes sintéticos

Reactivo	Volumen [μL]
pGEM®-T easy (50 ng/ μL)	1 μL
Mezcla PCR recursiva	1 μL (=43,5 ng*)
Tampón 2X	5 μL
ADN Ligasa	1 μL
Agua	2 μL

* Ejemplo de cálculo para la cantidad necesaria de producto de PCR aplicando la fórmula [4] (III.A.6):

$$\frac{50 \text{ ng}}{3 \text{ Kb}} \times 0,261 \text{ Kb} \times \frac{1}{10} = 43,5 \text{ ng mezcla de PCR recursiva purificada}$$

La reacción de ligación se incubó 16 h a una temperatura progresiva de 4 °C a 16 °C. El producto de ligación se transformó por choque de calor a células *E. coli* XL1 Blue químicamente competentes (Método CaCl₂; III.A.9). Las unidades formadoras de colonia (ufc) resultantes se seleccionaron mediante PCR (*Taq* ADN polimerasa, *Invitrogen*, *Life Technologies*, New York, USA) utilizando los cebadores *PR1a_for* y *KDELBam_rev* y como ADN molde una suspensión de una ufc aislada seleccionada de la placa LB-Agar. Las condiciones de PCR fueron: 3 min 95 °C; 40 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 58 °C, 30 s 72 °C; 10 min 72 °C. La composición de la reacción se describe en el apartado III.A.1.

Las secuencias codificantes de *bp213* y *bp217* las sintetizó la casa comercial *GenScript* (*GenScript*, Piscataway, NJ, USA). Éstas se encuentran incorporadas en el plásmido *pUC57* y flanqueadas con dianas *BamH I* a ambos extremos.

Vectores de origen

Para la construcción de los vectores necesarios tanto intermediarios como de expresión en planta se partió de los plásmidos alistados en la tabla III.16. En ésta se muestra el nombre del vector, el tamaño, el gen de selección y finalmente su función. Los vectores *pCAMBIA5300*, *pAHC17*, *pCAMBIA0390* y *pCAMBIA1300* fueron cedidos por B. San Segundo (CRAG, Barcelona). El vector *pGEM®T-Easy* se obtuvo de la casa comercial Promega (*Promega Corporation*, Madison, USA). Los vectores *pCAMBIA* son plásmidos que se utilizan para la transformación de plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens* diseñados con un mínimo de secuencias heterólogas necesarias para la preparación del vector según las condiciones requeridas, sean de selección o de expresión de proteínas. Concretamente *pCAMBIA1300* está preparado con el gen de selección de resistencia a higromicina (*hpt II*) para la selección de callos y plantas transformadas positivamente, y con el gen de resistencia a kanamicina (*npt II*), para la selección bacteriana. En ambos casos los genes de resistencia están regulados por el promotor del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV 35S*). Además este vector incorpora la región de múltiple clonaje de *pUC18*.

El vector *pCAMBIA0390* contiene únicamente la región de múltiple clonaje de *pUC9* y el gen de resistencia a kanamicina para la selección en bacterias. Este vector se modificó con el gen de la proteína verde fluorescente, *gfp* y sus elementos reguladores para la selección de callos de arroz transformados positivamente. Una característica en común de todos los vectores *pCAMBIA* son los elementos RB (*Right Border*) y LB (*Left Border*) que delimitan el T-ADN, es decir el fragmento de ADN que se inserta en el genoma de la planta huésped.

Tabla III.16: Vectores utilizados para la construcción de vectores intermediarios y de expresión

Vector	Tamaño [pb]	Resistencia	Finalidad
<i>pCAMBIA5300</i>	9000	<i>kan^r</i>	obtención de la secuencia génica <i>gos2^a::gfp^c::rrbcs^b</i>
<i>pAHC17</i>	5123	<i>amp^r</i>	vector base para la generación de plásmidos intermediarios
<i>pCAMBIA0390</i>	6813	<i>kan^r</i>	vector binario de expresión base para transformación por <i>Agrobacterium</i> y selección por <i>gfp</i>
<i>pCAMBIA1300</i>	8958	<i>kan^r / hptII^r</i>	vector binario de expresión base para transformación por <i>Agrobacterium</i> y selección por resistencia a higromicina
<i>pGEM®Easy vector</i>	3015	<i>amp^r</i>	vector intermediario para el aislamiento de las secuencias <i>bp214</i> , <i>bp192</i> y <i>bp216</i>
<i>pUC57</i>	2918 ¹ /2972 ²	<i>amp^r</i>	vector intermediario preparado por la casa comercial <i>GenScript</i> y para el aislamiento de las secuencias <i>bp213¹</i> y <i>bp217²</i>

^{-r}: Gen de resistencia, ^{-a}: Promotor, ^{-b}: Terminador, ^{-c}: secuencia codificante

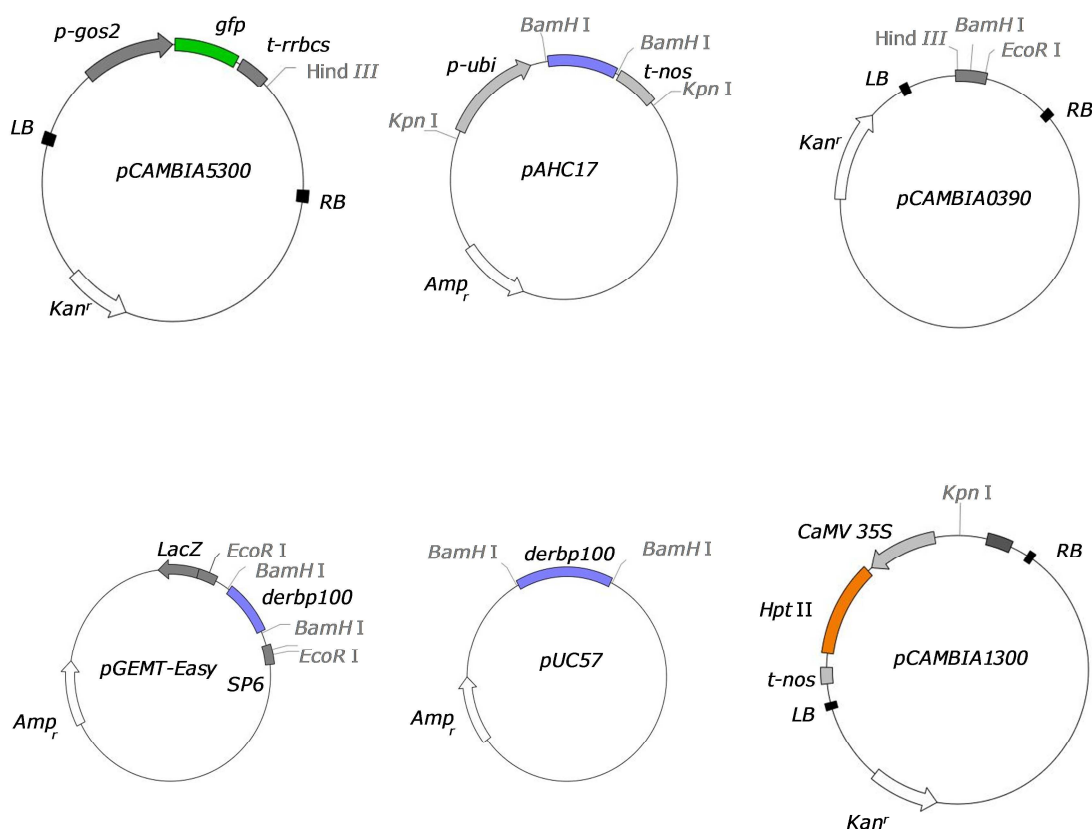


Figura III.3: Representación esquemática de los vectores de origen utilizados.

Vectores intermediarios

pAHC16

La obtención del vector *pAHC16* se produjo mediante una digestión del vector originario *pAHC17* con la enzima de restricción *BamH I* y seguida de una ligación del plásmido mediante el enzima T4 ADN Ligasa, sin necesidad de desfosforilación. La composición de la reacción se muestra en la tabla III.17. El vector resultante *pAHC16* se transformó mediante choque de calor en células *E. coli* XL1 Blue químicamente competentes (Método CaCl_2 ; III.A.9).

La selección de los clones positivos se realizó mediante una PCR (*Taq* ADN polimerasa, Apartado III.A.1) con los cebadores *UBIfi_for* y *NOS_rev* utilizando como ADN molde una suspensión de bacteriana realizada a partir de una colonia aislada. Como control positivo se amplificó el plásmido *pAHC17*. Las condiciones de PCR fueron: 3 min 95 °C; 40 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 58 °C, 1 min 72 °C; 10 min 72 °C. La composición de la reacción se describe en el apartado III.A.1.

Tabla III.17: Composición de la mezcla de la reacción de ligación para la obtención del vector pAHC16

Reactivo	Volumen [μL]
pAHC17 (<i>BamH</i> I) (50 ng/ μL)	6 μL
Tampón 10X	1,5 μL
T4 ADN Ligasa	1 μL
Agua	6,5 μL

Subclonaje de los genes de interés en pAHC16

Para el subclonaje de cada uno de los *derbp100* entre los elementos reguladores *pUBI* y *tNOS* de *pAHC16* se digirió el plásmido *pGEM::derbp100* (*bp214*, *bp192* y *bp216*) o *pUC57::derbp100* (*bp213*, *bp217*) con el enzima de restricción *BamH* I y se purificó de gel de agarosa el fragmento correspondiente a cada *derbp100*. El *pAHC16* se linearizó con *BamH* I y desfosforiló con fosfatasa alcalina (CIP, *Roche Diagnostics*, Barcelona, España). La ligaciones del vector *pAHC16* con los fragmentos *derbp100* se realizaron a una relación molar vector:inserto de 1:2. La cantidad total de inserto depende de la longitud de éste y se determinó mediante la fórmula [4] (Apartado III.A.6). La reacción de ligación se realizó a temperatura entre 4 °C y 16 °C progresiva durante 16 h. El producto de ligación se transformó a células *E. coli* XL1 Blue químicamente competentes (Método CaCl_2 , III.A.9). La selección de los clones se realizó mediante PCR (*Taq* ADN polimerasa, III.A.1) con los cebadores *UBIfi_for* y *KDELBam_rev*. Las condiciones del termociclador fueron: 3 min 95°C; 40 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 58°C, 1 min 72 °C; 10 min 72 °C. La composición de la reacción se describe en el apartado III.A.1.

Tabla III.18: Composición de la mezcla de la reacción de ligación para la obtención de los vectores intermediarios

Reactivo	Volumen [μL]
<i>derbp100</i> ^c	1-3 μL
pAHC16 (<i>Kpn</i> I ^a / CIP ^b) 100 ng/ μL	2 μL
Tampón de ligación 10X	1.5 μL
<i>T4</i> ADN Ligasa	1 μL
Agua	hasta 15 μL

a) Enzima para la linearización

b) Enzima de defosforilación

c) Cantidad aplicada en la reacción:

	<i>bp214</i>	<i>bp192</i>	<i>bp213</i>	<i>bp216</i>	<i>bp217</i>
Tamaño [pb]	176	216	216	261	261
Cantidad [ng]	13,2	16,2	16,2	19,6	19,6

Vectores de transformación

Obtención de la secuencia génica *pUBI::derbp100::tNOS*

Las secuencias génicas *pUBI::derbp100::tNOS* se obtuvieron a partir de los plásmidos intermediarios *pAHC16::derbp100*. Cada plásmido se digirió con enzima *Kpn I* (*Roche Diagnostics*, Barcelona, España) y el fragmento de interés, de unos 2500 pb, se extrajo de gel de agarosa 1% (p/v).

Obtención del gen marcador *gfp*

Se obtuvo la secuencia del gen marcador *gfp* con sus elementos reguladores promotor *gos2* y terminador *rrbcs* a partir del plásmido *pCAMBIA5300*. Se diseñaron los cebadores *GOS-GFP_for* y *RBC-GFP_rev* los cuales incluyen la diana de restricción *Hind III* para su posterior subclonaje en *pCAMBIA0390*. El oligonucleótido *GOS-GFP_for*, incluye en su extremo 5', además de la diana *Hind III*, las dianas de restricción *BamH I* y *Kpn I*.

La reacción de PCR para la obtención de la secuencia génica completa se llevó a cabo mediante el enzima *High Expand Fidelity* (*Roche Diagnostics*, Barcelona, España) y las condiciones de PCR fueron: 3 min 95°C; **10 ciclos:** 15 s 95 °C, 30 s 54 °C, 3m 30 s 68 °C; **20 ciclos:** 15 s 95 °C, 30 s 58 °C, 3 m 30 s + 5 s 68 °C; 10 min 68 °C, ∞ 4 °C. La composición de la reacción se describe en el apartado III.A.1.

Construcción del vector *pCAMBIAgfp*

Para el subclonaje del fragmento *gos2::gfp::rrbcs* en *pCAMBIA0390*, se digirieron en paralelo la dos secuencias génicas con el enzima *Hind III* (*Roche Diagnostics*, Barcelona, España), seguida en el caso del vector de una desfosforilación con fosfatasa alcalina (CIP, *Roche Diagnostics*, Barcelona, España). La ligación se llevó a cabo con una relación molar vector:inserto de 10:1 para generar un vector de 10,3 kb.

Tabla III.19: Composición de la mezcla de la reacción de ligación para la obtención de *pCAMBIAgfp*

Reactivo	Volumen [μ L]
<i>gos2::gfp::rrbcs</i> (<i>Hind III</i> ^a) 15 ng/ μ L	7
<i>pCAMBIA0390</i> (<i>Hind III</i> ^a / CIP ^b) 20 ng/ μ L	1
Tampón de ligación 10X	1,5
<i>T4 ADN Ligasa</i>	1
Agua	4,5

a) Enzima para la linearización

b) Enzima de defosforilación

El producto de ligación se transformó por choque de calor a células *E. coli* XL1blue químicamente competentes (Método CaCl₂; III.A.9). Los clones positivos se seleccionaron mediante una PCR con la combinación de cebadores *GGFSc_for* y *GGFSc_rev*, los cuales hibridan sobre el promotor *gos2*, generando un producto de PCR de 362 pb. Las condiciones de PCR de esta primera selección fueron: 3 min 95 °C; 30 ciclos: 1 min 95 °C, 30 s 56°C, 25 s 72 °C; 10 min 72 °C, ∞ 4°C. La composición de la reacción se describe en el apartado III.A.1.

En una segunda selección se determinó la orientación del inserto *gos2::gfp::rrbcs* mediante una PCR con la combinación de cebadores *pUCGF_for* y *pUCGF_rev*, los cuales hibridan sobre el promotor *gos2* y sobre el vector, respectivamente, generando un producto de 260 pb para aquellos clones con el inserto orientado en antisentido. La orientación final del gen de selección, *Hind* III/*rrbcs-gfp-gos2/Bam*H I/*Kpn* I/*Hind* III, permitirá el subclonaje del gen de interés, descrito en el siguiente punto. La condiciones de PCR (*Taq* ADN polimerasa, *Invitrogen*, *Life Technologies*, New York, USA) fueron: 3 min 95°C; 30 ciclos: 1 min 95 °C, 30 s 60°C, 25 s 72 °C; 10 min 72 °C, ∞ 4°C.

Construcción de los vectores finales de transformación: *pCAMBIAgfp::derbp100* y *pCAMBIA1300::derbp100*

Los vectores *pCAMBIAgfp* o *pCAMBIA1300* se linearizaron mediante una digestión con el enzima *Kpn* I (*Roche Diagnostics*, Barcelona, España) y se desfosforilaron con el enzima fosfatasa alcalina (CIP, *Roche Diagnostics*, Barcelona, España). La ligaciones de éstos con los *cassettes* de interés *pUBI::derbp100::tNOS* se realizaron con el enzima T4 ADN Ligasa (*Roche Diagnostics*, Barcelona, España). El producto de ligación se transformó mediante choque de calor en células *E. coli* XL1 Blue químicamente competentes (Método CaCl₂; III.A.9). La reacción de ligación se llevó a cabo aplicando un relación molar inserto:vector de 10:1. Para este cálculo se consideró un tamaño medio de 2500 pb para todos los insertos.

Tabla III.20: Composición de la mezcla de la reacción de ligación para la obtención de los vectores de transformación

Reactivo	Volumen [μ L]	
	<i>pCAMBIAgfp</i> (10,3 kb)	<i>pCAMBIA1300</i> (8,9 Kb)
<i>ubi:derbp100_nos</i> (<i>Kpn</i> I ^a) 90 ng/ μ L	2,5	2,5
<i>pCAMBIA</i> (<i>Kpn</i> I ^a /CIP ^b) 90 ng/ μ L	1	1
Tampón de ligación 10X	1,5	1,5
<i>T4 ADN Ligasa</i>	1	1
Agua	14	14

a) Enzima para la linearización

b) Enzima de defosforilación

La selección de los clones *pCAMBIAgfp::derbp100* se realizó mediante una PCR (*Taq* ADN polimerasa, *Invitrogen, Life Technologies, New York, USA*) con los cebadores *pUCGF_for* y *seqUBI_rev* utilizando como ADN molde una suspensión de una ufc aislada seleccionada de la placa LB-Agar. Aquellos clones con el inserto en dirección sentido generaron un producto de PCR de 500 pb. Las condiciones de PCR fueron: 3 min 95 °C; 40 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 58 °C, 30 s 72 °C; 10 min 72 °C; ∞ 4°C. La composición de la reacción se describe en el apartado III.A.1. Los clones *pCAMBIA1300::derbp100* con el inserto orientado en la dirección deseada (sentido) se seleccionaron con la combinación de cebadores *t35SKB_for* y *seqUBI_rev*. Las condiciones de PCR fueron: 3 min 95 °C; 40 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 55 °C, 2 m 30 s 72 °C; 10 min 72 °C; ∞ 4 °C. La composición de la reacción se describe en el apartado III.A.1.

III.B.2 Transformación de plantas de arroz

La transformación genética de plantas por *Agrobacterium tumefaciens* es actualmente el método más utilizado para la introducción de nuevos genes en células vegetales. La bacteria *A. tumefaciens* es un patógeno de plantas que en condiciones normales infecta plantas dicotiledóneas generando un tumor formando una herida a través de la cual la bacteria es capaz de introducir genes en la planta infectada.

Las plantas monocotiledóneas no son huéspedes de *Agrobacterium tumefaciens*, por lo que la introducción de genes en plantas de arroz no fue posible hasta más adelante cuando Hiei (*Hiei et al., 1994*) y Cheng (*Cheng et al., 1998*) elaboraron metodologías eficientes y reproducibles. El procedimiento seguido para la generación de plantas de arroz transgénicas consta de 3 procesos. El primero es la formación de callo embriogénico a partir de semillas de arroz. En la transformación de plantas monocotiledóneas, como arroz, se utiliza este tipo de material vegetal en combinación con la hormona acetosiringona (para la activación de los genes de virulencia) para una eficiente infección de *Agrobacterium* y transferencia de T-ADN. Paralelamente se debe modificar genéticamente la cepa. Mediante una transformación de células de *Agrobacterium* competentes (método CaCl_2 , III.A.9) se introduce el vector de transformación derivado de *pCAMBIA* donde el T-ADN se encuentra entre el LB (*Left Border*) y el RB (*Right Border*). El fragmento T-ADN incorpora el gen de selección y el gen de interés, cada uno con sus elementos reguladores. Finalmente en un último proceso se incuban los callos embriogénicos con *Agrobacterium* donde los genes de virulencia se activarán bajo el efecto de la hormona acetosiringona. Consecuentemente se introducirá el T-ADN al genoma de la planta. Las plantas de arroz MG utilizadas en esta tesis se generaron en el departamento de genética vegetal de IRTA, Cabrils.

Tabla III.21: Soluciones madre para la preparación de medios de cultivo

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración madre</i>	<i>Preparación</i>	<i>Disolvente</i>
Acetosirigona (Ac)	10 mM	192 mg/100 mL	Etanol 96% (v/v)
Tiamina	10 mM	10 mg/100 mL	Agua
CoCl ₂ .H ₂ O	1,7 mM	25 mg/100 mL	Agua
CuSO ₄ . 5H ₂ O	1 mM	25 mg/100 mL	Agua
FeEDTA	8,5 mM	250 mg/100 mL	Agua
<i>Reguladores de crecimiento</i>			
6-Benzylaminopurina (BA)	1 mM	113 mg/500 mL	HCl 0,5N
Ácido indol-3-acético (IAA)	1 mM	17,54 mg/100 mL	Etanol 96% (v/v)
Ácido naphthalenacético (ANA)	50 mM	9,3 mg/100 mL	Etanol 96% (v/v)
Ácido abscísico (ABA)	3,8 mM	100 mg/100 mL	NaOH 1N
Ácido 2,4-dichlorofenoxiacético (2,4-D)	50 mM	11 mg/100 mL	Etanol 96% (v/v)

Los reactivos alistados, se preparan pesando la cantidad indicada en la columna de preparación en un vaso de precipitados. Se disuelven en un volumen pequeño (aproximadamente 2-3 mL) del disolvente indicado a la columna de la derecha y finalmente se enrasan con agua destilada hasta el volumen necesario.

Medio de cultivo y placas LB + rifampicina y kanamicina

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Agar (para placas)	15 g
Volumen final	1000 mL

Autoclavar 20 min a 121 °C

Temperar el medio a T < 50°C y añadir los siguientes antibióticos:

* Rifampicina 50 mg/mL en DMSO	1 mL
* Kanamicina 50 mg/mL en agua	1 mL

Macros N6

CaCl ₂ .2H ₂ O	1,66 g
KH ₂ PO ₄	4,00 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,85 g
KNO ₃	28,30 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,63 g
Volumen final	1000 mL

Micros N6

MnSO ₄ .H ₂ O	1690 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	860 mg
H ₃ BO ₃	620 mg
KI	83 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O 1 mM	10 mL
CoCl ₂ .6H ₂ O 1,7 mM	10 mL
Volumen final	1000 mL

Medio N6 + Acetosiringona (N6 + Ac)

Preparar medio N6, líquido o sólido, y autoclavar 20 min a 121 °C.

Dejar enfriar hasta T < 50 °C y filtrar 10 mL de acetosiringona 10 mM a través de un filtro de acetato de celulosa de 0.22 µm.

Medio N6.0 (crecimiento de planta)

Preparar medio N6 sin la hormona de inducción de callo 2,4-D.

Medio N6 (inducción de callo)

Macros N6	100 mL
Micros MS	10 mL
FeEDTA MS	18,7 mL
Tiamina 10 mM	4 mL
Inositol	100 mg
Prolina	500 mg
Glutamina	500 mg
Hidrolizado de caseína	300 mg
2,4-D 50mM	18,2 mL
Sacarosa	30 g
Volumen final	1000 mL
Ajustar a pH 5,8 con NaOH 1M	
Gelrite (para medio sólido)	2,6 g
Autoclavar a 121 °C durante 20 min	

Pre-regeneración

Macros N6	100 mL
Micros MS	10 mL
FeEDTA MS	18,7 mL
Tiamina 10 mM	4 mL
Inositol	100 mg
Prolina	500 mg
Glutamina	500 mg
Hidrolizado de caseína	300 mg
BA 1mM	13,3 mL
AIA 1mM	2,85 mL
ANA 50mM	10,7 mL
Sacarosa	30 g
Volumen final	1000 mL
Ajustar a pH 5,8 con NaOH	
Gelrite (para medio sólido)	2,6 g
Autoclavar a 121 °C durante 20 min	

Después de autoclavar dejar temperar el medio a T < 50 °C y añadir en condiciones estériles 10 mL de la solución de ABA 3,8 mM filtrando a través de un filtro de acetato de celulosa de 0.22 µm.

Regeneración

Macros N6	100 mL
Micros MS	10 mL
FeEDTA MS	18,7 mL
Tiamina 10 mM	4 mL
Inositol	100 mg
Prolina	500 mg
Glutamina	500 mg
Hidrolizado de caseína	300 mg
BA 1mM	13,3 mL
AIA 1mM	2,85 mL
Sacarosa	30 g
Volumen final	1000 mL
Ajustar a pH 5,8 con NaOH	
Gelrite (para medio sólido)	2,6 g
Autoclavar a 121 °C durante 20 min	

Formación de callo embriogénico

Durante la formación de callos embriogénico es importante trabajar en condiciones estériles durante todo el proceso.

1. Pelar aproximadamente unas 70 semillas de arroz variedad Senia.
2. Seleccionar unas 60 semillas de aspecto maduro y entero.
3. Envolver las semillas con tela de lino y atarlas en forma de saco.
4. Sumergir las semillas en un vaso de precipitados estéril con 100 mL de etanol 70% (v/v) y agitar durante 1 min.
5. Decantar el etanol y sumergir las semillas en una solución de lejía 32% (v/v) y agitar exactamente durante 30 min para no dañar las semillas.
6. Lavar las semillas con agua estéril 3 veces durante un mínimo de 10 min cada vez.
7. Poner el saco sobre papel de filtro y abrir el saco con las semillas con pinzas estériles. Evitar tocar las semillas con los dedos.
8. Poner cada una de las semillas (pinzas) en un tubo de ensayo pequeño que contiene 4 mL de medio N6 sólido.
9. Germinar las semillas durante una semana a 25 °C y en oscuridad.
10. Transferir las semillas germinadas a placas N6 para inducir la formación de callo embriogénico. Aproximadamente se preparan para cada transformación 10 placas N6 de semillas germinadas.
11. Mantener las placas durante 2-3 semanas en oscuridad o hasta que el callo tenga un tamaño de hasta 1 cm de diámetro. En caso de tener el tamaño deseado en 3 semanas, transferir los callos a medio N6 fresco.

12. Los callos embriogénicos se seleccionan con una lupa y bajo campana. Los callos a seleccionar están cerca de la semilla y no alrededor de la raíz. Los nódulos embriogénicos deben tener un aspecto de bola pequeña y de un color más claro y húmedo que el resto de nódulos tal como se observa en la figura III.4.



Figura III.4: Formación de callo embriogénico después de transferir la semilla germinada a placa. Período de incubación de 3 semanas a 25 °C y en oscuridad.

13. Transferir del orden de unos 30 callos por placa N6. Para cada transformación preparar unas 10 placas de callos.
14. Mantener durante 2-4 semanas en oscuridad hasta que se proceda con la transformación.

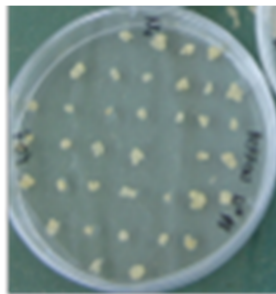


Figura III.5: Callos embriogénicos crecidos durante dos semanas después de la extracción de nódulos.

Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105

1. Sembrar una estría del glicerinado de *Agrobacterium tumefaciens* transformado sobre una placa de medio LB que contenga los antibióticos rifampicina (selección de la cepa de *A. tumefaciens* EHA105) y kanamicina (selección transformantes positivos con un vector derivado de *pCAMBIA*).
2. Incubar 16 h-20 h a 28 °C.
3. Preparar un cultivo de 50 mL en LB + rifampicina y kanamicina e incubar durante 15-20 h a 28 °C y 50 rpm.
4. Medir la OD_{550nm} de cuatro réplicas y anotar los valores.

5. Determinar el volumen necesario del segundo inóculo para obtener después de una incubación de 15 h una OD_{550nm} lo más cerca de 0,1, donde *A. tumefaciens* presenta un crecimiento óptimo y así las mejores condiciones para la transformación.

Ejemplo de cálculo:

- 1) Valor mediano de la densidad óptica del cultivo bacteriano

Mediana $OD_{550nm} = 0,39$

- 2) Cálculo del valor de ratio de duplicación (X) de *Agrobacterium* durante el tiempo de incubación

Tiempo de duplicación de *A. tumefaciens* = 1,35 h

$$X = \frac{\text{horas de cultivo}}{\text{tiempo de duplicación}}$$

$$X = \frac{15 \text{ h}}{1,35 \text{ h}} = 11,11 \text{ veces de duplicación de la bacteria}$$

- 3) Cálculo valor Z = número total de células generadas durante el tiempo de incubación

$$2^X = Z \quad 2^{11,11} = 2210,25 \text{ células bacteriana s}$$

- 4) Cálculo del volumen a inocular para obtener un cultivo con una $OD_{550nm} = 0,1$

$$V_{\text{inóculo}} = \frac{V_{\text{cultivo líquido}}}{Z}$$

$$V_{\text{inóculo}} = \frac{50 \text{ mL}}{2210,25} = 0,02 \text{ mL}$$

El $V_{\text{inóculo}} = 0,02 \text{ mL}$ es el volumen necesario para obtener una $OD_{550nm} = 0,39$ después de cultivar las bacterias 15 h. Para obtener la OD_{550nm} deseada de 0,1 después de 15 h de incubación, el volumen a inocular a un cultivo de 50 mL será el siguiente:

$$V_{OD_{550nm} = 0,1} = \frac{0,02 \text{ mL} \times 0,1}{0,39} = 5,1 \times 10^{-3} \text{ mL} = 5 \mu\text{L}$$

Para aumentar la probabilidad de obtener el cultivo con la concentración bacteriana deseada, se prepararon tres diluciones de inóculos:

- 1) X = 5 mL
- 2) 10X = 50 mL
- 3) 100 X = 500 mL

6. Incubar los tres inóculos durante 15-20 h a 28 °C y 50 rpm.

7. Calcular la OD_{550nm} para cada uno de los cultivos. El que se aproxime más a $OD_{550nm} = 0,1$ será el que se utilizará para la transformación.

Transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*

1. Dividir la suspensión de bacterias (50 mL) en dos tubos *Falcon* de 30 mL.
2. Centrifugar a 3.000 rpm durante 10 min.
3. Decantar con cuidado el sobrenadante, dejando medio residual para no perder el sedimento bacteriano.
4. Resuspender el sedimento en 50 mL de medio N6 + Ac. El compuesto fenólico Ac desencadena la transformación activando la traducción de las proteínas *vir* del plásmido Ti.
5. Repartir la suspensión final de bacterias en 4 placas *Cellstar* (60 x 15 mm) estériles.
6. A cada placa añadir la cantidad de 2-3 placas de callos embriogénicos. Muy importante: descartar aquellos callos que hayan desarrollado raíz.
7. Incubar los callos con la suspensión de bacterias durante 15 min.
8. Aspirar la suspensión de bacterias con una pipeta y escurrir los callos sobre papel de filtro estéril.
9. Transferir los nódulos de callo (aproximadamente 30 nódulos / placa) a medio N6 + Ac sólido. Para cada transformación preparar 20 placas de nódulos infectados.
10. Incubar los callos exactamente durante 3 días a 25 °C y a la oscuridad.
11. Transferir los callos a medio selectivo N6 con cefotaxime (C) y timentin (T) (para eliminar *Agrobacterium*), y higromicina (H), para aquellas transformaciones con selección positiva a resistencia a herbicida. Para los transformantes con el gen de selección *gfp*, no se añadió higromicina en el medio. Antes de transferir los callos al medio selectivo eliminar los restos de *Agrobacterium* sobre papel de filtro estéril.
12. Mantener los callos durante 2-3 semanas a 25 °C y a la oscuridad.
13. Después de 2-3 semanas repetir la transferencia a medio selectivo N6+C+T. En este punto el procedimiento se distingue en función del gen de selección utilizado:

Gen de selección *gfp*: Para las transformaciones con el gen de selección *gfp* solo se transfirieron aquellos nódulos de callos que bajo la lupa de fluorescencia se distinguían por su fluorescencia verde.

Gen de selección *hpt II*: Para la selección de los transformantes positivos se añadió en el medio el antibiótico higromicina. En este estadio se pueden observar algunos callos transformados positivamente. Los callos resistentes a higromicina empiezan a crecer y a desarrollar nódulos de color claro, mientras que el callo de abajo se necrosa.

14. Mantener durante dos semanas en oscuridad y a 25°C.
15. En este punto se distinguen claramente los callos transformados positivamente. Dependiendo del tamaño de los callos, estos se transferirán nuevamente a medio N6+C+T+H* o bien se podrán dividir para conservar una parte en medio de callo N6+C+T+H* y la otra parte para transferir a medio de pre-regeneración de planta PR+C+T+H*.

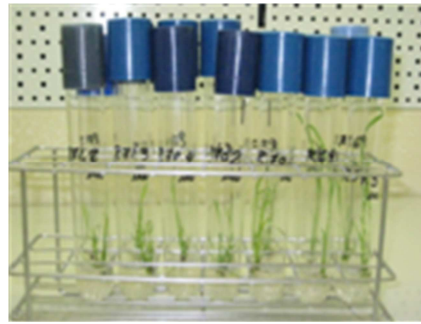


Figura III.6: Placa con medio de regeneración de planta con 4 tipos de callos diferentes. El callo verde está regenerando planta. Los callos de color claro están en fase de crecimiento y son resistentes a higromicina. El callo pequeño de color negro está necrosado y no es transgénico.

16. Los callos transferidos a medio N6 + C+T +H* se transferirán cada 2-3 semanas a medio fresco.
17. Los callos transferidos a medio PR con antibióticos es mantendrán durante un mínimo de 7 y un máximo 10 días en oscuridad.
18. Transferir los callos de PR a medio de regeneración (R) con antibióticos (C+T+H*) e incubar en un fotoperíodo de 16 h luz / 8 h oscuridad en la incubadora *Sanyo Growth Cabinet* y una temperatura de 28 °C / 22 °C, respectivamente.
19. Los callos generan planta a diferentes tiempos. A medida que vayan brotando se transferirán a tubos de cultivo *in vitro* con medio N6.0 (+ H*).
20. Finalmente se obtiene la planta *in vitro*.

*El antibiótico higromicina solo se añadió al medio para las transformaciones con construcciones que incorporan el gen de resistencia a éste.

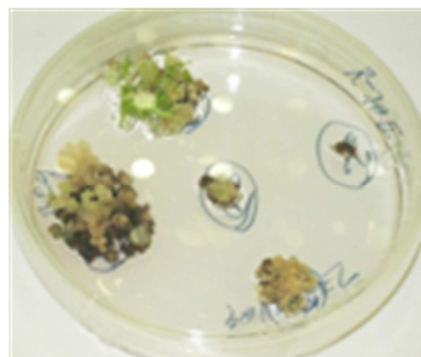


Figura III.7: Plántulas regeneradas en medio N6.0.

III.B.3 Obtención de líneas homocigotas

Aclimatación

Las plantas crecidas *in vitro* difieren fisiológicamente de aquellas crecidas en invernadero. Estas diferencias se deben básicamente a las condiciones controladas artificiales en que crece la planta. Un papel importante dentro de estas condiciones lo adquiere el medio de cultivo. Éste está compuesto con azúcares y hormonas por lo que la planta realiza poca fotosíntesis y se encuentra en un estado de desequilibrio hormonal. Además las condiciones ambientales de cultivo *in vitro* como elevada humedad, baja concentración de CO₂ y baja actividad lumínica hacen que la planta crezca en un estado de intercambio gaseoso restringido. El cultivo *in vitro* requiere condiciones de trabajo absolutamente asépticas generando un estado totalmente anormal de libre infección. Todas estas condiciones hacen que la planta se encuentre en un estado anormal, adquiriendo una anatomía distinta como p.ej. miniaturización, cutículas más delgadas, cambios fisiológicos como estomas no funcionales o hasta variaciones en los tejidos de los órganos, como la ausencia de raíces.

Para poder cultivar las plantas en condiciones atmosféricas, éstas deben someterse a un proceso de aclimatación. Los objetivos principales de la aclimatación son disminuir la capacidad epitelial y aumentar la capacidad fotosintética. Para llegar a este objetivo es necesario controlar la pérdida de agua de la planta mediante la absorción radicular y el reforzamiento foliar. En la figura III.8 se representa un esquema general del proceso de aclimatación de una planta desde su cultivo *in vitro* hasta planta adulta de invernadero.

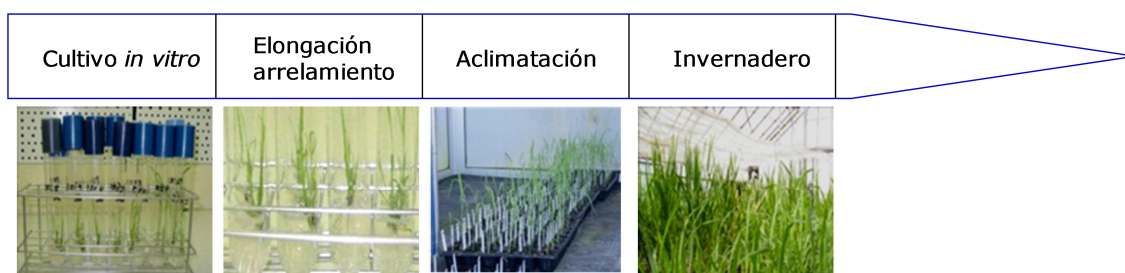


Figura III.8: Esquema de las fases de aclimatación de plantas *in vitro*.

La aclimatación se llevó a cabo en un túnel de aclimatación pulsante, ideado y construido por el Dr. Enric Melé y la Dra. Joaquina Messeguer (IRTA, Cabrils) (Figura III.9), que dispone de un sistema de apertura y cierre automático para adaptar a la planta progresivamente a las condiciones atmosféricas. Además dispone de un sistema de regulación de humedad (*fogg system*) el cual se combina con períodos de ventilación.

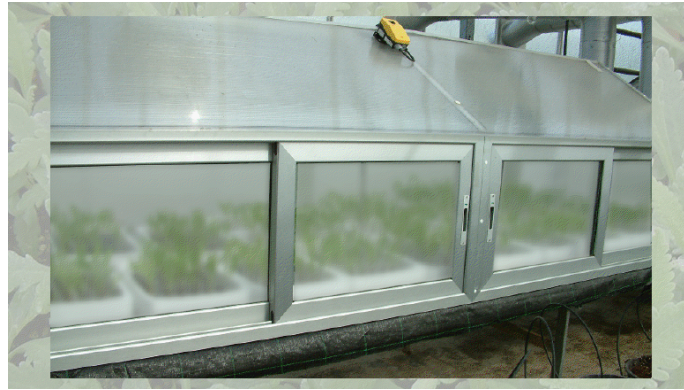


Figura III.9: Túnel de humedad pulsante para la aclimatación de plantas *in vitro* (Foto cedida por Joaquina Messeguer, IRTA, Cabrils).

Las condiciones de aclimatación de las plantas *in vitro* generadas durante esta tesis se variaron según el esquema representativo de la figura III.10. Se mantenía el túnel cerrado desde las 18 h a 9 h. Durante el día se combinaron intervalos de humedad alta (*fogg system*) durante 25 min, con 5 min de ventilación. Este proceso duraba hasta las 18 h momento en que se volvía a cerrar el túnel.

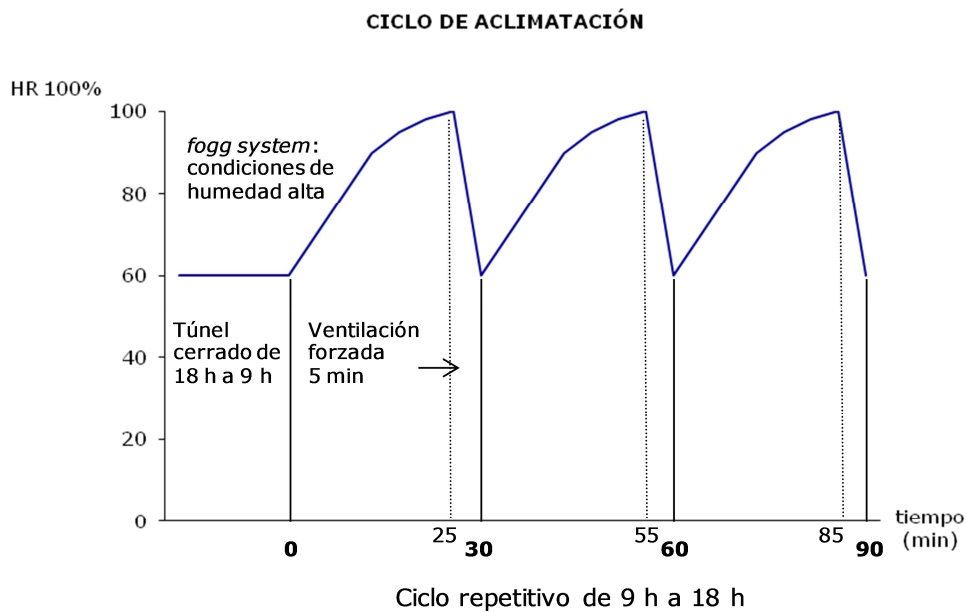


Figura III.10: Esquema del ciclo de aclimatación aplicado a la plántulas de arroz MG.

Selección de líneas homocigotas para el transgén

Las plantas obtenidas *in vitro* de la transformación por *Agrobacterium* representan la generación genética T0 y son hemicigotas para el transgén. Éstas, después de pasar por el proceso de aclimatación se cultivan en invernadero hasta su floración, autopolinización y producción de semillas. Las semillas T1 producidas por las plantas T0 son por la ley mendeliana un 50% hemicigotas (aA), 25% homocigotas (AA) y 25 % no transgénicas (aa). Con el fin de descartar las no transgénicas se sembraron las semillas T1 en medio MS con higromicina siendo fenotípicamente resistentes las semillas Aa o AA. Cada una de ellas se transfirió a invernadero para completar su ciclo hasta la floración y obtención de semilla T2. Con el objetivo de identificar las plantas homocigotas para el transgén (AA) se sembraron 24 semillas T2 de cada evento T1 en medio MS (para escoger las viables) y después en N6.0 + higromicina. Se escogieron aquellos eventos que sus 24 semillas T2 presentaban resistencia (figura III.11). El procedimiento para la obtención de líneas homocigotas de plantas con el gen de selección de *gfp* se realizó igual que el proceso descrito excepto en la selección de las semillas y plantas, la cuales se analizaron bajo fluorescencia.

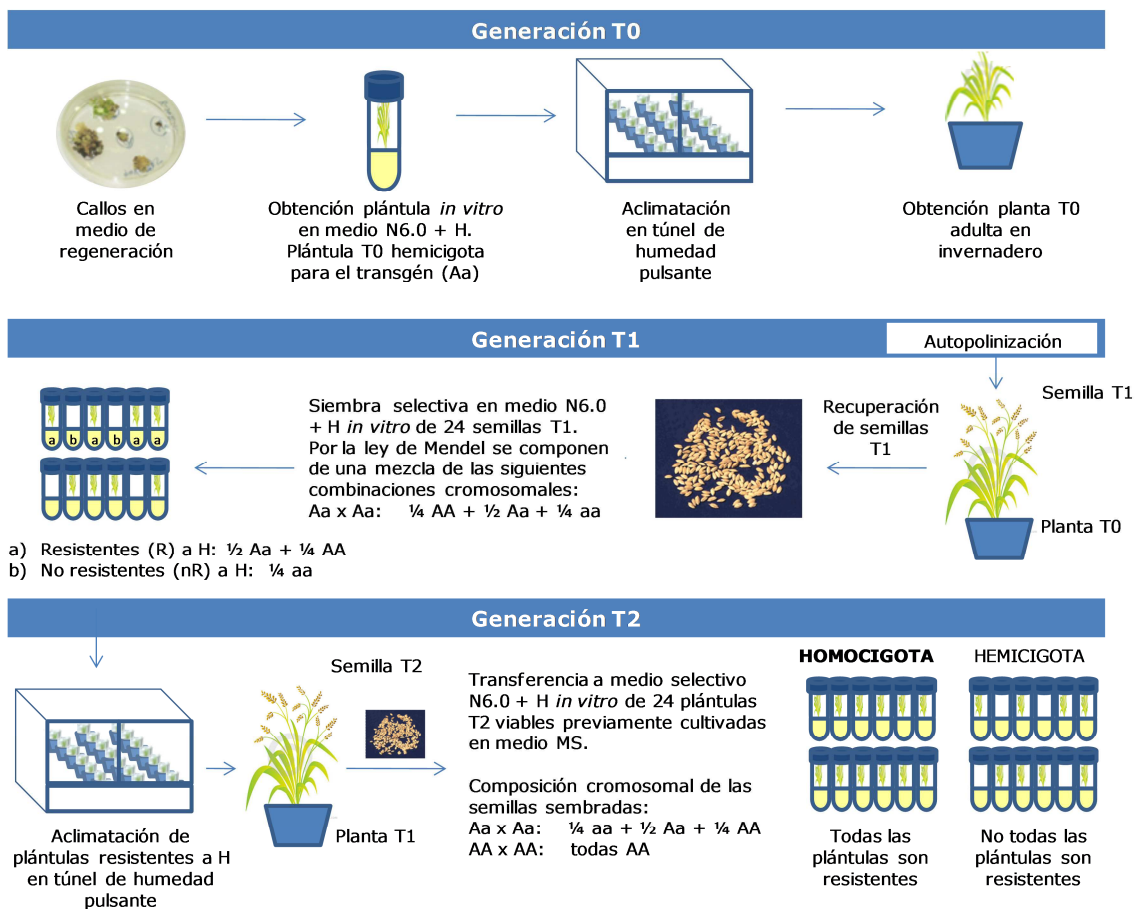


Figura III.11: Esquema del proceso de selección de plantas MG homocigotas

III.C Análisis de plantas de arroz transgénico

III.C.1 Cultivo de material vegetal MG

Mantenimiento y conservación de callos transgénicos

Los callos transgénicos obtenidos de las transformaciones se mantuvieron en medio N6 (III.B.2). Para mantenerlos a largo plazo se transfirieron a medio fresco periódicamente una vez cada 3-4 semanas. Los callos con el gen de selección *gfp* se seleccionaban por su emisión de fluorescencia durante las 3-4 primeras transferencias. Después de este período el material vegetal ya se consideró transgénico y no se seleccionó bajo la lupa fluorescente. Los callos transgénicos con el gen de resistencia a higromicina se conservaron en medio N6 suplementado con higromicina (40 mg/L).

Cultivo de plántulas de arroz MG *in vitro*

Las semillas para el cultivo *in vitro* de plántulas se esterilizaron según el procedimiento descrito en III.B.2. Éstas se sumergieron en medio estéril MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con un 3% (p/v) de sacarosa y un 0,7% (p/v) de agar. Las semillas se cultivaron en una cámara de cultivo con un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad y una temperatura 28 °C - 8 h/22 °C - 8 h bajo una lámpara fluorescente *Sylvania Cool White*. Las plántulas se cultivaron simultáneamente durante un período de 2 semanas hasta llegar al estadio vegetativo (V3), se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C. Las plántulas *in vitro* se cultivaron únicamente para su posterior análisis transcriptómico mediante la técnica del *microarray* o por RT-qPCR. Cada replicado se componía de 10 plántulas de dos hojas y para cada evento se muestrearon tres replicados biológicos.

Cultivo de plántulas de arroz MG en invernadero

Para ensayos de resistencia, extracción de proteína y extracción de ADN genómico se cultivaron plantas en invernadero sin necesidad de la esterilización de las semillas. Para cada evento se sumergieron en sustrato de arroz del orden de 12 a 15 semillas por maceta.

Composición sustrato de arroz

Turba Floratorf	225 L
Vermiculita n°3	125 L
Co ₃ Ca	250 g
Osmocote	375 g

Las plantas se cultivaron durante 2 semanas en condiciones de invernadero bajo lámparas *Philips Son-t Agro* (400 W; Flujo luminoso 55000 lm y rendimiento 130 lm/W) y a una temperatura diurna de 28 °C y nocturna de 20 °C con un fotoperíodo de 14 h/10 h respectivamente. Las plantas en estado vegetativo V3 se utilizaron inmediatamente para los ensayos de resistencia o para su conservación a -80 °C previa congelación con nitrógeno líquido.

III.C.2 Análisis de ADN genómico

Extracción de ADN genómico de planta. Método CTAB

La preparación de ADN genómico por el método del CTAB (*Panreac Química S.L.U.*, Barcelona, España) ha demostrado ser un método de extracción muy efectivo y con un rendimiento muy alto (Dellaporta *et al.*, 1983; Murray y Thompson, 1980). En esta tesis se utilizó esta técnica para la extracción de ADN genómico de plantas de arroz MG de la generación T2 para la detección del transgén mediante *Southern Blot*.

CTAB solución de extracción, 65 °C

CTAB	2% (p/v)
Tris HCl pH 8	100 mM
EDTA pH 8	20 mM
NaCl	1,4 M

Conservar a temperatura ambiente.

Inmediatamente antes de utilizar añadir 2% (v/v) de 2-mercaptoetanol.

CTAB/NaCl, 65 °C

Disolver 4,1 g NaCl en 80 mL de agua y lentamente añadir 10 g de CTAB bajo agitación. Si fuera necesario calentar a 65 °C. Ajustar el volumen a 100 mL.

CTAB solución de precipitación

CTAB	1% (p/v)
Tris HCl pH 8	50 mM
EDTA pH 8	10 mM

Tampón High-salt TE

Tris HCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	0,1 mM
NaCl	1 M

Conservar a temperatura ambiente.

Tampón TE

Tris HCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

1. Homogeneizar 1 gramo de hoja de arroz en nitrógeno líquido en un tubo córex hasta pulverizar.
2. Añadir a 4 mL de solución CTAB de extracción 80 μ L de β -mercaptoetanol.
3. Mezclar la solución preparada en el punto 2 con la muestra homogeneizada hasta obtener una suspensión homogénea.
4. Añadir la ARNsa (20 μ L por 4mL, *Roche Diagnostics*, Barcelona, España) y la proteinasa K (40 μ L por 4mL, *Roche Diagnostics*, Barcelona, España) e incubar 60 min a 65 °C mezclando de vez en cuando.
5. Añadir 1 volumen de 25:24:1 fenol:cloroformo:isoamylalcohol.
6. Mezclar invirtiendo el tubo y centrifugar 5 min a 10.000 rpm y a 4 °C.
7. Recuperar la fase acuosa (fase superior).
8. Añadir 0,1 volúmenes de la solución CTAB/NaCl previamente calentada a 65 °C y mezclar invirtiendo el tubo.
9. Repetir los pasos 4 y 5.
10. Añadir exactamente 1 volumen de solución CTAB de precipitación. Si no se observa ningún precipitado, incubar 30 min a 65 °C.
11. Centrifugar 30 min a 13.000 rpm y a 4 °C, y resuspender el sedimento en 500 μ L en tampón *High-Salt* TE. Si el sedimento no se disuelve bien, incubar 15 min a 65 °C. Repetir hasta que todo o casi todo el sedimento esté en solución.
12. Añadir 0,6 volúmenes de isopropanol, mezclar bien y centrifugar 30 min a 13.000 rpm y 4 °C.
13. Lavar el sedimento con 1 mL 80% (v/v) etanol y centrifugar 10 min a 13.000 rpm.
14. Retirar el sobrenadante con una pipeta *pasteur* estirada.
15. Secar el sedimento a 37 °C durante 10 min.
16. Resuspender en 100 μ L de agua o tampón TE.
17. Cuantificar la solución de ADN en el espectrofotómetro *NanoDrop D100*.

Análisis Southern Blot

La técnica del *Southern blot* fue diseñada por Edwin M. Southern en el año 1975 y permite la detección de secuencias determinadas de ADN dentro de una mezcla de fragmento de ADN. La técnica se basa en la separación de la mezcla de ADN por gel de agarosa (III.A.3), la transferencia a una membrana de *nylon* y finalmente la detección del fragmento de interés mediante hibridación específica con una sonda marcada. Originalmente EM. Southern diseñó el marcaje de la sonda con el isótopo de fósforo radioactivo ^{32}P . La síntesis de la sonda se diseñó para ser construida mediante una reacción de PCR con α - ^{32}P -dATP. Actualmente existen una gran variedad de sistemas no radioactivos basados en reacciones enzimáticas como el

sistema *AlkPhos Direct Labeling and Detection System with CDP-Star* (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia) aplicado en esta tesis. Este sistema se basa en el marcaje de la sonda con la enzima alcalina fosfatasa, la cual degradará el sustrato dioxetan emitiendo quimioluminiscencia.

La técnica del *Southern Blot* se aplicó para determinar el número de copias de transgén inseridas en el genoma de los diferentes eventos de las plantas de arroz transformadas con *derbp100*. Para ello se diseñó una sonda común para todos ellos, la cual corresponde a una secuencia de 406 pb que empieza en el intrón y termina sobre la secuencia del monómero *bp134*. Ésta se obtuvo por PCR convencional y con los oligonucleótidos *SouthUBI_for* y *SouthBP_rev*.

Preparación de la sonda

1. Generar el producto de PCR con los cebadores *SouthUBI_for* y *SouthBP_rev*. El amplicón que se genera es de 406 pb. Como ADN molde se utilizó el vector *pCAMBIA1300:bp214*, ya que solo tiene una copia de *bp134*.
2. Comprobar por electroforesis en gel de agarosa 1,5% (p/v) que la reacción de PCR ha generado un producto único.
3. Purificar el producto de PCR y determinar la concentración y pureza mediante el espectrofotómetro *NanoDrop D100*. La concentración de sales dentro de la solución de ADN no debe superar 50 mM.
4. Diluir 20 μL de la solución *cross-linker* con 80 μL de agua (conservar entre 2-8 $^{\circ}\text{C}$).
5. Ajustar la concentración de la solución de ADN a 10 ng/ μL .
6. Desnaturalizar el ADN incubando la solución 5 min a 95 $^{\circ}\text{C}$.
7. Inmediatamente poner la solución sobre hielo, incubar 5 min y centrifugar brevemente.
8. Añadir 10 μL del tampón de reacción y mezclar rápida- e intensamente. IMPORTANTE: Continuar trabajando sobre hielo.
9. Añadir 2 μL del reactivo de marcaje. Mezclar rápida- e intensamente.
10. Añadir 10 μL de la solución *cross-linker*, preparada en el punto 4. Mezclar rápida- e intensamente y centrifugar.
11. Incubar la reacción durante 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$.
12. La solución de sonda marcada se puede conservar durante 2 h en frío. Para conservarla durante más tiempo, diluir con 1 volumen de glicerol para obtener una solución de 50% (v/v). Esta solución es puede conservar a -20 $^{\circ}\text{C}$.

Con este protocolo se obtienen 32 μL de sonda marcada a una concentración 3,12 ng/ μL .

Preparación del gelSolución de depurar 0,125 M HCl

HCl	11 mL
Agua	989 mL

Se conserva hasta a 1 mes a temperatura ambiente.

Tampón de desnaturalización

NaCl	87,66 g
NaOH	20 g

Añadir aproximadamente 800 mL de agua destilada. Mezclar hasta que se disuelvan los reactivos. Ajustar el volumen a 1000 mL.

Se conserva hasta 3 meses a TA.

Tampón de neutralización

NaCl	87,66 g
Tris base	60,5 g

Añadir aproximadamente 800 mL de agua destilada. Mezclar hasta que se disuelvan los reactivos.

Ajustar el pH a 7,5 con HCl concentrado.

Ajustar el volumen a 1000 mL.

Se conserva hasta a 3 meses a TA.

1. Extraer el ADN genómico (20-25 μg , volumen de 50 μL) por el método de CTAB y digerir con las enzimas *Hind* III y *Eco* R1.
2. Separar el ADN digerido en un gel de agarosa al 1% (p/v). Teñir con *Sybr Safe* (Invitrogen, Life Technologies, New York, USA).
3. Depurar el gel en una solución de HCl 0,125 M. Agitar durante 10 min. Durante este tiempo el colorante azul de bromo fenol cambiará a color amarillo.
4. Desnaturalizar el ADN sumergiendo el gel en tampón de desnaturalización. Incubar 30 min en agitación. Durante este tiempo el colorante azul de bromo fenol recuperará su color inicial.
5. Neutralizar sumergiendo el gel en tampón de neutralización. Incubar 30 min en agitación.
6. Continuar con la transferencia por capilaridad.

Transferencia por capilaridadTampón de transferencia 20x SSC

Citrato de Tri-Sodio	88,23 g
NaCl	175,32 g

Añadir unos 800 mL de agua.

Agitar hasta que se disuelvan los reactivos. Comprobar que el pH esté entre 7-8.

Ajustar el volumen a 1000 mL.

Se conserva hasta 3 meses a TA.

Tampón de transferencia 2 X SSC

Diluir 1:10 el tampón 20 X SSC

1. Recortar un trozo de membrana de *Nylon Hybond-N⁺* de la medida del gel (6 x 9 cm para un gel pequeño).
2. Llenar hasta la mitad un recipiente de tamaño adecuado para el gel con tampón 20 X SSC. Para geles pequeños aproximadamente 20x20 cm y para geles grandes 24x24 cm.
3. Montar una plataforma enzima del recipiente y cubrir con 1 hoja de papel *Whatmann* 3MM. Los extremos del papel *Whatmann* deben estar sumergidos en el tampón. El tampón subirá por capilaridad hasta empapar los papeles (figura III.12).
4. Poner el gel sobre la el papel de *Whatmann* 3MM. Evitar las burbujas de aire. Enmarcar el gel con *parafilmTM* para evitar que los papeles de arriba absorban el tampón.
5. Poner la membrana *Hybond-N⁺* sobre el gel. Una vez situada no moverla.
6. Poner 3 papeles *Whatmann* 3MM del tamaño del gel encima de la membrana y mojarlos con tampón. Pasar un rodillo por encima para asurar el contacto con la membrana.
7. Poner un montón de papeles absorbentes de unos 5 cm de altura y del tamaño del gel.
8. Finalmente, situar una placa de vidrio y un peso que no supere 750 g encima del montaje.
9. Envolver todo el montaje con papel de film para evitar que se evapore el tampón de transferencia.
10. Transferir O/N.
11. Retirar los papeles absorbentes y de filtro. Marcar con un lápiz la orientación del gel.
12. No lavar la membrana antes de la fijación.
13. Fijar a 80 °C durante 2 h.
14. Lavar la membrana con tampón 2 X SSC.
15. Utilizar el blot inmediatamente. Continuar con la hibridación.



Figura III.12: Representación esquemática de la construcción para la transferencia por capilaridad del gel de agarosa a la membrana *Hybond-N⁺*.

HibridaciónTampón de hibridación

NaCl	2,92 g
Reactivo de bloqueo*	4 g

Ajustar el volumen a 100 mL

*Añadir lentamente y en agitación.

Agitar durante 1-2 h. Hacer alícuotas y conservar a -20 °C.

Para un gel pequeño se necesitan aproximadamente 15 mL.

Tampón lavado primario

Urea	120 g
SDS	1 g
NaH ₂ PO ₄ 0,5 M pH7:	100 mL
NaCl	8,7 g
1M MgCl ₂	1 mL
Reactivo de bloqueo	2 g

Ajustar el volumen a 1000 mL

Se conserva hasta a 1 semana entre 2-8°C. No recalentar.

Tampón de lavado secundario 20X

Tris Base	121 g
NaCl	112 g

Ajustar el pH a 10.

Ajustar el volumen a 1000 mL.

Se conserva entre 2-8 °C hasta 4 meses.

Tampón de lavado secundario 1X (1 Litro)

Tampón secundario 20X	5 mL
MgCl ₂ 1M	2 mL

Ajustar el volumen a 100 mL.

Utilizar el tampón al momento, no se puede conservar.

1. Precalear el volumen necesario del tampón de hibridación a 65 °C* (0,25 mL/cm²). *La temperatura de hibridación se ajustará para cada sonda.
2. Sumergir el blot en el tampón y prehibridar durante 15 min y a 65 °C en agitación (60 rpm).
3. Retirar una alícuota del tampón de hibridación y añadir la sonda marcada. Añadir entre 5-10 ng de sonda por mL de tampón. Para un gel pequeño preparar el volumen descrito al apartado **preparación de la sonda**. Devolver el tampón con la sonda al blot.
4. Hibridar durante 15-18 h a 65 °C y en agitación (60 rpm).

Post-hibridación

1. Pre-calentar el tampón de lavado primario a 65 °C. Utilizar en exceso, aproximadamente 2-5 mL/cm².
2. Sumergir el blot en tampón y lavar durante 10 min a 65 °C en agitación.
3. Repetir el lavado durante 10 min en tampón primario fresco y calentado a 65 °C.
4. Transferir el blot en un recipiente limpio y añadir un exceso de tampón secundario. Agitar 5 min a TA.
5. Repetir el lavado con tampón secundario. (Nota: si es necesario, el blot es puede dejar hasta 30 min en el tampón).

Nota: la temperatura de post-hibridación será la misma que la de hibridación.

Detección

1. Eliminar el exceso de tampón secundario del blot y colocarlo en papel limpio no absorbente (p.ej.: *parafilm*TM)
2. Pipetear el reactivo de detección *CDP-star* (30-40 µL/cm²) (para un gel pequeño unos 2,4 mL) y dejar incubar 2-5 min. Evitar contaminaciones separando una alícuota en condiciones estériles del reactivo *CDP-star* con antelación.
3. Eliminar el reactivo *CDP-star* del blot.
4. Analizar con la cámara de quimioluminiscencia.

III.C.3 Análisis transcriptómico de plantas de arroz MG

Extracción de ARN mensajero

Para la extracción de ARN de hoja y callo transgénicos se aplicó el método del *Trizol*[®] (*Invitrogen, Life Technologies, New York, USA*). Este reactivo está compuesto de fenol e isotiocianato de guanidina (en mono-fase) cuya aplicación fue descrita por Chomczynski y Sacchi (1987). Durante la homogenización y lisis de la muestra el reactivo mantiene la integridad del ARN mientras que disuelve los componentes celulares. El ARN se mantiene en solución y proteínas y otros componentes celulares se eliminarán de la muestra con la adición de fenol. El rendimiento de este método es muy elevado y la calidad del ARN resultante es muy elevada con valores $A_{260}/A_{280} > 2$. El ARN extraído por este método se utilizó para la generación de ADNc, qPCR y análisis de expresión por *microarray*.

Extracción de hoja de arroz

Como material de partida se utilizaron aproximadamente 400 mg de hojas de arroz, correspondientes a 10 plántulas en estadio V3 crecidas *in vitro*.

1. Poner la muestra en un tubo córex frío y homogeneizar la muestra con nitrógeno líquido hasta su pulverización (aproximadamente 10 min).
2. Añadir 4 mL de Trizol (1 mL por cada 100 mg de muestra) y mezclar durante 1-2 min más.
3. Dejar reponer 10 min a TA para que se deshaga el homogeneizado.
4. Transferir la muestra en microtubos de 1,5 mL.
5. Centrifugar a 8.000 rpm a 4 °C y durante 10 min. Recuperar el sobrenadante (SN) (para eliminar los restos de tejido vegetal) en un microtubo de 1,5 mL siliconizado.
6. Incubar 5 min a TA (para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos).
7. Añadir 0,2 mL de cloroformo por 1 mL de Trizol y mezclar bien durante 15 s.
8. Incubar 3 min a TA.
9. Centrifugar a 10.000 rpm y a 4 °C durante 15 min.
10. Transferir la fase acuosa a un microtubo de 2 mL (la fase acuosa, corresponde a la superior y es aproximadamente un 60% del volumen inicial de *Trizol*). Poner la fase acuosa rápidamente en hielo.
11. Precipitar añadiendo un volumen de isopropanol. Mezclar suavemente invirtiendo el tubo y dejarlo durante 30 min en hielo.
12. Centrifugar a 12.000 rpm y a 4 °C durante 10 min.
13. Eliminar el SN.
14. Lavar el ARN sedimentado con 1 mL de etanol 75% (v/v), centrifugar 12.000 rpm y 4 °C durante 10 min y recuperar el SN.
15. Secar el sedimento durante 5 min a 37 °C.
16. Añadir 500 µL de agua y resuspender con pipeta. En este paso juntar el contenido de 2 tubos para concentrar las muestras.
17. Incubar unas horas en hielo para precipitar los polisacáridos (2 h).
18. Centrifugar a 13.000 rpm y a 4 °C durante 20 min.
19. Transferir el SN a otro tubo.
20. Repetir la precipitación con 10% (v/v) 3 M acetato sódico y 1 volumen de isopropanol. Precipitar durante una hora en gel o toda la noche a -20 °C.
21. Centrifugar a 13.000 rpm y 4 °C durante 40 min.
22. Lavar el ARN sedimentado con 1 mL de etanol 75% (v/v). Centrifugar 13.000 rpm y 4 °C durante 10 min.
23. Eliminar el SN.
24. Secar el ARN durante 5 min a 37 °C.

25. Resuspender con 100 μL de agua.
 - a. Resuspender con vortex durante 2 min.
 - b. Incubar a 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min.
26. Analizar la cantidad y calidad de ARN al espectrofotómetro *NanoDrop D100*.

Extracción de callo de arroz

El proceso de extracción de ARN de callo arroz es en los pasos iniciales equivalente al de extracción de hoja. En este caso la cantidad de partida es de 100 mg. A partir del punto 10 proseguir de la siguiente manera:

11. Precipitar añadiendo 0,1 volúmenes de NaOAc-Glicógeno (1 μL de Glicógeno + 99 μL de NaOAc pH 5,2 3 M). Mezclar bien.
12. Precipitar añadiendo 1 volumen de isopropanol.
13. Precipitar toda la noche a -20 $^{\circ}\text{C}$.
14. Centrifugar a 13.000 rpm y 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 40 min.
15. Lavar el ARN sedimento con 1 mL de etanol 75% (v/v). Centrifugar 13.000 rpm y 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min.
16. Eliminar el SN.
17. Secar el sedimento durante 5 min a 37 $^{\circ}\text{C}$.
18. Resuspender con 100 μL de agua.
 - a. Resuspender con vórtex durante 2 min.
 - b. Incubar a 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min.
19. Analizar la cantidad y calidad de ARN al espectrofotómetro *NanoDrop D100*.

Tratamiento con ADNasa

Para los análisis de expresión con muestras de ADNc es necesario previamente y antes de realizar la reacción de retrotranscripción tratar la muestra de ARN con ADNasa. La eliminación del ADN es necesaria para obtener resultados fiables de expresión.

Dependiendo de la concentración de la solución de ARN se aplicaron dos tratamientos distintos, el rutinario o el riguroso.

Tratamiento rutinario: Solución de ARN < 200 ng/ μL .

Tratamiento riguroso: Solución de ARN > 200 ng/ μL .

El volumen de la mezcla de reacción siempre fue 50 μL y se procedió de la siguiente manera:

1. Añadir a la muestra de ARN 0,1 volúmenes del tampón 10X Turbo ADNasa.
2. Tratamiento rutinario: Añadir 1 μL TURBO ADNasa e incubar 30 min a 37 °C.
3. Tratamiento riguroso: Añadir 1 μL TURBO ADNasa e incubar 30min a 37 °C, repetir el proceso (1 μL TURBO ADNasa; 37 °C 30 min).
4. Añadir el reactivo de inactivación de ADNasa:
Tratamiento rutinario: 0,1 volúmenes.
Tratamiento riguroso: 0,2 volúmenes.
5. Mezclar e incubar 2 min a TA mezclando 2-3 veces durante la incubación.
6. Centrifugar a 10.000 rpm durante 1 min y 30 s y transferir la solución de ARN a un microtubo nuevo.
7. Analizar la cantidad y calidad de ARN al espectrofotómetro *NanoDrop D100*.

Transcripción reversa. Obtención del ADNc.

El ADNc se obtuvo a partir de la técnica de la retrotranscripción (RT). La reacción se realizó a partir de las muestras previamente tratadas con ADNasa (*Ambion Life Technologies*, New York, USA). Se utilizaron 50 U de *Multiscribe Reverse Transcriptase* (Multiscribe RT) (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) y *Random Hexamer Primers*, estos son oligodesoxiribonucleótidos aleatorios que se utilizan como cebadores en las reacciones de RT y permiten amplificar toda la población de ARN.

Las reacciones de retrotranscripción se prepararon en tubos de 200 μL y con 2 μg de ARN tratado (10 μL de 200 ng/ μL).

Tabla III.22: Reactivos para una reacción de retrotranscripción

Reactivo	Conc. Madre	Conc. Final	V [μL /reacción]
Tampón RT	10X	1x	2
dNTPs	100 mM	4 mM	0,8
Cebadores hexámeros azar	10X	1X	2
ARN ng/ μL	200	100	10
Agua			5,2

Tabla III.23: Condiciones del termociclador para una reacción retrotranscripción

T [°C]	tiempo	Objetivo
25	10 min	Incubación cebadores hexámeros
37	120 min	Retrotranscripción
95	5 min	Inactivación enzima

Análisis de expresión por qPCR

El método de la qPCR es actualmente una técnica muy común para el análisis de expresión génica, así como para la validación de *microarrays*. Esta técnica se utilizó para ambas finalidades. Todas ellas se llevaron a cabo con la química del *SYBR Green I* presentado en el apartado III.A.1. En los ensayos de expresión se deben utilizar como mínimo 2 o 3 genes como controles endógenos para poder normalizar los resultados obtenidos (Vandesompele *et al.*, 2002). En este caso se utilizaron 3 controles endógenos correspondientes a los genes: *18S* ribosomal, *β -actina* y al factor de elongación *ef-1 α* .

Análisis global de transcriptoma mediante *microarray*

Un *microarray* de ADN consiste en un conjunto de pequeños fragmentos de ADN conocidos, que suelen representar un gen individual, depositados sobre una superficie sólida que puede ser de vidrio, plástico o silicona; unidos por enlaces covalentes a la matriz química. Estos fragmentos de ADN son sondas, de las cuales se pueden colocar miles en un mismo ensayo de *microarray*. Esta tecnología se basa en la hibridación de una muestra que puede ser de ADN o ARN marcados, con las sondas dispuestas en el soporte. La hibridación ARN-sonda, emite una señal de fluorescencia que permite detectar la presencia y la cantidad de una secuencia conocida en la muestra.

El sistema de *microarray* utilizado se basa en la tecnología de la síntesis de sondas *in situ* de la casa comercial *Affymetrix*. Las sondas utilizadas en *GeneChip® Rice Genome Array* permiten la hibridación de un total de 51.279 transcritos de la especie *Oryza sativa*. Concretamente permite la detección de 48.564 transcritos de la variedad *japonica* y 1.260 de la variedad *indica*. El diseño del *array* utilizado está basado en la información disponible en *UniGene*, *GenBank mRNAs* y en las 59.712 predicciones de genes de *The Institute for Genomic Research (TIGR)*.

Los ensayos de *microarray* se realizaron en la Unidad de Genómica, Fundación Parque Científico de Madrid bajo la supervisión de Jesús García Cantalejo. La mezcla de ARN a analizar se marcó previamente con biotina y se sometió a la hibridación con el *microarray*. El ARN hibridado en el soporte se trató con el colorante estreptavidina el cual emite fluorescencia a 570 nm. La fluorescencia emitida por la unión específica sonda-ARN es proporcional al número de copias del transcrito en concreto presentes en la muestra. La comparación de la fluorescencia emitida por dos muestras hibridadas en paralelo permitió la determinación de la sobre- o infra-expresión de los genes analizados.

Herramientas bioinformáticas de análisis de expresión de genes

Microarray

Los valores de fluorescencia obtenidos de la hibridación del *microarray* se procesaron para obtener el nivel de expresión de cada gen de la muestra analizada. Para ellos se utilizó el programa *Robust Multi-array Average* (RMA) el cual incluye una corrección del sonido de fondo, la transformación a escala \log_2 y la normalización por cuantiles (Irizarry *et al.*, 2003). La comparación de las muestras se realizó mediante el análisis estadístico *t-Student* y la aplicación del factor de las fluorescencias de las dos muestras para un mismo transcrito. Este último factor permite determinar si el gen analizado se muestra inducido o reprimido en la muestra problema respecto a la de referencia (en esta tesis siempre se aplicó la comparación planta MG vs. no-MG). Adicionalmente se aplicó el test de corrección múltiple Benjamini y Hochberg *False discovery Rate* (FDR) para evitar la generación de falsos positivos.

RT-qPCR

La comparación del nivel de expresión de un mismo gen de dos muestras se llevó a cabo mediante el programa *Genex v.4.3.1 (MultiDAnalyses)*. Este permite la corrección por la eficiencia de cada gen, la normalización con los controles endógenos y el análisis estadístico para la comparación entre la muestra problema y la de referencia. La determinación de la eficiencia de amplificación de un gen y la obtención del valor Ct del mismo gen en la muestra problema se describe en el apartado III.A.1.

III.C.4 Análisis de actividad antibacteriana

Extracción de proteína total de material vegetal transgénico

La extracción de proteínas celulares comienza siempre con una ruptura celular o lisis. Los métodos más utilizados se basan esencialmente en la homogenización de los tejidos por medio de diferentes procedimientos físicos y/o químicos. Uno de los métodos físicos, y aplicado en esta tesis, es la disrupción mediante la homogenización del tejido con nitrógeno líquido. De esta forma se obtiene una lisis celular total obteniéndose lo que se denomina extracto crudo. Los objetivos a lograr en esta etapa son maximizar la liberación de las proteínas de interés, evitando la degradación térmica o las alteraciones secundarias por oxidación o proteólisis. Dependiendo del objetivo del análisis proteico es importante escoger el tampón de extracción adecuado para el ensayo. Las soluciones de extracción de proteínas están compuestas de un tampón para mantener el pH de la solución (variaciones de pH pueden favorecer la degradación de las proteínas), de sales (p.ej. NaCl) para ajustar la fuerza iónica y favorecer la

solubilidad de las proteínas en el medio y agentes quelantes como EDTA para captar iones divalentes esenciales para la actividad de las proteasas. Adicionalmente se añade un detergente para favorecer la solubilización de proteínas de membrana. Existen varios tipos de detergentes que se clasifican por su carga iónica, siendo éstos iónicos, no iónicos o una mezcla de los dos, los denominados *zwitteriónicos*. Dependiendo del objetivo de la extracción de proteínas totales se aplicará un detergente u otro. En caso de querer mantener la estructura nativa de las proteínas se utilizará un detergente no iónico o *zwitteriónico* ya que los detergentes iónicos desnaturalizan las proteínas de forma irreversible. En esta tesis se ha utilizado el detergente no iónico Tritón-X-100 para mantener la actividad de los péptidos transgénicos. Finalmente otro componente importante a añadir a la solución de extracción son los inhibidores de proteasas para evitar la degradación por proteólisis. El material vegetal transgénico analizado en esta tesis fue hoja de planta arroz MG crecida invernadero.

Inhibidores de proteasas 10X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Reconstituir la mezcla comercial liofilizada en 10 mL de agua MilliQ para obtener una solución 10X. Alicuotar y conservar a -20 °C.

Tampón de extracción

Tris HCl 500 mM pH 6,0	1 mL
EDTA 10 mM	1 mL
NaCl 1 M	1 mL
Tritón X-100 10% (v/v)	0,1 mL
Agua	6,9 mL

Para cada extracción y antes de empezar con la preparación del material añadir 10 μ L de la solución de inhibidores de proteasas por mililitro de tampón de extracción.

1. Homogeneizar 2 gramos de hoja crecida en invernadero con N₂-Líquido en un tubo córex o mortero hasta que la muestra esté pulverizada (aproximadamente 10 min).
2. Añadir a la muestra 10 mL tampón de extracción y homogeneizar la suspensión.
3. Transferir la suspensión a un tubo *Falcon* de 15 mL.
4. Incubar la muestra 30 min sobre hielo y mezclar periódicamente cada 5-10 min invirtiendo el tubo.
5. Centrifugar 20 min a 10.000 rpm y 4 °C para sedimentar el material insoluble.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y repetir la centrifugación.
7. Recuperar el sobrenadante y conservar una alícuota de 50 μ L para la cuantificación por el método de BRADFORD.
8. Filtrar la solución de extracto proteico crudo a través de filtro de 0,22 μ m de acetato de celulosa en condiciones estériles.

9. Alicuotar la solución en volúmenes de 100-200 μL en microtubos estériles y conservar a -80 $^{\circ}\text{C}$. Evitar congelar y descongelar las soluciones proteicas.

Cuantificación de proteínas por el método Bradford

La cuantificación de proteínas por el método Bradford (Bradford, 1976) se basa en la formación de un complejo entre el colorante, *Brilliant Blue G*, y las proteínas en solución. El complejo proteína-colorante desplaza el máximo de absorción de la longitud de onda 465 nm a 595 nm siendo la absorción proporcional a la cantidad de proteína. Para la cuantificación se requiere una recta patrón la cual se construye con una serie de diluciones de concentración conocida de BSA (*Bovine Serum Albumin*). La linealidad de la recta patrón se mantiene en el rango de 0 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El procedimiento seguido para la cuantificación de los extractos proteicos crudos fue el siguiente:

1. Preparar en un matraz de 100 mL una solución inicial de BSA de 1 mg/mL. (100 mg en 100 mL de agua). Filtrar la solución a través de un filtro de 0,45 μm y alicuotar para su conservación a -20 $^{\circ}\text{C}$. Diluir la solución madre a 0,1 mg/mL para la construcción de la recta patrón según las diluciones mostradas en la tabla III.24.

Tabla III.24: Concentraciones y volúmenes necesarios para la construcción de la recta patrón con BSA

Concentración final [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Volumen BSA 0,1 mg/mL [μL]	Volumen Tris HCl 0,1 M pH 8 [μL]
0	0	1000
1	10	990
3	30	970
5	50	950
7	70	930
10	100	900

2. Mezclar cada una de las diluciones con 1 volumen de reactivo *Bradford* e incubar durante 10 min para que se forme el complejo proteína-colorante.
3. Medir la absorbancia con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.
4. Construir la recta patrón con las concentraciones y las absorbancias. La ecuación de regresión relaciona de proporcionalmente la concentración de proteínas en solución y la absorbancia del complejo (figura III.13).

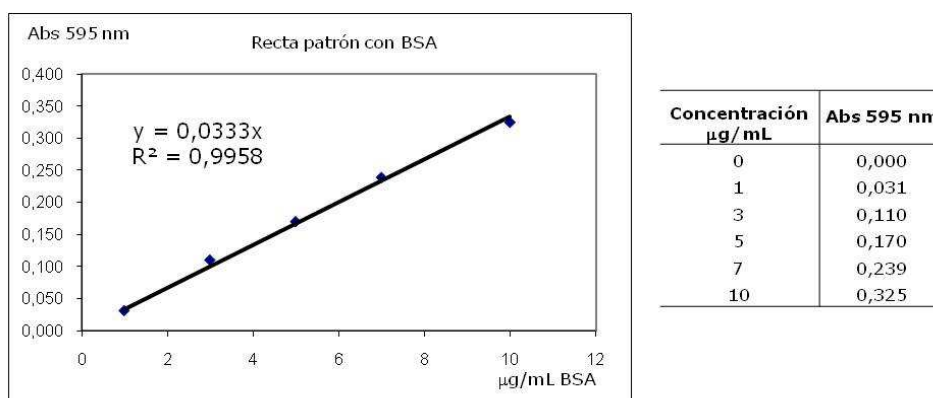


Figura III.13: Recta patrón para la cuantificación de proteínas en solución.

Para la cuantificación de una muestra desconocida se prepararon cuatro diluciones diferentes comprendidas entre 50 y 1.000 veces. Estas diluciones son necesarias debido a que la absorbancia del complejo sólo es lineal en un determinado rango y en caso de tener una muestra muy concentrada la absorbancia no correspondería a la concentración real. Así, de las cuatro diluciones analizadas escogió la que estaba dentro del rango lineal. Para la preparación del complejo proteína-colorante se procedió como se indica en los puntos de 2 a 4 para la formación de la recta patrón.

Para el cálculo de la concentración final de la solución muestra se aplicó la fórmula [5] de la recta patrón multiplicado por el factor de dilución:

$$[5] \text{ Concentración [mg/mL]} = \frac{A_{595\text{nm}}}{0,333} \times F$$

Análisis por muerte celular

Para analizar el efecto de los péptidos sobre la viabilidad de la bacteria, se realizó el análisis por muerte celular. Este ensayo se basa en determinar el efecto del contacto directo de las soluciones proteicas con las suspensiones bacterianas. Después de un período corto de incubación se prepara un banco de diluciones de las bacterias tratadas y se siembran en gota sobre placa LB agar. Cuando una muestra de proteína o péptido disminuye la viabilidad de las bacterias el número de ufc viables disminuye drásticamente. La bacteria analizada por contacto fue *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* y se ajustó a una concentración madre de 10^8 ufc/mL. Las soluciones proteicas se ajustaron a una concentración de 1 mg/mL. Para cada ensayo se realizaron controles positivos tanto para el efecto de péptido como para el crecimiento bacteriano.

Las soluciones bacterianas tratadas se sembraron en bancos de diluciones a 25 min, 1 h y 3 h. Para cada dilución se sembraron 4 gotas de 20 μL en una misma placa. Después de una incubación de 48 h a 25 $^{\circ}\text{C}$ se procedió con el recuento.

Tampón fosfato

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	3,31 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	33,77 g
Agua hasta	1000 mL
Ajustar el pH a 7,4	

Tabla III.25: Volúmenes aplicados para la construcción de un ensayo de muerte celular

Reactivo	Control negativo [μL]	Control positivo [μL]	Extracto crudo [μL]	Extracto crudo + PAM [μL]
Tampón fosfato	450	400	350	300
Solución Bacteriana 10 ⁸ ufc/mL	50	50	50	50
Extracto proteico 5 mg/mL	-	100	100	-
Solución PAM sintético 100 μM	-	50	-	50

III.C.5 Ensayos de resistencia a estrés

Resistencia a estrés oxidativo

El ensayo de resistencia a estrés oxidativo se realizó para determinar la capacidad de degradación de especies reactivas dentro de la célula de planta. El peróxido de hidrógeno es agente inductor de estrés oxidativo que induce formación de especies reactivas (ROS) como el anión superóxido. Plantas resistentes a estrés oxidativo, son capaces de convertir anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a especies no reactivas por lo que a mayor resistencia menor acumulación de anión superóxido. La determinación del anión superóxido se llevo a cabo mediante la incubación de la hojas tratadas con el colorante *nitro blue tetrazolium chlorid* (NBT, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA), el cual reacciona específicamente con el anión superóxido (pero no con H_2O_2) formando un complejo azul (formazán).

Reactivos

Solución H ₂ O ₂	50 mM
KH ₂ PO ₄ pH7,8	10 mM
Azida Sódica	10 mM
NBT	0,1% (p/v)

1. Cortar la tercera hoja de la planta y seccionar en trozos de 2-3 cm.
2. Poner las hojas en una placa de *Petri* y cubrir con 25 mL de H₂O₂ 50 mM.
3. Agitar suavemente durante 8 h.
4. Cubrir las hojas con 15 mL de una solución de 10 mM tampón fosfato y 10 mM NaAz.
5. Aplicar el vacío en un desecador conectado a una bomba durante 10 min.
6. Añadir una solución fresca de 10 mM tampón fosfato y 0,1% (p/v) NBT.
7. Aplicar el vacío en un desecador conectado a una bomba durante 10 min.
8. Incubar toda la noche a TA.
9. Analizar las hojas con el programa de análisis de imagen *APS Assess v.2.0*.

Resistencia a *Magnaporthe grisea* PR9

Obtención de esporas

1. Inocular el hongo en placas con medio de avena (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA) suplementado con 30 mg/L de cloramfenicol para evitar el crecimiento de bacterias.
2. Hacer de 8 a 10 réplicas en paralelo para seleccionar una placa con crecimiento adecuado y que el hongo haya formado esporas.

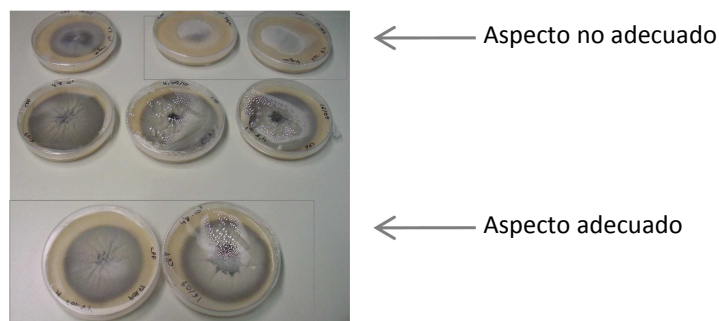


Figura III.14: *Magnaporthe grisea* PR9 crecido durante 15 días. Se muestra el aspecto adecuado del hongo para proceder con el ensayo de resistencia.

3. Incubar las placas a 28 °C con un fotoperíodo de 12 h de luz/12 h de oscuridad durante 13-15 días.
4. Añadir 5 mL de agua estéril. Agitar suavemente las placas con un asa *Digralsky* para recoger las esporas del micelio.
5. Recuperar la suspensión de esporas de la placa con la ayuda de una pipeta estéril y pasar por un filtro *Miracloth* estéril (*Calbiochem*, Merck, Darmstadt, Alemania). Calcular el número de esporas/mL con la ayuda de una cámara hemacitométrica *Neubauer*.

Nota: Para las infecciones en plantas de arroz con *M. grisea* se ha visto que la eficiencia de infección se ve reducida si se utilizan esporas almacenadas a 4 °C, con lo que es aconsejable obtener las esporas y utilizarlas en experimentos de infección el mismo día.

Infeción de hojas de arroz

Medio Agar+Kinetina

Agar	1% (p/v)
Autoclavar 20 min y a 121 °C	
Kinetina 2 mg/mL en etanol 50 % (v/v)	1 mL/L

Suplemento de nitrato

27% (6,5 % nitrógeno nítrico + 19,5% nitrógeno amoniacal)
37% SO₃

1. Se siembran las semillas de arroz en el sustrato de arroz (apartado III.C.1) (no es necesaria la previa desinfección de la semilla). Pasada una semana desde la siembra, se realiza el riego con un suplemento de nitrato (15 g/L) durante una semana más para favorecer la posterior infección de la planta con *M. grisea*.
2. En total se deja crecer en el invernadero durante 2 semanas, el tiempo necesario para que las plantas alcancen un estadio de 2-3 hojas.
3. Cortar la segunda hoja y colocarla con el envés hacia arriba con la ayuda de pinzas o la mano en una placa con medio agar + kinetina (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA).
4. Sumergir en la solución de esporas (4,5. 10⁵ esporas/mL) los discos para ensayos de antibióticos (*Acefe SA*, Barcelona, España) previamente autoclavados.
5. Colocar los discos encima del envés de las hojas (figura III.15).
6. Sellar las placas con *parafilm*TM, ponerlas en bandejas de plástico con papel de filtro mojado en su base. Se envuelve toda la bandeja con plástico transparente para que se forme una cámara húmeda. Esta bandeja ahora se cubre con plástico negro y se incuba a 28 °C durante el tiempo deseado. Las primeras 48 h-72 h después de la infección se deja en oscuridad. Después quitar el plástico negro y los discos de ensayo. Incubar a un fotoperíodo 16 h luz (28 °C)/ 8 h oscuridad (26 °C).
7. Después de 7 días de la infección analizar las hojas con el programa de análisis de imagen *APS Assess v2.0*.

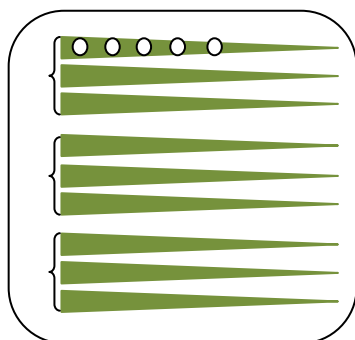


Figura III.15: Ejemplo esquemático de la colocación de los discos de ensayo.

III.C.6 Ensayo agronómico. Evaluación de los componentes de producción

Las líneas de arroz MG se compararon con la línea convencional Senia a nivel de parámetros agronómicos. Se utilizaron eventos MG independientes homocigotas de la generación T3 de las líneas S-bp213, S-bp214, S-bp217 y S-afp además de Senia convencional. En ensayo se realizó en condiciones de invernadero del 29 de Abril hasta el 7 Octubre del 2010, época que corresponde al cultivo de arroz en la región. Para cada línea se cultivaron 45 semillas, de las cuales germinaron entre el 81 y el 91%. Estas se cultivaron inicialmente en condiciones *in vitro* hasta el estadio vegetativo V3. Un total de 30 plantas por línea (3 replicados de 10 plantas) se transfirieron a macetas con sustrato de arroz y se cultivaron en invernadero en condiciones estándar. El crecimiento de la plantas se monitorizó para los parámetros altura, número de ahijados, contenido de clorofila (*spad*) y floración. Los componentes relativos a la producción se analizaron después de recolectar las plantas al final de período del cultivo. Se determinó el número de panículas por planta, número de semillas por panícula, peso de 100 semillas.

V. RESULTADOS

IV.1 Análisis transcriptómico de plantas de arroz resistentes a plagas

Las plantas modificadas genéticamente son hoy en día un punto central tanto en la investigación de genómica funcional como en el desarrollo de nuevas variedades mejoradas a nivel agronómico y de resistencia. Debido a la legislación que define el concepto de equivalencia sustancial en plantas MG es imprescindible estudiar los OMG en profundidad mediante técnicas de *profiling*. Éstas se centran en estudios metabólicos, proteómicos o transcriptómicos. Esta primera parte de la tesis se ha centrado en el estudio a nivel transcriptómico de los efectos no intencionados derivados del transgén *afp* comparando plantas MG y su convencionales isogénicas utilizando el cereal arroz como modelo. Las líneas MG estudiadas, expresan la proteína antifúngica AFP (S-afp), la cual le confiere resistencia al patógeno natural del arroz *Magnaporthe grisea*.

IV.1.1 Comparación transcriptómica de Senia-afp respecto a Senia mediante hibridación por *microarray*

Análisis de *microarray*

Las líneas estudiadas para la comparativa a nivel de transcriptoma fueron Senia convencional y S-afp. S-afp se generó mediante transformación genética por *Agrobacterium* y es resistente al patógeno *Magnaporthe grisea* por la expresión constitutiva de la proteína AFP bajo el promotor de la ubiquitina de maíz (*p-ubi*) (Coca *et al.*, 2004). La línea S-afp fue cedida cordialmente para este estudio por M. Coca (CRAG, Barcelona). El proceso de transformación regeneró varios eventos independientes, entre los cuales se seleccionó un evento de copia única y homocigota para el transgén que se utilizó para el análisis. Para evitar cambios transcripcionales derivados de efectos adversos de cultivo y focalizar los análisis en el efecto derivado únicamente del transgén, se cultivaron plántulas *in vitro* bajo condiciones contraladas

tanto de la línea convencional Senia como de la línea MG S-afp. De cada línea se prepararon tres replicados biológicos cada uno de 10 plántulas, los cuales se analizaron independientemente en tres *microarray* por variedad. Los resultados de los *microarray* están disponibles en *European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) Array Express* bajo el código E-MEXP-2730. Los valores de fluorescencia obtenidos de la hibridación se analizaron conjuntamente mediante el programa *Robust Multichip Average (RMA)* para la obtención de los valores de expresión de los genes analizados. El valor de expresión diferencial se representa en forma \log_2 -veces. La representación del logaritmo en base 10 del *P*-valor del test *t-Student* en función de la expresión diferencial \log_2 -veces para cada secuencia analizada se observa en la figura IV.1. Los valores del *microarray* se filtraron para considerar solamente aquellas secuencias con una expresión diferencial superior o inferior a 2-veces, validadas por el test *t-Student* con un *P*-valor < 0,05 y con una fluorescencia superior a 200 unidades (para la línea con mayor expresión).

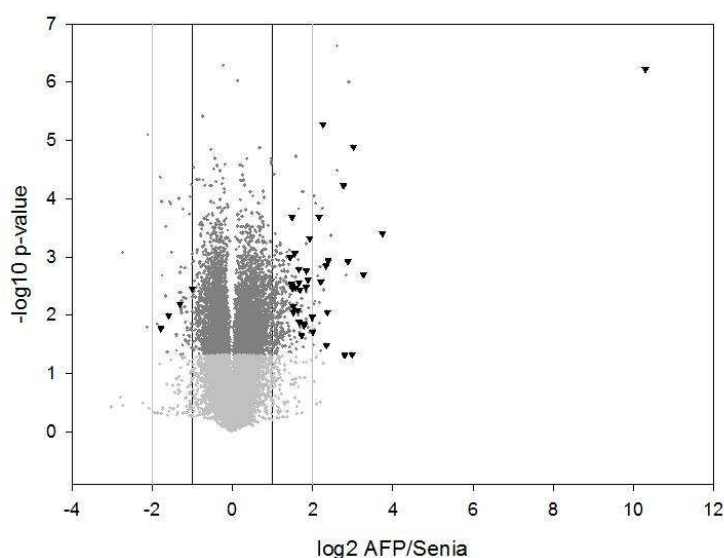


Figura IV.1. Representación *Volcano plot* de la expresión diferencial en líneas de arroz S-afp y Senia. Cada punto representa un gen del *microarray* de arroz de *Affymetrix*. Los logaritmos \log_{10} del *P*-valor del test *t-Student* obtenido del programa *RMA* se representan en función del cambio de la expresión diferencial \log_2 -veces. Las barras verticales indican una la diferencia de expresión de dos veces mayor o menor (2-veces o 0,5-veces). Las secuencia marcadas en negro fueron analizadas por RT-qPCR.

Validación del *microarray*

La validación del *microarray* se llevó a cabo mediante RT-qPCR. Para ello se escogieron un total de 44 secuencias correspondientes a aquellas con la mayor expresión diferencial (superior a 5-veces) más una serie de secuencias reprimidas escogidas al azar con valores de expresión

diferencial inferiores a 0,5-veces. Se diseñaron sistemas específicos de PCR sobre los genes diana, excepto para la secuencia *Os.22606.1.S1_at* (6,2-veces) sobre la cual no fue posible el diseño de un sistema de cebadores específicos. La especificidad de los sistemas se comprobó por qPCR. Todos ellos generaron amplicones únicos con la temperatura de disociación específica y mostraron coeficientes de linealidad y de eficiencia superiores a 0,99 y 0,90, respectivamente (promedio $R^2=0,998\pm0,002$ y $E=0,966\pm0,026$).

Los niveles de ARN mensajero de las, finalmente 43 secuencias, se ensayaron por triplicado en plántulas cultivadas *in vitro* de Senia y S-afp mediante RT-qPCR. Los niveles de expresión de los genes endógenos β -actina, *ef-1 α* y 18S ribosomal se utilizaron para normalizar los valores de expresión de los genes diana. La aplicabilidad para la estandarización de los genes endógenos se comprobó mediante el algoritmo estadístico *geNORM v3.4* (Ghent University, Ghent, Belgium), mostrando todos ellos valores de estabilidad $M<0,5$. Los valores obtenidos de los genes analizados en S-afp y Senia se normalizaron y corrigieron mediante el programa *Genex v.4.3.1* y se analizaron estadísticamente mediante el test *t-Student* acoplado a la corrección múltiple *False Discovery Rate* (FDR, de Benjamini y Hochberg) con P -valor $<0,05$. La tabla IV.1 muestra los resultados de qPCR para todas las secuencias en comparación con los resultados de *microarray*. El 82% de las secuencias fueron validadas con un P -valor del test *t-Student* medio de $0,017\pm0,016$. El porcentaje de validación se sitúa en el rango esperado de 65-95% (Dallas *et al.*, 2005).

El *microarray* de arroz *GeneChip*[®] utilizado contiene sondas para la detección de 51.279 transcritos, de los cuales 48.564 corresponden a la especie *Oryza sativa ssp. japonica*. De todas las secuencias analizadas, 196 presentaron una expresión diferencial en S-afp respecto Senia con valores mínimos de expresión dos veces mayor o menor. En el anexo 1 se describe la función de los genes correspondientes a las secuencias que mostraron expresión diferencial. Las sondas del *microarray* hibridan sobre secuencias del genoma, muchas de las cuales se ven representadas por más de una sonda. Así, de las 196 secuencias con expresión diferencial, 12 están representadas por dos o tres sondas, reduciéndose el número total de genes con expresión diferencial a 183 para la línea MG respecto la convencional Senia. El porcentaje de secuencias reguladas en S-afp respecto Senia se sitúa en el **0,40%**. La mayoría de las secuencias con expresión diferencial se mostraron inducidas, 162 secuencias, mientras que sólo 34 se mostraron reprimidas en la línea MG. Estos valores corresponden al 83% y 17%, respectivamente. Dieciocho de las secuencias mostraron valores de expresión diferencial situados entre 5- y 13-veces, 17 de las cuales se mostraron inducidas y sólo 1 reprimida en la línea MG. Además la secuencia correspondiente al gen de selección, higromicina B fosfotransferasa (*hpt II*), mostró claramente niveles muy altos de expresión en S-afp (1.000-

veces), mostrando niveles basales de expresión en Senia. Debido a que la expresión diferencial de esta secuencia fue naturalmente predecible, no se consideró para los análisis de expresión.

Tabla IV.1: Validación de los resultados de *microarray* por RT-qPCR. Para los genes con expresión diferencial validada se muestra el *P*-valor de la comparativa de test *t-Student* en gris

Código <i>Affymetrix</i>	Código Acceso Genbank	Descripción	<i>microarray</i>		RT-qPCR
			* <i>x</i> -veces	<i>P</i> -valor <i>t</i> -student	<i>P</i> -valor <i>t</i> -student
RPTR-Os-K01193-1_at	RPTR-Os-K01193-1	Gen de selección: higromicina B fosfotransferasa (<i>hpt</i> II)	1261,45	0,000	0,000
OsAffx.19456.1.A1_at	9640.m00123	Proteína tipo <i>C3HC4 zinc finger</i>	13,39	0,031	0,006
Os.6776.1.S1_at	AK067173.1	Glucano endo-1,3-beta-glucosidasa precursor, putativa	9,62	0,000	0,000
Os.50256.1.S1_at	AK120357.1	Secuencia transcrita	8,11	0,003	0,036
Os.7907.1.S1_a_at	AK120896.1	Precursor de ferredoxin dependiente glutamato sintasa, putativa	7,90	0,047	0,577
OsAffx.18617.1.S1_at	9639.m00033	Cadena pesada de clathrin, putativa	7,35	0,001	0,016
Os.15894.1.A1_a_at	BU673129	Peroxidasa, putativa	6,94	0,048	0,137
OsAffx.22999.1.S1_at	AK108619.1	Proteína retrotransposon, putativa	6,82	0,000	0,000
Os.10183.1.S1_at	AK067850.1	RSW1-like celulosa sintasa, subunidad catalítica	5,24	0,000	0,005
Os.57456.1.S1_x_at	D10956.1	GOS9	5,15	0,006	0,008
Os.37717.1.A1_s_at	BU673746	Glicosil hidrolasa, putativa	5,07	0,001	0,029
Os.6152.1.S1_at	AK066089.1	Proteína hipotética	5,03	0,033	0,018
Os.40352.1.S1_at	CF336665	Secuencia transcrita	4,78	0,000	0,000
Os.52377.1.S1_s_at	AK066722.1	Proteína hipotética	4,60	0,003	0,017
Os.14532.1.S1_at	AK107809.1	Proteína hipotética	4,46	0,000	0,002
Os.11821.1.S1_at	AK071775.1	ATP sintasa, putativa	4,01	0,019	0,011
Os.52425.1.S1_x_at	AK067023.1	Trehalosa-6-fosfato sintasa, putativa	3,97	0,011	0,002
Os.28397.1.S1_at	B1807677	Fenilalanina amonio-liasa, putativa	3,80	0,000	0,000
Os.6645.1.S1_s_at	AU101638	Péptido tipo tionina, putativo	3,69	0,002	0,008
Os.5504.1.S1_at	AK059244.1	Proteína <i>heat-shock (HSP)</i> , putativa	3,58	0,002	0,027
Os.15701.1.S1_x_at	AK100652.1	Proteína transportadora de potasio, putativa	3,57	0,003	0,031
Os.51601.1.S1_at	AK063147.1	Proteína ZOS7-10 - C2H2 <i>zinc finger</i>	3,45	0,015	0,016
Os.53343.1.S1_x_at	AK072144.1	Proteína con dominio de proteína quinasa	3,39	0,014	0,469
Os.5031.1.S1_at	AB127580.1	Proteína de patogénesis 10 específica de raíz	3,30	0,022	0,239
Os.22995.1.S1_at	CB096301	Secuencia transcrita	3,20	0,004	0,044
Os.46048.1.S1_x_at	CB642477	Proteína <i>zinc finger</i> , putativa	3,17	0,013	0,024
Os.53055.1.S1_at	AK070622.1	Proteína hipotética	3,16	0,003	0,050
Os.26698.4.S1_s_at	NM_189284.1	Proteína con dominio de proteína universal de estrés	3,15	0,002	0,142
Os.28011.1.S1_at	AY256682.1	Proteína inducible por <i>brown planthopper</i> , putativa	3,09	0,008	0,027
Os.26511.1.S1_at	AK073181.1	Proteína hipotética	2,97	0,003	0,003
Os.53062.1.S1_at	AK070653.1	Factor de transcripción familia MYB, putativo	2,93	0,001	0,112
Os.8032.1.S1_at	AK107749.1	Beta-oryzaína	2,87	0,009	0,049
Os.49627.1.S1_at	AK105605.1	Ascorbato oxidasa	2,86	0,007	0,043
Os.48734.1.S1_s_at	CR288034	Proteína de familia rica en prolina, putativa	2,81	0,003	0,618
Os.22577.2.S1_x_at	BU673049	Proteína con dominio DUF260, específica de semilla	2,80	0,000	0,007
Os.57475.1.S1_x_at	D21280.1	Deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato	2,80	0,003	0,021
Os.609.3.S1_a_at	AK066830.1	Proteína con dominio tipo plastocianin	2,80	0,003	0,013
Os.6542.1.S1_at	CB678453	Dishidroflavonol-4-reductasa, putativa	2,78	0,003	0,158
Os.8999.3.S1_x_at	AK062270.1	Aldolasa C-1	2,71	0,001	0,001
Os.6315.1.S1_at	AK101374.1	Secuencia transcrita	0,50	0,003	0,004
Os.52298.1.S1_at	AK066196.1	Proteína hipotética	0,40	0,006	0,009
Os.5725.1.S1_at	B1810367	Fructosa-bisfosfato aldolasa, putativa	0,33	0,010	0,026
Os.14921.1.S1_at	AK069119.1	App1, putativa	0,29	0,017	0,010

* en S-afp respecto Senia

Cada una de las secuencias con expresión diferencial se identificó por su código de acceso público y se determinó su función mediante la base de datos de *Gene Ontology* (GO). Los genes se clasifican por su actividad en procesos biológicos, en funciones moleculares o por el componente celular en que se ven implicados, a los cuales se les asigna un término GO para su identificación. La descripción, así como la función de cada una de las secuencias con expresión diferencial se muestran en la tabla IV.1 y en Anexo 1.

IV.1.2 Análisis de genes con expresión diferencial sobre-representados en Senia-afp

La representación del total de genes con expresión diferencial sobre el genoma de la línea MG se determinó mediante la herramienta *AgriGO* de *Gene Ontology* (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php>). *AgriGO* permite el análisis de enriquecimiento de secuencias (SEA) respecto al total de secuencias conocidas de la especie. Un total de 45.078 secuencias de *Oryza sativa ssp. japonica* se encuentran anotadas y clasificadas según tres términos GO: proceso biológico, componente celular y función molecular. El análisis SEA de un listado de secuencias problema determinará si existe una sobre-representación de genes con una misma función, pertenecientes al mismo componente celular o involucradas en un mismo proceso, por comparación con el total de secuencias conocidas que se sitúan en este término. Los términos GO están subdivididos en categorías de las cuales se puede determinar la sobre-representación génica mediante un análisis estadístico realizado con el método Fischer asociado a la corrección FDR de Yekutieli y con un nivel de significación de 0,05. Mediante esta herramienta es posible determinar qué secuencias de las que mostraron expresión diferencial están sobre-representadas en cada categoría y definir los tipos de genes que se han visto más afectados. El análisis SEA del total de genes con expresión diferencial en S-afp identificó tres grupos de secuencias, relacionadas con la respuesta a estímulos químicos, procesos catabólicos y metabólicos de glucosa. Todas estas categorías se clasificaron dentro del término GO procesos biológicos. Dentro de los otros dos términos, función molecular y componente celular no se identificó ninguna categoría sobre-representada. En la tabla IV.2 se muestran las categorías del término GO procesos biológicos de las cuales se ha identificado una sobre-representación (P -valor $<0,05$) de los genes con expresión diferencial en S-afp e introducidos en la herramienta SEA. Ésta sobre-representación se determina en base a la secuencias conocidas y anotadas de *Oryza sativa ssp. japonica* en la base datos *AgriGO* para las categorías en cuestión. Los valores correspondientes al total de genes de función conocida, así como los valores de P -valor ajustados, difieren de aquellos anotados en la publicación de los resultados referentes a este estudio. Bases de datos como *Gene Ontology* se actualizan constantemente, motivo por el cual ahora dispone de un mayor número de genes de función conocida de la especie *Oryza sativa*. Aún así el resultado final no difiere de aquel de la publicación (Montero *et al.*, 2011).

Tabla IV.2: Análisis de enriquecimiento de genes de las secuencias expresadas diferencialmente en S-afp respecto Senia mediante la herramienta *AgriGO*

Término GO procesos biológicos				
Identificación categoría	Descripción categoría	Anotados en la categoría / Total introducidos^a	Anotados en la categoría / Total de función conocida^b	P-valor ajustado^c
GO:0070887	Respuesta celular a estímulos químicos	6 / 175	140 / 45.078	0,0058
GO:0009056	Procesos catabólicos	13 / 175	1295 / 45.078	0,0049
GO:0044248	Procesos catabólicos celulares	10 / 175	629 / 45.078	0,0015
GO:0006006	Procesos metabólicos de glucosa	6 / 175	314 / 45.078	0,0077
GO:0042221	Respuesta a estímulos químicos	9 / 175	648 / 45.078	0,0031

a) Genes de expresión diferencial en S-afp vs. Senia

b) Genes anotados en *AgriGO*: fondo genético *Affymetrix Genome Array (GPL2025)*

c) Basado en el método estadístico de Fisher y corrección múltiple FDR Yekutieli (Benjamini y Yekutieli, 2001)

Tabla IV.3: Genes con expresión diferencial en S-afp vs. Senia clasificados en cinco categorías asociadas al término GO procesos biológicos

Código Affymetrix	Descripción	Procesos biológicos				
		A	B	C	D	E
<i>Os.15894.1.A1_a_at</i>	Peroxidasa putativa	■	■	■	■	■
<i>Os.50785.1.S1_at</i>	Gen de la familia de respuesta a auxina SAUR gen	■	■	■	■	■
<i>Os.156.2.S1_x_at</i>	Catalasa	■	■	■	■	■
<i>OsAffx.28989.1.S1_s_at</i>	Similar a proteína auxina-inducible tipo SAUR	■	■	■	■	■
<i>Os.8178.1.S1_at</i>	PR4 proteína relacionada con la patogénesis	■	■	■	■	■
<i>Os.51408.1.S1_at</i>	Similar a proteína auxina-inducible tipo SAUR	■	■	■	■	■
<i>Os.3408.1.A1_x_at</i>	Fructosa-1,6-bisfosfatasa, putativa	■	■	■	■	■
<i>Os.28397.1.S1_at</i>	Fenilalanina amonio-liasa, putativa	■	■	■	■	■
<i>Os.57475.1.S1_x_at</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	■	■	■	■	■
<i>Os.2450.3.S1_x_at</i>	Fosfoenolpiruvato carboxilasa	■	■	■	■	■
<i>Os.8032.1.S1_at</i>	Beta-oryzaína	■	■	■	■	■
<i>Os.33674.1.S1_at</i>	Nucleasa PA3, putativa	■	■	■	■	■
<i>Os.8999.3.S1_x_at</i>	Aldolasa C-1	■	■	■	■	■
<i>Os.7218.1.S2_at</i>	Erithronato-4-fosfato deshidrogenasa, dominio de proteína	■	■	■	■	■
<i>Os.56032.1.S1_x_at</i>	26S proteasa, subunidad reguladora 7, putativa	■	■	■	■	■
<i>Os.5725.1.S1_at</i>	Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, putativa	■	■	■	■	■
<i>Os.10178.1.S1_a_at</i>	CESA3 - celulosa sintasa	■	■	■	■	■
<i>Os.10183.1.S1_at</i>	RSW1-Subunidad catalítica de celulosa sintasa	■	■	■	■	■
<i>OsAffx.15562.1.S1_s_at</i>	Gen de la familia de respuesta a auxina Aux/IAA	■	■	■	■	■

A	GO:0070887	Respuesta celular a estímulos químicos
B	GO:0050896	Procesos catabólicos
C	GO:0044248	Procesos catabólicos celulares
D	GO:0006006	Procesos metabólicos de glucosa
E	GO:0042221	Respuesta a estímulos químicos

El número total de secuencias identificadas en cada categoría no es único e individual sino que algunos de los genes identificados están involucrados en funciones de diferentes categorías. El desglose de todos los genes identificados se muestra en la tabla IV.3, en el que se puede observar que la mayoría de los genes ejercen funciones en más de un proceso biológico. El total de genes identificados se sitúa en 19. Entre ellos se han podido identificar 4 genes relacionados con la respuesta a auxina clasificados únicamente en las categorías de respuesta a estímulos químicos. Dentro de la clasificaciones de procesos metabólicos se han identificados genes con funciones enzimáticas del ciclo de los carbohidratos, de la glucólisis e incluso de la formación de la pared celular. Finalmente genes codificantes de proteínas como la peroxidasa, catalasa o relacionadas con la patogénesis, se han clasificado en categorías tanto de respuesta a estímulos químicos como en procesos metabólicos. Estas proteínas poseen una gran diversidad de funciones tanto en la regulación de especies reactivas como en procesos de oxidación-reducción necesarios en el metabolismo de la planta.

IV.1.3 Evaluación del impacto del proceso de transformación sobre las diferencias transcriptómicas

Los efectos no intencionados de la transgénesis son a menudo una consecuencia del proceso de transformación genética aplicada así como del proceso de regeneración de plantas. Estos procesos forman parte de técnicas de cultivo *in vitro* utilizadas a menudo en la mejora genética. La técnica de transformación por *Agrobacterium* implica procesos de diferenciación celular a callos embriogénicos, infección tumoral por *Agrobacterium* así como el cultivo en diferentes medios (p.ej. de selección con antibióticos), regeneración y aclimatación de las plantas MG. Para determinar el efecto del proceso transformación sobre los cambios transcriptómicos no intencionados de la transgénesis, se evaluaron plantas descendientes de la líneas MG la cuales por la ley de Mendel habían perdido el transgén. Más detalladamente, los callos embriogénicos infectados con *Agrobacterium* se seleccionaron por su resistencia a higromicina, los cuales regeneraron a planta de generación T0 y hemicigota para el transgén. La autopolinización de las plantas adultas y previamente aclimatadas del evento de transformación S-afp-14 generó plantas descendientes de la cuales un 25% fueron homocigotas, un 50% hemicigotas y un 25% no transgénicas. Así pues, las plantas no-MG, S-afp(-), habían sido sometidas al mismo proceso de transformación y de cultivo que la plantas MG, pero no contenían el transgén.

Para la identificación de las plantas S-afp(-) se germinaron *in vitro* un total de 130 semillas T1, de la cuales se recolectó hoja de plántula y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Se extrajo ADN genómico de cada una de las hojas y se ensayaron independientemente

mediante qPCR para determinar la presencia del transgén. Un total de 31 plantas se identificaron como no transgénicas y fueron agrupadas en tres replicados biológicos de 10 plantas cada uno. Los niveles de expresión de las 34 secuencias con expresión diferencial en S-afp vs. Senia y validadas por RT-qPCR se determinaron sobre ARN mensajero de los tres replicados biológicos de S-afp(-). Estadísticamente el número de secuencias analizadas corresponde la muestra mínima representativa requerida (con un margen de error del 15% y un intervalo de confianza de 95%) para la fiabilidad de los resultados y corresponde a aproximadamente un 20% de las secuencias reguladas en Senia y S-afp, respecto los resultados de *microarray*. Los niveles de expresión de los genes endógenos β -actina, *ef-1 α* y *18s* ribosomal se utilizaron para normalizar los valores de expresión de los genes diana. La aplicabilidad para la estandarización de los genes endógenos se comprobó mediante el algoritmo estadístico *geNORM v3.4*, mostrando todos ellos valores de estabilidad $M < 0,5$. Los valores obtenidos de los genes analizados en S-afp(-) y Senia se normalizaron y corrigieron mediante el programa *Genex v.4.3.1* y se analizaron estadísticamente mediante el test *t-Student* acoplado a la corrección múltiple *False Discovery Rate* (FDR, de Benjamini y Hochberg) con P -valor $< 0,05$. Predeciblemente los resultados mostraron para la mayoría de los genes una expresión no diferencial entre Senia-afp(-) y Senia. Aún así, 12 de las 34 secuencias mostraron una expresión diferencial significativa en Senia-afp(-) (tabla IV.4), indicando pues, que su regulación está directamente relacionada con el proceso de transformación y no con la inserción o expresión del transgén. Las secuencias con expresión diferencial entre Senia-afp(-) y Senia, es decir clasificadas como efecto del proceso de transformación, se mostraron esperablemente no diferenciales entre Senia-afp(-) y S-afp. Aún así algunas de las secuencias relacionadas con el proceso de transformación, *Os.57456.1.S1_x_at*, *Os.37717.1.A1_s_at*, *Os.46048.1.S1_x_at* y *Os.22577.2.S1_x_at*, presentaron niveles expresión diferentes en las comparativas Senia vs. Senia-afp(-) y Senia vs. S-afp. Algunas de las secuencias no reguladas estadísticamente entre Senia y Senia-afp(-), *Os.8032.1.S1_at*, *Os.49627.1.S1_at* y *Os.609.3.S1_a_at*, presentaron niveles de expresión situados entre los niveles de expresión de Senia y S-afp, resultando estadísticamente no significativas en ambas comparativas. Cabe destacar que estas secuencias con niveles de expresión ambiguos, presentan un nivel de expresión inferior a 2,85-veces en la línea MG vs. no-MG y por lo tanto cerca del límite de sensibilidad de la técnica RT-qPCR.

IV.1.4 Evaluación de las diferencias transcriptómicas entre diferentes eventos MG de Senia-afp y Senia

Las diferencias transcriptómicas no intencionadas entre S-afp y Senia, pueden ser también consecuencia de la disrupción de genes en el genoma huésped, de reagrupamientos de

secuencias de DNA en la zona de inserción o bien de interacciones entre elementos del transgén y secuencias próximas a éstas. Los diferentes eventos MG provienen de células transformadas independientes y poseen como consecuencias diferentes zonas de inserción. Para evaluar el efecto del lugar de inserción sobre el nivel de expresión de la 34 secuencias seleccionadas y validadas de los resultados del *microarray* (tabla IV.1), se utilizaron tres eventos de transformación independientes derivados del proceso de obtención de líneas MG S-*afp*. Las líneas MG analizadas fueron S-*afp*-14 (analizada por *microarray*), S-*afp*-15 y S-*afp*-12, todas ellas con una copia única (confirmado por el método *Southern blot*, comunicación personal de J. Messeguer) y homocigotas para el transgén.

Para la obtención del material vegetal se cultivaron semillas en cámaras de cultivo *in vitro* hasta un estadio V3 y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. De cada evento se prepararon tres replicados biológicos de 10 plántulas cada uno, de los cuales se determinó el nivel de expresión del gen *afp* sobre el ARN mensajero. Los cebadores utilizados para este ensayo se diseñaron sobre la secuencia del gen y se determinó su especificidad *in silico* en la base de datos NCBI. Para todas las muestras el análisis de qPCR generó un único amplicón con una temperatura de disociación idéntica (T_m 85,2°C). Los resultados de la RT-qPCR se normalizaron con el nivel de expresión de los genes endógenos *β -actina*, *ef-1 α* y *18S* ribosomal, lo cuales mostraron ser estables en todos los replicados biológicos ($M < 0,5$, *geNORM v3.4*). Los niveles de expresión de *afp* de los tres eventos MG se compararon entre ellos mediante el test estadístico ANOVA de un factor, no mostró diferencias significativas entre ellos (P -valor=0,096). Con estos resultados queda excluido el efecto del nivel de expresión del transgén sobre las diferencias transcripcionales no intencionadas entre las líneas MG y su convencional.

Las 34 secuencias con expresión diferencial entre S-*afp*-14 y Senia seleccionadas de los resultados de *microarray*, se analizaron sobre ARN mensajero de los eventos S-*afp*-12 y S-*afp*-15 mediante RT-qPCR. Siguiendo el mismo proceso de análisis, los resultados de la RT-qPCR se estandarizaron y se compararon estadísticamente entre línea MG y convencional. Veintinueve de las 34 secuencias mostraron expresión diferencial entre líneas MG y isogénica en mínimo dos eventos de transformación (tabla IV.4), indicando pues que su regulación está en parte relacionada con la presencia del transgén. De estas 29 secuencias, a 12 se les asoció su regulación al proceso de transformación. Como consecuencia la regulación de las 17 restantes se puede asociar a la presencia del transgén. Finalmente la regulación de 5 de las secuencias se consideró específica de evento por mostrar expresión diferencial en solo un evento MG. Cabe destacar que de las secuencias específicas de evento, dos se encuentran situadas en el cromosoma 4 (*Os.26511.1.S1_at* posiciones 29.280.748 – 29.281.890; *Os.8032.1.S1_at*, posiciones 33.988.248-33.991.626), mientras que tres de ellas están situadas en los

cromosomas 5 (*Os.6152.1.S1_at*), 2 (*Os.52377.1.S1_s_at*) y 6 (*Os.52298.1.S1_at*). Como se muestra en la tabla IV.4, la secuencia *Os.8032.1.S1_at* se identificó como beta-oryzaína, mientras que las otras no se identificaron.

IV.1.5 Regulación de las secuencias por el efecto del nivel de expresión del transgén

El transgén de las líneas de arroz MG S-*afp* analizadas hasta el momento está regulado por el promotor de la ubiquitina de maíz, el cual es un promotor constitutivo y con niveles elevados de expresión en arroz. Los resultados obtenidos en este estudio han revelado que la expresión diferencial del 50% de los genes se deriva de la presencia del transgén. Con esta valoración y por el hecho de expresar el transgén constitutivamente no se puede diferenciar hasta que nivel la regulación de los genes es debida sólo a la presencia del transgén o se debe también al nivel de expresión del mismo. Para ello se incorporó en el ensayo una línea de arroz MG en que el transgén *afp* está regulado por un promotor inducible. La línea S-ZmPR4:*afp* (Moreno *et al.*, 2005) fue cedida cordialmente para este estudio por B San Segundo (CRAG). El promotor *p-ZmPR4*, del gen que codifica la proteína de patogénesis PR4 de maíz, ha demostrado funcionar correctamente en arroz. *ZmPR4* se induce fuertemente por presencia del patógeno, por sustancias elicitoras o bien por herida. Las líneas estudiadas en esta comparativa fueron S-*afp*, para la expresión constitutiva y S-ZmPR4:*afp* para expresión inducible del transgén y consecuentemente con un nivel de expresión de *afp* reducido.

La línea MG S-ZmPR4:*afp*, con resistencia demostrada a *Magnaporthe grisea* se generó mediante transformación genética por *Agrobacterium*. El proceso de transformación regeneró varios eventos independientes de los cuales se seleccionó un evento de copia única y homocigota para el transgén. Para evitar cambios transcripcionales derivados de efectos adversos de cultivo y focalizar los análisis en el efecto derivado únicamente de la expresión transgén, se cultivaron plántulas *in vitro* bajo condiciones controladas de las líneas MG S-*afp* y S-ZmPR4:*afp*. De cada línea se prepararon tres replicados biológicos cada uno de 10 plántulas, los cuales se analizaron independientemente por RT-qPCR. En este punto cabe destacar que aunque en el estudio se incorporó una línea con un promotor inducible, las condiciones de crecimiento fueron las mismas para ambas líneas y sin la aplicación de ningún tipo de estrés. De esta manera se estudiaron dos líneas con un nivel de expresión del transgén diferente.

De cada replicado biológico se extrajo ARN mensajero de hoja y se analizó el nivel de expresión del transgén *afp*. El sistema de cebadores utilizado se diseñó sobre la secuencia de ARNm del gen *afp* y se comprobó su especificidad *in silico* en la base de datos de NCBI. Los resultados de qPCR para todas las muestras analizadas generaron un único amplicón de Tm idéntica de 85,2 °C. Los niveles de expresión tanto del transgén como de los 17 genes analizados

posteriormente se normalizaron con los niveles de expresión de los genes endógenos β -actina, $ef-1\alpha$ y 18S ribosomal. La aplicabilidad para la estandarización de los genes endógenos se comprobó mediante el algoritmo estadístico *geNORM v3.4*, mostrando todos ellos valores de estabilidad $M < 0,5$. Los valores obtenidos de los genes analizados en S-*afp* y S-ZmPR4:*afp* se normalizaron y corrigieron mediante el programa *Genex v.4.3.1* y se analizaron estadísticamente mediante el test *t-Student* acoplado a la corrección múltiple FDR con P -valor $< 0,05$. La línea S-ZmPR4:*afp* mostró un nivel de expresión de *afp* basal y muy por debajo de la línea de expresión constitutiva. El análisis estadístico entre ambas líneas mostró una expresión diferencial significativa del transgén P -valor $< 0,05$. Adicionalmente se calculó el número de copias de ARNm del *afp* para determinar el nivel de expresión relativo entre ambas líneas. La línea constitutiva S-*afp* expresa 400 veces más el transgén que S-ZmPR4:*afp* con el promotor inducible.

Los 17 genes identificados como genes regulados por la presencia del transgén se analizaron mediante RT-qPCR sobre el ARNm de hoja. Los resultados de expresión normalizados se compararon estadísticamente con el nivel de expresión de Senia convencional. La figura IV.2 representa gráficamente los resultados obtenidos en la que se muestran marcados de color gris los genes regulados. De los 17 genes analizados 10 (60%) se mostraron regulados en ambas líneas indicando que su expresión no depende del nivel de expresión del transgén sino de la presencia del mismo. El resto de los 7 genes (40%) se muestran regulados solamente en S-*afp* indicando que su regulación depende del nivel de expresión de *afp*.

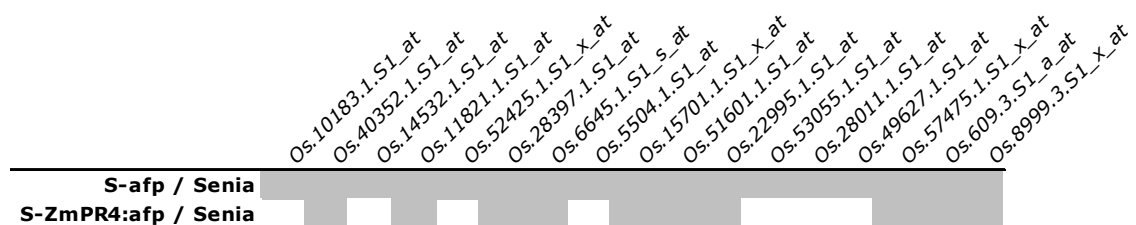


Figura IV.2: Comparación del nivel de expresión de S-ZmPR4:*afp* vs. Senia de las 17 secuencias asociadas a la presencia del transgén. Los valores significativos (P -valor $< 0,05$) del test *t-Student* se muestran de color gris.

Resumiendo los resultados de las 34 secuencias evaluadas para clasificar los efectos no intencionados, observamos que la expresión diferencial de 12 de ellas está regulada por el proceso de transformación y que la regulación de otras 5 secuencias se atribuyó al lugar de inserción siendo pues, específica de evento. La regulación de las 17 secuencias restantes fue consecuentemente atribuida al transgén (10 a la presencia y 7 al nivel de expresión). La tabla

IV.4 muestra de forma resumida los resultados obtenidos de la clasificación de los genes derivada de los análisis realizados en esta parte de la tesis.

Tabla IV.4: Resultados obtenidos de los análisis de expresión por RT-qPCR de los genes con expresión diferencial seleccionados. Se muestra para cada gen la asociación a su regulación, así como los valores del *P*-valor obtenidos de las comparativas mediante el test *t-Student* de S-afp(-) vs. Senia y entre tres eventos de transformación (S-afp-14, S-afp-15 y S-afp-12) y Senia. Se indica con código de colores la asociación de la regulación de cada gen

Código Affymetrix	Asociación de la regulación	Senia-afp(-) vs. Senia	Senia-afp vs. Senia		
			S-afp-14*	S-afp-15	S-afp-12
<i>RPTR-Os-K01193-1_at</i>	hpt II	0,05	0,00	0,00	0,00
<i>OsAffx.19456.1.A1_at</i>	t	0,00	0,01	0,01	0,00
<i>Os.6776.1.S1_at</i>	t	0,00	0,00	0,01	0,00
<i>Os.50256.1.S1_at</i>	t	0,00	0,04	0,02	0,00
<i>OsAffx.18617.1.S1_at</i>	t	0,00	0,02	0,47	0,00
<i>OsAffx.22999.1.S1_at</i>	t	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Os.10183.1.S1_at</i>	eT	0,24	0,01	0,00	0,00
<i>Os.57456.1.S1_x_at</i>	t	0,00	0,01	0,01	0,00
<i>Os.37717.1.A1_s_at</i>	t	0,00	0,03	0,65	0,00
<i>Os.6152.1.S1_at</i>	e	0,06	0,02	0,16	0,21
<i>Os.40352.1.S1_at</i>	T	0,06	0,00	0,00	0,00
<i>Os.52377.1.S1_s_at</i>	e	0,23	0,02	0,50	0,08
<i>Os.14532.1.S1_at</i>	eT	0,37	0,00	0,00	0,00
<i>Os.11821.1.S1_at</i>	T	0,07	0,01	0,00	0,00
<i>Os.52425.1.S1_x_at</i>	eT	0,09	0,00	0,05	0,01
<i>Os.28397.1.S1_at</i>	T	0,99	0,00	0,52	0,01
<i>Os.6645.1.S1_s_at</i>	T	0,13	0,01	0,01	0,00
<i>Os.5504.1.S1_at</i>	eT	0,18	0,03	0,02	0,00
<i>Os.15701.1.S1_x_at</i>	T	0,15	0,03	0,01	0,20
<i>Os.51601.1.S1_at</i>	T	0,20	0,02	0,03	0,00
<i>Os.22995.1.S1_at</i>	T	0,08	0,04	0,03	0,03
<i>Os.46048.1.S1_x_at</i>	t	0,00	0,02	0,01	0,01
<i>Os.53055.1.S1_at</i>	eT	0,13	0,05	1,00	0,01
<i>Os.28011.1.S1_at</i>	eT	0,19	0,03	0,03	0,03
<i>Os.26511.1.S1_at</i>	e	0,35	0,00	0,20	0,10
<i>Os.8032.1.S1_at</i>	e	0,72	0,05	0,88	0,39
<i>Os.49627.1.S1_at</i>	eT	0,95	0,04	0,03	0,01
<i>Os.22577.2.S1_x_at</i>	t	0,02	0,01	0,01	0,08
<i>Os.57475.1.S1_x_at</i>	T	0,06	0,02	0,04	0,01
<i>Os.609.3.S1_a_at</i>	T	0,83	0,01	0,02	0,02
<i>Os.8999.3.S1_x_at</i>	T	0,56	0,00	0,04	0,00
<i>Os.6315.1.S1_at</i>	t	0,01	0,00	0,01	0,01
<i>Os.52298.1.S1_at</i>	e	0,11	0,01	0,16	0,15
<i>Os.5725.1.S1_at</i>	t	0,00	0,03	0,00	0,00
<i>Os.14921.1.S1_at</i>	t	0,00	0,01	0,00	0,00

*secuencias validadas por RT-qPCR

hpt II	gen de selección
t	proceso de transformación
e	específica de evento
T	presencia del transgén
eT	expresión del transgén

IV.1.6 Regulación de secuencias por el efecto herida en plantas Senia y Senia-afp

La presencia del transgén en una gran variedad de plantas MG, ha demostrado conferir a la planta no sólo la resistencia asociada al transgén sino también mayor tolerancia a otros tipos de estrés biótico o abiótico. Para ensayar la resistencia de las plantas MG a un estrés abiótico, se analizaron las líneas S-afp y Senia bajo el efecto de herida. Para ello, las secuencias cuya regulación quedó asociada a la presencia del transgén se analizaron en ARNm de la línea convencional Senia y la línea MG S-afp crecidas en condiciones *in vitro* hasta un estadio V3. Antes de recoger las muestras, a tres replicados biológicos de ambas líneas, se les aplicó una herida y otros tres replicados, sin herida, se recogieron como línea control. Para las 12 muestras se ensayó el nivel de expresión de los mismos endógenos utilizados hasta el momento y se determinó su nivel de estabilidad. Para todos ellos se obtuvieron valores $M < 0,5$ confirmando su aplicabilidad para la normalización. Como se muestra en la figura IV.3, de las 17 secuencias analizadas, 9 se indujeron por herida y 8 secuencias no mostraron expresión diferencial entre ambas muestras. Estos resultados contrastan con los obtenidos en la comparación S-afp-herida vs. S-afp. De las 9 secuencias inducidas por herida en Senia-herida ninguna se muestra inducida en S-afp-herida vs. S-afp, y dos se muestran reprimidas en condiciones de estrés en S-afp-herida vs. S-afp. Estas dos secuencias, a una no se le identificó ninguna función (*Os.22995.1.S1_at*), y la otra *Os.28011.1.S1_at* se identificó como proteína inducible por estrés biótico (*Brown planthopper inducible protein*).

La mayoría de los genes los inducidos por herida en este ensayo mostraron en el ensayo anterior una regulación específica de la presencia del transgén. Así de los 9 genes inducidos 3 (*Os.14532.1.S1_at*, *Os.28011.1.S1_at* y *Os.49627.1.S1_at*) mostraron depender de la expresión del transgén y los 6 restantes se mostraron regulados sólo por la presencia del transgén. Estos resultados parecen sugerir que la resistencia a estrés adquirida por la planta huésped estaría en parte relacionada por la presencia del transgén y en una menor proporción por la expresión del mismo.

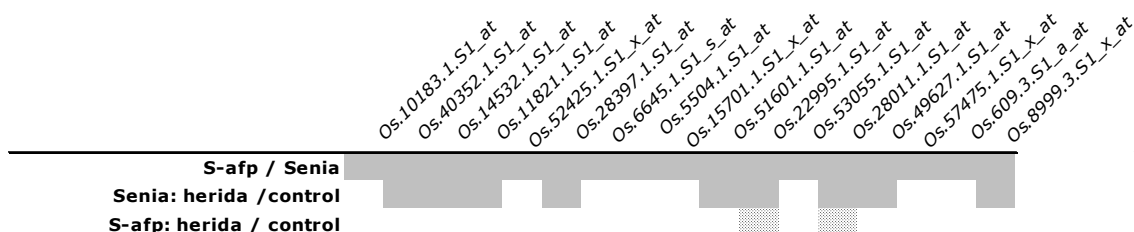


Figure IV.3: Respuesta transcripcional a herida de las 17 secuencias asociadas al transgén con expresión diferencial en S-afp y Senia. Los *P*-valores para expresiones diferenciales significativas entre comparativa se muestran de color gris para los genes inducidos y sombreado para los genes reprimidos.

IV.2. Construcción de plantas de arroz MG para la síntesis de derivados de BP100

El péptido antimicrobiano (PAM) BP100 fue seleccionado a partir del análisis de una librería de 125 péptidos lineales diseñados por química combinatoria en base al péptido BP76 (Ferré *et al.*, 2006), con actividad *in vitro* demostrada contra las especies bacterianas fitopatógenas *Erwinia amylovora* (*Ea*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*) y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*). El objetivo del estudio fue buscar nuevos péptidos con características mejoradas en términos de actividad antibacteriana, estabilidad y citotoxicidad (Badosa *et al.*, 2007). El péptido BP100 resultó tener una muy adecuada combinación de las tres características, siendo altamente tóxico para *Ea*, *Pss* y *Xav*; moderadamente resistente a proteasas y muy biocompatible, mostrando valores de toxicidad aguda en ratón extraordinariamente bajos. Se considera pues un buen candidato para aplicación en el campo fitosanitario. Es importante destacar, no obstante, que a partir de la misma librería de péptidos se seleccionaron otros, también de gran interés fitosanitario, por su potente actividad específica contra especies bacterianas o fúngicas. La aplicación de un producto fitosanitario en la agricultura requiere grandes cantidades del mismo. La producción masiva de estas cantidades de péptido mediante síntesis química resulta inviable desde el punto de vista económico. Una opción podría ser la síntesis en planta a gran escala (plantas biofactoría), opción que se ha utilizado para otras proteínas. Por otra parte, dichos péptidos podrían ser sintetizados por la planta de interés (planta modificada genéticamente, MG), de forma que se auto-protegiera frente a los patógenos diana. Como prueba de concepto, y con posibles aplicaciones a otros péptidos de características similares, este trabajo contempla la expresión de BP134 en la especie modelo arroz (*Oryza sativa* spp. *japonica*).

El péptido BP134 escogido para su expresión en planta es un péptido lineal compuesto de 11 L-aminoácidos y no modificado, por lo que es teóricamente sintetizable biológicamente. BP134 tiene la misma secuencia que BP100, pero (a diferencia de BP100) no está amidado en su extremo C-terminal. BP134 se sintetizó químicamente para estudiar *in vitro* sus características, antes de introducirlo en la aproximación de síntesis en planta. Los ensayos de actividad antibacteriana se realizaron contra los patógenos *Ea*, *Pss* y *Xav* monitorizando la inhibición del crecimiento bacteriano en presencia de concentraciones crecientes de BP134. La menor concentración de péptido a la cual no se observaba crecimiento bacteriano a tiempo final (48 h) del experimento, correspondía a la concentración mínima inhibitoria (CMI) del péptido (Badosa *et al.*, 2007). La citotoxicidad se determinó a través del grado de hemólisis comparado con el péptido de referencia melitina (cuya actividad hemolítica es muy elevada). Éste se evaluó mediante la incubación de una suspensión de eritrocitos de sangre humana con tres concentraciones diferentes de péptido, y la posterior determinación de la concentración de

hemoglobina liberada al medio. El porcentaje de hemólisis se expresa en relación al valor obtenido para melitina. Los resultados mostrados en esta tesis hacen referencia a la hemólisis observada a una concentración de péptido de 150 μM . Finalmente se determinó la estabilidad de BP134 frente a proteínasa K como indicador de su estabilidad frente a proteasas *in planta*. Mediante estos ensayos se confirmó la conservación de las características de BP134 respecto BP100 (especificados en Badosa *et al.*, 2007). Estos valores fueron: concentraciones mínimas inhibitorias (CMI): 2,5-5,0 μM respecto a *Ea* y *Pss*; y 5,0-7,5 μM respecto a *Xav*; actividad hemolítica a 150 μM , $22,0 \pm 2,8\%$.

La síntesis en plantas de moléculas tan pequeñas y con un cierto grado de toxicidad como BP134 presenta unos retos importantes a superar: i) bajos niveles de expresión; ii) pérdidas de estabilidad y actividad debido a las proteasas *in planta*, iii) tamaño mínimo expresable (en torno a los 20 aminoácidos) y iv) toxicidad para la planta. Por tanto, se requiere un especial diseño experimental que tenga en cuenta una serie de factores como la acumulación de los péptidos en determinados compartimientos subcelulares, el tamaño de los mismos o los elementos reguladores de la expresión. El presente trabajo se planteó con especial énfasis en el estudio de los posibles efectos adversos que la expresión de transgenes con propiedades potencialmente tóxicas podía tener para la planta huésped.

IV.2.1 Diseño y construcción de PAM derivados de BP100 para su expresión en planta

Secuencias peptídicas quiméricas

Las moléculas pequeñas acostumbran a ser susceptibles a degradación por proteasas en células vegetales impidiendo su acumulación en grandes cantidades. Paralelamente al problema de estabilidad del péptido, es conveniente considerar el posible efecto tóxico del mismo sobre la planta. La dirección y acumulación de proteínas a retículo endoplasmático (RE) se ha descrito como una vía para mayor acumulación de proteínas en células vegetales (ver la revisión de Twyman *et al.*, 2003) ya que presenta un potencial redox más oxidante que el citosol (favorece la formación de puentes disulfuro), escaso en proteasas y rico en proteínas del tipo chaperona que asisten el plegamiento de las proteínas. Estos factores son importantes para favorecer la correcta adopción de la estructura secundaria de las proteínas, su ensamblamiento y consecuentemente mayor acumulación en la célula vegetal (Nuttall *et al.*, 2002). Para el direccionamiento y retención de proteínas a nivel de RE es necesario dotarlas de un péptido señal en su extremo N-terminal, que posteriormente se procesa; y fusionarlas en C-terminal al tetrapéptido de reconocimiento H/KDEL (Conrad *et al.*, 1998). En tabaco Schillberg y colaboradores (2002) observaron la acumulación de anticuerpos a niveles de 2 a 10 veces superiores si se retenían en el RE que si se acumulaban en el citoplasma o el apoplasto; y en

arroz (Takagi *et al.*, 2005) se sintetizaron grandes cantidades de vacunas mediante la estrategia de retención a RE. Además, Coca y coautores expresaron con éxito el péptido antibacteriano CecA (35 aminoácidos) en arroz transgénico, tanto en una versión que introducía KDEL (y se retenía en el RE) como en una sin este elemento, para acumulación en el apoplasto; y observaron mayores niveles de acumulación de CecA en RE. Este resultado se corroboró a nivel de ARNm (Coca *et al.*, 2006). Además, un gen codificante para el péptido antimicrobiano Pep3, derivado de CecA, se transformó (sin secuencia de retención a RE) en planta de arroz con un promotor constitutivo, resultando letal para la planta (B. San Segundo, comunicación personal). Por este motivo y con el objetivo de mejorar sus niveles de expresión y acumulación, así como para aumentar su tamaño hasta un mínimo expresable en planta, se diseñó una serie de derivados de BP100 con la secuencia KDEL fusionada al extremo C-terminal. Cabe recordar que la secuencia KDEL no se hidroliza (como es el caso del péptido señal de secreción), aumentando así el tamaño final del derivado de BP100 en estos 4 aminoácidos y pudiendo previsiblemente modificar su actividad.

Como se ha comentado, los péptidos antimicrobianos de la serie BP (como BP100) se diseñaron en base a un híbrido CecA - melitina (Ferré *et al.*, 2006), que incluía en particular los 7 primeros aminoácidos (en N-terminal) de CecA. La CecA es un péptido lineal constituido por dos subunidades, unidas mediante la secuencia de 4 aminoácidos AGPA. Esta secuencia actúa de charnela entre las dos subunidades, ambas estructuradas en α -hélice, confiriendo al péptido movilidad conformacional. Como primera aproximación al aumento del tamaño de los PAM a expresar en planta se diseñaron nuevos derivados mediante la multimerización de BP134. Las secuencias unitarias de BP134 se fusionaron mediante la secuencia puente de 4 aminoácidos AGPA, manteniendo así la estructura del PAM modelo CecA. Así, las dos secuencias nuevas introducidas en el diseño de nuevos derivados de BP134 fueron:

- KDEL para retención a RE
- AGPA como secuencia de unión

Con estas dos modificaciones se diseñaron un monómero, un dímero y un trímero, todos con la secuencia KDEL en el extremo C-terminal y la secuencia de unión AGPA entre los BP134 monómeros. Por otra parte, se diseñaron dos dímeros en el que las 2 secuencias monómeras están orientadas en sentido opuesto y unidas también con la secuencia puente de 4 aminoácidos AGPA. En un caso, las secuencias monómeras fueron BP134; y en el otro caso, con el objetivo de aumentar el tamaño del péptido manteniendo la estructura de dímero invertido, cada una de las secuencias monómeras fue un híbrido de 20 aminoácidos compuesto por BP134 y los aminoácidos 10 a 18 del PAM melitina. Estas dos últimas construcciones se fusionaron igualmente con la secuencia KDEL. Los PAM derivados de BP100 (derBP100) resultantes (figura IV.4) tienen tamaños de 15 a 48 aminoácidos.

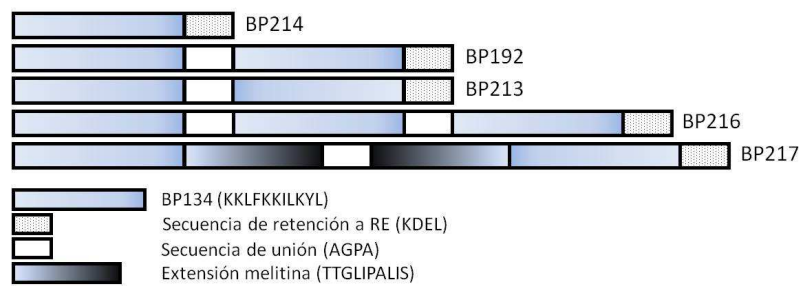


Figura IV.4. Representación esquemática y secuencia aminoacídica de los derivados de BP100 diseñados para expresar en planta. La graduación de color indica la orientación de la secuencia de aminoácidos.

Debido a que pequeñas modificaciones en la secuencia primaria de péptidos pueden resultar en un cambio de actividad (Javadpour *et al.*, 1996; Oard *et al.*, 2004; Badosa *et al.*, 2007), se sintetizaron químicamente los PAM descritos anteriormente y se determinó *in vitro* su actividad antibacteriana contra las especies patógenas modelo *Ea*, *Pss* y *Xav* mediante análisis de las cinéticas de crecimiento bacteriano en presencia de concentraciones crecientes de cada uno de estos péptidos (técnica de *bioscreen*). Los péptidos sintéticos requeridos para los ensayos de actividad en esta tesis, fueron sintetizados en el Laboratori d'Innovació en Processos i Productes de Síntesi Orgànica (LIPPSO) situado en el Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona y bajo la supervisión de E. Bardají. Los resultados se presentan en la tabla IV.5. La adición de la secuencia de retención a RE mejoró el nivel de actividad antibacteriana, siendo para BP214 (correspondiente a BP134 más KDEL) respecto BP100, 10 veces mayor contra *Xav* y 3 veces mayor contra *Pss* y *Ea*. Por otra parte, las multimerizaciones afectaron también de forma importante la actividad antibacteriana. Los péptidos BP213 y BP217, ambos dímeros invertidos, resultaron ser los más activos con valores de CMI de 10 y 40 veces mayores que BP134 contra *Xav*, y 3 veces mayores contra *Pss* y *Ea*. Por lo contrario, los péptidos BP192 (dímero directo de BP134) y BP216 (trímero directo de BP134) presentaron valores de actividad antibacteriana muy similares a BP134. Sólo el dímero BP192 mostró actividad contra *Xav* 3 veces superior a BP134. Así, en contra de lo esperado, dos o tres copias de una molécula activa dispuestas en tándem no mostraron proporcionalmente mayor actividad que la molécula de BP134 original.

La toxicidad de péptidos frente a células eucariotas puede analizarse a través de su capacidad de lisis de eritrocitos humanos (Ferré *et al.*, 2006; Badosa *et al.*, 2007; Polyansky *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos para nuestros derBP100 se compararon con el grado de hemólisis obtenido con la molécula de referencia melitina, un PAM natural altamente hemolítico. Este ensayo se realizó con la finalidad de obtener una estimación del grado de toxicidad de los PAM derBP100 sobre las células eucariotas vegetales que debían producirlos en planta. La capacidad de hemólisis de los derBP100 ensayados parece aumentar con la longitud de los mismos, siendo ligeramente inferior a BP134 únicamente en BP214 (BP134 más

KDEL); aumentando fuertemente para BP192 (68%) y llegando a valores próximos al 100% en BP213, BP216 y BP217 (92%, 98% y 100% a 150 μ M del péptido, respectivamente), péptidos de 30, 45 y 48 aminoácidos.

Tabla IV.5: Propiedades de los derivados de BP134 sintetizados químicamente. La actividad antibacteriana se analizó contra las bacterias *E. amylovora* (*Ea*), *P. syringae* pv. *syringae* (*Pss*) and *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*)

Péptido derivado de BP100	# Amino-ácidos	Actividad antibacteriana*			Actividad hemolítica**
		<i>Ea</i>	<i>Pss</i>	<i>Xav</i>	
BP134	11	1	1	1	1
BP214	15	3	3	10	0
BP192	30	1	1	3	3
BP213	30	3	3	10	4
BP216	45	1	1	1	4
BP217	48	3	3	40	5
BP100	11	2,5-5,0	2,5-5,0	5,0-7,5	22,0 \pm 2,8

* Para los derBP100 la actividad antibacteriana se expresa en forma de ratio respecto BP100. La CMI de BP100 se expresa en μ M (Badosa *et al.*, 2007).

Ea, *Erwinia amylovora*; *Pss*, *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*; y *Xav*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *Vesicatoria*.

** La actividad hemolítica se determinó a 150 μ M y para BP100 se expresa en % de hemólisis relativo al péptido melitina.

Para BP134 y sus derivados se expresa en forma de ratio respecto BP100.

Diseño de secuencias génicas

El diseño de la construcción génica a transformar es fundamental para la expresión de proteínas en plantas. Los elementos génicos reguladores (promotor, terminador, *enhancers*) resultan esenciales para obtener la expresión deseada. Entre los posibles tipos de promotores existen aquellos constitutivos, que presentan actividad de transcripción en todos los tejidos de la planta permitiendo la acumulación de grandes cantidades de proteína. Ejemplos de promotores constitutivos fuertes que se utilizan en plantas MG son el promotor del virus del mosaico de la coliflor *CaMV 35S* (Epple *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2000; Tyagi, *et al.*, 2001, Iwai *et al.*, 2002; Alan *et al.*, 2004.), confiriendo elevados niveles de transcripción en plantas dicotiledóneas y muy utilizado en tabaco; o el promotor del gen que codifica la ubiquitina de maíz, ubiquitin-1 (*p-ubi*) (Christensen *et al.*, 1992 y 1996), que ha mostrado ser fuerte en arroz y en otros cereales (Toki *et al.*, 1992, Christensen *et al.*, 1996, Coca *et al.*, 2004, Coca *et al.*, 2006). A pesar de resultar normalmente en acumulación de elevadas cantidades de proteína, la expresión constitutiva del transgén no siempre es la deseada, pudiendo presentar

inconvenientes en algunas plantas MG. Por ejemplo, algunas variedades comerciales de maíz resistentes al taladro llevan el transgén de la toxina Bt regulado específicamente a nivel de tallo y polen, de forma que afectarían en menor manera a la planta y la microbiota ambiental. Éste es un ejemplo de promotores específicos de tejido, activos especialmente en determinados tejidos de la planta como raíz (Noh *et al.*, 2011) o semilla (por ejemplo, Takaiwa y colaboradores (2007) obtuvieron una buena acumulación del péptido 7Crp en endospermo de arroz). Los promotores inducibles son regulados por un estímulo exógeno que puede provenir por ejemplo de un estrés biótico o abiótico (Breitler *et al.*, 2004, Moreno *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2010).

El presente trabajo aborda la posibilidad de expresión de transgenes que codifican derBP100 (*derbp100*) en arroz, con especial énfasis en su posible efecto tóxico para la planta MG. Así, y como aproximación inicial, se estimó la conveniencia de utilizar un promotor constitutivo, concretamente, se optó por el promotor *p-ubi*, incluyendo el primer intrón del mismo gen. La introducción de un intrón entre el promotor y el gen de interés se conoce como “*intron-mediated enhancement*” (IME) y ha demostrado aumentar notablemente los niveles de transcripción del mismo (Bartlett *et al.*, 2009; Parra *et al.*, 2011). Finalmente, como terminador se optó por el del gen que codifica la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta combinación de elementos reguladores había sido ya utilizada con éxito en plantas de arroz.

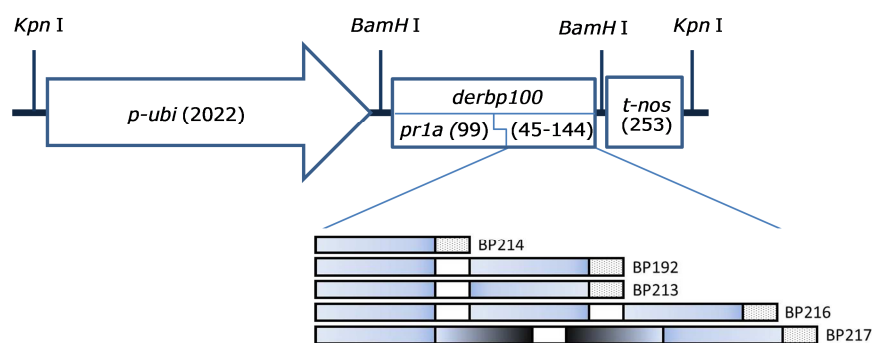


Figura IV.5: Representación esquemática de la construcción genética para expresión de los derBP100 en planta (*derbp100*). Se muestra el promotor del gen de la ubiquitina de maíz (*p-ubi* + intrón) del mismo gen, los péptidos quiméricos fusionados al péptido señal *pr1a* y el terminador del gen que codifica la nopalina sintasa de *Agrobacterium* (*t-nos*). Para cada secuencia genética se muestra el tamaño en pares de bases (pb). Asimismo se muestran las dianas de restricción relevantes para el clonaje.

Más arriba se ha argumentado la localización subcelular de los derBP100 a expresar en planta, el RE. A tal efecto, los 5 derBP100 a expresar en arroz se fusionaron a la secuencia KDEL en el extremo C-terminal; sin embargo su entrada a RE requiere asimismo un péptido señal en el extremo N-terminal. Así, el diseño de los transgenes *derbp100* incluye la secuencia

correspondiente al péptido señal de la proteína relacionada con la patogénesis PR1a de tabaco, que se ha mostrado efectiva en arroz (Cornelissen *et al.*, 1987). La construcción final de los 5 genes *derbp100* a transformar en arroz se presenta esquemáticamente en la figura IV.5., mostrándose los distintos elementos génicos que las componen así como las dianas de restricción más relevantes.

Síntesis de secuencias génicas

El uso de codones preferentes de la especie a transformar es un factor importante a tener en cuenta para la síntesis de proteínas heterólogas en plantas. Las secuencias que codifican los péptidos quiméricos derBP100 (incluyendo el péptido señal PR1a y KDEL) se adaptaron al uso de codones preferente del arroz (*Oryza sativa ssp. japonica*). Por ejemplo, la lisina (K) está codificada en el gen original de la CecA, (péptido modelo de la serie BP y procedente de la polilla *Hyalophora cecropia*) por el codón AAA, el cual se modificó por AAG, preferente en plantas monocotiledóneas. Otras modificaciones son los codones de la valina (GTT en el gen de insecto, GTC en el gen sintético) e isoleucina (ATT en el gen de insecto, ATC en el gen sintético). Las secuencias génicas de los *derbp100* (con la secuencia de aminoácidos debajo) se presentan en las figuras IV.6 y IV.9.

Las secuencias del monómero *bp214*, del dímero *bp192* y del trímero, *bp216* se sintetizaron mediante la técnica de PCR recursiva (Promodrou y Pearl, 1992). Esta técnica se utiliza para la generación de genes sintéticos a partir de la superposición de múltiples cebadores sin la necesidad de un ADN molde. Promodrou y Pearl diseñaron la técnica para simplificar la síntesis de genes sin necesidad de fosforilar los nucleótidos. El primer gen que sintetizó fue a partir de 10 cebadores y tuvo un tamaño de 522 pb. Para la síntesis de *bp214*, *bp192* y *bp216* se utilizaron 4 cebadores de tamaños entre 71 y 85 pb. Dos de ellos son internos y dos externos. Los internos contienen dos regiones complementarias, una entre ellos y otra con el cebador externo más próximo a cada uno. Para ello se diseñaron los cebadores *PR1a.1_for* (80-mero), *BP100.1_rev* (75-mero), *BP100.2_for* (79-mero) y *BP100.3KDEL_rev* (87-mero) que conforman juntos un fragmento de 261 pb que codifica la secuencia del *derbp100* trímero (*bp216*). La secuencia de los cebadores se presenta en la tabla III.13 y su hibridación se representa esquemáticamente en la figura IV.7.

A) *bp214*

atag ggatcc gag gcc acc **atg** ggc ttc gtc ctc ttc tcc caa ctc cca tcc ttc ctc ctc gtc tcc acc
BamH I M G F V L F S Q L P S F L L V S T
ctc ctc ctg ttc ctc gtg atc tcc cac tcc tgc cgc gcc aag aag ctc ttc aag aag atc ctc aag tac
L L L F L V I S H S C R A K K L F K K I L K Y
ctc aag gac gag ctc **tga** taat ggatcc tata
L K D E L *BamH I*

B) *bp192*

atag ggatcc gag gcc acc **atg** ggc ttc gtc ctc ttc tcc caa ctc cca tcc ttc ctc ctc gtc tcc acc
BamH I M G F V L F S Q L P S F L L V S T
ctc ctc ctg ttc ctc gtg atc tcc cac tcc tgc cgc gcc aag aag ctc ttc aag aag atc ctc aag tac
L L L F L V I S H S C R A K K L F K K I L K Y
ctc gcc ggc cca gcc aag aag ctc ttc aag aag atc ctc aag tac ctc aag gac gag ctc **tga** taat
L A G P A K K L F K K I L K Y L K D E L
ggatcc tata
BamH I

C) *bp216*

atag ggatcc gag gcc acc **atg** ggc ttc gtc ctc ttc tcc caa ctc cca tcc ttc ctc ctc gtc tcc acc
BamH I M G F V L F S Q L P S F L L V S T
ctc ctc ctg ttc ctc gtg atc tcc cac tcc tgc cgc gcc aag aag ctc ttc aag aag atc ctc aag tac
L L L F L V I S H S C R A K K L F K K I L K Y
ctc gcc ggc cca gcc aag aag ctc ttc aag aag atc ctc aag tac ctc gcc cgc cca gcc aag aag
L A G P A K K L F K K I L K Y L A G P A K K
ctc ttc aag aag atc ctc aag tac ctc aag gac gag ctc **tga** taat ggatcc tata
L F K K I L K Y L K D E L *BamH I*

Figura IV.6.: Secuencias génicas de los péptidos quiméricos *derbp100*. A) *bp214*, B) *bp192* y C) *bp216*. Secuencia de aminoácidos: PR1a en rojo; BP134 en verde, AGPA en negro y KDEL en azul. Secuencia de nucleótidos: los codones de iniciación y terminación se muestran en negrita; la diana de la enzima de restricción se muestra subrayada.

ATAG(---)TTCCACCCTCCTCCTGT	GAAGCTCTCAAGAAGATCCTCAAGTAC(---)CCTCAAGTACCTCGCC
GGTGGGAGGAGGACA(---)CTTCGAGAAGTTCTTCTAGGAGTTCATG	GGAGTTCATGGAGCGGCCGG(---)ATAT

Figura IV.7: Representación esquemática de la hibridación de los cebadores *PR1a.1_for* (80-mero, rojo), *BP100.1_rev* (75-mero, verde), *BP100.2_for* (79-mero, azul oscuro) y *BP100.3KDEL_rev* (87-mero, azul claro).

Debido a que en la técnica de la PCR recursiva los cebadores, con regiones largas de hibridación, se añaden conjuntamente a la mezcla de la reacción, el producto de PCR resultó ser una combinación de gran número de fragmentos, que se resolvían en geles de agarosa (AGE) como un *smear* (figura IV.8A). Entre la mezcla de secuencias pudieron identificarse las correspondientes al monómero, dímero y trímero de los *derbp100*. Para obtener los productos aislados se realizó una segunda amplificación de este producto de PCR. Para ello se diseñó un cebador antisentido, *KDELbam_rev*, el cual hibrida sobre la secuencia *kdel* (única y no repetitiva en cada una de los fragmentos) e incluye una diana de restricción *BamH I* en su extremo 5'. Esta diana se añadió también al cebador sentido diseñado para esta misma reacción, *PR1a_for*, que hibrida sobre la secuencia correspondiente al péptido señal *pr1a*. La diana *BamH I* se utilizó para subclonar los fragmentos codificantes de *derbp100* al vector intermediario *pAHC16* (ver más adelante). El producto obtenido de esta segunda reacción de PCR se analizó mediante electroforesis de gel de agarosa, pudiéndose identificar una mezcla de productos ADN de diferentes tamaños. Entre las bandas identificables en el gel de agarosa destacan tres de los tamaños esperados para el monómero (176 pb), el dímero (216 pb) y el trímero (261 pb) de *derbp100*. Debido al parecido tamaño de los fragmentos, no pudieron aislarse a partir de este gel (figura IV.8B). Con el objetivo de aislar las 3 secuencias de interés, el producto de la re-amplificación de la PCR recursiva se purificó mediante columnas de afinidad y se ligó en el vector comercial *pGEM[®] T-Easy* mediante el método de *T/A cloning*. El producto de ligación se transformó a células competentes *E. coli* XL1 Blue y los transformantes positivos se seleccionaron mediante una reacción de PCR convencional con los oligonucleótidos *PR1a_for* y *KDELbam_rev*. Así, se pudieron identificar clones para cada una de las 3 secuencias esperadas (ver los productos de PCR resueltos en AGE (figura IV.8C), de tamaños correspondientes a los *derbp100* (*bp214*, *bp192* y *bp216*) cuyas secuencias se corroboraron por secuenciación.

Las dos secuencias restantes, ambas con estructura de dímero pero con las secuencias orientadas en sentido opuesto, se diseñaron también con una diana *BamH I* en cada extremo (figura IV.9). Corresponden a *bp213* y *bp216*, e incorporan dos copias de *bp134* en el primer caso, y de *bp134* fusionado a un fragmento de 9 aminoácidos del PAM natural melitina en el segundo. Las secuencias codificantes de estos PAM fueron sintetizadas y clonadas en el plásmido *pUC57* por la casa comercial *GenScript*.

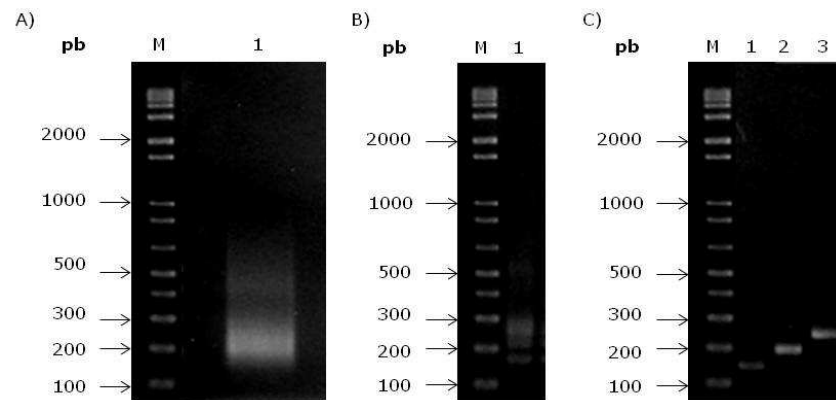


Figura IV.8: Resolución en gel de agarosa (AGE) al 2% de productos PCR. **A)** Producto de PCR recursiva para la síntesis de los genes quiméricos de interés derivados de *derbp100*. **B)** Mezcla de fragmentos obtenida en la re-amplificación por PCR del producto de PCR recursiva, utilizando los oligonucleótidos *PR1a_for* y *KDELbam_rev*. **C)** Productos de PCR correspondientes a las secuencias *bp214* (línea 1), *bp192* (línea 2) y *bp216* (línea 3). M: marcador de peso molecular 1kb plus; indicado a la izquierda el tamaño de algunos pesos moleculares.

A) *bp213*

atag ggatcc gag gcc acc **atg** ggc ttc gtc ctc ttc tcc caa ctc cca tcc ttc ctc ctc gtc tcc acc
BamHI M G F V L F S Q L P S F L L V S T
ctc ctc ctg ttc ctc gtg atc tcc cac tcc tgc cgc gcc aag aag ctc ttc aag aag atc ctc aag tac
L L L F L V I S H S C R A K K L F K K I L K Y
ctc gcc ggc cca gcc ctc tac aag ctc atc aag aag ttc ctc aag aag aag gac gag ctc **tga** taat
L A G P A L Y K L I K K F L K K K D E L
ggatcc tata
BamHI

B) *bp217*

atag ggatcc gag gcc acc **atg** ggc ttc gtc ctc ttc tcc caa ctc cca tcc ttc ctc ctc gtc tcc acc
BamHI M G F V L F S Q L P S F L L V S T
ctc ctc ctg ttc ctc gtg atc tcc cac tcc tgc cgc gcc aag aag ctc ttc aag aag atc ctc aag tac
L L L F L V I S H S C R A K K L F K K I L K Y
ctc acc acc ggc ctc cca gcc ctc atc tcc gcc ggc cca gcc tcc atc ctc gcc cca ctc ggc acc acc
L T T G L P A L I S A G P A S I L A P L G T T
ctc tac aag ctc atc aag aag ttc ctc aag aag aag gac gag ctc **tga** taat ggatcc tata
L Y K L I K K F L K K K D E L *BamHI*

Figura IV.9.: Secuencias génicas de los péptidos quiméricos *derbp100*: A) *bp213* y B) *bp217*. Secuencia de aminoácidos: PR1a en rojo, BP134 en verde, melitina (10-18) en naranja, AGPA en negro y KDEL en azul. Secuencia de nucleótidos: los codones de iniciación y terminación se muestran en negrita; la diana de la enzima de restricción se muestra subrayada.

IV.2.2 Estrategia de clonaje versátil

La transformación de plantas de arroz por *Agrobacterium* se realizó mediante un sistema de vectores binarios, en el que un vector incorpora los genes de virulencia del plásmido inductor de tumores de *Agrobacterium* (plásmido *pTi*); y un segundo vector que incorpora el ADN de transferencia (*T-DNA*) con la secuencia de interés y el gen de selección. Los vectores de transformación utilizados en este estudio son derivados del plásmido *pCAMBIA*, el cual es un vector comercial básico que incorpora las regiones necesarias para preparar el vector de transformación. Incluye el gen de selección, la región de múltiple clonaje (*polylinker*) y las secuencias que delimitan el *T-DNA*, RB (*Right Border*) y LB (*Left Border*). En esta tesis se realizaron transformaciones con dos genes de selección diferentes, que codifican respectivamente la proteína verde fluorescente (*gfp*) y la neomicina fosfotransferasa (*hpt II*), que confiere resistencia a la higromicina. Los vectores de transformación originarios, que posteriormente se modificaron, fueron *pCAMBIA0390* y *pCAMBIA1300*, respectivamente.

La combinación en un único vector de transformación del gen de selección y uno de los genes de interés (codificantes de PAM) se abordó mediante un diseño de clonaje versátil aplicable a todos los clonajes (figura IV.10). Las secuencias codificantes de los genes de interés (*derbp100*) son de tamaños pequeños, comprendidos entre 176 y 261 pb, por lo que se requirió el uso de un vector intermediario de tamaño menor que los *pCAMBIA* (en este caso, *pAHC16*) para introducir estas secuencias entre los elementos reguladores. Todas las secuencias *derbp100* tienen en sus extremos la diana *BamH I*; y los elementos reguladores *p-ubi* y *t-nos* están en *pAHC16* flanqueados, en la parte interna, por *BamH I* (lo cual permitió el clonaje de *derbp100*). El promotor *ubi* (con el primer intrón del mismo gen) y *t-nos* están flanqueados externamente por la diana de restricción *Kpn I*, la cual se utilizó en todos los casos para introducir el *cassette* de expresión (*p-ubi::derbp100::t-nos*) en los correspondientes vectores de transformación *pCAMBIA*.

Para la construcción del vector de transformación con el gen de selección *gfp*, se utilizó como vector base *pCAMBIA0390*. En este vector, las secuencias RB y LB únicamente flanquean la región de múltiple clonaje o *polylinker* del plásmido *pUC9*. Para el clonaje del gen de selección *gfp* se utilizó la diana *Hind III* situada en el *polylinker*. Debido a que el vector *pCAMBIA0390* no contenía la diana *Kpn I*, necesaria para el subclonaje del *cassette* de interés con *derbp100*, ésta se introdujo mediante el *cassette* de *gfp*, el cual se modificó por PCR introduciendo en su extremo 5' las dianas *Hind III* y *Kpn I*. Para los clonajes con el gen de selección *hpt II* se utilizó directamente el vector *pCAMBIA1300*, que incorpora la diana de restricción *Kpn I* en su *polylinker* y el gen de selección de resistencia a higromicina (*hpt II*).

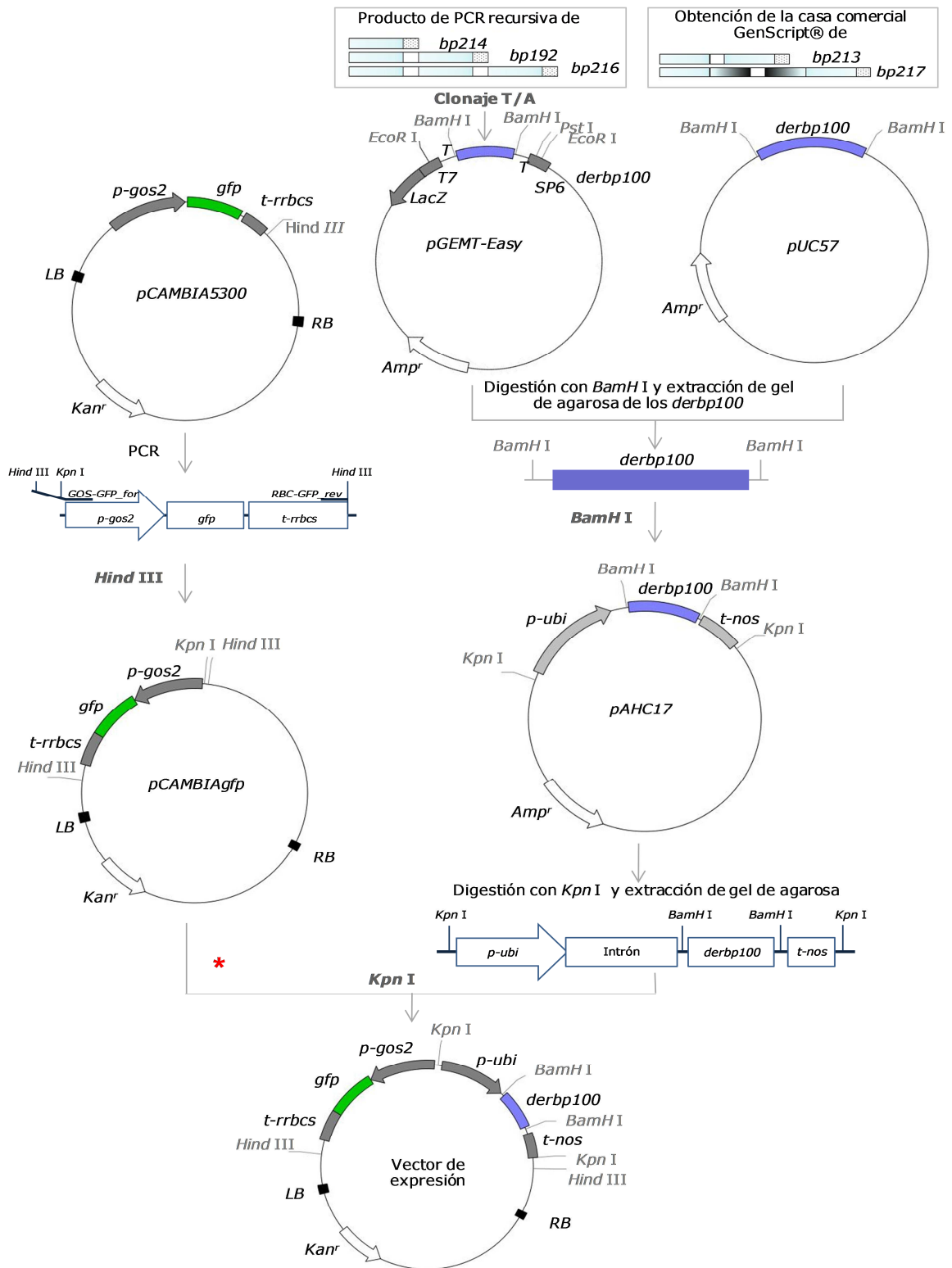


Figura IV.10: Esquema del diseño de clonaje para la obtención de los vectores de transformación con los genes de interés que codifican para los derBP100 y el gen de selección que codifica la proteína verde fluorescente. * El subclonaje se realizó con el vector *pCambia1300* que lleva incorporado el gen marcador de resistencia a higromicina (ver apartado IV.2.6).

IV.2.3 Construcción de los vectores intermediarios

El vector *pAHC17* cedido por la Dra. B. San Segundo (CRAG, Barcelona) incorpora los elementos reguladores necesarios para la expresión de *derbp100*. Para su utilización, el plásmido se preparó eliminando un fragmento no requerido que estaba situado entre los elementos reguladores. Para ello se digirió *pACH17* con la diana *BamH I* y sin necesidad de una desfosforilación se procedió a la reacción de ligación. Con este procedimiento se eliminó la secuencia no deseada obteniendo el ADN circular *pAHC16*. El vector se transformó a células de *E. coli* XL1 Blue, las cuales se seleccionaron por PCR convencional con los oligonucleótidos *UBIfi_for* y *tNOS_rev*. Una vez preparado el plásmido intermediario, se linearizó de nuevo con el enzima de restricción *BamH I*, que presenta una única diana en *pAHC16* entre los elementos reguladores *p-ubi* y *t-nos*. Seguidamente se desfosforiló con la fosfatasa alcalina (CIP) y purificó. Los plásmidos *pGEM[®] T-Easy* o *pUC57* que contenían las secuencias *bp214*, *bp192*, *bp216*, *bp213* y *bp217* se digirieron con *BamH I*, los productos de digestión se separaron en geles de agarosa y las secuencias de interés *derbp100* se extrajeron y purificaron. Finalmente se procedió a la ligación siguiendo la metodología descrita en el apartado III.A.6.

Los transformantes positivos se seleccionaron mediante una PCR con los oligonucleótidos *UBIfi_for* y *KDELBam_rev*, que permitía no sólo detectar la incorporación del fragmento *derbp100* sino la orientación deseada del mismo, entre el promotor y el terminador. Se seleccionaron aquellos clones que dieron lugar a una banda de unos 1200 pb (variable según el *derbp100*) en AGE. Los insertos completos se secuenciaron para descartar posibles mutaciones que modifiquen la secuencia inicial. Los resultados de secuenciación confirmaron las secuencias esperadas para aquellos clones seleccionados; de forma que finalmente, se cultivaron en medio LB líquido para conservación de glicerizados y purificación de plásmido para su posterior uso.

IV.2.4 Construcción de los vectores de transformación

Obtención del gen marcador *gfp* que codifica la proteína verde fluorescente

En el proceso de transformación de plantas, para identificar y seleccionar las células vegetales que hayan incorporado el transgén se necesita un gen marcador. Inicialmente se optó por la utilización del gen marcador *gfp* y no por uno de resistencia a antibiótico debido a la limitación establecida en la regulación de la Unión Europea (2001/18/EC) respecto a la liberación al medio de plantas transgénicas con genes marcadores codificantes de resistencia a antibióticos. Los elementos reguladores para el gen de selección fueron el promotor del gen *gos2* (que codifica el factor de iniciación SUI/eIF1 (de Pater *et al.*, 1992)) y el terminador del

gen *rrbcs* (que codifica la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa, RuBisCo), ambos procedentes de la especie *Oryza sativa* y que confieren elevados niveles de expresión. La secuencia *gos2:gfp:rrbcs* se obtuvo a partir del vector *pCAMBIA5300* cedido por la Dra. B. San Segundo, mediante PCR utilizando los cebadores *GOS-GFP_for* y *RBC-GFP_rev* (figura IV.11). El cebador sentido incluye las dianas *Kpn* I y *Hind* III, ésta última para permitir el subclonaje del *cassette* en el vector *pCAMBIA0390* y obtener así el vector *pCAMBIAgfp*. El cebador *rrbcs_rev* hibrida sobre el extremo 3' de la secuencia a amplificar, sin ninguna diana adicional ya que ésta ya incorpora la diana necesaria *Hind* III. El producto de PCR se analizó mediante AGE, detectándose el fragmento esperado de unos 3400 pb (figura IV.12).

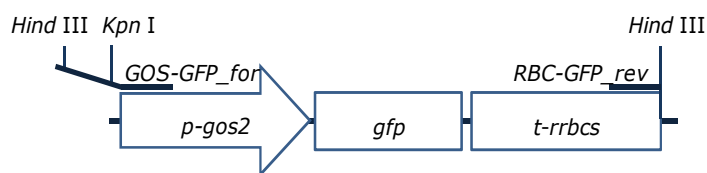


Figura IV.11: Representación esquemática del fragmento correspondiente al gen de selección *gfp* con los elementos reguladores, el promotor *p-gos2* y el terminador *t-rrbcs*. Se indican las dianas de restricción relevantes así como los cebadores utilizados para la obtención del *cassette*.

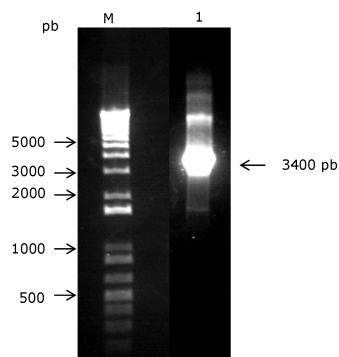


Figura IV.12: AGE al 1% para la resolución del fragmento amplificado *p-gos2::gfp::t-rrbcs* a partir del vector *pCAMBIA5300* mediante PCR realizada utilizando una polimerasa de elevada fidelidad (*High Expand Fidelity*). M: Marcador de peso molecular; 1: fragmento *p-gos2::gfp::t-rrbcs* de unos 3400 pb.

Subclonaje de *gfp*

Para poder subclonar el fragmento *p-gos2::gfp::t-rrbcs* se digirió el vector base *pCAMBIA0390* con el enzima de restricción *Hind* III, obteniendo el plásmido lineal (debido a la presencia de una única diana *Hind* III en la región de múltiple clonaje). Seguidamente se procedió a la desfosforilación de los extremos 5' para evitar la ligación intramolecular del vector. El inserto *p-gos2::gfp::t-rrbcs*, previamente purificado mediante columnas de afinidad, se digirió también

con *Hind* III para la obtención de extremos cohesivos complementarios a los extremos del vector. La ligación se realizó a una relación molar de 10:1 (inserto:vector) (III.A.6). La selección de los transformantes que contenían el inserto se realizó mediante PCR con los cebadores *GGFSc_for* y *GGFSc_rev*. Estos cebadores son específicos del promotor *p-gos2* y amplifican un fragmento de 362 pb. La determinación de la orientación del inserto en los clones seleccionados se realizó mediante una PCR con los cebadores *pUCGF_rev* y *pUCGF_for*. Se seleccionaron aquellos clones que llevaban el inserto en la dirección *Hind* III/*p-gos2::gfp::t-rrbcs*/*Kpn* I/*Hind* III los cuales permitieron la amplificación de un fragmento del tamaño deseado, que se visualizó en gel de agarosa. Se realizaron cultivos puros de todos los clones positivos y se conservaron glicerizados. La posición del *cassette* de expresión de *gfp* en el resultante vector de transformación *pCAMBIAgfp* se muestra en la figura IV.13.

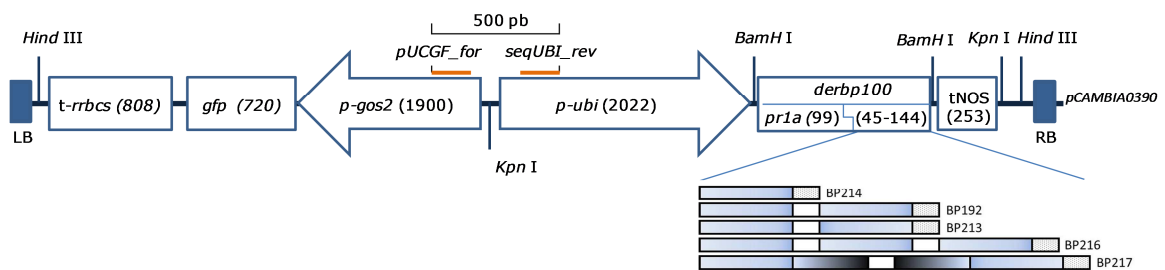


Figura IV.13: Representación esquemática de los *cassettes* de expresión introducidos en el vector de transformación *pCAMBIA* para la generación del *T-DNA*. Del extremo 5' al extremo 3' se muestra el elemento LB (*Left Border*); el *cassette* de expresión de la GFP flanqueado con la diana *Hind* III y que incluye el terminador de la RuBisCo (*t-rrbcs*, de 808 bp), el gen codificante de la proteína GFP (720 pb) y el promotor *p-gos* (1900 pb); el *cassette* de expresión que codifica los derBP100 flanqueado por la diana *Kpn* I y que incluye el promotor e intrón de la ubiquitina de maíz (*p-ubi*, 2022 pb), las dianas *BamH* I que flanquean los péptidos quiméricos *derbp100*, [fusión del péptido señal *pr1a* (99 pb) y las secuencias de 45 pb (*bp214*), 90 pb (*bp192*), 90 pb (*bp213*), 135 pb (*bp216*) y 144 pb (*bp217*)], el terminador de la nopalina sintasa de *Agrobacterium* (*t-nos*, 253 pb) y el elemento RB (*Right Border*). Sobre los promotores *p-gos* y *p-ubi* se indica en color naranja la hibridación de los cebadores sentido *pUCGF_for* y antisentido *seqUBI_rev*, respectivamente, para la obtención del producto de PCR específico de orientación de 500 pb.

Subclonaje de los genes de interés *derbp100*

Para subclonar los *cassettes* con el gen de interés *p-ubi::derbp100::t-nos* se linearizó y desfosforiló el vector de transformación *pCAMBIAgfp* con los enzimas *Kpn* I y fosfatasa alcalina, respectivamente. Los vectores intermediarios *pAHC16::derbp100* se digirieron con *Kpn* I, obteniéndose un fragmento de unos 2500 pb (variable en función del *derbp100*). Éstos se extrajeron de gel de agarosa y se purificaron con columnas de afinidad. Finalmente, se subclonaron mediante ligación en el vector de transformación *pCAMBIAgfp*. La selección de los transformantes positivos se realizó mediante una reacción de PCR con los cebadores

pUCGF_for y *seqUBI_rev*. El cebador sentido hibrida sobre el promotor *p-gos2* y el cebador antisentido hibrida sobre el promotor *p-ubi*. Se seleccionaron aquellos clones que habían incorporado el *cassette* de interés en el sentido deseado, es decir, de forma que los dos genes se orientaban en sentido opuesto. El producto de PCR resultante para los clones seleccionados correspondió a un fragmento de 500 bp. Todos los vectores aislados se secuenciaron con el oligonucleótido *seqUBI_rev*. En la figura IV.13 se representa esquemáticamente la posición del *cassette* de expresión de los *derbp100* en el vector de transformación.

IV.2.5 Generación de plantas de arroz MG S-*derbp100* mediante transformación por *Agrobacterium*

Para la síntesis de los *derBP100* en planta se procedió a la transformación por *Agrobacterium* de callos embriogénicos de arroz de la variedad Senia. El procedimiento aplicado ha estado diseñado muy detenidamente y ha dado en muchas ocasiones buenos resultados (Breitler *et al.*, 2004; Coca *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2005; Coca *et al.*, 2006). Las transformaciones presentadas se realizaron en el Institut de Recerca de Tecnologia Agrolimentàries (IRTA) en Cabrils y bajo la supervisión de los Dres. J. Messeguer y E. Melé. Como material vegetal de partida se utilizaron callos embriogénicos, ya que han demostrado ser más eficientes que embriones cigóticos inmaduros (Cheng *et al.*, 1998). La cepa utilizada para la transformación fue *Agrobacterium* EHA105, la cual está preparada con el vector de virulencia que permite la transferencia del *T-DNA* de un vector binario. La cepa *Agrobacterium* EHA105 se transformó con cada uno de los vectores de transformación obtenidos (que nombramos genéricamente *pCAMBIAgfp::derbp100*). La transferencia del plásmido se comprobó por PCR convencional.

Se seleccionaron detenidamente callos embriogénicos bajo estereomicroscopio, y se utilizaron unos 600 callos por transformación. De las primeras transformaciones realizadas se obtuvieron entre 10 y 30 callos que presentaban fluorescencia. La evolución de los callos varió en función de la construcción, observando variaciones en la intensidad de la fluorescencia emitida, siendo la construcción correspondiente a *bp217* la que emitía más intensamente (figura IV.14). Para las otras construcciones la emisión de fluorescencia se mantuvo durante unas pocas semanas y se perdió completamente. Los callos con las construcciones correspondientes a *bp214*, *bp213*, *bp216* y *bp192* tuvieron que descartarse todas, no habiéndose podido generar masas de callo fluorescentes (transgénicas). Por lo contrario los callos con la construcción de *bp217* mantuvieron la fluorescencia y finalmente llegaron a regenerar 18 plántulas a partir de 10 callos independientes. La mayor parte de ellas no sobrevivieron más que unos días, y únicamente 7 llegaron a la madurez fisiológica y produjeron semillas.

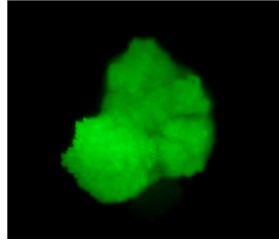


Figura IV.14: Imagen obtenida bajo el estereomicroscopio de fluorescencia de un callo de arroz Senia transformado con el vector *pCAMBIAgfp::bp217*.

Debido a que la técnica de transformación utilizada depende en gran medida del estado del material vegetal y de su manipulación, no se descartó la posibilidad que durante el proceso de transformación se produjera algún problema que resultara en una muy baja eficiencia de transformación. La selección del material vegetal es sin duda una parte muy importante de la transformación, pudiendo dar lugar a eficiencias de transformación bajas o incluso nulas, si no se seleccionan callos embriogénicos adecuados. Éstos se distinguen por su textura y color, mostrando un aspecto más hidratado y con un color más claro que el resto. Se distinguen también por la zona de crecimiento, concretamente alrededor de la semilla como se muestra en la figura IV.15.



- ← Nódulos de callo embriogénico crecidos alrededor de la semilla, de aspecto bien hidratado
- ← Nódulos con un aspecto más irregular, no adecuados para la transformación genética

Figura IV.15: Formación de callo embriogénico después de transferir la semilla germinada con medio N6 suplementado con la hormona de inducción de callo 2,4-D y un período de incubación de aproximadamente 2 semanas a 25 °C en la oscuridad.

Así pues, las transformaciones con los plásmidos correspondientes a *bp214*, *bp213*, *bp216* y *bp192* se realizaron una segunda vez introduciendo en el proceso la construcción control *pCAMBIAgfp*, la cual incorpora únicamente el gen de selección *gfp*. Con este segundo bloque de transformaciones se descartó la mala selección del material vegetal como causa de los resultados obtenidos en el experimento anterior. Los resultados fueron sólo ligeramente más satisfactorios. De todas las construcciones, excepto la correspondiente a *bp192*, se obtuvieron callos fluorescentes que pudieron mantenerse satisfactoriamente en medio de cultivo específico para callos, aunque mostraron en todos los casos muy reducida emisión de fluorescencia. No obstante, en todos los casos (excepto callos obtenidos en el primer

experimento para *bp217*) la transferencia a medio de regeneración y fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad resultó letal, necrosándose los callos por completo. La transformación con el plásmido control tuvo lugar según se esperaba, y todos los callos que mostraron fluorescencia dieron lugar a plantas regeneradas. La evidente alteración celular de los callos transformados con genes que codifican derivados de BP134 pareció sugerir de manera indirecta la síntesis de PAM en estos callos, así como su toxicidad para la planta huésped. Los derivados de BP100, incluso los que tienen una actividad hemolítica muy baja, parecen presentar un cierto grado de toxicidad, siendo ésta letal para la célula vegetal durante ciertas fases de su desarrollo.

El resumen de las transformaciones de genes que codifican derivados de BP100 con el gen de selección de *gfp* se muestra en la tabla IV.6, que evidencia la poca o nula eficiencia de transformación y regeneración de plantas que incorporan este tipo de construcciones.

Tabla IV.6: Resumen de las transformaciones realizadas con el gen de selección de *gfp*. Se indica el *derbp100*, y la obtención de callos que exhiben el carácter de selección (fluorescencia) para cada uno de los experimentos de transformación realizados (bloques 1 y 2), indicando con una cruz roja las transformaciones que no dieron lugar a callos positivos, con el símbolo verde las transformaciones de las cuales se obtuvieron callos fluorescentes y n.r para los ensayos no realizados. Se indica asimismo el número total de callos de los que se obtuvo regeneración de plántulas y el de plantas que resistieron el proceso de aclimatación, con el porcentaje respecto el número de callos regenerados entre paréntesis

<i>derbp100</i>	Callos fluorescentes		Callos regenerados	Plantas viables
	Bloque 1	Bloque 2		
<i>bp214</i>	X	✓	0	-
<i>bp192</i>	X	X	-	-
<i>bp213</i>	X	✓	0	-
<i>bp216</i>	X	✓	0	-
<i>bp217</i>	✓	n.r	10	2 (20%)
Control	n.r	✓	14	14 (100%)

Análisis molecular de los callos transgénicos

Análisis de expresión mediante RT-qPCR

Los resultados de las transformaciones evidenciaban indirectamente la síntesis de los *derBP100*. Así, se analizaron los callos transformados a nivel molecular para obtener más evidencias de la presencia y expresión de los transgenes de interés. En este punto cabe destacar que el uso de un promotor constitutivo permitió la realización de este análisis a nivel

de callo. Como indicador de la presencia y expresión de los transgenes que codifican derBP100 (genéricamente, *derbp100*) en los callos fluorescentes se determinaron los niveles de ARNm de *derbp100* en tres callos transformados con cada transgén, que se escogieron al azar. A tal efecto se crecieron en medio N6 a 25 °C en la oscuridad. Debido a que los callos transgénicos no poseen una característica positiva como un gen de resistencia a herbicida y para asegurar un material transgénico lo más homogéneo posible, se seleccionaron bajo el estereomicroscopio de fluorescencia durante las 4 primeras transferencias a medio N6 fresco. Una vez obtenida una cantidad suficiente de material fluorescente, se procedió a su análisis.

gfp S65T GenBank: U43284.1

```

1 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac
61 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac
121 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc
181 ctcgtgacca cttcaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag
241 cagcacgact ttttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc
301 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg
361 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac
421 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgaaaagcagaagaac SYGFP_for
481 ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc
541 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcccgacaaccac SYGFP_rev
601 tacctgagca cccagtcogc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc
661 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actcacggca tggacgagct gtacaagtaa

```

Figura IV.16: Secuencia del gen *gfp* sobre la cual se muestran las secuencias de los cebadores *SYGFP_for* y *SYGFP_rev* para la generación de un amplicón específico de 134 pb.

Se extrajo ARN mensajero a partir de estos callos utilizando una técnica basada en el reactivo Trizol (metodología III.C.3), se trató con ADNasa I y se sintetizó ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa (RT) con hexámeros al azar como cebadores. Finalmente, los niveles de ARNm de los *derbp100* se cuantificaron mediante PCR a tiempo real (qPCR). Los análisis qPCR se basaron en el diseño de cebadores específicos para las secuencias codificantes de los *derbp100* y del gen de selección *gfp* (figura IV.16 y IV.17, respectivamente). El ensayo de qPCR para la cuantificación del gen marcador generaba un amplicón de 134 pb con una temperatura de disociación (T_m) de 87,7 °C. La especificidad de los cebadores se comprobó *in silico* mediante el programa *blastN* de la base de datos NCBI. El ensayo de qPCR específico de *derbp100* se diseñó utilizando como diana las regiones comunes entre los 5 *derbp100*, con el objetivo de tener un solo ensayo para todo ellos. Las transformaciones realizadas permitieron obtener callos transgénicos para 4 *derbp100*. Así pues el sistema de cebadores generó cuatro

amplicones de tamaños y temperatura de disociación diferentes, dependiendo del gen a analizar. La figura IV.17 muestra las zonas comunes sobre las cuales se diseñaron los cebadores. Concretamente el cebador sentido se diseñó sobre la zona codificante del péptido señal *pr1a* y el cebador antisentido sobre la secuencia que engloba una parte de la secuencia que codifica la señal de retención a RE KDEL y la diana *BamH I*. Las secuencias 5'-3' para cada uno de los cebadores se muestran en la tabla III.13. Su especificidad se comprobó *in silico* mediante la herramienta *blastN* de la base de datos NCBI. Los amplicones generados con este sistema de cebadores *SYPR1a_for* y *SYKDEL_rev* se muestran en la tabla IV.7.



Figura IV.17: Secuencias comunes de los transgenes *derbp100* sobre las cuales se diseñó el sistema de cebadores de qPCR. Las secuencias específicas de cada *derbp100* se representan con guiones.

Antes de proceder al análisis de expresión se determinó la concentración óptima de cada cebador en la qPCR. Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de metodología (III.A.1, PCR a tiempo real) se seleccionaron las siguientes concentraciones, correspondientes a las combinaciones que resultaban en una mayor fluorescencia específica y la menor señal en los controles negativos: 300 nM para los cebadores *SYGFP_for* y *SYGFP_rev*, 50 nM para *SYPR1a_for* y 100 nM *SYKDEL_rev*.

Tabla IV.7: Tamaño y temperatura de disociación de los amplicones generados de los *derbp100*

<i>derbp100</i>	Tamaño amplicón [pb]	Tm [°C]
<i>bp214</i>	88	79,3
<i>bp213</i>	133	81,2
<i>bp216</i>	178	82,8
<i>bp217</i>	187	84,9

Para que la cuantificación de los niveles de expresión sea fiable y comparable entre muestras, es necesario introducir dos factores adicionales en el ensayo. Por una parte, la eficiencia de

cada reacción. Cada pareja de cebadores tiene una eficiencia de amplificación distinta, que en el caso de *derbp100* también depende de la secuencia diana. Por ello se generó una recta patrón específica para cada ensayo y diana. Sólo de esta forma el cálculo del número de copias de cada gen en cualquier muestra problema dará lugar a resultados comparables. El segundo factor a tener en cuenta es la utilización de genes de referencia o controles endógenos, que deberían mantenerse a niveles transcripcionales estables en distintos tejidos y condiciones. La normalización de los niveles de expresión de los ARNm de interés (*derbp100*) con los de los controles endógenos permite la comparación directa entre muestras. En arroz, se ha descrito que los genes que codifican el factor de elongación *ef-1 α* y *β -actina* son genes de referencia adecuados, ya que se expresan de forma constante en muchos tejidos diferentes y están conservados en la especie *Oryza sativa*. Se diseñaron sistemas de cebadores para ambos genes, se optimizaron las concentraciones según descrito en el apartado III.A.1 (las concentraciones óptimas de los cebadores sentido y antisentido para el sistema *β -actina* fueron de 100 nM y para el *ef-1 α* de 300 nM) y se analizaron las correspondientes rectas patrón. Los valores de las rectas patrón de las reacciones de *gfp*, de los *derbp100* y de los genes endógenos se muestran en la tabla IV.8.

Tabla IV.8: Resultados de las rectas patrón para los genes codificantes de *derbp100*, *gfp* y endógenos. Se indica la pendiente, la ordenada en el origen y R^2

Gen	Pendiente	Ordenada al origen	R^2
<i>gfp</i>	-3,31	37,13	0,998
<i>bp214</i>	-3,62	40,38	0,999
<i>bp213</i>	-3,28	39,26	0,991
<i>bp216</i>	-3,32	41,59	0,998
<i>bp217</i>	-3,53	40,23	0,998
<i>β-actina</i>	-4,06	44,78	0,999
<i>ef-1α</i>	-3,86	41,21	0,998

La figura IV.18 muestra una recta patrón a modo de ejemplo. La recta patrón se genera mediante la representación gráfica de los Ct generados de una serie de muestras a concentraciones de ADN diana conocidas y decrecientes, respecto el logaritmo en base 10 de dichas concentraciones. Pueden calcularse su ordenada en el origen y pendiente (que permite calcular además la eficiencia de la reacción) y su linealidad R^2 .

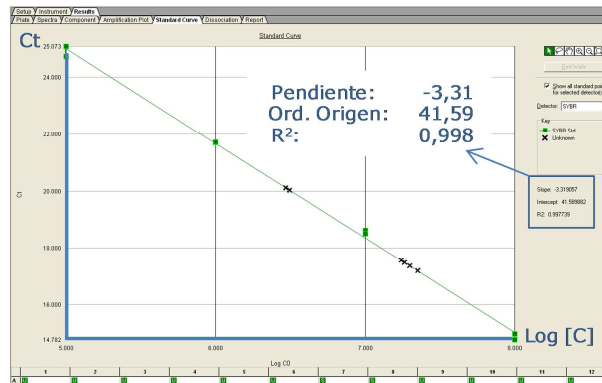


Figura IV.18: Representación gráfica de la recta patrón para la cuantificación de *bp216*, a modo de ejemplo.

Así, 3 callos fluorescentes para cada uno de los *derbp100*, escogidos al azar, se analizaron por duplicado mediante qPCR y para los 4 genes, *derbp100*, *gfp*, *ef-1 α* y *β -actina*. La especificidad de cada reacción se comprobó mediante el análisis de la temperatura de disociación del amplicón, que es única para cada uno de ellos. Con los valores de Ct obtenidos y aplicándolos a la ecuación de recta patrón se calcularon las copias de ARNm de cada gen en cada muestra. Los niveles de expresión del gen de selección y de los transgenes *derbp100* se normalizaron con los niveles de ARNm de los genes endógenos. La utilidad de un gen endógeno para la normalización de los niveles de expresión se determinó con la herramienta *geNORM v.3.4*. Esta herramienta compara los valores de Ct de los genes endógenos para cada una de las muestras entre sí y determina su conservación entre las diferentes muestras, dándole un valor numérico M. Normalmente se considera adecuado un valor M inferior a 0,5. Para ambos genes, *ef-1 α* y de *β -actina*, se obtuvo un valor M inferior a 0,5, confirmando su aplicabilidad. No obstante, el valor M del gen de la *β -actina* fue inferior, de forma que se utilizó este gen como control endógeno para estas muestras. En la tabla IV.9 se recogen los resultados de expresión de *derbp100* y *gfp* normalizados.

Tabla IV.9: Niveles de expresión de los diferentes *derbp100* y *gfp* en callos MG. Se muestra la construcción para la cual se determinaron los niveles de ARNm de *gfp* y *derbp100*. Se representa el nivel de expresión del gen diana relativo al gen endógeno *β -actina*; y la desviación estándar (SD)

<i>derbp100</i>	ARNm normalizado	
	<i>gfp</i>	<i>derbp100</i>
<i>bp216</i>	3,9 \pm 0,9	105,0 \pm 64,3
<i>bp214</i>	3,6 \pm 0,5	39,4 \pm 1,5
<i>bp213</i>	6,6 \pm 1,8	39,6 \pm 21,5
<i>bp217</i>	16,2 \pm 1,5	4,3 \pm 0,5
control	9,0 \pm 5,5	0

Como esperábamos, estos análisis confirmaron la presencia no sólo del transgén *gfp* (que daba lugar al fenotipo de selección) sino también del transgén *derbp100* esperado en todos los callos analizados. Así, se descartó que únicamente aquellas células que habían perdido el *derbp100* fueran viables y dieran lugar a callos fluorescentes.

El gen de selección *gfp* muestra unos niveles de expresión de entre 3- y 16-veces mayor que el gen de referencia, tanto para los callos con alguno de los *derbp100* como para los que únicamente tienen el transgén *gfp* (control). El análisis estadístico ANOVA de un factor no mostró diferencias significativas entre los niveles de expresión en función de la construcción (P -valor=0,573). Los niveles de expresión de los *derbp100* se mostraron generalmente más altos que los del gen de selección, obteniéndose niveles de entre 4- y 100-veces mayores que el gen endógeno. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor y mostraron diferencias significativas (P -valor=0,002). El análisis Tukey-b *posttest* generó dos grupos, separando los callos transformados con *bp217* de los que incorporaban las restantes construcciones. A pesar de no ser estadísticamente significativo, los callos portadores de la construcción con *bp216* presentaron los mayores niveles de *derbp100* observados (tabla IV.9).

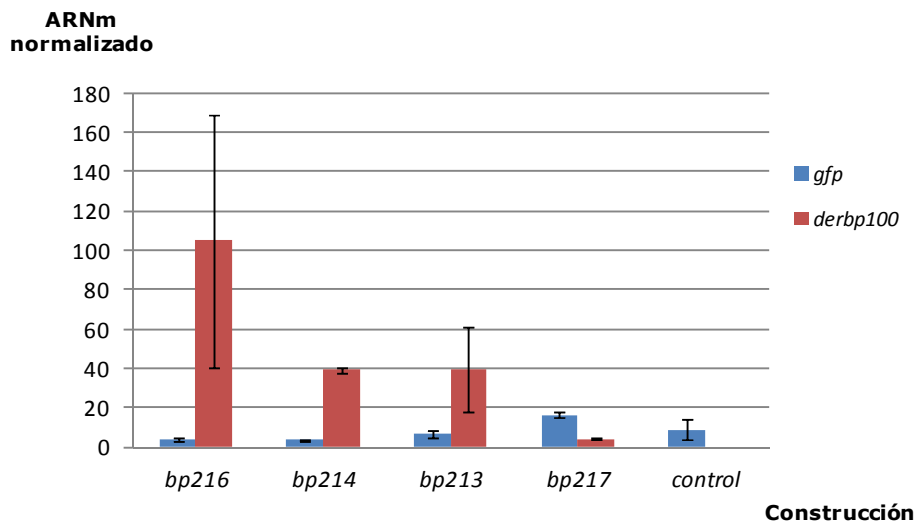


Figura IV.19: Representación gráfica de los niveles de expresión de los distintos *derbp100* y del gen de selección *gfp* en callos MG.

IV.2.6 Análisis del efecto de los transgenes *derbp100* sobre callos y plantas MG

Los resultados de las transformaciones de callos con el gen de selección *gfp* evidencian el efecto negativo de los transgenes *derbp100* (y posiblemente de los productos de estos transgenes, péptidos derivados de BP100) sobre las células vegetales. Para analizar su posible efecto fitotóxico se diseñaron una serie de transformaciones y se monitorizaron las eficiencias de transformación y regeneración para cada uno de los *derbp100*. A tal efecto se utilizó un gen de selección de resistencia a antibiótico, concretamente a la higromicina, para garantizar una mayor fiabilidad de los resultados. Una selección en base a fluorescencia podría subestimar el número de callos transgénicos si su emisión de fluorescencia es muy débil; y por otra parte, una selección positiva favorece la multiplicación de las células transformadas con el gen de selección, incluso en el caso de estar co-transformadas con un gen potencialmente tóxico.

Construcción de los vectores de expresión de *derbp100* con el gen de selección *hpt II*

La estrategia de clonaje versátil diseñada para la construcción de los vectores de expresión utilizados hasta el momento se aplicó para introducir las construcciones génicas *p-ubi::derbp100::t-nos* al nuevo vector de transformación *pCAMBIA1300*. Éste está preparado con la zona de clonaje múltiple de *pUC18* que incorpora la diana de restricción *Kpn I*, que se utilizó en los clonajes. Además, *pCAMBIA1300* incorpora el gen de selección de resistencia a higromicina *hpt II* con sus elementos reguladores. Así pues, los clonajes se llevaron a cabo digiriendo y desfosforilando el vector *pCAMBIA1300* y prosiguiendo con la ligación con los insertos preparados anteriormente. Los productos de ligación se transformaron a células *E. coli* XL1 Blue competentes y se seleccionaron por PCR convencional con los cebadores *PR1a_for* y *KDELBam_rev*. Para evitar interferencias en los procesos de transcripción entre el gen de selección y el gen de interés es conveniente que los *cassettes* de expresión estén orientados opuestamente en del vector de expresión. Así, los clones positivos se sometieron a una segunda selección mediante una PCR con los cebadores *t35S_rev* y *SeqUBI_rev* para seleccionar aquellos en que el transgén *derbp100* se había orientado correctamente. De los clones seleccionados se secuenciaron los transgenes para descartar cualquier modificación en la secuencia nucleotídica. La figura IV.20 muestra un esquema de la construcción de los vectores *pCAMBIA1300::derbp100*.

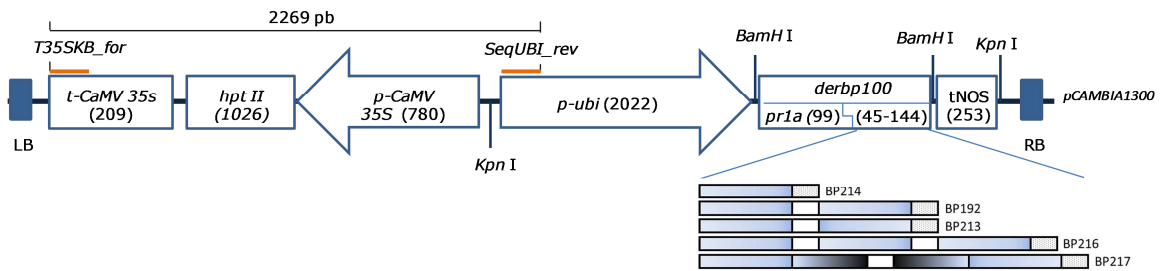


Figura IV.20: Construcción insertada en los vectores *pCambia1300::derbp100* para la transformación genética de arroz. Se indican los elementos LB (Left Border) y RB (Right Border) que flanquean la secuencia del T-DNA para la transformación por *Agrobacterium* así como los elementos reguladores para el gen de selección *hpt II* y los *derbp100*. En paréntesis se indican los tamaños de cada uno de los elementos génicos. Entre los cuales se muestran las dianas de restricción relevantes para la generación de toda la construcción. Las secuencias que generan los péptidos quiméricos con el péptido señal *pr1a* (99 pb) presentan tamaños de 45 pb (*bp214*), 90 pb (*bp192*), 90 pb (*bp213*), 135 pb (*bp216*) y 144 pb (*bp217*). Sobre el terminador *t-CaMV 35s* y el promotor *p-ubi* se indica en color naranja la hibridación de los cebadores sentido *T35SKB_for* y antisentido *seqUBI_rev* para la formación del producto de PCR específico de orientación, de 2269 pb.

Análisis del efecto de los *derbp100* sobre el proceso de transformación de arroz

Se transformaron callos de arroz con los vectores de expresión para cada uno de los genes *derbp100*, en una serie de experimentos que partían de unos 1200 callos por construcción. En cada experimento se incorporó un control que se transformó con *pCambia1300* (únicamente con el gen de resistencia a higromicina, *hpt II*). Se monitorizó el proceso de transformación en base al recuento de callos transformados positivamente (que mostraban el carácter de selección) y al de plantas transgénicas en cada uno de sus estadios (tabla IV.10). Durante el todo el procedimiento resultó clara la diferencia en la eficiencia de transformación con las construcciones portadoras de los genes *derbp100* respecto a la transformación control, corroborando así los resultados obtenidos en el bloque de transformaciones con el gen de selección *gfp*.

La aproximación se basó en observar la evolución de los callos obtenidos para cada construcción. Para cada uno de los plásmidos se registró, después de la infección con *Agrobacterium*, el número de callos que manifestaban resistencia a higromicina. Concretamente para el plásmido control se obtuvieron 110 callos resistentes. Las transformaciones con plásmidos que incluían *bp217* o *bp213* dieron lugar a unos de 80 callos cada una (75% respecto al control). La eficiencia fue notablemente menor para las tres construcciones restantes. Se obtuvieron 43 callos positivos en las transformaciones con *bp214*

(39% respecto al control) y sólo 23 y 20 callos positivos para *bp192* y *bp216*, respectivamente (aproximadamente 20% respecto al control).

Tabla IV.10: Evolución de las transformaciones realizadas con el gen marcador *hpt II*. Para cada *derbp100* se indica el número (y porcentaje respecto a las transformaciones control) de callos resistentes a higromicina, de plantas regeneradas *in vitro*, de plantas aclimatadas y de plantas fértiles productoras de semillas. Finalmente se indica la eficiencia global de transformación en porcentaje respecto al control

Péptido derivado de BP100	Callos resistentes a higromicina	Plántulas regeneradas*	Plantas aclimatadas*	Plantas productoras de semillas*	Eficiencia total del proceso respecto al control
control	110**	80%	100%	100%	
BP214	43 (39%)	21 (61%)	10 (48%)	9 (90%)	10%
BP192	23 (21%)	0 (0%)			<1%
BP213	82 (75%)	20 (30%)	5 (25%)	2 (40%)	2%
BP216	20 (18%)	0 (0%)			<1%
BP217	83 (75%)	8 (12%)	8 (100%)	3 (38%)	3%

* Se transformaron un total de 1200 callos con cada vector de transformación en tres bloques de transformaciones. Cada bloque incluía la transformación control con el vector control pCAMBIA. Se monitorizaron solo callos resistentes a higromicina

** Se procesaron solo 15 de los 110 callos resistentes a higromicina

Para proceder a la generación de plantas MG los callos positivos se transfirieron a medio de regeneración y fueron expuestos a un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Esta parte del proceso evolucionó distintamente en función del *derbp100* transformado. Así pues, los callos transformados con *bp192* y *bp216* no fueron capaces de regenerar planta, y en el caso concreto de *bp192* necrosaban a los pocos días. Por lo contrario, podían mantenerse a lo largo del tiempo en medio especial para callos y en la oscuridad. Los callos transformados con *bp214*, *bp213* o *bp217* evolucionaron positivamente generando plántulas *in vitro*, aunque con una eficiencia reducida obteniéndose 21, 20 y 8 plántulas, respectivamente (61%, 30% y 12% respecto al control, respectivamente). Las plantas regeneradas *in vitro* se seleccionaron por la integridad de su transgén mediante análisis de qPCR (ver apartado IV.2.7) y monitorizar solamente aquellas plantas que habían incorporado el transgén correctamente. Los callos control regeneraron en nuestras condiciones con una eficiencia del 80%.

La aclimatación de las plántulas es un proceso que en arroz acostumbra a evolucionar sin problemas. Se observó que el 100% de las plántulas control se aclimataron y evolucionaron correctamente hasta su floración. En cambio, no todas las plántulas que incorporaban *bp214* o *bp213* llegaron a aclimatarse, superando únicamente 10 y 5 plantas, respectivamente, el cambio de condiciones ambientales. Por lo contrario, las 8 plántulas que incorporaban *bp217* pudieron aclimatarse.

La evolución del proceso de transformación se muestra en la figura IV.21 en la que queda reflejada una eficiencia de obtención de plantas MG notablemente más baja para los *derbp100* que para el control. Estos resultados sugieren un efecto fitotóxico de los *derBP100* contra las células de arroz que los producen de forma constitutiva. No obstante, finalmente pudieron obtenerse 14 plantas fértiles, concretamente 9 eventos independientes para *bp214*, 2 de *bp213* y 3 de *bp217*. Los resultados de la monitorización de la transformación de distintos *derbp100* en arroz evidencian un efecto adverso de estos transgenes sobre callos y plantas transgénicas. Ello sugiere, por una parte, que estas células expresan péptidos antimicrobianos derivados de BP100; y por otra, que éstos tienen diferentes grados de fitotoxicidad. Así pues, *bp192* y *bp216* parecen interferir con la célula vegetal durante la exposición a la luz y regeneración. *bp214*, *bp123* y *bp216* no parecen tener un efecto tan fuerte en estas fases pero parecen presentar cierta toxicidad en fases posteriores.

No obstante, resultaba importante descartar la multiplicación de células transformadas con versiones de *derbp100* truncadas o modificadas de forma que no pudieran expresarse. Ello es especialmente relevante teniendo en cuenta que las transformaciones de *derbp100* con el gen de resistencia *hpt II* resultaron tener una mayor eficiencia que con el gen de selección *gfp*, pues se obtuvieron callos MG para todas la construcciones y éstos se mantuvieron a largo plazo en medio específico para callos. Aun así, para dos de las construcciones, *bp192* y *bp216*, fue nuevamente imposible la obtención de plántulas MG. Por todo ello se creyó oportuno el análisis de expresión de los transgenes a nivel de callo.

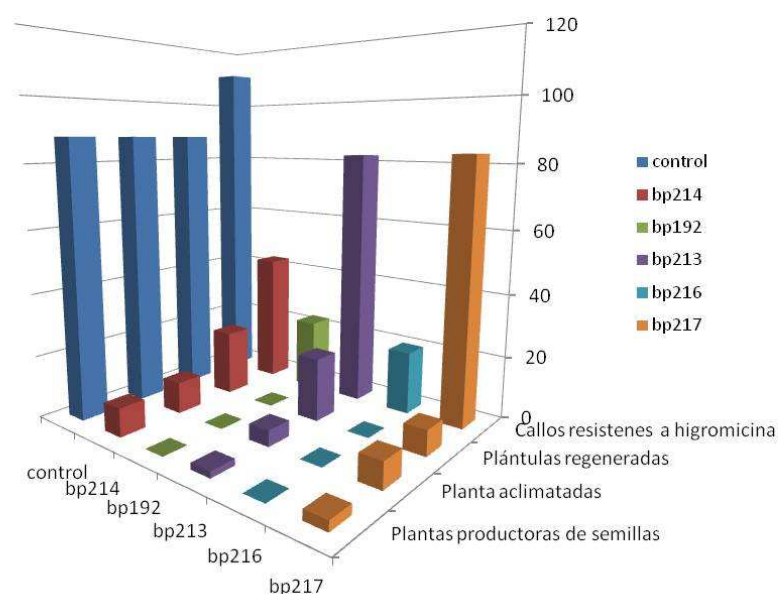


Figura IV.21: Evolución de la transformación de plantas de arroz con *derbp100*. Se muestran los valores absolutos de callos transformados, plántulas regeneradas, plantas aclimatadas y plantas fértiles para cada *derbp100*.

Análisis de expresión de los transgenes en callos MG

Se escogieron, para cada una de las transformaciones, tres callos al azar, de los que se extrajo el ARNm. Éste se trató con ADNasa y se generó ADNc por retrotranscripción utilizando hexámeros al azar como cebadores. Finalmente se cuantificaron por qPCR los niveles de *derbp100* y *hpt II*, siempre en relación al gen endógeno β -actina, como se ha descrito previamente (IV.2.5). Para el análisis de expresión del gen *hpt II* se diseñó el par de cebadores mostrados en la figura IV.22 mediante la herramienta *Primer Blast*, comprobando posteriormente su especificidad *in silico* sobre ARNm de *Oryza sativa ssp. japonica* para evitar amplificaciones inespecíficas. Los cebadores diseñados fueron *SyHigro_for* y *SyHigro_rev* (tabla III.13) para la generación de un amplicón de 203 pb y temperatura de disociación de 80,2 °C. Para el gen *hpt II* se realizó una recta patrón, obteniendo los valores de pendiente=-3,23; ordenada al origen=35,81 y $R^2=0,998$.

hpt II GenBank: AAF65337.1

```

1 ctatttcttt gccctcggac gagtgctggg gcgctcggttt ccaactatcgg cgagtaacttc
61 tacacagcca tcgggccaga cggccgcgct tctgcgggcg atttgtgtac gcccgacagt
121 cccggctccg gatcggacga ttgcgtcgca tcgaccctgc gcccaagctg catcatcgaa
181 attgcccgtca accaagctct gatagagttg gtcaagacca atgcggagca tatacgcgcc
SyHigro_for
241 gagtcgtggc gatcctgcaa gctccggatg cctccgctcg aagtagcgcg tctgctgctc
301 catacaagcc aaccacggcc tccagaagaa gatggtggcg acctcgtatt gggaatcccc
361 gaacatcgcc tcgctccagt caatgaccgc tgttatggcg ccattgtccg tcaggacatt
SyHigro_rev
421 gttggagccg aaatccgcgt gcacgaggtg ccggacttcg gggcagtcct cggcccaag
481 catcagctca tcgagagcct gcgcgacgga cgcactgacg gtgtcgtcca tcacagtttg
541 ccagtgatac acatggggat cagcaatcgc gcatatgaaa tcacgccatg tagtgatttg
601 accgattcct tgcggtcoga atgggccgaa cccgctcgtc tggctaagat cggccgcagc
661 gatcgcatac atagcctccg cgaccgggtg tagaacagcg ggcagttcgg tttcaggcag
721 gtcttgcaac gtgacaccct gtgcacggcg ggagatgcaa taggtcaggc tctcgtctaa
781 ctccccaatg tcaagcactt ccggaatcgg gagcgcggcc gatgcaaagt gccgataaac
841 ataacgatct ttgtagaaac catcggcgca gctatttacc cgcaggacat atccacgcc
901 tcctacatcg aagctgaaag cacgagattc ttcgccctcc gagagctgca tcaggctcga
961 gacgctgtcg aacttttcga tcagaaactt ctgcacagac gtcgcgggtga gttcaggett
1021 tttcat

```

Figura IV.22: Secuencia codificante del gen *hpt II*. Se muestran las secuencias de los cebadores *SyHigro_for* y *SyHigro_rev*. La secuencia del amplicón generado se muestra cursiva.

Todos los callos analizados mostraron expresión tanto para el gen de selección como para *derbp100* (excepto en los callos control). Aunque no se puede descartar que alguno de los callos resistentes a higromicina no expresen *derbp100*, estos resultados dan mayor validez a

los presentados en la tabla IV.9. Con los resultados de qPCR se calculó la expresión relativa de ARNm de cada transgén, respecto a β -actina, en cada muestra. Los niveles de expresión del gen endógeno β -actina fueron homogéneos en estas muestras (*geNORM* v3.4 valor $M < 0,5$). En todos los casos los callos mostraron mayores niveles de ARNm tanto de *hpt II* como de *derbp100* en relación a β -actina, mostrando valores de entre ~ 3 - y ~ 10 -, y de entre ~ 3 - y ~ 70 - veces superiores al control endógeno, respectivamente (tabla IV.11).

Tabla IV.11: Niveles de ARNm de *derbp100* y *hpt II* en callos MG normalizados. Se muestran las medias y desviaciones estándar de los valores obtenidos en tres callos independientes transformados con cada *derbp100*

<i>derbp100</i>	ARNm normalizado	
	<i>hpt II</i>	<i>derbp100</i>
<i>bp216</i>	8,5 \pm 0,3	69,4 \pm 19,6
<i>bp214</i>	3,5 \pm 1,4	42,3 \pm 20,3
<i>bp213</i>	5,3 \pm 2,2	17,9 \pm 2,4
<i>bp217</i>	9,7 \pm 3,2	11,9 \pm 0,2
<i>bp192</i>	3,3 \pm 0,5	3,4 \pm 0,5
control	5,2 \pm 2,6	-

En la figura IV.23 se muestran gráficamente los resultados de estos valores de expresión normalizados. El gen de selección se expresó de manera constante en todos los callos transgénicos, independientemente del *derbp100* que contuvieran, inclusive el control. La comparación se analizó estadísticamente mediante ANOVA de un factor, resultando un valor P -valor=0,811. El valor medio fue de $5,9 \pm 2,6$ -veces β -actina. Los diferentes *derbp100* mostraron niveles de ARNm no estadísticamente diferentes ($28,9 \pm 26,8$ -veces β -actina, ANOVA de un factor P -valor=0,105).

Aunque estadísticamente los callos transformados con los diferentes *derbp100* no presenten niveles diferentes de dichos transgenes, sí cabe destacar que los valores más reducidos correspondieron a *bp192*. La transformación de *bp192* con *hpt II* tuvo menor eficiencia que cualquier otro *derbp100*, no llegándose a obtener plántulas MG. Estos resultados sugieren que el producto de *bp192* sería altamente fitotóxico; pues preferentemente las células con reducida expresión del mismo dan lugar a callos MG; e incluso a bajos niveles de expresión resulta letal para las células de arroz.

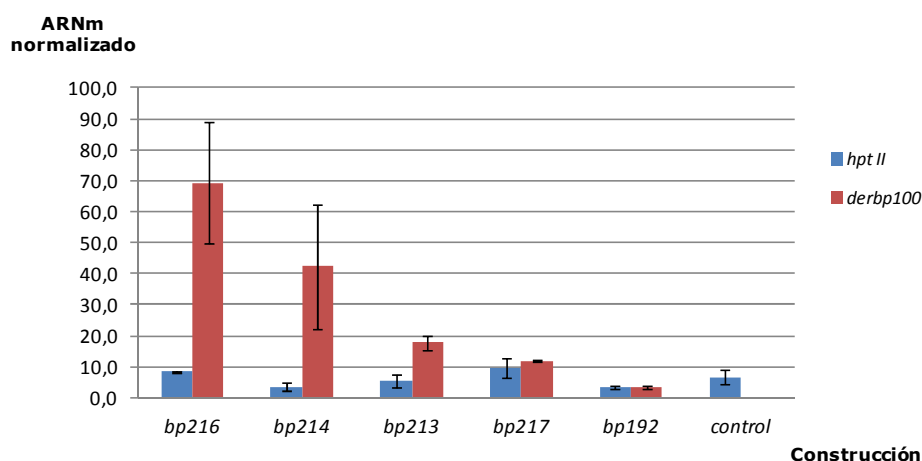


Figura IV.23: Representación gráfica de los niveles de expresión relativa de los *derbp100* y *hpt II* en callos resistentes a higromicina.

IV.2.7 Análisis molecular de plantas MG S-*derbp100*

A pesar de la reducida eficiencia de transformación de *derbp100* en arroz, se obtuvieron un total de 16 plantas fértiles que contenían tres *derbp100*: *bp214* (9 eventos), *bp213* (2 eventos) y *bp217* (5 eventos, 2 con *gfp* y 3 con *hpt II*). Se procedió a su análisis con el objetivo final de estudiar los posibles efectos no intencionados (probablemente fitotóxicos) de estos transgenes en plantas; y la posibilidad de obtener plantas con fenotipos razonablemente parecidos a la línea no transformada Senia, de la que derivan las transgénicas en estudio.

Confirmación de la presencia del transgén en plantas S-*derbp100* y estimación por qPCR del número de copias integradas

Inicialmente para descartar la regeneración de plantas MG únicamente a partir de células que hubieran perdido el transgén *derbp100*, pero también para obtener una estimación del número de copias integradas por genoma en dichas plantas, se analizaron todas las plantas T0 obtenidas mediante qPCR. Cabe mencionar que la transformación por *Agrobacterium* es un método efectivo para la introducción de genes en el genoma de plantas, generando en la mayoría de los casos plantas con una única copia del transgén mostrando su completa integridad. El sistema de qPCR es un método alternativo al método *Southern blot* que permite estimar de forma rápida el número de copias del transgén insertadas en una planta MG. La aproximación se basó en la amplificación de los genes de selección y *derbp100* sobre ADN genómico, utilizando cebadores específicos (para *gfp* y los *derbp100*, apartado IV.2.5; y para *hpt II* apartado IV.2.6). Como referencia se utilizó el gen endógeno que codifica la β -actina. A partir de un fragmento de hoja de cada una de las plantas T0 obtenidas (correspondientes a

eventos independientes) se extrajo ADN genómico mediante el método CTAB (Metodología III.C.2). Se ajustó la concentración a 100 ng/ μ L y se realizaron seis réplicas de qPCR para cada uno de los genes, *gfp* o *hpt II*, *derbp100* y β -*actina*. El número de copias se cuantificó aplicando las rectas patrón construidas anteriormente (IV.2.5 y IV.2.6). La especificidad de la amplificación se confirmó mediante análisis de temperatura de disociación. A todas la planta T0 restantes se les cuantificó el número de copias aproximadas con relación a gen endógeno β -*actina*. Para ello se calculó el promedio de los seis valores Ct obtenidos de la qPCR para cada uno de los genes y se aplicaron a la recta patrón correspondiente obteniendo finalmente el valor absoluto de número de copias generadas. Los 9 eventos con *bp214*, los 2 con *bp213* y los 3 con *bp217* (con *hpt II*) mostraron los valores más reducidos, cercanos a 1, sugiriendo la inserción de una única copia del transgén. Por lo contrario los 2 eventos analizados con el gen de selección *gfp* mostraron para el transgén una inserción multicopia.

Análisis de expresión de *bp214* y *bp217* en las plantas MG T0

Los nueve eventos S-*bp214* obtenidos se analizaron a nivel ARNm para estimar los niveles de expresión de *derbp100* y del gen de selección, con el objetivo de seleccionar tres eventos para el establecimiento de líneas homocigotas para el transgén, sobre las que continuar el estudio. Para ello se analizaron, mediante RT-qPCR, muestras de hojas de las líneas T0 crecidas *in vitro*. Los nueve eventos expresaban el *derbp100*, y mostraron niveles de expresión entre 25- y 40- veces superiores a los del gen endógeno β -*actina* (media y desviación estándar, 32,1 \pm 5,4-veces). Se seleccionaron los eventos S-*bp214*-6, S-*bp214*-10 y S-*bp214*-9, con niveles de expresión de *derbp100* 25-, 32- y 40-veces superiores a β -*actina*, respectivamente, de forma que se incluyó un evento con un valor similar a la media y los dos eventos más extremos.

Los tres eventos S-*bp217* con el gen de resistencia a higromicina se analizaron de manera equivalente. Éstos mostraron niveles de expresión muy bajos y muy similares entre ellos (2,1 \pm 0,8-veces), por lo que se seleccionaron dos ellos al azar: S-*bp217*-1 y S-*bp217*-9. Todos los eventos seleccionados mostraron un número de copias de ADN genómico del transgén similar al número de copias de β -*actina* (cuantificaciones realizadas por qPCR), sugiriendo la inserción de una única copia del transgén (o muy pocas) en el genoma receptor.

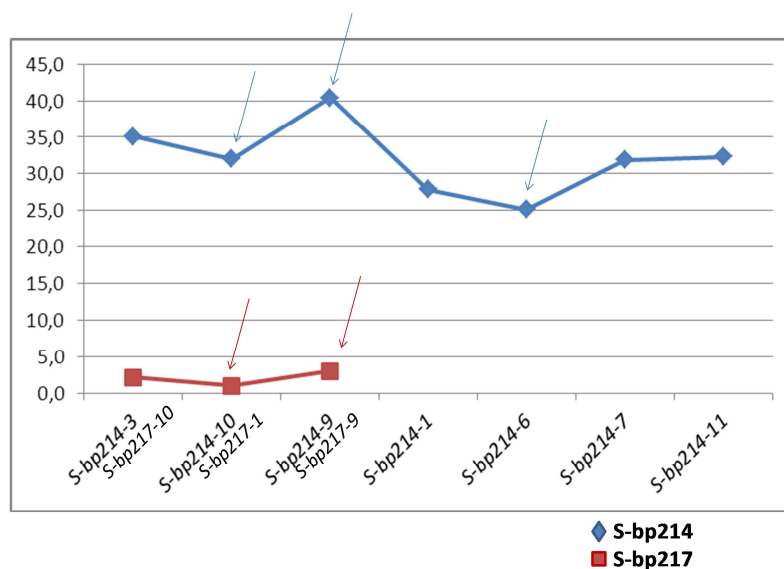


Figura IV.24: Representación gráfica de la expresión relativa de los *derbp100* en las líneas TO S-bp214 y S-bp217. En rojo se muestran los 3 eventos S-bp217 y en azul los 7 eventos S-bp214. Las flechas indican los eventos seleccionados para la continuación del trabajo.

En la figura IV.24 se muestran gráficamente los niveles de expresión relativa de las líneas TO analizadas, indicando con una flecha los eventos seleccionados. En la tabla IV.12 se muestran los eventos MG T0 seleccionados. A parte de los eventos seleccionados en este ensayo se indican los eventos de las líneas S-bp213 y S-bp217 (con el gen de selección *gfp*). De las líneas S-bp213 y S-bp217 (*gfp*) se indican los dos únicos eventos obtenidos, S-bp213-5 y S-bp213-42; y S-bp217-7 y S-bp217-18, respectivamente. Todas las líneas S-bp217 con el gen marcador *hpt* II presentaron una copia de transgén por genoma (cuantificaciones realizadas por qPCR), y se seleccionaron S-bp217-1 y S-bp217-9.

Tabla IV.12: Eventos de transformación seleccionados para la continuidad de los análisis

<i>derbp100</i>	<i>bp214</i>	<i>bp217</i>	<i>bp213</i>
Gen de selección	<i>hpt</i> II	<i>gfp</i>	<i>hpt</i> II
Código evento	S-bp214-6	S-bp217-7	S-bp217-1
	S-bp214-9	S-bp217-18	S-bp217-9
	S-bp214-10		S-bp213-5
			S-bp213-42

Análisis Southern blot

Los 9 eventos seleccionados en el apartado anterior se cultivaron para la obtención de las líneas homocigotas según descrito en el apartado de metodología III. B. 6 *Obtención de líneas homocigotas*. Para determinar el número de copias de transgén por genoma de arroz (así como comprobar la conservación del transgén a lo largo de dos generaciones) se realizaron análisis *Southern blot* de las generaciones T2. La aproximación se basó en la generación de una sonda común para los diferentes *derbp100*, que se marcó utilizando un sistema no radioactivo. La sonda desnaturalizada se unió covalentemente la fosfatasa alcalina. El revelado consiste en la aplicación del sustrato dioxetan, que degradado por la fosfatasa alcalina emite quimioluminiscencia. La sonda se diseñó sobre una parte de la secuencia del intrón *ubi*, la secuencia completa del péptido señal *pr1a* y una parte de la región codificante *bp134*: en total, 406 pb. Se sintetizó mediante PCR convencional (para lo que se diseñaron los cebadores *SouthUBI_for* y *SouthBP_rev*, tabla III.13 y figura IV.25), y se comprobó por secuenciación.

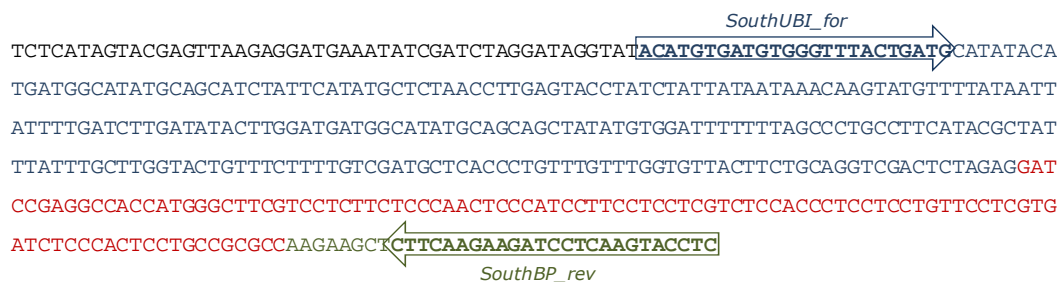


Figura IV.25: Secuencia de la sonda para la detección de los *derpb100* mediante el análisis *Southern blot*. En azul se muestra la secuencia del intrón *ubi*, en rojo la secuencia *pr1a* y en verde la secuencia *bp134*. Las secuencias de los cebadores se muestran enmarcadas en azul (*SouthUBI_for*) y en verde (*SouthBP_rev*).

Se preparó ADN genómico de los 9 eventos seleccionados mediante un método basado en CTAB. Veinticinco μg de cada uno se digirieron con *Hind* III, se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa y se transfirieron a una membrana de nylon. Después del proceso de hibridación con la sonda antes mencionada se procedió con la detección de la secuencia diana por quimioluminiscencia.

Todos los eventos que llevaban el gen de selección *hpt* II mostraron haber integrado una única copia de *derbp100*. Los eventos S-bp217-7 y S-bp217-18 mostraron patrones más complejos, indicando la inserción de ~4 y 2 copias del transgén, respectivamente. Estos resultados corroboran los obtenidos mediante qPCR.

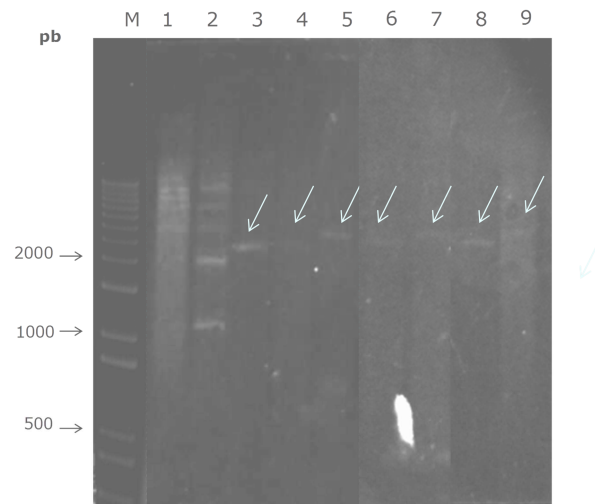


Figura IV.26: *Southern blot* de los 9 eventos obtenidos en este trabajo, digeridos con *Hind* III e hibridados con la sonda *derbp100*: S-217-7 (1); S-217-18 (2); S-214-6 (3); S-214-9 (4); S-214-10 (5); S-213-5 (6); S-213-42 (7); S-217-1 (8); S-217-9 (9). Se muestra el marcador de peso molecular (M) y las longitudes de fragmentos significativos.

Análisis de expresión de los transgenes en plantas homocigóticas T2

El estudio transcriptómico de las plantas MG homocigotas se diseñó con un doble objetivo: por una parte el análisis de expresión de los transgenes y por otra un análisis transcriptómico global (ver apartado IV.3). Para obtener unos resultados fiables es necesario preparar el material adecuadamente y considerar los debidos replicados biológicos (además de los experimentales). Tres grupos de 10 plantas (3 replicados biológicos) de cada evento se cultivaron en condiciones *in vitro* y, en el estadio vegetativo de dos hojas (V3), éstas se cortaron y congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido.

El análisis de expresión de los transgenes se realizó mediante RT-qPCR, determinándose en cada replicado los niveles de ARNm del *derbp100* y del gen de selección, siempre respecto al gen endógeno *β -actina*. Los sistemas de cebadores utilizados para cada gen diana fueron los mismos que para el análisis de expresión de callos MG y las generaciones T0. Se extrajo ARNm de cada una de las muestras y se trató con ADNasa. La generación del ADNc se realizó mediante la reacción de la retrotranscriptasa utilizando hexámeros como cebadores. Los resultados generados por la qPCR (Ct) se transformaron a número de copias de ARNm mediante los valores de la recta patrón para cada gen diana. Para poder comparar la muestras entre sí, se normalizaron los valores de los genes *derbp100*, *gfp* y *hpt II* con el nivel de expresión del gen *β -actina*, cuyo valor M (*GeNORM v3.4*) fue inferior a 0,5 en estas muestras.

Tabla IV.13: Niveles de expresión relativa de los *derbp100* y el gen de selección en las líneas homocigóticas T2. Se representa el nivel de expresión del gen diana relativo al gen endógeno β -actina; y la desviación estándar (SD)

<i>derbp100</i>	Código evento	ARNm normalizado*	
		gen selección	<i>derbp100</i>
<i>bp214</i>	S-bp214-6	8,6 ± 2,2	24,4 ± 5,3
	S-bp214-9	6,3 ± 1,5	28,1 ± 6,0
	S-bp214-10	7,3 ± 1,0	21,4 ± 1,1
<i>bp213</i>	S-bp213-5	15,2 ± 2,9	30,1 ± 12,8
	S-bp213-42	18,6 ± 2,5	12,6 ± 1,4
<i>bp217</i>	S-bp217-1	23,3 ± 5,3	9,4 ± 2,3
	S-bp217-9	3,0 ± 0,5	2,6 ± 0,4
	S-bp217-7	3,1 ± 0,8	1,3 ± 0,4
	S-bp217-18	3,4 ± 0,4	1,5 ± 0,1
<i>control</i>	S-Control-17	12,1 ± 4,0	

*Media y desviación estándar de tres replicados biológicos y dos replicados experimentales

Los resultados (tabla IV.13) muestran la expresión de ambos transgenes en todas las líneas estabilizadas. Los niveles de expresión relativa de los transgenes son diferentes en los distintos eventos de transformación de cada *derbp100*. Ello es esperable, ya que el nivel de expresión de un transgén depende del número de copias del mismo, así como del lugar de inserción. Así, el gen de selección se expresa entre 3- y 23-veces más que el gen endógeno; y los *derbp100* se expresan entre 1- y 30-veces más que β -actina. Los eventos con menor expresión del transgén corresponden a S-bp217. Un nivel bajo de expresión para los eventos con el gen marcador *gfp* fue predecible debido al silenciamiento que puede conllevar una inserción multicopia. Aún así una expresión baja de *bp217* parece mantenerse en eventos de copia única, mostrando un nivel máximo de expresión para S-bp217-1 de 9,4±2,3-veces respecto β -actina. Los eventos que mostraron expresiones más elevadas fueron S-bp214 y S-bp213, alrededor de 20 veces el nivel de β -actina (tabla IV.13).

Las líneas transformadas con diferentes *derbp100* expresaron, globalmente, niveles similares de gen de selección y de *derbp100* (figura IV.27). El análisis estadístico ANOVA de un factor únicamente mostró diferencias significativas del nivel de expresión de los eventos S-bp127 (P -valor=0,003) respecto a S-bp214 y S-bp213.

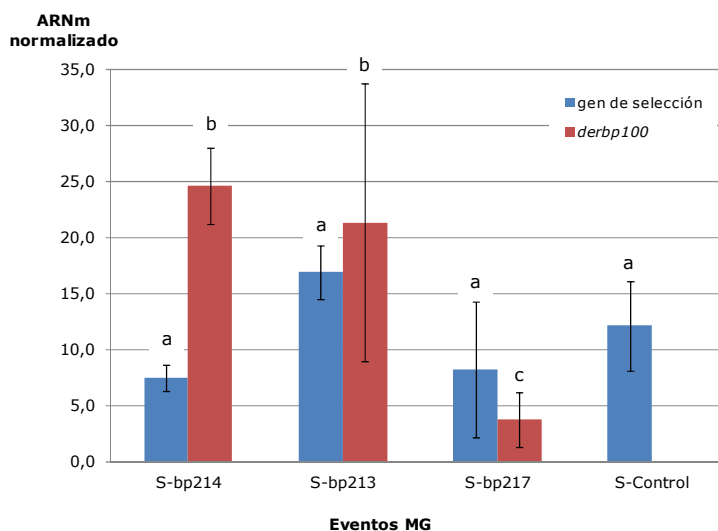


Figura IV.27: Representación gráfica de los niveles de expresión relativa de los eventos MG agrupados según el derivado de *bp100*. Diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA de un factor).

Análisis de extractos proteicos de plantas MG

Análisis de actividad antibacteriana por ensayo de muerte celular

BP100 es un péptido pequeño, fuertemente catiónico ($pI \sim 11$) y muy poco antigénico. Debido a estas características, su purificación, detección y cuantificación en muestras de planta resulta muy difícil. Nuestra primera aproximación al análisis del péptido producido en plantas MG se basó en ensayos de actividad antibacteriana de los extractos vegetales. Los derivados de BP100 sintéticos presentan alta toxicidad contra las bacterias fitopatógenas *Erwinia amylovora* (*Ea*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *Vesicatoria* (*Xav*) y *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* (*Pss*), de forma que se creyó oportuno analizar el efecto de los péptidos sintetizados en planta contra estos patógenos. Concretamente se utilizó *Xav*, altamente sensible a estos péptidos. Se prepararon extractos crudos proteicos de hojas de S-control (únicamente con el gen de selección) y S-bp217 (BP217 sintetizado químicamente presenta una actividad 40 veces mayor que el péptido de referencia BP134 contra *Xav*). La aproximación se basó en el contacto directo de una solución bacteriana a concentración conocida con una alícuota de extracto proteico. Como control se ensayó la actividad de BP217 (sintetizado químicamente) en presencia o no de extracto proteico de S-Control. En los ensayos realizados previamente, el efecto de BP217 sobre *Xav* depende de la concentración del mismo, siendo la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0,2-0,1 μM (CMI de BP100, 5,0-7,5 μM). La concentración del extracto crudo proteico fue en este ensayo un factor limitante, pudiéndose ajustar a un máximo de 1 mg/mL de proteína total soluble (PTS) final. En las condiciones que permite el ensayo, se trabajaría a la CMI del péptido sintetizado en planta suponiendo que éste tuviera la

misma actividad que BP217 sintetizado químicamente y representara un 0,1% de la PST extraída a partir de las plantas S-bp217.

Se ensayaron un control negativo (sin muestra proteica ni péptido sintético), BP217 sintetizado químicamente a 200 nM en tampón fosfato, y extractos proteicos de S-control y S-bp217-7, ambos con y sin adición de BP217 sintético a una concentración final de 10 μ M. Una vez puestas en contacto la suspensión de *Xav* con cada una de las muestras, se incubaron a temperatura ambiente y, periódicamente a lo largo de 4 horas, se sembraron diluciones entre 10^6 y 10^2 ufc/mL en forma de gota en placas LB-agar. La actividad antibacteriana de las muestras se determinó mediante recuento de tres replicados a las 4 h de incubación. Los resultados (figura IV.28) mostraron una clara actividad bactericida del péptido sintético BP217, que sin embargo se inhibía en presencia de extracto proteico control. A una concentración de 200 nM, BP217 disminuyó en 5 logaritmos la concentración de *Xav* viables a las 4 h de incubación; y a 10 μ M y con sólo 30 min de contacto no se detectó ninguna bacteria viable. A esta misma concentración pero en presencia de extracto proteico control, no se detectó actividad antibacteriana alguna. Los PAM derivados de BP100 presentan unas características extremas, son altamente catiónicos, con un punto isoeléctrico superior a nueve y extremadamente pequeños, lo que sugiere que se puedan adherir fuertemente a membranas y otros componentes de la célula vegetal, perdiendo la capacidad de interactuar con bacterias presentes en el medio. Aunque este experimento no permitió detectar la actividad de BP217 sintetizado en planta, y debido a los resultados obtenidos con BP217 sintético, no se puede descartar la presencia del péptido transgénico en las plantas S-bp217, pues incluso trabajando a concentraciones elevadas de BP217, éste pierde su actividad en presencia de proteínas y restos celulares.

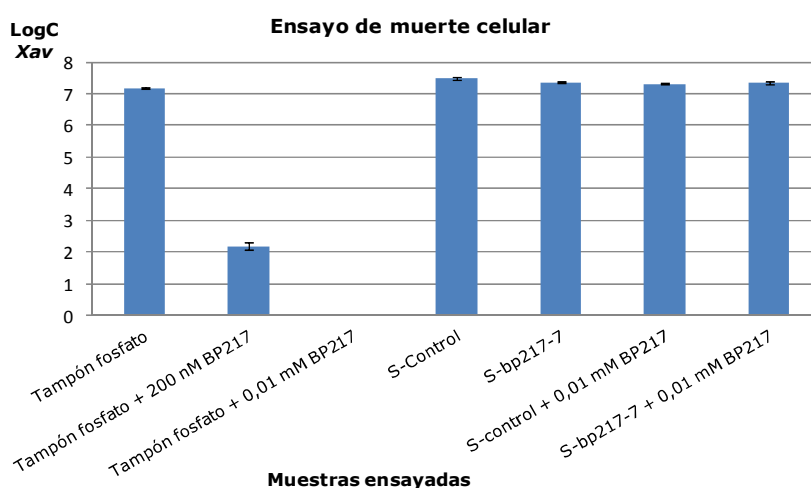


Figura IV.28: Representación gráfica del efecto del péptido BP217 sintetizado químicamente, y de extractos proteicos crudos de hojas de S-Control y S-bp217, ambos con y sin adición de BP217, sobre una suspensión de *Xav* a las 4 h de contacto.

IV.2.8 Análisis fenotípicos

Análisis de tolerancia a especies reactivas de oxígeno

El peróxido de hidrogeno H_2O_2 y el radical superóxido O_2^- son la principales especies reactivas (ROS) generadas en células aeróbicas. Las ROS son generalmente dañinas para células y, consecuentemente, degradadas de forma específica por determinadas enzimas. A su vez, la producción de ROS está altamente relacionada con la respuesta a estrés, sea biótico o abiótico, activando mecanismos de defensa de la planta. Plantas resistentes al estrés oxidativo presentan elevados niveles de superóxido-dismutasas y peroxidasas de clase III, cuya actividad es responsable de la degradación de ROS. La expresión de proteínas antimicrobianas como la proteína antifúngica AFP (Coca *et al.*, 2004), CecA (Campo *et al.*, 2008) o CaAMP1 de *Capsium annuum* (Lee *et al.*, 2009) han mostrado conferir a la planta resistencia a diferentes tipos de estrés, biótico y/o abiótico.

Para obtener una prueba indirecta de la producción de los derBP100 en las líneas MG con las construcciones *bp214*, *bp213* y *bp217*, se analizó su tolerancia a estrés oxidativo mediante un test sobre fragmentos de hoja. Para ello se cultivaron en invernadero 10 plantas de cada evento MG. En el estadio vegetativo V2 se tomó la segunda hoja de cada planta y se sometió a estrés oxidativo mediante incubación con una solución 50 mM H_2O_2 durante 8 h. La producción del anión superóxido se analizó mediante incubación con el colorante NBT (*tetrazolium nitron blue chlorid*), que forma un complejo azul, formazán, de forma específica con el anión superóxido (y no con H_2O_2). Los eventos con mayor tolerancia al estrés oxidativo acumularían consecuentemente menor cantidad de formazán. El análisis de lesión foliar se realizó mediante el programa *APS Assess v2.0*, que permitió calcular de forma automática el porcentaje de hoja teñido con formazán. Los resultados se presentan en la tabla IV.14, y la figura IV.29 muestra un ejemplo de las hojas sometidas a estrés oxidativo.



Figura IV.29: Ejemplos de las hojas de líneas MG S-bp214, S-bp217, S-bp213 y S-control (únicamente con el gen de selección), y Senia no transformada, sometidas a estrés oxidativo. En parejas se muestra una misma hoja antes (izquierda) y después (derecha) del análisis con *APS Assess v.2.0*.

Las hojas de plantas convencionales Senia mostraron los mayores niveles de acumulación de formazán, que cubría en torno al 7% de las hojas, indicando la acumulación de radicales superóxidos. Senia control, que solo incorpora el gen de resistencia a higromicina *hpt II* mostró unos niveles de acumulación de formazán ligeramente inferiores a Senia con un nivel foliar del 4%. La resistencia a estrés oxidativo para los eventos MG se mostró distinto según el *derbp100* que incorporan. S-bp214 aunque mostró una lesión foliar ligeramente por debajo de S-control el análisis estadístico no mostró una diferencia significativo respecto las hojas control (*ANOVA* de un factor P -valor=0,408), sugiriendo que el transgén *bp214* no le confiere a la planta mejor tolerancia al estrés oxidativo con los respecto a los eventos control. Por el contrario, los eventos S-bp213 y S-bp217 mostraron unos porcentajes de área afectada muy por debajo que Senia y Senia-control. El análisis estadístico mediante un *ANOVA* de un factor mostró que S-bp213 y S-bp217 se comportaban de forma estadísticamente diferente a las demás líneas analizadas (P -valor=0,001; Tuckey's *b posttest* α =0,05). Estos resultados sugieren que los transgenes *bp213* y *bp217* confieren a las plantas MG una cierta tolerancia al estrés oxidativo.

Tabla IV.14: Porcentajes de lesión foliar (acumulación de formazán) en hojas sometidas a estrés oxidativo en los eventos agrupados según el *derbp100* que incorporan. S-control únicamente incluye *hpt II*; y Senia es convencional. Se muestra la desviación estándar de la media de las 10 hojas analizadas

<i>derbp100</i>	% Lesión foliar
∅ (Senia)	7,3 ± 5,9
∅ (S-control)	4,0 ± 3,9
<i>bp214</i>	2,2 ± 2,1
<i>bp217</i>	0,4 ± 0,8
<i>bp213</i>	0,2 ± 0,1

Análisis de resistencia a *Magnaporthe grisea* PR9

El hongo *Magnaporthe grisea* es un patógeno natural de la planta arroz, responsable de una patología altamente destructiva a nivel mundial. El uso de plantas transgénicas para combatir este patógeno es cada vez más común. Coca y colaboradores generaron arroz resistente a *M. grisea* mediante la expresión constitutiva de la proteína antifúngica de *Aspergillus giganteus* AFP (Coca *et al.*, 2004) y de CecA (Coca *et al.*, 2006). Aunque la serie de BP100 son péptidos antibacterianos, no se descartó la posibilidad de que las plantas MG con *derbp100* adquirieran una cierta resistencia a este hongo, ya sea por el efecto directo o indirecto de los péptidos.

Se determinó la resistencia de los eventos MG portadores de *derbp100* a *M. grisea*, por comparación con la de S-control y Senia. El ensayo se realizó con la segunda hoja de plantas en el estadio V3, crecidas en invernadero. Se ensayaron 10 hojas de 10 plantas independientes de cada evento, que se infectaron mediante discos de bioensayo con una solución de *M. grisea* a concentración de 5×10^5 de esporas/mL. Las hojas se analizaron 7 días después de infección (dpi), cuantificándose el porcentaje de lesión foliar mediante el programa *APS Assess v.2.0*. Las líneas portadoras del mismo *derbp100* mostraron similares niveles de lesión. Como se muestra en la tabla IV.15 los porcentajes de lesión foliar variaban en las plantas control y aquellas portadoras de diferentes transgenes.

Tabla IV.15: Porcentajes de lesión foliar en hojas infectadas con una solución de 5×10^5 esporas/mL de *M. grisea* PR9 a los 7dpi. Se indica el transgén presente en las líneas MG analizadas (los resultados de los distintos eventos se han agrupado según el derivado de *bp134* que incorporan). S-control únicamente incluye *hpt II*; y Senia es convencional. Se indica asimismo la media y desviación estándar de los porcentajes de lesión. Se analizaron 10 hojas de cada uno de los eventos

<i>derbp100</i>	% Lesión foliar
∅ (Senia)	10,0 ± 2,5
bp214	7,5 ± 0,9
∅ (S-control)	7,0 ± 0,5
bp213	4,0 ± 0,7
bp217	3,4 ± 0,2

La variedad de referencia Senia mostró un lesiones afectando el 10% de la superficie foliar. Los eventos con *bp214* no mostraron resistencia a *M. grisea*, presentado una área foliar lesionada estadísticamente similar a S-control y Senia (*ANOVA* de un factor). Contrariamente, los eventos portadores de *bp213* y *bp217* mostraron una clara resistencia al patógeno, con lesiones foliares únicamente en torno al 4%. La lesión típica de *M. grisea* presenta una forma romboidal, que se pudo identificar claramente en las hojas de las líneas más sensibles, Senia, S-bp214 y S-control (figura IV.30).



Figura IV.30: Ejemplos de las lesiones observadas en hojas de líneas MG S-bp214, S-bp217, S-bp213 y S-control (únicamente con el gen de selección), y Senia no transformada, infectadas con *M. grisea* PR9 (5×10^5 esporas/mL en discos de bioensayos). Las imágenes se tomaron 7 dpi.

Comparando los resultados obtenidos en los ensayos de tolerancia a estrés oxidativo y resistencia a patógeno, se observan distintos fenotipos en función de los *derbp100* que portan las líneas MG. Así, la presencia del transgén *bp214* no parece incrementar la tolerancia a estrés en arroz. Por lo contrario, los transgenes *bp213* y *bp217* confieren a la planta tolerancia al estrés oxidativo y resistencia al patógeno. Dicho fenotipo puede explicarse, bien como consecuencia directa del producto del transgén, bien indirectamente a través de la activación de mecanismos como la respuesta a proteínas no correctamente estructuradas en el RE (*unfolded protein response* UPR, Campo *et al.*, 2008). En este último caso se trataría de efectos no esperados asociados al transgén, similares a los descritos en otras plantas MG, como arroz S-afp (Montero *et al.*, 2011).

IV.2.9 Ensayo de componentes de rendimiento de eventos MG S-*derbp100*

A raíz de los resultados obtenidos hasta el momento, se podía esperar que las plantas portadoras de *derbp100* mostraran, además del fenotipo de resistencia a estrés, efectos negativos sobre parámetros agronómicos que definen el rendimiento de las líneas en cuestión. Para evaluar el alcance de los posibles efectos fitotóxicos de los transgenes en los eventos S-*derbp100* obtenidos en este trabajo, se realizó un ensayo de componentes de rendimiento en invernadero.

Se ensayaron eventos de S-*bp214*, S-*bp213* y S-*bp217* a más de los controles Senia y S-Control. El ensayo se realizó durante la época de cultivo de arroz en la región, concretamente entre el 29 de Abril y el 7 de octubre del 2010. Para cada línea se sembraron un total 390 semillas de las cuales el porcentaje de germinación osciló entre el 71% y 91%. Para cada evento se cultivaron 270 plántulas *in vitro* (tres replicados de 90 plantas cada uno) hasta un estadio V3 y se transfirieron a invernadero a razón de dos plantas por maceta. Se realizó el ensayo con las líneas homocigotas obtenidas en este trabajo y la variedad control Senia, incluyéndose además un evento S-control con el gen marcador *hpt* II. Se añadió además la línea de arroz MG obtenida previamente (Crag e IRTA), que incorpora el gen de la proteína antifúngica AFP (S-afp) (Coca *et al.*, 2004) y estudiada en esta tesis a nivel transcriptómico. Todas las líneas comparadas en este ensayo expresan constitutivamente el transgén bajo el control del promotor de la ubiquitina de maíz. Concretamente los eventos MG estudiados en este ensayo fueron S-*bp214*-6, S-*bp214*-10, S-*bp213*-5, S-*bp217*-7, S-*bp217*-18, S-afp-14 y S-control-17. La línea no-MG estudiada fue Senia convencional.

Los datos recogidos durante el período de observación se centraron en el nivel de clorofila, la altura de las plantas así como los componentes relacionados con el rendimiento de la producción, basados en el peso y el número de panículas, la producción total de semillas así

como el peso correspondiente a 100 semillas. Entre replicados de una misma línea así como entre las distintas líneas portadoras de un mismo transgén no se observaron diferencias, de forma que se presentan los resultados de forma conjunta, expresándose en todos los casos como media y error típico.

El nivel de clorofila se determinó por medición instantánea sobre hoja mediante un medidor *spad*. Entre los eventos MG y Senia no se observaron diferencias significativas de niveles de clorofila indicando un metabolismo normal de aporte de nitrógeno de las diferentes líneas MG estudiadas. Los valores de clorofila para todos los eventos se situaron en un rango muy estrecho entre 41,5 y 44,7 unidades *spad* y con un promedio de $43,2 \pm 1,3$. Durante el período de cultivo se observaron diferencias en la altura de las plantas entre las diferentes líneas. La figura IV.31 muestran como ejemplo imágenes de algunas de las líneas S-bp217, S-bp213 y S-bp214, tomadas durante el período de floración, entre las que se observa una clara diferencia en la altura.

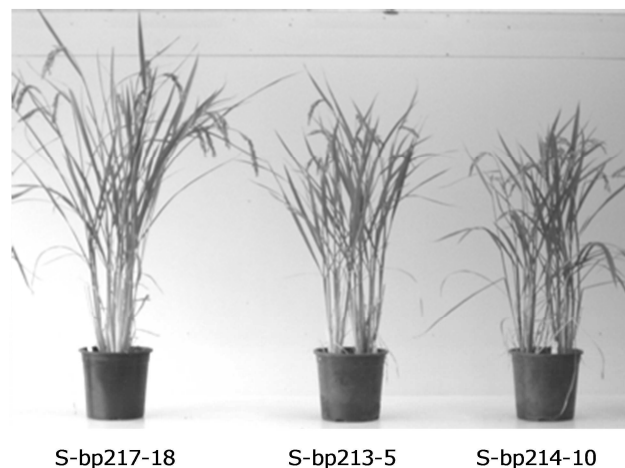


Figura IV.31: Se muestran como ejemplo las plantas de arroz MG correspondientes a la líneas S-bp217-18, S-bp213-5, S-bp214-10 en período de floración.

Las líneas que presentaron una altura menor fueron S-bp214 y S-bp213 con una media de $84,3 \pm 0,6$ y de $90,6 \pm 0,9$ cm, respectivamente. Las otras líneas estudiadas no mostraron diferencias significativas respecto la línea comparadora Senia convencional. S-control ($99,9 \pm 0,7$ cm) se situó ligeramente por debajo de la línea no-MG Senia ($105,3 \pm 1,1$ cm) mientras que las otras líneas MG mostraron un mejor crecimiento con alturas de $108,9 \pm 1,0$ cm y $107,8 \pm 0,9$ cm para S-afp y S-bp217, respectivamente. Los valores obtenidos se analizaron mediante un ANOVA de un factor separando las líneas S-bp214 y S-bp213 del resto (P -valor=0,000, test Tukey-b $\alpha=0,5$). La figura IV.32 representa gráficamente las alturas anotadas el 25 de agosto del 2010. Cabe mencionar que la línea S-control mostró en este ensayo una altura menor a la

esperada, pues las líneas S- control generadas desde el inicio del proyecto no mostraron nunca diferencias fenotípicas. Por ello, posteriormente el grupo realizó un segundo ensayo en el que se analizó la altura de un total de 5 eventos independientes de transformación de S-control y en el que no se detectó ninguna anomalía en el crecimiento de las plantas situándose todas al nivel de Senia convencional. El hecho que el evento escogido mostró una altura ligeramente por debajo de Senia, puede de ser debido al lugar de inserción del *T-DNA*. El lugar de inserción de genes de selección ha mostrado en otras ocasiones efectos ligeros no deseados sobre el fenotipo de la planta (Miki *et al.*, 2009).

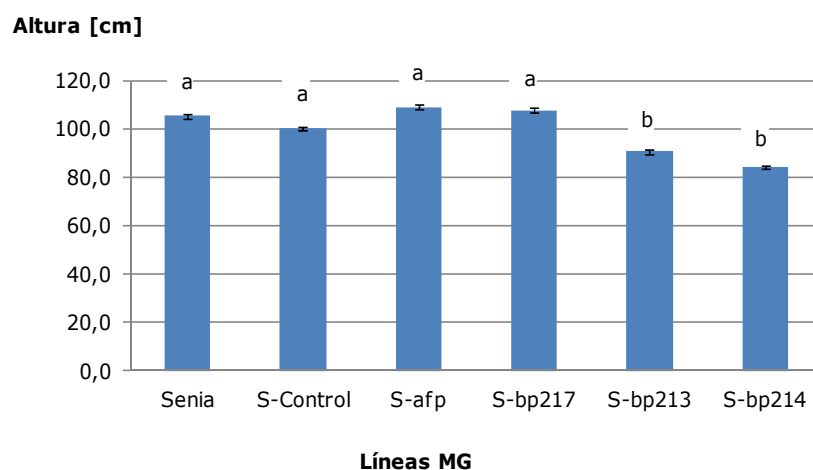


Figura IV.32: Gráfica representativa de las alturas (cm) de las plantas observadas para las diferentes líneas de arroz ensayadas agrupadas por transgén. Las letras sobre las barras indican los diferentes grupos generados por el análisis ANOVA.

El rendimiento de producción de las líneas de arroz ensayadas se determinó mediante varios factores. Uno de ellos fue el peso medio de las panículas por planta después de la recolección. Se observaron algunas diferencias entre las líneas control Senia y S-Control respecto las líneas MG con los diferentes transgenes. Senia y S-control mostraron pesos alrededor de los 20 g (S-Control $20,7 \pm 0,8$ g; Senia $20,5 \pm 1,0$ g), mientras que el resto de las líneas estudiadas presentaron valores situados entre 12-18 g/panícula. Concretamente S-bp217 presentó el mayor peso con ($17,6 \pm 0,6$ g) seguidas de S-afp ($14,2 \pm 0,7$ g), S-bp213 ($13,4 \pm 0,6$ g) y por último S-bp214 ($11,9 \pm 0,4$ g). El número de granos producidos por cada panícula es un parámetro importante para determinar la productividad de la planta, así como el peso correspondiente a 100 semillas. El peso de las semillas se mantuvo sin diferencias importantes entre las líneas estudiadas (entre 36 y 40 g/100 semillas). Aún así, las que presentaron un mayor peso fueron las líneas Senia y S-control. La conservación del peso medio de las semillas contrasta con la variabilidad observada en el peso de las panículas. Así, se puede deducir que el peso de las panículas está directamente relacionado con el número de semillas producidas y no con el peso de las mismas. Ello explicaría la diferente productividad entre líneas.

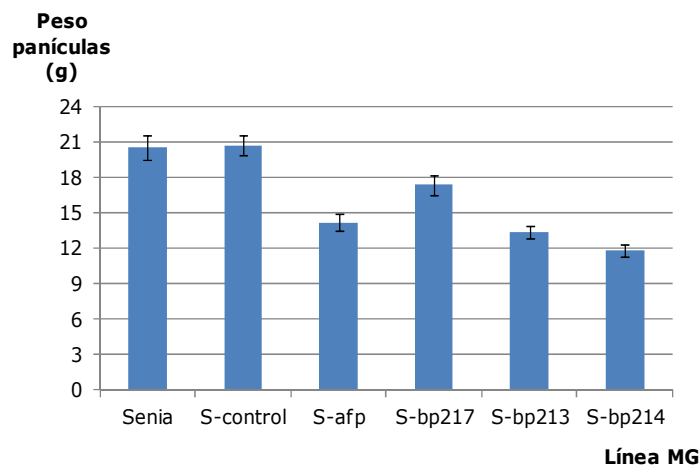


Figura IV.33: Gráfica representativa del peso de panículas de las líneas de arroz ensayadas.

Aunque el peso de las panículas es un valor de referencia para determinar la productividad de las plantas de arroz, se creyó oportuno determinar un valor de productividad más exacto incluyendo como factores independientes las semillas recogidas por panícula así como el número de panículas por planta. La combinación de estos dos factores se representa en forma de gráfico de dispersión en la figura IV.34.

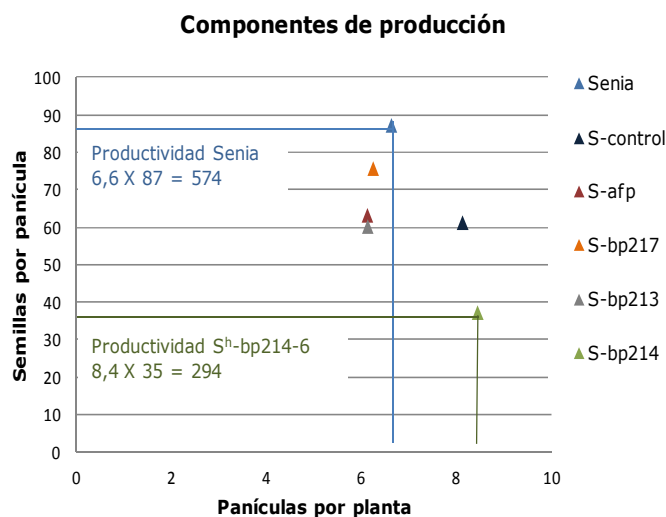


Figura IV.34: Gráfica de dispersión para el cálculo de productividad en función del número de panículas por planta y el número de semillas por panícula.

A nivel de productividad la línea MG que se separa más del resto pertenece a S-bp214, que juntamente con otros valores agronómicos parece ser la línea MG fenotípicamente más afectada de la estudiadas en la presente tesis.

IV.3 Análisis transcriptómico de plantas de arroz MG diseñadas para la síntesis de derBP100

Se analizaron las plantas de arroz MG homocigotas S-derbp213-5 y S-derbp217-1 a nivel transcriptómico en comparación con la línea convencional Senia, considerada como el mejor comparador (línea isogénica no MG). La línea MG S-afp estudiada previamente en esta tesis y a la que el transgén *afp* confiere resistencia al hongo patógeno *M. grisea*, mostró pequeñas diferencias transcriptómicas respecto a Senia, algunas de las cuales parecen suponer a la planta una cierta ventaja en la respuesta a situaciones de estrés (IV.1). Las plantas MG S-derbp100, que muestran también fenotipos de resistencia, incorporan transgenes que codifican péptidos antibacterianos cortos, altamente catiónicos y en estructura en α -hélice, que se han mostrado fitotóxicos para la planta productora (IV.2.6)) Se podría esperar pues que tuvieran un efecto importante sobre el transcriptoma de la planta MG, distinto al del transgén *afp*.

IV.3.1 Comparación transcriptómica mediante análisis de hibridación en *microarray*

Análisis y validación

En función de los resultados recogidos a lo largo de la tesis, se seleccionaron dos eventos para analizar globalmente su transcriptoma mediante la técnica de hibridación en formato *microarray*. El objetivo de este análisis fue identificar qué genes mostraban expresión diferencial entre plantas MG y plantas convencionales comparables, que pudiera atribuirse a efectos no intencionados del transgén. Se consideró importante comparar líneas con los fondos (*background*) genéticos lo más parecidos posible, de forma que la única diferencia sea el transgén. Para las líneas S-derbp100, la línea de partida para la transformación fue Senia (*Oryza sativa ssp. japonica*), de forma que ésta fue la variedad convencional utilizada como comparador. Se seleccionaron dos líneas homocigotas, ambas con el gen de selección *hpt II* (podría darse el caso de expresión diferencial debida al gen de selección) y una única copia del transgén (para armonizar las muestras y evitar el posible silenciamiento del mismo). Se optó por dos líneas MG con distintos *derbp100* (*bp213* y *bp217*), con fenotipo de tolerancia a estrés oxidativo y reducida sensibilidad a *M. grisea*. A pesar de que *bp213* y *bp217* mostraron cierta fitotoxicidad, ambos pudieron ser expresados en arroz de forma constitutiva y permitieron la obtención de plantas MG con características agronómicas similares a Senia. Así pues, los eventos seleccionados para el análisis transcriptómico fueron S-bp217-1 y S-bp213-5. Cabe mencionar que la línea S-bp217 presentó mejores características agronómicas que S-bp213. Los análisis transcriptómicos se realizaron mediante la técnica de hibridación en formato *microarray* utilizando *microarrays* de arroz comerciales *GeneChip® Rice Genome Array*

(Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Las comparaciones llevadas a cabo fueron siempre líneas MG respecto a Senia. Se analizaron independientemente tres replicados biológicos de cada línea, cada uno correspondiente a las hojas de 10 plántulas en estadio vegetativo de 3 hojas (V3), crecidas en paralelo en cultivo *in vitro*. Las hibridaciones se llevaron a cabo en la Unidad de Genómica, de la Fundación Parque Científico de Madrid bajo la supervisión del Dr. Jesús García Cantalejo. Los resultados de fluorescencia correspondientes a cada sonda se analizaron mediante el programa *RMA Analyse* para obtener finalmente los valores de expresión comparativos entre cada línea MG y Senia, en forma de \log_2 -veces (expresión relativa en la planta MG respecto a la convencional), así como la significación estadística de dicha comparación (ensayo *t-Student*). Los resultados de S-bp213-5 y S-bp217-1 se representan en forma de *Volcano plot* en la figura IV.35, generado con el programa *Sigma Plot*® v.11, en el que cada punto representa la expresión de una sonda del *microarray*. Normalmente cada sonda corresponde a un gen, aunque un mismo gen puede estar representado por varias sondas.

Los resultados se filtraron por el resultado del test *t-Student* (P -valor $<0,05$) y por el ratio de expresión de S-derbp100 respecto a Senia (≥ 2 -veces para los genes inducidos y $\leq 0,5$ -veces para los reprimidos en la línea transgénica). Se seleccionaron un total de 17 genes con expresión diferencial en S-bp217-1 y/o S-bp213-5 respecto a Senia, y fluorescencia superior a 150 unidades de fluorescencia por lo menos en una de las líneas comparadas. Sobre cada uno de estos genes se diseñó un ensayo de qPCR específico (anexo 3), que permitiría comprobar los resultados obtenidos en la hibridación en *microarrays*. Se optimizaron los ensayos de qPCR, obteniéndose en todos los casos productos únicos, con temperatura de disociación (T_m) específica y con valores de coeficiente de linealidad y eficiencia de reacción superiores a 0,996 y 0,902, respectivamente (medias, $R^2=0,997\pm 0,003$ y $E=0,973\pm 0,03$).

Se analizaron mediante RT-qPCR los niveles de expresión de los genes seleccionados en cada uno de los tres replicados biológicos de las líneas Senia, S-bp217-1 y S-bp213-5; y los ensayos RT-qPCR se realizaron a su vez por triplicado. Los resultados de RT-qPCR se introdujeron en el programa *Genex v.4.3.1*, se corrigieron con los valores de eficiencia de cada una de las rectas patrón, y se normalizaron con los valores de expresión de los genes endógenos β -actina, *ef-1 α* y 18S ribosomal en cada muestra. La aplicabilidad de los genes endógenos se determinó con herramienta *geNORM v3.4*, mostrándose los tres adecuados para el análisis de estas muestras (valor $M<0,5$ en todos los casos).

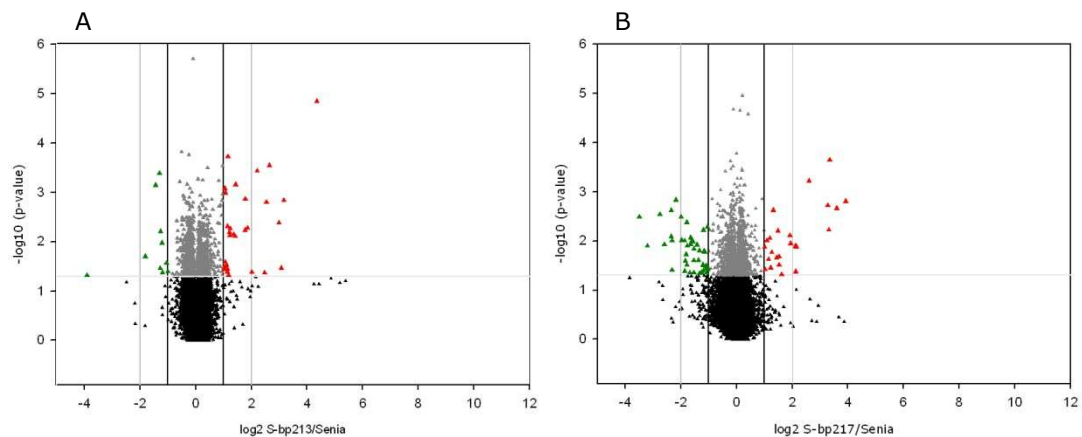


Figure IV.35: Representación *volcano plot* de los cambios de expresión génica de las líneas S-bp213-5 (A) y S-bp217-1 (B) con respecto a Senia. Cada punto en la gráfica representa una sonda del *microarray* de arroz de *Affymetrix*. El \log_{10} del *P*-valor (derivado del análisis estadístico mediante el programa *RMA*) se representa en función del cambio de expresión en \log_2 -veces. Las barras verticales negras indican el valor límite de sobre-expresión y represión, que se situó en doble o mitad (2-veces) en la línea MG respecto la no-MG. Los puntos marcados en negro corresponden a genes que no se validaron en el test estadístico (P -valor $> 0,05$). Los puntos en gris corresponden aquellos genes validados estadísticamente ($P < 0,05$) pero cuya expresión diferencial fue menor que 2-veces. Los puntos en rojo representan los genes inducidos en S-derbp100 respecto a Senia; y los puntos en verde representan los genes reprimidos en S-derbp100 con respecto a Senia.

Los resultados de qPCR obtenidos para cada secuencia se analizaron estadísticamente mediante el test *t-Student*. Para la línea S-bp217-1, todas las secuencias seleccionadas mostraron el mismo patrón de expresión (respecto a Senia) en los ensayos de *microarray* y RT-qPCR. Para la línea S-bp213-5 se corroboraron los resultados del *microarray* para 16 de las 17 secuencias. La comparativa S-bp217-1 respecto a Senia mostró un *P*-valor medio de $0,004 \pm 0,005$ para las 15 secuencias con expresión diferencial; y la comparación de S-bp213-1 respecto Senia mostró para las 6 secuencias analizadas un *P*-valor medio de $0,001 \pm 0,001$. Con estos resultados quedaron ambos análisis de *microarray* validados (tabla IV.16).

El *microarray* GeneChip utilizado para el análisis transcriptómico contiene sondas para analizar un total de 51.279 transcritos, de los cuales 48.564 corresponden a *Oryza sativa ssp. japonica*. S-bp213-5 mostró expresión diferencial respecto a Senia en un total de 40 transcritos; y S-bp217-1 en un total de 69 transcritos. Estos valores corresponden al **0,08%** y **0,14%** de las secuencias analizadas para **S-bp213-5** y **S-bp217-1**, respectivamente. Entre las secuencias con expresión diferencial en S-bp217-1 respecto a Senia, 5 genes están representados por 2 sondas, por lo que el total de genes con expresión diferencial se reduce a 64. Tres de los genes expresados diferencialmente en S-bp213-5 respecto a Senia están representados por 2 sondas, de forma que el número de genes con expresión diferencial se reduce a 37.

Tabla IV.16: Validación de los resultados de *microarray* mediante RT-qPCR

Probe Set ID	Código Acceso Genbank	Descripción	S-bp217-1 vs. Senia			S-bp213-5 vs. Senia		
			microarray		RT-qPCR	microarray		RT-qPCR
			x-veces ^a	P-valor ^b	P-valor ^b	x-veces ^a	P-valor ^b	P-valor ^b
Os.10660.1.S1_at	NM_186420.1	Proteína expresada	12,17	0,00	0,00	0,81	0,56	0,44
OsAffx.20082.1.S1_at	9640.m04095	Proteína expresada	10,12	0,00	0,00	1,14	0,30	0,02
OsAffx.22999.1.S1_at	AK108619.1	Proteína retrotransposon, putativa	9,70	0,00	0,00	9,01	0,00	0,00
Os.6645.1.S1_s_at	AU101638	Thionin-like péptido, putativo	3,79	0,01	0,00	1,41	0,11	0,23
Os.6776.1.S1_at	AK067173.1	Glucan endo-1,3-beta-glucosidasa precursor, putativo	2,08	0,05	0,00	3,44	0,00	0,00
Os.40352.1.S1_at	CF336665	Secuencia transcrita	1,24	0,15	0,23	4,05	0,04	0,00
Os.28011.1.S1_at	AY256682.1	Proteína inducible por <i>brown planthopper</i> BpHi008A, putativa	0,66	0,13	0,06	0,28	0,02	0,00
Os.264.1.S1_at	AK073360.1	Precursor de peroxidasa 64 clase III	0,49	0,04	0,00	0,77	0,11	0,12
Os.9301.1.S1_x_at	AK103189.1	Proteína de defensa, <i>Bet v I allergen</i>	0,48	0,03	0,01	0,72	0,05	0,00
Os.20289.1.S1_at	AY435041.1	PR4b, proteína relacionada con la patogénesis	0,46	0,04	0,00	1,03	0,49	0,67
Os.5725.1.S1_at	BI810367	Fructosa-bisfosfato aldolasa, putativa	0,44	0,02	0,02	0,43	0,01	0,00
Os.10310.1.S1_at	AK064825.1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa, FKBP-tipo, putativa	0,39	0,02	0,01	0,82	0,23	0,13
Os.2957.1.S1_at	AK120411.1	Precursor de peroxidasa 45 clase III	0,35	0,01	0,00	0,90	0,24	0,07
Os.27793.1.S1_x_at	AK108037.1	Precursor de peroxidasa 30 clase III	0,32	0,01	0,00	0,95	0,34	0,04
Os.5045.1.S1_at	AK102138.1	BBT18 - Precursor de inhibidor de tripsina tipo de Bowman-Birk	0,29	0,01	0,00	0,79	0,20	0,20
Os.39636.1.A1_x_at	AU166388	Indol-3-acetato beta-glucosiltransferasa, putativa. Ácido salicílico glucosiltransferasa, putativa	0,25	0,00	0,00	0,85	0,24	0,25
Os.16198.1.S1_at	AK110892.1	Indol-3-acetato beta-glucosiltransferasa, putativa. Ácido salicílico glucosiltransferasa, putativa	0,17	0,01	0,01	1,13	0,57	0,95

a) x-veces corresponde a la razón entre la expresión en S-derbp100 y en Senia. Los valores marcados en rojo representan los genes inducidos en S-derbp100, con una expresión diferencial superior a 2,0-veces; y los marcados en verde, los genes reprimidos en S-derbp100, con una expresión diferencial inferior a 0,5-veces

b) P-valor del test *t*-student. Se marcan de color gris los valores significativos con un P-valor<0,05

Los patrones de expresión diferencial entre plantas MG y convencionales variaron en función del transgén incorporado. Mientras que los genes regulados en S-bp217-1 respecto a Senia estaban mayoritariamente reprimidos en S-bp217 (42 genes, 7 de ellos más de 5 veces; frente a 22 genes inducidos, 6 de ellos más de 5 veces), la mayor parte de los regulados en S-bp213-5 se expresan más intensamente en la planta transgénica (28 genes inducidos, 6 de ellos más de 5 veces; frente a 9 genes reprimidos, 1 de ellos más de 5 veces). Un total de 18 genes se mostraron regulados en ambas líneas MG, S-bp217-1 y S-bp213-5, respecto a Senia, 14 de ellos se indujeron y 4 se reprimieron en S-derbp100. Así pues, aproximadamente la mitad de los genes regulados en S-bp213-5 respecto a Senia muestran también expresión diferencial entre S-bp217-1 y Senia. Por otra parte, es de destacar el elevado número de genes reprimidos entre S-bp217-1 y Senia, que se expresan de igual forma en S-bp213-5 y Senia (en total 38). Esto

parecería indicar que la construcción *bp217* ejerce sobre la planta un efecto transcriptómico no intencionado más amplio que *bp213* aunque parcialmente solapado.

Tabla IV.17. Genes que muestran expresión diferencial entre S-bp217-1 y Senia; y entre S-bp213-5 y Senia

	# Genes inducidos	# Genes reprimidos	# Total genes diferenciales	# Genes comunes inducidos	# Genes comunes reprimidos
S-bp217-1 vs. Senia	22 (34%)	42 (66%)	64	14	4
S-bp213-5 vs. Senia	28 (76%)	9 (24%)	37		

Descripción de los genes regulados en S-bp213-5 respecto a Senia

Como se ha mencionado, se detectaron un total de 37 genes cuya expresión en S-bp213-5 fue distinta a la expresión en la línea convencional Senia (28 inducidos y 9 reprimidos en la línea MG). Entre los 6 genes con mayor inducción en S-bp213-5 (niveles de 5- a 20-veces el nivel de Senia), 4 se inducen también en S-bp217-1. La tabla V.19 muestra los genes regulados en el evento S-bp213-5.

La herramienta *AgriGO* de la base de datos *Gene Ontology* (GO, Zhou *et al.*, 2010) se ha utilizado para analizar funcionalmente las diferencias transcripcionales entre S-bp213-5 y Senia (tal como se hizo previamente para S-afp). Entre los genes regulados en S-bp213-5 vs. Senia no se pudo hallar ningún grupo de genes sobrerrepresentado de forma estadísticamente significativa. Ello era previsible debido al reducido número de genes con expresión diferencial que pudieron, por tanto, introducirse en el análisis. Aún así se ha podido identificar algunas de sus funciones. La descripción de cada uno de los genes regulados se ha recogido en la tabla IV.18. Cabe destacar que el 40% de ellos no está asociado a ningún término o función específica. Entre los genes descritos destacan 4 relacionados con transposones o retrotransposones, fuertemente inducidos en la línea S-bp213-5 (entre 4,5 y 9,0-veces) y 3 de ellos también en S-bp-217-1. Entre los genes regulados se han podido identificar además genes con funciones enzimáticas en el metabolismo de la planta, así como relacionados con la resistencia a patologías (*Os.50213.1.S1_at*). Ocho de las 9 secuencias reprimidas en S-bp213-5 muestran valores de expresión próximas a la mitad en la línea MG respecto a Senia, mientras que el gen de la fragmoplastina destaca con una expresión 14 veces menor que la línea convencional isogénica. Cabe destacar asimismo los genes que codifican proteínas de defensa reguladas por estrés hídrico (*Os.6812.1.S1_at*) y de resistencia al patógeno de arroz *Brown planthopper* (*Os.28011.1.S1_at*).

Tabla IV.18: Genes con expresión diferencial en S-bp213-5 respecto a Senia. Se muestra el código de *Affymetrix*, el código de acceso público, el cromosoma en que sitúa cada uno de los genes (Chr.), la descripción y el valor de expresión en S-bp213 respecto Senia

Código <i>Affymetrix</i>	Código Acceso Genbank	Chr.	Descripción	x-veces*
<i>Os.54492.1.S1_s_at</i>	AK105340.1	Chr. 12	Secuencia transcrita	20,40
<i>OsAffx.22999.1.S1_at</i>	AK108619.1	Chr. 7	Proteína retrotransposón, putativa	9,01
<i>Os.32889.1.S1_at</i>	AK102508.1	Chr. 7	Proteína expresada	8,43
<i>Os.22606.1.S1_at</i>	CF278953	Chr. 11	Secuencia transcrita	7,96
<i>OsAffx.25936.7.S1_s_at</i>	NM_184006.1	Chr. 4 / 7	Elemento retrotransposable tipo TNP2	6,24
<i>Os.57146.1.S1_at</i>	AK111025.1	Chr. 1	Proteína tipo flavin-monooxigenasa	5,57
<i>Os.38444.2.S1_at</i>	AU163271	Chr. 5	Proteína retrotransposón, putativa	4,61
<i>Os.40352.1.S1_at</i>	CF336665	Chr. 9	Secuencia transcrita	4,05
<i>Os.12639.1.A1_at</i>	CF330511	Chr. 11	Proteína quinasa, dominio catalítico	3,63
<i>Os.6776.1.S1_at</i>	AK067173.1	Chr. 7	Beta-1,3-glucanasa, putativa	3,44
<i>Os.53606.1.S1_at</i>	AK073534.1	Chr. 6	Proteína hipotética	3,41
<i>Os.53027.1.S1_at</i>	AK070508.1	Chr. 6	Cisteína sintasa, putativa	2,69
<i>Os.25355.1.A1_at</i>	CA760741	Chr. 9	Proteína hipotética	2,67
<i>OsAffx.25720.1.S1_at</i>	9631.m05409	Chr. 3	Proteína hipotética	2,56
<i>Os.7505.1.S1_at</i>	AK106750.1	Chr. 5	CLA1 proteína tipo transquetolasa	2,33
<i>OsAffx.13720.1.S1_at</i>	9632.m00705	Chr. 4	Proteína expresada	2,32
<i>Os.7327.2.S1_x_at</i>	AK061655.1	Chr. 3	Transposón TNT, putativo. Serina proteasa tipo	2,26
<i>OsAffx.18673.2.S1_at</i>	9633.m01294	Chr. 5	Proteína hipotética	2,22
<i>Os.18592.1.S1_at</i>	AU030928	Chr. 7	UDP-glucosiltransferasa, putativa	2,20
<i>Os.22569.1.S1_at</i>	AK073684.1	Chr. 3	Proteína de la familia <i>PHD-finger</i>	2,20
<i>Os.54747.1.S1_at</i>	AK106655.1	Chr. 4	Secuencia transcrita	2,19
<i>OsAffx.19140.1.S1_at</i>	9639.m03023	Chr. 11	Proteína hipotética	2,14
<i>OsAffx.22233.5.S1_x_at</i>	AK106665.1	Chr. 1	Proteína retrotransposon, putativa no clasificada	2,09
<i>Os.22122.1.S1_at</i>	AB079874.1	Chr. 11	Proteína OsDmc1	2,09
<i>Os.6148.1.S1_at</i>	AK100272.1	Chr. 11	Proteína expresada	2,08
<i>Os.55288.1.S1_at</i>	AK107804.1	Chr. 5	Proteína hipotética	2,06
<i>Os.50213.1.S1_at</i>	AK120133.1	Chr. 6	Proteína RPG1 tipo NBS-LRR de resistencia a patologías	2,05
<i>Os.7327.4.S1_at</i>	AK065011.1	Chr. 3	Polyproteína transposón TNT, putativa	2,04
<i>Os.9327.1.S1_at</i>	AK103685.1	Chr. 5	Precursor de proteínas de la familia extensina alergen (pollen Ole e I POE152)	0,50
<i>Os.34077.1.S1_at</i>	AK072908.1	Chr. 4	Proteína hipotética	0,48
<i>Os.6075.1.S2_at</i>	CF319984	Chr. 4	Proteína hipotética	0,43
<i>Os.5725.1.S1_at</i>	BI810367	Chr. 11	Fructosa-bisfosfato aldolasa, putativa (<i>A. thaliana</i>)	0,43
<i>OsAffx.13633.1.S1_s_at</i>	9632.m00213	Chr. 4	Proteína homóloga a subtilisin, <i>OsSub34</i> , putativa	0,41
<i>Os.6812.1.S1_at</i>	AK058583.1	Chr. 10	Proteína regulada por estrés hídrico, putativa	0,40
<i>Os.49833.1.S2_at</i>	AK100761.1	Chr. 11	<i>Synaptojanin</i> , proteína con dominio N-terminal / proteína tipo inositol 5-fosfatasa 3	0,37
<i>Os.28011.1.S1_at</i>	AY256682.1	Chr. 6	Proteína BpHi008A, inducible por <i>brown planthopper</i> , putativa	0,28
<i>Os.52791.1.S1_at</i>	AK069270.1	Chr. 9	<i>Phragmoplastin 12</i> , putativa	0,07

*) x-veces corresponde a la razón entre la expresión en S-derbp100 y en Senia. Los valores marcados en rojo representan los genes inducidos en S-derbp100, con una expresión diferencial superior a 2,0-veces; y los marcados en verde, los genes reprimidos en S-derbp100, con una expresión diferencial inferior a 0,5-veces

**) Los genes sombreados de color verde se mostraron regulados en ambas comparativas, S-bp213-5 y S-bp217-1 vs. Senia

Descripción e identificación funcional de los genes regulados en S-bp217-1 respecto a Senia

La comparativa transcriptómica entre el evento S-bp217-1 y Senia mostró un total de 64 genes con expresión diferencial (tabla IV.19). Siete de ellos se expresan entre 4- y 15-veces más en S-bp217-1 que en la línea no transformada: tres corresponden a secuencias relacionadas con transposones o retrotransposones, también inducidas en S-bp213-5. Los 4 genes restantes no están asociados a ninguna función. Destacable de esta comparativa es el elevado número de genes reprimidos en S-bp217-1 con respecto a Senia: un 80% de los regulados. El análisis de los genes se llevó a cabo, igual que las comparativas anteriores, mediante la herramienta *AgriGO* de *Gene Ontology*. En el análisis se introdujeron todos los genes regulados en S-bp217-1. En este caso sí aparecieron categorías sobrerrepresentadas de forma estadísticamente significativa, todos ellos relativos al término GO función molecular. Las categorías sobrerrepresentadas son “unión a grupos heme”, “unión a tetrapirrol” y “unión al ion hierro” (tablas IV.20 y IV.21). Dentro de estas categorías están asociados genes que codifican precursores de peroxidasas de clase III (EC.1.11.1.7), concretamente cuatro genes con niveles de expresión entre 2 y 3 veces inferiores a Senia (señalados en negrita en la tabla IV.19). Las peroxidasas de la clase III de plantas pertenecen al único grupo de enzimas que contienen el grupo de unión a heme, y son mayoritariamente proteínas de pared celular (Welinder *et al.*, 2002; Mei *et al.*, 2009). Tal como se muestra en la figura IV.36 la actividad del grupo heme está relacionada tanto con la unión del metal hierro como del grupo tetrapirrol. Estas dos categorías derivan de la categoría más general GO:0003674 (*binding*).

Ninguna otra categoría dentro de los 3 términos GO (ni de función molecular, ni de procesos biológicos ni de componente celular) asociada a las secuencias reguladas se mostró sobrerrepresentada estadísticamente. Aún así, se utilizó esta herramienta para la identificación de las funciones asociadas a los genes regulados. Las tablas IV.21 y IV.22 muestran aquellos genes que se han podido clasificar en los términos GO de función molecular y procesos biológicos, respectivamente. Así, son tablas sin valor estadístico sino únicamente informativo.

Tabla IV.19: Genes con expresión diferencial en S-bp217-1 respecto a Senia. Se muestra el código de Affymetrix, el código de acceso público, el cromosoma en que sitúa el gen diferencial (Chr.), la descripción del gen, el valor x-veces de expresión y el valor de la expresión diferencial

Código Affymetrix**	Chr.	Código Acceso Genbank	Descripción	x-veces*
Os.54492.1.S1_s_at	Chr. 12	AK105340.1	Secuencia transcrita	15,12
Os.10660.1.S1_at	Chr. 7	NM_186420.1	Proteína hipotética	12,17
OsAffx.20082.1.S1_at	Chr. 5	9640.m04095	Proteína hipotética	10,12
OsAffx.22999.1.S1_at	Chr. 7	AK108619.1	Proteína retrotransposon, putativa	9,70
Os.22606.1.S1_at	Chr. 11	CF278953	Secuencia transcrita.	9,93
Os.38444.2.S1_at	Chr. 5	AU163271	Proteína retrotransposon, putativa	6,07
OsAffx.25936.7.S1_s_at	Chr. 4 / 7	NM_184006.1	Elementos retrotransposables TNP2-like	4,45
Os.53344.1.S1_at	Chr. 3	AK072160.1	Secuencia transcrita	4,35
OsAffx.25720.1.S1_at	Chr. 3	9631.m05409	Proteína hipotética	4,31
Os.6645.1.S1_s_at	Chr. 7	AU101638	Péptido thionin-like, putativo	3,79
Os.55288.1.S1_at	Chr. 5	AK107804.1	Proteína hipotética	3,07
Os.10941.1.S1_at	Chr. 3	L34271.1	MADS-box factor de transcripción 1 SEPALLATA1 proteína de crecimiento putativa	2,89
Os.53606.1.S1_at	Chr. 6	AK073534.1	Proteína hipotética	2,71
OsAffx.28574.2.S1_at	Chr. 7	9635.m02386	Proteína hipotética	2,49
Os.12639.1.A1_at	Chr. 11	CF330511	Proteína quinasa, dominio catalítico	2,41
Os.25355.1.A1_at	Chr. 9	CA760741	Proteína hipotética	2,35
Os.22122.1.S1_at	Chr. 11	AB079874.1	OsDmc1 protein [Oryza sativa Japonica Group]	2,28
Os.18592.1.S1_at	Chr. 7	AU030928	UDP-glucosiltransferasa, putativa	2,22
Os.7505.1.S1_at	Chr. 5	AK106750.1	CLA1 proteína tipo transquetolasa	2,13
Os.6776.1.S1_at	Chr. 7	AK067173.1	Beta-1,3-glucanasa, putativa	2,08
OsAffx.30821.1.S1_at	Chr. 11	9639.m00411	Proteína hipotética	2,04
OsAffx.23383.1.S1_x_at	Chr. 1	9629.m02427	Proteína hipotética conservada	2,02
Os.264.1.S1_at	Chr. 4	AK073360.1	Precursor de peroxidasa 64 clase III ***	0,49
Os.9301.1.S1_x_at	Chr. 8	AK103189.1	Proteína de defensa, <i>Bet v I allergen</i>	0,48
Os.51234.1.S1_at	Chr. 9	AK062303.1	Proteína hipotética	0,48
Os.12764.1.S1_at	Chr. 4	CA759979	Proteína con dominio gamma-thionin Similar a inhibidor de proteasa II (<i>A. thaliana</i>)	0,47
Os.39411.1.A1_at	Chr. 1	CF304040	ABC transportador, putativo	0,47
Os.20289.1.S1_at	Chr. 11	AY435041.1	PR4b, proteína relacionada con la patogénesis	0,46
Os.8741.1.S1_at	Chr. 3	AK102303.1	ATP8, putativa	0,45
Os.5725.1.S1_at	Chr. 11	B1810367	Fructosa-bisfosfato aldolasa, putativa (<i>A. thaliana</i>)	0,44
Os.11556.1.S1_at	Chr. 7	D16442.1	Precursor de peroxidasa 112 clase III ***	0,44
OsAffx.2548.1.S1_at	Chr. 2	9630.m00821	Isoleucil-tRNA sintetasa, putativa	0,43
Os.5314.1.S1_at	Chr. 2	AK069347.1	Factor de iniciación de traducción 1A	0,43
OsAffx.21616.1.S1_s_at	Chr. 1	9629.m05354	Factor de transcripción 2 de respuesta a etileno, putativo	0,43
Os.53616.1.S1_at	Chr. 1	AK073591.1	Inhibidor de xilinas, putativo	0,42
Os.6075.1.S2_at	Chr. 4	CF319984	Proteína hipotética	0,40
Os.37644.1.S1_at	Chr. 1	AK107857.1	Pproteína hipotética	0,40
Os.10310.1.S1_at	Chr. 1	AK064825.1	Peptidil-proil cis-trans isomerasa, FKBP-tipo, putativa	0,39
Os.8503.1.S1_at	Chr. 6	AK062563.1	Proteína hipotética	0,37
Os.2957.1.S1_at	Chr. 3	AK120411.1	Precursor de peroxidasa 45 clase III ***	0,35
Os.11851.1.S1_at	Chr. 3	AK069202.1	Proteína transportadora, putativa	0,34
Os.55079.1.S1_at	Chr. 1	AK107432.1	Proteína hipotética	0,34
Os.9527.1.S1_at	Chr. 7	AK105239.1	Proteína con dominio sulfotransferasa STF-1, putativa	0,34
Os.27793.1.S1_x_at	Chr. 2	AK108037.1	Precursor de peroxidasa 30 clase III ***	0,32
OsAffx.26671.1.S1_x_at	Chr. 4	9632.m05851	Secuencia transcrita.	0,32
Os.2426.1.A1_at	Chr. 11	CA759372	Proteína hipotética	0,32
Os.4618.1.S1_at	Chr. 1	AK062310.1	Proteína hipotética	0,32
Os.31171.1.S1_at	Chr. 1	AK107734.1	Proteína hipotética	0,31
Os.5045.1.S1_at	Chr. 1	AK102138.1	BBT18 - Precursor de inhibidor de tripsina tipo de Bowman-Birk	0,29
OsAffx.13633.1.S1_s_at	Chr. 4	9632.m00213	Proteína homóloga a subtilisin, OsSub34, putativa	0,29
OsAffx.7986.1.S1_at	Chr. 10	9638.m03219	Vall-tRNA sintetasa, putativa	0,29
OsAffx.25978.1.S1_at	Chr. 4	9632.m00987	Proteína hipotética	0,28
OsAffx.7530.1.S1_s_at	Chr. 12	9640.m00831	Proteína hipotética	0,28
Os.12239.1.S1_at	Chr. 9	AK103890.1	Proteína ubiquitina / ribosomal, putativa	0,27
Os.51145.1.S1_at	Chr. 11	AK061132.1	Calcon sintasa, putativa	0,25
Os.39636.1.A1_x_at	Chr. 4	AU166388	Indol-3-acetato beta-glucosiltransferasa, putativa. UDP-glucosa: ácido salicílico glucosiltransferasa, putativa	0,25
Os.9327.1.S1_at	Chr. 5	AK103685.1	Precursor de proteínas de la familia extensin alergen (pollen Ole e I POE152)	0,22
Os.12345.1.S1_s_at	Chr. 2	AB114830.1	Proteína aquaporin, putativa	0,20
Os.49030.1.A1_s_at	Chr. 9	CR292984	Glutatin S-transferasa OsGST, putativa	0,20
Os.11800.1.S1_s_at	Chr. 1	AK108373.1	MDR-like ABC transportador	0,20
Os.16198.1.S1_at	Chr. 4	AK110892.1	Indol-3-acetato beta-glucosiltransferasa, putativa. UDP-glucosa: ácido salicílico glucosiltransferasa, putativa	0,17
Os.54270.1.S1_at	Chr. 3	AK102950.1	Secuencia transcrita	0,15
OsAffx.30103.4.S1_s_at	Chr. 2	9637.m02463	Proteína de fusión ubiquitina, putativa	0,11
Os.6101.1.S1_at	Chr. 4	AK106302.1	Indol-3-acetato beta-glucosiltransferasa, putativa. UDP-glucosa: ácido salicílico glucosiltransferasa, putativa	0,09

*) x-veces corresponde a la razón entre la expresión en S-derbp100 y en Senia. Los valores marcados en rojo representan los genes inducidos en S-derbp100, con una expresión diferencial superior a 2,0-veces; y los marcados en verde, los genes reprimidos en S-derbp100, con una expresión diferencial inferior a 0,5-veces

**) Los genes sombreados de color verde se mostraron regulados en ambas comparativa, S-bp213-5 y S-bp217-1 vs. Senia

***) Genes sobrerrepresentados en el término GO función molecular en el análisis *AgriGO*

Tabla IV.20: Categorías sobre-representadas dentro del término GO función molecular de los genes con expresión diferencial en S-bp217-1 respecto a Senia. Se muestra la identificación de la categoría, la descripción, el número de secuencias introducidas (con expresión diferencial en S-bp217-1 vs. Senia) y anotadas en cada categoría (en el banco de secuencias GO), así como los valores estadísticos obtenidos por el método Fischer y el valor *P* ajustado por FDR

Término GO función molecular				
Identificación categoría	Descripción categoría	Anotados en la categoría / Total introducidos ^a	Anotados en la categoría / Total de función conocida ^b	<i>P</i> -valor ajustado ^c
GO:0020037	Unión grupo <i>heme</i>	4/52	205 / 45.078	0,0032
GO:0046906	Unión tetrapyrrol	4/52	217 / 45.078	0,0032
GO:0005506	Unión ión hierro	4/52	432/45.078	0,027

a) Genes de expresión diferencial en S-bp217-1 vs. Senia

b) Genes anotados en *AgriGO*: fondo genético *Affymetrix Genome Array* (GPL2025)

c) Basado en el método estadístico de Fisher y corrección múltiple FDR Yekutieli (Benjamini y Yekutieli, 2001)

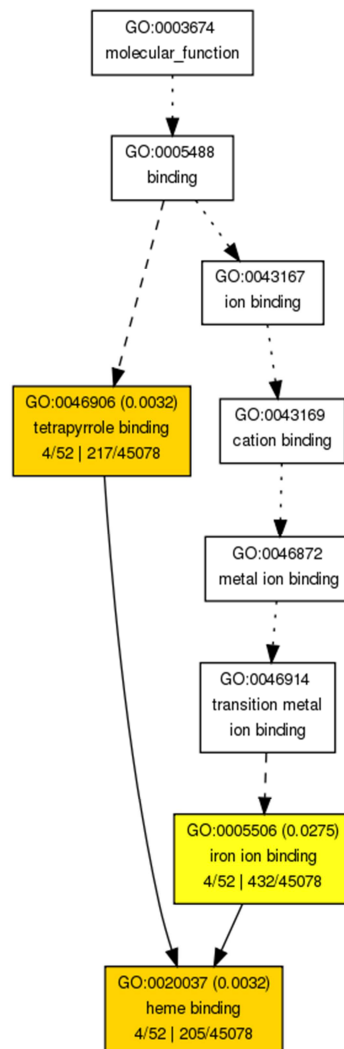


Figura IV.36: Representación gráfica de la relación entre las tres funciones moleculares sobre-representadas en *AgriGO* para los genes regulados en S-bp217-1. El color relaciona la categoría GO con el nivel de significación. Amarillo: nivel 1; naranja: nivel 2; ambos en una escala del 1 al 9 (mayor significancia) establecida por *AgriGO*.

través de la membrana). También en este caso el último gen está asociado además con el término GO:0003824 (actividad catalítica) por su función enzimática, al que están asociados además los genes que codifican enzimas con actividad peroxidasa, biosintética (*Os.51145.1.S1_at*) y transferasa (*Os.18592.1.S1_at* y *Os.9527.1.S1_at*, incluidos también en GO:0003824).

Tabla IV.22: Clasificación de los genes con expresión diferencial entre S-bp217-1 y Senia. Para cada secuencia se indica el código de *Affymetrix*, el nivel de expresión diferencial, la descripción de la misma y su categoría dentro del término GO de procesos biológicos

Código <i>Affymetrix</i>	*Exp	Descripción	Procesos biológicos									
			I	J	K	L	M	N	O	P	Q	
Os.9301.1.S1_x_at	Verde claro	Proteína de defensa, <i>Bet v I allergen</i>	■	■								
Os.2957.1.S1_at	Verde claro	Precursor de peroxidasa 45 clase III	■	■								
Os.27793.1.S1_x_at	Verde claro	Precursor de peroxidasa 30 clase III	■	■								
Os.20289.1.S1_at	Verde claro	PR4b, proteína relacionada con la patogénesis									■	
Os.51145.1.S1_at	Verde claro	Calcon sintasa, putativa									■	
Os.7505.1.S1_at	Verde oscuro	CLA1 proteína tipo transquetolasa			■						■	
OsAffx.30103.4.S1_s_at	Verde oscuro	Proteína de fusión ubiquitina, putativa									■	■
Os.10310.1.S1_at	Verde claro	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa, FKBP-tipo, putativa									■	■
Os.5725.1.S1_at	Verde claro	Fructosa-bisfosfato aldolasa, putativa (<i>A. thaliana</i>)									■	■
Os.22122.1.S1_at	Verde oscuro	OsDmc1 protein [<i>Oryza sativa Japonica Group</i>]			■						■	■
Os.39411.1.A1_at	Verde claro	ABC transportador, putativo									■	■
Os.12345.1.S1_s_at	Verde oscuro	Proteína aquaporin, putativa									■	■
Os.11800.1.S1_s_at	Verde oscuro	MDR-like ABC transportador									■	■

*Representación del nivel de expresión en línea MG vs. No-MG en escala de colores. Rojo: genes inducidos 2,5 > -veces > 2,0. Verde: genes reprimidos en S-bp217-1 vs. Senia (de verde claro a verde oscuro: >2-; > 3-; >4-; =5-; > 9-veces)

I	GO:0006950	Respuesta a estrés
J	GO:0050896	Respuesta a estímulos
K	GO:0006807	Procesos metabólicos de compuestos nitrogenados
L	GO:0051179	Localización
M	GO:0006810	Transporte
N	GO:0019538	Procesos metabólicos de proteínas
O	GO:0009058	Procesos biosintéticos
P	GO:0044260	Procesos metabólicos de macromoléculas
Q	GO:0044238	Procesos metabólicos primarios

La clasificación de los genes con expresión diferencial en función de los procesos biológicos asociados únicamente devuelve categorías GO generales. Tres genes (dos de los cuales reprimidos más de 4 veces en S-bp217-1 respecto a Senia) se asociaron a procesos de localización y transporte (dos del sistema ABC y una aquaporina). Los genes que codifican los precursores de peroxidasa de clase III 45 y 30 (los precursores de peroxidasa más fuertemente reprimidos en S-bp217-1) y el gen de defensa *bet1* se asocian a los términos de respuesta a estrés y a estímulos. A su vez se asocian a respuesta a estrés oxidativo (los 2 primeros) y defensa (el último). Finalmente, 7 genes están relacionados con procesos

biosintéticos y metabólicos, participando en la biosíntesis de la tiamina (*Os. 7505.1.S1_at*), síntesis de proteínas (*OsAffx.30103.4.S1_s_at*), pliegue de las mismas (*Os.10310.1.S1_at*), recombinación de ADN (*Os.22122.1.S_at* y *Os.39411.1.A1_at*) o glicólisis (*Os.5725.1.S1_at*). Entre los genes asociados a procesos metabólicos de macromoléculas se encuentra además *Os.20289.1.S1_at*, codificante de la proteína relacionada con la patogénesis PR4, asociada a pared celular.

Patrones de expresión de los genes reprimidos en S-bp217-1 respecto a Senia, en otras líneas S-derbp100

Como se ha comentado en el apartado anterior más del 70% de los genes regulados en S-bp217-1 respecto a Senia no se expresaban a niveles similares en S-bp213-5 y plantas convencionales. Concretamente para los genes reprimidos en S-bp217-1, el 90% se expresaban igualmente en S-bp213-5 y Senia. Se creyó pues oportuno analizar su posible regulación en otros eventos S-bp217, con el fin de determinar si dicha regulación era específica de evento (y podía depender, por ejemplo, de reordenaciones genómicas en el lugar de inserción del transgén) o podía asociarse al transgén *bp217*. A tal efecto se seleccionaron 10 genes reprimidos en S-bp217-1 y no en S-bp213-5 respecto a Senia (tabla IV.23). Se diseñaron y optimizaron ensayos de qPCR específicos, todos ellos generaron amplicones únicos de temperatura de disociación específica, y cumplieron con los criterios de eficiencia y linealidad requeridos. Las secuencias nucleotídicas y concentración de los cebadores se detallan en el anexo 3.

Se prepararon tres replicados biológicos de 10 plántulas de cada uno, todas ellas crecidas *in vitro* en paralelo y muestreadas en el estadio V3, de líneas homocigotas obtenidas a partir de tres eventos S-bp217 independientes: S-bp217-18, S-bp217-7 y S-bp217-9. Los 10 genes se analizaron mediante RT-qPCR sobre ARNm de hoja en las diferentes líneas S-bp217 y Senia, siempre utilizando los genes endógenos *β -actina*, *18S* ribosomal y *ef-1 α* como controles endógenos. Se utilizó la herramienta *geNORM v3.4* del programa *Genex v.4.3.1* para determinar su aplicabilidad para la normalización de los resultados, resultando adecuados (valor $M < 0,5$).

Como se observa en la tabla IV.23, los 10 genes analizados presentan expresión diferencial en los 3 eventos independientes respecto a Senia. Únicamente 2 genes se expresaban de forma similar en plantas convencionales y uno (*Os.11851.1.S1_at*) o dos (*Os.202891.S1_at*) de los eventos analizados. En todos los casos, la expresión diferencial lo es en el sentido de estar reprimidos en las líneas S-bp217. Estos resultados muestran que la regulación de los genes analizados no es específica del evento S-bp217-1 (*Os.202891.S1_at* está reprimido en 2 líneas

S-bp217, incluyendo S-bp217-1). El gen *Os.11851.1.S1_at* fue un caso particular, puesto que se mostró reprimido en S-bp217-9 y S-bp217-18 pero no en los otros 2 eventos respecto a Senia; incluyendo S-bp217-1, que a pesar de haberse seleccionado como diferencial en las hibridaciones en *microarrays*, este resultado no se corroboró en los ensayos de RT-qPCR. Es muy probable que esta situación se deba al reducido nivel de expresión de dicho gen, incluso en la línea no-MG (la señal de fluorescencia en los *microarrays* era cercana al filtro aplicado, que se sitúa en 150 unidades de fluorescencia para la línea con mayor expresión).

Tabla IV.23: Secuencias seleccionadas para el análisis de expresión en eventos S-bp217. Se muestran los resultados del análisis estadístico *t-Student* de la comparativa de cada una de las líneas MG con Senia

Código Affymetrix	Descripción	RT-qPCR		
		P-valor test t-student		
		S-bp217-7	S-bp217-9	S-bp217-18
<i>Os.264.1.S1_at</i>	Precursor de peroxidasa 64 clase III	0,003	0,001	0,006
<i>Os.2957.1.S1_at</i>	Precursor de peroxidasa 45 clase III	0,045	0,001	0,004
<i>Os.27793.1.S1_x_at</i>	Precursor de peroxidasa 30 clase III	0,001	0,000	0,045
<i>Os.9301.1.S1_x_at</i>	Proteína de defensa, <i>Bet v I allergen</i>	0,007	0,003	0,019
<i>Os.20289.1.S1_at</i>	PR4b, proteína relacionada con la patogénesis	0,103	0,000	0,094
<i>Os.10310.1.S1_at</i>	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa, FKBP-tipo, putativa	0,008	0,000	0,001
<i>Os.39636.1.A1_x_at</i>	Indol-3-acetato beta-glucosiltransferasa, putativa.	0,001	0,000	0,000
	UDP-glucosa: ácido salicílico glucosiltransferasa, putativa			
<i>Os.16198.1.S1_at</i>	Indol-3-acetato beta-glucosiltransferasa, putativa.	0,000	0,017	0,001
	UDP-glucosa: ácido salicílico glucosiltransferasa, putativa			
<i>Os.5045.1.S1_at</i>	BBT18 - Precursor de inhibidor de tripsina tipo <i>Bowman-Birk</i>	0,002	0,003	0,002
<i>Os.11851.1.S1_at</i>	Proteína transportadora, putativa	0,083	0,012	0,013

Estos resultados parecen sugerir que la regulación negativa de los genes analizados sea consecuencia de la presencia o expresión del transgén *bp217*. El hecho de que los genes analizados no se expresaran de forma diferencial entre S-bp213-5 y Senia (hibridaciones en *microarrays*) indica que esta regulación sería específica de *bp217*, no dependiendo de otros *derbp100* ni del gen de selección.

Como se observó en el apartado IV.1 de esta tesis (análisis de expresión en líneas S-afp y S-ZmPR4:afp), para algunos genes cuya regulación en plantas MG depende del transgén, los niveles de expresión en plantas MG depende del nivel de expresión del transgén. Nos propusimos evaluar si éste podía ser el caso en los 10 genes diferencialmente expresados en las líneas S-bp217 respecto a Senia. Así, se compararon estadísticamente (mediante el programa *Genex v.4.3.1*) los niveles de expresión de los 10 genes entre cada una de las líneas S-bp217 analizadas y S-bp217-1. Los niveles de expresión de *bp217* en S-bp217-7, S-bp217-18, S-bp217-9 y S-bp217-1 son de $1,3 \pm 0,4$; $1,5 \pm 0,1$; $2,6 \pm 0,4$ y $9,4 \pm 2,6$ veces los niveles de β -actina (únicamente es significativa la diferencia entre los 3 primeros y el último). El gen

Os.2957.1.51_at se expresa en los 3 eventos a niveles intermedios entre S-bp217-1 y Senia (figura IV.37). Teniendo en cuenta que S-bp217-7, S-bp217-18 y S-bp217-9 tienen menores cantidades de ARNm de *bp217*, se podría hipotetizar que el nivel de expresión de *Os.2957.1.51_at* está relacionado con el del transgén.

Sin embargo, para los 9 genes restantes no se observó una tendencia clara (figura IV.37), únicamente cabe destacar que la mayoría de estos genes se expresan de forma similar en S-bp217-1 y dos (o tres) de los eventos estudiados. El caso de S-bp217-7 es el más extremo, con los 9 genes expresados como S-bp217-1. Remarcablemente, S-bp217-7 es la línea con menor expresión del transgén. No se puede concluir, por tanto, que la expresión de estos 9 genes en las líneas S-bp217 dependa del nivel de expresión de *bp217*. Hay que notar, sin embargo, que la diferencia de nivel de expresión del transgén en las líneas estudiadas es sólo de 4- a 7-veces. Estos resultados sugieren que la regulación negativa de los genes analizados es consecuencia del transgén *bp217*, no pudiéndose discriminar si su regulación depende del nivel de expresión del transgén.

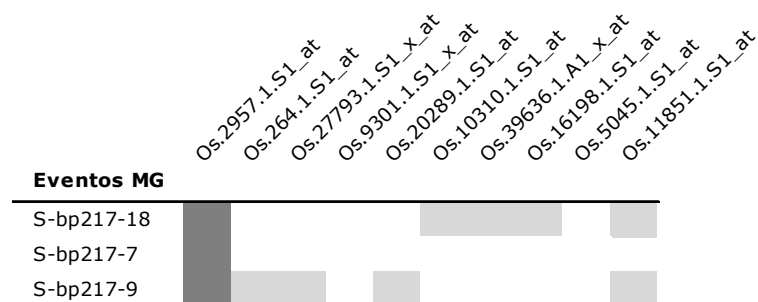


Figura IV.37: Comparación del nivel de expresión de los 10 genes seleccionados en líneas S-bp217 (S-bp217-18, S-bp217-7 y S-bp217-9 respecto a S-bp217-1). Las combinaciones que muestran expresión diferencial de forma estadísticamente significativa (test *t-Student*, P -valor < 0,05) se muestran sombreadas en gris. Los genes en gris oscuro se inducen y en gris claro se reprimen en S-bp217-18, S-bp217-7 o S-bp217-9 respecto a S-bp217-1. En blanco se muestran las secuencias igualmente expresadas en las líneas comparadas.

V. DISCUSIÓN

Las plantas MG están sujetas a estrictas legislaciones que tienen la finalidad de garantizar ante todo la seguridad alimentaria y la protección del consumidor. Estas legislaciones, fundamentadas en el concepto de equivalencia sustancial, determinan que una línea OMG (especialmente si está destinada al consumo como arroz o maíz) no puede diferir de las variedades convencionales de la misma especie (especialmente en lo que refiere a seguridad) para poder ser comercializada, a excepción del efecto deseado del transgén. Los criterios de evaluación de OMGs se centran básicamente en la comparación de la composición de un OMG con la de la línea convencional más próxima (comparador), a nivel de porcentajes de proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas, demás nutrientes, antinutrientes, etc. Deben analizarse asimismo la integridad y secuencia del transgén, su número de copias por genoma haploide y el lugar de inserción en el genoma huésped, su estabilidad a lo largo de generaciones, el nivel de expresión, la posibilidad de que codifique otros péptidos o proteínas, así como la posible presencia de secuencias alergógenas. Si se presume un riesgo se exigen además ensayos de toxicidad en animales (normalmente en rata). Cualquier diferencia hallada entre una planta MG y su isogénica no-MG, sin considerar el efecto intencionado del transgén, puede ser un efecto no intencionado del transgén. Dichos efectos pueden ser predecibles o no predecibles, en gran parte en función de nuestros conocimientos sobre la biología de la planta huésped.

Para la evaluación de los efectos no intencionados de un transgén existen actualmente una serie de técnicas capaces de analizar globalmente los patrones de expresión génica, acumulación de proteínas o metabolitos en plantas MG y convencionales. Estas técnicas se conocen como técnicas generalistas o de *profiling*. En los últimos años se han publicado diversos estudios de evaluación de los efectos no intencionados de determinados OMGs respecto a las líneas isogénicas no-MG, utilizando este tipo de técnicas (Hoekenga, 2008; Kok *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2010, revisión Ricroch *et al.*, 2011). Estas evaluaciones muestran consistentemente la poca importancia cuantitativa de los efectos no intencionados hallados en los OMGs analizados. Además, tanto los niveles de expresión de los genes regulados en OMGs respecto a sus comparadores, como la acumulación de las proteínas reguladas se sitúan en el

rango de valores considerado normal para la especie, es decir, se encuentran en variedades convencionales de esta especie, y/o en respuesta a condiciones ambientales muy comunes. Además, los genes y proteínas afectados no están mayoritariamente relacionados con una función determinada en la célula. Aunque las diferencias entre plantas MG y no-MG isogénicas son en general mínimas, este trabajo plantea el estudio de las causas de las diferencias no intencionadas. Ello facilitaría el desarrollo de nuevas técnicas para minimizarlas; y se espera aportar datos objetivos relevantes en el contexto de la problemática social generada por la comercialización de OMGs.

Se optó por evaluar los efectos no intencionados de los OMGs mediante técnicas de análisis transcriptómico, concretamente basadas en la hibridación de *microarrays* comerciales, por tratarse de técnicas muy estandarizadas y robustas. Se trabajó con arroz (*Oryza sativa*) como modelo, un cereal ampliamente estudiado a nivel genómico, molecular e incluso evolutivo (Yang y Jiang, 2007; Jiang *et al.*, 2011). El genoma de arroz se ha secuenciado mediante diferentes técnicas y es actualmente uno de los genomas eucariotas mejor secuenciados (Goff *et al.*, 2002, Yu *et al.*, 2002, Matsumoto *et al.*, 2005). Además, existe una gran cantidad de información acerca de la genómica funcional del arroz, recogida en diversas bases de datos. En comparación con otras especies vegetales, el arroz es fácilmente transformable tanto por *Agrobacterium* como biolística, de forma que se ha obtenido una gran variedad de plantas de arroz MG. Se escogieron pues 3 líneas de arroz MG, todas obtenidas a partir de transformación de callos embriogénicos mediante *Agrobacterium* y seleccionadas por resistencia a higromicina (*hpt II*). Las 3 incluían transgenes que les confieren fenotipos de resistencia, regulados por el mismo promotor constitutivo y terminador. Se trata de las líneas S-*afp*, S-*bp213-5* y S-*bp217-1*. Dos de los transgenes incorporados (*bp213* y *bp217*) presentan cierto grado de fitotoxicidad respecto a la célula huésped, ya que codifican PAMs α -helicoidales y altamente activos.

La línea S-*afp* expresa de forma diferencial un **0,4%** de las secuencias analizadas (un total de 196 de los 48.564 transcritos analizados), respecto a Senia. Cabe precisar que en este experimento se minimizaron los posibles efectos de condiciones ambientales no controladas, analizando hojas de plántulas crecidas *in vitro* hasta un estadio V3 y en condiciones homogéneas; y 3 replicados biológicos de 10 plantas (situadas aleatoriamente en las cámaras de cultivo) cada uno. El total de genes regulados es similar al descrito para otros OMGs de otras especies. Por ejemplo, en la planta modelo *Arabidopsis* se observaron diferencias transcripcionales muy reducidas entre plantas convencionales y OMGs que expresaban diferentes genes marcadores (El Quakfaoui y Miki, 2005), de resistencia a herbicida (Abdeen y Miki, 2009) o un factor de transcripción relacionado con la tolerancia a estrés hídrico (Abdeen *et al.*, 2010). En especies utilizadas para el consumo humano, el grupo publicó previamente que el maíz MON810 resistente a insectos, ampliamente comercializado, presenta una

regulación transcriptómica muy limitada (Coll *et al.*, 2008). Este evento, así como el maíz NK603 tolerante a glifosato, muestran menores cambios transcriptómicos que aquellos producidos por efectos ambientales y por técnicas de mejora convencional (Barros *et al.*, 2010; Coll *et al.*, 2010). Resultados similares se han publicado para plantas de arroz productoras de anticuerpos CsFv (Batista *et al.*, 2008) y subunidad- α antralinato sintasa (Dubouzet *et al.*, 2007), así como en otras especies como soja tolerante a glifosato (Cheng *et al.*, 2008) o trigo productor de fitasa (Gregersen *et al.*, 2005) o de una glutelina (Baudo *et al.*, 2009). Así pues, se considera que el par S-afp / Senia constituye un modelo adecuado para evaluar las posibles causas de los efectos no intencionados del transgén a nivel transcripcional.

Sorprendentemente, el análisis de un 20% de las secuencias reguladas entre S-afp y Senia mostró que la expresión diferencial de algunos de estos genes no está relacionada con la presencia ni la expresión del propio transgén, sino que existe también en plantas no-MG que han pasado por el mismo proceso (protocolo de obtención de plantas MG). Estas plantas, S-afp(-), resultan de la autopolinización de plantas S-afp hemicigotas para el transgén; y corresponden a la cuarta parte de la F1 que no incorpora el transgén, siendo pues, no-MG. Sin embargo, proceden de regeneración a partir de callos que habían sido infectados con *Agrobacterium* y seleccionados con higromicina: han pasado por estadio de callo y regeneración en cultivos *in vitro*. El hecho de que algunas secuencias se expresaran de forma diferente en Senia respecto a S-afp y S-afp(-) demuestra que su regulación no está asociada al transgén (presencia y/o expresión), sino al procedimiento experimental seguido. Esta aproximación experimental, basada en el uso del comparador adecuado, permite pues diferenciar entre los efectos no intencionados derivados del transgén y aquellos derivados del proceso de transformación. En el caso particular de S-afp / Senia, se cuantificó el efecto derivado del proceso de obtención de OMGs en el 35% de los genes analizados, con un intervalo de confianza del 95% entre 21% y 52%, calculado según Newcombe (1998). La introducción de un transgén en el genoma de una planta incluye el uso de técnicas de cultivo *in vitro* para inducir la desdiferenciación celular a callo, transformación con *Agrobacterium*, selección en medio con higromicina, diferenciación celular y regeneración de plantas MG. Todos estos procedimientos están asociados a situaciones de estrés, como por herida, osmótico o insuficiencia nutricional, así como el uso reguladores de crecimiento y de antibióticos (Carman, 1995), que inducen a menudo cambios genéticos (Filipecki y Malepszy, 2006; Latham *et al.*, 2006). En concordancia con nuestros resultados, Labra y colaboradores (2001) describieron mayor variabilidad genética en plantas MG obtenidas a partir de callos, que aquellas obtenidas a través de técnicas de transformación que no incluyen el cultivo de tejidos (por ejemplo, *floral dip*). Por otra parte, y también de acuerdo con nuestros resultados, se conoce que las infecciones por *Agrobacterium* u otros patógenos pueden causar modificaciones genómicas que resulten en cambios transcripcionales (Budziszewski *et al.*,

2001; Lucht *et al.*, 2002). Nuestros resultados no permiten discernir si los cambios transcripcionales entre S-afp y Senia son consecuencia de la infección o del cultivo *in vitro*; como tampoco si son mutaciones o modificaciones epigenéticas (los efectos del cultivo *in vitro* se han atribuido a cambios epigenéticos, Kaeppler *et al.*, 2000). Pero en el contexto del debate generado sobre la conveniencia o no de comercializar OMGs, es importante destacar que las infecciones por patógenos son fenómenos comunes y frecuentes en la naturaleza; y que el cultivo *in vitro* de especies vegetales tiene multitud de usos de interés comercial no relacionados con los OMGs, como la generación de variedades convencionales mejoradas (Larkin y Scowcroft, 1981; Veilleux y Johnson, 1998), la obtención de material vegetal libre de patógenos, o la propagación de especies.

Algunas de las secuencias expresadas diferencialmente en S-afp y la convencional S-afp(-) están reguladas en los tres eventos S-afp estudiados, respecto a Senia. Ello sugería que estos procesos aplicados para la modificación genética resultaban en la regulación preferente de ciertos genes. Se descartó la regulación transcripcional derivada de la evolución de la propia línea Senia, ya que las líneas MG S-bp217-1 y S-bp213-5, obtenidas a partir de la misma Senia que se utiliza como comparador, mostraron también algunas de estas diferencias (ver más adelante). En el caso del evento S-afp analizado (S-afp-14), aproximadamente un 15% de las diferencias transcriptómicas entre S-afp-14 y Senia [95 % IC: (6%, 30%)] son específicas de evento, es decir, estos genes mostraron niveles parecidos de expresión entre Senia y otros 2 eventos S-afp. De las 5 secuencias identificadas en este grupo, únicamente *Os.8032.1.S1_at* está anotada, y codifica una β -oryzaína, una proteína específica de arroz que participa en la regulación del aporte de agua a la planta. Sí se ha podido saber que las 5 secuencias afectadas están situadas en diferentes cromosomas, sugiriendo que dicho efecto no está restringido a secuencias situadas en la zona de inserción del transgén. La integración del T-ADN mediante la transformación por *Agrobacterium* acostumbra a conllevar pequeñas modificaciones en el lugar de inserción, que pueden ser eliminaciones de unos pocos pares de bases así como la introducción de secuencias superfluas (Latham *et al.*, 2006). No se puede descartar, sin embargo, que en algunas ocasiones se produzcan reorganizaciones génicas a mayor escala (un caso bien estudiado es el del maíz MON810, La Paz *et al.*, 2010). De todas formas, el transgén puede interrumpir secuencias génicas y/o interaccionar con secuencias próximas al lugar de inserción, resultando en efectos no intencionados (Miki *et al.*, 2009). Es relevante notar que este tipo de efectos no intencionados pueden evitarse simplemente a través de la selección de los eventos de transformación que presenten los mínimos efectos no deseados.

Así, únicamente la expresión diferencial de la mitad de las secuencias reguladas en S-afp y Senia puede atribuirse directamente a la presencia y/o expresión del transgén, lo que representa un 0,20% del transcriptoma de esta línea MG (Figura V.1).

A continuación se planteó si la regulación de estos genes dependía de la mera presencia del transgén, o se modulaban en función del nivel de expresión de *afp*. Así, se estudió la expresión de los 17 genes cuya regulación en S-*afp* vs. Senia se había asociado al transgén, en una línea MG similar a S-*afp* pero en la que el transgén *afp* está regulado por un promotor diferente (*ZmPR4*) y el nivel de expresión de *afp* es de aproximadamente 400 veces menor que en S-*afp*. La regulación de aproximadamente un 40% de ellos dependía del nivel de expresión del transgén (es decir, se expresaban de la misma forma en S-*ZmPR4:afp* y Senia). Consecuentemente, la regulación del 60% restante se atribuyó a la presencia (y/o expresión basal) de *afp*. El promotor *ZmPR4*, del gen que codifica por la proteína PR4 de maíz, es inducible por patógenos, elicitores y herida (Moreno *et al.*, 2005); y S-*ZmPR4:afp* presenta un fenotipo de resistencia a *M. grisea*. Nuestros resultados demuestran que una estrategia de expresión de proteínas heterólogas con promotores inducibles puede ser eficaz para reducir el impacto no intencionado del transgén sobre la planta huésped, manteniendo el fenotipo deseado.

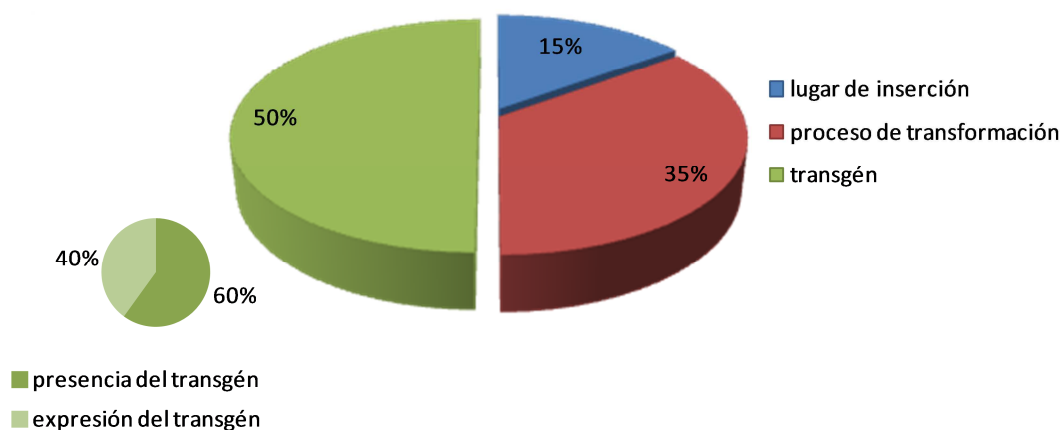


Figura V.1: Distribución de las causas atribuidas a los efectos no intencionados del transgén sobre el transcriptoma de S-*afp*.

Tal como ocurre en otras especies y transgenes (El Quakfaoui y Miki, 2005, Cheng *et al.*, 2008; Coll *et al.*, 2008), las secuencias expresadas diferencialmente entre S-*afp* y Senia están involucradas en una gran variedad de procesos biológicos. Las secuencias reguladas estaban mayoritariamente involucradas en procesos de respuesta a estímulos químicos, así como en procesos catabólicos y metabólicos de carbohidratos. El reducido número de secuencias reguladas que han podido asociarse al proceso de obtención de plantas MG, lugar de inserción del transgén o presencia/expresión del mismo imposibilita calcular la significación estadística del tipo de secuencias preferentemente reguladas por cada una de las 3 causas estudiadas. Por tanto, no se puede determinar si las secuencias reguladas en S-*afp* respecto a Senia como

consecuencia del proceso de obtención del OMG, lugar de inserción del transgén o su presencia/expresión realizan preferentemente una función determinada o participan en procesos biológicos concretos.

Nueve de las secuencias reguladas en S-afp y Senia se relacionan con la respuesta a estímulos químicos. Cinco de ellas participan en la respuesta a estrés, concretamente oxidativo (BU673129, putativa peroxidasa; D21280.1, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; D10425.1, catalasa), hídrico (AK107749.1, β -oryzaína) y defensa contra infecciones bacterianas y fúngicas (AY050642.1, proteína relacionada con patogénesis PR4). Las cuatro secuencias restantes están relacionadas con la respuesta a la hormona auxina (AK058556.1 y AK062728.1, similares a una proteína inducible por auxina de tipo SAUR; 9636.m00152 y 9634.m02249, genes de respuesta a auxina de las familias SAUR y Aux/IAA, respectivamente). La homeostasis de la auxina regula la activación de la respuesta de defensa en diferentes especies de plantas, incluyendo *Arabidopsis* (Navarro *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007) y arroz (Domingo *et al.*, 2009). Los genes que participan en procesos catabólicos y del metabolismo de la glucosa también están sobrerrepresentados entre los regulados en S-afp respecto a Senia. Éstos incluyen 5 genes de respuesta a estrés y una enzima de la ruta metabólica de fenilpropanol (BI807677, que codifica por PAL, una proteína con actividad fenilalanina-amonio-liasas involucrada en reacciones de defensa). En esta categoría se sitúan también 4 genes involucrados en la glicólisis (BU667041, putativa fructosa-1,6-bisfosfatasa; AK062270.1, aldolasa C-1; BI810367, putativa fructosa-bisfosfato aldolasa; y D21280.1, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), 2 que participan en la biosíntesis de la celulosa (AK120236.1, celulosa sintasa CESA3; y AK067850.1, subunidad catalítica de una celulosa sintasa similar a RSW1) y una enzima del ciclo del ácido tricarbóxico TCA (AK106451.1, fosfoenolpiruvato carboxilasa). En plantas, la respuesta a estrés está asociada a la activación de una gran cantidad de mecanismos que suponen mayor demanda de energía y redistribución de la misma. Recientemente, algunas publicaciones centradas en el estudio de la respuesta de diversas especies vegetales a la infección por patógenos mediante métodos generalistas o de *profiling* ha mostrado la regulación de genes del metabolismo primario, y se ha deducido que tienen un papel importante en la respuesta de defensa de la planta, ya que suministran la energía necesaria (revisión: Bolton, 2009). La respuesta a estrés estimula asimismo la respiración celular, lo que conlleva un aumento de la glicólisis (conversión de glucosa a piruvato, generando ATP) y del ciclo mitocondrial TCA (generación de equivalentes de reducción que son usados en la cadena transporte de electrones para la síntesis de ATP). También se han descrito en respuesta al ataque por patógenos la reducción de la fotosíntesis y cambios en el metabolismo de carbohidratos.

La línea S-*afp* es resistente a infección de *M. grisea* como consecuencia de la expresión de *afp* (Coca *et al.*, 2004). Nuestros resultados de expresión diferencial entre S-*afp* y Senia han mostrado la regulación de una serie de genes que se habían relacionado con la respuesta de plantas convencionales a estrés, de forma que S-*afp* mimetizaba parcialmente la respuesta a un estrés abiótico, particularmente el infringido por herida. Así, investigamos el patrón de expresión de los genes regulados en S-*afp* respecto a Senia que habíamos identificado como dependientes a la presencia y/o expresión del transgén, en plantas convencionales y MG sometidas o no a herida. Se comprobó experimentalmente que la mitad de estos genes (9 genes) se inducían en Senia 3 horas después de aplicar una herida. Sin embargo, resultó muy interesante evidenciar que estas secuencias no se indujeron en S-*afp* en respuesta al mismo tratamiento. Estas secuencias se expresaban en S-*afp* en condiciones normales a los mismos niveles que en Senia en respuesta a herida. Se dedujo que en este caso la sobre-expresión no intencionada de genes involucrados en procesos de respuesta a estrés podría mejorar la resistencia a estrés de las plantas MG. La regulación de 6 de estas 9 secuencias se había asociado a la presencia y/o expresión basal de *afp*, con lo que este efecto se daría incluso a niveles muy moderados de expresión del transgén. Algunos resultados publicados previamente apoyarían este efecto no intencionado de algunos tipos de transgenes (en particular, aquellos que persiguen fenotipos de resistencia, como *afp*), incrementando la resistencia de las plantas MG a estrés. En un estudio del defensoma de una línea de arroz Senia MG, productora del péptido antimicrobiano CecA (Campo *et al.*, 2008), se observaron elevados niveles de algunos genes involucrados en la protección frente a estrés oxidativo. Ello se correlacionó con el fenotipo observado en estas plantas MG, que además de la resistencia esperada, mostraban resistencia a otras especies bacterianas y fúngicas patógenas, y a estrés oxidativo. Así pues, la expresión de genes codificantes de PAM como AFP y CecA en plantas MG podría generar modificaciones no intencionadas en los niveles de transcripción de genes relacionados con la tolerancia a estrés, confiriéndoles una resistencia mejorada y más específica a determinadas condiciones de estrés.

Como segundo objetivo de esta tesis se abordó la posibilidad de sintetizar en planta de arroz PAM de la familia BP100, catiónicos y altamente activos pero no específicos contra patógenos de arroz, y analizar el impacto de éstos sobre la planta en términos de fitotoxicidad, modificaciones transcripcionales hacia fenotipos de resistencia así como evaluar el sistema de expresión utilizado y su posible aplicación como biofactoría. Varios de los undecapéptidos lineales de la librería CECMEL11 (actualmente constituida por 125 péptidos sintéticos diseñados por química combinatoria a partir de un híbrido CecA-melitina) presentan creciente interés en el desarrollo de agentes fungicidas y bactericidas contra patógenos de plantas (Montesinos y Bardají, 2008). En concreto el péptido BP100 tiene especial interés por sus propiedades contra patógenos de plantas de gran impacto económico (Badosa *et al.*, 2007). Al

igual que los restantes péptidos CECMEL11, BP100 presenta unas características químicas muy especiales. Tiene únicamente 11 aminoácidos y presenta una estructura en α -hélice anfipática, con fuerte carga positiva (pI~11), además de presentar una fuerte actividad antimicrobiana. La producción biotecnológica de BP100 no es *a priori* fácil y plantea unos retos específicos no pudiéndose descartar efectos nocivos sobre la planta huésped [a pesar de la baja toxicidad de BP100 determinada en ensayos de toxicidad aguda en ratón (Montesinos y Bardají, 2008)].

El presente estudio se planteó el objetivo de evaluar la posibilidad de expresar transgenes que codifican péptidos de la serie BP100 en plantas. Ello podría tener una doble aplicación: conferir a la planta un fenotipo de resistencia a patógenos; y obtener plantas biofactoría de moléculas activas relevantes. Se utilizó arroz como especie modelo, y se prestó especial atención al efecto que dichos transgenes puedan tener sobre la planta huésped (se evaluaron parámetros fenotípicos relacionados con la productividad y otras características agronómicas de interés). Se utilizó BP100 como modelo de péptidos cortos catiónicos, que se consideran una fuente importante de sustancias activas con una gran variedad de aplicaciones. La estrategia planteada consistió en acumulación del péptido en el retículo endoplasmático (RE) para minimizar el posible efecto nocivo sobre la planta huésped y a la vez, proteger el péptido de las proteasas celulares vegetales (Coca *et al.*, 2006; Florack *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 1994). Finalmente, se aumentó el tamaño del péptido a través del diseño de péptidos mayores basados en la secuencia BP100. Así, se diseñaron cinco derivados de BP100 de diferentes tamaños y estructuras: un monómero, tres dímeros y un trímero. La estructura de los PAM naturales se ha asociado en algunos casos con su actividad antimicrobiana. Por ejemplo, la CecA presenta dos regiones estructuralmente diferenciadas, unidas a través de una secuencia puente que permite la movilidad de una respecto a la otra, la cual es necesaria para su actividad (Rao, 1995). Fink y colaboradores (1989) mostraron también esta relación entre estructura y actividad en CecA en un estudio con péptidos sintéticos. En éste se concluye que la actividad antibacteriana requiere dos secuencias con estructura α -hélice, una N-terminal básica y una C-terminal hidrófoba, unidas mediante una región puente flexible y no helicoidal. En el caso de la CecA, la región puente contiene los aminoácidos alanina (A), glicina (G) y prolina (P) formando la secuencia AGPA. Para el diseño de los derivados de BP100 se realizó un estudio previo para evaluar la idoneidad o no de introducir una secuencia puente adyacente a la unidad BP100. Así, se comparó la actividad de dímeros y trímeros de BP100 con y sin la secuencia de unión AGPA (todos ellos obtenidos por síntesis química). Se observó consistentemente mayor actividad contra las especies diana en aquellos derivados de BP100 que incluían AGPA (E. Badosa, comunicación personal), de forma que dicha secuencia se introdujo en los derivados de BP100 para su expresión en arroz en el presente trabajo.

Los cinco derivados de BP100 diseñados incorporan secuencias de dirección y retención en retículo endoplasmático: la primera se procesa y no formará parte del péptido maduro, mientras que la última (la secuencia C-terminal KDEL) se mantiene en el péptido final. Las modificaciones introducidas en el PAM BP100 alteraron sus propiedades en términos de actividad antibacteriana, especificidad para el patógeno diana y actividad hemolítica. Por ello se considera prudente el ensayo de la actividad biológica y otras propiedades de un péptido antes de su posterior aplicación, por ejemplo, para su síntesis en plantas transgénicas. Los cinco derivados de BP100 diseñados para su expresión en planta presentaron mayor actividad antibacteriana que BP100 y BP134 (tabla IV.5). La mayor actividad parece estar relacionada con el incremento de tamaño del péptido y/o con la presencia de la secuencia KDEL en el extremo C-terminal. La comparación de BP214 y BP134 es especialmente indicativa, puesto que ambos péptidos se distinguen únicamente por la presencia o no de dicha secuencia. Este resultado mostró la viabilidad de la aproximación experimental basada en acumulación de péptidos antibacterianos activos en el RE. Además, era acorde con la intención de expresar en plantas péptidos con elevada actividad antibacteriana. Huang HW (2000) mostró también que el tamaño y la secuencia de los péptidos son los factores más relevantes para su actividad biológica. Nuestros resultados concuerdan asimismo con estudios anteriores en que se muestra que la modificación de un solo aminoácido influye en la actividad antimicrobiana y hemolítica de los péptidos de la librería CECMEL11 (López-García, 2002; Monroc, 2006; Badosa *et al.*, 2007). Por ejemplo, una sustitución en BP76 (aa X¹=K; aa X¹⁰=F) para generar BP81 (aa X¹=L) resultó en una mayor actividad hemolítica (95% superior); y una sustitución distinta (BP100 aa X¹⁰=Y) disminuyó en un 35 % dicha actividad (Badosa *et al.*, 2007). Otros PAMs han permitido observar asimismo el efecto de modificaciones de secuencia sobre la actividad antimicrobiana: la secuencia dimérica Phor14 y la trimérica Phor21 presentan CMI₅₀ de 38 μ M y 18,6 μ M, respectivamente, frente al patógeno de arroz *Rhizoptonia solani* (Javadpour *et al.*, 1996; Oard *et al.*, 2004). Nuestros resultados parecían indicar la existencia de una relación entre la estructura del PAM y su actividad biológica. Mientras que el trímero BP216 no presentó mayor actividad que el monómero frente a ninguna de las especies bacterianas diana analizadas, los dímeros BP192, BP213 y BP217 son 3, 10 y 40 veces más activos que BP100, respectivamente, frente a *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. BP213 y BP217 son 3 veces más activos que BP100 frente a *E. amylovora* y *P. syringae* pv. *syringae*, mientras que BP192 muestra el mismo nivel de actividad que BP100 frente a estos patógenos. Ello demuestra, por una parte, que las modificaciones en los derivados de BP100 implican variaciones en la especificidad de su actividad antibacteriana. Por otra parte, parece sugerir una relación directa entre la orientación de las sucesivas secuencias BP134 y la actividad de los derivados de BP100, siendo la orientación inversa la que da lugar a mayores actividades. De forma similar, Sym11, PAM de 11 aminoácidos (RRFPWWPFRR) cuya secuencia es un dímero orientado simétricamente a la secuencia tri-triptófano, presenta mejor actividad biológica que la

molécula original (Nagpal *et al.*, 1999 y 2002). Por otra parte, Kindrachuk y colaboradores (2011) estudiaron BMAP28 y RI-BMAP28 (isómero retroinvertido), con la misma secuencia de aminoácidos en orientación opuesta. RI-BMAP28 fue más estable frente a proteasas y menos citotóxico que BAMP28.

Los resultados de nuestros experimentos de hemólisis parecen sugerir que existe una relación directa entre longitud de los cinco derivados de BP100 diseñados para expresión en planta y su actividad hemolítica. La melitina, péptido utilizado en nuestros experimentos como referencia por su elevada actividad hemolítica, es capaz de lisar tanto células vegetales como de mamífero. Su actividad está altamente relacionada con su secuencia primaria, que incluye el motivo *leucin-zipper*, en que los aminoácidos leucina e isoleucina se encuentran en la posición a (Leu-6, Leu-13, and Ile-20) y d (Ile-2, Leu-9 and Leu-16). Aunque el motivo *leucin-zipper* se ha relacionado con factores de transcripción de interacción con el ADN (Landschulz *et al.*, 1988) así como en proteínas de fusión virales (Ghosh *et al.*, 1997) la sustitución aminoácidos en la secuencia *leucine-zipper* ha resultado en la disminución drástica de su actividad hemolítica (Asthana *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2011). Esta relación entre secuencia y actividad hemolítica en la melitina ha hecho posible el diseño racional de nuevos péptidos con elevada actividad antibacteriana y al mismo tiempo, reducida toxicidad no selectiva frente a células de mamífero. Un ejemplo sería el híbrido CecA–melitina (Andreu *et al.*, 1992, Wade *et al.*, 1992; Ferré *et al.*, 2006). El péptido BP100 se diseñó a partir de dicho híbrido con el objetivo de aumentar su actividad antibacteriana y reducir su toxicidad no selectiva (Badosa *et al.*, 2007); y la actividad hemolítica de BP100 demostró esta característica: es de únicamente un 3% respecto a la de melitina, a una concentración de 50 μ M. Aunque la actividad hemolítica de BP134 es similar a la de BP100, los derivados de BP134 diseñados para expresión en planta presentan niveles hasta cinco veces superiores (BP217). A pesar de ello, incluso BP217 es 20 veces menos hemolítico que melitina. La actividad hemolítica se ha utilizado a menudo para estimar la toxicidad de una molécula frente a células no diana vegetales o animales.

La posibilidad de producir derivados de BP100 en planta se ensayó en *Oryza sativa ssp. japonica* mediante transformación estable por *Agrobacterium*. Se siguió inicialmente la estrategia de expresión constitutiva y retención a retículo endoplasmático; y se utilizó el gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) como gen de selección. Los resultados de estas transformaciones sugirieron posibles efectos fitotóxicos de los derivados de BP100 sobre las células huésped; además, diferentes derivados de BP100 mostraron distintos niveles de fitotoxicidad. El caso más extremo fue *bp192*: los callos transformados se necrosaron sistemáticamente a los pocos días de mostrar el fenotipo GFP. Los callos transgénicos con los transgenes *bp214*, *bp213* y *bp216* se mantuvieron en medio de callo pero en ningún caso regeneraron plantas MG. Únicamente pudieron obtenerse plantas MG que incorporaban el

transgén *bp217*. Teniendo en cuenta que las transformaciones realizadas con el vector control (con *gfp* pero no *derbp100*) evolucionaron como era esperado, se atribuyó inicialmente la baja eficiencia de estas transformaciones al producto de los *derbp100*. No obstante, estos resultados contrastan con la actividad hemolítica de los distintos derivados de BP100: curiosamente, BP217 mostraba la mayor actividad hemolítica entre los péptidos ensayados. Los callos con *derbp100* o únicamente *gfp* (control) presentaron niveles de ARNm de *gfp* entre 3 y 16 veces superiores a los de β -actina (utilizada como referencia), no encontrándose diferencias significativas entre callos con diferentes *derbp100*. A su vez, todos los callos con *derbp100* expresaban dicho transgén; aunque en este caso *bp217* se expresaba menos que los restantes *derbp100*. A pesar de que BP100 mostró muy baja toxicidad en un modelo de ratón (Bardají y Montesinos, 2008), la actividad de *derbp100* parece tener efectos tóxicos para la célula huésped. Algunas observaciones podrían apoyar dicha sugerencia. Por ejemplo, los callos MG tenían tendencia a perder progresivamente la fluorescencia, lo que podría asociarse a una desventaja de las células MG respecto a las no transformadas y un consecuente predominio de las células convencionales frente a las MG, generándose un material vegetal no homogéneo, con progresiva pérdida de células MG (a pesar de que en cada transferencia a medio fresco, se seleccionaron las porciones de callo por su fluorescencia).

No obstante, no hay que descartar un posible efecto negativo de GFP sobre las células de arroz, a pesar de que la secuencia concreta *gfp* utilizada en este estudio ha resultado ser eficaz e inocua para la transformación de arroz (Sallaud *et al.*, 2003). Dicho efecto podría adicionarse al del producto de *derbp100*. Es por ello que se diseñó un ensayo para confirmar o no la fitotoxicidad de *derbp100* mediante la monitorización del proceso de transformación de arroz con estos transgenes, utilizando un gen de selección diferente: *hpt II*, que confiere resistencia a higromicina. El ensayo confirmó que los transgenes *derbp100* tienen un efecto negativo sobre los callos y plantas transgénicas. Se evidenciaron claras diferencias en la evolución de callos y plantas transformadas con los distintos *derbp100* respecto a los controles, que se transformaron en paralelo únicamente con el gen de selección *hpt II*. La transformación control se comportó de forma esperada, con una eficiencia de transformación comparable a la descrita por Hiei (1994) y Chen (1998). Hiei y colaboradores (1994) monitorizaron los procesos transformación de arroz partiendo de diferentes tejidos y optimizaron un protocolo de transformación para plantas monocotiledóneas. Describieron eficiencias de transformación muy diferentes para distintos tejidos, que se situaban entre el 0 y el 23%. La mayor eficiencia se obtuvo transformando callos de origen embrionario (un 23% de los callos presentaron el fenotipo de selección). Estos resultados se confirmaron posteriormente en un seguimiento de 42 experimentos de transformación de callos embriogénicos (Chen *et al.*, 1998). En el presente estudio se transformaron también callos embriogénicos, un 18% de los cuales mostraron resistencia a higromicina. Las eficiencias de regeneración y aclimatación de plantas MG

concordaron también con los resultados obtenidos por Chen y colaboradores (1998), con un 80% de plantas regeneradas y un 100% de plantas aclimatadas. Por lo contrario, las eficiencias de transformación obtenidas para los diferentes *derbp100* se situaron entre el 3 y 14% de callos resistentes a higromicina respecto el total de callos infectados, muy por debajo de lo esperado. En particular, la transformación con *bp192* sólo dio lugar a 23 callos resistentes a higromicina, lo que representa un 21% de los obtenidos con el plásmido control. A diferencia de los callos que incorporaron *bp192* y *gfp*, éstos se mantuvieron a largo plazo en medio de cultivo N6 suplementado con higromicina: ello apoyaría la hipótesis según la cual GFP conlleva cierta toxicidad a la célula de arroz, que en presencia de *bp192* resulta letal. La transformación con *bp216* mostró una eficiencia similar; y al igual que para *bp192*, no se obtuvieron plantas MG, lo que representa una eficiencia global de obtención de plantas transgénicas inferior al 1% respecto a la obtenida en las transformaciones control. Aunque sí se obtuvieron plantas MG que incorporaban *bp214*, *bp213* y *bp217*, la eficiencia del proceso de transformación fue francamente inferior a la esperada, situándose en 10%, 2% y 3% respecto a la transformación control, respectivamente. La expresión de PAM en plantas se ha descrito para numerosos péptidos y especies vegetales, como en tomate (Jan *et al.*, 2010), en cebada (Rahnamaeian *et al.*, 2009), en tabaco (Mitsuhara *et al.*, 2000) o en melón (Ntui *et al.*, 2010). Se ha descrito asimismo la obtención de eventos de arroz que expresan la proteína antifúngica AFP de *Aspergillus giganteus* (Coca *et al.*, 2004) o CecA (Coca *et al.*, 2006), y presentan fenotipos normales. Recientemente, se ha mostrado que la expresión de tanatina tiene muy pocos efectos perjudiciales sobre la planta huésped (Imamura *et al.*, 2010). No obstante, no se ha estudiado de forma sistemática la eficiencia de transformación de transgenes con posibles efectos fitotóxicos, ya que el objetivo de estos estudios es la obtención de una o pocas plantas con el fenotipo deseado.

La transformación con diferentes derivados de *bp100* no tuvo únicamente diferentes eficiencias globales (de <1% a 10%, como se ha comentado), sino que la eficiencia de pasos específicos a lo largo del proceso de obtención de plantas MG se mostró también variable. Por ejemplo, las transformaciones con *bp213* y *bp217* generaron un 75% (respecto al control) de callos resistentes a higromicina; sin embargo el porcentaje de callos MG que regeneraron planta disminuyó drásticamente hasta un 30% y un 12% respecto el control, respectivamente. Contrariamente, la transformación con *bp214* generó 43 callos positivos (un 40% de los esperados) pero más del 60% de ellos dieron lugar a planta: dicha frecuencia de regeneración se sitúa en el rango del 50% al 80% descrito por Hiei y colaboradores (1994). Tanto el proceso de aclimatación como la fertilidad de las plantas MG obtenidas evolucionaron de forma diferente en plantas con distintos *derbp100*. Únicamente un 25% de las plántulas con *bp213* superaron la aclimatación, mientras que lo hicieron alrededor del 50% de aquellas con *bp214* y todas las que se habían transformado con *bp217*. En cambio, las plantas con *bp214* fueron

mayoritariamente fértiles (90%), mientras que únicamente un 40% de aquellas con *bp213* o *bp217* produjeron semillas fértiles. El proceso de aclimatación (al que no sobrevive un porcentaje importante de plantas con *bp213*, por ejemplo) es una etapa de estrés y adaptación de la planta, entre otras cosas a la falta de azúcares en el medio y a la menor humedad ambiental. Dicho estrés podría adicionarse al causado por *derbp100*. La esterilidad en plantas de arroz MG provenientes de transformación por *A. tumefaciens* se ha observado en varias ocasiones, pudiendo afectar un porcentaje importante de las mismas (Hiei *et al.*, 1994; Urushibara *et al.*, 2001). Wakas y colaboradores (2006) describieron tasas de fertilidad de hasta un 31% en de arroz MG con el gen *OASA1D* y de hasta un 61% con el gen *OASA2*, genes codificantes de dos subunidades de antralinato sintasa. Dicha reducción de la fertilidad fue atribuida al proceso de regeneración de planta. Por otra parte, diversos estudios realizados en arroz bajo estrés de temperatura han mostrado la existencia de semillas estériles, y se ha asociado este fenómeno con situaciones de estrés (Jagdish *et al.*, 2007).

Estos resultados parecen sugerir diferentes niveles o tipos de fitotoxicidad sobre la célula huésped, lo que concuerda con el hecho de que derivados de BP100 sintetizados químicamente presentan distintas características. El aumento de tamaño basado en repeticiones de BP100 en tándem no resultó en un incremento proporcional de actividad antibacteriana, pero sí aumentó de forma importante la toxicidad del derivado de BP100 para la célula productora. Por otra parte, la actividad hemolítica de los derivados de BP100 tiende a aumentar con el tamaño (con la excepción de BP214, de 15 aminoácidos, menos hemolítico que el undecapéptido BP100). Sin embargo, se obtuvieron plantas MG para *bp217* y *bp213*, los más hemolíticos. De ello se concluye que la posibilidad de obtener plantas MG que expresan constitutivamente *derbp100* no puede inferirse directamente de la capacidad de estos péptidos para lisar eritrocitos. El modo de acción de los PAM similares a BP100 se basa en la atracción electrostática e interacción con las membranas celulares (Hancock *et al.*, 2000; Tossi *et al.*, 2000). Esta propiedad de interacción con membranas se ha explotado incluso para internalizar proteínas quiméricas en células eucariotas (Eggenberger *et al.*, 2011). Diferencias a nivel de membrana entre eritrocitos y células vegetales u orgánulos podría explicar su distinta vulnerabilidad frente a derivados de BP100. De hecho, el grupo ha observado muy recientemente que la infiltración de hojas de tabaco con BP100 a concentraciones crecientes produce lesiones importantes, contrariamente a la infiltración con agua (control), aunque la infiltración de melitina producía mayores lesiones. Se está trabajando en la posibilidad de que esta aproximación permita predecir la fitotoxicidad de los péptidos de la familia BP100 para la célula vegetal que los sintetiza.

El efecto fitotóxico de *derbp100* parece estar directamente relacionado con la secuencia del mismo y su nivel de expresión. En callos resistentes a higromicina, la construcción *bp192*

mostró niveles de ARNm muy similares entre eventos y más bajos que cualquier otro *derbp100*. Todos los callos necrosaron antes de regenerar planta, de forma que no se obtuvieron plantas portadoras *bp192*. Ello parece sugerir que la obtención de callos MG únicamente es posible si *bp192* se expresa a niveles bajos; lo que derivaría de una elevada fitotoxicidad del producto de *bp192* en estos tejidos de arroz. En contraste, los restantes *derbp100* se expresaron a niveles más elevados y variables entre eventos. Las diferencias entre eventos eran esperables, puesto que el nivel de expresión de un transgén no está únicamente determinado por el promotor, sino que influyen también factores específicos de evento como el lugar de inserción (Miki *et al.*, 2009), el número de copias insertadas en el genoma y su integridad, o factores epigenéticos como los niveles de metilación. Se han descrito diferencias de expresión entre eventos de transformación de hasta 10 veces (Day *et al.*, 2000).

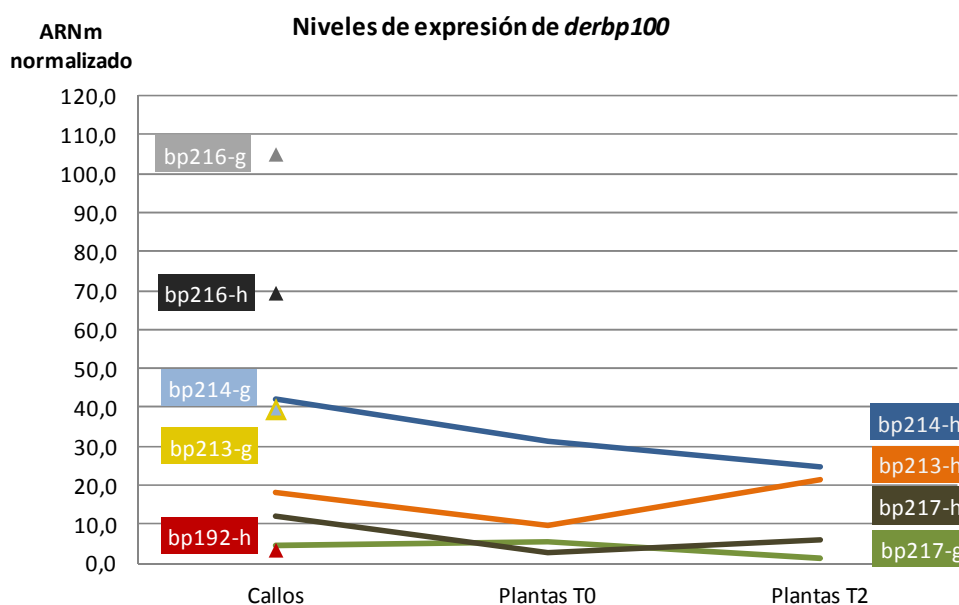


Figura V.2: Representación gráfica de los niveles de expresión de *derbp100* en callos, plantas T0 y plantas homocigotas T2. En la parte izquierda de la gráfica (triángulos) se sitúan los niveles de expresión de los callos que no regeneraron plantas MG. En la parte derecha del gráfico se nombran los eventos MG de los cuales se obtuvieron plantas T2 homocigotas: las líneas del mismo color representan la evolución de los niveles de expresión de estas plantas en callo, planta T0 y planta T2. Se representa únicamente el valor medio de los eventos analizados para cada construcción. Se indica con “g” el material transformado utilizando *gfp* como gen de selección; y con “h” el seleccionado mediante resistencia a higromicina.

Los callos con *bp216* lo expresaban a niveles más elevados, y aunque no necrosaron, no fueron capaces de generar plantas MG, sugiriendo un tipo de fitotoxicidad diferente. Otros *derbp100* pueden expresarse a niveles superiores sin impedir la viabilidad de la célula vegetal

productora. Los callos con *bp214* o *bp213* los expresaban a niveles más intermedios, y sí dieron lugar a plantas MG. Dos de los callos analizados (escogidos al azar) dieron lugar finalmente a plantas MG. Respecto a *bp214*, se obtuvo una planta MG a partir de un callo con elevados niveles de expresión del transgén: a pesar de tener morfología aparentemente normal, produjo semillas estériles. Respecto a *bp213*, el único de los callos analizados que regeneró planta fue el que presentaba niveles inferiores de ARNm del transgén. En el mismo sentido, los niveles de expresión de *bp214* o *bp213* en las plantas fértiles obtenidas independientemente mantuvieron niveles moderados de ARNm del transgén en las siguientes generaciones (hasta T3). Los callos que incorporaron *bp217* mostraban reducidos niveles de expresión (similares a *bp192*), y regeneraron plantas, que mantuvieron estos niveles de expresión hasta, como mínimo, la generación T3. En el caso de *bp217* se obtuvieron plantas también con el gen de selección *gfp*, aunque tanto callos MG como plantas T0 expresaban *bp217* sólo en torno a 5 veces el nivel de β -actina. Las plantas homocigotas para el transgén expresaban niveles inferiores de *bp217* (~2-veces β -actina). Los análisis de qPCR y *Southern blot* mostraron que los eventos S-*bp217-7* y S-*bp217-18* habían incorporado varias copias de transgén. Se ha asociado la inserción de múltiples copias del transgén al fenómeno de silenciamiento génico (Flavell, 1994), lo que podría explicar los reducidos niveles de expresión de *bp217* hallados en estas plantas. Aunque la estrategia de retención en RE ha resultado eficaz en numerosas ocasiones para la acumulación de grandes cantidades de proteína (Tagaki, 2005, Takaiwa *et al.*, 2007), no ha resultado suficientemente eficaz para la síntesis de elevadas cantidades de derivados de BP100, altamente catiónicos y fitotóxicos.

Los niveles de ARNm del transgén están también modulados por una gran variedad de factores relacionados con la secuencia del propio transgén. Las secuencias que codifican los derivados de BP100 presentados en esta tesis fueron diseñadas para optimizar la estabilidad de los ARNm, lo cual debería favorecer la producción de niveles más elevados de péptidos. Se utilizó a tal efecto el programa *OptimumGene™* (*GenScript*), que permite predecir la capacidad de secuencias problema para ser transcritas y la estabilidad de los ARNm producidos. La distribución de la frecuencia de codones de la secuencia se catalogó como “buena”, con un índice de adaptación de codón (CAI) superior a 0,8 para los cinco *derbp100*, indicando niveles altos de expresión. Las 5 secuencias analizadas contienen porcentajes de CG de aproximadamente 50%; y regiones de 60 pb dentro de éstas no mostraron tampoco valores fuera del rango 30-70% de GC, que se relacionan con una vida media del ARNm más corta. Las secuencias de *derbp100* son similares en cuanto a presencia de secuencias repetitivas, secuencias de unión ribosomales, secuencias de poliadenilación prematura o posibles elementos desestabilizantes *cis-acting*. Teniendo en cuenta este análisis, no parece que las diferencias de expresión entre plantas que incorporan distintos *derbp100* sean debidas a la estabilidad del transgén, sino a la fitotoxicidad de los productos de los distintos *derbp100*.

Los análisis de actividad antibacteriana realizados con extracto crudo de planta no mostraron actividad sobre células bacterianas de los patógenos diana contra los cuales se diseñaron los derivados de BP100. Los derivados de BP100 diseñados para su expresión en planta presentan unas características fisicoquímicas muy extremas. La mayoría de los PAM caracterizados poseen una carga neta positiva entre 2 y 9 a pH neutro conferida por sus dominios catiónicos. El carácter catiónico de los PAM es indispensable para la interacción electrostática con las membranas fosfolípicas, con carga aniónica, de los microorganismos. Basándose en estas consideraciones, la relación entre el carácter catiónico y la actividad antimicrobiana se ha demostrado en numerosos estudios (Bessalle *et al.*, 1992; Matsuzaki *et al.*, 1997; Dathe *et al.*, 1997). Concretamente los derivados de BP100 diseñados en la presente tesis tienen puntos isoeléctricos aún más extremos, situándose en 9,7 (BP214) y 10,1 (BP192, BP213, BP216 y BP217). Estas características, así como su reducido tamaño y antigenicidad, hacen que su detección y purificación a partir de tejidos vegetales sea altamente compleja. Es por esta razón que se abordó la detección del producto de *derbp100* mediante ensayos de actividad antibacteriana de extractos proteicos crudos. En ningún caso pudimos detectar actividad contra los patógenos *E. amylovora*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* o *P. syringae* pv. *syringae*, sobre los que se había optimizado BP100 y se había comprobado la actividad de BP214, BP192, BP213, BP216 y BP217. Sin embargo, BP217 perdía la actividad antibacteriana en presencia de extractos crudos de plantas convencionales Senia. Ello sugería una interacción de BP217 con proteínas y/o membranas del extracto, reduciendo su afinidad por las membranas bacterianas. Resultados similares se han publicado con el péptido recombinante SMAP-29 expresado en tabaco (Morassutti *et al.*, 2002). En el caso de SMAP-29, se recuperó la actividad antimicrobiana utilizando extractos de tabaco MG parcialmente purificados mediante columnas de afinidad, previo tratamiento del extracto crudo con el agente disgregante DMSO, de forma que se liberaba el péptido respecto al complejo proteico. Nuestros ensayos (no mostrados) con extracto crudo de S-bp217 suplementado con DMSO no mostraron actividad antibacteriana, lo que podría indicar mayor afinidad de BP217 respecto a otros componentes celulares vegetales, aunque no se podría descartar una menor actividad del producto de *bp217* sintetizado en planta, o menor concentración del mismo respecto a otros componentes celulares. En otro ejemplo, el péptido catiónico de citotoxicidad elevada *cathelicidin* LL-37 pierde por completo su actividad en presencia de proteínas de plasma (Johansson *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). La pérdida parcial de actividad de la serie de péptidos BP se manifestó también mediante un ensayo de inhibición *in vivo* sobre manzanas inoculadas con *Penicillium expansum*. Los PAM derivados de la serie BP mostraron valores de CMI *in vitro* contra *P. expansum* inferiores a 25 μ M mientras que en los ensayos *in vivo* mediante la aplicación de los PAM de forma preventiva las concentraciones activas se situaron alrededor de 300 mM. Los resultados de este ensayo muestran claramente que componentes vegetales pueden inhibir, en parte, la actividad del péptido (Badosa *et al.*, 2009).

Estos resultados demuestran la importancia de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos antimicrobianos para su expresión en planta; así como para la detección y purificación de derivados de BP100 producidos en planta. Prueba de dicha dificultad son las numerosas publicaciones de plantas MG que expresan PAMs en que no se muestran confirmaciones claras de la producción de estos péptidos. Podría suponer una alternativa viable el uso de proteínas quiméricas, por ejemplo con secuencias *tag* de reconocimiento inmunológico, que podrían compensar las cargas de los derivados de BP100, facilitando su detección y purificación, a la par que incrementarían el tamaño, haciéndolos más fácilmente expresables.

Nuestras especies bacterianas indicadoras *Ea*, *Xav* y *Pss* no son patógenos de arroz y no pueden utilizarse pues para determinar la resistencia de nuestras plantas MG frente a estas especies, que hemos utilizado como indicadoras de la actividad de los derivados de BP100 sintetizados químicamente. Sin embargo, varias proteínas antimicrobianas confieren a las plantas MG protección contra un amplio rango de patógenos y tipos de estrés abiótico. Por ejemplo, la expresión transgénica de la proteína antimicrobiana de *C. annuum* CaAMP1 en pimiento le proporciona resistencia contra muchos patógenos (Lee *et al.*, 2008). La sobreexpresión de *CecA* en arroz es efectiva contra el hongo *M. grisea* (Coca *et al.*, 2006) y otras condiciones como estrés oxidativo (Campo *et al.*, 2008). La expresión de péptidos quiméricos que incluyen porciones de *CecA* da lugar a patatas MG con actividad antimicrobiana de amplio espectro (Osusky *et al.*, 2004); y otros péptidos catiónicos α -helicoidales, como el derivado de la dermaseptina B1 de *Phyllomedusa bicolor* MsrA2, confieren resistencia a una variedad de fitopatógenos fúngicos y bacterianos en patatera transgénica (Osusky *et al.*, 2005). A pesar de que los derivados de BP100 son inicialmente antibacterianos, presentan cierta actividad antifúngica. En un ensayo de inhibición *in vitro* (no mostrado) observamos que BP213, BP214 y BP217 sintetizados químicamente tienen una ligera actividad contra *M. grisea*, dependiente de dosis. Ello correlaciona con la mayor resistencia de las líneas S-bp213 y S-bp217 frente a *M. grisea*. En nuestros ensayos sobre hojas inoculadas con *M. grisea* PR99, Senia se mostró susceptible a la infección con dicho hongo, mostrando las típicas lesiones en forma romboidal. En cambio, las hojas de S-bp213 y S-bp217 fueron menos sensibles al patógeno, presentando una menor superficie dañada y lesiones de menor tamaño. S-bp214 y Senia transformada con *hpt* II mostraron niveles de resistencia intermedios a *M. grisea*. Se concluyó pues que la expresión de *bp213* y *bp217* confiere a las plantas MG resistencia al patógeno; sin embargo *bp214* no aportó un grado mayor de resistencia a la que presentaron plantas control sometidas también al proceso de transformación.

Las líneas S-bp213 y S-bp217 también mostraron mayor tolerancia a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que las convencionales. H_2O_2 y el radical superóxido son las especies reactivas de oxígeno (ROS) más abundantes en sistemas biológicos aeróbicos, producidas por procesos

metabólicos como la respiración o la fotosíntesis en mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas (Bienert *et al.*, 2006). El H₂O₂ presenta dos funciones importantes involucradas en mecanismos celulares. Por un parte, es altamente reactivo y tóxico para la célula activando el proceso de la muerte celular programada (PCD). Por otra parte, actúa como molécula reguladora en el desarrollo celular, en la transducción de señal así como en una gran variedad de mecanismos de respuesta a estrés biótico y abiótico desencadenados por mecanismos de defensa. Debido a esta función doble en la célula, el nivel de ROS en tejidos vegetales debe estar muy precisamente regulado. En condiciones normales el exceso de H₂O₂ celular está regulado por mecanismos de defensa antioxidantes en que incluyen enzimas como ascorbato peroxidasa (APx), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y peroxiredoxina. Éstos, junto a los antioxidantes ácido ascórbico y glutatión, regulan la detoxificación de H₂O₂ y otros ROS (Mittler *et al.*, 2004). El equilibrio entre producción y degradación de ROS se puede ver alterado por estrés biótico o abiótico, aumentando rápidamente los niveles de ROS intracelulares. El estrés hídrico, osmótico, de temperatura, herida o los elicitores de patógenos son algunos de los estreses que se han asociado a un aumento de ROS intracelular (Mittler *et al.*, 2004, Wan *et al.*, 2008). La regulación de ROS intracelulares implica la acción de hasta 152 genes en *Arabidopsis*, en lo que se ha descrito como *ROS gene network* (Mittler *et al.*, 2004). Algunas plantas de arroz MG expresan ciertas enzimas involucradas en la regulación de ROS más fuertemente que las plantas convencionales, y a su vez presentan mejor tolerancia a estreses bióticos o abióticos. Por ejemplo, el arroz MG resistente a *M. grisea* por expresión de CecA sobre-expresa genes de respuesta a estrés oxidativo en ausencia del patógeno, lo que explica su tolerancia a estrés oxidativo (Campo *et al.*, 2008). Asimismo, la expresión de la proteína antifúngica AFP ha mostrado conferir al arroz MG resistencia no sólo al hongo diana sino a una serie de estreses, tanto bióticos como abióticos (Coca *et al.*, 2004), resultados que concuerdan con la detección de la inducción de genes de respuesta a estrés en S-afp mostrada en esta tesis. La sobre-expresión de *CaAMP1* confiere a *Arabidopsis* tolerancia a estreses hídrico y salino, lo que se pudo asociar a la regulación de un gen relacionado con el estrés (Lee *et al.*, 2008). La aplicación de H₂O₂ sobre hojas en un ensayo *ex vivo* dio lugar a lesiones que afectaban distintas áreas en plantas control y con distintos *derbp100*. Como era de esperar, las hojas de plantas no transformadas mostraron extensas lesiones. Las hojas de plantas S-bp213 y S-bp217 fueron las menos sensibles a H₂O₂. Ello sugiere que los transgenes *bp213* y *bp217* son directa o indirectamente responsables de dicho fenotipo de resistencia. Las hojas transformadas únicamente con el gen de selección y, sorprendentemente, de S-bp214, mostraron una tolerancia a estrés oxidativo intermedia. Estos resultados parecen indicar que la expresión de *bp214* no confiere a la planta un nivel importante de resistencia a estrés oxidativo.

La figura V.3 resume los resultados de susceptibilidad a *M. grisea* y sensibilidad a H₂O₂. Destacan los fenotipos de las líneas S-bp213 y S-bp217, significativamente más resistentes que las otras líneas estudiadas, entre ellas Senia convencional, pero remarcablemente también Senia transformada únicamente con *hpt* II, lo cual prueba que no es este último transgén el responsable del fenotipo de resistencia. Ello puede considerarse una muestra indirecta de la producción de derivados de BP100 en estas líneas MG. A pesar de que el péptido sintético BP217 resultó ser el más activo contra bacterias y *M. grisea*, y teniendo en cuenta los reducidos niveles de ARNm de *bp213* y principalmente *bp217* (este último similares a β -*actina*), no se puede descartar que los fenotipos de tolerancia a estrés oxidativo y sensibilidad a patógeno de las líneas S-bp213 y S-bp217 no sean una consecuencia directa de la acumulación de BP213 y BP217 sino un efecto indirecto de estos transgenes. Tal como se ha mencionado anteriormente, la expresión del transgén puede tener un efecto no intencionado sobre el transcriptoma de la planta, lo cual puede dar lugar a efectos fenotípicos. Así, el análisis del defensoma de arroz MG que expresa CecA permitió sugerir que la resistencia de estas plantas contra hongos era consecuencia de la combinación de la actividad antifúngica de CecA y de la inducción no intencionada de genes relacionados con la respuesta a estrés (Campo *et al.*, 2008).

Las líneas S-bp214 mostraron fenotipos similares a la línea control de transformación en referencia a los dos tratamientos de estrés estudiados, ambas situándose en una posición intermedia entre S-bp213 y S-bp217; y Senia. Curiosamente, los niveles de expresión de *bp214* en S-bp214 son más elevados que los de *bp213* y, especialmente, *bp217* en las líneas MG correspondientes. Estos resultados indicarían que el fenotipo de S-bp214 proviene, más que del transgén *bp214*, del gen de selección *hpt* II [aunque cabe recordar que los resultados de las plantas control transformadas únicamente con *hpt* II provienen de un único evento de transformación, el cual mostró además (ver más adelante) unas características agronómicas que no se repitieron en otros eventos] y/o del proceso de obtención de plantas MG. Dicho proceso conlleva el cultivo *in vitro* tanto de callo como de plántula, que se ha asociado a la generación de variaciones somaclonales en el genoma (Filipecki y Malepszy, 2006). Dichas variaciones pueden originar modificaciones a nivel morfológico, de síntesis de metabolitos secundarios o incluso distinto grado de tolerancia a estrés o resistencia a patógenos (Veilleux y Johnson, 1998). Aunque con baja eficiencia, se ha mostrado en este trabajo la posibilidad de producir líneas de arroz que expresan por lo menos algunas secuencias *derbp100* (por ejemplo, S-bp213 y S-bp217) y se ha demostrado de forma indirecta la producción de derivados de BP100 en las mismas.

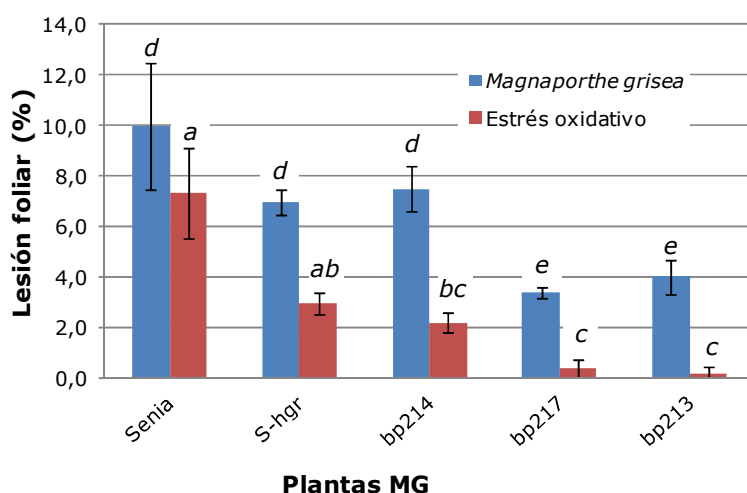


Figura V.3. Tolerancia al tratamiento con H₂O₂ (estrés oxidativo) y sensibilidad a *Magnaporthe grisea* de la planta control Senia y las plantas MG S-bp214, S-bp213, S-bp217 y S-hgr. Ensayos realizados sobre 10 hojas de líneas homocigotas. Se representan los valores medios y error estándar de los porcentajes de las áreas foliares afectadas. Las letras indican la diferencias estadísticamente significativa (ANOVA de un factor, Tukey's-b posttest con $\alpha < 0,05$).

El análisis de características agronómicas realizado en invernadero mostró que el estado nutricional de estas plantas MG no se ve afectado por el transgén *derbp100*: los contenidos en clorofila a nivel de hojas, que se han relacionado de forma directa con el contenido en nitrógeno y que a su vez se considera un indicador del estado nutricional de la planta, fueron similares para todos los eventos S-*derbp100* y Senia. En cuanto a altura, las plantas S-bp214 y S-bp213 fueron aproximadamente un 20% y un 10 % más bajas de lo esperado, respectivamente. Sin embargo, el cambio más importante observado fue el menor número de granos (y peso total de la panícula) por planta en S-bp213 y S-bp214 respecto a Senia. Se ha observado que las condiciones de estrés pueden afectar muchas características agronómicas de las plantas (Rahman *et al.*, 2002), en función del estadio de desarrollo en que se aplique el estrés y el tipo e intensidad del mismo. Por ejemplo, el estrés hídrico afecta la producción de semillas por panícula en arroz especialmente si se aplica durante el inicio de la fase reproductiva (Boonjung y Fukai, 1996; Bouman y Tuong, 2001). Así, se podría especular que el menor número de semillas observado en S-bp213 y S-bp214 fuera, en parte, consecuencia del efecto fitotóxico del producto de la acumulación de derivados de BP100 en las células de la planta. Sin embargo, S-*derbp100* presentaron valores comparables a S-*afp*, de forma que este efecto fenotípico no parece ser específico de OMGs que expresan *derbp100* sino que podría asociarse al proceso de transformación. Yang y colaboradores (2011) estudiaron el fenotipo de líneas portadoras de un gen *cry* (*cry1ac* y *cry2B*). Dos de ellas mostraron un rendimiento de producción estadísticamente inferior a su isogénica asociando esta desviación al proceso de transformación por *Agrobacterium*. La generación de híbridos para la obtención de líneas MG con ambos genes resultó en la recuperación de un fenotipo normal y comparable a la línea no

transformada. Yang y colaboradores sugieren la pérdida de los efectos negativos mediante la reproducción sexual de líneas MG (Yang *et al.*, 2011). Evaluaciones fenotípicas entre 12 genotipos de la misma especie Basmati (*Oryza sativa* sp.L) mostraron diferencias significativas para los 16 parámetros estudiados (Saleem MY, Tesis doctoral, 2008). Los resultados sugieren pues que la variabilidad observada entre líneas MG y Senia parece situarse en rangos normales descritos entre variedades de una misma especie y que el impacto de los *derbp100* sobre la planta huésped se puede considerar mínimo.

Las líneas MG S-bp213-5 y S-bp217-1 se analizaron a nivel transcriptómico mediante la técnica de hibridación en *microarray*. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos no intencionados de los transgenes *derbp100* sobre la planta de arroz MG, y compararlos con las diferencias observadas entre S-*afp* y Senia. Tanto *derbp100* como *afp* pueden conferir a la planta MG un fenotipo de resistencia, una ventaja en ciertas situaciones de estrés. Sin embargo, *derbp100* codifican péptidos derivados de BP100, de características extremas tanto a nivel fisicoquímico como de actividad: altamente catiónicos, elevada actividad antibacteriana y, tal como se ha observado en esta tesis, su expresión constitutiva puede resultar tóxica para el arroz MG. Así, se esperaría *a priori* que los efectos no intencionados del transgén en plantas S-*afp* y S-*derbp100* fueran diferentes, incluso estando *derbp100* y *afp* dirigidos por el mismo promotor constitutivo y utilizándose en todos los casos el mismo gen de selección *hpt II*. La aproximación experimental fue la comparación transcriptómica en base a hibridación de *microarrays* comercializados por *Affymetrix* (la misma que para S-*afp* en esta misma tesis). Se escogieron líneas MG que incorporan transgenes que codifican derivados de BP100 con distinta actividad antibacteriana y a los que se habían atribuido distintos niveles de fitotoxicidad, aunque evidentemente habían dado lugar a líneas MG homocigotas, las cuales presentaron un fenotipo de resistencia a *M. grisea* y estrés oxidativo (indicativo de la producción del derivado de BP100), a la vez que características agronómicas similares a las plantas no-MG. Entre los eventos disponibles se escogieron las líneas que más expresaban el transgén. De esta forma se seleccionaron las líneas S-bp213-5 y S-bp217-1. La tabla V.1 resume las características de los 3 derivados de BP100 para los que se obtuvieron líneas MG homocigóticas.

A pesar de haber obtenido plantas S-bp214 con una eficiencia mejor que para otros *derbp100*, éstas se descartaron en el presente estudio por varias razones. Por una parte, y a pesar de que *bp214* se transcribe, las plantas S-bp214 no mostraron fenotipos de resistencia a *M. grisea* o tolerancia a H₂O₂, por lo que no tenemos evidencias claras de la producción de BP214 en planta. Por otra parte, los estudios de características agronómicas mostraron diferencias importantes tanto vegetativas (plantas más bajas, mayor número de panículas) como de rendimiento (menor número de semillas por espiga, menor producción por planta) respecto a

Senia. Ello dificultaría la obtención de un resultado respecto a los posibles efectos directos del transgén a nivel de transcriptoma. Finalmente, y debido al mecanismo de entrada de las proteínas al RE, no se descarta que un péptido de tamaño tan pequeño como BP214 (15 aminoácidos) no sea reconocido por la vía de secreción y no adquiera la estructura necesaria para entrar en este compartimiento subcelular. Cabe recordar el fuerte efecto fenotípico de S-bp214, siendo BP214 menos hemolítico que BP213 o BP217; y la no resistencia a *M. grisea* o tolerancia a H₂O₂ de S-bp214. Un análisis histoquímico para la localización de proteínas en el retículo endoplasmático (por ejemplo mediante anticuerpos) permitiría dilucidar esta opción. Por todo esto, y para asegurar una comparativa de los efectos no intencionados derivados únicamente del transgén, eliminando la posible influencia del compartimiento subcelular, se descartaron las líneas MG S-bp214.

Tabla V.1. Resumen de las principales características de los derivados de BP100 y las líneas MG S-derbp100. De verde oscuro a pálido y blanco, de mejores a peores características

	BP214	BP213	BP217
Grado de hemólisis*	0	4	5
Actividad antibacteriana (Ea / Ps / Xv)*	3/3/10	3/3/10	3/3/40
Eficiencia de transformación <i>derbp100</i> (respecto a Senia)	10%	2%	3%
Nivel de expresión <i>derbp100</i> en S-derbp100 (respecto β -act)	~24	~22	~4
Fenotipo de resistencia de S-derbp100 (<i>M. grisea</i> y H ₂ O ₂)	-	+	+
Características agronómicas de S-derbp100 **	~40%	~65%	~80%

* x-veces respecto BP100

** productividad (respecto a Senia)

Los resultados del análisis transcriptómico de las líneas de arroz MG S-bp217-1 y S-bp213-5 fueron sorprendentes. S-bp213-5 mostró expresión diferencial respecto a la línea no-MG Senia en sólo el 0,08 % del total de genes analizados (se calcula que aproximadamente un tercio de los genes de arroz); y S-bp217-1 expresa diferencialmente el 0,14% de los genes analizados. En esta tesis hemos mostrado que las diferencias transcripcionales entre hojas de arroz Senia y S-afp (que expresa constitutivamente el gen de una proteína antifúngica y lleva también el gen de selección *hpt II*), crecidas y muestreadas en condiciones comparables a S-bp213-5 y S-bp217-1, afectan el 0,40% del transcriptoma. Las modificaciones transcripcionales de las plantas transgénicas S-derbp100 respecto a las isogénicas no-MG se situaron pues en los mismos niveles que plantas MG pertenecientes a la misma u otras especies y que incorporan otros tipos de transgén, según las publicaciones aparecidas hasta el momento (El Quakfaoui y Miki, 2005; Cheng *et al.*, 2008; Coll *et al.*, 2008; Abdeen y Miki, 2009; Abdeen *et al.*, 2010; Montero *et al.*, 2011, resultado de esta misma tesis). Cabe recordar que las plantas de arroz MG S-bp213-5 y S-bp217-1 incorporan transgenes que codifican péptidos con cierto grado de toxicidad para la planta. Es por ello que se esperaban inicialmente mayores cambios transcripcionales.

Las diferencias transcripcionales observadas entre arroz convencional y las líneas MG S-afp, S-bp213-5 o S-bp217-1, son inferiores a las descritas entre distintas variedades comerciales de una misma especie, como trigo (Baudo *et al.*, 2006) o maíz (Coll *et al.*, 2010). La comparativa transcriptómica entre trigo *Golden Promise* convencional y MG cuyo transgén codifica una endoquitinasa, mostró solamente 22 transcritos con expresión diferencial, mientras que entre las variedades de trigo convencional *Golden Promise* y *Baronesse* se detectaron 1.600 transcritos con expresión diferencial (Kogel *et al.*, 2010). Asimismo, dos variedades de maíz comercial MON810 mostraron diferencias en el 0,1% y 1,7% del transcriptoma respecto a sus isogénicas no-MG (Coll *et al.*, 2008 y 2009). En variedades de soja se encontraron también mayores diferencias transcriptómicas entre dos líneas convencionales, que entre líneas MG y las correspondientes isogénicas convencionales (Cheng *et al.*, 2008).

Un total de 18 secuencias se expresan de forma distinta en S-bp213-5 y también S-bp217-1, respecto a Senia. Ello representa aproximadamente la mitad de los genes regulados en S-bp213-5 vs. Senia. De hecho, hasta 12 de estas 18 secuencias reguladas en S-bp213-5 y S-bp217-1 vs. Senia están también reguladas en S-afp vs. Senia, lo que representa un 75%. Esta elevada coincidencia parecía sugerir la dependencia de las secuencias reguladas respecto a transgenes que confieren fenotipos similares (resistencia). Sin embargo, dicha similitud podría indicar también el efecto del gen de selección *hpt II*, y/o del proceso de obtención de plantas MG. Los posibles efectos de genes de selección han sido analizados en diversas publicaciones, destacando *hpt II* como uno de los que conllevan menos efectos no intencionados (Miki *et al.*, 2009). A pesar de ello, la comprobación experimental en el sistema Senia, S-afp y S-derbp100 sería deseable, y se está ensayando en el laboratorio. La variación somaclonal (y como consecuencia la regulación génica) debida al proceso de transformación ha sido descrita ampliamente (Filiplecki y Malepszy, 2006). En esta tesis se ha analizado en qué porcentaje los genes regulados en arroz MG respecto al comparador convencional, lo son como consecuencia del proceso de transformación. La aproximación consistió en determinar los niveles de expresión de 34 genes regulados en S-afp vs. Senia, en plantas no transgénicas obtenidas a partir de autofecundación de plantas hem cigotas para el transgén. Tres de los genes analizados se expresan diferencialmente también en S-bp217-1 y S-bp213-5, respecto a Senia; y la expresión diferencial de los 3 se asoció al proceso de transformación. Concretamente se trata de los genes codificantes de la β -1,3 glucanasa (*Os.6776.1.S1_at*, una proteína de membrana citoplasmática), fructosa bifosfato aldolasa (*Os.5725.1.S1_at*, que participa en la glicólisis), y un retrotransposón (*OsAffx.22999.1.S1_at*). Estos resultados sugieren que una parte de la regulación génica observada en S-bp213-5 y S-bp217-1 respecto a plantas convencionales es consecuencia del proceso de obtención de plantas MG. Asimismo, sugiere que los cambios transcripcionales, probablemente de origen epigenético, que ocurren en

situaciones de cultivo *in vitro* como des-diferenciación y diferenciación celular, afectarían prioritariamente a ciertos genes.

Tabla V.2: Relación de genes regulados en la S-bp217-1, S-bp213-5 y S-afp. Se muestra en escala de colores el nivel de expresión en la línea MG respecto al no-MG. Escala de rojos: de 2-veces (rojo claro) a 20-veces (rojo oscuro) mayor expresión y escala de verdes de 2-veces (verde claro) a 5-veces (verde oscuro) menor expresión

Código Affymetrix	Descripción	Transgén		
		bp217	bp213	afp
<i>Os.54492.1.S1_s_at</i>	Secuencia transcrita	Red oscuro	Red oscuro	Red oscuro
<i>OsAffx.22999.1.S1_at</i>	Proteína retrotransposón, putativa	Red oscuro	Red oscuro	Red oscuro
<i>Os.22606.1.S1_at</i>	Secuencia transcrita	Red oscuro	Red oscuro	Red oscuro
<i>OsAffx.25936.7.S1_s_at</i>	Elemento retrotransposable TNP2-like	Red oscuro	Red oscuro	Red oscuro
<i>Os.38444.2.S1_at</i>	Proteína retrotransposón, putativa	Red oscuro	Red oscuro	Red oscuro
<i>Os.12639.1.A1_at</i>	Proteína quinasa, dominio catalítico	Red oscuro	Red oscuro	Red oscuro
<i>Os.6776.1.S1_at</i>	Beta-1,3-glucanasa, putativa	Red oscuro	Red oscuro	Red oscuro
<i>Os.53606.1.S1_at</i>	Proteína hipotética	Red oscuro	Red oscuro	Red oscuro
<i>Os.25355.1.A1_at</i>	Proteína hipotética	Red oscuro	Red oscuro	Red oscuro
<i>OsAffx.25720.1.S1_at</i>	Proteína hipotética	Red oscuro	Red oscuro	Red oscuro
<i>Os.7505.1.S1_at</i>	CLA1 proteína tipo transquetolasa	Red oscuro	Red oscuro	Red oscuro
<i>Os.18592.1.S1_at</i>	UDP-glucosiltransferasa, putativa	Red oscuro	Red oscuro	Red oscuro
<i>Os.22122.1.S1_at</i>	Proteína OsDmc1	Red oscuro	Red oscuro	Red oscuro
<i>Os.55288.1.S1_at</i>	Proteína hipotética	Red oscuro	Red oscuro	Red oscuro
<i>Os.9327.1.S1_at</i>	Precursor de proteínas de la familia extensin	Verde claro	Verde claro	Verde claro
<i>Os.6075.1.S2_at</i>	Proteína hipotética	Verde claro	Verde claro	Verde claro
<i>Os.5725.1.S1_at</i>	Fructosa-bisfosfato aldolasa, putativa (<i>A. thaliana</i>)	Verde claro	Verde claro	Verde claro
<i>OsAffx.13633.1.S1_s_at</i>	Proteína homóloga a subtilisin, OsSub34, putativa	Verde claro	Verde claro	Verde claro

No únicamente la arriba mencionada, sino un total de 3 secuencias de retrotransposones se muestran reguladas en S-afp, S-bp217-1 y S-bp213-5 respecto a Senia: (*OsAffx.22999.1.S1_at*, *OsAffx.25936.7.S1_s_at* y *Os.38444.2.S1_at*), un número relativamente elevado teniendo en cuenta que se identificaron únicamente 12 secuencias reguladas en las 3 líneas. Todas ellas mostraron niveles de expresión notablemente más altos en las líneas MG que en Senia, situándose entre 4,6 y 9,7 veces. Los retrotransposones pertenecen a los transposones de clase I, que a diferencia de los de clase II, inician la transposición mediante secuencias de ARN. Los retrotransposones incorporan una secuencia reguladora necesaria para transcripción, que constituye el primer paso de transposición. La transcripción sólo se da en retrotransposones activos (Hirochika, 1997), así pues, a diferencia de los inactivos, éstos son detectables mediante técnicas de análisis de ADNc y ARN, como RT-qPCR o la hibridación en *microarrays* realizada en la presente tesis. Así, nuestros resultados indican que estos 3 retrotransposones son más activos en las líneas MG analizadas que en Senia. Se estima que en el genoma de arroz

existen un total de 1.000 retrotransposones pertenecientes a 32 familias. En condiciones de cultivo normales los retrotransposones se mantienen inactivos (sin actividad transcripcional detectable), mientras que en condiciones de cultivo *in vitro* o estrés se ha mostrado actividad como mínimo en 5 de las 32 familias (Hirochika, 1997). En particular, Hirochika (1997) mostró actividad de los retrotransposones de las familias A y B después de la regeneración de plantas de arroz *in vitro*, mientras que los de la familia C hasta X se mantuvieron activos.

La regulación del gen que codifica la β -1,3 glucanasa se ha asociado al proceso de obtención de S-afp, S-bp217-1 y S-bp213-5. Se trata de una proteína implicada en procesos de defensa y de desarrollo de la planta durante el proceso de meiosis. El silenciamiento de este gen generó semillas estériles en arroz (Wan *et al.*, 2011). En tabaco, se ha clasificado como proteína de defensa de la familia PR-2 (*Pathogenesis Related*) (Antoniw *et al.*, 1980; Sels *et al.*, 2008). El gen codificante de la proteína OsDmc1 (*Os.22122.1.S1_at*) se induce en los 3 eventos MG respecto a la línea convencional comparadora. Éste ha sido estudiado en arroz por Deng y Wang (2007) mediante silenciamiento génico. Las líneas DMC1-RNAi mostraron un crecimiento aparentemente normal hasta la fase de floración en que las panículas y el polen se mostraron estériles, además de una progresión anormal en el ciclo de la meiosis, demostrando la funcionalidad de este gen en la reproducción celular y concretamente en el apareamiento de cromosomas homólogos.

La represión del gen codificante de una fructosa bifosfato aldolasa (*Os.5725.1.S1_at*) se ha asociado asimismo al proceso de obtención de S-afp, S-bp217-1 y S-bp213-5. Esta enzima tiene un papel en el metabolismo de carbohidratos. Se ha observado la regulación de algunos genes de este tipo en respuesta a patógenos, favoreciendo la formación de la pared celular de la planta. Se ha descrito que el cultivo *in vitro* (necesario para la regeneración de plantas a partir de callos) resulta en la regulación de genes con funciones de defensa (Filipecki y Malepszy, 2006). En todo caso, las condiciones de cultivo *in vitro* son muy diferentes a las condiciones de cultivo convencional. En particular, la composición del medio (rico en azúcares) tiene un efecto sobre el metabolismo de glúcidos de la planta, que aprovecha los del medio de cultivo y disminuye la fotosíntesis. La regulación de genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos como consecuencia de las etapas de cultivo *in vitro* parece pues, razonable. Otra característica de las condiciones de cultivo *in vitro* es la elevada y constante humedad a que están sujetas las plantas, cuyas estructuras foliares en consecuencia presentan menor protección frente a deshidratación. EL gen *Os.9327.S1_at*, codificante de una extensina, se muestra reprimido en las 3 líneas MG estudiadas respecto a Senia. Las extensinas son proteínas de la familia de las glicoproteínas las cuales forman parte de la pared celular vegetal, con un papel importante en anabolismo de la misma (Lamport *et al.*, 2011).

Seis genes están regulados en las líneas MG S-bp213-5 y S-bp217-1 y no en S-afp. Dos de ellos codifican proteínas cuya función está relacionada con procesos biosintéticos. Concretamente la transquetolasa CLA1 (*Os.7505.1.S1_at*), relacionada con la biosíntesis de tiamina, se sobreexpresa en estas plantas MG. En arroz, se ha relacionado la acumulación de tiamina con una mejor resistencia a ataques de patógenos; y su biosíntesis está regulada por la activación de genes de defensa (Wang *et al.*, 2006). Estudios de genes relacionados con la biosíntesis de tiamina mostraron que el gen codificante de la enzima EI35I3 se inducía por inoculación con *M. grisea* (Zhou *et al.*, 2002). Este mismo gen mostró expresión diferencial en líneas de arroz MG resistentes a *X. oryzae* y *M. grisea* respecto a la línea no-MG; y no se indujo en las líneas MG en respuesta a estos patógenos (Wen *et al.* 2003). Así, la inducción de *Os.7505.1.S1_at* en las líneas MG S-bp213-5 y S-bp217-1 podría constituir una de las causas de la resistencia de estas plantas a infección por *M. grisea*. El gen de la enzima UDP-glucosiltransferasa (*Os.18592.1.S1_at*), que cataliza la transferencia de moléculas para la formación de uniones glucosídicas en lípidos, proteínas o carbohidratos, también se indujo en S-bp213-5 y S-bp217-1. Y el gen codificante de una proteína tipo subtilisina (*OsAffx.13663.1.S1_s_at*) se mostró reprimido en ambas líneas MG. Las proteínas tipo subtilisina pertenecen a la familia de las serina proteasas. Las subtilasas están presentes una gran variedad de organismos, y como proteasas su función se relaciona con mecanismos de defensa. Los estudios sugieren que estas proteínas son secretadas al apoplasto, donde entran en contacto con los componentes derivados de una invasión bacteriana o fúngica (Pearce *et al.*, 2010). En *Arabidopsis*, se ha observado que el estrés de RE regula negativamente una proteína tipo subtilisina (Martínez *et al.*, 2003).

Además de estas secuencias reguladas comúnmente en S-bp213-5, S-bp217-1 y mayoritariamente en S-afp (siempre respecto a la línea convencional), tanto S-bp213-5 como S-bp217-1 mostraron regulación de algunas secuencias de forma específica. Entre las secuencias inducidas únicamente en S-bp213-5 destaca otro retrotransposón (adicionalmente a los 3 regulados en S-bp217-1 y S-afp), y un gen que codifica una proteína de la familia NBS-LRR (*nucleotide binding sequence and leucine rich repeat*) (*Os.50213.1.S1_at*). La familia de las proteínas con estructura NBS-LRR es de las más extensas entre los genes de resistencia conocidos como genes R. El análisis de genes de resistencia a *M. grisea* en arroz ha mostrado que muchos de ellos presentan secuencias tipo NBS-LRR (Jiang *et al.*, 2011). Entre las secuencias reprimidas, destaca el gen codificante de la proteína fragmoplastina 12, que tiene un papel importante en la división celular y citocinesis. Este gen se expresa 15 veces menos en S-bp213-5 que en Senia, siendo uno de los más fuertemente regulados en este evento. Por otra parte, tres secuencias reprimidas entre 2,5 y 3,5 veces respecto a Senia fueron (i) el gen *Os.6812.1.S1_at*, regulado por estrés hídrico; (ii) el gen *Os.28011.1.S1_at* codificante de la proteína BpHi008A, inducible por el homóptero (*Nilaparvata Lugens*) y (iii) el gen codificante la

proteína sinaptojanina (*Os.49833.1.S2_at*), con actividad inositol-5-fosfatasa que regula los niveles celulares de inositol-fosfato, activando a su vez funciones celulares de proliferación y diferenciación celular (Whisstock *et al.*, 2002).

S-bp217-1 mostró mayores diferencias transcripcionales respecto a Senia que S-bp213-5. Aun así, el número de secuencias inducidas es de únicamente 22, la mayor parte (60%) inducidas también en S-bp213-5. Se han podido identificar 2 genes inducidos de forma específica en S-bp217-1 respecto a la línea no-MG: *Os.6645.1.S1_s_at*, que codifica un péptido de la familia de las tioninas, proteínas antimicrobianas de defensa (Fritig *et al.*, 1998); y *Os.10941.1.S1_at*, que codifica un factor de transcripción MADS-box, involucrado en el proceso de floración del arroz (Yamaguchi y Hirano, 2006). El análisis del transcriptoma de S-bp217-1 destaca, no obstante, por el relativamente elevado número de secuencias que se expresan de forma menos intensa en S-bp217-1 respecto a arroz convencional (42 genes). En este caso la herramienta *AgriGO* permitió identificar 3 categorías significativamente sobrerrepresentadas entre los genes reprimidos en S-bp217-1. Las 3 categorías son de función molecular: unión a grupos heme, unión a hierro y unión al grupo tetrapirrol. Comprenden en concreto 4 genes que codifican peroxidasas de clase III. Las peroxidasas de clase III están asociadas a la regulación de especies de oxígeno reactivas (ROS) en planta. La compleja regulación de ROS en planta está mediada por estas proteínas cuya actividad enzimática tiene un papel tanto en la formación como en la degradación de ROS. Las peroxidasas de clase III son proteínas multifuncionales, que pueden participar en una gran variedad de procesos biológicos como germinación, floración o senescencia (Passardi *et al.*, 2005); así como tener un papel en funciones específicas en respuesta a estrés biótico, abiótico, químico y biológico; o formación de pared celular y lignificación. Dos de los precursores de peroxidasas regulados en S-bp217-1 se relacionaron asimismo con la respuesta a estrés (GO:0006950) y a estímulos (GO:0050896), procesos biológicos a los que se asoció también el gen de defensa *bet1*, reprimido en S-bp217-1 vs. Senia.

Dos de los genes reprimidos específicamente en S-bp217-1 tienen un papel en los procesos metabólicos de proteínas, concretamente una isomerasa (*Os.10310.1.S1_at*) y una ubiquitina con función a nivel ribosomal (*OsAffx.30103.4.S1_s_at*). Dos genes participan de forma más general en procesos biosintéticos: uno codificante de una proteína ribosomal (*OsAffx.30103.4.S1_s_at*) y el de la chalcona sintasa (*Os.51145.1.S1_at*), que participa a su vez en la defensa frente al *stripe* virus que afecta el arroz, transmitido por *brown-planthopper* (Hao *et al.*, 2011). El gen de la proteína de patogénesis PR4b (*Os.20289.1.S1_at*) se asoció a procesos metabólicos de macromoléculas de la pared celular. Ésta es una función común en proteínas PR ya que el refuerzo de la pared celular es un método de protección contra el ataque de patógenos en plantas. En tabaco se han descrito proteínas del tipo PR4 con

actividad quitinasa (Sels *et al.*, 2008). Las quitinasas son enzimas de degradación de la quitina, un compuesto de pared celular de hongos, mediante la hidrólisis de enlaces glucosídicos. Entre los genes reprimidos en S-bp217-1 respecto a Senia que no se asociaron a ningún término GO destacan dos codificantes de ARNt sintetasas (isoleucil-ARNt-sintetasa, *OsAffx.2548.1.S1_at*, y valil-ARNt-sintetasa, *OsAffx.7986.1.S1_at*), involucradas en la síntesis de proteínas facilitando la unión de los aminoácidos a los correspondientes a ARN de transferencia; o el gen codificante de la glutatión-S-transferasa (*Os.49030.1.A1_s_at*). Ésta pertenece a un grupo de enzimas multifuncionales de transferencia del grupo glutatión (GSH), molécula que actúa como antioxidante y tiene un papel importante en la transducción de la señal en el sistema de defensa en planta (Ghanta *et al.*, 2011). Un estudio reciente de las secuencias reguladoras del gen de la glutatión-S-transferasa en arroz ha revelado la presencia de elementos de respuesta a estrés y hormonas (Hu *et al.*, 2011). Destacar finalmente la represión en S-bp217-1 de tres secuencias codificantes de UDP-glucosa:ácido salicílico glucosiltransferasas. Se trata de enzimas que catalizan la conversión de ácido salicílico libre (SA) en O- β -glucosil ácido salicílico (SAG). Las funciones de SA y SAG pueden variar notablemente entre especies vegetales. En arroz, las concentraciones de SA son más altas que en otras especies (dos veces respecto a tabaco y *Arabidopsis*), y se ha determinado su función como captador de ROS generados en situaciones de estrés biótico o abiótico (Yang *et al.*, 2004).

Se observa en la descripción de los genes regulados en S-bp217-1 (respecto a la línea control) la recurrencia de funciones o actividades de alguna forma relacionadas con procesos de respuesta a distintos tipos de estrés, particularmente oxidativo. Ello podría tener sentido en el contexto de plantas que expresan el transgén *bp217*, que codifica un péptido altamente catiónico y que podría influir en el equilibrio redox celular. Esta relación no se ha hallado, sin embargo, utilizando las herramientas objetivas de análisis como *AgriGO*. Esta aparente contradicción podría deberse al reducido número de genes con expresión diferencial (lo que disminuye la fuerza estadística de los análisis masivos de secuencias), pero también a la enorme bibliografía existente sobre respuesta a estrés. Muchos de los genes con expresión diferencial identificados pueden tener funciones en distintos procesos biológicos, y nuestro conocimiento es todavía muy parcial. Sin embargo, la regulación de algunos de los genes reprimidos en S-bp217-1 podría relacionarse con los mecanismos de respuesta a estrés de RE y a la presencia de proteínas no estructuradas correctamente (*unfolded protein response, UPR*). El RE es el orgánulo que da soporte a la síntesis de algunas proteínas de membrana o de secreción; y en el lumen del cual éstas se ensamblan en su conformación nativa antes de ser transferidas al aparato Golgi. La presencia en el RE de proteínas que no han llegado a adoptar la conformación nativa y han quedado retenidas en este orgánulo provoca un estrés de RE. En respuesta a este fenómeno se activan una serie de mecanismos de protección (Urade, 2009; Rasheva, 2009). Así, inicialmente se activa la síntesis de chaperonas y otras proteínas que

tienen el objetivo de recuperar la estructura nativa de las proteínas mal plegadas; y en caso de no conseguirlo, se inicia el proceso de apoptosis y muerte celular (Moreno y Orellana, 2011). En *Arabidopsis* se identificaron como proteínas de *UPR* diversas peroxidasas, una aquaporina y una peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa, de actividad esencial para el pliegue de proteínas en el RE (Kaumachi *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2003). También en *Arabidopsis* y mediante inducción química de estrés de RE (con tunicamicina y DTT), se observó la represión de genes que codifican peroxidasas, aquaporinas, diversas proteínas relacionadas con la síntesis de azúcares o lípidos, y algunas proteínas de respuesta a estrés. En este último ensayo, basado en hibridaciones en *microarrays*, se identificaron 75 genes reprimidos en plantas tratadas con tunicamicina respecto a las control, y remarcablemente 7 de ellos codifican peroxidasas (Martínez *et al.*, 2003). También un 10% de los genes reprimidos en S-bp217-1 respecto a Senia corresponden a peroxidasas; y también estaban infraexpresados un gen de una aquaporina y uno de una isomerasa (todos los analizados se regularon en más de un evento S-bp217-1, ver más adelante). Considerando que *bp217* se diseñó para acumulación de BP217 en el RE, así como las características químicas de BP217, no se puede descartar que la expresión de *bp217* (incluso a niveles relativamente bajos, en comparación con otros OMGs similares) desencadene un estrés de RE. Ello constituiría una evidencia indirecta más de la síntesis de BP217 en planta y su entrada en el RE. Cabe mencionar que cualquier tipo de desequilibrio celular como el estrés a RE y la respuesta *UPR*, está relacionado con una serie de mecanismos celulares complejos en que se ven implicados una gran variedad de genes. Hasta el momento, nuestros resultados permiten únicamente sugerir este posible efecto derivado de la expresión de *bp217*. Estas sugerencias adquirirían mayor relevancia si la represión de estos genes pudiera asociarse a la presencia y/o expresión de *bp217*. La mayor parte de los genes reprimidos en S-bp217-1 no están regulados en S-bp213-5 ni en S-afp, OMGs obtenidos esencialmente de la misma forma y utilizando el mismo gen de selección. Ello descarta que su regulación dependa del gen de selección o sea una consecuencia muy común del proceso de transformación utilizado. *A priori* no pudo descartarse que su regulación fuera específica de evento, es decir, que dependiera del lugar de inserción de *bp217* en S-bp217-1 y de las reordenaciones genómicas que hayan podido tener lugar durante la transformación de esta línea. El análisis de 10 de estos genes en otros 3 eventos de transformación S-bp217-1 mostró que su regulación no era específica de evento, sino que parecía directamente asociada al transgén *bp217*. Las 10 secuencias seleccionadas se expresaban diferencialmente en 4 eventos independientes S-bp217 respecto a la línea control Senia. Todas ellas se expresaban en menor medida en los eventos S-bp217 analizados que en la planta convencional, en el mismo sentido que se había observado en las hibridaciones en *microarrays* para S-bp217-1. Reafirmando nuestras observaciones previas, ninguno de estos genes se regulaba en S-bp213-5 o S-afp-14 respecto a Senia. La figura V.4 esquematiza la especificidad de la regulación de estos 10 genes en las líneas S-bp217. Estos resultados sugieren una relación entre *bp217* y los niveles de

expresión de los 10 genes analizados. No se ha podido discernir con claridad, sin embargo, si esta relación depende de la presencia y/o de la expresión de *bp217*. Estos 10 genes regulados se expresan de la misma forma en los 2 eventos S-bp217 cuyos niveles de expresión de *bp217* son más extremos (S-bp217-1 y S-bp217-1-7), lo que sugeriría que la regulación de los 10 genes deriva de la presencia de *bp217*. Sin embargo, *bp217* sólo se expresa unas 10 veces más en S-bp217-1 (aproximadamente 10 veces más que β -actina) que en S-bp217-1-7 (similar a β -actina). En el caso de S-afp se hallaron genes regulados en función del nivel de expresión, pero en este caso se comparaban eventos que diferían en 400 veces los niveles de ARNm de *afp*.

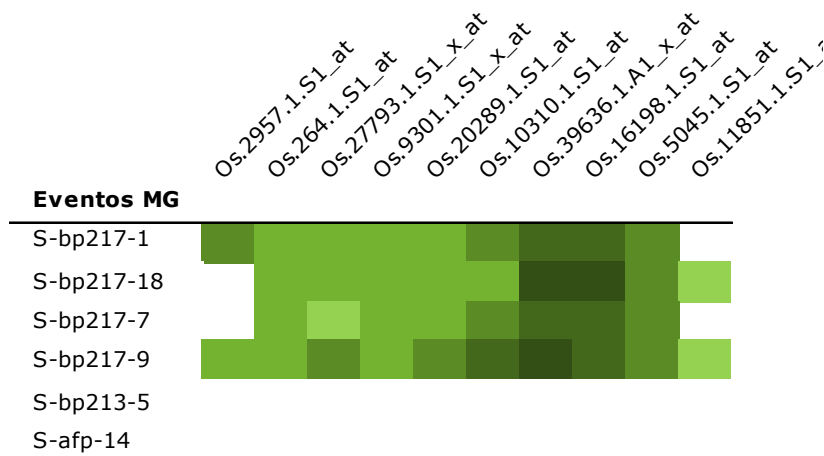


Figura V.4: Expresión de 10 genes seleccionados en 4 líneas S-bp217, una S-bp213-5 y una S-afp, siempre respecto a la línea convencional Senia. La expresión diferencial se indica en verde, representando el verde oscuro mayor diferencia de expresión entre plantas MG y convencionales, y el verde claro menor diferencia. Blanco: expresión similar en plantas MG y Senia.

En esta tesis se ha mostrado que los efectos no intencionados sobre el transcriptoma de una planta MG pueden tener causas muy distintas. Aproximadamente la mitad de los genes regulados en S-afp respecto a Senia lo eran como consecuencia del transgén; y la regulación de un 40% de ellos dependía de una fuerte expresión del transgén *afp*. Otro tercio de los genes regulados en S-afp respecto a Senia lo son como consecuencia del proceso de obtención de plantas MG, que implica transformación mediada por *Agrobacterium*, del cultivo *in vitro* y regeneración. Y el 15% restante era específico de evento, es decir, depende del lugar de inserción del transgén y reordenaciones genómicas asociadas al proceso concreto de transformación. A pesar de no haber realizado un estudio directamente dirigido a comprobar las causas de los efectos no intencionados de los transgenes *derbp100* sobre el transcriptoma de las plantas S-derbp100, nuestros resultados sugieren la existencia de genes regulados como consecuencia de los 3 mismos factores.

Entre los genes regulados únicamente en S-bp217-1 respecto a Senia, como mínimo 10 estaban regulados en diversos eventos S-bp217. Este patrón indica que su regulación no depende del lugar de inserción del transgén (no es específica de evento), ni parece probable que dependa del proceso de obtención de plantas MG o de *hpt* II (ni es específica de evento ni común en las plantas obtenidas en paralelo y con el mismo gen de selección). Su regulación se atribuye pues, a la presencia y/o expresión (siempre a niveles moderados) del transgén *bp217*. A pesar de ser similar a *bp213* y expresarse a niveles comparables en las plantas MG obtenidas, las proteínas codificadas por ambos transgenes presentan ciertas diferencias que podrían ser la causa de esta especificidad.

Por otra parte, un total de 12 secuencias (6%, 30% y 17% de las secuencias con expresión diferencial en S-afp, S-bp213-5 y S-bp217-1, respectivamente) se regulan en los 3 OMGs analizados, respecto a Senia. Descartado el lugar de inserción (serían específicas de evento), y habiéndose descrito los reducidos efectos transcripcionales del gen de selección *hpt* II (Miki et al., 2009), dichas diferencias podrían estar asociadas a cierto tipo de transgén (que confiere resistencia a microorganismos) o al proceso de obtención de plantas MG. Únicamente 3 de los genes comúnmente con expresión diferencial fueron estudiados en detalle en S-afp; y los 3 se asociaron al proceso de transformación mediada por *Agrobacterium* y de cultivo *in vitro* y regeneración. Teniendo en cuenta las características de los genes comúnmente con expresión diferencial (por ejemplo, retrotransposones o proteínas involucradas en el metabolismo de los azúcares), se podría sugerir que el proceso de obtención de plantas MG mediado por *Agrobacterium* ha resultado en la regulación predominante de este reducido número de secuencias.

Finalmente, el lugar de inserción del transgén y las reorganizaciones genómicas asociadas pueden afectar también al transcriptoma de la planta. En el evento S-afp analizado mediante hibridación en *microarrays*, origina en torno al 15% de los efectos transcripcionales no intencionados. En las líneas S-derbp100 analizadas, no se ha demostrado la regulación de ningún gen de forma específica de evento, lo cual no descarta su posible existencia. No obstante, el progreso del protocolo de obtención de plantas MG con *derbp100* ha mostrado de forma indirecta la importancia del lugar de inserción y reordenamientos genómicos asociados sobre la célula vegetal. Tanto para S-bp213-5 como para S-bp217-1 se obtuvo inicialmente un número de callos con el fenotipo de selección no muy inferior al esperado; pero la mayor parte de los eventos MG no sobrevivieron a las diferentes etapas hasta llegar a la obtención de líneas homocigóticas. Las líneas obtenidas (especialmente S-bp217-1), además, expresaban menores niveles de *derbp100* que, por ejemplo, S-afp, cuyo transgén está regulado por el mismo promotor que S-derbp100. Estos resultados sugieren que sólo aquellos eventos en que la inserción del transgén propiciaba una expresión débil del mismo, y cuyo efecto sobre la

planta fue también menor, fueron capaces de sobrevivir. Esta hipótesis explicaría a su vez el bajo número de genes con expresión diferencial en los eventos S-bp213-5 y S-bp217-1 vs. Senia. Cabe destacar que este tipo de efectos no intencionados de un transgén se pueden minimizar mediante la selección del evento adecuado. En esta tesis se ha podido demostrar que incluso transgenes codificantes de péptidos con características extremas, como elevada toxicidad, altamente catiónicos y tamaños muy pequeños, pueden expresarse en plantas que presentan cambios transcripcionales mínimos y cuyos fenotipos son similares a los convencionales, excepto una mayor tolerancia a estrés oxidativo y resistencia a *M. grisea*, respecto la línea convencional isogénica.

VI. CONCLUSIONES

De los estudios realizados en esta tesis se puede concluir que:

1. Los análisis de transcriptoma de hojas arroz MG S-*afp* y la línea convencional más próxima Senia revelan que sólo un 0,4% de las casi 50.000 secuencias analizadas se expresan de forma diferencial. Este valor es similar al descrito para otros pares planta MG / convencional, en distintas especies y transgenes; e inferior al observado entre distintas variedades convencionales de una misma especie.
2. Únicamente la regulación de la mitad de los genes que muestran expresión diferencial entre S-*afp* y Senia se ha asociado a la presencia y/o expresión del transgén. El proceso de obtención de la planta MG explicaría la regulación del 35% de estos genes; y la regulación del 15% restante dependería del lugar de inserción del transgén en el genoma huésped y reorganizaciones génicas asociadas.
3. De entre las secuencias cuya regulación en S-*afp* y Senia se ha asociado directamente al transgén, la regulación del 40% está asociada a elevados niveles de expresión de *afp*, mientras que la del 60% restante depende de la presencia o expresión basal de dicho transgén.
4. La mitad de las secuencias cuya regulación en S-*afp* y Senia se ha asociado directamente al transgén se inducen en plantas convencionales, pero no en S-*afp*, en respuesta a herida: la sobre-expresión no intencionada de genes involucrados en procesos de respuesta a estrés podría mejorar la resistencia de estas plantas MG a condiciones de estrés.
5. Se han diseñado 5 péptidos antimicrobianos derivados de BP100 para expresión en planta y acumulación a nivel subcelular de retículo endoplasmático. Consisten en una (BP214), dos (BP192) o tres (BP216) unidades de BP100 en tándem. BP213 y BP217 tienen 2 unidades de BP100 en orientación invertida, en BP217 cada unidad está elongada con un fragmento de melitina. Los 5 derivados presentan una actividad antimicrobiana similar o mayor que BP100, destacando aquellos que forman dímeros en orientación invertida. La inclusión de la secuencia de retención a RE KDEL no afecta negativamente la actividad de los derivados de BP100.

6. Se ha demostrado la viabilidad de obtener plantas MG que expresan de forma constitutiva transgenes que codifican ciertos derivados de BP100. No obstante, tienen un efecto fitotóxico sobre la planta huésped: las eficiencias de transformación de *derbp100* se han mantenido por debajo del 10% respecto al control; y para *bp192* y *bp216* ha sido inferior al 1%, no habiéndose obtenido ninguna planta MG viable y fértil. Los distintos *derbp100* presentan distintos grados de fitotoxicidad, siendo los dímeros en orientación invertida los menos fitotóxicos.

7. Se han obtenido 3, 9 y 4 eventos que expresan *bp213*, *bp214* y *bp217*, respectivamente. De todos ellos se han obtenido plantas homocigóticas (T2). Presentan una única copia del transgén (excepto dos eventos S-*bp217*); y los *derbp100* se expresan, en hoja, a niveles moderados (entre 1 y 30 veces el gen de referencia β -*act*).

8. S-*bp213* y S-*bp217* presentan fenotipos de mayor resistencia a *Magnaporthe grisea* y tolerancia a H₂O₂ respecto a plantas convencionales o transgénicas control (S-*hgr*), indirectamente demostrando la producción de derivados de BP100 en dichas plantas. S-*bp214* mostró un fenotipo indistinguible de S-*hgr*.

9. Las plantas S-*derbp100* y Senia presentan similares estados nutricionales. Las productividades de S-*bp217*, S-*bp213* y S-*bp214* son del 80%, 65% y 40% respecto a Senia. Las dos primeras se sitúan en el rango de otras plantas MG con transgenes muy diferentes.

10. Los análisis de transcriptoma revelan que únicamente el 0,08 y 0,14% de las casi 50.000 secuencias analizadas se expresan de forma diferencial en hojas de las líneas MG S-*bp213* y S-*bp217*, respectivamente, respecto a la línea convencional más próxima Senia. Este valor es similar al descrito para S-*afp* respecto a Senia, y otros pares planta MG / convencional, en distintas especies y transgenes; e inferior al observado entre distintas variedades convencionales de una misma especie.

11. Gran parte de las secuencias reguladas son comunes en S-bp213 y S-bp217; y dos tercios de ellas (12 secuencias) están reguladas asimismo en S-afp respecto a Senia. Se ha podido asociar la regulación de como mínimo 3 de estos genes al proceso de obtención de plantas MG.

12. La presencia y/o expresión de *bp217* confiere a S-bp217 una regulación transcripcional específica respecto a Senia, que podría relacionarse con una respuesta al estrés de RE.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdeen, A y Miki, B** (2009). The pleiotropic effects of the bar gene and glufosinate on the Arabidopsis transcriptome. *Plant Biotechnol. J.* **7**, 266–282.
- Abdeen A, Schnell J, y Miki B** (2010). Transcriptome analysis reveals absence of unintended effects in drought-tolerant transgenic plants overexpressing the transcription factor ABF3. *BMC Genomics* **11**, 69.
- Agrios, G.N.** (1998). *Plant pathology*, 4th ed. Academic Press, San Diego, Calif.
- Ahloowalia BS y Maluszynski M** (2001). Induced mutations-a new paradigm in plant breeding. *Euphytica* **118**, 167-173.
- Alan AR, Blowers A y Earle ED** (2004). Expression of a magainin-type antimicrobial peptide gene (MSI-99) in tomato enhances resistance to bacterial speck disease. *Plant Cell Rep.* **22**(6), 388-96.
- Ali, GS y Reddy ASN** (2000). Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens by synthetic peptides, in vitro growth inhibition, interaction between peptides, and inhibition of disease progression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 847–859.
- Allwood JW, Ellis DI, y Goodacre R** (2008). Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant-host interactions. *Physiol Plant* **132**, 117-135.
- Álvarez JP, Pekker I, Goldshmidt A, Blum E, Amsellem Z, y Eshed Y** (2006). Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell* **18**, 1134-1151.
- Andersen DC y Krummen L** (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**(2), 117-123.
- Andreu D, Ubach J, Boman A, Wählin B, Wade D, Merrifield RB y Boman HG** (1992). Shortened cecropin A-melittin hybrids. Significant size reduction retains potent antibiotic activity. *FEBS Lett.* **296**, 190–194.
- Antoniw JF, Ritter CE, Pierpoint WS, y Van Loon LC** (1980). Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J. Gen. Virol.* **47**, 79–87.
- Arencibia AD, Carmona ER, Tellez P, Chan MT, Yu SM, Trujillo LE y Oramas P** (1998). An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research* **7**, 1-10.
- Arite T, Iwata H, Ohshima K, Maekawa M, Nakajima M, Kojima M, Sakakibara H y Kyojuka J** (2007). DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J.* **51**, 1019–29.
- Aviezer D, Brill-Almon E, Shaaltiel Y, Hashmueli S, Bartfeld D, Mizrahi S, Liberman Y, Freeman A, Zimran A y Galun E** (2009). A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme—a preclinical and phase I investigation. *PLoS.One.* **4**, e4792.

- Asthana N, Yadav S P y Ghosh JK** (2004). Dissection of antibacterial and toxic activity of melittin, a leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity but not antibacterial activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 55042-55050.
- Badosa E, Ferré R, Frances J, Bardají E, Feliu L, Planas M y Montesinos E** (2009). Sporicidal activity of synthetic antifungal undecapeptides and control of Penicillium rot of apples. *Appl Environ Microbiol* **75**, 5563-5569.
- Badosa E, Ferré R, Planas M, Feliu L, Besalú E, Cabrefiga J, Bardají E y Montesinos E.** (2007). A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. *Peptides* **12**, 2276-85.
- Badri MA, Rivard D, Coenen K y Michaud D** (2009). Unintended molecular interactions in transgenic plants expressing clinically useful proteins, the case of bovine aprotinin traveling the potato leaf cell secretory pathway. *Proteomics* **9**, 746-756.
- Baker JM y Brooks RR** (1989). Terrestrial higher plants which accumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1**, 81-126.
- Balsamo GM, Cangahuala-Inocente GC, Bertoldo JB, Terenzi H y Arisi AC** (2011). Proteomic analysis of four Brazilian MON810 maize varieties and their four non-genetically-modified isogenic varieties. *J Agric Food Chem.* **59**(21), 11553-9.
- Baneyx F** (1999). Recombinant protein expression in Escherichia coli. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 411-421.
- Barros E, Lezar S, Anttonen MJ, Van Dijk JP, Rohlig RM, Kok EJ y Engel KH** (2010). Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Plant Biotechnol. J.* **8**, 1-16.
- Barta A, Sommengruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke MA y Matzke AJM.** The expression of a napoline synthase human growth hormone chimeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol Biol.* **6**, 347-57.
- Bartlett JG, Snape JW y Harwood WA** (2009). Intron-mediated enhancement as a method for increasing transgene expression levels in barley. *Plant Biotechnol J.* **7**(9), 856-66.
- Barton KA, Binns AN, Matzke AJ y Chilton MD** (1983). Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. *Cell* **32**, 1033-1043.
- Batista R, Saibo N, Lourenco T y Oliveira MM** (2008). Microarray analyses reveal that plant mutagenesis may induce more transcriptomic changes than transgene insertion. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **105**, 3640-3645.
- Baudo MM, Lyons R, Powers S, Pastori GM, Edwards KJ, Holdsworth MJ y Shewry PR** (2006). Transgenesis has less impact on the transcriptome of wheat grain than conventional breeding. *Plant Biotechnol.J.* **4**, 369-380.
- Baudo MM, Powers SJ, Mitchell RA y Shewry PR** (2009) Establishing substantial equivalence, transcriptomics. *Methods Mol.Biol.* **478**, 247-272.
- Baulcombe DC** (2000). Molecular biology. Unwinding RNA silencing. *Science* **290**, 1108-1109.
- Baykal U y Zhang Z** (2010). "Small RNA-mediated gene silencing for plant biotechnology" in:"gene silencing: theory, techniques and applications" Ed. Anthony J. Catalano. *Nova Science Publishers*, In. ISBN:978-1-61728-276-8.
- Beale MH, Ward JL, and Baker JM** (2009). Establishing substantial equivalence, metabolomics. *Methods Mol.Biol.* **478**, 289-303.
- Bessalle R, Haas H, Gorla A, Shalit I y Fridkin M** (1992). Augmentation of the antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 313-317.
- Bevan MW, Flavell RB y Chilton MD** (1983). A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* **304**, 184-187.

- Bienert GP, Schjoerring JK y Jahn TP** (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 994–1003.
- Boehm R** (2007). Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. *Ann.N.Y Acad.Sci* **1102**, 121-134.
- Boman HG** (2003). Antibacterial peptides, basic facts and emerging concepts. *J. Intern. Med.* **254**, 197–215.
- Boman HG** (2000). Innate immunity and the normal microflora. *Immunological Rev.* **173**, 5-16.
- Boman HG** (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**,61-92.
- Boonjung H y Fukai S** (1996). Effects of soil water deficit at different growth stage on rice growth and yield under upland conditions. *Field Crops Res.* **48(1)**, 47-55.
- Bouman BAM y Toung TP** (2001). Field water management to save water and increase its productivity in irrigated lowland rice. *Agric. Water Manage* **49(1)**, 11-30.
- Bourque JE** (1995). Antisense strategies for genetic manipulation in plants. *Plant Sci.* **105**, 125-149.
- Bower R y Birch RG** (1992). Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *Plant J* **2**, 409-416.
- Bolton MD** (2009). Primary metabolism and plant defense – fuel for the fire. *Mol. Plant Microbe Interact.* **22**, 487–497.
- Breitler JC, Vassal JM, del Mar Catala M, Meynard D, Marfà V, Melé E, Royer M, Murillo I, San Segundo B, Guiderdoni E y Messeguer J** (2004). Bt rice harbouring cry genes controlled by a constitutive or wound-inducible promoter, protection and transgene expression under Mediterranean field conditions. *Plant Biotechnol J.* **2(5)**, 417-30.
- Budziszewski GJ, Lewis SP, Glover LW, Reineke J, Jones G, Ziemnik LS, Lonowski J, Nyfeler B, Aux G, Zhou Q, McElver, J, Patton DA, Martienssen R, Grossniklaus U, Ma H, Law M y Levin JZ** (2001). Arabidopsis genes essential for seedling viability, isolation of insertional mutants and molecular cloning. *Genetics* **159**, 1765–1778.
- Campo S, Manrique S, García-Martínez J y San Segundo B** (2008). Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression. *Plant Biotechnol J.* **6(6)**, 585-608.
- Cao S, Xu W, Luo Y, He X, Yuan Y, Ran W, Liang L, Huang K** (2011). Metabonomics study of transgenic *Bacillus thuringiensis* rice (T2A-1) meal in a 90-day dietary toxicity study in rats. *Mol Biosyst.* **7(7)**, 2304-10.
- Cao W, Zhou Y, Ma Y, Luo Q y Wei D** (2005). Expression and purification of antimicrobial peptide adenoregulin with C amidatedterminus in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* **40**, 404–410.
- Carma JG** (1995). Nutrient absorption and the development and genetic stability of cultured meristems. *In Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology* (pp. 393–403). Dordrecht, the Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
- Cavallarin L, Andreu D y San Segundo B** (1998). Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 218–227.
- Cellini F, Chesson A, Colquhoun I, Constable A, Davies HV, Engel KH, Gatehouse AM, Karenlampi S, Kok EJ, Leguay JJ, Lehesranta S, Noteborn HP, Pedersen J y Smith M** (2004). Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food Chem.Toxicol.* **42**, 1089-1125.
- Chen L, Zhang S, Beachy Rn y Fauquet CM** (1998). A protocol for consistent, large-scale production of fertile transgenic rice plants. *Plant Cell Reports.* **18**, 25-31.

- Chen R, Matsui K, Ogawa M, Oe M, Ochiai M, Kawashima H, Sakuradani E, Shimizu S, Ishimoto M, Hayashi M, Murooka Y y Tanaka Y** (2006). Expression of delta-6, delta-5 desaturase and GLELO elongase genes from *Mortierella alpina* for production of arachidonic acid in soybean *Glycine max* (L.) Merrill seeds. *Plant Sci* **170**, 399-406.
- Chen Z, Young TE, Ling J, Chang SC y Gallie DR** (2003). Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **100**, 3525-3530.
- Cheng KC, Beaulieu J, Iquira E, Belzile FJ, Fortin MG y Stromvik MV** (2008). Effect of transgenes on global gene expression in soybean is within the natural range of variation of conventional cultivars. *J.Agric.Food Chem.* **56**, 3057-3067.
- Cheng M, Fry JE, Pang SZ, Zhou HP, Hironaka CM, Duncan DR, Conner W y Wan YC** (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* **115**, 971-980.
- Cheng X, Sardana R, Kaplan H y Altosaar I** (1998). *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic cryIA(b) and cryIA(c) genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(6), 2767-72.
- Choi MS, Kim YH, Park HM, Seo BY, Jung JK, Kim ST, Kim MC, Shin DB, Yun HT, Choi IS, Kim CK y Lee JY.** (2009). Expression of BrD1, a plant defensin from *Brassica rapa*, confers resistance against brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rices. *Mol Cells* **28**, 131-137.
- Chomczynski P y Sacchi N** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**(1), 156-9.
- Christensen AH, Sharrock RA y Quail PH** (1992). Maize Polyubiquitin Genes - Structure, Thermal Perturbation of Expression and Transcript Splicing, and Promoter Activity Following Transfer to Protoplasts by Electroporation. *Plant Molecular Biology* **18**, 675-689.
- Christensen AH y Quail PH** (1996). Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research* **5**, 213-218.
- Christou P, Ford TL, y Kofron M** (1991). Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric-discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Nat.Biotechnol* **9**, 957-962.
- Chu Z, Yuan M, Yao J, Ge X, Yuan B, Xu C, Li X, Fu B, Li Z, Bennetzen JL, Zhang Q, Wang S.** (2006). Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. *Genes Dev.* **20**, 1250-5.
- Coca M, Bortolotti C, Rufat M, Peñas G, Eritja R, Tharreau D, del Pozo AM, Messeguer J y San Segundo B.** Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Mol Biol.* **54**, 245-259.
- Coca M, Peñas G, Gómez J, Campo S, Bortolotti C, Messeguer J y San Segundo BS** (2006). Enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* conferred by expression of a cecropin A gene in transgenic rice. *Planta* **223**, 392-406.
- Coll A, Nadal A, Palauelmas M, Messeguer J, Mele E, Puigdomenech P y Pla M** (2008). Lack of repeatable differential expression patterns between MON810 and comparable commercial varieties of maize. *Plant Mol Biol.* **68**, 105-117.
- Coll A, Nadal A, Collado R, Capellades G, Messeguer J, Mele E, Palauelmas M y Pla M** (2009). Gene expression profiles of MON810 and comparable non-GM maize varieties cultured in the field are more similar than are those of conventional lines. *Transgenic Res.* **18**, 801-808.
- Coll A, Nadal A, Collado R, Capellades G, Kubista M, Messeguer J y Pla M** (2010). Natural variation explains most transcriptomic changes among maize plants of MON810 and comparable non-GM varieties subjected to two N-fertilization farming practices. *Plant Molecular Biology.* **73**(3),349-62.

- Coll A, Nadal A, Rossignol M, Collado R, Puigdomènech P y Pla M** (2011). Proteomic analysis of MON810 and comparable non-GM maize varieties grown in agricultural fields. *Transgenic Research* **20**(4), 939-49.
- Conrad U y Fiedler U** (1998). Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells, an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Mol. Biol.* **38**, 101-109.
- Cornelissen BJ, Horowitz J, van Kan JA, Goldberg RB y Bol JF** (1997). Structure of tobacco genes encoding pathogenesis-related proteins from the PR-1 group. *Nucleic Acids Res.* **15**, 6799-6811.
- Corrado G y Karali M** (2009). Inducible gene expression systems and plant biotechnology. *Biotechnol Adv.* **27**, 733-43.
- Corpillo D, Gardini G, Vaira AM, Basso M, Aime S, Accotto GP y Fasano M** (2004). Proteomics as a tool to improve investigation of substantial equivalence in genetically modified organisms, the case of a virus-resistant tomato. *Proteomics.* **4**, 193-200.
- Cotter PD, Hill C y Ross RP** (2005). Bacteriocins, developing innate immunity food. *Nat Rev Microbiol.* **3**(10), 777-788.
- Dallas PB, Gottardo NG, Firth MJ, Beesley AH, Hoffmann K, Terry PA, Freitas JR, Boag JM, Cummings AJ y Kees UR** (2005). Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR – how well do they correlate? *BMC Genomics* **6**, 59.
- Daniell H, Singh ND, Mason H y Streatfield SJ** (2009). Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci* **14**, 669-679.
- Darbani B, Eimanifar A, Stewart CN, Jr., y Camargo WN** (2007). Methods to produce marker-free transgenic plants. *Biotechnol J.* **2**, 83-90.
- Dathe M, Wieprecht T, Nikolenko H, Handel L, Maloy WL, MacDonald DL, Beyermann M y Bienert M** (1997) Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett* **403**, 208-212.
- Day CD, Lee E, Kobayashi J, Holappa LD, Albert H y Ow DW** (2000). Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes Dev.* **14**(22), 2869-80.
- de Maagd RA, Bosch D y Stiekema W** (1999). Toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends Plant Sci* **4**, 9-13.
- de Pater BS, van der Mark F, Rueb S, Katagiri F, Chua NH, Schilperoort RB y Hensgens LAM** (1992). The promoter of the rice gene GOS2 is active in various different monocot tissues and binds rice nuclear factor ASF-I. *The Plant Journal* **2**(6), 837-844.
- Dellaporta SL, Wood J y Hicks JB** (1983). A plant DNA miniprep preparation versión.II. *Plant Molecular Biology Reporter* **18**, 61-64.
- Deng ZY y Wang T** (2007). OsDMC1 is required for homologous pairing in *Oryza sativa*. *Plant Mol Biol* **65**, 31-42.
- Di Carli M, Villani ME, Renzone G, Nardi L, Pasquo A, Franconi R, Scaloni A, Benvenuto E y Desiderio A** (2009). Leaf proteome analysis of transgenic plants expressing antiviral antibodies. *J Proteome Res.* **8**, 838-848.
- Domingo C, Andres F, Tharreau D, Iglesias DJ y Talon M** (2009). Constitutive expression of OsGH3.1 reduces auxin content and enhances defense response and resistance to a fungal pathogen in rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* **22**, 201-210.
- Du H, Wang N, Cui F, Li X, Xiao J y Xiong L** (2010). Characterization of the beta-carotene hydroxylase gene DSM2 conferring drought and oxidative stress resistance by increasing xanthophylls and abscisic acid synthesis in rice. *Plant Physiol* **154**, 1304-18.

- Dubouzet JG, Ishihara A, Matsuda F, Miyagawa H, Iwata H y Wakasa K (2007). Integrated metabolomic and transcriptomic analyses of high-tryptophan rice expressing a mutant anthranilate synthase alpha subunit. *J.Exp.Bot.* **58**, 3309-3321.
- Eggenberger K, Mink C, Wadhvani P, Ulrich AS y Nick P (2011). Using the Peptide Bp100 as a Cell-Penetrating Tool for the Chemical Engineering of Actin Filaments within Living Plant Cells. *Chem. Biochem.* **12**, 132-137.
- El Ouakfaoui S y Miki B (2005). The stability of the Arabidopsis transcriptome in transgenic plants expressing the marker genes nptII and uidA. *Plant J* **41**, 791-800.
- Ellul P, Ríos G, Atarés A, Roig LA, Serrano R y Moreno V (2003). The expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HAL1 gene increases salt tolerance in transgenic watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsun. & Nakai.]. *Theor Appl Genet.* **107**(3), 462-9.
- Enríquez-Obregón GA, Vázquez-padrón RI, Prietosansonov DL, de la Riva GA y Selman-HouseinG (1998). Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium* mediated transformation. *Planta* **206**, 20-27.
- Enríquez-Obregón GA, Vázquez-Padrón RI, Prieto-Samsónov DL, Pérez M y Selman-Housein G (1997). Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds. *Biotechnologia Aplicada* **14**, 169-174.
- Epple P, Apel K y Bohlmann H (1997). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* **9**(4), 509-20.
- Fagundes PC, Ceotto H, Potter A, Vasconcelos de Paiva Brito MA, Brede D, Nes IF y Bastos MD (2011). Hycin 3682, a bioactive peptide produced by *Staphylococcus hyicus* 3682 with potential applications for food preservation. *Res Microbiol.* **162**(10), 1052-9.
- FAO/WHO (2000). Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on food derived from biotechnology, Geneva, Switzerland. Food and Agricultural Organisation of the United Nations. Available from, <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/gmreport.pdf>.
- FAO/WHO (2002) Report of the Third Session of the Codex Ad Hoc Intergovernmental Task Force on Foods Derived from Biotechnology (ALINORM 01/34). In, Codex Ad Hoc Intergovernmental Task Force on Foods Derived from Biotechnology. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Available from, ftp://ftp.fao.org/codex/alinorm03/AI03_34e.pdf.
- Feng XJ, Wang JH, Shan AS, Teng D, Yang YL, Yao Y, Yang GP, Shao YC, Liu S y Zhang F (2006). Fusion expression of bovine lactoferricin in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* **47**, 110-117.
- Ferré R, Badosa E, Feliu L, Planas M, Montesinos E y Bardají E. (2006). Inhibition of plant-pathogenic bacteria by short synthetic cecropin A-melittin hybrid peptides. *Appl Environ Microbiol.* **72**, 3302-8.
- Filipecki M y Malepszy S (2006). Unintended consequences of plant transformation, a molecular insight. *J. Appl. Genet.* **47**, 277-286.
- Fink J, Boman A, Boman HG y Merrifield RB (1989). Design, synthesis and antibacterial activity of cecropin-like model peptides. *Int J Pept Protein Res.* **33**(6), 412-21.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE y Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Fischer R, Emans NJ, Twyman RM y Schillberg S (2004). Molecular farming in plants, technology platforms. In, Goodman RB, editor. *Encyclopedia of plant and crop science*. New York, Marcel Dekker, 753-6.
- Flavell RB (1994). Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(9), 3490-6.
- Florack D, Allefs S, Bollen R, Bosch D, Visser B y Stiekema W (1995). Expression of giant silkworm cecropin B genes in tobacco. *Transgenic Res*, **4**, 132-141.

- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL y Woo SC (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **80**, 4803-4807.
- Fritig B, Heitz T y Legrand M (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology* **10**, 16-22.
- Fromm ME, Morrish F, Armstrong C, Williams R, Thomas J y Klein TM (1990). Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Biotechnology (N.Y)* **8**, 833-839.
- Fukuoka S, Saka N, Koga H, Ono K, Shimizu T, Ebana K, Hayashi N, Takahashi A, Hirochika H, Okuno K, Yano M (2009). Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science* **325**, 998-1001.
- Gao AG, Hakimi SM, Mittanck CA, Wu Y, Woerner BM, Stark DM, Shah DM, Liang J y Rommens CM (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat Biotechnol.* **18**, 1307-1310.
- García-Cañas V, Simó C, León C, Ibáñez E y Cifuentes A (2011). MS-based analytical methodologies to characterize genetically modified crops. *Mass Spectrom Rev.* **30**(3), 396-416.
- Gelvin SB (2003). Agrobacterium-mediated plant transformation, the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **67**, 16-37.
- Ghanta S, Bhattacharyya D y Chattopadhyay S (2011). Glutathione signaling acts through NPR1-dependent SA-mediated pathway to mitigate biotic stress. *Plant Signaling & Behavior* **6**(4), 607-609.
- Ghosh JK, Ovadia M y Shai Y (1997). A leucine zipper motif in the ectodomain of Sendai virus fusion protein assembles in solution and in membranes and specifically binds biologically-active peptides and the virus. *Biochemistry.* **36**, 15451-15462.
- Giddings G (2001). Transgenic plants as protein factories. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 450-454.
- Gisbert C, Ros R, De Haro A, Walker DJ, Pilar BM, Serrano R y Navarro-Avino J (2003). A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**, 440-445.
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, et al., (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* **296**, 92-100.
- Goulet C, Benchabane M, Anguenot R, Brunelle F, Khalf M y Michaud D (2010). A companion protease inhibitor for the protection of cytosol-targeted recombinant proteins in plants. *Plant Biotechnol.J.* **8**, 142-154.
- Gregersen PL, Brinch-Pedersen H y Holm PB (2005). A microarray-based comparative analysis of gene expression profiles during grain development in transgenic and wild type wheat. *Transgenic Res.* **14**, 887-905.
- Gupta SK, Rai AK, Kanwar SS, Chand D, Singh NK y Sharma TR (2011). The single functional blast resistance gene Pi54 activates a complex defence mechanism in rice. *J Exp Bot.* [Epub ahead of print].
- Hancock RE (1997). Peptide antibiotics. *Lancet.* **349**(9049), 418-22.
- Hancock RE y Scott MG (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8856-8861.
- Hao Z, Wang L, He Y, Liang J y Tao R (2011). Expression of defense genes and activities of antioxidant enzymes in rice resistance to rice stripe virus and small brown planthopper. *Plant Physiol Biochem.* **49**(7), 744-51.
- Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montagu M y Schell J (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* **303**, 209-213.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T y Kumashiro T (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* **6**(2), 271-282.

- Hirai MY, Yano M, Goodenowe DB, Kanaya S, Kimura T, Awazuhara M, Arita M, Fujiwara T y Saito K (2004). Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **101**, 10205-10210.
- Hirochika H (1997). Retrotransposons of rice, their regulation and use for genome analysis. *Plant Molecular Biology* **35**, 231–240.
- Holak TA, Engström A, Kraulis PJ, Lindeberg G, Bennich H, Jones TA, Gronenborn AM y Clore GM (1988). The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A, a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry* **27**(20), 7620-9.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ y Schilperoort RA (1983). A binary plant vector strategy based on separation of Vir-region and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**, 179-183.
- Hoekenga OA (2008). Using metabolomics to estimate unintended effects in transgenic crop plants, problems, promises, and opportunities. *J. Biomol. Tech.* **19**, 159–166.
- Hood EE, Witcher DR, Maddock S, Meyer T, Baszczynski C, Bailey M, et al. (1997). Commercial production of avidin from transgenic maize, characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Mol. Breed.* **3**, 291–306.
- Houmiel KL, Slater S, Broyles D, Casagrande L, Colburn S, Gonzalez K, Mitsky TA, Reiser SE, Shah D, Taylor NB, Tran M, Valentin HE y Gruys KJ (1999). Poly(beta-hydroxybutyrate) production in oilseed leukoplasts of brassica napus. *Planta* **209**, 547-550.
- Hu T, He S, Yang G, Zeng H, Wang G, Chen Z y Huang X (2011). Isolation and characterization of a rice glutathione S-transferase gene promoter regulated by herbicides and hormones. *Plant Cell Rep.* **4**, 539-49.
- Huang HW (2000). Action of antimicrobial peptides, two-state model. *Biochemistry* **39**(29), 8347-52.
- Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Kapur R y Boman HG (1982). Insect immunity, isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia* pupae. *Eur. J. Biochem.* **127**, 207-217.
- Imamura T, Yasuda M, Kusano H, Nakashita H, Ohno Y, Kamakura T, Taguchi S y Shimada H (2010). Acquired resistance to the rice blast in transgenic rice accumulating the antimicrobial peptide thanatin. *Transgenic Research* **19**, 415-424.
- Iqbal MM, Nazir F, Ali S, Asif MA, Zafar Y, Iqbal J y Ali GM. (2011). Over Expression of Rice chitinase Gene in Transgenic Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Improves Resistance Against Leaf Spot. *Mol Biotechnol.* [Epub ahead of print].
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U y Speed TP (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**(2),249-64.
- ISAAA. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (2009). Marker-Free GM Plants. *ISAAA Pockets of Knowledge.* **36**, 1-6.
- ISAAA. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (2010). Brief 42. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. Executive summary.
- Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T y Kumashiro T (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* **4**, 745-750.
- Iwai H, Nakajima Y, Natori S, Arata Y y Shimada I (1993). Solution conformation of an antibacterial peptide, sarcotoxin IA, as determined by 1H-NMR. *Eur J Biochem* **217**,639–644.
- Jagadish SVK, Craufurd PQ y Wheeler TR (2007). High temperature stress and spikelet fertility in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* **58**(7), 1627–1635.
- Jan PS, Huang HY y Cheng HM (2010). Expression of a synthesized gene incoding cationic peptide cecropin B in transgenic tomato plants protects against bacterial diseases. *Appl Biochem Biotechnol.* **76**, 769-775.

- Javadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, Becker CL y McLaughlin ML (1996). De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem.* **39**(16), 3107-13.
- Jefferson RA, Burgess SM y Hirsh D (1986). beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **83**, 8447-8451.
- Jiang Y, Zhaoxia Cai, Weibo Xie, Tuan Long, Huihui Yu y Qifa Zhang (2011). Rice functional genomics research, Progress and implications for crop genetic improvement. *Biotechnol Adv.* doi, 10.1016/.
- Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J, Petersen S, Brunstedt J y Okkelsz F (1998). Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol Breed* **4**, 111-117.
- Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, Berndt, KD y Agerberth B (1998). Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J. Biol. Chem.* **273**, 3718–3724.
- Kaddurah-Daouk R, Beecher C, Kristal BS, Matson WR, Bogdanov M y Asa DJ (2009). Bioanalytical advances for metabolomics and metabolic profiling. *PharmaGenomics* **January**, 46-52.
- Kaeppeler SM, Kaeppeler HF y Rhee Y (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.* **43**, 179–188.
- Kaiser J (2008). Is the drought over for pharming? *Science* **320**,473–5.
- Karas M y Hillenkamp F (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal.Chem.* **60**, 2299-2301.
- Karunanandaa B, Qi Q, Hao M, Baszis SR, Jensen PK, Wong YH, Jiang J, Venkatramesh M, Gruys KJ, Moshiri F, Post-Beittenmiller D, Weiss JD y Valentin HE (2005). Metabolically engineered oilseed crops with enhanced seed tocopherol. *Metab Eng* **7**, 384-400.
- Kamauchi S, Nakatani H, Nakano C y Urade R (2005). Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal* **272**, 3461–3476.
- Kawakatsu T, YamamotoMP, Touno SM, Yasuda H y Takaiwa F (2009). Compensation and interaction between RISBZ1 and RPBF during grain filling in rice. *Plant J.* **59**, 908–20.
- Khalf M, Goulet C, Vorster J, Brunelle F, Anguenot R, Fliss I y Michaud D (2010). Tubers from potato lines expressing a tomato Kunitz protease inhibitor are substantially equivalent to parental and transgenic controls. *Plant Biotechnol.J.* **8**, 155-169.
- Kikkert JR (1993). The Biolistic[®] PDS-1000/He device. *Plant Cell Tiss.Org.Cult.* **33**, 221-226.
- Kim HK, Chun DS, Kim JS, Yun CH, Lee JH, Hong SK y Kang DK (2006). Expression of the cationic antimicrobial peptide lactoferricin fused with the anionic peptide in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **19**, 1–9.
- Kim SG, Kim ST, Wang Y, Kim SK, Lee CH, Kim KK, Kim JK, Lee SY y Kang KY (2010). Overexpression of rice isoflavone reductase-like gene (*OsIRL*) confers tolerance to reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum*, **138**, 1–9.
- Kindrachuk J, Scruten E, Attah-Poku S, Bell K, Potter A, Babiuk LA, Griebel PJ y Napper S (2011). Stability, toxicity, and biological activity of host defense peptide BMAP28 and its inversed and retro-inversed isomers. *Biopolymers* **96**(1), 14-24.
- Kishchenko EM, Komarnitskii IK y Kuchuk NV (2011). Transgenic sugar beet tolerant to imidazolinone obtained by Agrobacterium-mediated transformation. *Tsitol Genet.* **45**(3), 20-5.
- Klein TM, Wolf ED, Wu R y Sandford JC (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**, 70-73.
- König A, Cockburn A, Crevel RW, Debruyne E, Grafstroem R, Hammerling U, Kimber I, Knudsen I, Kuiper HA, Peijnenburg AA, Penninks AH, Poulsen M, Schauzu M y Wal JM (2004). Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. *Food Chem.Toxicol.* **42**, 1047-1088.

- Kogel KH, Voll LM, Schafer P, Jansen C, Wu Y, Langen G, Imani J, Hofmann J, Schmiedl A, Sonnewald S, von Wettstein D, Cook RJ y Sonnewald U (2010). Transcriptome and metabolome profiling of field-grown transgenic barley lack induced differences but show cultivarspecific variances. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 6198–6203.
- Kok EJ, Keijer J, Kleter GA, and Kuiper HA (2008). Comparative safety assessment of plant-derived foods. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* **50**, 98-113.
- Kok EJ y Kuiper HA (2003). Comparative safety assessment for biotech crops. *Trends in Biotechnology* **21**, 439-444.
- Koncz C, Nemeth K, Redei GP y Schell J (1992). T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis. *Plant Mol.Biol.* **20**, 963-976.
- Kristensen C, Morant M, Olsen CE, Ekstrom CT, Galbraith DW, Moller BL y Bak S (2005). Metabolic engineering of dhurrin in transgenic Arabidopsis plants with marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **102**, 1779-1784.
- Kuiper HA, Kleter GA, Noteborn HP y Kok EJ (2001). Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *Plant J.* **27**(6), 503-28.
- Kuiper HA, Kleter GA, Noteborn HP y Kok EJ (2002). Substantial equivalence--an appropriate paradigm for the safety assessment of genetically modified foods? *Toxicology* **181-182**, 427-31.
- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H y Kyojuka J (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652–5.
- La Paz JL, Vicient CM, Puigdomènech P y Pla M (2010). Characterization of polyadenylated cryIA(b) transcripts 5 in maize MON810 commercial varieties. *Anal Bioanal Chem* **396**, 2125-2133.
- Labra M, Savini C, Bracale M, Pelucchi N, Colombo L, Bardini M y Sala F (2001). Genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced by infecting calli with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* **20**, 325–330.
- Lacroix B, Li J, Tzfira T y Citovsky V (2006). Will you let me use your nucleus? How *Agrobacterium* gets its T-DNA expressed in the host plant cell. *Can.J.Physiol Pharmacol.* **84**, 333-345.
- Lampert DT, Kieliszewski MJ, Chen Y y Cannon MC (2011). Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture. *Plant Physiol.* **156**(1), 11-9.
- Landschulz WH, Johnson PF y McKnight SL (1988). The leucine zipper, a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science.* **240**, 1759-1764.
- Larkin PJ y Scowcroft WR (1981). Somaclonal variation – a novel source of variability from cell-cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* **60**, 197–214.
- Latham JR, Wilson AK y Steinbrecher RA (2006). The mutational consequences of plant transformation. *J. Biomed. Biotechnol.* **2006**, 1-7.
- Lee SC, Hwang IS, Choi HW y Hwang BK (2008). Involvement of the pepper antimicrobial protein CaAMP1 gene in broad spectrum disease resistance. *Plant Physiol.* **148**, 1004-1020.
- Lehesranta SJ, Davies HV, Shepherd LV, Nunan N, McNicol JW, Auriola S, Koistinen KM, Suomalainen S, Kokko HI y Karenlampi SO (2005). Comparison of tuber proteomes of potato varieties, landraces, and genetically modified lines. *Plant Physiol* **138**, 1690-1699.
- Li Q, Lawrence CB, Xing HY, Babbitt RA, Bass WT, Maiti IB y Everett NP (2001). Enhanced disease resistance conferred by expression of an antimicrobial magainin analog in transgenic tobacco. *Planta* **212**, 635-639.
- Li Y (2009). Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem.* **54**(1), 1-9.

- Li Y, Su X, Zhang B, Huang Q, Zhang X y Huang R (2009). Expression of jasmonic ethylene responsive factor gene in transgenic poplar tree leads to increased salt tolerance. *Tree Physiol.* **29**(2), 273-9.
- Li Z, Zhou M, Zhang Z, Ren L, Du L, Zhang B, Xu H, Xin Z (2011). Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased resistance to *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia cerealis*. *Funct Integr Genomics* **11**, 63-70.
- Liu F, Chen S, Que ZQ, Wang L, Liu XQ y Pan QH (2007). The blast resistance gene Pi37 encodes a nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a resistance gene cluster on rice chromosome 1. *Genetics* **177**, 1871–80.
- Lui J, Carmell MA, Rivas VF, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor LJ y Hannon GJ (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **304**, 1437-1441.
- Liu SP, Zhou L, Lakshminarayanan R y Beuerman RW (2010). Multivalent Antimicrobial Peptides as Therapeutics, Design Principles and Structural Diversities. *Int J Pept Res Ther.* **16**, 199–213.
- Liu W, Mazarei M, Rudis MR, Fethe M, Stewart CN, Jr (2011). Rapid *in vivo* analysis of synthetic promoters for plant pathogen phytosensing. *BMC Biotechnology* **11**(108), 1-9.
- López-García B, González-Candelas L, Pérez-Paya E y Marcos JF (2000). Identification and characterization of a hexapeptide with activity against phytopathogenic fungi that cause postharvest decay in fruits. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 837-846.
- López-García B, Pérez-Paya E y Marcos JF (2002). Identification of novel hexapeptides bioactive against phytopathogenic fungi through screening of a synthetic peptide combinatorial library. *Appl Environ Microbiol.* **68**, 2453-2460.
- Lu CA, Lim EK y Yu SM (1998). Sugar response sequence in the promoter of a rice alpha-amylase gene serves as a transcriptional enhancer. *J Biol Chem.* **273**, 10120-10131.
- Lucca P, Poletti S y Sautter C (2006). Genetic engineering approaches to enrich rice with iron and vitamin A. *Physiol Plant* **126**, 291-303.
- Lucht JM, Mauch-Mani B, Steiner HY, Metraux JP, Ryals J y Hohn B (2002). Pathogen stress increases somatic recombination frequency in *Arabidopsis*. *Nat. Genet.* **30**, 311–314.
- Manetti C, Bianchetti C, Casciani L, Castro C, Di Cocco ME, Micheli A, Motto M y Conti F (2006). A metabonomic study of transgenic maize (*Zea mays*) seeds revealed variations in osmolytes and branched amino acids. *J. Exp. Bot.* **57**, 2613-2625.
- Mangoni ML (2006). Temporins, anti-infective peptides with expanding properties. *Cell Mol Life Sci.* **63**(9), 1060-9.
- Mannis MJ (2002). The use of antimicrobial peptides in ophthalmology, an experimental study in corneal preservation and the management of bacterial keratitis. *Trans Am Ophthalmol Soc.* **100**, 243-71.
- Martínez IM y Chrispeels MJ (2003). Genomic Analysis of the Unfolded Protein Response in *Arabidopsis* Shows Its Connection to Important Cellular Processes. *The Plant Cell* **15**, 561–576.
- Martyniuk CJ y Denslow ND (2009). Towards functional genomics in fish using quantitative proteomics. *Gen. Comp Endocrinol.* **164**, 135-141.
- Matsumoto T, Wu JZ, Kanamori H *et al.* (2005). The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**, 793-800.
- Matsuzaki K, Sugishita K, Harada M, Fujii N y Miyajima K (1997) Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1327**, 119–130.
- McCabe DE y Martinell BJ (1993). Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. *Nat. Biotechnol* **11**, 596-598.

- McCormick AA, Reddy S, Reinl SJ, Cameron TI, Czerwinski DK, Vojdani F, Hanley KM, Garger SJ, White EL, Novak J, Barrett J, Holtz RB, Tuse D y Levy R** (2008). Plant-produced idiotypic vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma, safety and immunogenicity in a phase I clinical study. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* **105**, 10131-10136.
- Menzel G, Harloff HJ y Jung C** (2003). Expression of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in hairy roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Appl.Microbiol.Biotechnol* **60**, 571-576.
- Miki B, Abdeen A, Manabe Y y MacDonald P** (2009). Selectable marker genes and unintended changes to the plant transcriptome. *Plant Biotechnol.J.* **7**, 211-218.
- Miki B y McHugh S** (2004). Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J. Biotechnol.* 107(3), 193-232.
- Miles JS y Guest JR** (1984). Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli*. *Gene* **32**, 41-48.
- Mills D, Hammerschlag FA, Nordeen RO, Owens LD** (1994). Evidence for the breakdown of cecropin B by proteinases in the intercellular fluid of peach leaves. *Plant Science* 1994, **104**, 17-22.
- Millstone E, Brunner E y Mayer S** (1999). Beyond 'substantial equivalence'. *Nature* **401**, 525-526.
- Minakuchi K, Kameoka H, Yasuno N, Umehara M, Luo L, Kobayashi K, Hanada A, Ueno K, Asami T, Yamaguchi S y Kyojuka J** (2010). FINE CULM1 (FC1) works downstream of strigolactones to inhibit the outgrowth of axillary buds in rice. *Plant Cell Physiol* **51**,1127-35.
- Mir KU y Southern EM** (1999). Determining the influence of structure on hybridization using oligonucleotide arrays. *Nat.Biotechnol.* **17**, 788-792.
- Mitsuhara I, Matsufuru H, Ohshima M, Kaku H, Nakajima Y, Murai N, Natori S y Ohashi Y** (2000). Induced expression of sarcotoxin IA enhanced host resistance against both bacterial and fungal pathogens in transgenic tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 860-868.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M y Van Breusegem F** (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* **9**, 490-498.
- Monroc S, Badosa E, Feliu L, Planas M, Montesinos y Bardají E** (2006). De novo designed cyclic cationic peptides as inhibitors of plant pathogenic bacteria. *Peptides* **27**, 2567-2574.
- Montero M, Coll A, Nadal A, Messeguer J y Pla M** (2011). Only half the transcriptomic differences between resistant genetically modified and conventional rice are associated with the transgene. *Plant Biotechnol J.* **9**(6), 693-702.
- Montesinos E y Bardají E** (2008). Synthetic antimicrobial peptides as agricultural pesticides for plant-disease control. *Chem Biodivers* **5**, 1225-1237.
- Morassutti C, De Amicis F, Skerlavaj B, Zanetti M y Marchetti S** (2002). Production of a recombinant antimicrobial peptide in transgenic plants using a modified VMA intein expression system. *FEBS Lett.* **519**(1-3), 141-6.
- Moreno AA y Orellana A** (2011). The physiological role of the unfolded protein response in plants. *Biol Res.* **44**(1), 75-80.
- Moreno AB, Peñas G, Rufat M, Bravo JM, Estopà M, Messeguer J y San Segundo B** (2005). Pathogen-induced production of the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* confers resistance to the blast fungus *Magnaporthe grisea* in transgenic rice. *Mol Plant Microbe Interact.* **18**(9), 960-72.
- Murray MG y Thompson WF** (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**(19), 4321-5.
- Mursahige, T y Skoog** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant* **15**, 473-497.

- Murch SJ, Rupasinghe HP, Goodenowe D y Saxena PK** (2004). A metabolomic analysis of medicinal diversity in Huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) genotypes, discovery of novel compounds. *Plant Cell Rep.* **23**, 419-425.
- Nagpal S, Kaur KJ, Jain D y Salunke DM** (2002). Plasticity in structure and interactions is critical for the action of indolicidin, an antibacterial peptide of innate immune origin. *Protein Science* **11**, 2158–2167.
- Nagpal S, Gupta V, Kaur KJ y Salunke DM** (1999). Structure-Function Analysis of Tritypticin, an Antibacterial Peptide of Innate Immune Origin. *The journal of biological chemistry* **274**(33), 23296–23304.
- Napoli C, Lemieux C y Jorgensen R** (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279-289.
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O y Jones JD** (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**, 436–439.
- Nishihara JC y Champion KM** (2002). Quantitative evaluation of proteins in one- and two-dimensional polyacrylamide gels using a fluorescent stain. *Electrophoresis* **23**, 2203-2215.
- Newcombe RG** (1998). Two-sided confidence intervals for the single proportion, comparison of seven methods. *Stat. Med.* **17**, 857–872.
- Noh SA, Lee HS, Huh GH, Oh MJ, Paek KH, Shin JS y Bae JM** (2011). A sweetpotato SRD1 promoter confers strong root-, taproot-, and tuber-specific expression in *Arabidopsis*, carrot, and potato. *Transgenic Research* [Epub ahead of print].
- Ntui VO, Thirukkumaran G, Azadi P, Khan RS, Nakamura I y Mii M** (2010). Stable integration and expression of wasabi defensin gene in "Egusi" melon (*Colocynthis citrullus* L.) confers resistance to *Fusarium* wilt and *Alternaria* leaf spot. *Plant Cell Rep.* **29**, 943-954.
- Nuttall J, Vine N, Hadlington JL, Drake P, Frigerio L y Ma JK** (2002). ER-resident chaperone interactions with recombinant antibodies in transgenic plants. *Eur J Biochem* **269**, 6042-6051.
- O'Farrell PH** (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* **250**, 4007-4021.
- Oard S, Rush MC y Oard JH** (2004). Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. *J Appl Microbiol.* **97**(1), 169-80.
- Oard SV y Enright FM** (2006). Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Cell Rep.* **25**(6), 561-72.
- Obata T, Kitamoto HK, Nakamura A, Fukuda A y Tanaka Y** (2007). Rice shaker potassium channel OskAT1 confers tolerance to salinity stress on yeast and rice cells. *Plant Physiol* **144**, 1978–85.
- Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S y Reddy SV** (2011). Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances* **29**, 210–222.
- OECD** (1993). Safety Evaluation of Foods Derived by Modern Biotechnology. Available via OECD. <http://www.oecd.org/dataoecd/37/18/41036698.pdf>.
- OECD** (1996) Food Safety Evaluation. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OECD** (2003). Consensus Documents for the Work on the Safety of Novel Foods and Feed. Task force for the Safety of Novel Foods and Feed. Paris, Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Oksman-Caldentey KM y Inze D** (2004). Plant cell factories in the post-genomic era, new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci.* **9**, 433-440.

- Oraby H, Venkatesh B, Dale B, Ahmad R, Ransom C, Oehmke J y Sticklen M** (2007). Enhanced conversion of plant biomass into glucose using transgenic rice-produced endoglucanase for cellulosic ethanol. *Transgenic Research* **16**(6), 739-49.
- Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY y Remington SJ** (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392-1395.
- Osusky M, Osuska L, Hancock RE, Kay WW y Misra S** (2004). Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot. *Transgenic Research* **13**, 181-190.
- Osusky M, Osuska L, Kay W, Misra S** (2005). Genetic modification of potato against microbial diseases, *in vitro* and *in planta* activity of a dermaseptin B1 derivative, MsrA2. *Theor Appl Genet* **111**, 711-722.
- Padgett SR, Kolacz KH, Delannay X, Re DB, Lavalley BJ, Tinius CN, Rhodes WK, Otero YI, Barry GF, Eichholtz DA, Peschke VM, Nida DL, Taylor NB y Kishore GM** (1995). Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Science* **35**, 1451.
- Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, Howells RM, Kennedy MJ, Vernon G, Wright SY, Hinchliffe E, Adams JL, Silverstone AL y Drake R** (2005). Improving the nutritional value of Golden Rice through increased provitamin A content. *Nat. Biotechnol.* **23**, 482-487.
- Pandey BK, Srivastava S, Singh M y Ghosh JK** (2011). Inducing toxicity by introducing a leucine-zipper-like motif in frog antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochem J.* **436**(3), 609-20.
- Parra G, Bradnam K, Rose AB y Korf I** (2011). Comparative and functional analysis of intron-mediated enhancement signals reveals conserved features among plants. *Nucleic Acids Research* **39**(13), 5328-37.
- Passardi F, Cosio C, Penel C y Dunand C.** Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep* (2005) **24**, 255–265.
- Pearce G, Yamaguchi Y, Barona G y Ryan CA** (2010). A subtilisin-like protein from soybean contains an embedded, cryptic signal that activates defense-related genes. *PNAS.* **107**(33), 14921–14925.
- Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP y Fodor SP** (1994). Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **91**, 5022-5026.
- Petravovits LA, Purnell MP, Nielsen LK y Brumbley SM** (2007). Production of polyhydroxybutyrate in sugarcane. *Plant Biotechnol J* **5**, 162-172.
- Peuke AD y Rennenberg H** (2005). Phytoremediation with transgenic trees. *Z. Naturforsch. C* **60**, 199-207.
- Piccioni F, Capitani D, Zolla L y Mannina L** (2009). NMR metabolic profiling of transgenic maize with the Cry1Ab gene. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 6041-6049.
- Podishetty N, Kalidindi S, Laha GS, Kommoju S, Mishra B, Viraktamath BC, Yadla H, Reddy CS, Balachandran SM, Ram T, Maganti SM, N SR, Chirravuri NN, Gajjala AR, Shaik H y Sundaram RM** (2011). Identification and fine-mapping of Xa33, a novel gene for resistance to *Xanthomonas oryzae pv oryzae*. *Phytopathology* [Epub ahead of print].
- Polyansky AA, Vassilevski AA, Volynsky PE, Vorontsova OV, Samsonova OV, Egorova NS, Krylov NA, Feofanov AV, Arseniev AS, Grishin EV y Efremov RG** (2009). N-terminal amphipathic helix as a trigger of hemolytic activity in antimicrobial peptides, a case study in laticins. *J Appl Microbiol.* **97**(1), 169-80.
- Promodrou C y Pearl LH** (1992). Recursive PCR, a novel technique for total gene synthesis. *Protein Eng.* **5**(8), 827-9.
- Pun T, Hochstrasser DF, Appel RD, Funk M, Villars-Augsburger V y Pellegrini C** (1988). Computerized classification of two-dimensional gel electrophoretograms by correspondence analysis and ascendant hierarchical clustering. *Appl. Theor. Electrophor.* **1**, 3-9.

- Rademacher T, Sack M, Arcalis E, Stadlmann J, Balzer S, Altmann F, Quendler H, Stiegler G, Kunert R, Fischer R, Stoger E** (2008). Recombinant antibody 2G12 produced in maize endosperm efficiently neutralizes HIV-1 and contains predominantly single-GlcNAc N-glycans. *Plant Biotechnol J*, **6**, 189–201.
- Rahman MT, Islam MT y Islam MO** (2002). Effect of water stress at different growth stages on yield and yield contributing characters of transplanted aman rice. *Pak. J. Biol. Sci.* **5**(2), 169-172.
- Rahnamaeian M, Langen G, Imani J, Khalifa W, Altincicek B, von Wettstein D, Kogel KH y Vilcinskis A** (2009). Insect peptide metchnikowin confers on barley a selective capacity for resistance to fungal ascomycetes pathogens. *Journal of Experimental Botany* **60**, 4105-4114.
- Raimondo D, Andreotti G, Saint N, Amodeo P, Renzone G, Sanseverino M, Zocchi I, Molle G, Motta A y Scaloni A** (2005). A folding-dependent mechanism of antimicrobial peptide resistance to degradation unveiled by solution structure of distinctin. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 6309–6314.
- Ransom C, Balan V, Biswas G, Dale B, Crockett E y Sticklen M** (2007). Heterologous *Acidothermus cellulolyticus* 1,4-beta-endoglucanase E1 produced within the corn biomass converts corn stover into glucose. *Appl. Biochem. Biotechnol* **137-140**, 207-219.
- Rao AG** (1995). Antimicrobial peptides. *Mol Plant Microbe Interact.* **8**(1), 6-13.
- Rasheva VI y Domingos PM** (2009). Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* **14**(8), 996-1007.
- Regulation (EC) No 1830 / 2003** of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending directive 2001/18/EC. *Off J Eur Union* **L268** 24-28.
- Ren Y, Lv J, Wang H, Li L, Peng Y y Qu LJ** (2009). A comparative proteomics approach to detect unintended effects in transgenic Arabidopsis. *J. Genet. Genomics* **36**, 629-639.
- Resende JM, Moraes CM, Munhoz VH, Aisenbrey C, Verly RM, Bertani P, Cesar A, Pilo'-Veloso D y Bechinger B** (2009) Membrane structure and conformational changes of the antibiotic heterodimeric peptide distinctin by solid-state NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 16639–16644.
- Ricroch EA, Berge' JB, y Kuntz M** (2011). Evaluation of Genetically Engineered Crops Using Transcriptomic, Proteomic, and Metabolomic Profiling Techniques. *Plant Physiology* **155**, 1758-1761.
- Rivero M, Furman N, Mencacci N, Picca P, Toum L, Lentz E, Bravo-Almonacid F y Mentaberry A** (2011). Stacking of antimicrobial genes in potato transgenic plants confers increased resistance to bacterial and fungal pathogens. *J Biotechnol*. [Epub ahead of print].
- Robinson C** (2002). Genetic modification technology and food. Consumer health and safety. Walter Hammes. 1-53. Washington, USA. ILSI (International Life Sciences Institute) Europe concise monograph series. (Book, Monograph)
- Rocco M, Corrado G, Arena S, D'Ambrosio C, Tortiglione C, Sellaroli S, Marrad M, Raob R y Scaloni A** (2008). The expression of tomato prosystemin gene in tobacco plants highly affects host proteomic repertoire. *J Proteomics* **71**, 176–185.
- Roessner U, Luedemann A, Brust D, Fiehn O, Linke T, Willmitzer L y Fernie A** (2001). Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell* **13**, 11-29.
- Ruebelt MC, Lipp M, Reynolds TL, Schmuke JJ, Astwood JD, DellaPenna D, Engel KH y Jany KD** (2006). Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 3. Assessing unintended effects. *J Agric Food Chem* **54**, 2169-2177.
- Ruggiero F, Exposito JY, Bournat P, Gruber V, Perret S, Comte J, Olganier B, Garrone R y Theisen M** (2000). Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS Lett.* **469**, 132-136.

- Sallem MY** (2008). Genetic analysis of basmati rice (*Oryza sativa* L.). *PhD Thesis*. Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan.
- Sallaud C, Gay C, Larmande P, Bes M, Piffanelli P, Piegu B, Droc G, Regad F, Bourgeois E, Meynard D, Perin C, Sabau X, Ghesquiere A, Glaszmann JC, Delseny M y Guiderdoni E** (2004). High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice, a first step towards in silico reverse genetics. *Plant J.* **39**, 450-464.
- Sallaud C, Meynard D, van Boxtel J, Gay C, Bès M, Brizard JP, Larmande P, Ortega D, Raynal M, Portefaix M, Ouwerkerk PB, Rueb S, Delseny M y Guiderdoni E** (2003). Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theor Appl Genet.* **106**(8), 1396-408.
- Sandford JC, Smith FD y Russell JA** (1993). Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol.* **217**, 483-509.
- Sato S, Soga T, Nishioka T y Tomita M** (2004). Simultaneous determination of the main metabolites in rice leaves using capillary electrophoresis mass spectrometry and capillary electrophoresis diode array detection. *Plant J.* **40**, 151-163.
- Schena M, Shalon D, Davis RW y Brown PO** (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470.
- Schillberg S, Twyman RM y, Fischer R** (2005). Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants—technology assessment. *Vaccine.* **23**, 1764–9.
- Schillberg S, Emans N y Fischer R** (2002). Antibody molecular farming in plants and plant cells. *Phytochem. Rev.* **1**, 45–54.
- Schubert D, Lechtenberg B, Forsbach A, Gils M, Bahadur S y Schmidt R** (2004). Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants, the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. *Plant Cell* **16**(10), 2561-72.
- Schoof H y Karlowski WM** (2003) Comparison of rice and Arabidopsis annotation. *Curr Opin Plant Biol.* **6**, 106–112.
- Sels J, Mathys J, De Coninck BM, Cammue BP y De Bolle MF** (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins, a focus on PR peptidases. *Plant Physiol Biochem.* **46**(11), 941-50.
- Shai Y** (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers.* **66**(4), 236-48.
- Sharma A, Sharma R, Imamura M, Yamakawa M y Machii H** (2000). Transgenic expression of cecropin B, an antibacterial peptide from *Bombyx mori*, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice. *FEBS Lett* **484**, 7-11.
- Shewry PR, Jones HD y Halford NG** (2008). Plant biotechnology, transgenic crops. *Adv.Biochem.Eng Biotechnol.* **111**, 149-186.
- Smith EF y Townsend CO** (1907). A plant-tumor of bacterial origin. *Science* **25**, 671-673.
- Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M y Nishioka T** (2003). Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J.Proteome.Res.* **2**, 488-494.
- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ y Joshua-Tor L** (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* **305**, 1434-1437.
- Southern EM** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Spök A** (2007). Molecular farming on the rise – GMO regulators still walking a tightrope. *TRENDS in Biotechnology* **25**, 74-82.
- Stachel SE, Nester EW y Zambryski PC** (1986). A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**, 379-383.

- Sundar IK y Sakthivel N** (2008). Advances in selectable marker genes for plant transformation. *J.Plant Physiol* **165**, 1698-1716.
- Takagi H, Saito S, Yang L, Nagasaka S, Nishizawa N y Takaiwa F** (2005). Oral immunotherapy against a pollen allergy using a seed-based peptide vaccine. *Plant Biotechnol. J.* **3**, 521-533.
- Tanasienko IV, Emets AI, Pirko IaV, Korkhovoï VI, Abumkhadi N y Blium IaB.** (2011). Developing transgenic barley lines producing human lactoferrin using mutant alfa-tubulin gene as selective marker gene. *Tsitol Genet.* **45**(1), 3-10.
- Takaiwa F, Takagi H, Hirose S y Wakasa Y** (2007). Endosperm tissue is good production platform for artificial recombinant proteins in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 84–92.
- Timms JF y Cramer R** (2008). Difference gel electrophoresis. *Proteomics* **8**,4886–4897.
- Toki S, Takamatsu S, Nojiri C, Ooba S, Anzai H, Iwata M, Christensen AH, Quail PH y Uchimiya H** (1992). Expression of a Maize Ubiquitin Gene Promoter-bar Chimeric Gene in Transgenic Rice Plants. *Plant Physiol.* **100**, 1503-1507.
- Torrent M, Llop-Tous I y Ludevid MD** (2009). Protein body induction, a new tool to produce and recover recombinant proteins in plants. *Meth Mol Biol.* **483**,193-208.
- Tossi A, Sandri L y Giangaspero A** (2000). Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**, 4-30.
- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P y Fischer R** (2003). Molecular farming in plants, host systems and expression technology. *TRENDS in Biotechnology* **21**(12), 570-578.
- Tyagi AK** (2001). Plant genes and their expression. *Curr. Sci.* **80**, 161–169
- Tyagi AK, Khurana JP, Khurana P, Raghuvanshi S, Gaur A, Kapur A, Gupta V, Kumar D, Ravi V, Vij S, Khurana P y Sharma S** (2004). Structural and functional analysis of rice genome. *J. Genet.* **83**, 79–99.
- Tzfira T y Citovsky V** (2006). Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants, biology and biotechnology. *Curr.Opin.Biotechnol.* **17**, 147-154.
- Urade R** (2009).The endoplasmic reticulum stress signaling pathways in plants. *Biofactors* **35**(4),326-31.
- Urushibara S, Tozawa Y, Kawagishi-Kobayashi M y Wakasa K** (2001). Efficient transformation of suspension cultured rice cells mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Breeding Science* **51**,33-38.
- Ushimaru T, Nakagawa T, Fujioka Y, Daicho K, Naito M, Yamauchi Y, Nonaka H, Amako K, Yamawaki K y Murata N.** (2006). Transgenic Arabidopsis plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. *J Plant Physiol.* **163**(11), 1179-84.
- van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN y Stuitje AR** (1990). Flavonoid genes in petunia, addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**, 291-299.
- van Zoggel H, Hamma-Kourbali Y, Galanth C, Ladram A, Nicolas P, Courty J, Amiche M y Delbé J** (2010). Antitumor and angiostatic peptides from frog skin secretions. *Amino Acids.* [Epub ahead of print]
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A y Speleman F** (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**(7), 0034.1-0034.12.
- Vasil IK** (2008). A history of plant biotechnology, from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Rep.* **27**, 1423-1440.
- Vasil V, Castillo AM, Fromm ME y Vasil IK** (1992). Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Nat.Biotechnol* **10**, 667-674.

- Veilleux RE y Johnson AAT** (1998). Somaclonal variation, molecular analysis, transformation interaction, and utilization. *Plant Breed. Rev.* **16**, 229–268.
- Veluthambi K, Gupta AK y Sharma A** (2003). The current status of plant transformation technologies. *Current Science* **84**(3), 368-380.
- Verhoeven HA, de Vos CHR, Bino RJ y Hall RD** (2006). Plant metabolomics strategies based upon Quadruple Time of Flight Mass Spectrometry (QTOF-MS). In 'Plant Metabolomics'. Saito K, Dixon R, and Willmitser L.(Eds), Heidelberg, Germany.)
- Vila L, Quilis J, Meynard D, Breitler JC, Marfà V, Murillo I, Vassal JM, Messeguer J, Guiderdoni E y San Segundo B.** (2005). Expression of the maize proteinase inhibitor (mpi) gene in rice plants enhances resistance against the striped stem borer (*Chilo suppressalis*), effects on larval growth and insect gut proteinases. *Plant Biotechnol J.* **3**(2),187-202.
- Wade D, Andreu D, Mitchell SA, Silveira AMV, Boman A, Boman HG y Merrifield RN** (1992). Antibacterial peptides designed as analogues or hybrids of cecropins and melittin. *Int. J. Pept. Protein Res.* **40**, 429–436.
- Wakasa K, Hasegawa H, Nemoto H, Matsuda F, Miyazawa H, Tozawa Y, Morino K, Komatsu A, Yamada T, Terakawa T y Miyagawa H** (2006). High-level tryptophan accumulation in seeds of transgenic rice and its limited effects on agronomic traits and seed metabolite profile. *Journal of Experimental Botany* **57**(12), 3069–3078.
- Waldron C, Murphy EB, Roberts JL, Gustafson GD, Armour SJ y Malcolm SK** (1985). Resistance to hygromycin B. *Plant Mol Biol* **5**, 103-108.
- Wan L, Zha W, Cheng X, Liu C, Lv L, Liu C, Wang Z, Du B, Chen R, Zhu L y He G** (2011). A rice β -1,3-glucanase gene Osg1 is required for callose degradation in pollen development. *Planta* **233**(2), 309-23.
- Wan XY y Liu JY** (2008). Comparative Proteomics Analysis Reveals an Intimate Protein Network Provoked by Hydrogen Peroxide Stress in Rice Seedling Leaves. *Mol Cell Proteomics* **7**(8), 1469-88.
- Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, Culler AH y Dong X** (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr. Biol.* **17**, 1784–1790.
- Wang E, Wang J, Zhu X, Hao W, Wang L, Li Q, Zhang L, He W, Lu B, Lin H, Ma H, Zhang G y He Z** (2008). Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. *Nat Genet.* **40**,1370–4.
- Wang FZ, Wang QB, Kwon SY, Kwak SS y Su WA** (2005). Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *J Plant Physiol.* **162**(4), 465-72.
- Wang G, Ding X, Yuan M, Qiu D, Li X, Xu Cy Wang S** (2006). Dual function of rice OsDR8 gene in disease resistance and thiamine accumulation. *Plant Mol Biol.* **60**(3), 437-49.
- Wang W, Smith DK, Moulding K y Chen HM** (1998). The dependence of membrane permeability by the antibacterial peptide cecropin B and its analogs, CB-1 and CB-3, on liposomes of different composition. *J Biol Chem.* **273**, 27438–27448.
- Wang ZX, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y y Sasaki T** (1999). The Pib gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J.* **19**, 55–64.
- Warthmann N, Chen H, Ossowski S, Weigel D y Herve P** (2008). Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. *PLoS.One.* **3**, e1829.
- Wen N, Chu Z y Wang S** (2003). Three types of defenseresponsive genes are involved in resistance to bacterial blight and fungal blast diseases in rice. *Mol. Genet. Genomics* **269**, 331–339.
- Whisstock JC, Wiradjaja F, Waters JE y Gurung R** (2002). The structure and function of catalytic domains within inositol polyphosphate 5-phosphatases. *IUBMB Life* **53**(1), 15-23.

- White J, Chang SY, Bibb MJ y Bibb MJ** (1990). A cassette containing the bar gene of *Streptomyces hygrosopicus*, a selectable marker for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1062.
- Wroblewski T, Tomczak A y Michelmore R** (2005). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J* **3**, 259-273.
- Xu P, Zhang Y, Kang L, Roossinck MJ y Mysore KS** (2006). Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. *Plant Physiol* **142**, 429-440.
- Xu X, Jin F, Yu X, Ren S, Hu J y Zhang W** (2007). High-level expression of the recombinant hybrid peptide cecropinA(1–8)–magainin2(1–12) with an ubiquitin fusion partner in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* **55**, 175–182.
- Yamaguchi T y Hirano HY** (2006). Function and diversification of MADS-box genes in rice. *Scientific World Journal* **6**, 1923-32.
- Yang D, Guo F, Liu B, Huang N y Watkins SC** (2003). Expression and localization of human lysozyme in the endosperm of transgenic rice. *Planta* **216**, 597–603.
- Yang H y Jiang J** (2007). Rice as a model for centromere and heterochromatin research. *Chromosome Research* **15**, 77–84.
- Yang J, Barr LA, Fahnestock SR y Liu ZB** (2005). High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting. *Transgenic Res.* **14**, 313-324.
- Yang MJ, Lin WY, Lu KH y Tu WC** (2011). Evaluating antioxidative activities of amino acid substitutions on mastoparan-B. *Peptides.* **32**(10), 2037-43.
- Yang Y, Min Q y Mei C** (2004). Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. *The Plant Journal.* **40**, 909-919.
- Yang Z, Chen H, Tang W, Hua H y Lin Y** (2011). Development and characterisation of transgenic rice expressing two *Bacillus thuringiensis* genes. *Pest Manag Sci* **67**, 414–42.
- Ye X, Al Babili S, Kloti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P y Potrykus I** (2000). Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* **287**, 303-305.
- Yevtushenko DP y Misra S** (2007). Comparison of pathogen-induced expression and efficacy of two amphibian antimicrobial peptides, MsrA2 and temporin A, for engineering wide-spectrum disease resistance in tobacco. *Plant Biotechnol J.* **5**, 720-734.
- Yevtushenko DP, Romero R, Forward BS, Hancock RE, Kay WW y Misra S** (2005). Pathogen-induced expression of a cecropin A-melittin antimicrobial peptide gene confers antifungal resistance in transgenic tobacco. *J Exp Bot.* **56**, 1685-1695.
- Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, Toki S, Wang ZX, Kono I, Kurata N, Yano M, Iwata N y Sasaki T** (1998). Expression of Xa1, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 1663–8.
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Liu B, et al.** (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* **296**, 79–92.
- Zaidi MA, Ye G, Yao H, You TH, Loit E, Dean DH, Riazuddin S y Altosaar I** (2009) Transgenic rice plants expressing a modified cry1Ca1 gene are resistant to *Spodoptera litura* and *Chilo suppressalis*. *Mol Biotechnol.* **43**(3), 232-42.
- Zaslloff M** (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* **415**, 389–395.
- Zha X, Luo X, Qian X, He G, Yang M, Li Y y Yang J** (2009). Over-expression of the rice LRK1 gene improves quantitative yield components. *Plant Biotechnol J.* **7**, 611–20.

- Zhang H, Han B, Wang T, Chen S, Li H, Zhang Y y Dai S** (2011). Mechanisms of Plant Salt Response, Insights from Proteomics. *J Proteome Res.* [Epub ahead of print].
- Zhang Q** (2007). Strategies for developing Green Super Rice. *PNAS.* **104**(42), 16402–16409.
- Zhang Q, Li J, Xue Y, Bin Han B y Deng XW** (2008). Rice 2020, A Call For An International Coordinated Effort In Rice Functional Genomics. *Molecular Plant* **1**(5),715–719.
- Zhang SW, Li CH, Cao J, Zhang YC, Zhang SQ, Xia YF, Sun DY y Sun Y** (2009). Altered architecture and enhanced drought tolerance in rice via the down-regulation of Indole-3-Acetic acid by TLD1/OsGH3.13 activation. *Plant Physiol.* **151**, 1889–901.
- Zhou B, Peng K, Chu Z, Wang S y Zhang Q** (2002). The defense-responsive genes showing enhanced and repressed expression after pathogen infection in rice (*Oryza sativa* L.). *Sci. China (Series C)* **45**, 450–467.
- Zhou D, Zhou X, Ling Y, Zhang Z y Su Z** (2010). AgriGO, a GO analysis toolkit for the agricultural community Nucleic Acids Research Advance Access published on July 1, 2010, DOI 10.1093/nar/gkq310. *Nucl. Acids Res.* **38**,W64-W70.
- Zhou J, Ma C, Xu H, Yuan K, Lu X, Zhu Z, Wu Y y Xu G** (2009). Metabolic profiling of transgenic rice with cryIac and sck genes, an evaluation of unintended effects at metabolic level by using GC-FID and GC-MS. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* **877**, 725-732.
- Zhu WL, Song YM, Park Y, Park K H, Yang ST, Kim JI, Park IS, Hahm KS y Shin SY** (2007). Substitution of the leucine zipper sequence in melittin with peptoid residues affects self-association, cell selectivity, and mode of action. *Biochim. Biophys. Acta.* **1768**, 1506-1517.
- Zolla L, Rinalducci S, Antonioli P y Righetti PG** (2008). Proteomics as a complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic maize seeds as a result of genetic modifications. *J.Proteome.Res.* **7**, 1850-1861.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Secuencias con expresión diferencial en S-afp vs. Senia

Código Affymetrix	x-veces*	Código Acceso Genbank	Descripción	Descripción categorías dentro del término GO		
				Procesos biológicos	Función molecular	Componente celular
RPTR-Os-K01193-1_at	1261,45	RPTR-Os-K01193-1	Gen de selección. Higromicina B fosfotransferasa (<i>hpt II</i>)	---	---	---
OsAffx.19456.1.A1_at	13,39	9640.m00123	C3HC4 tipo <i>Zinc finger</i>	---	---	---
Os.6776.1.S1_at	9,62	AK067173.1	Precursor glucano endo-1,3-beta-glucosidasa, putativo	Procesos metabólicos de carbohidratos	Actividad catalítica /// Actividad hidrolasa, Compuestos de hidrólisis de O-glicosil /// Unión a cationes	---
Os.50256.1.S1_at	8,11	AK120357.1	Secuencia transcrita	---	---	---
Os.7907.1.S1_a_at	7,90	AK120896.1	Ferredoxin-dependiente glutamato sintasa, putativa, precursor cloroplasto	Procesos biosintéticos de glutamato /// procesos metabólicos de compuestos nitrogenados /// procesos metabólicos /// oxidación reducción	Actividad catalítica /// Actividad glutamato sintasa /// Actividad glutamato sintasa (ferredoxina) /// Actividad oxidoreductasa	---
OsAffx.18617.1.S1_at	7,35	9639.m00033	Clathrin cadena pesada, putativa	Proteína de transporte intracelular /// Transporte vesicular	Actividad molécula estructural /// Unión /// Proteína de unión	clathrin coat of trans-Golgi network vesícula /// clathrin coat of coated pit
Os.15894.1.A1_a_at	6,94	BU673129	Peroxidasa putativa	Respuesta a estrés oxidativo/// oxidación reducción	Actividad peroxidasa /// Unión a ion hierro /// Unión a ion calcio /// Actividad oxidoreductasa /// Unión a grupo heme /// Unión ion metal	---
OsAffx.22999.1.S1_at	6,82	AK108619.1	Proteína retrotransposón, putativa	---	---	---
Os.10183.1.S1_at	5,24	AK067850.1	Celulosa sintasa tipo RSW subunidad catalítica	Organización de pared celular /// Procesos biosintéticos de celulosa	Proteína de unión /// Unión a ion zinc /// Actividad transferasa /// Actividad	Plasma membrana /// Membrana /// Membrana integral
Os.57456.1.S1_x_at	5,15	D10956.1	GOS9	---	---	---
Os.37717.1.A1_s_at	5,07	BU673746	Glicosil hidrolasa, putativa	Procesos metabólicos de carbohidratos	Actividad catalítica /// Actividad hidrolasa, Compuestos de hidrólisis de O-glicosil ///	---
Os.6152.1.S1_at	5,03	AK066089.1	Proteína expresada	---	---	---
Os.40352.1.S1_at	4,78	CF336665	Secuencia transcrita	---	---	---
Os.156.2.S1_x_at	4,66	D10425.1	Catalasa	respuesta a estrés oxidativo/// hydrogen peroxide catabolic process Procesos catabólicos de peróxido de hidrógeno /// Oxidación reducción	Actividad catalasa /// Actividad peroxidasa /// Unión a ion hierro /// Actividad oxidoreductasa /// Unión a grupo heme /// Unión ion metal	Peroxisoma /// glioxisoma

Código Affymetrix	x-veces*	Código Acceso Genbank	Descripción	Descripción categorías dentro del término GO		
				Procesos biológicos	Función molecular	Componente celular
Os.52377.1.S1_s_at	4,60	AK066722.1	Proteína expresada	---	---	---
Os.14532.1.S1_at	4,46	AK107809.1	Proteína expresada	---	---	---
OsAffx.28903.2.S1_x_at	4,27	9636.m04166	Proteína retrotransposón, putativa	---	---	---
OsAffx.28903.2.S1_at	4,15	9636.m04166	Proteína retrotransposón, putativa	---	---	---
OsAffx.30473.1.S1_x_at	4,10	NM_190863.1	Proteína fotosistema II D2	---	---	---
Os.11821.1.S1_at	4,01	AK071775.1	ATP sintasa, putativa	transporte /// transporte de iones/// Síntesis de ATP acoplada a transporte de protones /// transporte de protones /// Procesos metabólicos de ATP	Actividad hidrolasa, sobre ácidos anhídridos, catalización de movimientos transmembranales /// hydrogen ion transporting Actividad ATP sintasa acoplada al transporte de hidrógeno, mecanismo rotacional/// proton-transporting Actividad ATPasa acoplada al transporte de protones, mecanismo rotacional	Complejo ATPasa transportador de protones, dominio catalítico /// ATPase transportador de protones tipo V, dominio V1
Os.52425.1.S1_x_at	3,97	AK067023.1	Trehalosa-6-fosfato sintasa, putativa	Procesos biosintéticos de trehalosa	Actividad catalítica	---
Os.2450.3.S1_x_at	3,89	AK106451.1	Fosfoenolpiruvato carboxilasa	Ciclo tricarboxílico ácido	Actividad catalítica /// Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa	---
Os.12191.1.S1_s_at	3,84	U76030.1	Hemoglobina 1	Transporte de oxígeno	Unión a ion hierro /// Unión a oxígeno /// Unión a grupo heme /// Unión ion metal	---
Os.28397.1.S1_at	3,80	BI807677	Fenilalanina amonio-liasa, putativa	L-phenylalanine catabolic process /// Procesos biosintéticos/// phenylpropanoid procesos	Actividad catalítica /// Actividad amonio ligasa /// Actividad amonio liasa	citoplasma
Os.6645.1.S1_s_at	3,69	AU101638	Péptido tipo tionina, putativo	---	---	---
Os.57449.1.S1_x_at	3,63	D29697.1	Chalcona sintasa, gen	Procesos metabólicos /// Procesos biosintéticos///Procesos biosintéticos de flavonoid	Actividad catalítica /// Actividad acil-transferasa /// Actividad naringenin-chalcon sintasa /// Actividad transferasa /// Actividad transferasa, transferencia de grupos acil diferentes a grupos amino-acil	---
Os.47388.1.S1_s_at	3,61	CA761514	Proteína con dominio de familia ribonucleasa T2	---	Unión a ARN /// Actividad ribonucleasa T2	---
Os.5504.1.S1_at	3,58	AK059244.1	Proteína <i>heat-shock</i> , putativa	respuesta a estrés	Unión a nucleótidos/// ATP Unión	---

Descripción categorías dentro del término GO						
Código <i>Affymetrix</i>	x-veces*	Código Acceso Genbank	Descripción	Procesos biológicos	Función molecular	Componente celular
<i>Os.15701.1.S1_x_at</i>	3,57	AK100652.1	Proteína transportadora de potasio, putativa	Transporte /// Transporte de iones/// Transporte de potasio	Actividad transportadora transmembranal de iones potasio /// Unión a ion potasio	Membrana /// Membrana integral
<i>Os.57471.1.S1_x_at</i>	3,56	D21122.1	Actina	---	Unión a nucleótidos/// Proteína de unión /// ATP Unión	Citoplasma /// Citosesqueletón
<i>Os.51601.1.S1_at</i>	3,45	AK063147.1	Proteína ZOS7-10 - C2H2 <i>Zinc finger</i>	---	Unión a ion zinc	Intracelular
<i>Os.53343.1.S1_x_at</i>	3,39	AK072144.1	Proteína con dominio quinasa	---	---	---
<i>OsAffx.12326.1.S1_at</i>	3,32	9630.m03138	Proteína expresada	---	---	---
<i>Os.5031.1.S1_at</i>	3,30	AB127580.1	Proteína de patogénesis 10, específica de raíz	Respuesta de defensa /// Respuesta a estímulos bióticos	---	---
<i>Os.22995.1.S1_at</i>	3,20	CB096301	Secuencia transcrita	---	---	---
<i>Os.46048.1.S1_x_at</i>	3,17	CB642477	Proteína <i>Zinc finger</i> , putativa	---	Actividad ubiquitina-ligasa /// Unión a ion zinc	---
<i>Os.53055.1.S1_at</i>	3,16	AK070622.1	Proteína expresada	---	---	---
<i>Os.26698.4.S1_s_at</i>	3,15	NM_189284.1	Proteína con dominio de proteína universal de estrés	Respuesta a estrés	---	---
<i>Os.323.1.S1_at</i>	3,15	AF251277.1	Proteína de patogénesis PR-1a	---	---	Región extracelular
<i>Os.28011.1.S1_at</i>	3,09	AY256682.1	Proteína inducible por <i>brown planthopper</i> , putativa	---	---	---
<i>Os.7935.2.S1_x_at</i>	3,01	NM_186055.1	Proteína tipo alcohol deshidrogenasa	Procesos metabólicos /// Oxidación reducción	Actividad catalítica /// Unión /// Actividad oxidoreductasa	---
<i>Os.26511.1.S1_at</i>	2,97	AK073181.1	Proteína expresada	---	---	---
<i>Os.12691.3.S1_x_at</i>	2,97	AK068429.1	Proteína tipo OsEIL1 etileno-insensitiva	---	Actividad reguladora de transcripción	Núcleo
<i>Os.53062.1.S1_at</i>	2,93	AK070653.1	Familia factor de transcripción MYB, putativa	---	DNA Unión	---

Descripción categorías dentro del término GO						
Código Affymetrix	x-veces*	Código Acceso Genbank	Descripción	Procesos biológicos	Función molecular	Componente celular
AFFX-Os_Gapdh_5_at	2,91	AFFX-Os_Gapdh_5	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	---	---	---
Os.8032.1.S1_at	2,87	AK107749.1	Beta-oryzaina	Proteólisis	Actividad cysteina-tipo endopeptidasa/// Actividad peptidasa /// Actividad cysteina-tipo peptidasa /// Actividad hidrolasa	---
Os.49627.1.S1_at	2,86	AK105605.1	Ascorbato oxidasa	Oxidación reducción	Unión a ion cobre /// Actividad L-ascorbato oxidasa /// Actividad oxidoreductasa /// Unión ion metal	Región extracelular
Os.48734.1.S1_s_at	2,81	CR288034	Proteína rica en prolina, putativa	---	---	---
Os.22577.2.S1_x_at	2,80	BU673049	Proteína específica de semilla con dominio DUF260	---	---	---
Os.57475.1.S1_x_at	2,80	D21280.1	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Procesos metabólicos de glucosa /// Procesos metabólicos /// Oxidación reducción	Actividad catalítica /// Actividad gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (fosforilating) /// Unión /// Actividad oxidoreductasa /// NAD or NADH Unión	---
Os.609.3.S1_a_at	2,80	AK066830.1	Proteína con dominio tipo plastocianina	---	Unión a ion cobre /// electron carrier actividad	---
Os.22839.1.S1_at	2,79	AK120345.1	Familia glicosil hidrolasa 16, putativa	Procesos metabólicos de carbohidratos /// Procesos metabólicos celulares	Actividad hidrolasa, Compuestos de hidrólisis de O-glicosil /// Actividad transferasa xyloglucan:xyloglucosyl	Pared celular /// Apoplasto
Os.6542.1.S1_at	2,78	CB678453	Dihidroflavonol-4-reductasa, putativa	---	---	---
Os.8999.3.S1_x_at	2,71	AK062270.1	Aldolasa C-1	Glicólisis /// procesos metabólicos	Actividad catalítica /// Actividad fructosa-bisfosfato aldolasa /// actividad liase	---
Os.28282.2.S1_x_at	2,71	NM_186054.1	Proteína tipo alcohol deshidrogenasa	Procesos metabólicos /// oxidación reducción	Actividad catalítica /// Unión /// Actividad oxidoreductasa	---
Os.23471.2.S1_at	2,70	AK107355.1	Cicloartenol sintasa, putativa	---	Actividad catalítica /// Actividad transferasa intramolecular	---
Os.57474.1.S1_x_at	2,67	D21297.1	Piruvato quinasa	Glicólisis	Unión a ion magnesio /// Actividad catalítica /// Actividad piruvato quinasa/// Actividad quinasa/// Actividad transferasa /// Unión a ion potasio	---
Os.10185.1.S1_at	2,65	AK101049.1	Proteína expresada	---	---	---
AFFX-Os_Actin_5_f_at	2,64	AFFX-Os_Actin_5	Actina	---	---	---
OsAffx.26230.2.S1_at	2,63	9630.m04064	Familia precursor de proteína de maduración	---	---	---

Descripción categorías dentro del término GO						
Código Affymetrix	x-veces*	Código Acceso Genbank	Descripción	Procesos biológicos	Función molecular	Componente celular
Os.23471.2.S1_x_at	2,62	AK107355.1	Cicloartenol sintasa, putativa	---	Actividad catalítica /// Actividad transferasa intramolecular	---
Os.50198.1.S1_at	2,60	AK072653.1	Proteína expresada	---	---	---
Os.7692.1.S1_at	2,58	AK072140.1	Proteína con dominio repetitivo de tetratricopéptido, putativa	---	Unión	---
Os.12793.1.S1_x_at	2,58	NM_191194.1	Familia con dominio de proteína específica de planta TIGR01615	---	---	---
Os.17347.1.S1_at	2,55	AK105854.1	Proteína <i>heat-shock</i> , putativa	Respuesta a estrés	---	---
Os.9816.1.S1_a_at	2,54	AK071789.1	Proteína con motivo de reconocimiento de ARN	---	Unión a nucleótidos /// Unión ácidos nucleicos	---
Os.10803.1.S1_at	2,52	AK119500.1	Piruvato decarboxilasa 2	---	Unión a ion magnesio /// Actividad catalítica /// Actividad piruvato decarboxilasa // Actividad liasa /// Actividad carboxi-liase /// Unión tiamina pirofosfato /// Unión ion metal	---
Os.10178.1.S1_a_at	2,51	AK120236.1	CESA3 - celulosa sintasa	Organización de pared celular /// Procesos biosintéticos de celulosa	Proteína de unión /// Unión a ion zinc /// Actividad transferasa /// Actividad transferasa, transferencia de grupos glicosil /// Actividad celulosa sintasa (formación de UDP) /// Unión ion metal	Plasma membrana /// Membrana /// Membrana integral
OsAffx.19037.1.S1_s_at	2,49	9639.m02449	Proteína homóloga a serina carboxipeptidasa, putativa	Proteólisis	Actividad tipo serina-carboxipeptidasa	---
Os.37660.1.S1_at	2,48	AK062620.1	Proteína con motivo de reconocimiento de ARN	Oxidación reducción	Unión a nucleótidos /// Unión ácidos nucleicos /// Actividad oxidoreductasa	---
OsAffx.23927.1.S1_x_at	2,46	NM_190125.1	Proteína con motivo de reconocimiento de ARN	---	Unión a nucleótidos /// Unión ácidos nucleicos	---
OsAffx.6480.1.S1_at	2,46	9637.m02967	Familia hidrolasa, alpha-beta	---	Actividad hidrolasa	---
AFFX-Os_Actin_5_s_at	2,45	AB047313.1	Actina	---	Unión a nucleótidos /// Proteína de unión /// ATP Unión	Citoplasma /// Citosqueleto
Os.49215.1.S1_at	2,43	AK103265.1	Receptor fitosulfoquina, putativa	Proteína fosforilación de aminoácidos	Actividad proteína quinasa /// Actividad proteína tirosina quinasa /// ATP Unión	---
Os.15969.3.S1_x_at	2,42	AK072405.1	Proteína expresada	---	---	---

Descripción categorías dentro del término GO						
Código Affymetrix	x-veces*	Código Acceso Genbank	Descripción	Procesos biológicos	Función molecular	Componente celular
<i>Os.4765.1.S1_s_at</i>	2,42	AK104946.1	Factor de elongación 1B gamma	Traducción /// Elongación traduccional	Actividad factor translación elongación	Factor eucariotico de elongación de traducción 1
<i>OsAffx.26230.2.S1_x_at</i>	2,42	9630.m04064	Familia precursor de proteína de maduración	---	---	---
<i>Os.8481.1.S1_a_at</i>	2,41	AK066517.1	Proteína asociada al microtúbulo, putativa	---	---	---
<i>Os.11985.1.S1_a_at</i>	2,41	AK121290.1	Proteína CEO, putativa	---	Actividad transferasa NAD+ ADP-ribosil	---
<i>Os.11745.1.S1_x_at</i>	2,41	AK102677.1	Proteína expresada	---	---	---
<i>Os.20206.1.S1_at</i>	2,40	AK062480.1	Proteína expresada	---	---	---
<i>Os.8200.2.S1_x_at</i>	2,40	AK062754.1	Proteína con dominio catalítico de polimerasa	---	Actividad transferasa NAD+ ADP-ribosil	---
<i>Os.10604.1.S1_at</i>	2,40	AK105457.1	26S proteasome partícula reguladora subunidad 5 non-ATPasa	---	---	Complejo proteasoma
<i>Os.8178.1.S1_at</i>	2,40	AY050642.1	Proteína (PR4) Proteína de patogénesis PR4 de plántulas de 1	Procesos catabólicos de quitina /// Procesos catabólicos de macromoléculas de pared celular ///	Actividad chitinasa	---
<i>Os.37955.1.S1_a_at</i>	2,39	AK063604.1	Proteína expresada	---	---	---
<i>Os.26088.1.A1_x_at</i>	2,39	BI306108	Proteína expresada	---	---	---
<i>OsAffx.26078.1.S1_s_at</i>	2,39	9632.m01846	Factor de elongación Tu, putativo	---	---	---
<i>OsAffx.26573.1.S1_x_at</i>	2,38	9632.m05081	Proteína tipo aminotransferasa	---	Actividad catalítica /// Actividad transaminase /// Actividad transferasa /// Unión pyridoxal fosfato	---
<i>OsAffx.26914.1.S1_at</i>	2,37	9633.m01407	Familia glicosil hidrolasa 18	Procesos metabólicos de carbohidratos	Actividad catalítica /// Actividad hidrolasa, Compuestos de hidrólisis de O-glicosil ///	Unión a cationes
<i>Os.22661.2.S1_x_at</i>	2,36	AK068206.1	Proteína tipo NTMC2, putativa	---	---	---
<i>Os.8901.1.S1_at</i>	2,35	BU673546	Proteína tipo proteína con dominio C2	---	Actividad quinasa	---

Código Affymetrix	x-veces*	Código Acceso Genbank	Descripción	Procesos biológicos	Función molecular	Componente celular
Os.28089.1.S1_at	2,35	AK066606.1	Proteína tipo acilaminoacil-peptidasa, putativa	Proteólisis	Actividad tipo serina endopeptidasa/// Actividad tipo serina peptidasa	---
Os.34061.1.S1_a_at	2,34	AK072967.1	Proteína con dominio ACT, expresada	Procesos metabólicos	Unión a aminoácido	---
Os.9102.1.S1_x_at	2,33	AK066898.1	Proteína de familia factor de transporte nuclear 2 (NFT2)	---	---	Núcleo
Os.11271.1.S1_a_at	2,32	AK063436.1	Proteína expresada	---	---	---
Os.26698.4.S1_x_at	2,31	NM_189284.1	Proteína con dominio de proteína universal de estrés	Respuesta a estrés	---	---
Os.57464.1.S1_x_at	2,31	AU093199	Alcohol deshidrogenasa (S17 gen)	Procesos metabólicos /// Oxidación reducción	Actividad catalítica /// Actividad alcohol deshidrogenasa (NAD) /// Unión /// Unión a ion zinc /// Actividad oxidoreductasa /// Unión ion metal	Citoplasma /// Plástido
Os.55270.1.S1_s_at	2,30	AK107772.1	Secuencia transcrita	---	---	---
Os.11596.1.S1_at	2,30	AK072825.1	Coatomer subunidad beta-1, putativa	Transporte /// Proteína de transporte intracelular /// Proteína de transporte /// Transporte vesicular	Actividad molecula estructural /// Unión /// Proteína de unión	Citoplasma /// Aparto Golgi /// Membrana /// Vesícula citoplasmatica
Os.3408.1.A1_x_at	2,30	BU667041	Fructosa-1,6-bisfosfatasa, putativa	Procesos metabólicos de carbohidratos /// Procesos biosintéticos de carbohidratos	Unión a ion magnesio /// Actividad hidrolasa /// Actividad fructosa 1,6-bisfosfato 1-fosfatasa /// Actividad hidrolasa ácido fosfórico /// Unión ion metal	Citoplasma
Os.6645.1.S1_at	2,28	AU101638	Péptido tipo tionina, putativo	---	---	---
Os.20425.1.S1_at	2,27	AK103919.1	UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, putativa	Procesos metabólicos /// Oxidación reducción	Actividad catalítica /// Unión /// Actividad oxidoreductasa /// Actividad oxidoreductasa, acuta sobre grupos CH-OH donores y NAD o NADP como aceptores /// NAD or NADH Unión	---
Os.56032.1.S1_x_at	2,26	AK109151.1	26S proteasa reguladora subunidad 7, putativa	Proteína procesos catabólicos	Unión a nucleótidos/// ATP Unión /// Actividad hidrolasa /// Actividad nucleosido trifosfatasa	Complejo proteasoma /// Núcleo
Os.53062.1.S2_at	2,25	CB646278	MYB familia factor de transcription, putativa	---	---	---
Os.12342.1.S1_at	2,25	AK072775.1	Proteína expresada	---	---	---

Descripción categorías dentro del término GO						
Código <i>Affymetrix</i>	x-veces*	Código Acceso Genbank	Descripción	Procesos biológicos	Función molecular	Componente celular
<i>Os.14411.1.S1_at</i>	2,24	CB655696	Carboxil-terminal peptidasa, putativa	---	---	---
<i>Os.8018.1.S1_x_at</i>	2,22	AF221552.1	Proteína RIP-15 rica en prolina	Regulation de transcripción, ADN-dependiente	DNA Unión	Cromatina /// Núcleo /// Vesícula unida a membrana citoplasmática
<i>Os.8100.1.S1_at</i>	2,21	AK062812.1	Proteína serina/threonina quinasa WNK9, putativa	Proteína fosforilación de aminoácidos	Unión a nucleótidos/// Actividad proteína quinasa /// Actividad proteína quinasa serine/threonine /// ATP Unión /// Actividad quinasa /// Actividad transferasa	---
<i>Os.51408.1.S1_at</i>	2,21	AK062728.1	Gen miembro de la familia de respuesta a auxina SAUR	---	---	---
<i>Os.12979.3.S1_x_at</i>	2,20	NM_190466.1	Proteína con motivo dominio de unión calmodulina IQ	---	---	---
<i>Os.14124.1.S1_at</i>	2,20	AK073951.1	Proteína similar a metionil-tRNA sintetasa	---	Unión a ARNt /// Actividad aminoacil-tRNA ligasa	---
<i>Os.8945.1.S1_at</i>	2,19	AK072246.1	Proteína con dominio F-box y repetición <i>kelch</i>	---	---	---
<i>Os.49147.1.S1_x_at</i>	2,19	CB669414	Proteína chaperonina 60 subunidad-alfa, putativa	Procesos metabólicos celulares	Unión a nucleótidos/// Proteína de unión /// ATP Unión	Citoplasma
<i>OsAffx.28989.1.S1_s_at</i>	2,18	9636.m00152	Similar a proteína tipo SAUR auxina inducible	---	---	---
<i>OsAffx.9099.1.S1_x_at</i>	2,18	NM_192943.1	Aspartic proteasa, putativa	---	---	---
<i>Os.2938.1.S1_x_at</i>	2,18	AK068088.1	Proteína polen alergen, putativa	---	---	Región extracelular
<i>OsAffx.5065.1.S1_x_at</i>	2,17	9634.m03825	Secuencia transcrita	---	---	---
<i>Os.3393.1.S1_at</i>	2,17	AK069613.1	Proteína quinasa SNF1	Proteína fosforilación de aminoácidos	Unión a nucleótidos/// Actividad proteína quinasa /// Actividad proteína quinasa serine/threonine /// ATP Unión /// Actividad quinasa	---
<i>OsAffx.15533.1.S1_at</i>	2,17	9634.m02066	Proteína precursora rica en glicinas estructural de pared celular, putativa	---	---	---
<i>Os.4169.1.S1_at</i>	2,16	D01000.1	Superóxido dismutasa zinc cobre	Procesos metabólicos de superóxido/// Oxidación reducción	Actividad superóxido dismutasa /// Unión a ion cobre /// Unión a ion zinc /// Actividad antioxidante/// Actividad oxidoreductasa /// Unión ion metal	Citoplasma

Descripción categorías dentro del término GO						
Código Affymetrix	x-veces*	Código Acceso Genbank	Descripción	Procesos biológicos	Función molecular	Componente celular
Os.6321.1.S1_at	2,15	AK099776.1	Proteína tipo resistencia a nemátodos, putativa	---	---	---
OsAffx.3640.1.S1_at	2,15	9631.m05800	Proteína inhibidora de proteasas, putativa	Transporte /// Transporte de lípidos	peptidase actividad /// lipid Unión	---
Os.3887.1.S1_at	2,15	CB096255	Proteína transportadora, putativa	---	---	---
Os.9.1.S1_s_at	2,15	D14673.1	Aspartato aminotransferasa	Procesos metabólicos delulares de aminoácidos /// Procesos biosintéticos	Actividad catalítica /// Actividad L-aspartato:2-oxoglutarato amino transferasa /// Actividad transaminasa/// Actividad transferasa /// Actividad transferasa, transferencia de grupos nitrogenados /// pyridoxal	Citoplasma
Os.12650.2.S1_a_at	2,15	AK101989.1	Proteína serina/threonina quinase Mak, putativa	Proteína fosforilación de aminoácidos	Unión a nucleótidos/// Actividad proteína quinasa /// Actividad proteína quinasa serine/threonine /// Actividad cyclin-dependiente proteína quinasa /// Unión a ATP /// Actividad ARN polimerasa II carboxi-terminal dominio quinasa /// Actividad quinasa	---
Os.4671.1.S1_a_at	2,14	AF435970.1	Proteína tipo lectina	---	---	---
Os.56554.1.S1_at	2,14	AK110145.1	Proteína retrotransposón, putativa	---	---	---
Os.4418.1.S1_at	2,13	AK071143.1	ATP sintasa, putativa	Procesos biosintéticos de ATP/// Transporte /// Transporte de iones /// Síntesis de ATP acoplada a transporte de protones /// Transporte de protones /// Procesos metabólicos de ATP	Unión a nucleótidos/// ATP Unión /// ATP Unión /// Actividad ATPase exporte de hidrógeno, fosforilativo mecanismo /// Actividad hidrolasa /// Actividad hidrolasa, actuando sobre ácido anhidrido, catalizando movimientos de sustancias transmembranales	Mitocondrio /// Membrana mitocondrial interior /// Membrana /// Complejo ATPasa transportador de protones, dominio catalítico
Os.37955.1.S1_at	2,13	AK063604.1	Proteína expresada	---	---	---
Os.33674.1.S1_at	2,12	AK061848.1	Nucleasa PA3, putativa	Procesos catabólicos de ADN	Unión ácidos nucleicos /// Actividad endonucleasa /// Actividad hidrolasa, actuando sobre uniones ester	---
Os.46241.2.S1_s_at	2,12	AK103763.1	Proteína tipo ADNJ	Proteína de ensamblamiento /// Respuesta a estrés	Unión a ion zinc /// Proteína de unión <i>heat shock</i> /// Unión ion metal	---
OsAffx.15562.1.S1_s_at	2,11	9634.m02249	Gen miembro de la familia de respuesta a auxina Aux/IAA	Transcripción /// Respuesta a estímulos de auxina///Activación de señal por auxina /// Regulación de transcripción	Actividad de proteína dimerización	Núcleo

Descripción categorías dentro del término GO						
Código Affymetrix	x-veces*	Código Acceso Genbank	Descripción	Procesos biológicos	Función molecular	Componente celular
Os.12096.4.S1_s_at	2,11	AY324879.1	Ferritina	Transporte de ión hierro/// Homeostasis de ión hierro celular /// Oxidación reducción	Unión /// Unión a ion hierro /// Unión hierro férrico /// Actividad oxidoreductasa /// Unión ion metal /// Unión ion metal de transición	---
Os.26059.1.S1_x_at	2,10	AK107871.1	Secuencia transcrita	---	---	---
Os.24912.1.S1_a_at	2,10	AK070031.1	Proteína activadora GTPasa, putativa	Regulación de actividad ARF GTPase	Actividad activador ARF GTPasa/// Unión a ion zinc	---
Os.11160.1.S1_at	2,10	AK063666.1	Proteína transportadora mitocondrial, putativa	Transporte /// Transporte de transmembrane	Unión	Membrana mitocondrial interior /// Membrana /// Membrana integral
Os.11985.1.S1_at	2,10	AK121290.1	Proteína CEO, putativa	---	Actividad transferasa NAD+ ADP-ribosil	---
Os.28435.5.S1_x_at	2,09	AK099678.1	Enzima formadora de etileno, putativa	Oxidación reducción	Unión a ion hierro /// Actividad oxidoreductasa /// Actividad oxidoreductasa, acutando sobre donores con oxigenos molecular, incorporación de dos átomos de oxígeno	---
Os.28066.1.S1_s_at	2,09	AK072570.1	Proteína con dominio HECT	Proteína modificación procesos ///Proteína de procesos catabólicos	Actividad ligasa	Intracelular
Os.57482.1.S1_x_at	2,08	D21296.1	Piruvato deshidrogenasa subunidad-beta	Procesos metabólicos	Actividad catalítica	---
Os.8188.1.S1_s_at	2,08	AF491815.1	Proteína USP1 universal de estrés, putativa	Respuesta a estrés	---	---
Os.50785.1.S1_at	2,07	AK058556.1	Gen miembro de la familia de respuesta a auxina SAUR	---	---	---
OsAffx.19878.1.S1_at	2,07	9640.m02781	Inhibidor de proteasa/acumulación en semilla/Proteína precursora familia	---	---	---
Os.2938.1.S1_at	2,06	AK068088.1	Proteína polen alergen, putativa	---	---	Región extracelular
Os.9421.1.S1_at	2,06	NM_195297.1	Proteína de patogénesis tipo 1	---	---	Región extracelular
Os.8439.1.S1_a_at	2,05	AK058266.1	Proteína expresada	---	---	---
Os.20333.1.S1_at	2,05	AK063712.1	Proteína expresada	---	---	---
OsAffx.27459.2.S1_s_at	2,05	9634.m00419	Early nodulin 93	---	---	---
Os.7896.2.S1_at	2,05	CB630483	Proteína expresada	---	---	---
Os.11615.1.S1_at	2,04	CB628589	Proteína de unión a ARN Rp120	Interferencia de ARN	Unión ácidos nucleicos /// Proteína de unión /// Actividad hidrolasa, sobre grupos	Complejo de ARN de silenciamiento

Descripción categorías dentro del término GO						
Código Affymetrix	x-veces*	Código Acceso Genbank	Descripción	Procesos biológicos	Función molecular	Componente celular
<i>Os.17215.1.S1_at</i>	2,04	AK065684.1	Proteína de unión calmodulina, putativa	---	---	---
<i>Os.12880.1.S1_s_at</i>	2,04	AU198165	Proteína expresada	---	---	Mitocondrio
<i>Os.3350.1.S1_a_at</i>	2,04	AK102488.1	Alanina aminotransferasa, putativa	Procesos biosintéticos	Actividad catalítica /// Actividad transaminase /// Actividad transferasa /// Actividad transferasa, transferencia de grupos nitrogenados /// Actividad 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa /// Unión fosfato piridoxal	---
<i>Os.4518.2.S1_x_at</i>	2,03	NM_185431.1	Proteína de unión acil-CoA, putativa	---	Unión acil-CoA/// Unión	---
<i>Os.8773.2.S1_a_at</i>	2,03	AK060406.1	Chaperonina	Proteína de ensamblamiento	ATP Unión	Citoplasma
<i>AFFX-Os_Gapdh_M_at</i>	2,03	AFFX-Os_Gapdh_M	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	---	---	---
<i>Os.23290.2.S1_x_at</i>	2,02	NM_197724.1	Enzima formadora de etileno, putativa	---	Actividad oxidoreductasa	---
<i>OsAffx.31409.1.S1_s_at</i>	2,02	9639.m03722	Secuencia transcrita	---	---	---
<i>Os.19722.1.S1_s_at</i>	2,02	AK073735.1	Fosfatidilinositol 4-quinasa	Fosforilación de fosfoinositol /// Señal mediado por fosfoinositol	Actividad inositol o fosfatidilinositol quinasa /// Actividad 1-fosfatidilinositol 4-quinasa /// Actividad quinasa /// Actividad transferasa /// Actividad fosfotransferasa, grupo alcohol como aceptor	---
<i>Os.8545.1.S1_s_at</i>	2,02	AK062385.1	Proteína expresada	---	---	---
<i>Os.57479.1.S1_x_at</i>	2,01	D21312.1	Ubiquitina	---	---	---
<i>Os.12163.1.S1_at</i>	2,01	U76031.1	Hemoglobina 2	transporte de oxígeno	Unión a ion hierro /// Unión a oxígeno/// Unión a grupo heme /// Unión ion metal	---
<i>Os.9756.2.S1_at</i>	0,50	AK099305.1	Secuencia transcrita	Procesos metabólicos	Actividad catalítica	Mitocondrio /// Plástido
<i>Os.6315.1.S1_at</i>	0,50	AK101374.1	Secuencia transcrita	---	---	---
<i>Os.52444.1.S1_at</i>	0,50	AK067180.1	Receptor de gibberelina, putativa	Procesos metabólicos	Actividad hidrolasa	---

Descripción categorías dentro del término GO						
Código Affymetrix	x-veces*	Código Acceso Genbank	Descripción	Procesos biológicos	Función molecular	Componente celular
Os.37083.1.S1_at	0,50	AK060991.1	Secuencia transcrita	---	---	---
Os.17536.1.S1_at	0,49	AK063180.1	Proteína expresada	---	---	---
Os.57327.1.S1_at	0,48	AK111310.1	Secuencia transcrita	---	---	---
Os.27659.1.S1_x_at	0,48	AK069734.1	Proteína de membrana TMS, putativa	---	---	Membrana
Os.55488.1.S1_at	0,48	AK108186.1	Proteína-tipo de respuesta a resistencias patológicas	---	---	---
Os.53784.1.S1_at	0,47	AK105694.1	Citocrom P450, putativa	---	Actividad monooxygenasa /// Unión a ion hierro /// Actividad protadora de electrones /// Actividad liasa /// Unión a grupo heme /// Unión ion metal	---
Os.56019.1.S1_at	0,46	AK109132.1	Proteína expresada	---	---	---
Os.27218.1.A1_at	0,44	CB649864	Proteína expresada	---	---	---
Os.7929.5.S1_at	0,44	AK102313.1	Proteína expresada	---	---	---
OsAffx.28001.1.S1_s_at	0,44	9634.m03728	Oxidoreductasa, familia cadena corta deshidrogenasareductasa	Procesos metabólicos /// Oxidación reducción	Actividad catalítica /// Unión /// Actividad oxidoreductasa	---
Os.50959.1.S1_at	0,43	AK059728.1	Secuencia transcrita	---	---	---
OsAffx.32332.1.A1_at	0,43	X15901.1	Proteína ribosomal S11	---	---	---
Os.25556.1.S1_at	0,43	AK120474.1	Proteína expresada	---	---	---
Os.26455.1.S1_at	0,42	AK066307.1	ARN polimerasa subunidad alfa	Transcription /// Transcription, dependiente de ADN /// traducción /// Iniciación de traducción	DNA Unión /// Unión a ARN /// Constituyente estructural de ribosoma /// Actividad factor iniciación de traducción /// Actividad ARN polimerasa/// Unión a ARNr ///Actividad proteína de dimerización	Intracelular /// Ribosoma /// Cloroplasto/// Plástido /// Subunidad ribosomal /// Proteína complejo ribonúcleo
Os.46541.1.S1_at	0,42	AK066318.1	Proteína tipo acilaminoacil-peptidasa, putativa	---	---	---

Código Affymetrix	x-veces*	Código Acceso Genbank	Descripción	Procesos biológicos	Función molecular	Componente celular
Os.32459.1.S1_at	0,42	AK070467.1	Inhibidor de tripsina <i>Bowman Birk</i> , putativo	---	Actividad inhibidor tipo serina endopeptidasa /// Actividad inhibidor peptidasa	Región extracelular
Os.7218.1.S2_at	0,41	AK072105.1	Proteína con dominio eritronato-4-fosfato deshidrogenasa	Procesos metabólicos	Actividad catalítica /// Unión /// Actividad oxidoreductasa, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor /// cofactor Unión /// NAD or NADH Unión	---
Os.7861.1.S1_at	0,40	AK120231.1	Proteína expresada	---	---	---
Os.52298.1.S1_at	0,40	AK066196.1	Proteína expresada	---	---	---
OsAffx.32235.1.S1_x_at	0,40	X15901.1	NADH deshidrogenasa ND4	---	---	---
OsAffx.32199.1.A1_x_at	0,38	X15901.1	Cloroplasto	---	---	---
OsAffx.32341.1.S1_at	0,35	BA000029.2	Mitocondrio	---	---	---
Os.51464.1.A1_at	0,34	AK062864.1	Secuencia transcrita	Síntesis de ATP acoplada a transporte de electrones /// Oxidación reducción	Actividad NADH deshidrogenasa (ubiquinone) /// Actividad oxidoreductasa	---
Os.5725.1.S1_at	0,33	BI810367	Fructosa-bisfosfato aldolasa, putativa	Glicólisis /// Procesos metabólicos	Actividad catalítica /// Actividad fructosa-bisfosfato aldolasa /// Actividad liasa	Plástido
OsAffx.32231.1.A1_at	0,32	X15901.1	ATPasa subunidad beta, cloroplasto	---	---	---
Os.52820.1.S1_at	0,32	AK069444.1	Proteína homóloga complejo <i>white-brown</i> , putativa	---	Unión a nucleótidos /// ATP Unión /// Actividad ATPasa /// Actividad nucleosido-trifosfatasa	Membrana
Os.31094.1.S1_at	0,30	AK107848.1	Proteína transportadora de cobre, putativa	Transporte de ión cobre	Actividad transportadora transmembranal de ion cobre	Membrana integral
OsAffx.32347.1.S1_x_at	0,29	X15901.1	Proteína de cloroplasto PSII I	---	---	---
Os.14921.1.S1_at	0,29	AK069119.1	App1, putativa	---	---	Vesícula unida a membrana citoplasmática
OsAffx.32309.1.S1_at	0,28	X15901.1	Complejo citocromo b f subunidad 5	---	---	---
Os.46483.1.S1_at	0,23	AK072201.1	Secuencia transcrita	transporte	Actividad transportadora	Membrana

ANEXO 2. Oligonucleótidos aplicados para los análisis de RT-qPCR en S-afp y Senia

Código Affymetrix	Código Acceso Genbank	Concentración óptima [nM]	Cebador sentido (5'-3')	Cebador antiosentido (5'-3')
<i>RPTR-Os-K01193-1_at</i>	RPTR-Os-K01193-1	300	TTCGGCTCCAACAATGTCCTG	GCGTCTGCTGCTCATACAAG
<i>OsAffx.19456.1.A1_at</i>	9640.m00123	300	GCAGGCACGAGTCCACAAG	CGGCAGAGAGGGCAGGTG
<i>Os.6776.1.S1_at</i>	AK067173.1	300	AAGTGGCTCACGCAACCTATG	GCGTTGTTTGGTGGAGTAGG
<i>Os.50256.1.S1_at</i>	AK120357.1	300	ATTGGTGTGTGACTTGTGAGC	AATCAGGGCAGCCATCAGTTG
<i>Os.7907.1.S1_a_at</i>	AK120896.1	300	CTGCTGTGCGGAATGGTTCTC	GAATCAAATGCTGGTGGATGGC
<i>OsAffx.18617.1.S1_at</i>	9639.m00033	300	AGTCATTATGATCGCCCTCG	CTCCAAGCCCACTCTCTTG
<i>Os.15894.1.A1_a_at</i>	BU673129	300	CCTCCATCCTCCTCACCAAGAC	TGGGTATCGCTGTGCTC
<i>OsAffx.22999.1.S1_at</i>	AK108619.1	300	GTGCAATCGTGTGGTTTGTG	AATGCCCAAAGTACTCCG
<i>Os.10183.1.S1_at</i>	AK067850.1	300	TCTACCTCTGAGCCGATAGTG	AGCCACAATCCATAAGCATCCC
<i>Os.57456.1.S1_x_at</i>	D10956.1	300	CATCAGTGTGCCACCAAGAAG	CCACACCGATGATGTTGAAGGG
<i>Os.37717.1.A1_s_at</i>	BU673746	300	GTAGTGTATAGTAGTCAAGATCAATGGC	GGCGAGGCTGGACGAGAG
<i>Os.6152.1.S1_at</i>	AK066089.1	300	CGCCGGTTTCTACTACTGTTC	GCTTGTGTTTGAGGTATCCATT
<i>Os.40352.1.S1_at</i>	CF336665	300	TGCTGCTTCTAGGTGTGGATCAGC	CCGCGCTCGCCATAGCCATA
<i>Os.52377.1.S1_s_at</i>	AK066722.1	300	TTACCGTCTGGTATTATCTTGA	CAGCTGCAATGTGCTCGAA
<i>Os.14532.1.S1_at</i>	AK107809.1	100	GCTTCCAAGGCGCGACGAG	GCAGCCACGGCCACCCCTTT
<i>Os.11821.1.S1_at</i>	AK071775.1	300	CCACGTGGTGTTCAGTCCCTGC	CTGGCCAGCTGGTGAATGT
<i>Os.52425.1.S1_x_at</i>	AK067023.1	300	TGTCTGCAGGCAGGAAATGAGG	ACCACTAAGTGTGGGAGCAACCA
<i>Os.28397.1.S1_at</i>	BI807677	100	TGGAGTGCAGAACCGGCTTG	GCCGCCTTCCCCAGTTGAG
<i>Os.6645.1.S1_s_at</i>	AU101638	300	GCTGTGTGGCTCCGACTC	ACTGGTAGCAATGCAAGCATGTTGT
<i>Os.5504.1.S1_at</i>	AK059244.1	300	ACCACCGCAACAGCATTGGCA	TCCCTCCCAACAGGGACCG
<i>Os.15701.1.S1_x_at</i>	AK100652.1	300	CGGTTGTGGGCAGCCAGTCT	TGCACGACCTTAAACCGTGAA
<i>Os.51601.1.S1_at</i>	AK063147.1	300	TGGGCTCTCCCGACTGCAC	TCCAGGCCAGACTGACCCCTC
<i>Os.53343.1.S1_x_at</i>	AK072144.1	50	TGGGACACCCCAATCCTGC	TGTGCTGCAGTGTGGCGAAGAA
<i>Os.5031.1.S1_at</i>	AB127580.1	100	CTACCTCGTCCGCTCACCTAC	GGAAGCAGCAATACGGAGATGG
<i>Os.22995.1.S1_at</i>	CB096301	100	ACTGCTTTTAGCCTCCCGCTGC	GAGTCCACAAGTGCGCCCGA
<i>Os.46048.1.S1_x_at</i>	CB642477	50	TGCTGTGCCAGTCTGTGCGA	ACGACAGGAGGCTTCAGACG
<i>Os.53055.1.S1_at</i>	AK070622.1	100	GGCAATCTCCATTTGCGCATGG	GCAAGCACTTGCAGGATTTGGGG
<i>Os.26698.4.S1_s_at</i>	NM_189284.1	300	GTGGACGAGAGCGAGGAGAG	GAGGTATCATGTACCCTGAGC
<i>Os.28011.1.S1_at</i>	AY256682.1	50	TCCAGGCGGAGAAAGGTGGG	CCCATCCGTCCTGTTGATGTC
<i>Os.26511.1.S1_at</i>	AK073181.1	300	TTTGCCCGCAGGTTTCGTGT	AGCCCATGGGGCAAAGGAACA
<i>Os.53062.1.S1_at</i>	AK070653.1	300	TCTCCCAGAAAGGCATGGGCT	ACTCCTGATCTGAGAGATGCCGT
<i>Os.8032.1.S1_at</i>	AK107749.1	300	GCTTCGCCGATCTCACCAAC	CGCCCTTCTCCCTCAGTC
<i>Os.49627.1.S1_at</i>	AK105605.1	100	AACACGGCGGTGCTTCCC	TGCGAGTGGCCAATCACAATGTT
<i>Os.48734.1.S1_s_at</i>	CR288034	300	CCCCCAAACCAACGCGGGAAA	CCGCGGAGTCTTGTGCCGA
<i>Os.22577.2.S1_x_at</i>	BU673049	100	TCCGTCGGCTGCTCTGGTC	GAGACCTGCACGACGGGGTC
<i>Os.57475.1.S1_x_at</i>	D21280.1	100	AGGTCAAGGTCAAGGACTCCAAG	GCAGCCGAACACCGCAAC
<i>Os.609.3.S1_a_at</i>	AK066830.1	100	TGTGTGAGAGAGATGAGTGGTTTG	CACGATGGAACGGAACAACAAC
<i>Os.6542.1.S1_at</i>	CB678453	100	CCGGAGAGAACACGTCGCTGG	ACGTGGAATCTGGGCGCCTT
<i>Os.8999.3.S1_x_at</i>	AK062270.1	300	TCACCAACCCCTGTCCTC	GTGCCGGCAACCTCAACGGT
<i>Os.6315.1.S1_at</i>	AK101374.1	300	ACTGCGGGTCTGATGGAGA	CCGGCAGTTACAGCAGGACA
<i>Os.52298.1.S1_at</i>	AK066196.1	300	CGCATTGGCGCAACACCAAG	ACCGAACAAGACATGGCCGGG
<i>Os.5725.1.S1_at</i>	BI810367	300	TGCTTGGCTCTCCATCTGT	AGCAACCATGCAATCCGTAGATCA
<i>Os.14921.1.S1_at</i>	AK069119.1	300	GGCGAGTGGCGACAAATGCG	GCATGCTGTAATTTGCCAACAA
<i>afp</i>		300	CATCTGCAAAGTGTACGTC	GCCCTTGTAGCTGTGCAACT
<i>18S ribosomal</i>		50	ACGGGTGACGGAGAATTAGGG	CGTGTGAGATTGGTAATTTGC
<i>β-actina</i>		100	CCTCTCCAGCCTTCTTCATA	GCAATGCCAGGGAACATAGTG
<i>ef-1α</i>		300	TTTCACTTGGTGTGAAGCAGAT	GACTTCTTCACGATTTTCATGTA

ANEXO 3. Oligonucleótidos aplicados para los análisis de RT-qPCR en S-derbp100 y Senia

Código Affymetrix	Código Acceso Genbank	Concentración óptima [nM]	Cebador sentido (5'-3')	Cebador antiosentido (5'-3')
<i>OsAffx.22999.1.S1_at</i>	AK108619.1	300	GTGCAATCGTGTGGTTTGTC	AATGCCAAACTGTACTCCG
<i>Os.40352.1.S1_at</i>	CF336665	300	TGCTGCTTCTAGGTGGATCAGC	CCGCCGTCGCATAGCCATA
<i>Os.6776.1.S1_at</i>	AK067173.1	300	AAGTGGCTCAGCAACCTATG	GCGTTGTTGGTGGGAGTAGG
<i>Os.5725.1.S1_at</i>	BI810367	300	TGCTGGCTCCTCCATCTGT	AGCAACCATGCAAATCCGTAGATCA
<i>Os.28011.1.S1_at</i>	AY256682.1	50	TCCCAGGCGGAGAAGGTGGG	CCCATCCGCTCGGTGGATTGC
<i>Os.6645.1.S1_s_at</i>	AU101638	300	GCTGCTGGTGGCTCCGACTC	ACTGGTAGCAATGCAAGCATGTTGTT
<i>Os.6152.1.S1_at</i>	AK066089.1	300	CGCCGGTTTCTACCTACTGTTC	GCTTGTGTTGCAGGTATCCATT
<i>Os.10660.1.S1_at</i>	NM_186420.1	300	ACTACCTGTTCTCCTGAATCTTGC	ATTGCTCAACCCGAATGATAGACC
<i>OsAffx.20082.1.S1_at</i>	9640.m04095	300	GCAGGTCGCCATTGATAAGT	TCTGCAGCCATCATTCAAGTC
<i>OsAffx.28903.2.S1_at</i>	9636.m04166	300	CAGCAAGGAAAAACAACCGT	TCTCCATTGGTGGAGGTTTC
<i>Os.264.1.S1_at</i>	AK073360.1	100	GGGCTTCGCTGCTTCTGCTTGA	TGCGTACAAAAGCCAAGGCCTGA
<i>Os.9301.1.S1_x_at</i>	AK103189.1	100	TCCCTACCATGTACCTTCTCCTTC	ATTTGAGAAACCCGAGGGCGGC
<i>Os.20289.1.S1_at</i>	AY435041.1	100	GGCAAATGTCTCTCGGTGACGAACA	GCCGCAGTCGACGAACTGGTAG
<i>Os.10310.1.S1_at</i>	AK064825.1	100	TGTTGGCAGGAGTGCAGCCAC	ATGATCGCTTCAAGTTGCAGGCCA
<i>Os.2957.1.S1_at</i>	AK120411.1	100	TACCTGGTGAAGTACGTGCTCAACG	TCAACACGTACGCTTGCAGCT
<i>Os.27793.1.S1_x_at</i>	AK108037.1	300	GGTGATTCGCAGCTTTGATGTTGG	TGACCTTGCTTGGTTGATCCATCAC
<i>Os.39636.1.A1_x_at</i>	AU166388	100	GGTCAAGGTGCTGAACTGCTGA	TCGACGAGGACATAAGCTAACGACA
<i>Os.16198.1.S1_at</i>	AK110892.1	100	AGCAAAAGTAGGCGGGAGCTC	ACTAACTCCATCTTGTCTGTCTGCT
<i>Os.5045.1.S1_at</i>	AK102138.1	100	TGTGTAACATTCGTGGTCAAGT	ACCGAAACATCCCTCACGATCCA
<i>Os.11851.1.S1_at</i>	AK069202.1	100	CCTGACACGAGTTGGCGCTC	ACGTACCCTCACGGTCACCG