

Estratègies de co-transformació
per eliminar els gens de selecció
i
avaluació del flux de gens en
plantes transgèniques d'arròs

Gisela Peñas Civit



Bellaterra 2005

**Estratègies de co-transformació per eliminar els gens de selecció
i
avaluació del flux de gens en plantes transgèniques d'arròs**

Gisela Peñas Civit

Bellaterra 2005

Universitat Autònoma de Barcelona

**Estratègies de co-transformació per eliminar els gens de selecció
i
avaluació del flux de gens en plantes transgèniques d'arròs**

Memòria presentada per:
Gisela Peñas Civit

Per optar al títol de Doctora en Biologia

Tesi doctoral realitzada sota la co-direcció de la Dra. Joaquina Messeguer Peypoch i la
Dra. Blanca San Segundo de los Mozos al centre IRTA de Cabrils

Dra. Joaquina Messeguer
Directora de la tesis doctoral

Dra. Blanca San Segundo de los Mozos
Directora de la tesis doctoral

Gisela Peñas Civit

Dr. Joan Barceló i Coll
Tutor, Dept. Fisiologia vegetal UAB

AGRAÏMENTS

En primer lloc voldria agrair als jefes, Quima, Enric i Blanca, la gran confiança que incondicionalment han dipositat en mi durant aquests quatre anys. Gràcies per haver fet possible aquest projecte, i per haver-ho fet amb tanta estima, saviesa, humanitat, il·lusió, i que més us diria jo, si ja ho sabeu ...

Agrair també a tots els companys de l'IRTA de Cabrils el plaer de treballar amb tan bona gent. Pels somriures motivadors i els milions de flors. En especial als companys de genètica vegetal, la gent de marcadors i els combatents de cada dia, els del laboratori d'*in vitro*, pel suport constant i la quantitat de consells.

A tots els que es poden creuar per la quarta planta del CSIC de Barcelona amb especial atenció als components del laboratori Rosa, per haver-me guiat en l'aspecte més original d'aquest treball, per l'abstractisme molecular. I a la gent de lo Delta, responsables dels aspectes agronòmics dels assaigs de camp, sentit final del present projecte de recerca.

A la gent de casa, per haver tingut la sort més gran del món, pels principis ètics de la vida, per la confiança i la llibertat. I al meu país, tant petit, i tant estimat, del Delta a l'Empordà, de Sant Pau a Puigcerdà!

Gràcies a tots!

INTRODUCCIÓ	1
1. L'ARRÒS	1
1.1 Descripció botànica	1
1.2 Importància del cultiu d'arròs.....	3
1.3 L'arròs a nivell europeu.....	4
1.4 La ciència i l'arròs	5
2. TRANSFORMACIÓ GENÈTICA	6
2.1 Mètodes de transformació genètica de plantes.....	6
2.1.1 Transformació genètica per <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	6
2.1.2 Transformació genètica per biolística.....	11
2.2 Regeneració de plantes transgèniques	13
2.3 Transformació genètica de l'arròs	15
2.4 Percepció de la transgènia	16
2.4.1 Aportacions de la transgènia.....	16
2.4.2. Limitacions de la transgènia.....	18
3. ELS GENS DE SELECCIÓ	21
3.1 Problemàtica dels gens de selecció.....	21
3.2 Estratègies per eliminar els gens de selecció basats en resistència a antibiòtic.....	22
3.2.1 Prescindir dels gens de selecció	22
3.2.2 Eliminació dels gens de selecció per co-transformació.....	23
3.2.3 Escissió dels gens de selecció.....	26
3.2.4 Ús de gens de selecció alternatius a les resistències a antibiòtics	29
3.2.5 Altres solucions. Els cloroplasts.....	30
4. EL FLUX DE GENS	33
4.1 Flux de gens en arròs	33
4.2 L'arròs salvatge	35
OBJECTIUS	41
MATERIAL I MÈTODES	45
A. MATERIALS	45
1. MATERIAL BIOLÒGIC	45
1.1 Material vegetal	45
1.2 Bacteris	46
2. DNAS I PLÀSMIDS	46
2.1 Plàsmids i construccions.....	46
2.2. Oligonucleòtids.....	52
3. MEDIS DE CULTIU I SOLUCIONS GENERALS	53
3.1 Bacterians	53
3.2 En l'obtenció de plantes transgèniques d'arròs	54
B. MÈTODES.....	55
1. RELACIONATS AMB ELS ÀCIDS NUCLÈICS.....	55
1.1 Extracció de DNA genòmic.....	55
1.2 Obtenció de DNA plasmídic	59
1.3 Subclonatge de fragments de DNA en plasmidis	61
1.4 Digestions enzimàtiques del DNA genòmic.....	62
1.5 Transformació de bacteries.....	62
1.6 Avaluació molecular per PCR.....	63
1.7 Transferència i hibridació d'àcids nuclèics, "Southern blot"	65
1.8 Marcatge radioactiu del DNA.....	66
2. RELACIONATS AMB PROTEÏNES.....	68

2.1 Extracció de proteïnes totals de fulla d'arròs	68
2.2 Electroforesi desnaturalitzant de proteïnes.....	68
2.3 Immunotransferència	70
3. TRANSFORMACIÓ D'ARRÒS	72
3.1 Obtenció del call embriògenic.....	72
3.2 Transformació genètica de l'arròs	73
3.2.1 Transformació per <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	73
3.2.2 Transformació per bombardeig de micropartícules.....	77
3.3 Selecció de les cèl·lules transformades.....	79
3.4 Pre-regeneració i regeneració de plantes transformades genèticament.....	80
3.5 Aclimatació de les plantes regenerades.....	81
4. AVALUACIONS DE LES PLANTES TRANSFORMADES GENÈTICAMENT	82
4.1 Anàlisi histoquímic de l'expressió del gen <i>uidA</i> (enzim GUS).....	82
4.2 Anàlisi de l'expressió del gen <i>gfp</i> per microscopia de fluorescència.....	83
4.3 Avaluació de la resistència a herbicida de les plantes transgèniques	84
5. AVALUACIÓ DEL FLUX GENÈTIC D'ARRÒS EN CAMP.....	85
5.1 Disseny experimental	85
5.2 Mesures del vent.....	86
5.3 Anàlisi de la descendència.....	87
5.4 Estudis de segregació	87
5.5 Anàlisi estadístic.....	88
RESULTATS	91
1. ESTRATÈGIES DE CO-TRANSFORMACIÓ PER <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	92
1.1 Transformació amb dos vectors T-DNA introduïts individualment en <i>Agrobacterium</i>	92
1.1.1 Inoculació simultània amb els dos cultius d' <i>Agrobacterium</i>	92
1.1.2 Inoculació dels dos cultius bacterians amb decalatge de temps	104
1.2 Transformació amb dos vectors introduïts conjuntament a <i>Agrobacterium</i>	104
1.3 Inoculació amb una soca bacteriana portadora d'un vector amb dos T-DNA	106
1.3.1 Assaig de transformació	106
1.3.2 Estudis de segregació.....	114
2. ESTRATÈGIES DE CO-TRANSFORMACIÓ PER BIOLÍSTICA.....	142
2.1 Obtenció dels DNAs a utilitzar en la transformació per biolística	142
2.2 Assaigs de co-transformació per biolística.....	145
3. OBTENCIÓ D'ARRÒS MODIFICAT GENÈTICAMENT AMB UN GEN D'INTERÈS I SENSE GEN DE SELECCIÓ	147
4. AVALUACIÓ DEL FLUX GENÈTIC EN ARRÒS	153
4.1 Dades agronòmiques	153
4.2 Anàlisi de les descendències	154
DISCUSSIÓ	161
1. SOBRE L'ELIMINACIÓ DE GENS DE SELECCIÓ	161
2. SOBRE L'AVALUACIÓ DEL FLUX DE GENS.....	183
CONCLUSIONS	189
BIBLIOGRAFIA	193

ABREVIATURES

ABA	àcid abscísic
Ac	anticòs
Amp	ampicilina
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CF	cefotaxima
DNA	àcid desoxiribonuclèic
EEE	Estació Experimental del Delta de l'Ebre (IRTA)
et al.	et alter, i col·laboradors
FAO	Food and Agriculture Organisation RNA àcid ribonuclèic
GFP	Green Fluorescent Protein
GUS	β -glucuronidasa
H	higromicina
IRRI	International Rice Research Institute
Kan	kanamicina
Kb	kilobases
LB	Left border, extrem esquerre del T-DNA
pb	parell de bases
RB	Right border, extrem dret del T-DNA
Rif	rifampicina

INTRODUCCIÓ

1. L'ARRÒS

1.1 Descripció botànica

Les plantes d'arròs pertanyen al gènere botànic *Oryza*, que inclou 23 espècies classificades en dos grans grups: Latifolia, amb les espècies salvatges, i Sativa, amb les dues espècies cultivades, *Oryza sativa* i *Oryza glaberrima*. Les dues espècies són diploids, amb $2n=24$, anuals i principalment autògames, a diferència de les espècies salvatges que poden ser anuals o perennes, al·lògames o autògames (Arraudeau, 1998).

- *Oryza glaberrima*, d'origen africà, es cultiva des del delta central del Níger fins al Senegal.

- *Oryza sativa*, d'origen asiàtic, present en la majoria de països orizícoles, és l'espècie més cultivada, amb més de 100.000 varietats descrites, 65.000 registrades al banc de germoplasma de l'IRRI (Internacional Rice Research Institut, Filipines). Hi ha dos grans grups genètics dins l'espècie *Oryza sativa*; el tipus *indica* i el tipus *japonica*, sent el primer originari del Sud-Oest d'Himàlaia i el segon, de l'Est de l'Himàlaia i inclou diferents tipus morfològics com el *japonica* i el tropical o *javanica* (Jacquot et al., 1995).

La morfologia de la planta d'arròs varia en funció de l'estadi de desenvolupament, caracteritzat en fase vegetativa per la formació de fillols que es disposen en tofes. L'alçada de les plantes oscil·la de 0,5 a 1,5 m en la majoria d'espècies, tot i que alguna varietat flotant pot arribar als 6 metres. En estadi reproductiu s'inicia la formació de la inflorescència, una panícula que es pot compondre d'entre 50 i 300 flors o espiguetes.

El gra d'arròs, és un fruit del tipus cariopsi (Figura 1), format per diverses capes de teixits i l'embrió se situa a la part inferior del gra, parcialment en contacte directe amb la capa de l'aleurona, per sobre de la qual es troben el tegument i el pericarp (Figura 2).

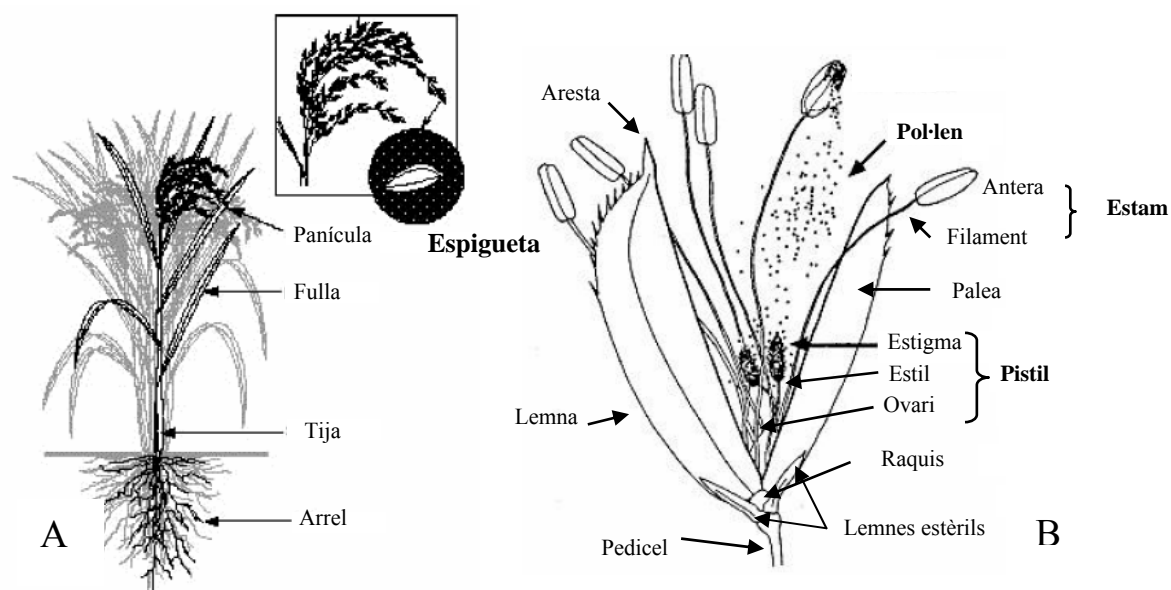


Figura 1. A. Esquema d'una planta d'arròs en estadi reproductiu, en el que es mostra un detall de la panícula. B. Esquema d'una flor o espigueta en la que es detallen cadascuna de les parts que la componen. <http://www.training.irri.org/courseware/online/hybridrice/PDF%20Files/Manual.PDF>

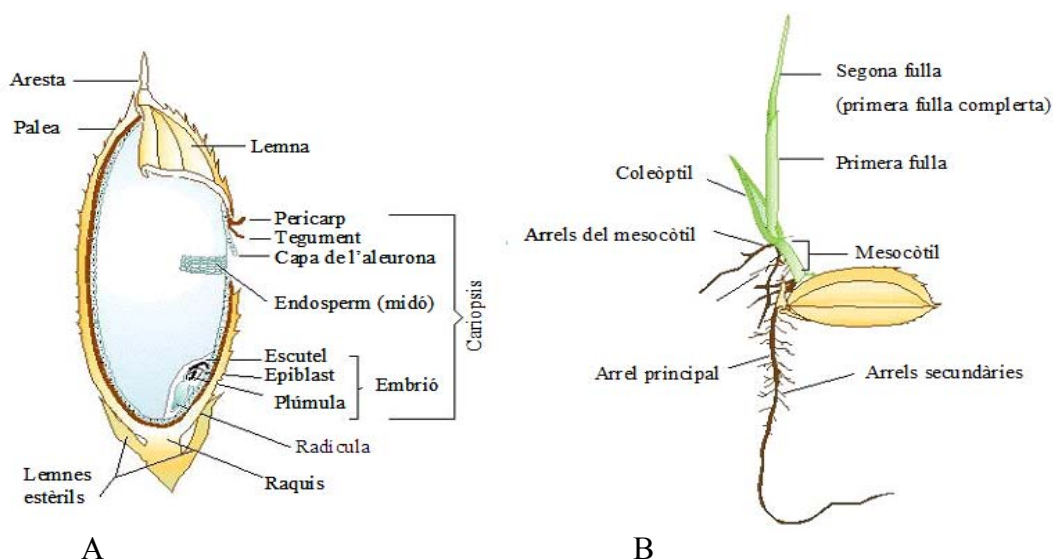


Figura 2 A. Esquema d'una secció longitudinal de la llavor d'arròs. Es descriuen les principals parts constituents del cariopsi. B. Esquema de les diferents parts d'una plàntula d'arròs germinada. (<http://www.riceweb.org/PLANT.HTM>)

1.2 Importància del cultiu d'arròs

L'arròs és el cereal que més es consumeix al món després del blat. Tot i que la producció d'arròs és la tercera per darrera del blat i del blat de moro, la importància de l'arròs rau en què pràcticament tot es destina a l'alimentació humana. En aquest sentit, l'arròs aporta a més de la meitat de la població més de la meitat de les calories de la seva alimentació.

A la Taula I es mostra la distribució global de la producció d'arròs, que en el darrer any se n'ha produït unes 608 TM (tones mètriques d'arròs sencer), ocupant una àrea total de 153 milions hectàrees (FAOSTAT, 2005; www.fao.org/rice2004).

	Producció	Superfície	Rendiment
	MT (milions tones)	Ha	T / Ha
ÀSIA	549,461	134.544.391	4,084
Xina	186,730	29.420.000	6,347
Índia	124,400	42.500.000	2,927
Indonèsia	53,100	11.752.651	4,518
ÀFRICA	19,223	10.220.371	1,881
AMÈRICA CENTRAL	2,477	676.452	3,663
SUD AMÈRICA	23,168	5.799.001	3,995
NORT AMÈRICA	10,227	1.349.240	7,581
EUROPA	3,381	593.850	5,694
Espanya	0,902	121.100	7,448
OCEANIA	0,556	73.300	7,589
MÓN	608,496	153.256.605	3,970
Països en vies de desenvolupament	582,123	149.379.115	3,897
Països desenvolupats	26,373	3.877.490	6,101



Taula I. Dades globals de la producció d'arròs (en milions de tones), de l'àrea cultivada (en hectàrees) i del rendiment del cultiu (en tones per hectàrea). Font: FAOSTAT/FAO, 2005

El rendiment de l'arròs, amb una mitjana mundial de 3,9 tones/hectàrea, pot oscil·lar de les 0,75 T/Ha en països com el Congo, on el cultiu d'arròs és de secà, a les 9,5 T/Ha d' Austràlia, on es cultiva per irrigació. A més, en funció del clima i del cicle de cada varietat es poden obtenir entre 1 i 4 collites a l'any. En climes temperats o tropicals freds (de montanya) només es recull un cop a l'any, durant setembre i octubre a l'hemisferi Nord i durant els mesos de març i abril a l'hemisferi Sud.

1.3 L'arròs a nivell europeu

La producció d'arròs a l'Europa Occidental, d'aproximadament 2,7 MT anuals, ocupa una àrea cultivada de 405.100 hectàrees, principalment situades a la conca mediterrània. Els majors països productors d'arròs a Europa són Itàlia (50,3%), Espanya (33,6%), Grècia (6,6%), Portugal (5,2%) i França (4,4%). Curiosament un 83% del gra que produeix és rodó o mitjà (tipus *japonica*), en contraposició a la producció mundial que majoritàriament és de gra llarg (tipus *indica*) (Faure, et al., 1995).

Tanmateix, la principal característica del cultiu d'arròs a Europa és que la majoria dels arrossars es localitzen en la proximitat de zones protegides i espais naturals de gran interès ecològic. Al Delta de l'Ebre, l'Albufera de València i planes del Guadalquivir, a la Península, al Delta del Po a Itàlia i a la Camarga a França. Actualment existeixen legislacions adaptades a les zones arrosseres protegides d'Europa, per tal d'evitar la contaminació dels ecosistemes limítrofs. Tanmateix hi ha alguna diferència en criteris de permissibilitat entre els diferents països.

A Catalunya s'apliquen des de 1998 els mètodes de producció agrària compatibles amb la protecció medioambiental de zones humides incloses en el llistat de la convenció de RAMSAR (www.ramsar.org). Així es prioritza la substitució i reducció de tractaments químics en la lluita contra plagues, amb la finalitat de protegir les aus i les espècies aquàtiques (DARP, 2005).

Els arrossars europeus es veuen afectats per diverses plagues i malalties de les que destaquen el barrinador d'arròs (*Chilo suppressalis*) i la piriculariosi o cremat de l'arròs (*Magnaporthe grisea*). El cremat de l'arròs és la malaltia més devastadora i extesa en l'arròs a nivell mundial. L'obtenció de línies d'arròs amb gens de resistència a aquesta malaltia fúngica va ser l'objectiu del treball de recerca pertanyent a aquest mateix període de formació doctoral (Peñas, 2003). El barrinador d'arròs, *Chilo suppressalis*, d'origen asiàtic, és una de les plagues més extenses en els arrossars del sud d'Europa causant pèrdues de producció que oscil·len entre el 15-20% en països com França i Espanya. La solució d'aquest problema s'ha dirigit a tractaments químics amb piretrines així com amb insecticides formulats amb *Bacillus turingensis* (Bt). A part que els tractaments químics són massa agressius pel medi ambient, en general esdevenen poc eficaços donada la baixa persistència que representen per la larva donat que aquesta es desenvolupa íntegrament a l'interior de les tiges de l'arròs. Una alternativa és el

desenvolupament de cultius d'arròs modificats genèticament, adaptats a les condicions de creixement local, portadores d'un o diversos gens que codifiquin per proteïnes insecticides.

Els gens insecticides més àmpliament utilitzats són els gens *Cry* del bacteri del sòl *Bacillus turingensis*, que codifiquen per endotoxines actives contra insectes. Estudis anteriors havien demostrat que l'expressió constitutiva del gen *Cry1B* de *Bacillus turingensis* en plantes d'arròs confereix protecció enfront al barrinador de l'arròs (Breitler et al., 2000). Posteriorment, es va poder comprovar que l'expressió d'aquest mateix gen sota el control d'un promotor induïble per ferida del gen *mpi* de blat de moro (maize proteinase inhibitor), també confereix protecció enfront al barrinador (Breitler et al., 2001).

1.4 La ciència i l'arròs

La gran importància mundial del cultiu d'arròs l'ha convertit en una espècie vegetal especialment tractada per la ciència. A més, l'arròs és la planta model de recerca genètica en cereals donada la petita mida del seu genoma (450 Mb, el més petit dels cereals). Organismes d'investigació públics com privats han treballat conjuntament per determinar-ne la seqüència completa del genoma (www.riceweb.org).

La constant millora varietal de l'arròs inclou aspectes com augmentar la qualitat del gra, la resistència a insectes i malalties, així com una major tolerància a l'estrès causat per factors com la sequera, la salinitat, el fred i la deficiència de nutrients. En aquest sentit, la biotecnologia es considera una gran eina per aconseguir-ho.

La biotecnologia en l'arròs passa per la utilització de tècniques de cultiu de teixits i de biologia molecular. Dos tipus de cultius de teixits, el rescat d'embrions i el cultiu d'anteres permeten als milloradors ampliar els encreuaments varietals, i establir més ràpidament les noves línies. Per altra banda, la utilització de marcadors moleculars ajuden a accelerar els programes tradicionals de millora genètica.

Una altra de les recents contribucions en el camp de la biotecnologia es basa en l'addició de gens aliens al genoma de l'arròs per enginyeria genètica; que també contempla la reintroducció de patrimoni genètic històricament perdut, però guardat en

bancs de germoplasma (IRRI). Aquesta transferència de gens, esdevindria impossible per mètodes convencionals de millora, a més, s'elimina la necessitat dels retrocreuaments per evitar gens no desitjats típics de la hibridació convencional.

2. TRANSFORMACIÓ GENÈTICA

Una de les conseqüències més importants dels avenços en el camp de la biologia molecular ha estat l'accés al patrimoni genètic dels organismes. Això ha portat al desenvolupament de la transgènia, que consisteix en transferir un o varis gens, forans o propis a un organisme, per introduir noves característiques o bé modificar-ne de pròpies. Es distingeixen dues etapes en la producció d'una planta transgènica, la inserció del DNA que es pretén introduir en el genoma de la cèl·lula vegetal, i la regeneració de la cèl·lula transformada a una planta adulta i fèrtil.

2.1 Mètodes de transformació genètica de plantes

Per introduir els transgens en el genoma de les cèl·lules vegetals, s'han desenvolupat diferents mètodes, biològics com l'ús d'*Agrobacterium tumefaciens* o mecànics com el bombardeig de micropartícules (biolística), l'electroporació de protoplasts o la microinjecció. Les dues tècniques més freqüents en transformació vegetal són la transferència de DNA per *Agrobacterium tumefaciens* i la transferència directe per bombardeig de micropartícules.

2.1.1 Transformació genètica per *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens i *Agrobacterium rhizogenes* són bacteris Gram negatiu del sòl que pertanyen a la família Rhizobiaceae, causants de tumors vegetals.

Els teixits que proliferen en els tumors proveeixen al bacteri amb aminoàcids inusuals (opines), font de carboni i nitrogen pel bacteri a expenses de la cèl·lula vegetal. Els gens necessaris per induir la formació de tumors així com els gens responsables de

la biosíntesi de les opines es troben en el T-DNA, fragment de DNA del plàsmid Ti (Tumor inducing) que es transfereix als cromosomes de la cèl·lula vegetal, delimitat per dues seqüències flanquejants (“right” i “left borders”), que són repeticions directes imperfectes de 25 bp. La substitució dels gens del T-DNA per gens objectes d’estudi no altera l’habilitat de transferència de DNA per part d’*Agrobacterium* però sí evita la formació de tumors vegetals, donant lloc al terme de soca desarmada.

El plàsmid Ti conté fora del T-DNA una regió amb els gens de virulència *vir*, l’acció combinada dels quals és responsable de la transferència del T-DNA al nucli de la cèl·lula vegetal. Els dos components principals implicats en la transferència de gens per *Agrobacterium*, el T-DNA i la regió *vir*, poden estar en plàsmids separats, anomenats vectors binaris Ti. La majoria de laboratoris utilitzen soques d’*Agrobacterium* portadores d’un sistema binari de plàsmids, un amb les seqüències dels operons *vir*, que codifiquen pels factors que actuen en *trans* per la transferència del T-DNA, que es localitza per separat en l’altre plàsmid (Hoekama et al., 1983).

Sistema d’integració del T-DNA al genoma hoste

Al produir-se una lesió tisular en una planta, els teixits ferits alliberen compostos fenòlics de baix pes molecular, sucres i àcids orgànics pels quals *Agrobacterium* és atret. La resposta a aquesta atracció química és el reconeixement de les cèl·lules productores dels senyals i la posterior unió bacteri-planta per un mecanisme polar (Tzfira et al. 2002; Winans, et al. 1992). En aquesta unió s’inicia l’expressió coordinada d’operons determinants per la transferència genètica (Stachel et al., 1985). Aquests operons, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* i *virG*, anomenats col·lectivament “vir-regulon”, estan coordinadament regulats per un sistema receptor i transductor de senyals format per dos components, *virA* i *virG*. Els compostos fenòlics i monosacàrids causen directa o indirectament l’autofosforilació dels receptors tipus quinases transmembranals *virA*, que activen el factor transcripcional soluble citoplasmàtic *virG* per un altra reacció de fosforilació. Subseqüentment el factor *virG* activa la transcripció de cadascun dels operons *vir* per la unió d’elements *cis* reguladors de la transcripció (Zupan et al., 2000; Winans, et al. 1992). Els productes generats per la transcripció dels operons *vir*, realitzen funcions crítiques per la transferència del fragment del T-DNA, essent els productes dels operons *virD1* i *virD2* responsables de l’escissió de la cadena-T,

delimitada per la presència de les seqüències flanquejants (LB i RB) (Stachel et al., 1985). La proteïna *virD2* s'uneix covalentment a l'extrem 5' de la cadena-T, que amb la proteïna d'unió a cadena simple *virE2* passa a ser el complexe-T. Aquest pas pot ocórrer tant en bactèria com en planta. El complexe-T, és exportat per un sistema de secreció bacteriana (tipus 4) codificat pels operons *virB* i *virD4* (Vergunst, et al. 2000). Tant *virD2* com *virE2* contenen seqüències de localització nuclear que interactuen amb components de la planta com α -importines, fosfatases del tipus 2C, i tres ciclofilines (factors d'interacció *virD2*), i vip-1, vip-2 (factors d'interacció *virE2*), responsables de dirigir el complexe-T cap al nucli de la cèl·lula vegetal (Tzfira et al. 2002, Schilton et al., 1977). Un cop dins del nucli la cadena-T s'integra en el genoma vegetal per recombinació no homòloga mediada per proteïnes codificades que probablement formen part de processos de recombinació i/o reparació en plantes (Ziemienowicz et al., 2000; Van Attikum et al., 2001).

Tot i que es desconeix el procés detallat d'integració del T-DNA en el genoma vegetal, està àmpliament descrit i acceptat que el procés d'integració s'inicia en l'extrem dret del T-DNA (Herrera-Estrella et al., 1988; De Buck et al., 2000; Kim et al., 2003; Gelvin, 2003). També hi ha qui suggereix un inici de la transferència del T-DNA des de l'extrem esquerra del mateix cap a l'extrem dret (Ramanathan, et al., 1995; Van der Graaff et al., 1996; Lu et al., 2001). A la Figura 3 es representa esquemàticament el procés de transferència del T-DNA d'*Agrobacterium* a la cèl·lula vegetal. Diverses tècniques de biologia molecular permeten l'escissió dels oncogens del T-DNA i la seva substitució per gens d'interès.

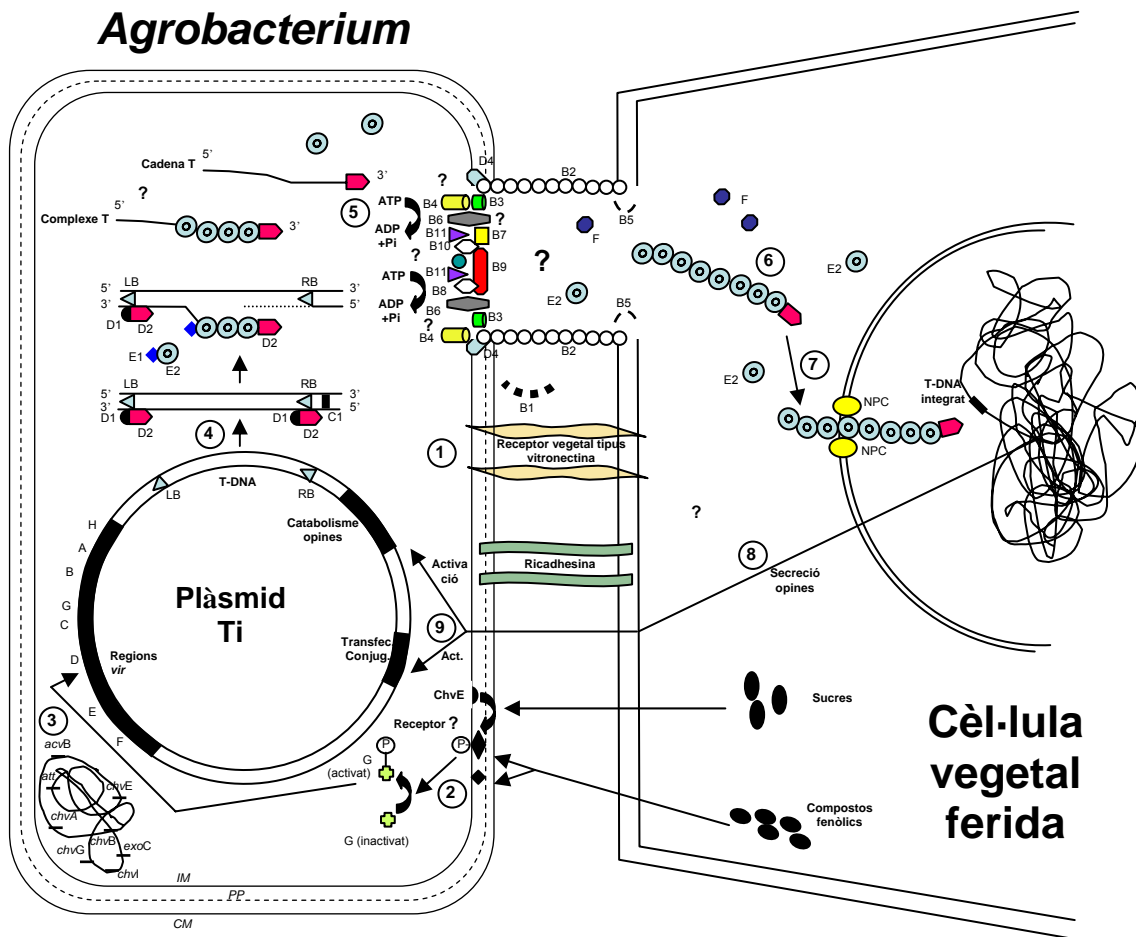


Figura 3. Representació esquemàtica de la cascada d'esdeveniments en el procés de transferència del T-DNA d'*Agrobacterium* al genoma vegetal. Es resumeixen els processos seqüencials que tenen lloc en la infecció en nou passos. Pas 1: Unió d'*Agrobacterium* a la superfície receptora de la cèl·lula vegetal; Pas 2: reconeixement directe o indirecte dels senyals moleculars de la planta per part dels factors *virA* i *virG*, dos components bacterians amb sistema sensor-transducció; Pas 3: inducció dels gens bacterians *vir* situats al plàsmid Ti; Pas 4: formació de la cadena-T; Pas 5: Formació i transport del complexe-T a la cèl·lula hoste vegetal pel pilus-T; Pas 6: reconeixement i interacció del complexe-T amb proteïnes citoplasmàtiques de la cèl·lula hoste; Pas 7: transport del complexe-T al nucli; Pas 8: integració del T-DNA i secreció d'opines; Pas 9: activació dels gens bacterians responsables del catabolisme d'opines i transferència conjugal de gens del plàsmid Ti. *acvB*, *att*, *chvA*, *chvB*, *chvE*, *chvG*, *chvI* i *exoS* són gens de virulència codificats pel cromosoma bacterià. “?” indica que en cara no s’han establert els passos específics. OM és la membrana externa, IM és la membrana interna, PP és el periplasma i la línia discontinua fa referència a la composició peptidoglicana de la paret cel·lular. (Veluthambi, et al., 2003)

El sistema de transformació genètica per *Agrobacterium* té avantatges respecte la resta de sistemes de transformació i és considerada la primera opció en la transformació genètica vegetal (Herrera-Estrella, et al., 2005; Veluthambi et al., 2003). Aquests avantatges inclouen aspectes com:

- Percentatge significatiu d'events de transformació amb integració d'una sola còpia del T-DNA en el cromosoma de la cèl·lula transformada (Crouzet, et al 2002)
- Disponibilitat comercial de nombrosos vectors amb les seqüències flanquejants del T-DNA corresponents, possibilitant l'ús de diferents gens marcadors i gens de selecció permetent als investigadors triar les combinacions més apropiades en cada cas.
- Possibilitat de transferir DNA a diferents organismes susceptibles d'infecció per *Agrobacterium*, incloent moltes espècies vegetals tant dicotiledònies com monocotiledònies. I fora del regne vegetal s'ha descrit en llevats, fongs ascomicets i algun basidiomicet, i darrerament en cèl·lules humanes (Gelvin, 2003; Kunik et al., 2001).

El sistema de transformació per *Agrobacterium* permet la introducció definida d'un fragment limitat per les seqüències flanquejants del T-DNA. Tot i que es descriuen escapaments amb integració de seqüències externes del T-DNA que pertanyen al plàsmid. Tot i això, l'agroinfecció resulta una tecnologia més “neta” d'inserció de transgens respecte la biolística, en què normalment es treballa amb plàsmids sencers que s'integren al genoma vegetal.

Recentment Jefferson i col·laboradors han publicat a la revista Nature, la transferència de gens en tabac, arròs i *Arabidopsis* utilitzant soques bacterianes fora del gènere *Agrobacterium*. A l'article es descriu com modifiquen introduint a algunes soques dels gèneres *Rhizobium*, *Sinorhizobium* i *Mesorhizobium* un plàsmid Ti i el vector binari corresponent capacitant-los per agrotransformar les plantes. Aquest descobriment obre novament més portes en el camp de la biotecnologia vegetal, tot i que les eficiències de transformació i regeneració resultaren baixes (Broothaerts et al., 2005).

2.1.2 Transformació genètica per biolística

El desenvolupament d'aquesta tècnica de transformació va sorgir de la necessitat de transformar espècies que originàriament no eren susceptibles d'infecció per *Agrobacterium*, entre les quals es trobaven espècies de cereals de gran interès econòmic.

El mètode de transformació genètica per biolística consisteix en la introducció de DNA a la cèl·lula receptora mitjançant la utilització de micropartícules accelerades, normalment d'or o tungstè, que prèviament s'han recobert del DNA a introduir. El revestiment de les partícules es realitza per precipitació del DNA amb clorur càlcic i espermidina. Un cop en el nucli de les cèl·lules, el DNA se separa i pot expressar-se de forma transitòria o es pot incorporar establement en els cromosomes hostes.

L'aparell més àmpliament utilitzat per la transformació de plantes és el Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (Kikkert, 1993) comercialitzat per Bio-Rad (Figura 4). S'utilitza l'alta pressió d'heli comprimit alliberat per un disc de ruptura per repel·lir una membrana portadora de milions de partícules recobertes de DNA cap a les cèl·lules diana (Figura 4). Una reixeta metàl·lica d'intercepció situada entre la membrana portadora i el teixit diana atura les restes de la membrana portadora permetent que només les partícules recobertes de DNA es dirigeixin cap a les cèl·lules.

Donada la naturalesa física i la metodologia senzilla de la biolística, es poden transferir DNAs a tipus cel·lulars i teixits molt diferents i d'una gran diversitat d'organismes. En la recerca en biologia vegetal, les aplicacions més comunes de la biolística han estat dirigides a estudis d'expressió transitòria, a l'obtenció de plantes transgèniques, i a la inoculació de patògens virals a plantes (Sanford et al., 2000; Southgate et al., 1995; Taylor et al., 2002).

El disseny de vectors per la transformació mitjançant biolística sovint esdevé més simple que en el cas dels vectors binaris d'*Agrobacterium*. No és imprescindible clonar en el mateix vector el gen de selecció i el gen d'interès ja que dos plasmidis (un portador del gen d'interès i l'altre del gen de selecció) es barregen en el moment de revestir les micropartícules. La co-transformació sol ser del 80% (Vila, 2003).

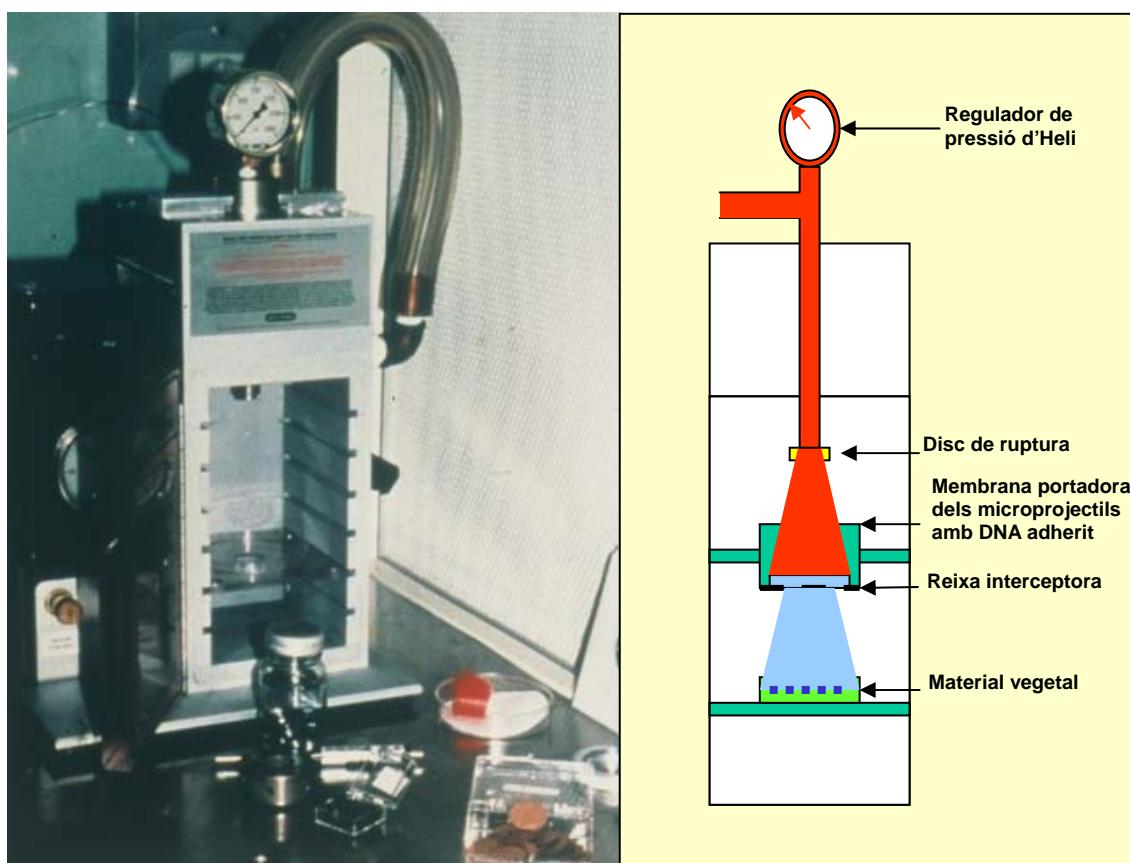


Figura 4. Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad Laboratories). Esquema del procés biolístic. S'omple el tub d'acceleració de gas amb heli fins el màxim que resisteix el disc de ruptura. Quan aquest es trenca, l'ona expansiva del gas empeny la membrana de plàstic on s'han adherit per assecat les micropartícules revestides de DNA. Aquesta membrana es dirigeix cap avall fins que topa amb el filtre metàl·lic. En l'impacte la membrana portadora queda retinguda mentre que les partícules continuen viatjant a gran velocitat cap al teixit diana on s'incrustaran. La velocitat de la membrana portadora depèn de la pressió de l'heli en el tub d'acceleració de gasos, de la distància entre el disc de ruptura i la membrana portadora, el trajecte que recorre la membrana portadora fins a la reixeta metàl·lica, la distància entre la reixeta i el teixit diana i el buit que es realitzi a la cambra de bombardeig.

En alguns casos la biolística és la única tècnica de transformació viable. La modificació genètica de mitocondris i plastidis fins ara només s'ha descrit per biolística.

Algun dels desavantatges de la biolística és una sovint menor eficiència transformació que no pas per *Agrobacterium*. La integració de seqüències del vector de transformació que no són necessàries és un dels inconvenients més importants d'aquesta metodologia. Molts investigadors han abandonat aquest tècnica degut a la tendència de patrons complexes d'integració del DNA, sovint de múltiples còpies, que poden causar fenòmens de silenciament així com la integració de còpies truncades. També s'han descrit en nombrosos casos que les diferents còpies tendeixen a integrar-se en el mateix *locus*, seguint posteriorment patrons de segregació mendeliana. (Kohli et al., 1998).

2.2 Regeneració de plantes transgèniques

Quan la cèl·lula vegetal ha incorporat el DNA de manera estable (integrat en el genoma hoste) el següent pas és regenerar la planta transgènica. Les dues vies principals de regeneració descrites són l'organogènesi i l'embriogènesi somàtica (Dandekar, 1994). L'organogènesi implica la regeneració d'arrels o tiges adventícies a partir de teixits meristemàtics organitzats mentre que l'embriogènesi, implica la formació d'embrions o teixits embriogènics a partir de teixits somàtics.

Tanmateix, les baixes eficiències en què les cèl·lules vegetals incorporen funcionalment el DNA forani, sumat al fet que aquestes es veuen afectades negativament per la pròpia transformació genètica respecte la gran quantitat de cèl·lules no transformades que les envolten, és necessari l'establiment de sistemes eficients per la selecció d'aquestes cèl·lules.

En aquest sentit, els gens de selecció que confereixen resistència a diversos antibiòtics i herbicides són habitualment utilitzats als laboratoris de recerca vegetal. Codifiquen per proteïnes que detoxifiquen els corresponents agents de selecció permetent el creixement preferent de les cèl·lules transformades inhibint el creixement o matant les no transformades. Els gens de selecció més habituals en la transformació vegetal són:

- El *nptII* codifica per l'enzim neomicina fosfotransferasa II, que transfereix el grup γ -fosfat d'una molècula d'ATP a un grup 3'hidroxil de l'aminohexosa d'antibiòtics aminoglicosídics que consegüentment queden inactivats (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983). Un dels antibiòtics usats com agent de selecció quan es transforma amb el gen *nptII* és la kanamicina.
- El gen *hpt* codifica per l'enzim higromicina fosfotransferasa o aminoglicosid 4'-fosfotransferasa, i es va aïllar d'*E.coli* i confereix resistència a l'antibiòtic higromicina B (van den Elzen et al., 1985);
- El gen *bar*, clonat d'*Streptomyces higroscopicus* (Thomson et al., 1987; White et al., 1990), és el responsable de la conversió de la fosfotricina, principi actiu de diversos herbicides com el Bialaphos, el Finale i el Basta, en una forma acetilada no tòxica que permet el creixement de les cèl·lules que l'hagin incorporat funcionalment i que estiguin creixent en medi amb fosfotricina (Murakami et

al., 1986). La fosfinitricina és un tripèptid compost per dos residus L-Ala i un anàleg de l'àcid glutàmic. La toxicitat en plantes i bacteries de la fosfinitricina rau en què les peptidases intracel·lulars tallen els residus d'Alanina activant la fosfinitricina, que és un inhibidor de la Glutamina sintetasa. La inhibició de la Gln sintetasa per la fosfonotricina causa un ràpid increment dels nivells d'amoni intracel·lulars, provocant una disrupció de l'estructura dels cloroplasts que resulta en una inhibició de la fotosíntesi i mort de la cèl·lula vegetal (Tachibana et al., 1986).

La utilització de gens de selecció permet que només regenerin les cèl·lules que han incorporat funcionalment el gen de resistència al seu genoma, i per inferència seran les portadores del DNA d'interès.

Opcionalment es poden utilitzar els gens marcadors o reporters. Tot i que els gens marcadors no confereixen propietats selectives a les cèl·lules transformades, resulten una eina molt útil en estudis concrets (per exemple promotors i seqüències reguladores d'expressió), a banda de permetre un anàlisi ràpid previ a la caracterització molecular de les plantes transgèniques. Alguns dels gens marcadors més habituals són:

- El gen *uidA* codifica per l'enzim β -glucuronidasa o GUS i es va aïllar d'*E.coli* (Jefferson et al., 1986). Aquest enzim hidrolitza el substrat incolor 5-bromo-clor-3-indol β -D-glucurònid (X-GLU) en un compost que forma precipitats cristal·lins blaus, el diXH-indigo. La determinació histo-química de la seva activitat té caràcter destructiu pel teixit avaluat donada la toxicitat citològica del substrat.
- El gen *gfp*, aïllat de la medusa *Aequorea victoria*, codifica per una proteïna que posseeix un cromòfor que per transducció de l'energia d'excitació a energia d'emissió, emet immediatament llum verda fluorescent al ser il·luminada o exposada a llum de la franja del blau al ultraviolat (Ormo et al., 1996). Donat que la seva visualització en cap cas malmet el teixit, permet un seguiment no invasiu de l'expressió al llarg del desenvolupament de la planta (Chalfie et al., 1994).

El desenvolupament de la tecnologia de cultiu de teixits permet en cada experiment establir un protocol més o menys eficient de regeneració. Tot i que en

algunes espècies vegetals la transformació genètica ha esdevingut una eina de treball gairebé rutinària, en d'altres espècies, el factor limitant no és la transformació del material genètic en sí, sinó la manca d'un protocol eficient de regeneració.

2.3 Transformació genètica de l'arròs

Mentre es van establir sistemes de transformació genètica per *Agrobacterium* en moltes espècies dicotiledònies, les monocotiledònies, especialment els cereals quedaven fora del rang d'hostes del bacteri.

Per aquesta raó les temptatives inicials de transformar genèticament l'arròs, es van focalitzar en tècniques de transferència directe de DNA com l'electroporació de protoplasts o el bombardeig de micropartícules (Toriyama et al., 1988; Zhang et al., 1988 (a,b); Abdullah et al., 1989; Shimamoto et al., 1989; Datta et al., 1990, 1992; Hayashimoto et al., 1990; Li et al., 1990; Tada et al., 1990; Christou et al., 1991, 1992; Ayres et al., 1994; Ghosh-Biswas et al., 1994; Wu et al. 1995; Peng et al., 1995).

Posteriorment, es va veure que un dels factors limitants derivava del fet de que les plantes monocotiledònies no produeixen els compostos fenòlics d'atracció, o almenys no en suficient quantitat per activar els sistemes de reconeixement que desencadenen el procés de transferència del T-DNA (Smith et al. 1995). També degut a que moltes espècies monocotiledònies, a diferència de les dicotiledònies, tendeixen a lignificar la zona de ferida sense que es produeixin divisions cel·lulars aparents (Kahl et al., 1982).

Hiei i els seus col·laboradors (1994) van descriure amb èxit la transferència de DNA d'*Agrobacterium* a cèl·lules d'arròs afegint durant el co-cultiu, una concentració de 100 µM d'acetosiringona (4-acetil-2,6-dimetoxifenol), compost fenòlic que activa els gens *vir*. El mateix equip va establir el cultiu de calls derivats de l'escutel de llavors madures, teixit que es troben en constant divisió cel·lular, com una bona font de cèl·lules per la producció de plantes transgèniques d'arròs. Altres autors de seguida ho corroboraren i actualment és un dels millors sistemes de transformació i regeneració per arròs (Dong et al., 1996; Hiei et al., 1994; Rashid et al., 1996). L'any 1993, Chan i col·laboradors havien obtingut les primeres plantes d'arròs (tipus *japonica*) transformades genèticament inoculant embrions immadurs amb *Agrobacterium*, però

l'eficiència de transformació i regeneració no van ser gaire bones comparant amb les que posteriorment Hiei i col·laboradors (1994) van descriure.

Des d'aleshores fins ara s'han realitzat centenars de transformacions genètiques d'arròs amb *Agrobacterium tumefaciens*, fent servir majoritàriament varietats model (Nipponbare i Taipei) d'alta capacitat proliferativa i regenerativa.

Així però, estudis realitzats al nostre laboratori van permetre establir els protocols de transformació genètica tant per *Agrobacterium tumefaciens* com per biolística, de tres varietats comercials mediterrànies d'arròs tipus *japonica*, (Sénia, Bahia i Tebre) (Pons et al., 2000). Aquests protocols s'han utilitzat amb èxit per obtenir línies d'arròs resistents a insectes (Breitler et al., 2000, 2004; Marfà et al., 2002; Vila et al., 2005) i a malalties fúngiques (Coca et al., 2004, 2005; Moreno et al., 2005).

2.4 Percepció de la transgènia

La transgènia s'hauria d'entendre com una eina més que ens aporta la ciència i, que juntament amb la millora clàssica i altres tècniques ja acceptades ens haurien d'ajudar a la recerca de noves varietats més adaptades a les nostres necessitats i gustos. Cal tenir en compte però, que sempre que s'introdueix una nova tecnologia s'ha d'emprar amb les precaucions i la prudència adequades per reduir al mínim les desavantatges i riscos potencialment associats.

2.4.1 Aportacions de la transgènia

Fa vint anys es van publicar els primers resultats amb èxit de transferència i expressió de gens forans en plantes (Herrera-Estrella et al., 1983; De Block et al., 1984). Des de llavors, les plantes transgèniques han esdevingut una eina essencial de la genètica molecular, fonamental en estudis de genòmica funcional.

En aquest sentit, s'utilitzen extensivament les plantes transgèniques per l'anàlisi funcional de promotors. En aquest sentit es transformen plantes amb construccions en les que gens marcadors estan sota el control del promotor del gen d'estudi. La

funcionalitat de dit promotor es pot així determinar sota un gran ventall d'estímuls ambientals, incloent la llum, ferides, temperatura i hormones entre d'altres, i en diferents teixits vegetals.

La transformació genètica també ha demostrat ser una eina de treball fonamental per determinar la funció de gens concrets, i en relació a processos fisiològics específics de la planta. En aquest sentit, les estratègies que es fan servir poden ser la sobreexpressió del gen d'estudi o el silenciament de l'expressió del gen (seqüències antisentit; RNAi).

Darrerament s'ha estès l'ús de plantes transformades com a eines per la mutagènesi d'inserció, tant directament per T-DNA com indirectament per mobilització de transposons (Sallaud et al., 2004). Les col·leccions de mutants poden ser fàcilment crivades per caràcters fenotípics podent-se identificar i aïllar els gens responsables del caràcter amb certa facilitat. Es troben diversos treballs d'interès en els que s'ha seguit aquesta estratègia d'estudi funcional en *Arabidopsis*, tomàquet i arròs (Meinke et al., 1998; Jeon et al., 2000; Gidoni et al. 2003) alhora que apareixen noves tècniques com el TILLING (McCallum et al., 2000) per estudiar genètica funcional (Liu et al., 2005).

Amb el desenvolupament dels mètodes de transformació i el coneixement que se'n deriva, s'han posat a l'abast eines amb les que es poden sobrepassar les limitacions de la millora clàssica. En aquest sentit s'ha avançat en la cursa de l'obtenció de millors plantes transgèniques amb importants aplicacions en l'agricultura, la indústria i la medicina. Des de l'obtenció de les primeres plantes transgèniques, s'han desenvolupat noves varietats que han estat cultivades extensament en algunes regions del món.

Algunes de les modificacions introduïdes a noves varietats fan referència a aspectes tan diversos com la qualitat de fruits i llavors, la resistència a virus, insectes, fongs i bacteries fitopatògenes, fotosíntesi i metabolisme dels sucres, tolerància a estrès abiòtic. També ha permès l'ús de plantes com a bioreactors, o la producció de compostos amb aplicacions clíniques en plantes transgèniques (rev. Herrera-Estrella et al., 2005)

Tot i que en termes de producció agrícola, l'impacte de la tecnologia transgènica, no ha assolit el seu potencial donades les controvèrsies que aquesta nova tecnologia ha generat, i als estrictes sistemes reguladors que s'han adoptat en alguns països, la superfície de cultius transgènics s'ha anat incrementant a nivell mundial des de la

comercialització del tomàquet transgènic, el 1994. Segons dades del “International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications” (ISAAA, 2004) 80 milions d’Ha es varen cultivar amb plantes transgèniques durant el 2004, distribuïdes en 17 països. Aquesta superfície és més gran que tota la península Ibèrica. Així però, el 99% d’aquesta producció estava localitzada en sis països (Estats Units, Argentina, Canadà, Brasil, Xina i Sud-Àfrica). Aquests cultius eren principalment de soja, blat de moro, cotó i colza tots ells, resistents a herbicides i/o a l’atac d’insectes. En el cas de la Unió Europea, abans de l’adhesió de Polònia (2004), l’únic país on es cultivaven plantes transgèniques a nivell comercial era Espanya, amb una superfície conreada durant l’any 2004 de 58 000 Ha, exclusivament de blat de moro, l’única espècie autoritzada pel cultiu.

2.4.2. Limitacions de la transgènia

Les limitacions de les plantes transgèniques, deriven del desconeixement de possibles riscos que poden comportar en aspectes de seguretat alimentària així com d’impacte ambiental d’aquest tipus de cultius.

Una de les preocupacions en seguretat alimentària fan referència a la presència dels gens de selecció que confereixen resistències a antibiòtics. Una d’aquestes preocupacions es basa en la possible reducció de l’eficàcia dels antibiòtics en humans i animals a través de possibles transferències d’aquests gens a les bacteris presents en els aparells digestius o a les bacteris presents en l’ambient. Aquest aspecte ha estat àmpliament estudiat per un grup de científics de la “British Society for Antimicrobial Chemotherapy” i els resultats de l’estudi s’han publicat recentment (Bennett et al., 2004; Netherwood et al. 2004). Les conclusions d’aquests estudis indicaren que no hi ha proves científiques objectives que facin creure que els gens de resistència a antibiòtics puguin migrar als bacteris per crear nous problemes clínics. També s’han portat a terme diversos estudis amb la proteïna Bt, en els que no es descriu cap evidència de receptors específics d’aquestes proteïna en teixits de mamífers, ni hi ha indicacions d’homologia en la seqüència aminoacídica a cap proteïna al·lergènica alimentària coneguda. Tampoc es van identificar problemes de toxicitat (Kuiper et al., 2001).

Malgrat tot això, tenint en compte el principi de precaució i donat que el risc zero no existeix, es recomana el mínim ús dels gens que codifiquen resistències a antibiòtics així com l'establiment de noves estratègies de transformació per evitar, en un futur, el seu ús. En aquesta tesi es desenvolupa un estudi comparatiu de diferents estratègies per eliminar els gens de selecció en plantes transgèniques de varietats comercials d'arròs.

Un altre dels riscos que s'atribueixen a les plantes transgèniques és que d'alguna manera podrien danyar el medi ambient o contribuir a la pèrdua de biodiversitat natural. La desaparició d'espècies locals deguda a la introducció de nous conreus ja ha estat àmpliament descrita en el cas de cultius no transgènics (Ellstrand et al., 1999; Ellstrand 2001). Aquest és un factor de risc que no es pot atribuir exclusivament a les plantes transgèniques.

Una altra preocupació mediambiental dels cultius transgènics és la probabilitat i possibles conseqüències de la transferència dels gens introduïts a través de la dispersió del pol·len cap a parents salvatges o a cultius no transgènics. Referent a la introducció de gens de resistència a insectes, malalties o a herbicides, l'efecte que tindrà sobre el medi ambient dependrà del caràcter introduït. Així per exemple, si el que s'ha introduït es un gen de resistència a insectes, cultivar plantes que produeixen substàncies insecticides tindrà probablement el mateix efecte que l'aplicació continuada d'insecticides químics, es a dir, l'aparició de poblacions d'insectes resistents als insecticides. Per tant, en aquest cas, tampoc les plantes transgèniques creen nous problemes respecte els cultius tradicionals –que requereixen l'ús d'insecticides químics per combatre les plagues- i per tant, s'han d'establir les mateixes estratègies de control. S'han realitzat estudis sobre l'aparició de poblacions d'insectes resistents a Bt en cultius de blat de moro Bt en els que no es van detectar dites poblacions resistents després de cinc anys consecutius de mostreig per diferents zones d'Espanya (Farinós et al., 2004). Si el que s'ha introduït és una resistència a herbicida i aquest gen passa a males herbes compatibles, la conseqüència més clara és que les males herbes esdevindran resistents a l'herbicida i aquest producte ja no es podrà fer servir per eliminar-les dins del conreu.

Però a la natura, aquesta resistència puntual no té per que representar una avantatge, ja que no es fan servir herbicides, i per tant, la mala herba resistent no té per que convertir-se en una "super mala herba". O el cas de la papallona monarca, on conclusions errònies per l'extrapol·lació de les condicions de laboratori a les condicions

de camp, van generar una gran polèmica (Losey et al., 1999; Shelton et al., 2001). Així doncs, l'impacte ambiental dels gens que s'introdueixen s'ha d'avaluar en cada cas.

Aquesta tecnologia té un gran potencial per contribuir al desenvolupament d'una agricultura sostenible. L'anomenada primera generació de plantes transgèniques, (resistents a herbicides i/o a insectes) està sent adoptada per diversos països com demostra l'increment d'aquests cultius a nivell mundial esmentat abans. Com exemple podem citar el cas de la Xina que ha adoptat el cotó Bt resistent a insectes. Aquesta opció s'ha traduït en una major producció i sobre tot en una reducció significativa del número d'agricultors intoxicats per l'ús indiscriminat d'insecticides químics (Hossain et al., 2004). A més, les autoritats xineses han decidit potenciar al màxim la producció de varietats d'arròs transgènic resistents a malalties per disminuir l'impacte ecològic dels pesticides que actualment es fan servir i també per a augmentar la producció d'aquest aliment bàsic per la seva població. Fan aquesta aposta de futur perquè consideren que les avantatges que per a ells comporta aquesta tecnologia justifica plenament el seu ús.

Per altra banda, comencen a aparèixer estudis seriosos, basats en dades econòmiques, com per exemple el de Phipps i col·laboradors (2002) on es demostra clarament que el cultiu de plantes transgèniques resistents a herbicides i/o insectes es tradueix en un augment de producció, en una disminució en l'aplicació d'herbicides i en un estalvi de combustible i per tant d'alliberament de CO₂ al medi ambient. Recentment el govern de la Índia ha autoritzat el conreu d'una patata transgènica amb una composició proteica més equilibrada (Chakraborty et al., 2000) per ajudar a pal·liar els problemes de malnutrició del país.

3. ELS GENS DE SELECCIÓ

3.1 Problemàtica dels gens de selecció

Tal com s'ha descrit a l'apartat 2.2 de la introducció, les baixes eficiències dels mètodes de transformació requereixen l'ús de gens de selecció per identificar les cèl·lules que hagin incorporat funcionalment el DNA transferit. Per això clàssicament s'introdueix un gen que codifica per una resistència a antibiòtic o a herbicida amb el gen d'interès, es cultiven les cèl·lules transformades en un medi amb l'agent de selecció corresponent permetent el creixement exclusiu de les cèl·lules que hagin incorporat el DNA forani. Després del procés d'obtenció de les plantes transgèniques no es requereix més de la presència dels gens de selecció a la planta.

Per altra banda els mateixos agents de selecció, herbicides i antibiòtics, disminueixen l'habilitat de les cèl·lules transgèniques a proliferar i diferenciar-se a plantes transgèniques ja que les cèl·lules que moren per acció dels agents de selecció, i els compostos tòxics que se'n deriven, inhibeixen el subministrament de nutrients a cèl·lules transformades (Ebinuma et al., 2001(a)).

A més, si s'incrementa el número de caràcters transgènics per encreuaments sexuals, el número de còpies del gen de selecció es multiplica, incrementant la possibilitat de silenciament gènic depenent d'homologia per l'elevada expressió de gens homòlegs (Ebinuma et al., 2001(a)). I si enlloc d'encreuaments sexuals es retransformen les plantes transgèniques per incorporar nous caràcters, el gen de selecció del segon caràcter haurà de ser diferent al primer, i el número de gens de selecció disponibles que siguin aptes per moltes espècies és actualment limitat. El número de promotors usats habitualment per expressar constitutivament els gens de selecció és també limitat, i la seva repetida introducció podria activar mecanismes de silenciament amb efectes negatius en l'expressió d'un més gens d'interès (Puchta, 2003 (a)).

El manteniment dels gens de selecció en plantes transgèniques no té més repercussions a nivell de laboratori ni bioassaigs, però la seva presència a nivell de camp sí té repercussions d'àmbit públic i social (Hohn et al., 2001).

A nivell europeu aquestes raons han portat l'adopció de mesures preventives com l'aparició de directives com la EU 2001/18/EC en la que es fa referència a la prohibició de la presència dels gens de selecció que confereixin resistència a antibiòtics d'ús clínic (humà i animal) en camps comercials a partir de 2005 i a partir del 2009 per camps experimentals.

Per totes aquestes raons seria interessant des del punt de vista científic i social, trobar una estratègia de transformació genètica que prescindís de gens de selecció basats en la resistència a antibiòtics. Tanmateix fins avui es desconeix i, fins que no aparegui l'ús de d'una nova tecnologia que ho permeti, molts autors han dedicat grans esforços en trobar estratègies que permetin l'eliminació eficient dels gens de selecció un cop realitzada la transformació genètica, entenent que anomenem gen de selecció o d'interès referint-nos als cassettes per l'expressió dels mateixos, promotor:gen:terminador.

3.2 Estratègies per eliminar els gens de selecció basats en resistència a antibiòtic

Fins ara es podrien definir quatre grans línies d'actuació per la resolució de la problemàtica amb els gens que confereixen resistència a antibiòtics en plantes transgèniques.

3.2.1 Prescindir dels gens de selecció

Millorant les eficiències de transformació, hauria de ser possible la identificació de les cèl·lules modificades genèticament per mètodes moleculars en estadis immediats a la transformació genètica. En algunes plantes model en què s'han establert mètodes de transformació amb una gran eficiència regenerativa, es poden portar a terme modificacions genètiques sense l'ús de gens de selecció. El grup de De Vetten (2003), seleccionen per PCR les cèl·lules de patata transformades, amb una eficiència del 1-5%. També el grup d'Aziz (2003) descriu l'obtenció de plantes transgèniques de tabac inoculant línies germinals masculines (concretament microspores uninucleades) sense gens de selecció amb una eficiència que permet prescindir dels gens de selecció. Tanmateix són necessàries moltes altres aproximacions a aquest tipus de tècniques a fi que es pogués prescindir dels gens de selecció en la producció de plantes transgèniques.

3.2.2 Eliminació dels gens de selecció per co-transformació

Les estratègies de co-transformació es basen en la co-integració separada en el genoma hoste de dos transgens, el d'interès i el de selecció, seguida de la segregació dels dos caràcters en la subsegüent generació de plantes.

Mitjançant la transformació genètica per *Agrobacterium tumefaciens* es poden derivar tres vies de co-transformació en funció de la localització dels 2 T-DNAs en els que es clonen per una banda el gen d'interès i per altra el gen de selecció. Tal com es representa a la Figura 5, els dos T-DNA poden estar localitzats en vectors separats (Figura 5A,B), podent-se trobar els dos plàsmids en dos cultiu bacterians independents (Figura 5A) o en un mateix cultiu (Figura 5B). Per últim, els dos T-DNA també poden estar localitzats en un únic plàsmid (Figura 5C).

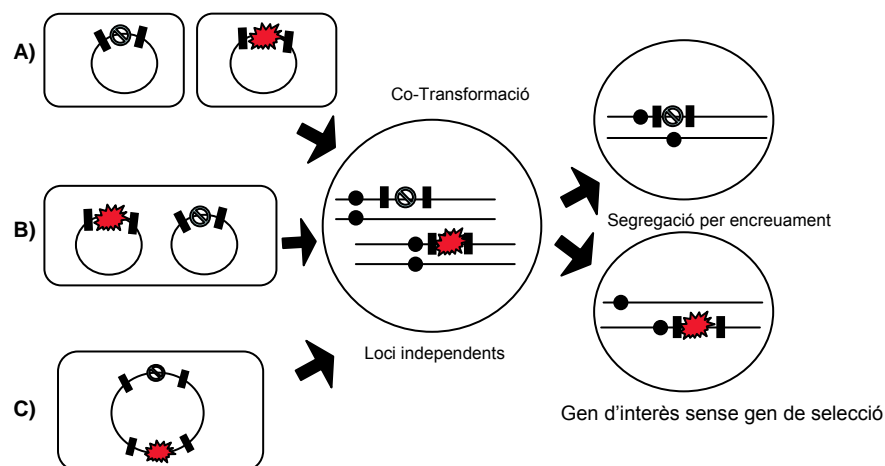


Figura 5. Generació de plantes transgèniques lliures de gens de selecció per mètodes de co-transformació. Un gen de selecció (⊙) i un gen d'interès (☀) clonats entre dos T-DNAs diferents s'integren a *loci* independents per co-transformació. Es representen les tres modalitats a, b i c, en funció de la localització dels dos T-DNAs. El gen d'interès segrega del de selecció per encreuament sexual i s'obtenen les plantes transgèniques lliures de gen de selecció a la descendència.

A) Transformació amb dos vectors T-DNA introduïts individualment en *Agrobacterium*

Tal com es mostra a la Figura 5A, la co-transformació es porta a terme inoculant el material vegetal amb dos cultius d'una soca d'*Agrobacterium*, un portador d'un vector amb el gen de selecció i l'altre portador del vector amb el gen d'interès. El

material transformat es selecciona amb l'agent de selecció corresponent i s'avaluen les plantes regenerades pel gen d'interès. Les plantes transgèniques lliures de gens de selecció segreguen de les plantes co-transformades per encreuament.

El grup de Depiker (1985), van co-cultivar protoplasts de tabac amb dues soques d'*Agrobacterium*, una portadora d'un plàsmid Ti amb un T-DNA salvatge (nopalina) i l'altra portadora d'un vector binari que contenia el gen *nptII*, que confereix resistència a la kanamicina. Els resultats indicaren que cada cèl·lula vegetal tenia suficients llocs de reconeixement o d'inserció per diverses cèl·lules bacterianes i que la transformació d'una cèl·lula vegetal per dues bactèries representaven fets independents. El 1987, McKnight i col·laboradors, van repetir un experiment similar en el que treballaren amb discs de fulla de tabac. La segregació independent dels dos T-DNA en les plantes descendents indicaven que els dos T-DNA s'havien integrat en diferents *loci*. Més tard, De Block i col·laboradors (1991), van co-cultivar segments d'hipocòtil de llavors de colza amb dues soques d'*Agrobacterium*. Una portava un plàsmid que contenia el gen *bar* i l'altra un plàsmid amb els gens *hpt* (higromicina fosfotransferasa) i *nptII* (neomicina fosfotransferasa). Els resultats, en contrast amb els descrits per Depiker i col·laboradors (1985), indicaren que la co-transformació no era el resultat de dos fets o events independents sinó que es tractava d'un fenomen més freqüent.

De Neve i col·laboradors (1997), ho van provar inoculant amb dues soques d'*Agrobacterium*, una amb un plàsmid amb el gen *hpt* i l'altra soca amb un plàsmid portador del gen *nptII*. Els experiments els van realitzar amb protoplasts de tabac, i amb disc i arrels d'*Arabidopsis*. Els resultats que es van descriure indicaven que els T-DNA derivats de diferents bactèries eren freqüentment integrats en el mateix *locus*. Resultats molt similars van ser obtinguts per l'equip de Komari (1996), que van treballar amb arròs i tabac.

B) Transformació amb dos vectors introduïts conjuntament en *Agrobacterium*

La co-transformació es porta a terme per co-cultiu del teixit vegetal amb una soca bacteriana que conté dos plàsmids diferents portadors del gen de selecció o del gen d'interès respectivament (Figura 5B).

La primera aproximació d'aquesta estratègia de co-transformació es va publicar el 1986 per De Framond i els seus col·laboradors. Van inocular plàntules de tabac amb una

soca bacteriana portadora d'un plàsmid amb el genotip salvatge per una octopina i amb un segon vector en el que es va clonar el gen *nos*. La segregació dels dos T-DNA en la descendència d'alguna de les plantes indicà que s'havien integrat en *loci* independents. Més tard, els resultats de Daley i col·laboradors (1998), en què van inocular tabac i colza amb una soca d'*Agrobacterium* portadora de dos plàsmids, un amb el gen *uidA* (GUS) i l'altre amb el gen *nptII*, van coincidir amb l'anterior.

C) Transformació amb un vector portador de dos T-DNA

Tal com es mostra a la Figura 5C, la co-transformació es realitza amb una soca bacteriana, portadora d'un vector binari en el que s'han clonat dos T-DNAs diferents, un portador del gen de selecció i l'altre portador del gen d'interès. Posteriorment, a nivell de descendència s'obtidrien plantes lliures de gens de selecció.

Una de les primeres temptatives d'aquesta estratègia va ser descrita per Depicker i els seus col·laboradors el 1985. Van inocular protoplast de tabac utilitzant un vector binari portador de dos T-DNA (un amb T-DNA salvatge i l'altre T-DNA amb el gen *nptII*). Els resultats indicaren que una sola soca d'*Agrobacterium* podia transferir i integrar dos T-DNAs separats en un mateix esdeveniment d'infecció. A més conclogueren que les cèl·lules vegetals tenien més probabilitat d'adquirir diversos T-DNA provenint d'un sol tipus bacterià que de diversos. Més tard, Komari, i col·laboradors (1996), van arribar a les mateixes conclusions treballant amb arròs i tabac. Nombrosos autors han portat a terme aquesta estratègia de co-transformació amb diferents espècies vegetals incloent soja, ordi, tabac o blat de moro (Xing et al., 2000; Matthews et al., 2001; McCormac et al., 2001; Miller et al., 2002)

Recentment, Lu i els seus col·laboradors (2001) van simplificar l'estratègia del doble T-DNA construint un T-DNA amb dues seqüències flanquejants de l'extrem dret del T-DNA (DRB, double right border) entre les que es clonava el gen de selecció. El gen d'interès se situava entre el segon extrem dret i l'extrem de l'esquerra. Els autors van descriure l'obtenció de plantes d'arròs amb diversos gens d'interès i sense gens de selecció a nivell de progènie. I l'equip de Gilbertson (2003), posteriorment va desenvolupar una aproximació amb un T-DNA únic portador del gen d'interès. El gen de selecció es clonava més enllà de l'extrem esquerra del T-DNA (L-border), en la pròpia seqüència del vector binari. Donada la integració de seqüències "no desitjades" del vector binari més enllà del l'extrem esquerre del T-DNA, la integració en *loci*

independents del T-DNA per una banda i del gen de selecció per una altra, va ser possible la segregació de caràcters en la progènie.

3.2.3 - Escissió dels gens de selecció

– Per recombinació de lloc específic

L'habilitat de les recombinases microbianes de lloc específic de tallar el DNA, adherir-s'hi i enclavar-lo en una segona seqüència diana ha permès un àmplia manipulació del DNA en eucariotes superiors. Es tracta de sistemes de dos components en què una recombinasa actua en *trans* per catalitzar la recombinació entre dues seqüències curtes i específiques de DNA. Teòricament, qualsevol seqüència de DNA flanquejada per dues seqüències de reconeixement de l'enzim orientades directament seran delectades en presència de la recombinasa. L'estratègia per eliminar els gens de selecció és la producció de transformants en els que el gen de selecció estigui flanquejat per les seqüències de reconeixement de la recombinasa, i subseqüentment introduir el gen de la recombinasa per una segona transformació genètica o per encreuament sexual.

En qualsevol cas, es podrien identificar en la progènie segregant, plantes lliures de gens de selecció i sense el gen de la recombinasa. Els sistemes de recombinació específica més usats són el sistema Cre/loxP del bacteriòfag P1 (Dale et al., 1990; Odell, 1990; Russell, et al., 1992); el FLP/FRT, de *Saccharomyces cerevisiae* (Lyznik, et al., 1993; Lloyd et al., 1994); el sistema pSR1, de *Zygosaccharomyces rouxii* (Onouchi et al., 1991); i la recombinasa Gin, del fag Mu (Maeser et al., 1991). A la Figura 6 es mostra un esquema del procés d'eliminació del gens de selecció per recombinases de lloc específic, concretament del sistema Cre/lox.

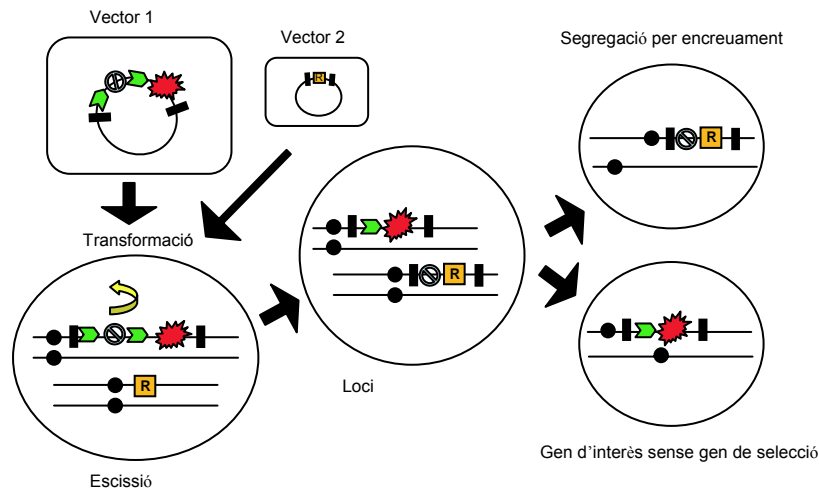


Figura 6. El sistema Cre/lox del bacteriòfag P1 és un sistema de recombinació específica que consisteix en dos components: la recombinasa (Cre) (R) i els seus llocs de reconeixement (loxP) (▶). La recombinasa Cre media events de recombinació causant l'escissió de segments de DNA situats entre dues dianes loxP directament adjacents (Odell et al., 1990). Se situa el gen de selecció (R) flanquejat per dues regions loxP i alhora lligat al gen d'interès (★). Es generen plantes transgèniques que continguin els dos gens, i el gen *cre* és aleshores introduït per retro-encreuament o per pol·linització creuada. Després de l'escissió del gen flanquejat per les dianes loxP del genoma vegetal, l'encreuament pot separar el gen d'interès del gen *cre*. Per tant les plantes transgèniques lliures de gens de selecció s'obtidrien a nivell de T1.

La primera demostració que un gen de selecció va poder ser extret del genoma d'una planta transgènica seguint aquest precepte va ser fa més d'una dècada. Dale i col·laboradors (1991) van escindir el gen *nptII* (kan^R), situat entre dues regions *lox* del genoma de plantes de tabac per l'expressió de la recombinasa Cre. Més tard, treballant amb tabac i *Arabidopsis* es va veure que l'escissió era més eficient en estadis inicials del desenvolupament quan el gen *cre* és introduït per re-transformació que per encreuament pol·línic (Russell, et al., 1992). Posteriorment es va comprovar en tabac, que a través de l'expressió transitòria del gen *cre*, també es podien produir plantes transgèniques lliures de gens de selecció sense encreuament sexual (Gleave et al., 1999).

- Per transposons

Els transposons o elements transposables són seqüències de DNA amb la capacitat de moure's d'una localització genòmica cap a una altra. Un dels transposons més estudiats en genètica vegetal és el sistema *Ac/Ds* de blat de moro (Federoff et al., 1983). L'estratègia per eliminar el gen de selecció es basa en clonar el gen d'interès o el

INTRODUCCIÓ

gen de selecció a l'abast de seqüències transposables de manera que, les dues entitats puguin ser separades entre elles durant una reacció controlada per transposasa, posterior a la transformació genètica i a la selecció, obtenint a nivell de progènie plantes transformades lliures de gens de selecció.

Les dues estratègies s'han aplicat amb èxit. En la primera, el gen de selecció es situa en un element mòbil el qual es perd després de la transposició (Gorbunova et al., 2000). La segona temptativa, situant el gen d'interès en l'element mòbil per allunyar-lo del gen de selecció, s'ha descrit útil en tomàquet (Goldsbrough et al., 1993; Yoder et al., 1994). Aquest reposicionament permet l'expressió dels transgens a diferents posicions genòmiques i conseqüentment a diferents nivells d'expressió, creant una sèrie de plantes amb diferents loci transformats a partir d'un sol event de transformació. Tanmateix, els transposons tendeixen a saltar a posicions lligades en el genoma, esdevenint una tècnica d'eliminació de gens de selecció molt lenta.

A la Figura 7 es mostra un esquema representatiu del procés d'eliminació dels gens de selecció mitjançant l'ús de transposons.

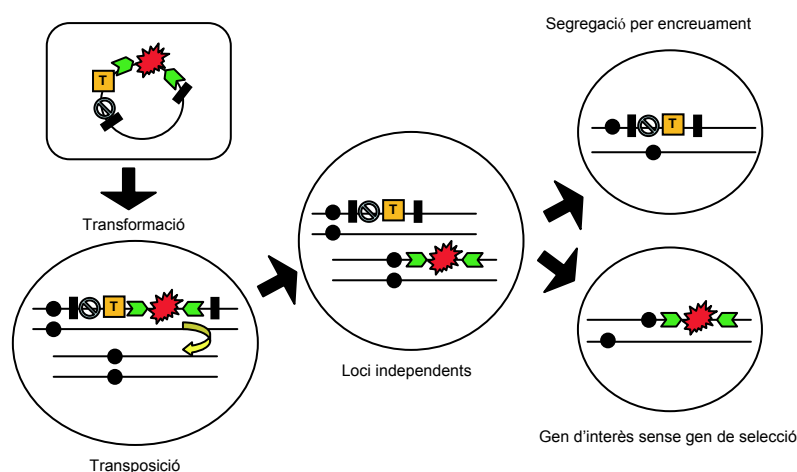


Figura 7. Eliminació del gen de selecció per elements Ds. El d'interès (☀) flanquejat per les seqüències Ds (➤) s'uneix al gen de selecció (⊙) i al gen de la transposasa Ac (T). Després de la transposició del gen d'interès a un locus no lligat, segrega del gen de selecció per encreuament sexual.

- Per recombinació homòloga intracromosòmica

Tot i que la delació de seqüències situades entre repeticions directes per recombinació homòloga (HR) en el genoma és molt baixa (Puchta, et al., 1995), l'equip de Zubco (2000), utilitzant el sistema de seqüències att-P, va obtenir plantes de tabac

lliures de gens de selecció amb una freqüència més alta de l'esperada. Tot i que s'han donat diferents interpretacions a diferents resultats, hi ha moltes incògnites pendents (Paques et al., 1998). L'eliminació de fragments de DNA per recombinació homòloga intra-cromosòmica no requereix l'expressió de recombinases, fet pel qual deixa de ser necessària la segregació de caràcters per l'eliminació del gen que la codifiqui.

3.2.4 Ús de gens de selecció alternatius a les resistències a antibiòtics

Paral·lelament, i en combinació a les estratègies d'eliminació dels gens de selecció, es desenvolupen un nou tipus de gens, anomenats gens de selecció positiva. La raó d'aquests gens és que l'agent de selecció no mata les cèl·lules no transformades tal com passa amb els sistemes de selecció per resistències a antibiòtics i herbicides (selecció negativa).

Hi ha gens de selecció positiva que confereixen un avantatge metabòlic a la cèl·lula transformada afavorint la seva regeneració respecte la gran resta de cèl·lules no transformades. El primer exemple de selecció positiva va ser descrit per Joersbo i col·laboradors (1996) a l'obtenir plantes transgèniques de tabac utilitzant el gen aïllat d'*E.coli* que codifica per la β -glucuronidasa com a gen de selecció. Van substituir la citoquinina del medi de cultiu per un derivat de la benziladenina (citoquinina glucurònide) de manera que només les cèl·lules que l'expressessin podien regenerar.

Altres gens de selecció positiva estan relacionats amb el metabolisme de sucres, com el gen de la xilosa isomerasa, (Haldrup et al., 1998), o el sistema més ben establert, el gen de la manosa isomerasa, (Joersbo et al., 1998; Negrotto et al., 2000). Donada la menor agressivitat dels agents de selecció, en diversos dels treballs citats s'observa un augment significatiu en la taxa de regeneració de plantes (Joersbo et al., 1996; Hohn et al., 2001).

Altres gens de selecció positiva estan relacionats amb el metabolisme de les fitohormones, com els vectors MAT (Multi-Auto-Transformació) (rev. Ebinuma et al., 1997, 2001(b)), en els que es combina la selecció positiva amb diferents tècniques d'escissió de DNA. S'han descrit dos tipus de vectors MAT. El tipus *ipt*, que utilitza el gen de la isopentanol transferasa d'*Agrobacterium tumefaciens* PO22 (Wabiko et al., 1989) com a gen de selecció per regenerar cèl·lules transformades. I el tipus *rol*, que

utilitza un fragment de 7,6 kb amb els gens *rol A,B,C* d'*A.rhizogenes* NIAES 1724 (Kiyokawa et al., 1994). El gen *ipt* codifica per la isopentanol transferasa que catalitza la síntesi de citoquinines causant la proliferació de les cèl·lules transgèniques i l'aparició de brots adventicis. Els gens *rol*, en canvi, són responsables de la proliferació d'arrels en cabellera incrementant la sensibilitat a les auxines. Donat que les plantes que regeneren a partir d'arrels en cabellera presenten fenotips anormals, es va combinar, pels dos tipus de vectors MAT, amb el transposó de blat de moro Ac o amb el sistema de recombinació específica R/RS, per treure aquests gens després de la transformació.

Recentment s'ha descrit la utilització del gen *gfp* com a gen de selecció visual en la producció de civada (*Avena sativa*) (Kaepler et al. 2001), ordi (*Hordeum vulgare*) (Ahlandsberg et al., 1999), arròs (Vain et al 1998) i blat (Jordan 2000).

3.2.5 Altres solucions. Els cloroplasts

La recombinació homòloga entre repeticions directes és una estratègia simple d'escissió de gens de selecció després que les cèl·lules o brots transgènics hagin estat aïllats (seleccionats). En els plastidis, la recombinació homòloga és un fenomen que es dona amb més predominància que en el nucli. Els gens de selecció es flanquegen per repeticions directes pre-dissenyades, en les que tant el número com la longitud influeixen en la taxa d'escissió. A la Figura 8 es mostra l'esquema general del procés.

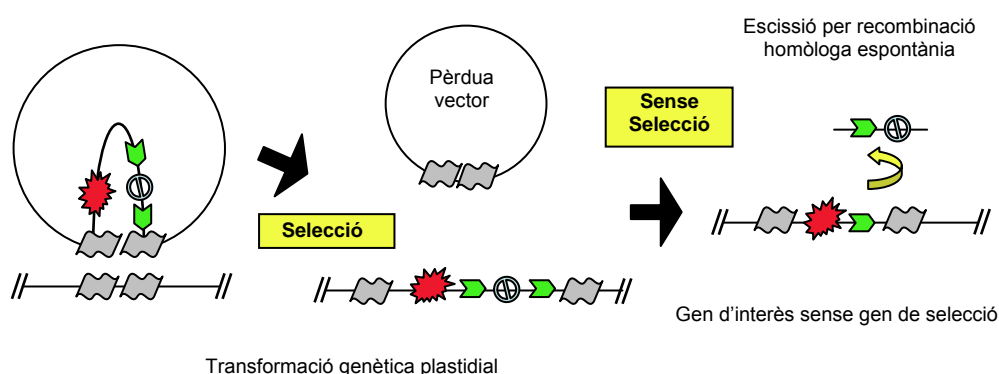


Figura 8. Esquema del procés d'escissió per recombinació homòloga del gen de selecció (⊕) en plastidis. La interacció del DNA forà té lloc per recombinació homòloga de seqüències comunes (), quedant excloses seqüències dels vectors de transformació plastidial fora d'aquestes regions. La incorporació d'aquest DNA és conduïda per la selecció de l'expressió del gen de selecció. Quan es treu l'agent de selecció, el gen que codifica per la resistència a la selecció s'escindeix per recombinació homòloga espontània entre les dues seqüències que flanquegen el gen de selecció (), obtenint-se la cèl·lula transformada amb el gen d'interès (⊲).

La integració del DNA forani en cloroplasts té lloc per recombinació homòloga, entre el DNA extern i el seu lloc diana en planta. Les seqüències homòlogues flanquejants dels dos gens, el de selecció i el d'interès, promouen la seva integració exclouent la integració de la resta de vector de transformació. La integració en el genoma hoste del gen de selecció permet la selecció de les cèl·lules transformades, que un cop aïllades, es deixen de seleccionar, i per fenòmens de recombinació homòloga espontània, s'eliminen les seqüències codificants pel gen de selecció, flanquejades per repeticions directes. Les primeres cèl·lules seran heteroplastídiques en el sentit que tindran una mescla de plastidis, amb i sense gens de selecció. Quan es troben els dos tipus de plastidis en una mateixa cèl·lula, les repetides divisions cel·lulars donen lloc a dues poblacions de cèl·lules amb continguts homogenis de plastidis, amb i sense gens de selecció.

Aquesta estratègia s'ha aplicat amb èxit en plastidis de tabac ja que es van obtenir plantes transplantòmiques sense gens de selecció (Iamtham et al., 2000). Tanmateix, aquest procediment només és viable en espècies en les que s'hagi posat a punt un protocol eficient d'obtenció de plantes transplantòmiques.

Alguns autors han intentat avaluar conjuntament les estratègies descrites en els apartats anteriors. Així, per exemple, en una revisió de 10 publicacions (Goldsbrough, 2001) en què es descriuen estratègies de co-transformació per *Agrobacterium* (Depicker et al., 1985; Petit et al., 1986; De Framond et al., 1986; Simpson et al., 1986; McKnight et al., 1987; De Block et al., 1991; Komari et al., 1996; De Neve et al., 1997; De Buck et al., 1998; Daley et al., 1998) amb vuit espècies vegetals diferents (tabac, pastanaga, lotus, *Arabidopsis*, civada, tomàquet, mostassa i arròs), les taxes de co-transformació variaven del 14% al 90%. Només en cinc publicacions es presenten dades de segregació en les plantes descendents. En els 5 casos, es descriu algun event primari de co-transformació en què els T-DNA es van integrar en *loci* no lligats, confirmant la validesa de l'estratègia de la co-transformació per eliminar els gens de selecció de plantes transgèniques. Tanmateix no hi ha prou dades per treure conclusions a l'hora de portar a la pràctica les estratègies, degut a les metodologies de transformació usades, a les soques d'*Agrobacterium*, als plàsmids i a les espècies empleades.

En el treball de Komari (et al., 1996), treballant amb arròs i tabac, va obtenir eficiències de co-transformació similars experimentant amb les tres variants de

l'estratègia. Tot i que amb un vector superbinari (amb dos T-DNA) obtenia una co-transformació lleugerament superior que usant dos vectors en una soca bacteriana o dues soques bacterianes, cadascuna portadora d'un plàsmid diferent, la freqüència de segregació independent en la progènie van ser majors en la mescla de dues soques bacterianes.

En una revisió de 16 treballs referits a la co-transformació per mètodes de transformació directa (Goldsbrough, 2001) i en la que es van experimentar deu espècies diferents (tabac, petúnia, *Arabidopsis*, blat de moro, soja, arròs, mostassa, ordi, pèsol i blat) es van descriure freqüències de co-transformació que oscil·laven entre 18-100%. Les dades de segregació de la progènie de les plantes co-transformades es van limitar de nou a cinc publicacions, tanmateix, només en una (Herve et al., 1993) es descriu segregació independent dels gens, i va ser per electroporació de protoplast de mostassa.

Els mètodes d'escissió com els transposons o les recombinases de lloc específic poden presentar diverses limitacions en línies transformants que continguin múltiples còpies dels gens, integrades en un o diferents *loci*, de manera complexa, donat que es podrien donar fenòmens de translocació, inversions i delecions cromosòmiques, dependent de les estructures i de les localitzacions cromosòmiques del DNA insertat. Probablement seria necessari fer una pre-selecció dels primers transformants, triant els casos d'integració simple i preferiblement en un sol *locus* (Dale et al., 1991; Lyznik 1996).

Amb el propòsit d'eliminar els gens de selecció usualment s'utilitza la transformació genètica per *Agrobacterium* donada la major freqüència d'integració separada de dos gens que no pas mitjançant la transferència directa de DNA. Sobre les diferents estratègies de co-transformació s'han donat resultats molt dispars, essent difícil establir un consens final que permeti dir quin és el millor sistema. A més, en la literatura se solen provar les estratègies amb plantes models, que poden resultar molt diferents de les varietats relatives cultivades (comercials).

Fins ara, la co-transformació continua semblant l'estratègia més simple de totes i pot ser portada a terme per diferents vies alhora que es pot aplicar per diferents mètodes de transformació.

4. EL FLUX DE GENS

Un dels riscos potencials que s'atribueixen a les plantes transgèniques és que d'alguna manera podrien danyar el medi ambient degut a la dispersió dels transgens a través del pol·len ja sigui cap a camps veïns o a males herbes compatibles. En base a poder garantir la coexistència entre cultius transgènics, convencionals i ecològics, cal estudiar doncs, per a cada un dels conreus, fins a quin punt la pol·linització creuada pot donar-se i en cas afirmatiu, quines mesures de seguretat es podrien prendre per minimitzar-la.

En aquest sentit, la nova normativa europea sobre OMGs defineix la coexistència com el dret que tenen tots els agricultors a poder escollir entre cultius transgènics, tradicionals o ecològics (Comission Recommendations). En aquesta normativa també s'estableix un llindar (0.9%) per sobre del qual els productes que continguin una proporció més alta de transgènics s'hauran d'etiquetar com a tal (1829/2003 i 1830/2003). Dins d'aquest marc, la disseminació dels gens introduïts als camps veïns deguda a la pol·linització creuada (anomenada flux de gens) adquireix una importància econòmica i social, a més de la que podria tenir des del punt de vista ambiental.

Tot i que el flux de gens ha adquirit una major importància des de l'aparició de les plantes transgèniques, l'interès en estudiar-lo per exemple en la producció de llavors i línies pures, ha estat patent des de fa molts anys. En les primeres aproximacions a la mesura del flux de gens s'utilitzaven anàlisis de marcadors genètics (Slatkin 1985), proves d'exclusió paternal (Ellstrand et al., 1989; Ellstrand 1992; Friedman et al., 1985; Adams et al., 1990) o per microsatèl·lits (Dow et al., 1998). Més recentment, per estudiar el flux, en i amb plantes transgèniques, es proposen l'ús de marcadors visuals com la proteïna GFP per mesurar, mitjançant l'expressió en planta sencera, el flux gènic en condicions de camp (Stewart, 1996; Leffel et al., 1997; Harper et al., 1999), o el mateix gen amb promotors específics de pol·len per fer-ne un seguiment amb trampes de pol·len (Hudson et al., 2005).

4.1 Flux de gens en arròs

L'arròs és una planta autògama, sent l'arquitectura floral la que determina en gran part que s'autopol·linitzi. Així l'hora del dia en que s'obra la flor i el temps que roman

oberta depèn de les condicions d'humitat i temperatura. La disseminació del pol·len d'arròs es considera molt baixa doncs les anteres l'alliberen abans o quan la lemna i la palea s'obren, per tant la majoria dels grans de pol·len cauen sobre l'estigma de la mateixa flor.

A més, la viabilitat del pol·len d'arròs és baixa (Yoshida, 1981), i el moviment horitzontal del pol·len és limitat de tal manera que una distància de 10 m d'aïllament es considera suficient en la producció de llavors híbrides per evitar la contaminació per pol·len dels camps adjacents (Khush, 1993). Així però, la pol·linització creuada és possible i té lloc en certa proporció.

El flux de gens entre les varietats cultivades d'arròs i/o varietats salvatges emparentades ha estat recentment revisat per Ellstrand i col·laboradors (1999). El grau de pol·linització creuada es generalment més alt en les varietats del tipus *indica* i les varietats salvatges que en les del tipus *japonica* (Oka, 1988). Lord (1935) va trobar que en dos zones climàtiques diferents de Sri Lanka la freqüència natural d'encreuament variava entre el 0.34 i el 0.67%, mentre que Brown (1957) va detectar a Malàisia un 0.41% de pol·linització creuada. Srinivasan i col·laboradors (1961) varen trobar valors entre el 0.04 i el 0.03% a l'Índia en unes distàncies que variaven entre 1.8 i 2.1 m de l'agent pol·linitzador. Reano i col·laboradors (1998) demostraren que la pol·linització creuada pot tenir lloc depenent de la varietat i del sistema de plantació utilitzat.

Més recentment s'han fet servir plantes transgèniques d'arròs resistents a herbicides per quantificar el flux de gens entre plantes transgèniques i no transgèniques de la mateixa varietat. Així, en un assaig de camp realitzat a l'Estació Experimental del Delta de l'Ebre de l'IRTA (Amposta) (Messeguer et al., 2001) es va sembrar un nucli de plantes transgèniques d'arròs de la varietat mediterrània Thaibonet (que tenien el gen *pat* (Wohlleben et al., 1988), que confereix resistència a l'herbicida glufosinat d'amoni). Aquest nucli es va envoltar per dos cercles a 1 i 5 m de distància de plantes no transgèniques de la mateixa varietat. Totes les espigues produïdes per les plantes no transgèniques es varen collitar planta per planta, anotant la posició que ocupaven en el camp. L'anàlisi de les llavors va permetre detectar un flux genètic lleugerament inferior al 0.1% a la distància d'1 m del nucli central. També es va detectar una distribució molt asimètrica del flux en aquest cercle, on els valors més alts (0.53%) es detectaren en la direcció del vent dominant. Un valor significativament més baix (0.01%) de flux es va

detectar al cercle de 5 m el que era d'esperar tenint en compte les característiques del pol·len d'arròs. Així doncs, tots aquests estudis demostren que encara que hi ha un cert grau de pol·linització creuada entre varietats cultivades i/o silvestres, aquest és força baix.

4.2 L'arròs salvatge

Als camps d'arròs sovint apareix una mala herba compatible amb les varietats comercials, anomenada arròs salvatge o arròs roig degut a que freqüentment presenta una coloració vermellosa al pericarp. Investigacions basades en isoenzims, RFLP, RAPD i SSR mostren que les diferents soques d'arròs salvatge poden ser diferenciades en tipus *japonica* i *indica*, suggerint un origen comú amb les varietats cultivades (Cho et al., 1995; Suh et al 1997; Bres Patry et al., 2001, 2002). Malgrat això l'anàlisi per SSR ha revelat també la presència d'al·lels que no es troben en la col·lecció més representativa de les varietats cultivades a Àsia (Bres Patry et al., 2002).

L'arròs salvatge exhibeix una sèrie de trets associats al caràcter de “mala herba” com el vigor, la precocitat i la dehiscència i dormància de les llavors, que asseguren la dispersió i la seva permanència als camps. Per aquestes raons la presència d'arròs salvatge ha esdevingut una qüestió de gran importància econòmica degut a les pèrdues de producció i sobre tot de qualitat que provoca.

Les rotacions de cultius i els tractaments amb herbicides tenen un efecte limitat sobre aquesta mala herba. Per això, l'ús de plantes transgèniques d'arròs resistents a un herbicida podria ser una solució a aquest problema, sempre i quan no hi hagués o es pogués minimitzar el flux genètic de l'arròs transgènic a aquestes males herbes. Així doncs, amb l'aparició de la enginyeria genètica, l'avaluació del risc de flux genètic cap a l'arròs salvatge ha adquirit més importància.

Les diverses soques d'arròs salvatge es poden creuar amb les varietats cultivades produint híbrids fèrtils (Langevin et al., 1990; Noldin et al., 1999). Després d'analitzar 12000 llavors d'arròs salvatge collides en camps de cultiu de 6 varietats diferents es va estimar que les taxes d'hibridació natural entre l'arròs salvatge i les varietats cultivades variaven entre el 1.08% i el 52.18% (Langevin et al., 1990). Les diferències trobades entre varietats s'atribuïren a les diferents dates de floració. Wheeler i

col·laboradors (2000) varen fer un assaig per determinar la freqüència en que el gen *pat* (resistència a glufosinat d'amoni) es transferia a l'arròs salvatge, mitjançant encreuaments amb l'arròs transgènic portador d'aquest gen. Utilitzant tres varietats transgèniques resistents a l'herbicida i vuit ecotips d'arròs salvatge, varen trobar que les descendències de l'arròs salvatge sobreviuen al tractament amb glufosinat en totes les combinacions assajades. La freqüència d'encreuament variava entre el 0.8 i el 19.7% depenent dels ecotipus d'arròs salvatge i de les varietats d'arròs cultivada.

Per altra banda, Oard i col·laboradors (2000) varen estudiar els caràcters fenotípics de la descendència obtinguda fent encreuaments entre plantes transgèniques portadores del gen *bar* (resistència al glufosinat d'amoni) i l'arròs salvatge, conclouent que la transferència del gen *bar* a aquesta mala herba no alterava ni el seu vigor ni els trets de dormància o dehiscència, els quals estan associats a l'aptitud reproductora d'aquesta mala herba.

En canvi, en un treball similar realitzat per l'equip de Noldin (2004) en l'avaluació fenotípica de la generació F₂ sí que es varen trobar, en alguns casos, diferències significatives tant en el vigor com en la dehiscència de les llavors.

Per tal d'avaluar el flux de gens en condicions de camp entre l'arròs transgènic l'arròs salvatge es va realitzar un segon assaig de camp a l'Estació Experimental del Delta de l'Ebre de l'IRTA (Amposta) (Messeguer et al, 2004). Al igual que en el primer assaig descrit anteriorment, es va fer servir un disseny circular, però en aquest cas el cercles concèntrics estaven situats de dins cap a fora en el següent ordre: el cercle interior de 3 m de diàmetre es va plantar amb plantes de la varietat Sènia no transgèniques, envoltades per un cercle de plantes d'arròs salvatge, les quals estaven envoltades per dos cercles de plantes transgèniques portadores del gen *bar* (resistència al glufosinat d'amoni), un altre cercle de plantes transgèniques i finalment un cercle de Sènia no transgènica. A més, per tal de confirmar els resultats obtinguts en el primer assaig, es varen afegir en les 8 direccions de la rosa dels vents, grups de 8 plantes Sènia no transgènica situats a 1, 2, 5 i 10 m de distància. Amb l'anàlisi de les descendències obtingudes es varen detectar unes taxes d'encreuament de 0.036 + 0.0006% i 0.086 + 0.007 % per l'arròs salvatge i Sènia no transgènica respectivament. Nogensmenys, per ambdós tipus de plantes es va detectar una clara distribució asimètrica deguda a la influència del vent dominant. Per altra banda el flux detectat en les plantes situades a 1,

2, 5 i 10 m de distància disminuïa a mida que augmentava la distància, sent la disminució menys dramàtica en la direcció del vent dominant.

Dels estudis descrits anteriorment es dedueix que hi ha una certa taxa d'encreuament cap a l'arròs salvatge que depèn de diversos factors com l'ecotipus d'arròs salvatge, la varietat, i les condicions meteorològiques, sobretot la influència del vent. Hi ha però alguns aspectes en els que cal aprofundir. Els assaigs realitzats fins ara o bé es basen en la pol·linització manual o bé en situar les plantes d'arròs salvatge al costat de les altres.

Cal però quantificar el flux que s'obtidria si aquestes plantes estiguessin situades entremig del camp o bé fora del camp (per exemple als marges). Un altre aspecte és esbrinar fins a quin punt en condicions de camp, es dona una introgressió real dels transgens en l'arròs salvatge i veure fins a quin punt les tècniques culturals que habitualment es fan servir per controlar aquesta mala herba podrien evitar la introgressió.

El primer punt és l'objectiu principal de l'assaig de camp que es presenta en aquesta tesi mentre que per estudiar la introgressió en funció de les tècniques culturals es va iniciar un altre assaig de camp l'estiu de l'any passat. En aquest assaig, de tres anys de durada, s'estan utilitzant les línies transgèniques $bar+$ i $gfp+bar+$, descrites en l'apartat 1.3 de resultats d'aquesta tesi.

OBJECTIUS

A. Estudi de diferents estratègies de transformació que permetin eliminar els gens de selecció en plantes d'arròs de la varietat comercial Sènia.

Establir una estratègia de transformació d'arròs que permeti incorporar el gens d'interès i el de selecció en diferents *loci* per posteriorment obtenir, per segregació de caràcters, plantes d'arròs que només continguin el gen d'interès. Per fer-ho es provaran diferents estratègies de co-transformació tant per *Agrobacterium tumefaciens* com per biolística, utilitzant els gens marcadors *uidA* i *gfp*.

A.1 Avaluació per transformació amb *Agrobacterium tumefaciens* de les següents estratègies:

- Inoculació amb dos cultius bacterians, cadascun portador d'un tipus de plàsmid T-DNA i gen marcador (*uidA* o *gfp*). Seguint aquesta estratègia també es volia provar si un decalatge de temps entre una i altra inoculació podria afavorir la integració separada en el genoma hoste dels dos transgens.
- Inoculació amb un cultiu bacterià portador d'ambdós plàsmids T-DNA, cada plàsmid amb un gen marcador diferent.
- Inoculació amb un cultiu bacterià, amb un únic plàsmid, portador de dos T-DNA (2T-DNA).

A.2 Avaluació de la viabilitat de la transferència directe de "cassettes" d'expressió i el possible efecte del decalatge de temps en l'eficiència de co-transformació. Ús de dos T-DNA lineals, un amb el gen de selecció i l'altre amb un gen marcador.

B. Obtenció de plantes d'arròs portadores d'un gen d'interès, el gen *cry1B* que confereix resistència al barrinador de l'arròs (*Chilo suppressalis*).

C. Determinació de l'existència, i en el seu cas, el grau de flux gènic en plantes d'arròs.

C.1. Confirmar l'efecte de la distància i dels vents dominants en l'encreuament entre plantes transgèniques i plantes no transgèniques de la mateixa varietat d'arròs.

C.2. Avaluar la taxa d'encreuament amb l'arròs salvatge situat entremig del camp o bé a diferents distàncies per tal de poder establir les bases de coexistència, evitant o minimitzant l'encreuament amb plantes situades als camps adjacents o als marges.

MATERIAL I MÈTODES

A. MATERIALS

1. MATERIAL BIOLÒGIC

1.1 Material vegetal

El material vegetal de partida per realitzar els assaigs de transformació per l'estudi de diferents estratègies per eliminar el gen de selecció van ser llavors d'arròs (*Oryza sativa* L., *japonica*) de la varietat Sènia. Aquesta varietat, clàssicament cultivada al Delta de l'Ebre, va ser obtinguda el 1969 per encreuament de Sequial i Bahia 553 al "Departamento de Arroz" de l'IVIA. Les llavors utilitzades en cada assaig eren llavors madures, recollides i certificades durant la campanya de producció al Delta de l'Ebre de l'any anterior.

Pels assaigs de camp per l'avaluació de flux de gens, les plantes no transgèniques eren llavors certificades de la varietat comercial Sènia. Les plantes d'arròs salvatge s'obtingueren a partir de llavors collitades de plantes seleccionades a l'EEE d'Amposta i que presentaven les característiques pròpies d'aquesta mala herba: més vigor que les varietats comercials, dehiscència de les llavors i coloració vermellosa del pericarpí. La línia de plantes transgèniques es va obtenir al nostre laboratori per transformació genètica de la varietat Sènia amb la soca EHA105 portadora del plàsmid pCAMBIA 3301 segons la tècnica descrita per Pons i col·laboradors (2000). Aquest plàsmid conté els gens *uidA* (seqüència codificant de la β -glucuronidasa i també el gen *bar* que codifica per la fosfotricina acetil transferasa i que confereix resistència a l'herbicida glufosinat d'amoni. L'expressió dels dos gens està dirigida pel promotor constitutiu CaMV35S (Figura 12).

1.2 Bacteris

Per realitzar els diferents assaigs de transformació genètica en arròs es va treballar amb dues soques desarmades d'*Agrobacterium tumefaciens*, EHA 105 (Hood et al., 1993) i LBA 4404 (Hoekema et al., 1983). Tot i que EHA 105 té un fons cromosòmic de la soca C58 i LBA 4404 el té de la TiAch5, les dues tenen un gen marcador cromosòmic de selecció de soca, la Rifampicina (Hellens et al., 2000 (a)).

Per l'amplificació i obtenció de DNA plasmídic es va utilitzar la soca d'*E.coli* DH5 α .

2. DNAS I PLÀSMIDS

2.1 Plàsmids i construccions

Els vectors utilitzats en els assaigs de transformació amb *Agrobacterium tumefaciens* van ser plàsmids comercials de CAMBIA (Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture, Camberra, Australia, <http://www.cambia.org>):

- pCAMBIA 1301. El T-DNA del vector conté el gen que confereix resistència a la Higromicina per la planta i el gen marcador *gus* amb el promotor constitutiu 35SCaMV. La selecció en bacteri és per Kanamicina, el gen *nptII* es troba fora del T-DNA (Figura 9A).
- pCAMBIA 1302. El T-DNA conté la resistència a la Higromicina per la planta i el gen marcador *gfp* amb el promotor constitutiu 35SCaMV. La selecció en bacteri és per Kanamicina (Figura 9B).

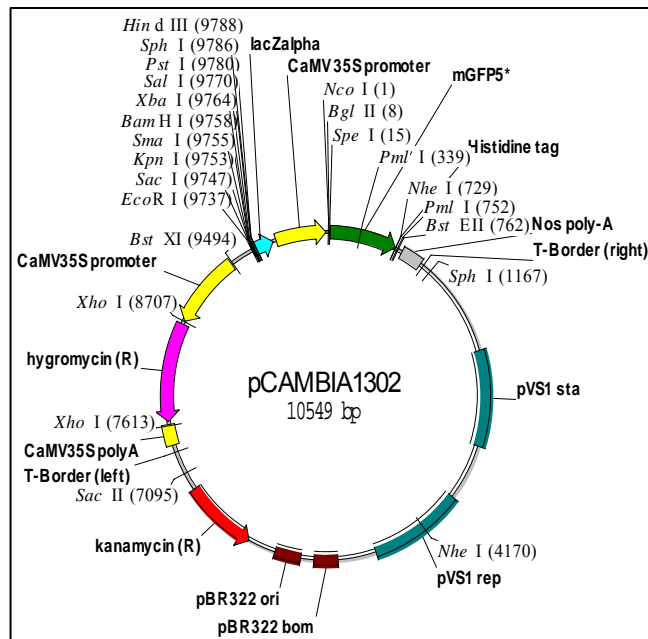
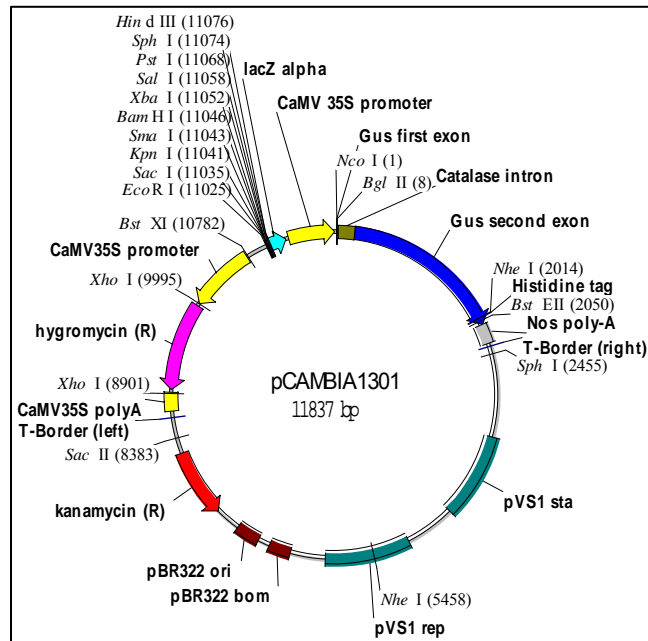


Figura 9. A, esquema del vector comercial pCAMBIA 1301, amb el gen marcador que codifica per l'enzim GUS. B, esquema del vector comercial pCAMBIA 1302, amb el gen marcador *gfp*. A la regió compresa entre les seqüències flanquejants del T-DNA (T-borders) de cada plàsmid es troba el gen de selecció per planta que confereix resistència a la Higromicina i les múltiples dianes de clonació que es detallen en cada cas. Fora del T-DNA es troba el gen de selecció bacteriana que confereix resistència a la Kanamicina (en els dos casos) i l'origen de replicació de cada plàsmid.

- pCAMBIA 1201. El T-DNA del vector conté la resistència a la Higromicina per la planta i el gen marcador *uidA* amb el promotor constitutiu 35SCaMV. A diferència dels vectors anteriors la selecció en bactèria és per l'antibiòtic Cloramfenicol (Figura 10).

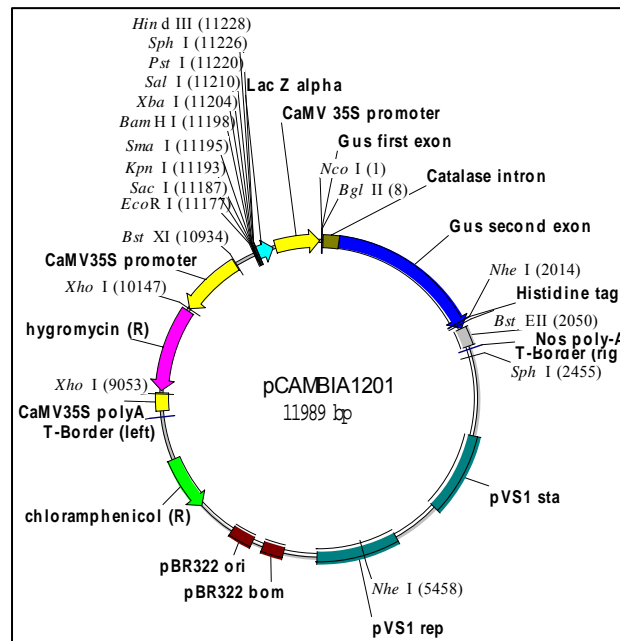
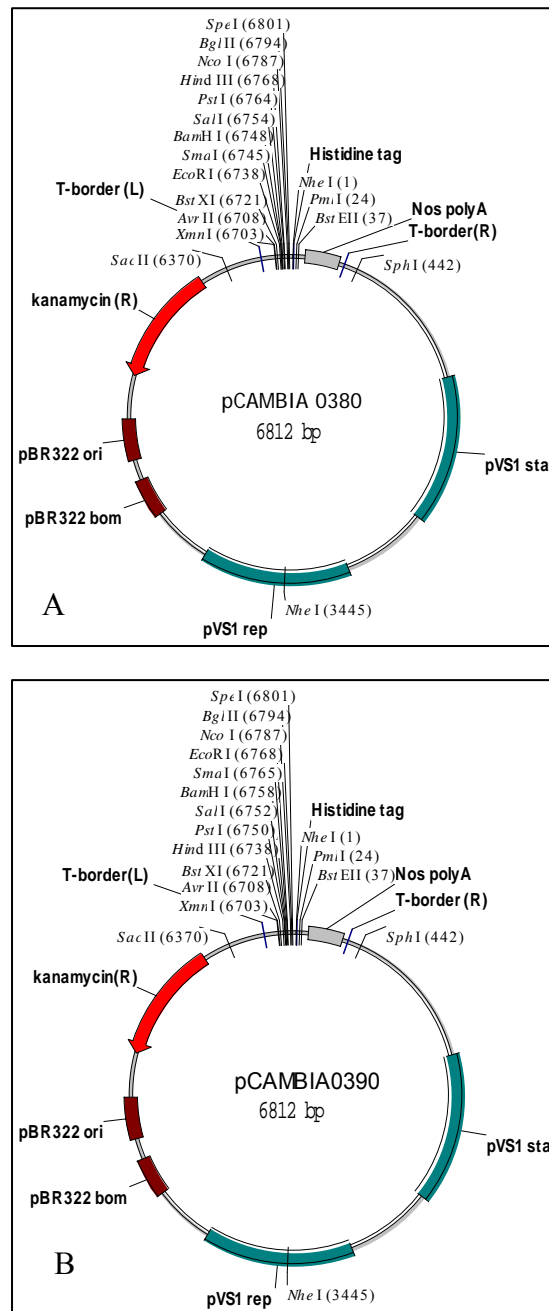


Figura 10. Esquema del vector comercial pCAMBIA 1201. A la regió delimitada pels extrems dret i esquerre (T-borders) es troba el gen de resistència a Higromicina per selecció de planta, el gen marcador *uidA* (GUS). Fora del T-DNA es troba el gen de selecció bacteriana que confereix resistència al Cloramfenicol.

- pCAMBIA 0380 i pCAMBIA 0390. La diferència entre els dos vectors radica en les regions clonatge múltiple “polilinkers”. Mentre el del pCAMBIA 0380 derivava del pUC8 el del 0390 ho fa del pUC9 (Figura 11). Ambdós plàsmids tenen fora del T-DNA el gen *nptII* que confereix a la bactèria portadora resistència a la Kanamicina. La mida dels dos vectors és la mateixa (6812pb).



Figures 11. A, esquema del vector comercial pCAMBIA 0380 i B, esquema del vector pCAMBIA 0390. Es pot observar com la única diferència entre ells és la situació de les dianes de restricció del polilinker.

- pCAMBIA 3301. El T-DNA del vector conté el gen que confereix resistència a la fosfotricina per selecció de planta (i el gen marcador *uidA* amb el promotor constitutiu 35SCaMV. I la selecció en bactèria és per l'antibiòtic Kanamicina (Figura 12). Amb aquest plàsmid es van obtenir les plantes d'arròs utilitzades en els assaigs de flux de gens S1B.

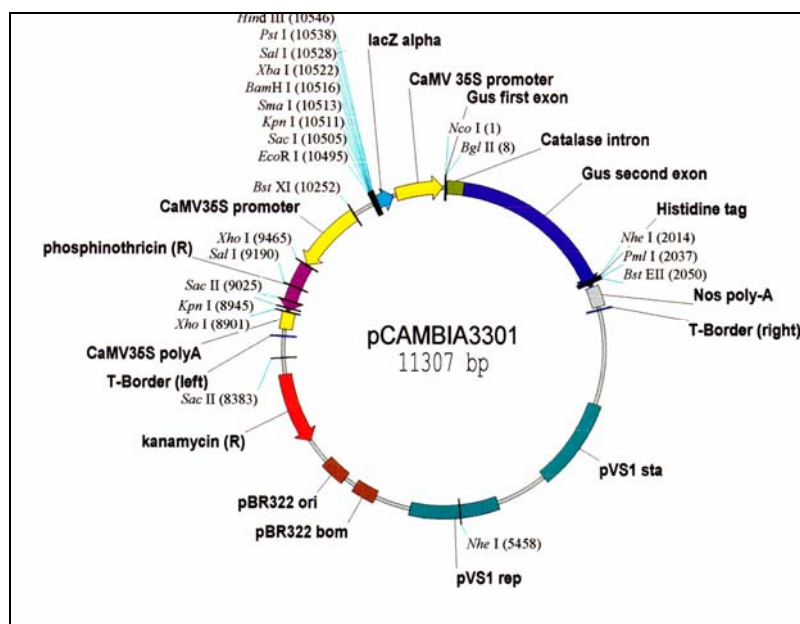


Figura 12. Plàsmid pCAMBIA 3301 utilitzat per transformar arròs de la varietat Sènia per portar a terme els assaigs de flux. En la regió compresa entre els extrems flanquejants del T-DNA es troben els gens de selecció per planta, resistència a la fosfinitricina i el gen marcador *uidA* (GUS).

- pX₂H. Plàsmid derivat del pCAMBIA 5300, portador de dos T-DNA, cedit pel departament “Biotrop and Crop Protection Programmes” del CIRAD de Montpellier. El T-DNA flanquejat pels extrems d’*Agrobacterium tumefaciens* porta la resistència a la Higromicina per la planta i el gen marcador *Sgfp65T* (Heim et al. 1995) sota el control del promotor constitutiu específic per arròs *gos2* (de Pater et al., 1992). Figura 13A
- pX₂-HB. Plàsmid portador de dos T-DNA, derivat del plàsmid pX₂-H, cedit pel departament “Biotrop and Crop Protection Programmes” del CIRAD de Montpellier. Un dels T-DNA conté els gens de selecció *hpt* i el gen marcador *Sgfp65T*, els dos dirigits per promotors constitutius (35SCaMV i *Gos2* resp.) i està flanquejat per les zones limitants (L-border i R-border) d’*Agrobacterium tumefaciens*. L’altre T-DNA conté el gen *bar* dirigit pel promotor constitutiu del gen de la ubiquitina 1 de blat de moro (*ubi*) (Christiansen et al., 1992) i està limitat pels extrems d’*Agrobacterium rhizogenes*. La selecció pel bacteri és per Kanamicina. Figura 13B.

- pX2-HCryIB, derivat del plàsmid pX2-HB, cedit pel departament de Genètica Molecular del CSIC de Barcelona. Conté en un dels T-DNA el gen de la proteïna *Sgfp65T* i el de la resistència a Higromicina. L'altre T-DNA conté el gen *cryIB*, que codifica per una δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* dirigit pel promotor induïble del gen *mpi* de blat de moro (Cordero et al., 1994). Figura 13C.

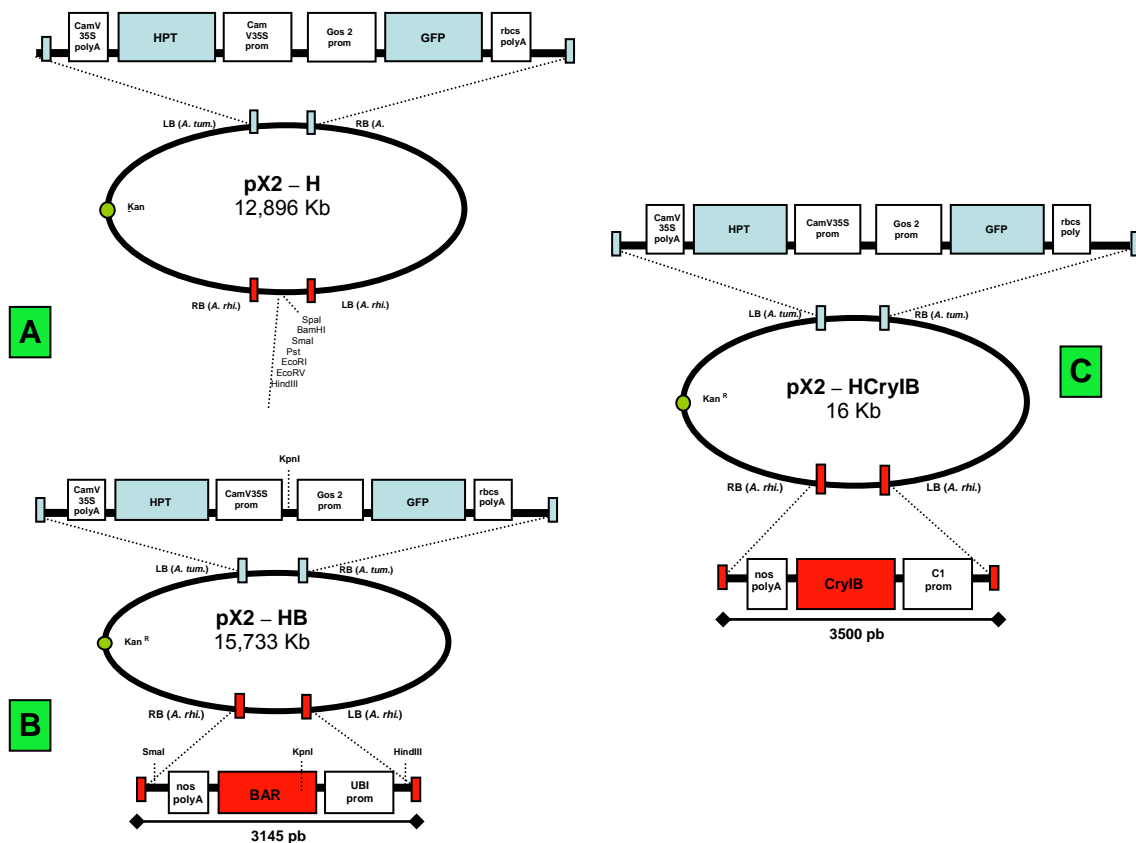


Figura 13. Representació gràfica dels plàsmids portadors de dos T-DNA utilitzats en aquest treball. A. Representació esquemàtica del vector pX2-H, intermediari en el processament dels plàsmids pX2-HB i pX2-HCryIB. Conté en el T-DNA flanquejat pels extrems d'*Agrobacterium tumefaciens* el gen *hpt* de selecció en planta conferint resistència a la Higromicina i el gen marcador *gfp*. La mida total del plàsmid de 12896 pb. B. Plàsmid pX2-HB, amb dos T-DNA, el flanquejat pels extrems d'*Agrobacterium tumefaciens* és el mateix que en pX2-H, i el flanquejat pels extrems d'*Agrobacterium rhizogenes* és portador del cassette d'expressió del gen *bar*. C. Plàsmid pX2-HCryIB, amb dos T-DNA, el portador del gen de selecció i el gen marcador comú als anteriors i el segon T-DNA és portador del gen *cryIB*. C1 és un fragment de 900 pb corresponent al fragment del gen *mpi* de blat de moro.

- Plàsmid pUC19 35S::*gfp*::*tnos* cedit per l'equip d'investigació dirigit per Blanca San Segundo del CSIC. La seqüència *gfp* que està clonada en aquest vector prové de la *gfp* descrita per Haseloff (1997), la *m-gfp-5-ER*, en la que es va eliminar la seqüència que codifica pels pèptids N i C terminals per la translocació i retenció de la proteïna GFP en el reticle endoplasmàtic respectivament. La correcta localització de la proteïna en el citoplasma de cèl·lules vegetals havia estat ja comprovada en el CSIC. Figura 14.

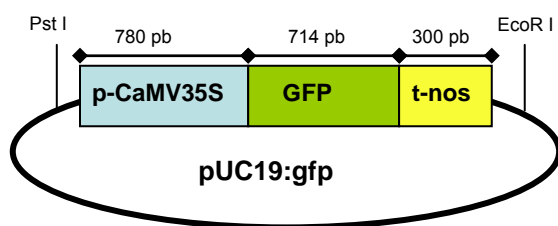


Figura 14. Representació esquemàtica del plàsmid pUC19:gfp. La mida total del plàsmid és de 4 Kb.

- Plàsmid pILTAB 227 (ILTAB, EEUU) portador del cassette CaMV35S:hpt:*tnos*, flanquejat per les dianes dels enzims de restricció Sma I i HindIII, com es pot veure a la Figura 15.

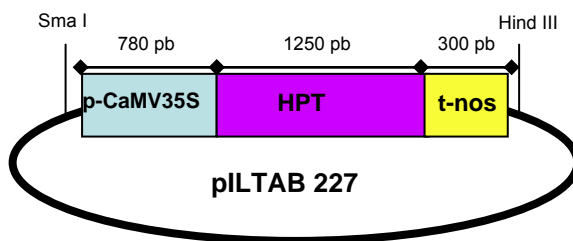


Figura 15. Representació esquemàtica del plàsmid pILTAB 227. La mida total del plàsmid és de 5,1 Kb.

2.2. Oligonucleòtids

Les seqüències dels encebadors per amplificar el diferents fragments de DNA utilitzats en aquest treball mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) van ser:

T-DNA-f 5' CGC GGT CGA CCA GCA ACG CTC TGT CAT CGT TA 3'
 T-DNA-r 5' CGC GGT CGA CGC GAC TAA AAC ACG CGA CAA GA 3'

GFP-f	5' - GAA GGT GAT GCA ACA TAC GGA A - 3'
GFP-r	5' - GAT TGT GTG GAC AGG TAA TGG - 3'
GUS-f	5' - GGT GGG AAA GCG CGT TAC AAG -3'
GUS-r	5' - GTT TAC GCG TTG CTT CCG CCA - 3'
BAR-f	5' - GCA GGA ACC GCA GGA GTG GA -3'
BAR-r	5' - AGC CCG ATG ACA GCG ACC AC -3'
CRYIB-f	5' GCC AGA TCG ATC ATA TCG TCA 3'
CRYIB-r	5' GTT GCC GTA CTT GAG CTC GT 3'
HPT-f	5' CTG AAC TCA CCG CGA CGT C 3'
HPT-r	5' TCT ACA CAG CCA TCG GTC C 3'

3. MEDIS DE CULTIU I SOLUCIONS GENERALS

3.1 Bacterians

YEB (Vervliet et al., 1975)

Extracte de bou	0,5%
Extracte de llevat	0,1%
Peptona	0,5%
Sacarosa	0,5%
MgSO ₄	0,05%

SSC20X

NaCl	3 M
Citrat trisòdic deshidratat	0,3 M

TAMPÓ TE

Tris-HCl pH 8	50 mM
EDTA	5 mM

SOB (Hanahan, 1983)

Bactotripton	2%
Extracte de llevat	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM

TAMPÓ PBS

NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM

LB (Luria et al. 1960)

Bactotripton 10%
NaCl 10%
Extracte de llevat 5%

PH	7,4
----	-----

3.2 En l'obtenció de plantes transgèniques d'arròs

Composició general dels medis de cultiu

	N6	N60	N6-PR	N6-R	N6-Canó
Macroelemets (ml/l)	100	100	100	100	100
Microelements (ml/l)	10	10	10	10	10
FeNaEDTA (ml/l)	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7
Tiamina (ml/l)	4	4	4	4	4
Myo-inositol (mg/l)	100	100	100	100	100
Hidrolitzat de caseïna (mg/g)	300	300	300	300	300
Prolina (mg/l)	500	500	500	500	500
Glutamina (mg/l)	500	500	500	500	500
2,4-D (ml/l)	18,2	-	-	-	18,2
AIA (ml/l)	-	-	2,85	2,85	-
ABA (mg/l)	-	-	10	-	-
BA (ml/l)	-	-	13,26	13,26	-
Manitol (g/l)	-	-	-	-	72,88
Sorbitol (g/l)	-	-	-	-	72,88
Sacarosa (g/l)	30	30	30	30	30
Gelrite (g/l)	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6

Composició específica dels medis de cultiu

Composició dels MACROELEMENTS N6 (100ml/l)

Stock (10X)	g/l
KH ₂ PO ₄	4
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,66
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,85
KNO ₃	28,3
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,63

Composició dels MICROELEMENTS MS (Murashige i Skoog, 1962) (10ml/l)

Stock (100X)	g/l
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2,23
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,86
H ₃ BO ₃	0,62
KI	0,083
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0025
CoCL ₂ ·6 H ₂ O	0,0025

Suplements dels medis de cultiu

FeNaEDTA 2,5g/l

Vitamina B1 o Tiamina $1 \cdot 10^{-4}$ M

2,4-D (2,4-Dicloroferroacètic) $5 \cdot 10^{-4}$ M (Auxines dissoltes en etanol de 96°)

AIA (Àcid 3-indolacètic) $1 \cdot 10^{-3}$ M (Auxines dissoltes en etanol de 96°)

BA (6-Benzilaminopurina) $1 \cdot 10^{-3}$ M (Citoquinines dissoltes en HCl 0,5N)

ABA 1mg/ml (Àcid abscísic dissolt en NaOH 1N)

Rifampicina (Rif) 100 mg/l

Higromicina (H) 40 mg/l

Kanamicina (Kan) 50 mg/l

Cefotaxima (Cf) 250 mg/l

Àcid clavulànic (T) 100 mg/l

Acetosiringona (AC) 19,62 mg/l

B. MÈTODES**1. RELACIONATS AMB ELS ÀCIDS NUCLÈICS****1.1 Extracció de DNA genòmic**

L'extracció de DNA utilitzat per realitzar les amplificacions per PCR es va realitzar adaptant el protocol de Doyle i Doyle (1987).

- Introduir una fulla jove o cotiledó en un tub eppendorf d' 1.9 ml
- Triturar la mostra amb N₂ líquid
- Afegir 600 µl de tampó d'extracció calent
- Vórtex i incubar al bany de 60-65° durant 30 min
- Afegir 600 µl de cloroform:isoamil (24:1) i fer un vórtex
- Centrifugar 10 min a 13000 rpm i T ambient
- Transferir la fase aquosa a un tub net prèviament rotulat
- Afegir 500 µl d'isopropanol (-20°), barrejar suaument invertint els eppendorfs
- Centrifugar 5 min a 10000 rpm i T ambient
- Eliminar el sobrenadant i afegir 500µl de tampó de rentat

MATERIAL I MÈTODES

- Vòrtex suau i deixar reposar mínim 20 min a -20°C
- Centrifugar 5 min a 10000 rpm
- Eliminar el sobrenadant i deixar assecar els tubs boca avall sobre paper de filtre durant 30 min
- Resuspendre el DNA amb 25 μl de TE.

Tampó d'extracció CTAB (pH 8)

NaCl	1,4 M
EDTA	20 mM
Tris-HCl	100 mM
CTAB*	2%
2- β -mercaptoetanol	0,2%

*CTAB, Hexadecil Trimethyl Ammonium Bromide .

Tampó de rentat

Etanol	76%
NH ₄ AC	10 mM

Tampó d'elució (pH 8)

Tris-HCl (pH 7,4)	10 mM
EDTA	1 mM

L'extracció de DNA per analitzar per "Southern blot" es va realitzar seguint diferents protocols:

a) Extracció de DNA d'arròs amb CTAB

- En tubs falcon de 50 ml de capacitat afegir 6 ml del tampó d'extracció CTAB i escalfar al bany de 65°C
- Triturar aproximadament 2 grams de material vegetal amb nitrogen líquid i transferir la pols seca als tubs que contenen el tampó d'extracció
- Incubar de 60 a 90 min al bany de 65°C i amb agitació suau
- Deixar reposar 5 min a temperatura ambient i afegir 4,5 ml de cloroform:alcohol isoamílic (24:1)
- Agitar suaument a temperatura ambient 10 min
- Centrifugar 10 min a 3000 rpm i temperatura ambient

- Recuperar la fase aquosa en tubs nous de 50 ml de capacitat
- Repetir l'extracció amb cloroform:alcohol isoamílic (24:1)
- Transferir la fase aquosa recuperada en tubs de 15 ml de capacitat on prèviament s'hi afegeix RNAsa
- Incubar a temperatura ambient durant 30 min i amb agitació suau
- Afegir 6 ml d'isopropanol fred i agitar els tubs per inversió diverses vegades fins que es vegi el DNA
- Pescar el DNA amb pipeta Pasteur de vidre i transferir-lo en un tub de 15 ml amb 2ml de TE
- Deixar resuspendre el DNA tota la nit a temperatura ambient i amb agitació suau
- Precipitar el DNA amb 159 µl de NaCl 5M i 6 ml d'etanol absolut (barrejar bé per inversió)
- Recollir el DNA amb noves pipetes Pasteur de vidre i transferir-lo a nous tubs de 15ml amb 2ml de solució de rentat 1. Deixar DNA i pipeta dins els tubs durant 20 min.
- Rentar breument el DNA en solució de rentat 2.
- Transferir el DNA precipitat en un eppendorf estèril amb 100 µl de TE.
- Deixar resuspendre el DNA tota la nit a temperatura ambient i amb agitació suau.

Tampó d'extracció CTAB

Tris-HCl pH 7,5	100 mM
NaCl	1,4 M
EDTA pH 8	20 mM
CTAB	10%
Sulfit de Sodi	0,5%

Solució de rentat 1

EtOH	76%
NaOAc	0,2 M

Solució de rentat 2

EtOH	76%
NH ₄ OAc	10 mM

b) Extracció de DNA d'arròs amb MATAB (maxipreparació)

- Prendre 2g de material vegetal i triturar la mostra amb N₂ líquid
- Dipositar la pols vegetal en un tub Falcon de 15 ml
- Afegir 5 ml de tampó d'extracció MATAB calent
- Vórtex i incubar al bany de 74°C durant 35 min
- Deixar temperar a temperatura ambient
- Afegir 6 ml de cloroform: alcohol isoamílic (24:1) i fer un vórtex
- Centrifugar 20 min a 4000 rpm i temperatura ambient
- Transferir la fase aquosa en un tub nou prèviament rotulat i afegir RNAsa
- Incubar 30 min a 37°C
- Afegir 6 ml de cloroform: alcohol isoamílic (24:1)
- Centrifugar 20 min a 4000 rpm i temperatura ambient
- Transferir el sobrenadant a tub Falcon de 50 ml de capacitat
- Afegir 5 ml d'isopropanol i barrejar molt suaument per inversió fins que es visualitzin els filaments de DNA
- Amb una pipeta Pasteur de vidre a la que prèviament hem tapat la punta amb foc, transferir el DNA a eppendorf
- Resuspendre el DNA amb 50 µl d'H₂O

Tampó d'extracció MATAB

Tris-HCl pH 8	100 mM
NaCl	1,4 M
EDTA	20 mM
MATAB*	2%
PEG 6000	1%
Sulfit de Sodi	0,5%

* MATAB, Mixed Alkyltrimethyl Ammonium Bromide

c) Extracció de DNA d'arròs amb MATAB (minipreparació)

- Escalfar el tampó d'extracció MATAB a 72°C
- Refredar la placa en nitrogen líquid
- Dipositar petits trossos de fulla a cada pou
- Col·locar dues boles de vidre per pou per la trituració

- Triturar el material vegetal congelat (0,2 g) en el Mixer Mill MM 300 (Retsch) amb el programa 1 min 50s, a 30c/s
- Centrifugar les plaques un minut a 4000 rpm per fer baixar el material de les parets
- Afegir 300 µl del tampó d'extracció calent
- Homogeneïtzar el contingut per inversió
- Afegir 360 µl de cloroform: alcohol isoamílic (24:1) i barrejar per inversió
- Centrifugar 20 min a 4000 rpm
- Prendre 250 µl del sobrenadant i transferir-los a una placa nova
- Afegir 200 µl d'isopropanol
- Centrifugar 60 min a 4000 rpm
- Descartar el sobrenadant i assecar les parets dels tubs amb paper de filtre
- Afegir 300 µl d'etanol al 70% i centrifugar 10 min a 4000 rpm.
- Llençar el sobrenadant i assecar la placa a l'estufa de 37°C durant una hora
- Resuspendre el DNA durant una nit amb 50 µl de TE+RNAsa

1.2 Obtenció de DNA plasmídic

Per extreure el DNA plasmídic de cultius bacterians d'*Agrobacterium tumefaciens* o d'*Escherichia coli* es va utilitzar el següent protocol de minipreparació de plàsmids, basat en la metodologia descrita per Maniatis et al., 1982 i adaptat al laboratori.

- Centrifugar entre 1 i 5 ml del cultiu “overnight” durant 40 segons i descartar per complert el medi de cultiu
- * En *Agrobacterium*: - afegir 1 ml de STE, vórtex i centrifugar un minut per descartar el sobrenadant.
- Resuspendre el pellet amb 100 µl de la Solució I i l'ajuda del vórtex.
- Incubar 5 min a temperatura ambient.
- Afegir 200 µl de la Solució II i invertir els eppendorf diverses vegades (no vórtex)
- Incubar 5 min a temperatura ambient
- Afegir 150 µl de la Solució III i invertir de nou
- Incubar 5 min a temperatura ambient
- Centrifugar durant 10 min a 10.000 rpm i transferir el sobrenadant a eppendorf nou prèviament identificat
- Afegir 300 µl d'isopropanol i invertir diverses vegades
- Incubar 20 min a temperatura ambient
- Centrifugar 10 min a 10.000 rpm i descartar el sobrenadant

MATERIAL I MÈTODES

- Rentar el pellet afegint 300 µl d'etanol 70%, centrifugant 5 min a 10.000 rpm i llençant l'etanol. Deixar evaporar les restes d'alcohol
- Resuspendre el DNA plasmídic amb 50 µl de TE, afegiem 1µl de RNAsa (10 mg/ml) i ho incubàvem 15 min a 37°C

Amb aquest mètode s'obtenia prou DNA plasmídic per procedir amb les comprovacions mitjançant digestions amb enzims de restricció i seqüenciació de DNA.

<u>Solució I</u>	<u>Solució II</u>	<u>Solució III</u>
50 mM glucosa 25 mM TrisHcl pH 8 10 mM EDTA pH 8	0.2 N NaOH 1% SDS	Acetat potàssic 3M Acètic glacial 3M

STE

NaCl	0,1 M
Tris pH8	10 mM
EDTA pH8	1 mM

També es realitzaren midipreparació de DNA plasmídic, en aquest cas se segueixen les instruccions de fabricant

Protocol de midipreparació de DNA plasmídic (Qiagen)

- Repartir un volum de 500 ml de solució saturada de bacteris volum en dues botelletes de 250 ml, prèviament esterilitzades. Centrifugar els bacteris 30 min a 3000 rpm 15°C
- Resuspendre el pellet amb 10 ml tampó P1
- Afegir 10 ml tampó P2, barrejar i deixar 5 min a temperatura ambient
- Afegir 10 ml tampó P3 (fred), barrejar i deixar 20 min en gel
- Centrifugar 30 min a 14000 rpm durant 30 min a 4°C
- Passar el sobrenadant a tub de centrífuga prèviament autoclavat
- Centrifugar 15 min a 15000 rpm a 4°C
- Equilibrar les columnes de Quiagen amb 10 ml de tampó QBT
- Aplicar el sobrenadant del pas a les columnes i deixar que entri a la resina de la columna per pròpia gravetat
- Rentar les columnes amb 2 x 30 ml del tampó QC
- Col·locar les columnes sobre tubs de centrífuga prèviament autoclavats

- Afegir 15 ml del tampó QF a les columnes, farà que el DNA es filtri
- Afegir 0.7 volums d'isopropanol prèviament equilibrat a temperatura ambient al tub de centrifuga on hi ha el DNA amb el QF
- Centrifugar 30 min a 4°C i a 8000 rpm
- Llençar el sobrenadant i rentar el DNA amb 5 ml d'alcohol al 70%
- Tornar a centrifugar durant 5 min a 8000 rpm a 4°
- Llençar el sobrenadant i assecar sobre paper de filtre
- Resuspendre amb 50 µl TE

1.3 Subclonatge de fragments de DNA en plasmidis

Tant per aïllar inserts a clonar com per fer receptius els vectors, es van digerir amb enzims de restricció els DNA plasmídics. Les condicions per totes les reaccions enzimàtiques es van preparar d'acord amb els criteris establerts per les cases comercials subministradores dels enzims de restricció corresponents.

Purificació del DNA a partir de gels d'agarosa

El mètode que es va emprar per purificar els DNAs d'interès prèviament separats per electroforesi en gel d'agarosa es basa en la unió del DNA a una reïna. Es va utilitzar el Kit QIAEX II Agarose Gel Extraction (QIAGEN) seguint el protocol del fabricant.

Lligació dels inserts als vectors receptors

Per totes les lligacions es va usar l'enzim T4 DNA Ligase (Roche). Les reaccions de lligació es realitzaven en un volum final de 25µl, amb 40 unitats de lligasa amb una relació de DNA vector/DNAinsert de 1:1 (clonació del cassette 35SCaMV::*hpt*::tnos en els vectors pCAMBIA0380 o pCAMBIA0390) o de 1:2 (clonació del cassette 35SCaMV::*gfp*::tnos en els vectors pCAMBIA0380 o pCAMBIA0390).

Les lligacions es deixaven tota la nit a temperatura ambient. Finalment s'inactivava l'enzim de lligació a 65°C durant 10 min.

1.4 Digestions enzimàtiques del DNA genòmic

El tampó i la temperatura de digestió van ser les recomanades per la casa comercial subministradora de l'enzim. La concentració òptima del DNA en una digestió és de 0,1µg. La concentració òptima de l'enzim és de 1-2 U/µg DNA (quan es tracta de DNA genòmic cal augmentar la concentració fins a 10 U/µg de DNA). Cal destacar que el volum de l'enzim afegit, en cap cas ha de sobrepassar el 10% del volum de reacció final ja que el glicerol que contenen les solucions de les cases comercials pot inhibir l'activitat dels enzims. També cal vigilar amb el volum de la solució de DNA afegit a la reacció (si el DNA està resuspès en un tampó amb EDTA s'inhibeix l'activitat enzimàtica).

Es realitzava una precipitació del DNA en fred i es resuspensia amb un coctail prèviament preparat amb els mateixos elements citats anteriorment i es repetia la digestió genòmica en les mateixes condicions.

1.5 Transformació de bacteries

Es van transformar dues espècies bacterianes en aquest treball, *E.coli* DH5α i *Agrobacterium tumefaciens*. La tècnica utilitzada per transformar les soques bacterianes està basada en la permeabilitat de la membrana de les cèl·lules bacterianes sotmeses a baixes temperatures i en presència de cations bivalents, afavoreix la incorporació de DNA plasmídic. En les transformacions s'han utilitzat cèl·lules competents de bacteries preparades mitjançant el tractament amb CaCl₂ 50 mM (Sambrook et al., 1989).

En les transformacions de cèl·lules competents d'*E.coli* DH5α es va utilitzar tot el volum de les reaccions de lligació (30µl). I les condicions d'incubació per l'aparició de colònies era d'una nit a 37°C en els condicions de selecció que venen determinades pel plàsmid utilitzat en la transformació.

En canvi en el cultiu d'*Agrobacterium* els volums de transformació depenien de la concentració dels plàsmids a introduir. Totes les soques d'*Agrobacterium* es van seleccionar amb Rifampicina (100mg/l) a part dels antibiòtics corresponents a cada plàsmid.

El protocol que es va emprar per transformar les soques bacterianes es detalla a continuació :

- Descongelar una alíquota de 100 µl de cèl·lules bacterianes competents i mantenir en gel
- Afegir el DNA plasmídic agitant suaument i submergir l'eppendorf en nitrogen líquid.
- Inmediatament incubar l'eppendorf en un bany a 37°C durant cinc min
- Deixar l'eppendorf en gel durant 1 o 2 min
- Afegir 800 µl de medi de cultiu (YEB per *Agrobacterium* i SOB per *E.coli*)
- Incubar (a 28°C durant 4-5 hores per *Agrobacterium* i a 37°C durant 45-60 min per *E.coli*), sempre en agitació
- Sembrar en plaques de Petri amb 25 ml de medi LB selectives amb els antibiòtics escaients

1.6 Avaluació molecular per PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis et al., 1986) és un tècnica àmpliament utilitzada per amplificar fragments de DNA (Ausubel et al., 1998). En aquest treball es va utilitzar la PCR per una banda per confirmar molecularment dades obtingudes de les avaluacions fenotípiques i per altra banda per caracteritzar plantes transformades amb gens, de més complexa avaluació fenotípica com el gen *Cry1B* i en alguns casos el gen *gfp*.

Totes les PCR realitzades en aquest treball van seguir un mateix procediment, amb elements comuns com el buffer de reacció i el termociclador (GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystems), i amb condicions particulars per l'amplificació del fragment en qüestió i de la seqüència dels primers o encebadors.

Buffer de reacció de la PCR (Quantitats per una sola reacció de PCR)

Tampó PCR*10X	2.5 µl
dNTPs 10mM	1 µl
MgCl ₂ 25mM	1 µl
Primer F 10µM	1 µl
Primer R 10µM	1 µl
H ₂ O	17 µl

MATERIAL I MÈTODES

Taq polimerasa**	0,5 µl
DNA mostra	1 µl

*Composició del tampó PCR 10X:

MgCl ₂	15 mM
CIK	500 mM
Tris-HCl pH 8	100 mM
Gelatina	0,01%

**Taq polimerasa (Ampli Taq, Applera Hispania)

Condicions particulars de les PCR:

Els fragments de DNA amplificats en aquest treball i les condicions emprades en cada cas han estat:

- a) Per amplificar un fragment de 523 bp del gen *gfp* es van utilitzar els encebadors GFP-f i GFP-r (apartat 2.2 de materials) i les condicions per l'amplificació van ser 35 cicles: 94°, 5min; 94°, 30s; 66,5°, 30s; 72°, 30s; 72°, 5min; 4°, ∞.
- b) Per amplificar un fragment de 800 bp del gen *uidA* es van utilitzar els encebadors Gus-f i Gus-r (apartat 2.2 de materials) amb unes condicions de 94°, 5min; 94°, 45s; 64°, 30s; 72°, 45s; 72°, 5min; 4°, ∞.
- c) Per amplificar un fragment de 700 bp del gen *bar*, les condicions d'amplificació amb els encebadors BAR-f i BAR-r (apartat 2.2 de materials), van ser de 94°, 5min; 94°, 30s; 66°, 30s; 72°, 40s; 72°, 5min; 4°, ∞.
- d) Per amplificar un fragment 1800 bp del gen *CryIB*. Les condicions d'amplificació eren 94°, 5min; 94°, 30s; 62°, 30; 72°, 1min50s; 72°, 5min; 4°, ∞. I els encebadors eren CRY1B-f, CRY1B-r (apartat 2.2 de materials).
- e) Per amplificar un fragment del gen *hpt* de 900 bp. HPT-f i HPT-r (apartat 2.2 de materials). Les condicions van ser 94°, 5min; 94°, 30s; 67°, 30s; 72°, 50s; 72°, 5min; 4°, ∞.

f) A partir de les seqüències dels vectors pCAMBIA (<http://www.CAMBIA.org>) es van dissenyar els encebadors per amplificar el T-DNA per PCR. Es va utilitzar l'Expand High Fidelity PCR System (Roche) seguint les instruccions del fabricant i les condicions específiques d'amplificació del fragment van ser, 94°, 5min; 94°, 30s; 62°, 30s; 72°, 3min; 72°, 5min; 4°, ∞. I els encebadors eren T-DNA-f i T-DNA-r (apartat 2.2 de materials)

Purificació productes de PCR

Es van seguir dos procediments per purificar productes de PCR. Per una banda es separava electroforèticament el producte de PCR. Per purificar el DNA es va fer servir el Kit QIAEX II Agarose Gel Extraction (QIAGEN) seguint el protocol del fabricant. Per altra banda es purificava el DNA amb un Kit comercial, el High Pure PCR Product Purification Kit, de Roche.

1.7 Transferència i hibridació d'àcids nucleics, "Southern blot"

L'anàlisi per Southern del DNA de les plantes transformades genèticament es va portar a terme seguint els següents passos:

Transferència del DNA a la membrana de niló

- El DNA digerit amb els enzims de restricció apropiats se separen electroforèticament Es fotografia per tenir constància de la referència dels marcadors de pes molecular (habitualment DNA del bacteriòfag λ digerit amb EcoRI/HindIII)
- Es depurinitza el DNA en HCL 0,25N durant 10 min en agitació suau
- Es renta el gel amb H₂O destil·lada
- Es desnatura el DNA en incubant en agitació durant 15 min amb NaOH 0,4N
- Transferència dels DNA al suport sòlid, la membrana de niló durant tota una nit (Figura 16).

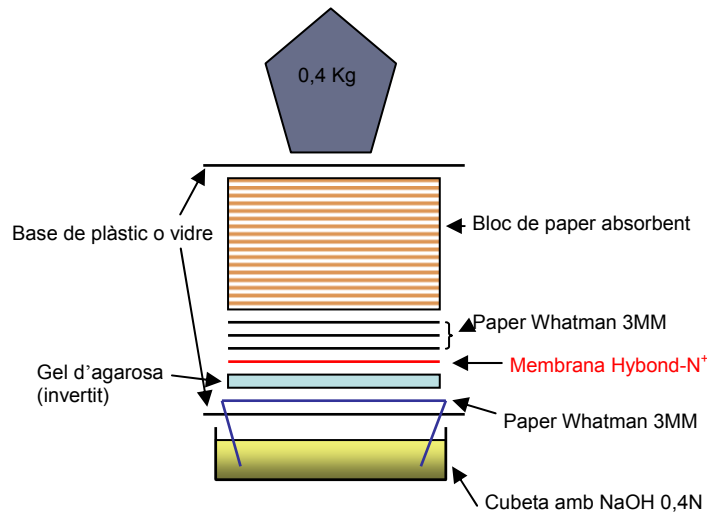


Figura 16. Esquema detallat dels diferents components en la transferència de DNA a un suport sòlid "Southern Blot".

- L'endemà es recupera i renta la membrana (5min en una solució de SSC 2X) i es deixa assecar sobre paper de filtre convencional
- Es fixa el DNA deixant tres hores les membranes a 80°C i es mantenen a temperatura ambient fins la pre-hibridació

1.8 Marcatge radioactiu del DNA

Utilitzant el Kit comercial Megaprime (Amersham-Pharmacia) basat en el *Random priming*, seguint indicacions del fabricant. Les cadenes de DNA complementàries són sintetitzades a partir dels encebadors per acció de la DNA polimerasa Klenow en presència de α -dCTP³².

- El fragment de DNA a marcar (200-300 ng) es desnaturalitza a 94°C 10 min
- Afegir en fred els hexanucleòtids (dATP, dTTP i dGTP) i la DNA polimerasa Klenow (5 unitats / marcatge) i per últim 3 μ l de α -dCTP³²
- S'incuba a 37°C dues hores en què els primers hibriden amb cadascuna de les cadenes cada 100-200 bp
- Per últim es para la reacció de marcatge afegint un volum de NaOH i deixant reposar a temperatura ambient 10 min

Pre-hibridació i hibridació

Abans d'hibridar amb les sondes marcades, les membranes es pre-hibridaven seguint el següent protocol:

- Se submergeixen les membranes durant dos min en SSC 2X
- En cubetes de plàstic de 14x33x3'5 cm es col·loquen les membranes i s'hi afegeixen 60 ml de la solució de pre-hibridació. S'incuba a 65°C en constant agitació durant un mínim de 5 hores

Passat aquest temps es procedeix amb la hibridació:

- Afegir la sonda marcada corresponent a la cubeta que contenia la membrana pre-hibridada
- La incubació sol ser tota la nit a 65°C i en constant agitació

Els rentats es realitzen segons el següent procediment:

- S'aboca la solució d'hibridació en el recipient especial de residus radioactius.
- Dos rentats de 15 min amb la solució R1 a 65° i en agitació
- Un rentat amb la solució R2 de 15 min, a la mateixa temperatura i en agitació
- Un rentat amb la solució R3 de 15 min, a la mateixa temperatura i en agitació
- Finalment s'assequen amb cura les membranes amb paper de filtre convencional i s'emboliquen amb film de plàstic transparent evitant bombolles d'aire o arrugues del plàstic

Exposició i revelat dels films

- Es col·loca cada membrana en una carpeta Kodack d'exposició (X-Ray Films Expure Holders) juntament amb un film (Medical X-Ray films, Fuji) i una pantalla intensificadora
- S'embolica amb paper d'alumini convencional les carpetes per evitar l'entrada de llum i es deixen durant 5-7 dies a -80°C.

Solució de pre-hibridació (200 ml)

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 20%	70 ml
Albúmina de sèrum boví	2 g
Tampó fosfat*	100 ml
H ₂ O	30 ml
DNA d'esperma de salmó desnaturalitzat	0,1 mg/ml

* Tampó fosfat (500 ml)

Na ₂ HPO ₄	56'8 g
NaH ₂ PO ₄	12 g
H ₂ O	500 ml
pH 7,2	

Solucions de rentats

R1	SSC 2 %, SDS 0,5 %
R2	SSC 1 %, SDS 0,5 %
R3	SSC 0,5 %, SDS 0,5 %

2. RELACIONATS AMB PROTEÏNES

2.1 Extracció de proteïnes totals de fulla d'arròs

- Es prenen mostres de 2-3 fulles senceres de les plantes d'arròs i es posaven en N₂ líquid de seguida
- Es trituren les mostres en morters constantment refredats per l'addició de N₂ líquid
- S'omple la meitat del volum d'ependorfs de 2ml de teixit vegetal en pols i s'afegeix 1 ml de tampó d'extracció de proteïnes
- Es fa un vòrtex i es deixen les mostres en un agitador orbital a 4°C durant 15 min per extreure les proteïnes solubles
- Seguidament es centrifuguen els eppendorfs 10 min a 13000 rpm en fred
- Es rescata el sobrenadant i es diposita en nous eppendorfs per tornar a centrifugar 15 min a 13000 rpm i a 4°C
- Es torna a rescatar el sobrenadant i es manté en gel

Seguidament es procedeix a determinar-ne la concentració de cada mostra. Per quantificar les proteïnes s'utilitza el mètode de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, BioRad) i es realitza d'acord amb les instruccions del fabricant.

Tampó d'extracció de proteïnes totals

Tris-HCl, pH8	50mM
EDTA, pH 8	1mM
Glicerol	5%
Ditiotreitol (DTT)	1mM
Triton X-100	0,1%

2.2 Electroforesi desnaturalitzant de proteïnes

El mètode utilitzat està basat en el que Laemmli (1970) ja descrivia. L'aparell que vam emprar per fer i resoldre els gels va ser un Miniprotean (BioRad). Els tampons utilitzats i la composició dels gels que es van fer en aquest treball es descriuen a continuació.

Havent quantificat els extractes de proteïna es procedia a preparar les mostres per carregar en els gels SDS-PAGE.

Abans de carregar les mostres en el gel calia desnaturalitzar-les incubant-les 3 min a 100°C en presència de tampó TM contenint β-mercaptoetanol al 10%. Inmediatament es tornaven a deixar en gel fins que es procedia a carregar el gel.

Composició dels gels de Bis acrilamida

Els gels de poliacrilamida estan formats per dues parts, el gel de separació (“lower gel”) i el gel de concentració de les mostres (“stacking gel”):

Volums necessaris per preparar 2 ml de gel concentrador

Gel concentrador (2 ml)	
H ₂ O	2,25 ml
Tampó del gel concentrador	1 ml
Acri:bisacrilamida (30:0,8)	0,5 ml
APS 15% (p/v)	40 µl
Temed	6 µl

Volums necessaris per preparar 10 ml de gels separadors amb diferents % d' Acrilamida/ bisacrilamida

Gel separador	7,5%	12,5%
H ₂ O	5,63 ml	4,38 ml
Tampó del gel separador	2,5 ml	2,5 ml
Acri:bisacrilamida (30:0,8)	1,88 ml	3,13 ml
APS 15% (p/v)	40 µl	40 µl
Temed	5 µl	5 µl

Tampó del gel concentrador (capa superior):

Tris-HCl pH6,5	0,5 M
SDS	0,4 %

Tampó del gel separador (capa inferior):

Tris-HCl pH8,8	1,5 M
SDS	0,4 %

Tampó d'electroforesi

Glicina	1,92 M
Tris-HCl, pH 8,8	0,25 M
SDS	10%
pH entre 8,3 i 8,8	

2.3 Immunotransferència

Per realitzar la transferència de proteïnes del gel a la membrana (Hybond-C extra (Amersham Biosciences)) s'utilitza el sistema SemyDry (BioRad). Els procediments que es citen a continuació estan basats en els protocols que es descriuen a *Current Protocols in Protein Science*, Coligan et al., 2002.

- Per equilibrar el gel, els papers GB 004 (Gel-Blotting-Paper Scheicher & Schuell), i les membranes se submergeixen durant uns minuts amb el tampó de transferència a 4°C
- Les condicions de l'electrotransferència són de 12V durant 40 min
- Es desmonta i es tenyeixen les membranes amb "Roig de Ponceau" per confirmar una correcta transferència de proteïnes. En aquest moment es marca amb llapis convencional les bandes del patró de pesos moleculars que havíem carregat en el gel
- Es renta el colorant amb una solució de metanol 30% i acètic 10%, i esbandint-les amb H₂O destil·lada i les assequem amb paper de filtre convencional

Tampó de transferència

Glicina	39 mM
Tris	48 mM
Metanol	20%
SDS	10%

Immunodetecció

Les condicions emprades en aquest treball van ser:

- Dos rentats de les membranes amb PBS 1X de 5 min cadascun en agitació
- Incubació en solució de bloqueig (PBL5 + 3% llet en pols desnatada) durant una hora a temperatura ambient o bé una nit a 4°C, sempre en constant i suau agitació
- Tres rentats consecutius de 5 min cadascun en solució PBL5

- Incubació amb la dilució adequada de l'anticòs primari en solució de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació. En el cas de la detecció de la proteïna Cry1B la dilució amb l'antiserum anti-Cry1B va ser de 1:5000. En canvi la dilució utilitzada en el cas de l'antisèrum anti-GFP va ser de 1:1000
- Eliminar el sèrum i fer 3 rentats consecutius de 5 min cadascun en solució PBLs
- Incubar amb l'anticòs secundari anti IgG de conill lligat a una fosfatasa alcalina (Anti-Rabbit IgG, Alkaline Phosphatase Conjugate, SIGMA) a dilució 1:5000
- Fer 4 rentats consecutius de 5 min cadascun en solució PBLs
- Equilibrar amb tampó fosfatasa
- Revelar amb substrat colorat NBT/BCIP, mantenint les membranes en fosc
- Parar la reacció amb PBS 1X + EDTA 0,2M

PBLs

PBS	1X
Tween-20	0,1%

Tampó fosfatasa alcalina

NaCl	100 mM
Tris-HCl pH 9,5	100 mM
MgCl ₂	5 mM

NBT

NBT (Boheringher)	0,05 g
Dimetilformamida (DMF)	700 µl
H ₂ O	300 µl

BCIP

BCIP (Duchefa)	0,05g
H ₂ O	1 ml

Substrat NBT/BCIP

NBT (50 mg/ml)	66 µl
BCIP (50 mg/ml)	33 µl
Tampó fosfatasa	10 ml

3. TRANSFORMACIÓ D'ARRÒS

3.1 Obtenció del call embriògenic

Introducció de les llavors *in vitro* per induir-les a la formació de call.

- Es desproveeixen les llavors de les cobertes exteriors (palea i lemma) per acció mecànica entre dues superfícies de cautxú
- Es desinfecten les llavors mitjançant un bany d'un minut en una solució d'alcohol al 70% en agitació, es llença l'alcohol i s'afegeix una solució de lleixiu comercial diluïda al 16% de clor actiu, i una gota de Tween 20 per cada 100 ml de la solució. En aquesta solució el bany és de 30 min i en constant agitació.
- Finalment en una cambra de flux laminar es fan tres rentats de 10 min en aigua estèril
- Se sembren les llavors desinfectades individualment en tubs de 9 ml de capacitat que contenen 2 ml de medi N6 (apartat 3.2 de materials) per la inducció de call
- Una setmana més tard es fa un control de germinació i de contaminació en què es transfereixen les llavors que han germinat a plaques de Petri de 9 cm amb 25 ml de medi N6, a raó de 8-10 llavors per placa. Les plaques es deixen en condicions de foscor i temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durant dues setmanes. Passat aquest temps l'escutel dels embrions forma un call primari de 0,5-1 cm del que es procedeix a la selecció del call embriogènic.

Selecció i subcultiu de call embriogènic.

Segons la seva morfologia, es distingeixen dos tipus de call, tal i com diversos autors han descrit (Nabors et al. 1983, Peterson et al., 1991, Chowdhry et al. 1993; Rueb et al. 1994).

Amb l'ajuda d'una lupa binocular Wild-Heerbrugg i en condicions d'esterilitat se separen els nòduls embriogènics i es transfereixen a plaques de Petri de 9 cm amb 25 ml de medi N6 a raó de 15-20 nòduls per placa. Aquest call embriogènic, o unitats embriogèniques seleccionades han de tenir una sèrie de característiques que garanteixin a l'explant un estat fisiològic òptim per la seva transformació genètica. Els criteris de selecció són els següents:

- Talla: les unitats o nòduls embriogènics han de mesurar entre 0,8 i 1,6 mm. Calls més grans presenten un estat de diferenciació massa avançat i condueixen a freqüències de transformació inferiors, mentre que calls massa petits no suporten la desestabilització cel·lular que la transformació genètica comporta.

- Forma: les unitats seleccionades han de tenir una forma esfèrica i una superfície llisa. Els calls de formes més complexes són diferenciats i no són vàlids.

- Color: les unitats han de ser lleugerament translúcides i beige. Els nòduls blancs o grogosos no són vàlids.

- Textura: els calls han de ser compactes i resistents a ser agafats amb pinces. El call massa disgregable, no resistent a la manipulació amb les pinces no té capacitat regenerativa, i el call viscos i cristal·lí no és apte a la transformació perquè està diferenciat a formar estructures exclusivament radiculars.

Les plaques es mantenen en condicions de foscor i $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dues setmanes més, en les que els nòduls embriogènics formen noves unitats embriogèniques i aquestes adquireixien la talla necessària per garantir una bona transformació genètica. Aleshores té lloc la transformació genètica de les cèl·lules.

3.2 Transformació genètica de l'arròs

Es van utilitzar dues tècniques de transformació genètica, per *Agrobacterium tumefaciens* i per biolística amb el canó de gens.

3.2.1 Transformació per *Agrobacterium tumefaciens*

-I- Procediment general de la transformació via *Agrobacterium*

Totes les agroinfeccions es van realitzar seguint els mateixos procediments independentment de la soca d'*Agrobacterium* utilitzada així com de l'estratègia de co-transformació a assajar.

Cultiu d'*Agrobacterium tumefaciens*

- Es fa una sembra en escocès a partir de l'estoc glicerinat del bacteri d'interès (Maniatis et al., 1982) en una placa de Petri que conté 25 ml de medi LB sòlid (apartat 3.1 de materials) amb els antibiòtics necessaris en cada cas. S'incuba la placa a la foscor i a 28°C.
- Un o dos dies després, quan apareixen colònies bacterianes aïllades, se'n pica una i es fa créixer en 50 ml de medi LB líquid (apartat 3.1 de materials) amb els corresponents antibiòtics en erlenmeyer de 100 ml de capacitat. La incubació es realitza a 28°C, a la foscor i amb una agitació constant de 300 rpm durant una nit.
- Aleshores es fa una lectura espectrofotomètrica per saber la densitat òptica de cultiu bacterià. Per tenir una bona taxa d'agrotransformació és necessari que els bacteris es trobin en fase de creixement exponencial. Aquesta fase de creixement s'assoleix quan la concentració bacteriana és de $1 \cdot 10^8$ bacteris/ml i correspon a una densitat òptica de 0,1 llegida a una longitud d'ona de 600 nm.

Aplicant la següent fórmula s'obté la quantitat d'inòcul necessària per fer un subcultiu en 50 ml, de medi fresc i amb els corresponents antibiòtics, per tenir el cultiu bacterià a 0,1 de densitat òptica per realitzar la transformació genètica en un moment donat.

$$NH / TD = Y$$

$$2^Y = Z$$

$$VC / Z = VI$$

$$X = (VI \cdot DOf / DOi)$$

NH: número d'hores de creixement del cultiu abans de transformar

TD: temps de duplicació del cultiu bacterià, en *Agrobacterium* és 1,35

VC: volum en ml del cultiu bacterià

VI: volum en ml d'inòcul per fer el subcultiu, sense ajustar la densitat òptica del cultiu.

DOf: densitat òptica final, en el nostre cas 0,1.

DOi: valor de la lectura de la DO del cultiu bacterià inicial

X= volum necessari d'inòcul en ml per fer el subcultiu.

- Es feia una segona lectura a l'espectrofotòmetre dels bacteris crescuts en medi LB per comprovar la densitat òptica. En cas que no s'ajustés al valor esperat calia repetir el procés anteriorment citat.

Preparació de l'inòcul per transformar

Amb l'objectiu de concentrar les suspensions bacterianes i tenir-les en medi N6_{líquid}+AC (apartat 3.2 de materials) per afavorir l'activació de la maquinària agroinfectiva dels mateixos, es centrifuga la solució bacteriana durant 10 min a 3000 rpm i el pellet bacterià es resuspén en 40 ml de medi N6_{líquid}+AC. En aquest moment l'inòcul està preparat per l'agroinfecció.

Agroinfecció del call embriogènic d'arròs

- Es disposen 15 ml de l'inòcul bacterià en una placa de Petri de 5 cm. Seguidament s'hi afegeixen els calls embriogènics i s'hi deixen entre 15 i 20 min
- Es transfereixen els calls sobre paper de filtre esterilitzat a fi d'assecar-los eliminant l'excés de bacteri
- Seguidament els calls es passen a plaques Petri de 9 cm amb 25 ml de medi N6+AC de cocultiu a raó de 15-20 calls per placa. Aquestes plaques s'incuben 3 dies en foscor i a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Després es transfereixen a medi de selecció.

-II- Estratègies de co-transformació per *Agrobacterium tumefaciens*

Es varen aplicar les següents estratègies de co-transformació:

A. Transformació amb dos vectors T-DNA introduïts individualment en *Agrobacterium* (dos vectors/ dos cultius bacterians)

La inoculació amb cadascun dels cultius bacterians es va portar a terme simultàniament i amb decalatge de temps. Les agroinfeccions es van realitzar amb les soques EHA105 pCAMBIA1301 i EHA 105 pX2-H, una portadora del gen marcador *uidA* i l'altra del gen marcador *gfp*. El procediment de les inoculacions va ser el següent:

- Es posaven a créixer per separat les soques bacterianes per transformar. Quan les dues assolien una densitat òptica $\text{DO}_{550} = 0,1 \pm 0,025$ es centrifugaven i resuspenien amb

N6l+Ac (apartat 3.2 de materials). En el moment de la inoculació es barrejaven 7,5 ml de cada solució bacteriana a la placa de 5 cm on tenia lloc l'agroinfecció.

- Per altra banda es transformaven els calls equivalents per dos assaigs amb una de les soques bacterianes, portadora del gen marcador *gfp*.

- Dos dies després, el call transformat amb els dos vectors simultàniament i la meitat del transformat amb un gen marcador es transferien a medi de selecció. L'altra meitat del call transformat amb un gen marcador s'inoculava amb la soca portadora de l'altre gen marcador (GUS). En aquest assaig hi havia per tant dos dies de decalatge entre una i altra infecció bacteriana.

- Cinc dies després de la primera inoculació es procedia amb la segona transformació del call que restava per co-transformar. Aquesta planificació pot veure's esquematitzada en la següent Taula II:

	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
TD 0	GFP GUS	co-cultiu	co-cultiu	Selecció		
TD 2	GFP	co-cultiu	GUS	Co-cultiu	co-cultiu	selecció
TD 5	GFP	co-cultiu	co-cultiu	Co-cultiu	co-cultiu	GUS

Taula II. Representació esquemàtica de les transformacions realitzades en temps de decalatge (TD) de 0, 2 i 5 dies. GFP amb el plàsmid pC1302 i GUS amb el pC1301.

Els assaigs amb la soca d'*Agrobacterium* portadora del plàsmid pCAMBIA1302 es van realitzar seguint els mateixos procediments.

B. Transformació amb dos vectors T-DNA introduïts conjuntament en *Agrobacterium*

Inicialment els assaigs realitzats per estudiar aquesta estratègia de co-transformació es va utilitzar la soca LBA 4404 pCAMBIA1201pCAMIA1302. Més tard es van repetir les inoculacions amb LBA 4404 pCAMBIA1201pX2-H, en el que es va substituir el gen *gfp* de la casa comercial CAMBIA.

C. Transformació amb un vector amb dos T-DNA

Les transformacions realitzades amb aquests tipus de plàsmids (pX2-HB i pX2-HCry1B) van seguir els mateixos procediments generals descrits a l'apartat 3.2.1 de mètodes.

3.2.2 Transformació per bombardeig de micropartícules

-I- Procediment general de la transformació per biolística

Preparació del material vegetal pel bombardeig

Quatre hores abans del bombardeig es disposaven els calls embriogènics formant un anell circular d'un centímetre d'ample i amb un cercle central d'un centímetre de diàmetre que quedava buit a cada placa amb medi N6_{canó} (apartat 3.2 de materials). Es preparaven dues plaques per cada assaig de transformació. La disposició circular és la més adequada perquè els calls rebin homogèniament els disbars, el call situat al centre d'aquest cercle seria susceptible de rebre massa impactes per micropartícules disminuint la viabilitat de les cèl·lules transformades i, fora de l'anell disminuiria el nombre de micropartícules que hi arribaria. La composició del medi N6_{canó} canvia les condicions osmòtiques de les cèl·lules afavorint la retracció del contingut cel·lular reduint els danys causats pels impactes de les micropartícules.

Preparació de les micropartícules pel bombardeig

Per cada assaig de transformació pel canó de gens les micropartícules es van preparar tal com consta en el següent protocol:

- Pesar en un mateix eppendorf 1.5 mg de micropartícules d'or d'1 µm de diàmetre i 1.5 mg de micropartícules de 1.6 µm de diàmetre
- Afegir 1 ml d'etanol absolut i sonicar les micropartícules 30 segons
- Deixar precipitar durant una hora.
- Retirar l'etanol i afegir-hi 0.5ml d'H₂O bidestil·lada autoclavada
- Tornar a sonicar i deixar precipitar
- Treure l'H₂O ajustant el volum a 50 µl i tornar a sonicar les micropartícules
- Afegir per ordre i vortexant suaument:
 - 10 µl del DNA a una concentració de 0.5 µg/ µl
 - 20 µl d'espermidina 0.1M
 - 50 µl de CaCl₂ 2.5M
- Deixar sedimentar les micropartícules mantenint els eppendorfs en gel
- Centrifugar breument i llençar el sobrenadant
- Resuspendre les micropartícules d'or, ja portadores del DNA, en 38 µl d'etanol absolut

Bombardeig del call d'arròs

Per cada assaig de transformació amb el canó de gens es van realitzar un total de 4 dispars a raó de dos dispars per placa. Un cop tenien lloc els dispars, els calls es transferien a medi N6+selecció i seguien el procés de regeneració.

Per procedir amb els dispars es van seguir els passos contemplats en el següent protocol:

- Netejar amb etanol al 96% la cambra de flux laminar on es troba el canó de gens PDS1000/He (BioRad. USA), i accessoris del mateix (cambra del canó de gens, discs de ruptura (1100 psi) i membranes portadores del DNA, reixetes de contenció, suports de les membranes, dels discs de ruptura i de la placa Petri)
- Col·locar les membranes que han de portar el DNA en els suports corresponents, prèviament autoclavats
- Comprovar que el volum de l'ependorf que conté les micropartícules d'or amb el DNA és de 38 µl; en cas que s'hagués evaporat part de l'alcohol afegir-ne per tenir el volum desitjat
- Agitar per vòrtex l'ependorf per homogeneitzar el contingut i ràpidament dispensar 8µl d'aquesta solució al centre de 4 membranes. Deixar evaporar completament l'alcohol

Per cada dispar:

- Col·locar el disc de ruptura de 1100 psi al suport corresponent i cargolar-lo al canó de gens
- Col·locar la reixeta de contenció a l'orifici destinat a la mateixa i, que es troba a la peça que portarà la membrana portadora, vigilant que quedi ben centrada
- Col·locar el suport de la membrana portadora del DNA amb la membrana de manera que les micropartícules quedin per la banda de la reixeta. Assegurar les peces cargolant-les correctament. Finalment emplaçar aquest muntatge dins la cambra del canó, per sota del suport del disc de ruptura
- Per últim col·locar la placa que conté el call embriogènic sense la tapa al suport per la mateixa. I emplaçar el suport a 6 cm per sota de la reixeta de contenció
- Tancar la porta de la cambra del canó i procedir al dispar

Procediment del dispar

- S'encén el canó de gens i la bomba de buit i s'obre la clau de pas de la bombona d'Heli.
- Es fa el buit a la cambra del canó i es manté.

- Amb un pulsador es deixa entrar el gas fins que la pressió d'aquest arriba a 1100psi i es trenca el disc de ruptura deixant passar de cop l'Heli acumulat a la cavitat del darrera del mateix. Aquest gas empeny de cop les micropartícules de la membrana portadora cap el teixit diana. La membrana portadora queda retinguda per la reixeta de contenció.
- Es torna a la pressió normal de la cambra del canó i es retira la placa amb el call, que si ha de rebre el segon dispar es gira 90° respecte l'orientació del primer dispar o es segella amb Parafilm si ja ha rebut els dos dispar.

-II- Estratègies de co-transformació per biolística

Es van realitzar diferents assaigs de transformació per canó de gens amb el T-DNA obtingut en l'apartat 2.1 de resultats. Per una banda es van fer assaigs de transformació en què es disparaven simultàniament els dos T-DNA, i per altra banda amb temps de decalatge de dos i cinc dies.

En la transformació simultània amb els dos T-DNA es preparaven les micropartícules, tal com es descriu a l'apartat anterior, posant la meitat de DNA corresponent a un cassette i l'altra meitat corresponent a l'altre cassette. En canvi, en els assaigs amb decalatge es disparava seguint el procediment habitual com si es tractés d'assaigs independents. L'esquema seguit en aquestes transformacions es pot veure a la Taula III.

	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
TD 0	GFP HPT	selecció	selecció	selecció	selecció	selecció
TD 2	GFP	canó	HPT	selecció	selecció	selecció
TD 5	GFP	canó	canó	canó	canó	HPT

Taula III. Representació esquemàtica de les transformacions realitzades en temps de decalatge (TD) de 0, 2 i 5 dies on es mostren els medis de cultiu detallats ; selecció, N6+H; canó, N6 canó.

3.3 Selecció de les cèl·lules transformades

Diversos estudis realitzats en el nostre laboratori van revelar que tant amb la transformació per *Agrobacterium* com per biolística, l'obtenció de plantes transgèniques és molt més efectiva utilitzant el gen *hpt*, que confereix resistència a la higromicina

(Ayres et al., 1994), com a sistema de selecció que quan es fan servir els gens *pat* o *bar*, que confereixen resistència a la fosfotricina. Per tant, durant el desenvolupament d'aquest treball es va utilitzar la higromicina com a agent de selecció a raó de 40 mg per litre de medi.

Un cop realitzada la transformació genètica dels calls embriogènics aquests es transferien a plaques de Petri de 9 cm amb 25 ml de medi N6+H+Cf+T si la transformació genètica es feia per *Agrobacterium* per eliminar-ne les restes després de la inoculació i sense Cf+T si es feia per canó de gens, a raó de 15-20 calls per placa i 20 plaques per assaig de transformació. Les plaques es mantenien a la foscor durant 12-15 dies i a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ moment en què es transferien els calls a medi fresc i se sotmetien a les mateixes condicions.

3.4 Pre-regeneració i regeneració de plantes transformades genèticament

Passades entre tres i quatre setmanes des de la transformació genètica, els calls que presentaven un creixement actiu passaven a medi de pre-regeneració N6-PR+H (apartat 3.2 de materials) amb el que es mantenien a la foscor durant una setmana, mai més de 10 dies. Aleshores es transferien els calls a medi de regeneració N6-R+H(+Cf+T) on estaven 48 hores més a la foscor abans d'exposar-los a la llum a la cambra de cultiu que mantenia un fotoperíode de 16:8. Les plantes que es van obtenir en tots els assaigs van aparèixer entre una i sis setmanes després de l'exposició dels calls a la llum.

A mida que regeneraven noves plàntules en placa, aquestes s'individualitzaven i es transferien a tubs de vidre de 62 ml de capacitat amb 8 ml de medi N60+H (apartat 3.2 de materials) de afavorint el desenvolupament d'arrels.

L'adaptació de les condicions per regenerar plantes d'arròs de la varietat Sènia a partir de call embriogènic establertes al nostre laboratori estan descrites a Pons i col·laboradors 2000.

3.5 Aclimatació de les plantes regenerades

Una setmana més tard les plantes arrelades es treien dels tubs, se n'eliminaven les restes de medi de cultiu de la zona radicular i es transferien a germinadors de 60 alvèols que contenien substrat adaptat al creixement de l'arròs. La composició del substrat era de dos volums de torba per un volum de vermiculita, neutralitzat amb CaCO₃ (1 g CaCO₃ / 1 torba) i enriquit amb Osmocote (tipus 15-11-13-2 MgO, Scotts) a raó d'1g Osmocote/l substrat.

Per evitar un estrès hídric sever a les plantes per passar d'unes condicions ambientals controlades i molt favorables del cultiu *in vitro* a condicions d'hivernacle hi havia un període d'acclimatació. El procés tenia lloc en un túnel d'acclimatació on per un sistema "fog system" programable es podia dissenyar un descens progressiu d'humitat en 15 dies. En aquest temps les plantes endurien la cutícula protegint-se del xoc hídric. Finalment les plantes es transferien dels alvèols dels germinadors a testos convencionals de cinc litres de capacitat a raó de tres plantes per test. Aquesta era la ubicació final de les plantes per prendre'n mostra per analitzar així com per l'obtenció de llavors.

3.6 Sembra i cultiu en camp de línies transgèniques i no transgèniques d'arròs

En l'assaig de camp que es va portar a terme per l'anàlisi de flux gènic, totes les llavors es varen sembrar en un substrat de torba i vermiculita als hivernacles de l'empresa Erms Salats de Sant Jaume d'Amposta. Quan les plantes tenien 2-3 fulles, es varen trasplantar al camp. El cultiu del camp es va desenvolupar d'acord amb el maneig normal d'un camp d'arròs.

4. AVALUACIONS DE LES PLANTES TRANSFORMADES GENÈTICAMENT

4.1 Anàlisi histoquímic de l'expressió del gen *uidA* (enzim GUS)

En el present treball s'han realitzat anàlisis histoquímics per determinar l'activitat d'aquest enzim. L'expressió del gen *uidA* ha estat sempre dirigida pel promotor constituïtiu CaMV35S.

Les mostres de teixit vegetal assajades van ser trossos de fulla d'una mida aproximada de 0,2 cm². Les mostres de fulla es prenen quan les plantes assolien un estadi de 2 fulles *in vitro* i posteriorment en planta adulta a l'hivernacle, buscant aleshores una fulla jove.

Les mostres de fulla es col·locaven individualment i netejant amb etanol els estris utilitzats per tallar i manipular la mostra –tissors i pinces- cada vegada en els compartiments de plaques ELISA que contenien 80 µl de la solució X-GLU. A cada placa s'hi posava una mostra de fulla de *Sénia* no transformada com a control negatiu així com almenys una mostra de teixit *gus+* conegut. Es segellaven les plaques amb Parafilm i s'incubaven una nit a 28°. Es retirava el substrat i es decoloraven les mostres afegint 100 µl amb etanol de 70°. Unes hores després es retirava l'etanol i es repetia el rentat. Seguint aquesta metodologia es podien visualitzar clarament les zones del teixit tenyides de color blau.

Preparació de la solució X-GLU

A) Solució tampó (per 100 ml)

NaH₂PO₄·2H₂O 11,36 g

Na₂HPO₄·2H₂O 2,4 g

Na₂EDTA·2H₂O 372 mg

Thimerosal 25 mg

Triton X-100 0,1 %

Ajustar a pH 7,5 i esterilitzar per filtració en cambra de flux. Mantenir a 4°C.

B) Solució d'ironcyanida (sals potàssiques):

Ferricianida 211 mg

Ferrocianida 165 mg

Dissolts en 10 ml H₂O i filtrar per esterilitzar, mantenir a 4°C.

C) Solució de Na X-GlcA:

Na X-GlcA 20 mg

Dissolts en 1 ml DMF (Dimetil formamida).

Solució X-GLU final, en un envàs de vidre estèril i mantenir a 4°C:

Tampó A: 40 ml

Solució B: 40 µl

Solució C: 1 ml

4.2 Anàlisi de l'expressió del gen *gfp* per microscopia de fluorescència

Els diferents DNAs amb els que es va transformar el material vegetal portaven el gen *gfp* dirigit per promotors constitutius CaMV35S i *gus2* possibilitant el seguiment de la fluorescència en qualsevol estadi de desenvolupament de la planta. La proteïna GFP emet fluorescència sota una longitud d'ona de 510 nm, per visualitzar-la es va utilitzar la lupa binocular Leica MZ6 (Leica) amb el filtre GFPplus, d'excitació a 480/40 nm i d'emissió a 510 nm LP. La visualització de la fluorescència no comporta cap tipus d'afectació negativa pel teixit, permetent-ne l'observació repetida sense destruir el material vegetal.

Es van seguir dos procediments en la visualització de la fluorescència de la proteïna GFP

a) Avaluació de les plantes T0. Es va fer un seguiment de la fluorescència durant tot el procés de regeneració dels calls embriogènics transformats a les plàntules d'arròs. Es feia una darrera observació de la plàntula en el moment que s'havia transferit de placa a tub.

b) Determinació de l'heretabilitat del caràcter a la descendència. S'induïa la germinació en plaques Petri de 9 cm de llavors T1 o T2 prèviament declofollades. Se sembraven

sobre dos discs de paper de filtre convencional humitejats amb aigua corrent un màxim de 24 llavors per placa. Es segellaven les plaques amb Parafilm i s'incubaven a les fosques 48 hores. Passat aquest període es determinava l'expressió del gen *gfp* per observació de les plàntules a la lupa de fluorescència.

4.3 Avaluació de la resistència a herbicida de les plantes transgèniques

El gen *bar*, clonat d'*Streptomyces higroscopicus* confereix resistència a herbicides com el Bialaphos, el Finale i el Basta. La determinació de la resistència d'un teixit a l'herbicida glufosinat es va fer seguint dues metodologies. En funció de l'interès en mantenir viva una planta sensible a l'herbicida l'aplicació era localitzada o bé generalitzada.

a) Metodologia per la determinació de la resistència a l'herbicida en planta T0. La determinació de la funcionalitat del gen *bar* en plantes directament obtingudes de la transformació genètica (T0), es va fer d'acord amb els procediments descrits pel grup de Gordon-Kamm (1990) pintant amb una solució aquosa d'herbicida una àrea local de les fulles d'arròs. Aquesta metodologia permetia avaluar les plantes *in vivo*, sense implicar la mort de les que no haguessin incorporat el gen. El mètode d'aplicació puntual d'herbicida consistia en:

- Triar dues fulles sanes de la planta a assajar i fer dos talls identificatius en forma de V invertida a l'extrem de la fulla.
- Amb un cotonet impregnat d'una solució de glifosat (Finale) equivalent a 800 g de matèria activa per hectàrea (3'95 ml de Finale / l), fregar marcant una línia transversal a la zona més distal de l'envés de les fulles triades.
- Una setmana més tard es feia el control visual dels símptomes, molt evidents en les plantes susceptibles mentre que les resistents no presentaven lesions.

b) En canvi, per estudiar l'heretabilitat del gen *bar* en les següents generacions (T1,T2,T3) el número de plantes a assajar augmentava considerablement i al no tenir interès en mantenir vives les plantes negatives, es va optar per polvoritzar-les amb l'herbicida. Les plantes de les que es determinava la presència del gen *bar* eren plantes

que abans eren avaluades per l'expressió del caràcter *gfp*, de manera que eren llavors induïdes a germinar, observades a la lupa i aclimatades als hivernacles.

- Quan les plantes havien assolit un estadi de 3-4 fulles es feia un control per descartar les plantes que morissin durant el procés d'aclimatació, evitant falsos negatius.
- Procedíem a l'aplicació de l'herbicida, a la dosi equivalent a 800 gma/ha, polvoritzant el més homogèniament possible les safates on es trobaven les plantes d'arròs.
- Una setmana més tard es feia el control de les plantes tractades. Els efectes de l'herbicida en plantes susceptibles era molt evident.

5. AVALUACIÓ DEL FLUX GÈNIC D'ARRÒS EN CAMP

L'assaig es va realitzar a l'Estació Experimental del Delta de l'Ebre de l'IRTA (Amposta) durant els mesos de maig a octubre de 2001, un cop havia estat autoritzat per la "Comisión Nacional de Bioseguridad" (assaig de referència B/ES/01/07).

5.1 Disseny experimental

Les plantes transgèniques es varen situar en el centre del camp formant 7 cercles concèntrics de 0.25 a 1.75 m de radi, separats entre ells 25 cm. Les plantes no transgèniques es varen situar en cercles al voltant del nucli transgènic, a 1, 2, 5 i 10 m de distància del cercle més exterior de les transgèniques. Dins del nucli transgènic es varen intercalar plantes d'arròs salvatge, a una densitat aproximada de 2 plantes /m². Per tal de poder avaluar l'efecte del vent sobre la pol·linització de l'arròs salvatge es varen intercalar plantes d'aquesta mala herba en el cercles de Sénia no transgènica de tal manera que hi havien dues plantes per sector en els cercles de 1 i 2 m i quatre per sector en els de 5 i 10 m (Figura 17).

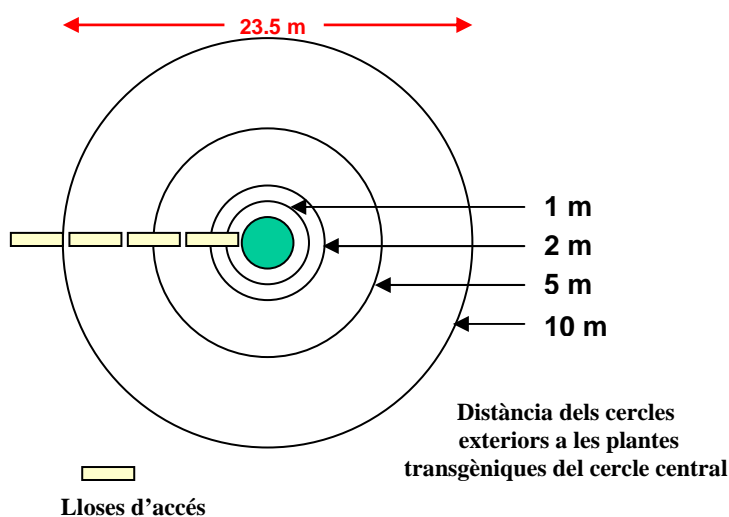


Figura 17. Disseny de l'assaig. Cercle central d' 1.7 m de radi amb 154 plantes transgèniques i 22 plantes de arròs salvatge intercalades. Els cercles exteriors situats a 1, 2, 5 i 10 m de distància sembrats amb plantes control no transgèniques y plantes de arròs salvatge intercalades distribuïdes regularment (16 en els dos cercles interiors y 32 en los exteriors).

El camp es va cultivar seguint les tècniques culturals habituals de la zona. Després de la floració, les espigues de les plantes d'arròs salvatge es varen embolicar amb una malla per tal d'evitar la caiguda de les llavors al sol, i recollir les mostres.

Un cop les llavors estaven madures, es varen recol·lectar a ma, planta per planta, assenyalant la posició que ocupaven al camp (cercle i orientació segons la rosa dels vents)

5.2 Mesures del vent

Durant el període de floració, la direcció i velocitat del vent es varen mesurar amb un anemòmetre i un potenciòmetre del tipus Delta-T Type AN1 i Delta-T Type Wd1 respectivament. Ambdós instruments es varen posar al centre del camp a una alçada just per sobre de les espigues. Les mesures de la velocitat del vent es varen prendre cada 10 segons i el promig de sis lectures s'enregistrava en un Data logger (Tipus DL33 de la casa Delta-T Devices LTD, Burwell, Cambridge). La direcció del vent es va registrar cada minut.

5.3 Anàlisi de la descendència

Les llavors es varen mantenir emmagatzemades al centre de Cabrils (a temperatura ambient en el cas de les S1 B i no transgèniques) i a 4°C en el cas de les d'arròs salvatge, per tal de trencar la dormància. Al cap de 4 mesos es va avaluar el percentatge de germinació de les llavors per determinar el pes que calia sembrar per obtenir aproximadament 500 plantetes germinades per plata.

Per avaluar les descendències, mostres de llavors de cadascuna de les plantes d'arròs salvatge i de les Sènia no transgèniques es va sembrar en plates de Porexpan (48 x 28 x 7cm) en un substrat d'arròs, en un hivernacle de vidre adaptat al cultiu de plantes transgèniques. Quan les plantetes tenien 2-3 fulles, es varen tractar amb l'herbicida Finale, a una dosi equivalent a 800 gma/Ha. Al cap de 15 dies, les plantetes que havien sobreviscut al tractament a l'herbicida s'analitzaven amb la prova histoquímica de l'activitat GUS tal com es descriu als apartats 4.3 i 4.1 respectivament de mètodes.

Donada la disponibilitat d'espai a l'hivernacle, per poder avaluar totes les plantes de l'assaig es varen fer 3 sembres consecutives. En cadascuna d'elles, es varen sembrar també una sèrie de plates amb les descendències de les S1B per tal de fer-les servir de control del tractament amb herbicida. En cadascuna d'aquestes sembres es va avaluar el percentatge de germinació obtingut, fent un recompte de les plantetes germinades de 10 plates, a fi i efecte de poder estimar el número total de plantes tractades posteriorment amb herbicida.

5.4 Estudis de segregació

Les plantes resistents a l'herbicida i gus+ es varen cultivar en el substrat descrit anteriorment per tal d'obtenir la següent generació i poder esbrinar si eren fruit de la pol·linització creuada amb el pol·len de les S1B. Així, 24 llavors de cadascuna de les plantes es varen sembrar a l'hivernacle i es varen tractar amb herbicida quan tenien 2-3 fulles. D'aquesta manera, es podia esbrinar si les plantes resistents provenien de la pol·linització creuada (segregació del caràcter de resistència) o be eren llavors

transgèniques (homozigòtiques pel caràcter de resistència) que per algun error en la recol·lecció de les llavors o en la manipulació posterior s'havien barrejat amb les altres.

5.5 Anàlisi estadístic

Per tal de determinar la significació de les diferències de flux en funció de la distància es va fer un anàlisi estadístic mitjançant el procediment SAS GLM. El test de Watson one-sample U_2 (Watson, 1962) específicament dissenyat per distribucions circulars es va fer servir per testar la hipòtesi nul·la d'uniformitat entre els cercles i demostrar la influència del vent.

RESULTATS

Tots els assaigs de transformació genètica s'han fet amb call obtingut a partir de llavors madures d'arròs de la varietat Sènia (*Oryza sativa* cv Sènia). A la Figura 18 es mostren algunes imatges representatives del procés de transformació genètica de l'arròs.

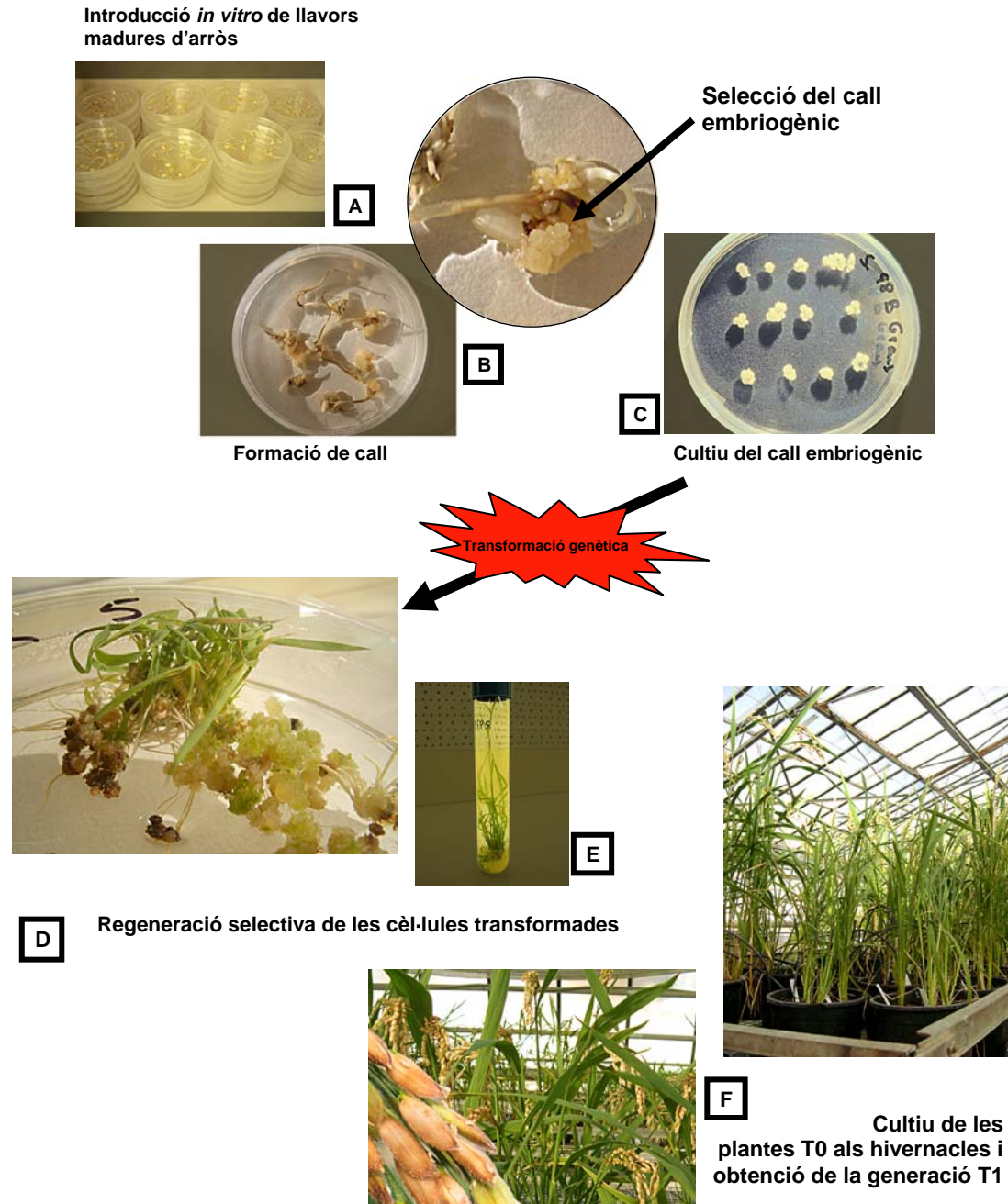


Figura 18. Principals esdeveniments que tenen lloc durant el procés de transformació genètica d'arròs. A la Figura 18A es mostren les plaques en les que s'introdueixen *in vitro* les llavors madures d'arròs. Seguidament té lloc la inducció de call embriogènic, la seva selecció (B) i el posterior subcultiu (C), fins que el call està en les millors condicions per ser transformat. Un cop realitzada la transformació genètica, per *Agrobacterium* o per biolística, s'inicia la regeneració de plantes en medi de selecció (D), l'arrelament de les plàntules clonades (18E), i l'aspecte que presenten les plantes en condicions d'hivernacle, on es cultiven per obtenir la següent generació de plantes (T1) (F).

1. ESTRATÈGIES DE CO-TRANSFORMACIÓ PER AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

1.1 Transformació amb dos vectors T-DNA introduïts individualment en *Agrobacterium*

Es van realitzar diferents assaigs de transformació utilitzant dos cultius independents de la soca EHA 105 d'*Agrobacterium tumefaciens*, cadascun amb un plàsmid portador d'un gen marcador diferent (*gfp* i *uidA*), tal com es mostra a la Figura 19. Es van fer inoculacions amb els dos cultius simultàniament i per altra banda amb un decalatge en el temps de dos i cinc dies entre un i altre cultiu.

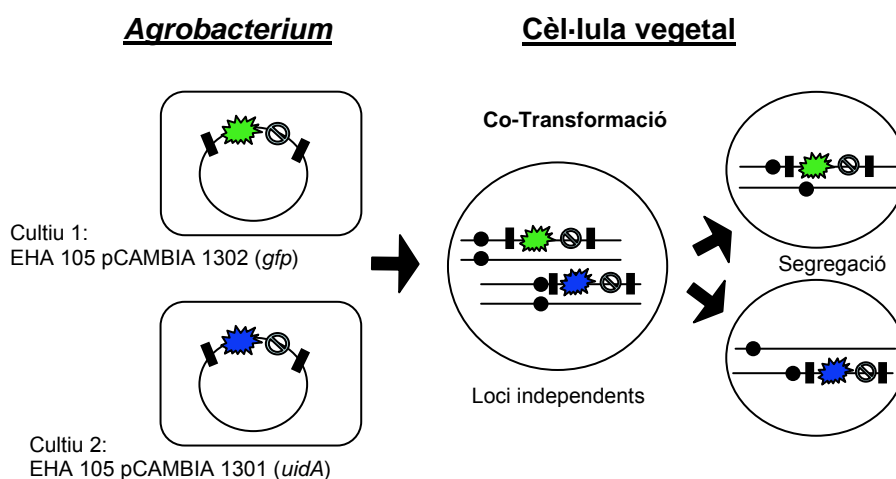


Figura 19. Esquema representatiu de les transformacions genètiques d'arròs amb dos cultius d'*Agrobacterium*, cadascun amb un plàsmid amb un gen marcador diferent: (●) *gfp*, (●) *uidA*. Cada vector conté en el T-DNA el gen que confereix resistència a la higromicina en planta (⊙).

1.1.1 Inoculació simultània amb els dos cultius d'*Agrobacterium*

Es van utilitzar el cultiu 1 (EHA 105 pCAMBIA 1302 (*gfp*)) i el cultiu 2 (EHA 105 pCAMBIA 1301 (*uidA*)) simultàniament. D'aquest assaig de transformació, que es va anomenar G1, se'n van obtenir 118 plantes procedents de 35 calls independents. Les plantes de la generació T0 de l'assaig G1 es van transferir a condicions d'aclimatació i es van cultivar en hivernacle.

Mitjançant l'anàlisi histoquímic de l'activitat GUS es va confirmar l'expressió del gen *uidA* en les plantes G1 T0. D'aquesta manera es van identificar 39 plantes *gus+* (d'un total de 101 plantes avaluades). En canvi els resultats de l'anàlisi de l'expressió del gen *gfp* mitjançant fluorescència en les plantes G1 T0 eren poc fiables. La integració del gen *gfp* es va confirmar per PCR (Figura 20) i per "Southern blot" en 55 plantes G1 T0 (dades no mostrades). Tot i que s'havia confirmat la integració del transgen, no es va poder observar la fluorescència de la proteïna GFP de manera concloent en cap d'aquestes plantes.

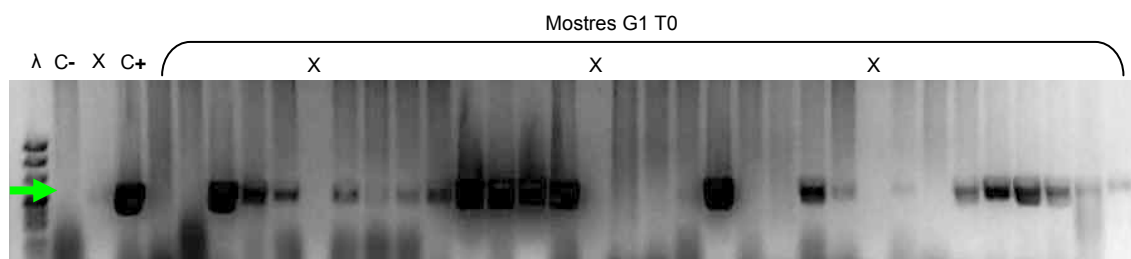


Figura 20. Anàlisi electroforètic en gel d'agarosa dels productes de la PCR amb els encebadors que amplifiquen un fragment intern del gen *gfp* de 523 pb. D'esquerra a dreta trobem el marcador de pes molecular λ pUCmix, i on se senyala de color verd l'alçada a la que corresponen els fragment de 523 pb; DNA de plantes Sènia no transformada de control negatiu (C-); Mescla de la reacció sense DNA (X), DNA del plàsmid pCAMBIA 1302 de control positiu (C+), i la resta de carrils corresponen a DNA de les plantes procedents de l'assaig G1.

En base als resultats obtinguts de l'activitat GUS i d'integració del gen *gfp* (anàlisis moleculars) es van identificar 19 plantes G1 T0 que havien co-integrat ambdós gens marcadors (sobre 55 plantes que van ser avaluades pels dos caràcters).

Es van sembrar un total de 848 llavors procedents de 18 plantes T0 co-transformades. La segregació del caràcter GUS es va poder determinar a la població T1 de les 18 línies parentals co-transformades; en canvi, la segregació del gen *gfp* no es va poder determinar mitjançant la detecció de la fluorescència de la proteïna GFP tot i que l'anàlisi molecular de les plantes indicava la presència del transgen.

Tot i que els vectors CAMBIA estan dissenyats per transformar tant espècies dicotiledònies com monocotiledònies i estan testats per *Agrobacterium* i per biolística en tabac i arròs (www.cambia.org), els nostres resultats indicaven que el gen *gfp* del plàsmid pCAMBIA 1302 no permetia obtenir la informació desitjada en plantes d'arròs,

al no permetre un seguiment de l'expressió d'aquest gen marcador mitjançant l'anàlisi de la fluorescència de la proteïna GFP.

Per aquesta raó, es va decidir avaluar la funcionalitat d'altres versions del gen *gfp* abans de continuar amb els estudis de les diferents estratègies de co-transformació previstes. Amb aquesta finalitat es va dissenyar un assaig d'expressió transitòria per biolística sobre call d'arròs amb diferents DNAs.

a) Per una banda teníem la versió *Sgfp65T* (Heim et al., 1995) del gen *gfp*, l'expressió del qual està controlada pel promotor del gen *gos2* d'arròs (De Pater et al., 1992) i el terminador del gen *rbcS* d'arròs (Matsuoka et al., 1988). El cassette *gos2:Sgfp65T:rbcS* es trobava clonat en diferents plàsmids:

- pX2-H. Plàsmid portador de dos T-DNAs en un dels quals es troben clonats els cassettes per l'expressió dels gens *gfp* i *hpt* (Figura 13A).
- pX2-HB. Plàsmid portador de dos T-DNA (Figura 13B). En un T-DNA hi ha els gens *gfp* i *hpt* (igual que en el vector pX2-H) i en l'altre T-DNA el gen *bar*.
- pX2-HCryIB. Plàsmid amb dos T-DNA, una amb els gens *gfp* i *hpt* i l'altre amb el gen *CryIB* (Figura 13C). Aquest vector va ser el que posteriorment es va utilitzar per l'obtenció de plantes transgèniques amb un gen d'interès (*CryIB*) lliures de gens de selecció (apartat 3 de resultats).

b) Plàsmid pCAMBIA 1302, provenint de la col·lecció de vectors pCAMBIA (www.cambia.org, Austràlia), amb el que es va portar a terme l'assaig G1 i que tan dubtosa expressió es va obtenir (Figura 9B).

Per descartar la possibilitat de que s'hagués rebut un lot defectuós d'aquest plàsmid, es van assajar dues preparacions diferents d'aquest plàsmid de lots rebuts per vies independents (IRTA, CSIC)

c) Plàsmid pUC19:gfp. Aquest vector contenia una versió del gen *gfp* derivada del gen *m-gfp-5-ER* descrita per Hasseloff (1997) sota el control del promotor CaMV35S (Figura 14).

- Plàsmid pCAMBIA 0390-GFP. Per digestió amb enzims de restricció es va obtenir el cassette per l'expressió del gen *gfp* a partir del plàsmid pUC19:gfp. Aquest DNA es va clonar en el vector pCAMBIA 0390 (el procés seguit per la preparació d'aquest plàsmid s'indica a l'apartat 2.1 de resultats).
- A més es va obtenir el T-DNA aïllat a partir d'aquest mateix plàsmid en experiments de transformació. La preparació d'aquest DNA s'indica a l'apartat 2.1 de resultats)

Les plaques es van disparar seguint el protocol descrit a l'apartat 3.2.2 de mètodes, però se'n va disparar una enloc de dues plaques ja que l'objectiu era comprovar la funcionalitat de les diferents versions del gen *gfp* i no l'obtenció d'un número mínim d'events de transformació independents i estables. Es van fer observacions dels calls a les 24 hores i cinc dies després de la transformació. Els resultats es mostren a la Taula IV:

	24 hores	5 dies
a) pX2-HB	+	+
pX2-H	+	+
pX2-HcryIB	+	+
b) pCAMBIA 1302 (IRTA)	-	-
pCAMBIA 1302 (CSIC)	-	-
c) pUC19:gfp	+	+
pCAMBIA 0390-gfp	+	+
T-DNA-gfp	+	+
Sènia no transformada	-	-

Taula IV. Resultats de la visualització amb la lupa de fluorescència dels calls transformats; (+) va aparèixer almenys 1 punt on l'expressió de la GFP era clara; (-) no es va visualitzar cap punt del call fluorescent.

La intensitat de fluorescència en els calls de les tres primeres plaques (pX2-H, pX2-HB, pX2-HCryIB) era molt forta. La fluorescència de la proteïna GFP provenint de la transformació amb els plàsmids pUC19:gfp, pCAMBIA 0390-GFP, o en el fragment

de T-DNA-GFP, tot i no ser tan brillant com la primera, era clarament distingible de la resta de call no transformat. La majoria dels punts visualitzats a les 24 hores del bombardeig havien incrementat en nombre i en intensitat quan es va tornar a observar el call 5 dies després. En canvi, no es va veure cap punt fluorescent en les plaques transformades amb el plasmidi comercial pCAMBIA 1302.

D'aquest assaig d'expressió transitòria es va concloure que o el gen *gfp* original dels plasmidis pCAMBIA utilitzats no era funcional o bé si ho era, calia nivells d'expressió i/o acumulació de la proteïna GFP superiors en les cèl·lules per poder-la visualitzar. Simultàniament a aquests experiments, dos representants de la casa CAMBIA, que es trobaven a Barcelona assistint al Congrés de Biologia Molecular 2003, ens van comunicar a títol personal que el gen *gfp* del plàsmid pCAMBIA 1302 no estava funcionant bé en arròs; de fet presentaven al congrés noves versions del mateix gen. Aquests resultats ens van portar a abandonar decididament el plàsmid pCAMBIA 1302.

Es va repetir l'experiment de transformació amb dos vectors T-DNA introduïts individualment en *Agrobacterium* per inoculació simultània amb els dos cultius bacterians (abans assaig G1) però aquesta vegada utilitzant el plàsmid pX2-H, portador del cassette Gos2-Sgfp65T-trbcs i la resistència a la higromicina (Figura 13).

En aquest nou assaig de transformació genètica es va inocular el call d'arròs simultàniament amb els dos cultius d'*Agrobacterium* (soca EHA 105), el cultiu 1, portador del vector pX2-H i el cultiu 2, amb el pCAMBIA 1301 (*uidA*). Aquest assaig es va anomenar G12 i se'n van fer dues repeticions. Es van obtenir un total de 40 plantes procedents de 22 calls independents (Taula V). En la mateixa taula es mostren els resultats de l'anàlisi histoquímic de l'expressió del gen *uidA* (GUS) així com de les observacions de les plantes a la lupa de fluorescència.

CODI PLANTA	CALL	GUS	GFP
G12 - 1	1	-	+
G12 - 2	2	-	+
G12 - 3	3	ND	ND
G12 - 4	4	ND	ND
G12 - 5	5	-	+
G12 - 6	5	-	+
G12 - 7	6	-	+
G12 - 8	7	-	+
G12 - 9	8	-	+
G12 - 10	1	-	+
G12 - 11	5	-	+
G12 - 12	5	-	+
G12 - 13	9	+	-
G12 - 14	1	-	+
G12 - 15	1	-	+
G12 - 16	1	-	+
G12 - 17	10	-	+
G12 - 18	10	-	+
G12 - 19	10	-	+
G12 - 20	11	-	+

CODI PLANTA	CALL	GUS	GFP
G12 - 21	12	ND	ND
G12 - 22	12	+	-
G12 - 23	13	-	+
G12 - 24	13	-	+
G12 - 25	14	-	+
G12 - 26	14	-	+
G12 - 27	14	-	-
G12 - 28	15	-	-
G12 - 29	16	+	+
G12 - 30	16	-	+
G12 - 31	17	-	+
G12 - 32	18	ND	ND
G12 - 33	19	+	-
G12 - 34	20	-	+
G12 - 35	21	-	-
G12 - 36	22	+	-
G12 - 37	18	-	+
G12 - 38	18	-	+
G12 - 39	19	-	+
G12 - 40	19	-	+

Taula V. Llistat de plantes obtingudes a l'assaig G12. A la columna de l'esquerra de cada bloc es mostra el llistat de les 40 plantes obtingudes en l'assaig G12. A la segona columna figura el call del que ha regenerat cada planta. A les altres dues columnes hi consten els resultats de les diferents observacions realitzades a les plantes, essent + positiu, - negatiu i N.D. no avaluat.

Taxes de transformació i co-transformació de les plantes T0 de l'assaig G12

El resum global de l'assaig considerant el número de plantes que han integrat un o altre caràcter independentment de l'altre, així com el número de plantes que han integrat els dos caràcters es mostra a la Taula VI.

a)

	GUS	GFP
Nº plantes + (calls)	5 (5)	29 (15)
Nº plantes - (calls)	31 (17)	7 (7)
Total avaluades (calls)	36 (19)	36 (19)

b)

GUS + GFP +	1 (1)
GUS + GFP -	4 (4)
GUS - GFP +	28 (15)
GUS - GFP -	3 (3)

Taula VI. a) Resultats de la co-transformació amb els plàsmids pC1302 i pX2-H. Els valors numèrics corresponen al número de plantes per cada cas i entre parèntesi el número de calls diferents que pertanyen a la mateixa categoria. b) Resultats expressats en quatre categories en funció de la integració dels dos gens marcadors.

A partir d'aquest resultat es pot calcular la taxa de transformació per cada gen marcador així com la taxa de co-transformació considerant la integració dels dos gens. La taxa de transformació pel gen *uidA* va ser d'entre un 13,8% i un 26,3%, mentre que pel gen *gfp* va ser entre un 78,9% i un 80,5%. La taxa d'integració dels dos gens, co-transformació va quedar entre el 2,7% i el 5,26% en funció de comptabilitzar les plantes o els calls dels que venen. La representació gràfica dels resultats es mostra a la Figura 21.

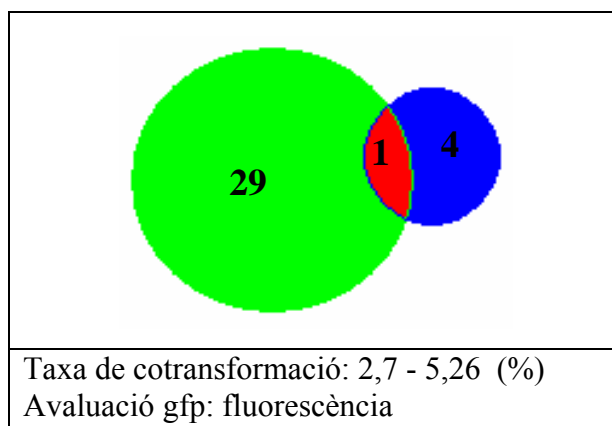


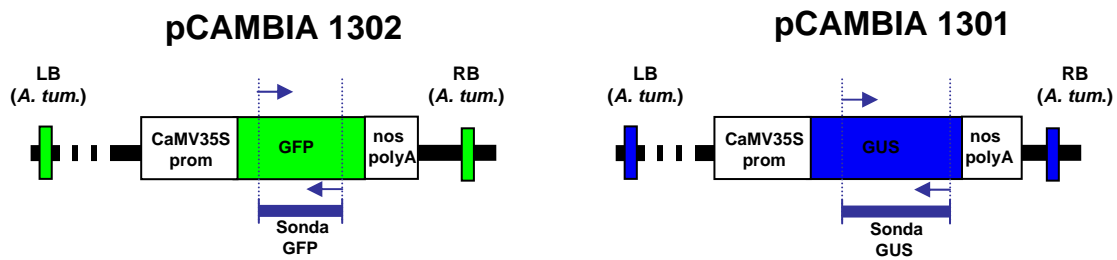
Figura 21. Representació dels resultats obtinguts en l'assaig de co-transformació G12, en què es va inocular call d'arròs amb una solució 1:1 de dues poblacions bacterianes; una, portadora del plàsmid que conté el gen *gfp* i l'altra, amb un plàsmid portador del gen *uidA*. En verd es representen les plantes que havien integrat establement el gen *gfp* i en blau les plantes que van incorporar el gen *uidA*. En vermell es representa la planta que van integrar els dos gens.

Avaluació de la segregació de caràcters en la generació T1

Tot i que es van cultivar les 36 plantes als hivernacles, inicialment les úniques llavors que estudiariem serien les produïdes per l'event de transformació que expressava els dos gens marcadors (línia G12-29).

Es van sembrar 78 llavors T1 produïdes per la planta G12-29 (*gus+gfp+*), de les que 70 eren *gfp+* i 8 *gfp-*. La proporció de plantes *gfp+* va ser del 89,7%, l'esperada considerant que podien haver-se integrat dues còpies del gen *gfp* en el genoma de la planta G12-29. Mitjançant un anàlisi per Southern blot del DNA genòmic de les plantes G12 (T0). Es va confirmar la integració de les dues còpies del gen *gfp* en la línia G12-29, a la vegada que es va determinar que presentava una sola còpia del gen *uidA* integrada en el seu genoma (Figura 22)

A)



B)

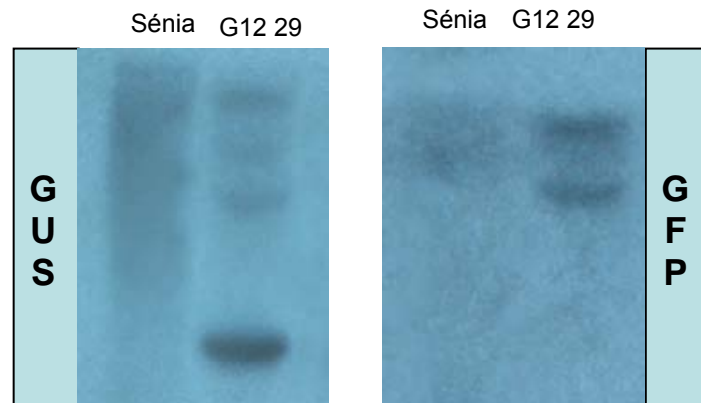


Figura 22. A) Esquema parcial dels T-DNA dels vectors pCAMBIA 1302, 1301 i 1300 en què s'indica el fragment amplificat per PCR amb els diferents encebadors. Els DNAs amplificats per PCR es van marcar radioactivament per random priming per ser posteriorment utilitzats com a sondes d'hibridació. B) Southern realitzat a la planta G12-29 T0 i a una planta Sènia no transformada (control negatiu). A l'esquerra es mostra el resultat de la hibridació de la membrana amb la sonda pel gen *uidA* en què s'observa una intensa banda en el carril de la planta transgènica, inexistent a la planta no transformada. A la dreta es mostra la hibridació amb la sonda pel gen *gfp* en la que s'observen les dues bandes d'igual intensitats presents en el carril de la planta G12-29.

L'anàlisi histoquímic de l'activitat GUS va indicar que de les 70 plantes T1 *gfp*⁺, 41 continuaven expressant el gen *uidA*, i 17 plantes havien segregat pel mateix caràcter (12 plantes van morir abans de ser analitzades). De les 8 plantes T1 *gfp*⁻, 4 van ser *gus*⁻ (les altres 4 no es van poder avaluar).

Només es van poder avaluar quatre de les vuit *gfp*⁻, les 4 van ser *gus*⁻. Considerant que es van analitzar pels dos caràcters 62 plantes, i que 41 mantenien els dos transgens, 17 eren *gus-gfp*⁺ i 4 havien perdut els dos gens, es van obtenir els percentatges de segregació que es mostren a la Taula VII. Es pot observar que hi ha segregació pel gen

RESULTATS

uidA, 66,1% de la descendència l'expressa mentre que un 33,9 % no ho fa, confirmant que hi havia una sola còpia integrada.

Segregació de caràcters en G12-29 T1	Nº plantes	%
GUS + GFP +	41	66,1
GUS + GFP -	0	0
GUS - GFP +	17	27,4
GUS - GFP -	4	6,5
TOTAL	62	100

Taula VII. Percentatges obtinguts per cadascuna de les quatre combinacions possibles amb els dos gens marcadors en plantes G12-29 T1.

Es van observar diferències en l'expressió del gen *gfp* en els diferents teixits de les plantes T1 *gfp+* procedents d'una mateixa planta T0. Així com totes les plàntules germinades presentaven com a zona de màxima intensitat de fluorescència el mesocòtil, només algunes expressaven fluorescència en l'endosperma (Figura 23).



Figura 23. Imatge de tres llavors germinades G12-29 T1 amb la lupa estereoscòpica de fluorescència Leyca MZ6, amb el filtre GFPplus. Es pot observar com es donaren diferents nivells d'expressió del gen *gfp*. Les plàntules A i C presentaven fluorescència a nivell d'endosperma a diferència de la plàntula B. La zona de major intensitat de fluorescència en totes les plàntules té lloc al mesocòtil.

La intensitat de fluorescència emesa per la proteïna GFP està directament relacionada amb la concentració de proteïna soluble que és alhora depenent del promotor que dirigeix l'expressió del gen. El promotor que dirigeix l'expressió del gen *gfp*, promotor del gen d'arròs *gos2* (de Pater et al., 1992) se sap que és actiu en diferents teixits de la planta d'arròs (fulla, arrel, coleòptil). Aquest promotor, tot i que no s'ha utilitzat tan extensament com els promotors CaMV35S o ubiquitina, presenta les característiques pròpies d'un promotor constitutiu en plantes transgèniques d'arròs. En canvi, encara que es tracti de promotors constitutius, existeixen diferències en quant al nivell d'expressió d'aquests promotors en diferents teixits d'una planta. En aquest sentit, els bons resultats obtinguts amb la versió *Sgfp65T* (diferent de la versió del gen *gfp* dels altres vectors utilitzats en aquest treball, el pCAMBIA 1302 i el pUC19:gfp) poden ser degudes no sols a les característiques de la *gfp* del plàsmid pX2-H sinó també a que en aquest cas l'expressió del gen està sota control del promotor del gen *gos2* d'arròs (mentre que en els altres casos és el promotor CaMV35S)

Es van sembrar 64 llavors T2 de quatre de les 17 línies que havien perdut el gen marcador *uidA* i mantenien el *gfp* amb la finalitat d'estudiar-ne la segregació pel darrer caràcter. Les 256 llavors van ser *gfp+*. Aquests resultats concorden amb la integració de dues còpies del gen *gfp* en la T0, ja observada per "Southern blot" a la Figura 22B.

De les 41 línies que mantenien la co-transformació en T1 (*gus+*, *gfp+*) es van triar set línies a l'atzar per sembrar-ne algunes llavors T2 i estudiar la segregació dels caràcters en la següent generació. Els resultats es mostren a la Taula VIII.

Codi planta T1	Llavors sembrades	GFP +		GFP -	
		GUS +	GUS -	GUS +	GUS -
G12-29 + 3	70	0	70	0	0
G12-29 + 4	10	7	3	0	0
G12-29 + 5	27	0	18	0	0
G12-29 + 7	70	0	69	0	0
G12-29 + 11	27	15	7	0	3
G12-29 + 15	70	0	64	0	0
G12-29 + 16	70	46	17	0	7

Taula VIII. Resultats de l'anàlisi de descendències de les plantes T1 *gfp+**gus+* que figuren a la columna de l'esquerra, totes elles eren plantes T1 que mantenien els dos transgens que caracteritzaven el seu parental, la planta G12-29. En les línies G12-29 + 5, G12-29 + 7, G12-29 + 11 i G12-29 + 15 van morir 9, 1, 2 i 6 plantes respectivament abans d'haver-ne realitzat la prova histoquímica de l'activitat GUS.

En les línies G12-29+7, G12-29+11 i G12-29+17, la segregació del gen *uidA*, en base als resultats de l'activitat GUS, s'observaren les freqüències esperades d'una sola còpia del gen. En quatre de les set línies procedents de plantes T1 *gfp+gus+* (G12-29+3, G12-29+5, G12-29+7 i G12-29+15) no hi havia activitat GUS, probablement per un efecte de silenciament en l'expressió del gen *uidA*. No es podria associar a un silenciament per múltiples còpies del gen *uidA* ja que sols hi havia una còpia integrada (Figura 22B).

Per altra banda es va observar que en dues de les set línies (G12-29+11 i G12-29+16), va haver segregació pel gen *gfp*, i amb una freqüència acceptada per la presència de dues còpies independents del gen. Donat que en aquestes dues línies no hi va haver silenciament del gen *uidA* es pot afirmar que va haver segregació dels dos caràcters. Tanmateix i d'acord amb l'observació de que la planta T0 tenia dues còpies del gen *gfp* i una del gen *uidA*, la taxa de segregació fenotípica pel gen *uidA* era molt major a l'obtinguda pel gen *gfp*, ja que no podem identificar la segregació de cada còpia, fet pel qual seria necessari avaluar poblacions de plantes descendents considerablement més grans per localitzar plantes *gfp-gus+*. Tanmateix es va veure que era possible la segregació de dos caràcters.

Tot i no haver obtingut una bona taxa de co-transformació en aquest assaig, les plantes que van regenerar i que havien integrat un o altre gen marcador, mostraven una expressió molt destacada del nou caràcter. Per aquesta raó es van triar sis plantes T0 per seguir la descendència amb l'objectiu d'obtenir línies homozigòtiques per una banda amb el gen marcador *uidA* (G-12-13, G-12-22 i G-12-36) i per altra banda línies amb el gen marcador *gfp* (G-12-14, G-12-24 i G-12-34). A la Figura 24 es mostren algunes imatges de plantes avaluades expressant intensament el gen marcador *uidA*. Per localitzar línies homozigòtiques es van sembrar 24 llavors T1 de cadascuna de les 6 plantes T0 escollides, *in vitro* i en medi N6 amb l'agent de selecció higromicina. Es van aclimatar un màxim de 16 plantes T1 que haguessin sobreviscut en presència de l'antibiòtic amb la finalitat de recollir-ne la següent generació T2. Es van transferir un mínim de 14 plantes T2 de cada línia T1 a medi selectiu per determinar-ne la homozigosi o hemizigosi del gen marcador, en funció de la segregació de caràcters.

En total es van obtenir 6 línies homozigòtiques pel gen *gfp* i 11 pel gen *uidA*. Tot i que aquestes línies contenen el gen de resistència a antibiòtic (*hpt*), i per tant no eren

objectiu d'aquest treball, es va decidir tenir-les per utilitzar-les de controls positius per altres assaigs.

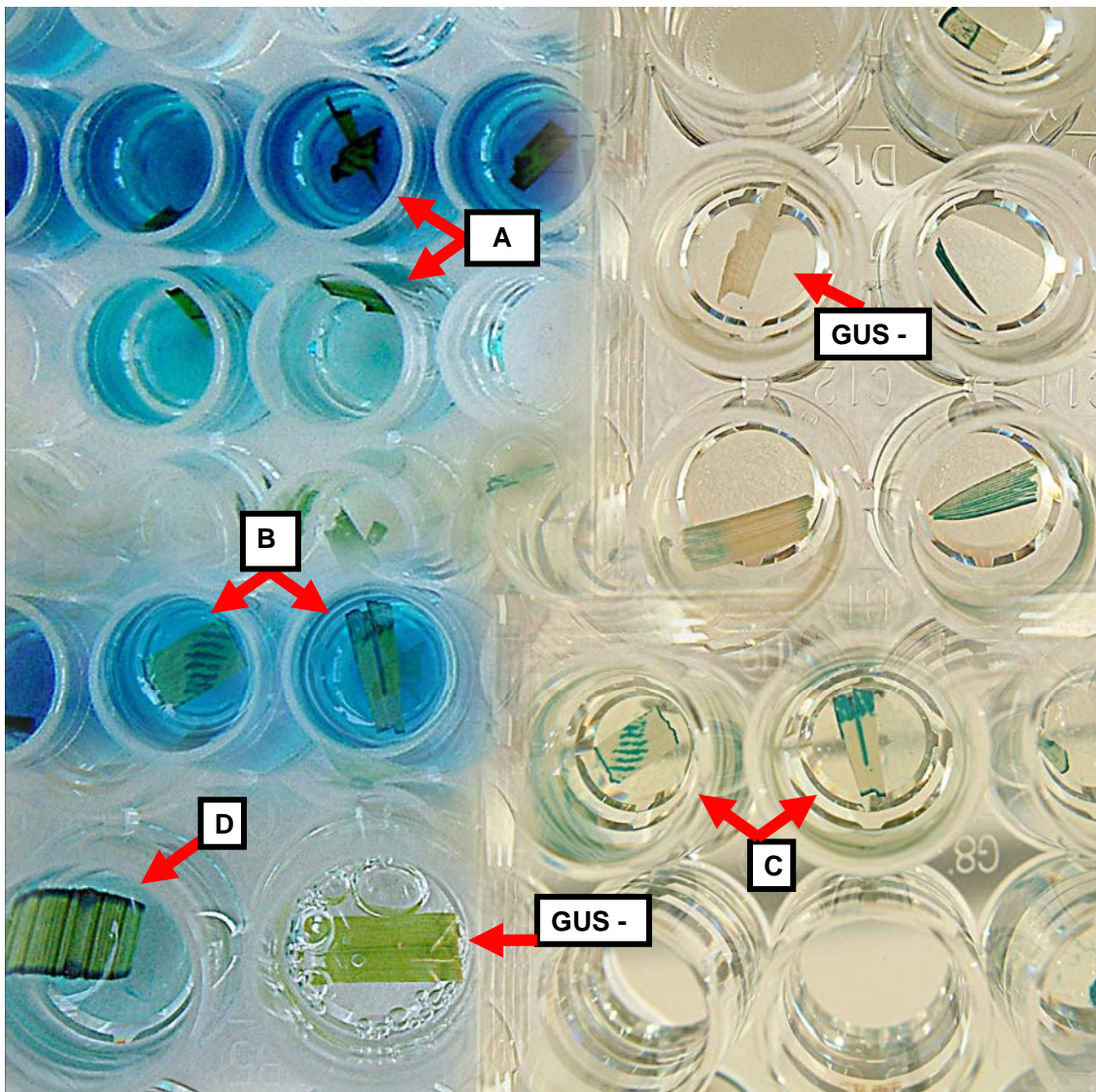


Figura 24. Imatges representatives de plantes G12-29 T2 avaluades amb la reacció histoquímica de l'enzim GUS. A l'esquerra es troben les mostres de fulla amb la solució de reacció, que ens els casos positius es veu la coloració blava del substrat. A la dreta es troben les mostres de fulla avaluades pel gen *uidA* rentades amb alcohol. A, diferents intensitats de coloració del substrat enzimàtic. B i C, Detall dues mostres abans i després dels rentats amb alcohol (B i C resp.). D, s'observa com es teneix de color blau la zona de tall de la fulla degut a la penetració de precipitats cristal·lins de color blau formats per la hidrolització del substrat incolor 5-bromo-clor-3-indol β -D-glucurònid (X-GLU). En canvi en les plantes GUS- no hi ha reacció de coloració.

1.1.2 Inoculació dels dos cultius bacterians amb decalatge de temps

A l'apartat anterior s'han presentat els resultats obtinguts en l'estratègia de co-transformació amb dos vectors T-DNA introduïts individualment en *Agrobacterium*, quan s'inoculà el material a transformar amb els dos cultius bacterians simultàniament. En aquest treball es va assajar una estratègia similar a l'anterior presentada però en la que es van realitzar les agroinfeccions de manera seqüencial, és a dir amb un decalatge en el temps en la inoculació amb cadascun dels dos cultius bacterians, el cultiu portador del gen marcador *uidA* (*Agrobacterium* EHA 105 pCAMBIA 1301) i el cultiu portador del gen marcador *gfp.* (*Agrobacterium* EHA 105 pX2-H). Es van deixar 2 i 5 dies entre una i altra agroinfecció.

De l'assaig de transformació genètica en què s'inoculà el call d'arròs amb el plàsmid pX2-H i dos dies després amb el pCAMBIA 1301, anomenat G13, es van obtenir set plantes procedents de tres calls independents. De l'assaig G14, amb un decalatge de cinc dies entre les dues inoculacions no va regenerar cap planta. Cap de les plantes G13 va ser positiva per la reacció histoquímica de l'enzim GUS.

Un cop avaluades les plantes obtingudes en els assaigs G13 i G14 i no tenir cap planta co-transformada no es va poder estudiar la segregació de dos caràcters en la seva descendència.

1.2 Transformació amb dos vectors introduïts conjuntament a *Agrobacterium*

Per la realització d'aquesta estratègia es va utilitzar la soca d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 enlloc de la soca fins ara emprada EHA 105. En un assaig previ de resistències a antibiòtics per bacteris, vàrem constatar que la soca d'*Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 creixia perfectament fins a concentracions de 100 mg/l de Cloramfenicol, en canvi la soca LBA 4404 no creixia a 10 mg/l del mateix antibiòtic. Per aquesta raó es va utilitzar la soca LBA 4404 en l'assaig en què es van introduir dos plàsmids T-DNA diferents, pCAMBIA 1201 i pCAMBIA 1302, cadascun amb un gen marcador diferent en el T-DNA i cadascun amb un gen de selecció per bacteri diferent (*uidA*-Cloramfenicol, *gfp*-Kanamicina resp.). L'esquema de l'estratègia es mostra a la Figura 25.

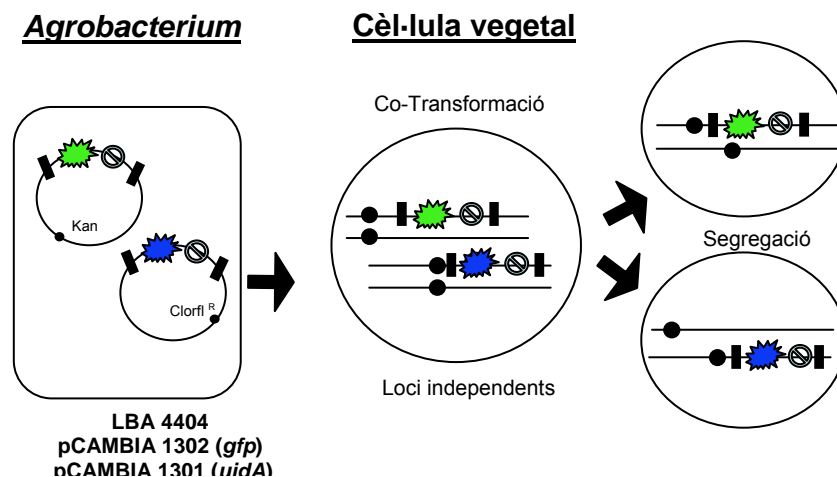


Figura 25. Representació esquemàtica de l'estratègia amb que es va inocular el call d'arròs amb un cultiu d'*Agrobacterium* al que se li van introduir dos vectors T-DNA, pCAMBIA 1201 i pCAMBIA 1302, el cultiu bacterià es va seleccionar sempre amb els dos antibiòtics.

En l'assaig de transformació genètica amb la soca LBA 4404 d'*Agrobacterium tumefaciens*, a la que s'hi van introduir dos plàsmids, un portador del gen marcador *uidA* (pCAMBIA 1201) i l'altre del gen *gfp* (pCAMBIA 1302) del que es van fer dues repeticions i que es va anomenar G5, es van obtenir 67 plantes de 28 calls independents

Igual que en la resta d'assaigs en què es va transformar el call d'arròs amb el plàsmid pCAMBIA 1302 (apartat 1.1 de resultats) la determinació de l'expressió del gen *gfp* no es va poder portar a terme. En canvi, l'anàlisi de l'expressió del gen *uidA*, del plàsmid pCAMBIA 1201 realitzat tant en planta *in vitro* com en planta aclimatada va ser negatiu per les 59 plantes T0 avaluades.

D'entrada, semblava que el transgen *uidA* no s'havia integrat, però la soca bacteriana sempre es feia créixer amb els dos antibiòtics de selecció bacteriana. També va barrejar la hipòtesi que basava els resultats negatius pel gen *uidA* en una no funcionalitat del gen del vector comercial pCAMBIA 1201. A l'apartat 1.1 de resultats es presenta la falta de funcionalitat del gen *gfp* del vector pCAMBIA 1302, de la mateixa casa comercial. Per descartar la possibilitat de que el gen *uidA* del vector pCAMBIA 1201 no fos funcional, es va portar a terme un assaig d'expressió transitòria sobre call d'arròs i sobre epíteli de ceba (*Allium cepa* L.). Els resultats indicaren que el plàsmid era funcional (dades no mostrades).

Abans de treure cap conclusió, i de la mateixa manera que es van repetir els assaigs G1, G2 i G3 amb el vector pX2-H substituint el pCAMBIA 1302, es va fer amb el G5, anomenat aleshores G15. Així, es va transformar *Agrobacterium* amb els dos plàsmids simultàniament, pCAMBIA 1201 i pX2-H fent-se créixer en doble selecció amb els antibiòtics Kanamicina i Cloramfenicol. Aquest cultiu es va utilitzar per portar a terme l'agroinfecció (assaig G15)

De l'assaig G15 van regenerar 50 plantes procedents de 34 calls independents, cap de les 40 plantes avaluades pel caràcter GUS va ser positiva i 37 de les 41 avaluades per fluorescència van ser positives.

Així, van haver quatre plantes que no havien integrat cap dels dos plàsmids i en canvi van créixer en selecció amb higromicina. Es podria pensar que es tractava de falsos positius, descrits a la literatura, o bé events que integraren còpies truncades del gens marcadors.

La taxa de transformació pel gen *gfp* en l'assaig G15 es va mantenir alta com en els assaigs precedents situant-se entre el 89,6 i el 90,2%. Tanmateix al no tenir plantes co-transformades no es va poder arribar a cap resultat de co-transformació mitjançant aquesta estratègia experimental.

1.3 Inoculació amb una soca bacteriana portadora d'un vector amb dos T-DNA

1.3.1 Assaig de transformació

En aquest assaig de transformació es va inocular el call d'arròs amb la soca EHA 105 d'*Agrobacterium tumefaciens*, amb el plàsmid pX2-HB, portador de dos T-DNA, el T-DNA-1, flanquejat amb els extrems d'*A. tumefaciens* amb el gen de selecció per planta *hpt* i el gen marcador *gfp* i el T-DNA-2 amb extrems d'*A. rhizogenes*, amb el gen *bar* que confereix resistència a herbicida. A diferència dels assaigs de co-transformació fins ara realitzats, en què es partia de dos gens marcadors (*uidA* i *gfp*) cadascun clonat a continuació del gen de selecció *hpt* de manera que teòricament es podria avaluar la co-transformació considerant la integració independentment cada transgen, en el doble T-

DNA, només un dels gens marcadors (*gfp*) es troba clonat en el mateix T-DNA on hi ha el gen de selecció per planta *hpt*. Així el segon gen marcador, *bar* en aquest cas i que no es va utilitzar com a gen de selecció per regenerar les cèl·lules transformades, es troba sol en el T-DNA-2, que per segregació de caràcters de la planta T0 co-transformada es trobaria en un apart de la descendència T1 sense gen de selecció. Per tant hi ha un factor direccional en el disseny d'aquesta estratègia en què el gen *bar* ocuparia el lloc del gen d'interès. A la Figura 26 es pot veure la representació esquemàtica de l'estratègia.

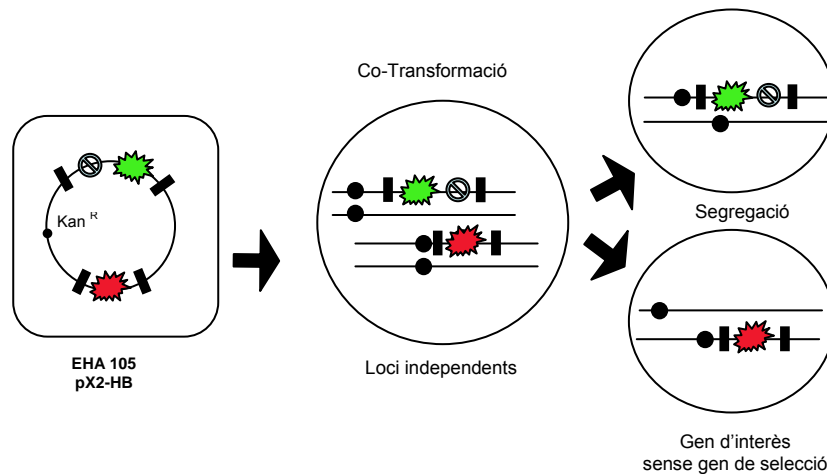


Figura 26. Esquema de l'assaig, en que es va inocular el call d'arròs amb el plàsmid portador de dos T-DNA (assaig G9). El T-DNA flanquejat per els extrems d'*Agrobacterium tumefaciens*, T-DNA-1, conté el gen de selecció per planta *hpt* (☉) i el gen marcador *gfp* (★). En el T-DNA-2, amb els extrems d'*Agrobacterium rhizogenes*, es troba el gen *bar* (★), que confereix resistència a la fosfotricina.

Aquest assaig es va anomenar G9 i se'n van realitzar dos experiments de transformació dels que se'n van obtenir 18 i 29 plantes procedents de set i vint calls independents respectivament.

Durant el procés de regeneració es va fer el seguiment de la fluorescència dels calls permetent-nos discriminar entre els calls que havien incorporat funcionalment tant la resistència a la Higromicina (*hpt*) com la proteïna fluorescent (*gfp*); amb l'excepció de la planta G9-36, que tot i no ser fluorescent regenerà en medi selectiu. A la Figura 27 es mostren unes imatges del seguiment de l'expressió de la proteïna *gfp* en call i planta regenerada en tub.

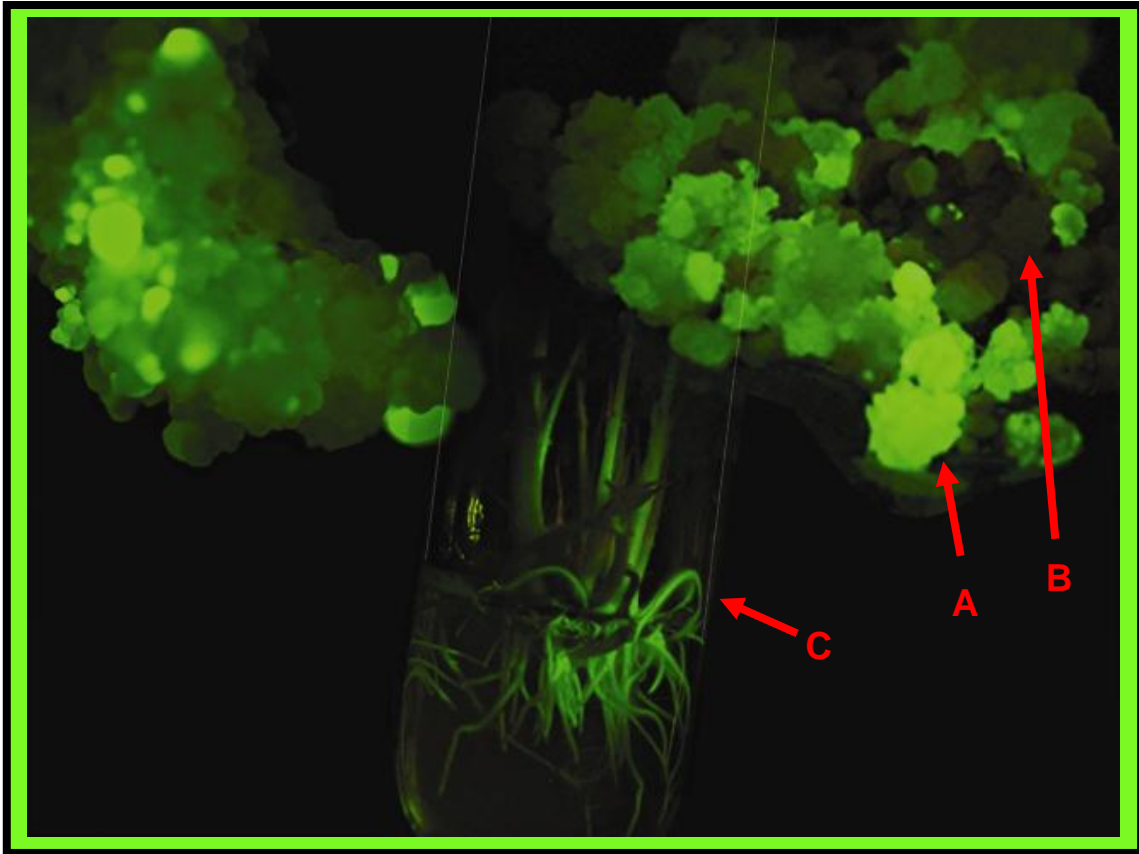


Figura 27. Imatges del seguiment de l'expressió del gen *gfp* en les diferents etapes de la regeneració de plantes d'arròs transgèniques transformades amb el plàsmid portador de dos T-DNAs (pX2-HB). A la part superior es mostren diferents estadis del call transformat on es diferencien zones que han integrat estable i funcionalment el gen *gfp* (A), i zones negatives pel caràcter (B). A la part inferior es mostra una planta *gfp+* en tub regenerada a partir del call (C).

Es van transferir les plantes T0 als hivernacles. Set línies no van sobreviure al procés d'aclimatació (G9-5, G9-14, G9-15, G9-20, G9-26, G9-32 i G9-39).

Per determinar la incorporació funcional del gen *bar*, situat al segon T-DNA, a les plantes T0, es pintaven fulles adultes amb una solució aquosa de l'herbicida (3'95ml de Finale/litre) tal com es descriu a l'apartat 4.3.de mètodes. L'aplicació puntual de l'herbicida va permetre determinar la funcionalitat del gen *bar in vivo* sense implicar la mort dels individus que no havien incorporat el gen. Tal com es mostra a la Figura 28, els efectes del glufosinat eren evidents entre un i altre fenotip.



Figura 28. Plantes d'arròs adultes a les que se'ls va determinar la resistència a l'herbicida Finale per aplicació puntual del producte. A la dreta planta adulta no transformada de la varietat Sénia i a l'esquerra una planta transgènica portadora del gen *bar* deu dies després de l'aplicació de l'herbicida. Les fletxes senyalen la localització de l'aplicació del producte, i a la part central es mostra un detall dels símptomes de sensibilitat a l'herbicida respecte la inexistència de lesions de la planta resistent.

Segons aquesta prova funcional, 25 de les 40 plantes avaluades havien integrat el gen *bar*, ja que no van presentar cap símptoma pel tractament amb l'herbicida i 15 plantes van ser sensibles al tractament. Els resultats poden observar-se a la Taula IX.

CODI PLANTA	CALL	GFP	BAR
G9 – 1	1	+	-
G9 – 2	1	+	+
G9 – 3	1	+	-
G9 – 4	1	+	-
G9 – 5	2	+	ND
G9 – 6	3	+	+
G9 – 7	1	+	+
G9 – 8	1	+	+
G9 – 9	1	+	+
G9 – 10	4	+	-
G9 – 11	4	+	-
G9 – 12	5	+	-
G9 – 13	6	+	+
G9 – 14	6	+	ND
G9 – 15	3	+	ND
G9 – 16	7	+	+
G9 – 17	6	+	-
G9 – 18	6	+	+
G9 – 19	8	+	+
G9 – 20	8	+	ND
G9 – 21	9	+	+
G9 – 22	9	+	-
G9 – 23	10	+	+

CODI PLANTA	CALL	GFP	BAR
G9 – 24	10	+	-
G9 – 25	10	+	-
G9 – 26	11	+	ND
G9 – 27	12	+	+
G9 – 28	13	+	+
G9 – 29	14	+	+
G9 – 30	14	+	-
G9 – 31	15	+	+
G9 – 32	15	+	ND
G9 – 33	16	+	+
G9 – 34	16	+	+
G9 – 35	17	+	+
G9 – 36	18	-	-
G9 – 37	19	+	+
G9 – 38	19	+	+
G9 – 39	20	+	ND
G9 – 40	21	+	+
G9 – 41	21	+	+
G9 – 42	22	+	+
G9 – 43	23	+	+
G9 – 44	24	+	-
G9 – 45	25	+	+
G9 – 46	26	+	-
G9 – 47	27	+	-

Taula IX. Relació de les 47 plantes T0 obtingudes en l'assaig G9, en què es va inocular el call amb el plàsmid pX2-HB portador de dos T-DNA. En el primer assaig es van obtenir 18 plantes (G9-1 a G9-18) i la resta es van obtenir en la repetició del mateix (G9-19 a G9-47). Els calls es van seleccionar amb Higromicina, gen que compartia el mateix T-DNA que el gen *gfp*. El gen del segon T-DNA era el *bar*, que conferia resistència al glufosinat, i l'avaluació de les plantes per aquest gen es va portar a terme amb l'anomenada aplicació puntual del producte en dues fulles de cada planta. A la segona columna es mostra l'origen de cada succés de transformació respecte el call del que provenen. Les plantes avaluades per cada caràcter van ser positives (+), negatives (-) o no van poder ser determinades (ND).

Per determinar la taxa de co-transformació de l'assaig G9 calia conèixer el número d'events independents obtinguts. En aquest sentit es van analitzar per Southern les plantes T0 que es cultivaven als hivernacles. A la Figura 29 es mostra un esquema del vector amb les dianes utilitzades per digerir el DNA així com les regions de DNA utilitzades com a sondes d'hibridació. Cada digestió genòmica es dividia en tres alíquotes iguals amb la finalitat de tenir tres membranes rèplica separades però iguals

per hibridar amb cadascuna de les tres sondes (HIGRO, GFP i BAR). Les sondes es van obtenir de l'amplificació per PCR de plàsmids que contenen el gen en qüestió (pCAMBIA 1300, pCAMBIA 1302 i pCAMBIA 3300, resp.), i es marcaven amb ^{32}P per random priming (apartat 1.8 de mètodes).

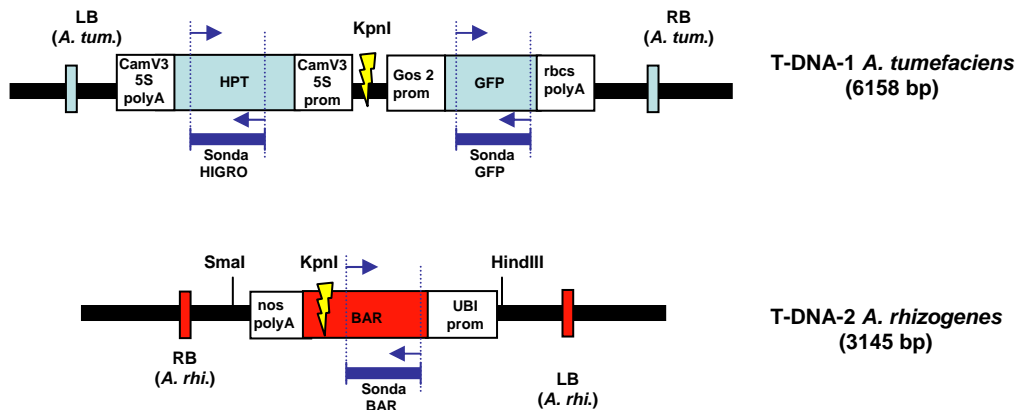


Figura 29. Esquema dels dos T-DNA del vector pX2-HB, en forma lineal en el què es posicionen les dianes utilitzades per digerir el DNA i les regions de DNA utilitzades com a sondes d'hibridació. Les fletxes de color blau indiquen la posició dels corresponents parells d'encebadors de cada gen.

A la Figura 30 es mostren els resultats obtinguts per algunes de les plantes analitzades per “Southern blot” per determinar el número de còpies i els patrons d'integració del gen *hpt*. Algunes d'aquestes plantes es van identificar com a clons donat que presentaven el mateix patró d'integració del transgen. En els Southern de les plantes obtingudes en el primer assaig (G9-1 a G9-18) el DNA genòmic de cada planta es va digerir per separat amb dos enzims de restricció (SmaI i HindIII) (Figura 30A). El DNA de la resta de plantes va ser digerit amb un sol enzim de restricció, KpnI (Breitler et al., 2004) (Figura 30B). Amb l'anàlisi molecular per Southern es van poder determinar els events de transformació independents així com l'aproximació al número de còpies integrades de cada transgen.

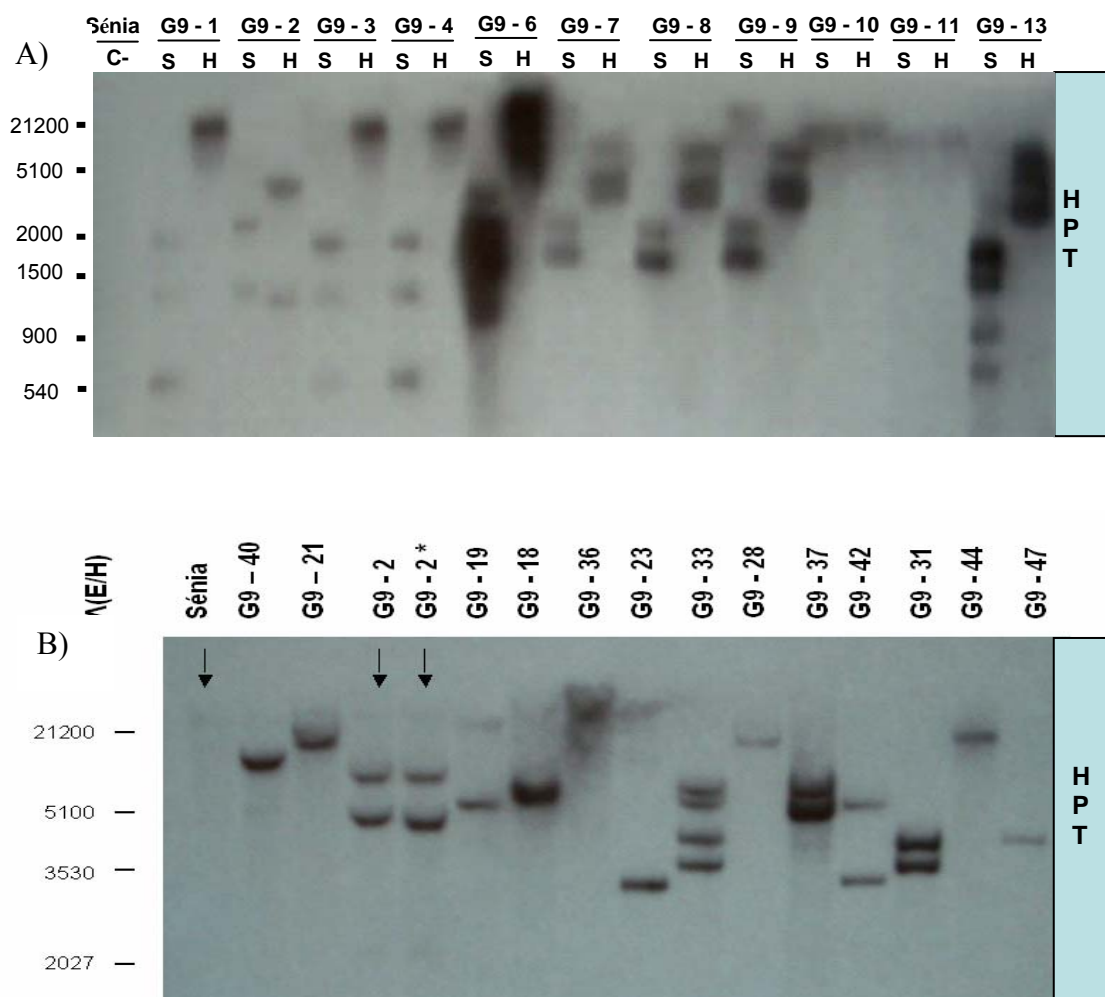


Figura 30. A Anàlisi “Southern blot” del DNA genòmic de plantes transgèniques procedents de l’assaig de transformació amb el vector 2-TDNA, es mostra algun exemple amb algunes plantes G9 T0. El DNA genòmic de cada planta es va digerir per separat amb els enzims de restricció SmaI (S), HindIII (H). La sonda d’hibridació utilitzada va ser la Higromicina i es pot observar com plantes G9-1, G9-2, G9-3, G9-4, G9-7, G9-8 i G9-9 que provenien del mateix call, en realitat segueixen tres patrons d’integració diferents. En aquest sentit les plantes G9-1, G9-3 i G9-4 eren clons d’un mateix event de transformació, diferents del G9-2 i del presentat per les plantes G9-7, G9-8 i G9-9 que també seguien un mateix patró. B Anàlisi “Southern blot” representatiu de línies G9. La sonda d’hibridació utilitzada va ser la Higromicina. El DNA genòmic de les plantes es va digerir amb KpnI. Les plantes analitzades en aquest Southern eren T0 amb l’excepció de la G9-2, que es va avaluar en T0 i T1 (*), es pot observa com continuava mantenint les dues còpies estimades en la T0.

Les plantes G9-1, G9-3 i G9-4, totes elles originàries del call 1, presentaven el mateix patró de bandes pels dos enzims, indicant que es tractava de tres clons d’un mateix event de transformació. En canvi, la planta G9-2, que també venia del call 1, presentava un patró de bandes diferents. I les plantes G9-7, G9-8 i G9-9, procedents

també del call 1, van presentar el mateix patró de bandes entre elles però diferents dels anteriors. Per tant del call 1 en realitat hi havia tres events de transformació independents. Els resultats globals dels anàlisis per “Southern blot” de les plantes obtingudes per transformació amb el vector 2T-DNA (assaig G9) es mostren a la Taula X.

Codi planta	call	Nº de còpies integrades			Determinació genotípica
		GFP	HPT	BAR	
G9 - 2	1	1	2	1	GFP + BAR +
G9 - (1,3,4)	1	1-2	2-3	0	GFP + BAR -
G9 - 6	3	3-5	3-5	3-5	GFP + BAR +
G9 - 9	1	2-4	2-3	1-3	GFP + BAR +
G9 - (10,11)	4	1	1	0	GFP + BAR -
G9 - 13	6	/	2-5	3-5	GFP + BAR +
G9 - 16	7	2-3	1	1-3	GFP + BAR +
G9 - 17	6	1-2	1-2	1-2	GFP + BAR -
G9 - 18	6	2	1-2	1-2	GFP + BAR +
G9 - 19	8	1	1	1	GFP + BAR +
G9 - 21	9	1	1-2	1	GFP + BAR +
G9 - 22	9	1-2	1	0	GFP + BAR -
G9 - 23	10	1	1	1	GFP + BAR +
G9 - 24	10	/	1	0	GFP + BAR -
G9 - 25	10	1-2	1	0	GFP + BAR -
G9 - 27	12	/	1	/	GFP + BAR +
G9 - 28	13	1	1	1-3	GFP + BAR +
G9 - 29	14	1-2	2-4	2-4	GFP + BAR +
G9 - 30	14	1	1	0	GFP + BAR -
G9 - 31	15	1-3	1-3	2-3	GFP + BAR +
G9 - 33	16	2-3	1-4	3-5	GFP + BAR +
G9 - 34	16	1	1	1	GFP + BAR +
G9 - 35	17	/	1	1	GFP + BAR +
G9 - 36	18	0	1	0	-GFP -BAR
G9 - (37,38)	19	1-2	1-2	1-3	GFP + BAR +
G9 - 40	21	1	1	1-3	GFP + BAR +
G9 - 41	21	1	1	1	GFP + BAR +
G9 - 42	22	1-2	1-2	1-2	GFP + BAR +
G9 - 43	23	1-2	2	1-3	GFP + BAR +
G9 - 44	24	1	1	0	GFP + BAR -
G9 - 45	25	1-2	1	1	GFP + BAR +
G9 - 46	26	/	/	/	GFP + BAR -
G9 - 47	27	1	1	0	GFP + BAR -

Taula X. Resultats globals de transformació amb el vector 2 T-DNA, assaig G9. Es mostren les dades obtingudes dels anàlisi per “Southern blot” detallant l’estimació del número de còpies integrades de cada gen, la barra (/) indica que no va poder ser avaluat el caràcter. A la columna de la dreta es presenten les determinacions genotípiques que es van fer a partir dels Southern i de l’avaluació posterior de la generació T1, ressaltant amb colors vermell les plantes co-transformades i amb verd les plantes que només havien integrat el gen marcador *gfp*. De color blau cel es mostra l’únic cas detectat que no tenia ni un ni altre gen (*gfp*- *bar*-).

Tal com es mostra a la Taula X, no va haver cap cas de fals positiu en les determinacions fenotípiques *in vivo* de la resistència al glufosinat anteriorment realitzades. Excepcionalment, La planta G9-17, sensible a l'aplicació de l'herbicida, havia integrat 1-2 còpies del gen *bar* segons l'avaluació molecular del Southern, però aparentment aquestes còpies no eren funcionals.

D'aquesta manera es conclou que la taxa de co-transformació obtinguda en l'assaig G9, en què es va inocular call d'arròs amb el plàsmid pX2-HB, portador de dos T-DNA, el T-DNA-1 amb els dos cassettes d'expressió 35S::*hpt*::nos per selecció en planta i el Gos2::*sgfp65T*::trbcs com a gen marcador, i el T-DNA-2 amb el cassette ubi::*bar*::nos, i seleccionant-lo per un dels dos T-DNA (selecció per Higromicina), va ser 69,7% (23 co-transformats / 33 events independents avaluats). Donat que la selecció del material transformat es va realitzar amb Higromicina, no és possible detectar si ha hagut events d'integració del T-DNA-2 independents. A la Figura 31 queden representades aquestes dades.

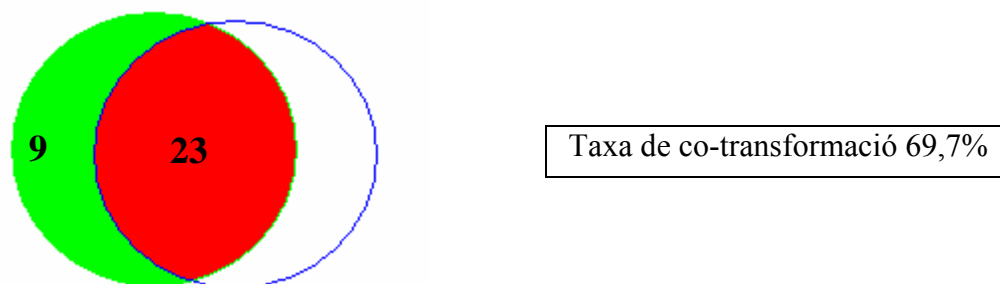


Figura 31. Representació dels resultats de la co-transformació obtinguda en l'assaig amb el doble T-DNA. En verd es representen els events de transformació T0 independents portadors del T-DNA-1 (amb els gens *gfp* i *hpt*). Encerclades en vermell es representen els casos que integrarien ambdós T-DNAs, dels quals només podem conèixer els events que integren a més del T-DNA-2 alguna còpia funcional del gen *hpt* present en el T-DNA-1, ja que la selecció del material transformat va ser amb Higromicina.

1.3.2 Estudis de segregació

1.3.2.1 Objectius dels estudis de segregació de la generació G9-T1

a) L'obtenció de línies d'arròs portadores del gen *bar* (que en estudis posteriors seria substituït pel gen d'interès) i sense el gen de selecció *hpt* (i del gen marcador *gfp*) que es perdria per segregació de caràcters en la generació T1.

b) Obtenció de línies d'arròs portadores dels dos gens marcadors, línies *gfp+bar+*. La identificació d'aquestes línies era necessària per la realització dels assaigs de flux de gens en arròs prevists pel període 2004-2006.

1.3.2.2 Avaluació de la generació T1

Es van cultivar les 33 plantes T0 a l'hivernacle amb l'objectiu d'obtenir-ne la descendència T1 i avaluar-ne el comportament fenotípic. Així, podríem obtenir les taxes de segregació que determinarien la viabilitat de l'estratègia, a banda de determinar la relació d'integració entre transgens (mateix *locus* o en *loci* independents) més probable en T0. Les línies G9-11 i G9-35 no van ser avaluades donat que van ser estèrils, i la línia G9-36 no tenia incorporat cap dels dos gens d'estudi.

Per tal d'avaluar cadascuna de les línies obtingudes amb més detall, es van sembrar sèries de 64 llavors T1 de les 30 línies G9 T0 (Taula X). Es va treballar amb poblacions de 64 llavors per trobar amb gran probabilitat ($p=0,98$) representants de cadascun dels quatre fenotips possibles de la combinació de dos gens dominants. La probabilitat de que una distribució real de 9:3:3:1 (2 gens dominants independents, cas teòric més senzill) en una població de 64 individus que no aparegués cap representant del fenotip minoritari (*gfp-bar-*) és $p=0,016$.

El sistema que es va seguir per avaluar la generació T1 va ser l'observació de les plàntules T1 a la lupa de fluorescència per separar els dos fenotips: plantes que heretaven el caràcter *gfp* i l'expressaven (fenotip *gfp+*) i plantes que per segregació de caràcters perdien el caràcter o el deixaven d'expressar (fenotip *gfp-*). Posteriorment s'aclimataven les plàntules caracteritzades per la fluorescència de la proteïna GFP i quan assolien l'estadi de 4 fulles es ruixaven amb una solució aquosa de glufosinat d'amoní (3,95 ml Finale/ litre). Una setmana més tard els símptomes de les plantes sensibles ja eren molt visibles. Aquesta metodologia es troba descrita als apartats 4.2 i 4.3 de mètodes, i a la Figura 32 es mostren algunes imatges dels dos processos.

A la Taula XI es mostren els resultats obtinguts de l'avaluació de les descendències de les plantes G9 T0.

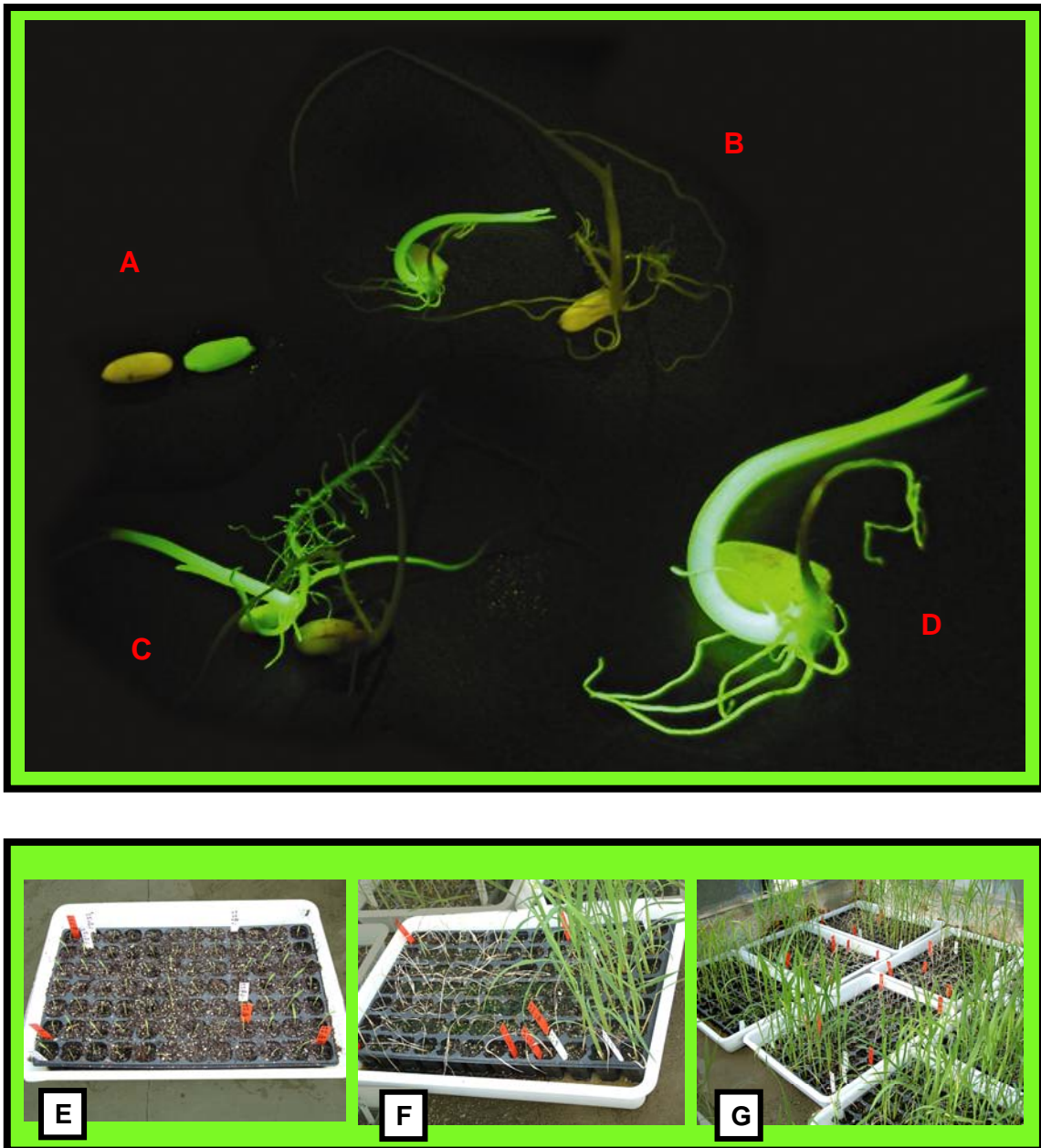


Figura 32. Imatges preses durant l'avaluació de la fluorescència de llavors G9 T1 (A, B, C i D) i posterior comprovació de la resistència a herbicida de les plàntules (E, F i G). A, llavors 24 hores després de posar-les a germinar, es pot observar com des d'estadis primerencs es podien diferenciar les plantes *gfp+* de les *gfp-*. B i C, observació de les plàntules 72 hores després de la germinació. Es poden apreciar les diferències entre les plantes fluorescentes de les que no. L'expressió constitutiva i la intensitat de del gen *gfp* permeten observar detalls com les arrels secundàries de les arrels principals (C). D, detall d'una plàntula d'arròs *gfp+*. E, un cop avaluades pel gen *gfp*, les plàntules G9-T1 es cultivaven a l'hivernacle degudament etiquetades. Quan les plantes assolien un estadi de 4 fulles es ruixaven amb una solució aquosa de Finale. F, aspecte d'una grup de plantes 12 dies després de ser tractades amb herbicida. Es pot observar com les plantes de la part esquerra van morir mentre que les de la part dreta van resistir sense presentar lesions. G, imatge corresponent a un grup de poblacions tractades amb Finale.

PLANTA	llavors	llavors	%	GFP+	GFP+	GFP-	GFP-	%	%	%	%	%	%	%	%
T0	T1 sem.	T1 germ.	germin.	BAR+	BAR-	BAR+	BAR-	GFP +	GPF -	BAR+	BAR -	BAR+	BAR-	BAR+	BAR-
G9 2	63	43	68,3	0	0	36	7	0	100	83,7	16,3	0	0	83,72	16,28
G9 4	64	55	85,9	0	34	0	21	61,8	38,2	0	100	0	61,82	0	38,18
G9 6	70	59	84,3	0	0	58	1	0	100	98,3	1,7	0	0	98,31	1,69
G9 9	189	153	81	117	23	0	13	91,5	8,5	76,5	23,5	76,47	15,03	0	8,5
G9 13	66	59	89,4	49	0	5	5	83,1	16,9	91,5	8,5	83,05	0	8,47	8,47
G9 16	64	60	93,8	46	0	0	14	76,7	23,3	76,7	23,3	76,67	0	0	23,33
G9 17	64	57	89,1	0	43	0	14	75,4	24,6	0	100	0	75,44	0	24,56
G9 18	190	150	78,9	114	0	0	36	76	24	76	24	76	0	0	24
G9 19	204	192	94,1	133	5	0	54	71,9	28,1	69,3	30,7	69,27	2,6	0	28,13
G9 21	64	58	90,6	35	9	10	4	75,9	24,1	77,6	22,4	60,34	15,52	17,24	6,9
G9 22	68	64	94,1	0	52	0	12	81,2	18,8	0	100	0	81,25	0	18,75
G9 23	64	60	93,8	32	12	13	3	73,3	26,7	75	25	53,33	20	21,67	5
G9 24	65	58	89,2	0	38	0	20	65,5	34,5	0	100	0	65,52	0	34,48
G9 25	61	37	60,7	0	33	0	4	89,2	10,8	0	100	0	89,19	0	10,81
G9 27	192	165	85,9	4	0	117	44	2,4	97,6	73,3	26,7	2,42	0	70,91	26,67
G9 28	63	58	92,1	44	0	9	5	75,9	24,1	91,4	8,6	75,86	0	15,52	8,62
G9 29	61	52	85,2	46	0	0	6	88,5	11,5	88,5	11,5	88,46	0	0	11,54
G9 30	63	61	96,8	0	46	0	15	75,4	24,6	0	100	0	75,41	0	24,59
G9 31	131	114	87	106	7	1	0	99,1	0,9	93,9	6,1	92,98	6,14	0,88	0
G9 33	64	56	87,5	37	0	0	19	66,1	33,9	66,1	33,9	66,07	0	0	33,93
G9 34	64	60	93,8	48	0	0	12	80	20	80	20	80	0	0	20
G9 37	64	60	93,8	55	0	0	15	78,6	21,4	78,6	21,4	78,57	0	0	21,43
G9 40	64	57	89,1	38	0	0	19	66,7	33,3	66,7	33,3	66,67	0	0	33,33
G9 41	63	55	87,3	45	0	0	10	81,8	18,2	81,8	18,2	81,82	0	0	18,18
G9 42	64	51	79,7	35	0	0	16	68,6	31,4	68,6	31,4	68,63	0	0	31,37
G9 43	63	44	69,8	30	2	0	12	72,7	27,3	68,2	31,8	68,18	4,55	0	27,27
G9 44	62	58	93,5	0	38	0	20	65,5	34,5	0	100	0	65,52	0	34,48
G9 45	64	56	87,5	46	0	0	10	82,1	17,9	82,1	17,9	82,14	0	0	17,86
G9 46	60	45	75	0	33	0	12	73,3	26,7	0	100	0	73,33	0	26,67
G9 47	64	57	89,1	0	42	0	15	73,7	26,3	0	100	0	73,68	0	26,32

Taula XI. Estudi de la descendència T1 de transformació amb el vector 2T-DNA. Es mostra el nom de cada línia T0 avaluada, el número de llavors sembrades i germinades de cadascuna d'elles, amb el conseqüent percentatge de germinació. Per altra banda es mostren els resultats de les avaluacions fenotípiques per cadascun dels dos gens (*gfp* i *bar*) amb els corresponents percentatges. I es mostren els percentatges o freqüències en que es van trobar els quatre fenotips esperats de la combinació de dos caràcters. Es ressalten en violeta les quatre línies de els que se seguirien els estudis de segregació en T2.

RESULTATS

En aquest estudi de descendències es van sembrar 2502 llavors T1 i 2164 plantes van ser avaluades per l'expressió dels gens *gfp* i *bar*.

Les 30 línies de les que es van estudiar les descendències, tot i presentar la gran heterogeneïtat en quant a número de còpies integrades de cada gen, es van poder agrupar en funció dels patrons de segregació de caràcters en la generació T1.

Cas 1. Les línies G9-21 i G9-23 (Figura 33), i les línies G9-34 i G9-41 (no mostrades) tenien la característica comuna d'haver integrat una única còpia de cadascun dels gens marcadors segons l'avaluació molecular per Southern realitzada a la planta T0.

Suposant el cas més senzill, en què a part d'haver-se integrat una sola còpia de cada T-DNA, s'haguessin inserat els dos T-DNA en *locus* que es transmetessin independentment, les freqüències fenotípiques que esperariem en la descendència serien les que es mostren a la Taula XII:

	GB	Gb	gB	gb	FENOTIP	Freq.
GB	GG BB	GG Bb	Gg BB	Gg Bb	GFP + BAR +	(9/16)
Gb	GG bB	GG bb	Gg bB	Gg bb	GFP + BAR -	(3/16)
gB	gG BB	gG Bb	gg BB	gg Bb	GFP - BAR +	(3/16)
gb	gG bB	gG bb	gg bB	gg bb	GFP - BAR -	(1/16)

Taula XII. Taula de genotips esperats de l'encreuament de GgBb amb ella mateixa suposant independència entre dels dos caràcters (G i B). Essent G la presència d'una còpia funcional del gen *gfp*, i g l'absència, B una còpia funcional del gen *bar* i b el seu defecte. Els quatre fenotips possibles d'aquestes combinacions s'esperen en les proporcions que es mostren a la dreta de la taula.

Si en canvi els dos T-DNA es trobessin integrats en *loci* tan propers que es transmetessin a la descendència conjuntament, només es donarien dos fenotips possibles, o plantes *gfp+bar+* amb una freqüència esperada de 3/4, o bé plantes *gfp-bar-* que apareixerien amb freqüències d'1/4 (Taula XIII).

	GB	Gb	FENOTIP	Freq.
GB	GB GB	GB gb	GFP + BAR +	(3/4)
gb	gb GB	gb gb	GFP - BAR -	(1/4)

Taula XIII. Taula de genotips esperats de l'encreuament de GgBb amb ella mateixa suposant que els dos transgens s'haguessin integrat en el mateix locus. Essent G la presència d'una còpia funcional del gen *gfp*, i g l'absència, B una còpia funcional del gen *bar* i b el seu defecte, els dos únics fenotips possibles d'aquestes combinacions s'esperen en les proporcions que es mostren a la dreta de la taula.

Tal com es mostra a la Taula XIV, les freqüències fenotípiques observades en aquestes poblacions semblaven indicar que dues línies havien integrat en loci molt propers els dos T-DNA (G9-34 i G9-41), dues en canvi havien integrat en loci prou allunyats els T-DNA de manera que s'heretaren independentment (G9-21 i G9-23). L'acceptació pel test de la χ^2 en cadascun d'aquests casos no permeteren rebutjar les hipòtesis formulades.

	GFP + BAR +	GFP + BAR -	GFP- BAR +	GFP- BAR -	Model Fenotípic	χ^2	límit acceptació
G9 - 21	35	9	10	4	9:3:3:1	0,6	7,81
G9 - 23	32	12	13	3	9:3:3:1	0,56	7,81
G9 - 34	48	0	0	12	3:1	0,8	3,84
G9 - 41	45	0	0	10	3:1	1,36	3,84

Taula XIV. Resum de les distribucions obtingudes pels possibles fenotips en la generació T1 de les quatre línies en què s'havia detectat per "Southern blot" que tenien integrada una sola còpia de cada T-DNA. El test de la χ^2 accepta amb una probabilitat $p=0,95$ les hipòtesis en cada cas. Les freqüències fenotípiques esperades en la descendència T1 en cas de lligament són 3:1 i en cas d'integració en loci separats 9:3: 3:1.

Avaluant la descendència de plantes co-transformades que havien integrat una còpia de cada T-DNA i sense estar lligades (línies G9-21 i G9-23), per segregació de caràcters es van obtenir plantes portadores del gen *bar* sense el gen de selecció (*hpt*). Les línies G9-21 i G9-23 van seguir aquestes característiques essent els requeriments per ser línies d'interès per camp. Tot i que altres línies com les G9-28 i G9-27 també eren *bar+hpt-*, al tenir més d'una còpia del gen *bar*, es van descartar davant d'altres línies de còpia única. A la Figura 33 es mostra l'avaluació per "Southern blot" d'un grup de plantes G9 T0 junt amb algunes descendents T1, algunes amb segregació de caràcters i d'altres que no.

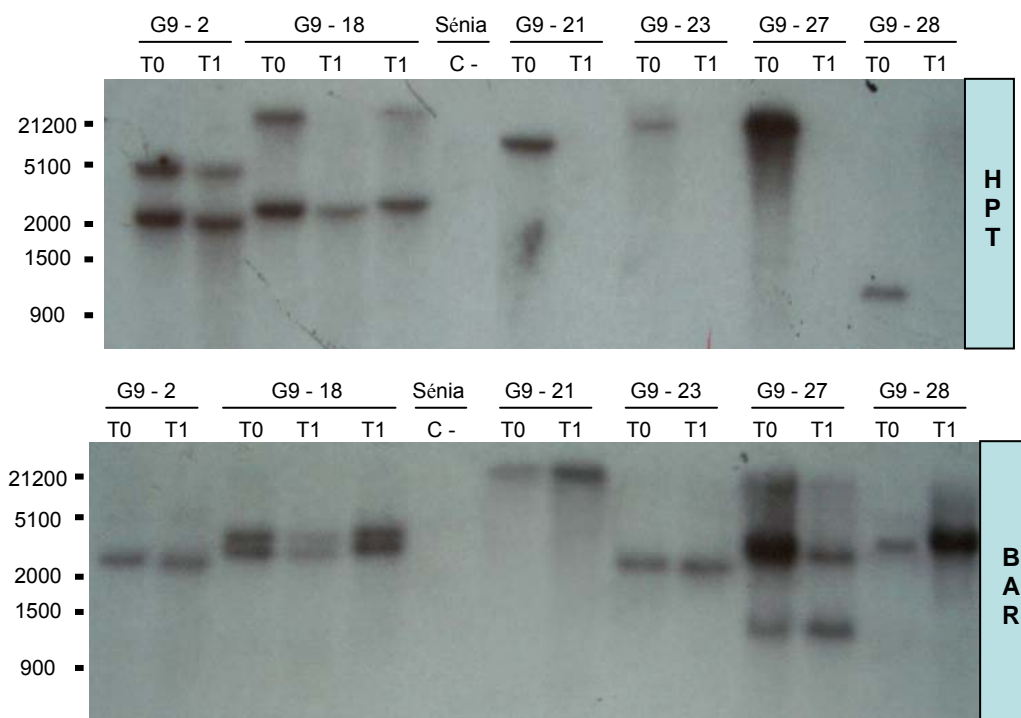


Figura 33. Anàlisi “Southern blot” d’algunes plantes obtingudes a l’assaig G9. El DNA genòmic de plantes G9-T0 i G9-T1 es va digerir amb l’enzim de restricció KpnI i es va hibridar per separat amb les tres sondes, per Higromicina (part superior), per bar (part inferior), i per gfp (imatge no mostrada). Cal observar que en les línies G9-21, G9-23, G9-27 i G9-28 en T0 apareixen còpies úniques del gen de selecció *hpt* mentre que en T1 no hi són ja que es va donar segregació de caràcters. En canvi en les línies G9-2 i G9-18 no va haver segregació de caràcters en T1 i continuaven tenint les còpies corresponents al gen de selecció.

Cas 2. Respecte a les línies G9-16, G9-18, G9-29, G9-33, G9-37, G9-40, G9-42 i G9-45, tot i que el “Southern blot” va revelar que podia haver més d’una còpia d’alguns dels transgens, el patró de comportament de la generació T1 va ser comú per totes. Només es van donar dos fenotips, *gfp+bar+* o *gfp-bar-*. La hipòtesi que es va formular per aquest cas era la possible integració dels dos T-DNA en zones tan properes del genoma vegetal que es comporten com un sol *locus*. A la Taula XV es poden veure les freqüències fenotípiques de la generació T1 d’aquestes línies. Treballant amb un 95%, el test de la χ^2 en les freqüències observades no es podia rebutjar la hipòtesi de lligament entre els dos T-DNA. La possible integració de més d’una còpia de cada T-DNA podia fer pensar que estarien en tàndem amb la primera, de manera que la freqüència fenotípica en la descendència no es veuria modificada.

	GFP + BAR +	GFP + BAR -	GFP- BAR +	GFP- BAR -	Model Fenotípic	χ^2	límit acceptació
G9 – 16	46	0	0	14	3:1	0,009	3,84
G9 – 18	114	0	0	36	3:1	0,08	3,84
G9 – 29	46	0	0	6	3:1	5,03*	6,63*
G9 – 33	37	0	0	19	3:1	2,38	3,84
G9 – 37	55	0	0	15	3:1	0,47	3,84
G9 – 40	38	0	0	19	3:1	2,11	3,84
G9 – 42	35	0	0	16	3:1	1,1	3,84
G9 – 45	46	0	0	10	3:1	1,52	3,84

Taula XV. Anàlisi de les dades presentades a la Taula 27 en què es mostren vuit línies i les freqüències en què van aparèixer representats dos del quatre fenotips possibles. Aquesta distribució feia pensar en l'existència de lligament dels dos T-DNA en el genoma vegetal. El test de la χ^2 accepta en tots els casos aquesta hipòtesi amb una $p=0,05$, excepte per la línia G9-29* en la qual $p=0,01$.

Cas 3. A la Taula XVI es mostra l'anàlisi de la distribució trobada per la descendència T1 de les línies G9-4, G9-17, G9-22, G9-24, G9-25, G9-30, G9-44, G9-46 i G9-47 en què cap planta va ser resistent a l'aplicació de l'herbicida. Aquests eren els resultats esperats per totes aquestes línies ja que les plantes T0 no havien integrat el gen *bar*, amb l'excepció de la línia G9-17. Així, en el cas de la línia G9-17 l'anàlisi per "Southern blot" revelà la integració del gen *bar* en la planta T0 (1-2 còpies integrades en T0), però probablement es tractés de còpies no funcionals ja que la prova de l'aplicació puntual de l'herbicida va ser negativa.

Aleshores, considerant un sol gen funcional en cadascuna d'aquestes línies, es va mirar la freqüència de plantes fluorescents (*gfp+*), i es va comparar si s'ajustava el valor esperat suposant la hipòtesi de que les múltiples possibles còpies del transgen es trobessin inserides en tàndem formant part del mateix grup de lligament. Totes les línies es van comportar d'acord amb la hipòtesi formulada comportant-se d'acord amb els patrons esperats per un sol gen amb una sola còpia. Només el comportament fenotípic de la descendència de G9-25, s'ajustà més a la possible integració de dues còpies.

	GFP + BAR +	GFP + BAR -	GFP- BAR +	GFP- BAR -	Model Fenotípic	χ^2	límit acceptació
G9 - 4	0	34	0	21	3:1	5,09*	6,63*
G9 - 17	0	43	0	14	3:1	0,06	3,84
G9 - 22	0	52	0	12	3:1	1,33	3,84
G9 - 24	0	38	0	20	3:1	2,78	3,84
G9 - 25	0	33	0	4	15:1	1,31	3,84
G9 - 30	0	46	0	15	3:1	0,005	3,84
G9 - 44	0	38	0	20	3:1	2,78	3,84
G9 - 46	0	33	0	12	3:1	0,007	3,84
G9 - 47	0	42	0	15	3:1	0,005	3,84

Taula XVI. Anàlisi de les dades mostrades a la Taula XI en què es mostren les línies de les que s'espera que cap planta sigui resistent a l'herbicida (excepte la línia G9-17), ja que les corresponents plantes T0 no havien integrat el gen *bar*. * Tot i que el valor de la χ^2 quedava fora del límit d'acceptació de la hipòtesi amb $p=0,95$, amb $p=0,99$ sí ho era.

Cas 4. Les línies G9-2 i G9-6 van ser confirmades per Southern de ser portadores dels dos T-DNA. A més van ser plantes que regeneraren per doble selecció, presència d'antibiòtic al medi (Higromicina) i seguiment de fluorescència. En canvi, tal com es mostra la Taula XVII, cap planta T1 que provingués d'aquestes línies expressava el gen *gfp*. Es va avaluar per Southern una de les plantes G9-2 T1gfp-bar+ i es va veure com mantenien integrades ambdues còpies, presents en la planta T0, al hibridar la membrana amb la sonda *gfp* (Figura 33). Molt probablement es tractés de dos casos de silenciament.

Tal com es mostra a la Taula XVII les freqüències en què van aparèixer plantes bar+ i bar- semblaven indicar que en la línia G9-2 hi havia una sola còpia del gen *bar* integrada mentre que en la línia G9-6 se'n podien haver integrat dues.

	GFP + BAR +	GFP + BAR -	GFP- BAR +	GFP- BAR -	Model Fenotípic	χ^2	Límit acceptació
G9 - 2	0	0	36	7	3:1 15:1	1,74 7,38	3,84 3,84
G9 - 6	0	0	58	1	3:1 15:1	17,19 2,089	3,84 3,84

Taula XVII. Detall de la Taula XI en què es mostren les freqüències fenotípiques de la descendència T1 en les que no es va localitzar cap planta que expressés el gen *gfp*.

Cas 5. La resta de casos presentaren patrons d'heretabilitat força més complexes. Es van agrupar les plantes G9-13 i G9-28 (Taula XVIII) pel fet que en la generació T1 es van donar tres fenotips diferents. Fins ara n'esperàvem dos o quatre, en funció del lligament o no dels dos caràcters. En aquests casos van haver plantes T1 amb el fenotip *gfp-bar+*. Segons els resultats dels Southern, les tres línies havien integrat més d'una còpia del gen *bar*. Es podria interpretar que les línies G9-13 i G9-28 havien integrat una còpia de cada T-DNA en regions molt properes del genoma de manera que, la segregació s'ajustava al model de lligament i, a més, es va introduir una segona còpia del T-DNA portador del gen *bar*, però insertada independent del grup de lligament. Suposant aquesta hipòtesi, esperaríem les freqüències fenotípiques que es mostren a la Taula XVIII.

	(GB) B	(GB) b	(gb) B	(gb) b	FENOTIP	Freq.
(GB) B	(GB) B (GB) B	(GB) B (GB) b	(GB) B (gb) B	(GB) B (gb) b	GFP + BAR +	(12/16)
(GB) b	(GB) b (GB) B	(GB) b (GB) b	(GB) b (gb) B	(GB) b (gb) b	GFP + BAR -	0
(gb) B	(gb) B (GB) B	(gb) B (GB) b	(gb) B (gb) B	(gb) B (gb) b	GFP - BAR +	(3/16)
(gb) b	(gb) b (GB) B	(gb) b (GB) b	(gb) b (gb) B	(gb) b (gb) b	GFP - BAR -	(1/16)

Taula XVIII. Genotips resultants de la combinació de parents portadors de dos gens lligats (GB) i una còpia extra d'un dels dos (B en aquest cas). Les lletres majúscules (G, B) indiquen la presència del gen mentre que les minúscules (g, b) representen l'absència del mateix. A la dreta de la taula s'indiquen les freqüències esperades de cada fenotip.

Les dades que es presenten a la Taula XIX, descendències de les línies G9-13 i G9-28 es van ajustar als models de distribució fenotípica esperats amb la suposició de tenir les T0 el genotip (GB)B (gb)b. Tot i que els valors de la χ^2 accepten les hipòtesis, altres suposicions podrien ser igualment vàlides. Tanmateix, es van obtenir plantes amb el gen *bar* i sense els gens de selecció, un dels objectius d'aquest apartat.

	GFP + BAR +	GFP + BAR -	GFP- BAR +	GFP- BAR -	Model Fenotipic	χ^2	límit acceptació
G9 - 13	49	0	5	5	12:3:1	4,3	5,99
G9 - 28	44	0	9	5	12:3:1	0,85	5,99

Taula XIX. Detall de la Taula XI en què es mostren els casos G9-13 i G9-28. Cap de les dues línies va tenir cap representant del fenotip *gfp+bar-*. En canvi van haver *gfp-bar+*, plantes amb el gen d'interès i que per segregació de caràcters van eliminar els gens de selecció.

RESULTATS

* Les freqüències fenotípiques que es van obtenir de la línia G9-9 (Taula XX) indicaven que es tractava del mateix patró d'integració però enlloc d'haver-se integrat una segona còpia del T-DNA portador del gen *bar*, va ser del T-DNA amb els gens *gfp* i *hpt*. Per tant s'havien integrat en el mateix *loci* una còpia de cada T-DNA i independentment hi havia una còpia del gen *gfp*.

	GFP + BAR +	GFP + BAR -	GFP- BAR +	GFP- BAR -	Model Fenotípic	χ^2	límit acceptació
G9 - 9	117	23	0	13	12:3:1	2,41	5,99

Taula XX. Detall de la Taula XI en què s'agrupen els resultats de l'estudi de les descendències de la línia G9-9. Els valors de la χ^2 confirma que les dades es van ajustar al model teòric proposat ((GB)G).

* Les línies que no s'ajustaven a cap dels models teòrics proposats es poden veure agrupades a la Taula XXI.

	GFP + BAR +	GFP + BAR -	GFP- BAR +	GFP- BAR -
G9 - 19	133	5	0	54
G9 - 43	30	2	0	12
G9 - 31	106	7	1	0
G9 - 27	4	0	117	44

Taula XXI. Detall de la Taula XI en què es mostren les dades obtingudes de l'avaluació de la generació T1 de quatre línies que no s'ajustaren a cap dels models anteriors proposats.

Les plantes G9-19 i G9-43, s'ajustaven als patrons 3:1 esperats en cas de lligament dels dos T-DNA en els genomes de les plantes T0, però les dues van presentar alguna planta T1 amb un tercer fenotip, *gfp+bar-*. Si es consideressin mutacions puntuals que afectessin un dels gens, per probabilitat estadística podríem estimar quin dels dos caràcters s'inactivaria per ajustar millor al model 3:1 (Figura 34).

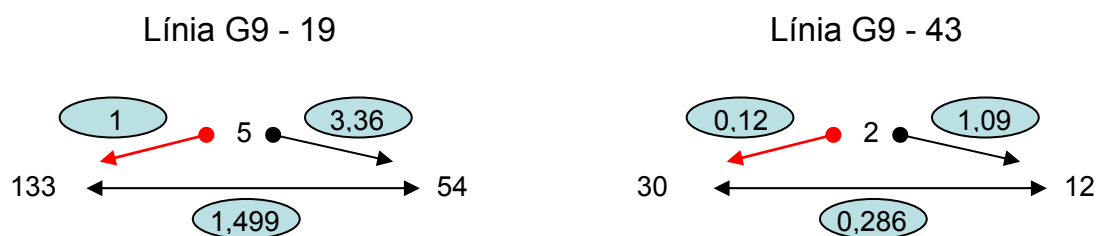


Figura 34. Esquemes en els que es mostren els valors de l'estadístic χ^2 (cercles blau) considerant cadascun dels tres casos possibles en l'adjudicació dels casos fora de fenotip esperat, que se situen per dalt dels valors que sí entren. Considerant que el límit d'acceptació de la χ^2 per 1 grau de llibertat amb un 95%, és 3,84, tots entren, però se senyalen en vermell les adjudicacions que més s'ajusten al model 3:1 de lligament dels dos gens, *gfp* i *bar*.

Acceptant que es tractés de plantes que haguessin integrat lligats els dos T-DNA, per estadística, les plantes fora dels fenotips esperats (*gfp+bar-*), tant podrien haver silenciats el gen *bar* (essent en realitat serien plantes *gfp+bar+*), com podien ser *gfp-* (*gfp-bar-*). Tanmateix semblava més probable (Figura 34) que es tractés de plantes *gfp+bar+* i que per alguna raó van inactivar el gen *bar*.

Si considerem el cas de la línia G9-31, només una llavor, de les 114 avaluades per la *gfp* va ser negativa. Es podria formular una hipòtesi en què hi hauria múltiples còpies integrades del cassette portador del gen *gfp*, de manera que la probabilitat de trobar una planta que per recombinació de caràcters no tingui almenys una còpia del gen seria molt baixa. També es podria tractar d'una mutació puntual que silenciés l'expressió de la proteïna *gfp*. O bé, simplement es podria tractar d'error de manipulació durant l'avaluació. El fet que aquesta planta *gfp-* fos *bar+* reforçaria la idea de la mutació puntual. S'hauria d'haver avaluat per Southern per veure si es tractava d'un silenciament puntual del gen *gfp* o si realment aquest hauria segregat. Tanmateix es tractaria d'un cas complex en què múltiples còpies dels T-DNAs, algunes lligades i altres no explicarien aquestes distribucions fenotípiques. El mateix ocorreria amb la línia G9-27.

Es va avaluar la generació T1 de 30 línies independents T0 de l'assaig G9. Vuit d'aquestes línies no havien integrat el gen *bar*, i els estudis de descendència indicaven que en tots els casos el comportament de la descendència obeïa a la integració d'una única còpia del gen *gfp*.

Tres línies que genèticament havien integrat els dos T-DNA no expressaven per un dels dos caràcters en la generació T1. Cap planta T1 de les línies G9-2 i G9-6 va ser positiva per l'expressió de la proteïna fluorescent i cap planta T1 de la línia G9-17 va ser resistent a l'aplicació de l'herbicida. Tanmateix la línia G9-17 en T0 ja no expressava el gen *bar*.

El comportament fenotípic de deu línies T1 s'ajustava clarament al model de lligament dels dos gens. En vuit d'aquest casos les proves moleculars havien determinat múltiples còpies dels transgens mentre que en dues línies es tractava de còpies úniques. Es podria pensar en una integració del vector binari, portador dels dos T-DNA, si bé potser no complerta, parcial, amb els dos T-DNA en el mateix locus. Per detectar la

possible integració de seqüències plasmídiques fora dels T-DNAs (vector backbone) en el genoma hoste, s'hauria pogut analitzar molecularment, per Southern, hibridant les membranes amb sondes corresponents, tal com descriu Breitler i col·laboradors (2004).

El comportament fenotípic de tres línies indicava la integració lligada dels dos T-DNA per una banda i a més tenien una segona còpia d'un dels T-DNA. En dos casos hi havia una còpia extra del gen *bar* (Taula XIX) i en un cas es tractava del gen *gfp* (Taula XX).

Quatre línies van presentar comportaments fenotípics que no s'ajustaven a cap dels models proposats. Dues d'aquestes línies (G9-19 i G9-43), semblaven pertànyer al grup de plantes en què hi havia lligament dels dos T-DNA i les altres dues línies (G9-31 i G9-27) tindrien un patró d'integració dels dos T-DNA més complex i no es va arribar a determinar. I dues línies, G9-21 i G9-23, van integrar independentment en el genoma una única còpia de cada T-DNA, permetent la segregació de caràcters pretesos en el disseny d'aquesta estratègia. Per tant l'estratègia de co-transformació amb un plàsmid portador de dos T-DNA va permetre l'obtenció de plantes transgèniques d'arròs lliures de gens de selecció per segregació de caràcters a nivell de la generació T1.

A la Figura 35 es representen les dades globals de segregació de les 22 events de transformació que havien incorporat almenys una còpia de cadascun dels dos T-DNA i dels que es va seguir la descendència.

			G9 - 16			
			G9 - 18			
			G9 - 29			
			G9 - 33			
			G9 - 34			
			G9 - 37			
			G9 - 40			G9 - 19
			G9 - 41			G9 - 27
G9 - 21		G9 - 2	G9 - 42		G9 - 13	G9 - 31
G9 - 23	G9 - 17	G9 - 6	G9 - 45	G9 - 9	G9 - 28	G9 - 43
G B	Gg	Bb	(GB)	(GB)G	(GB)B	?

Figura 35. Es representen les dades globals de segregació de les 22 events de co-transformats dels que es va seguir la descendència.

Per tant, de 22 events de co-transformació independents, 6 van segregar caràcters a nivell de descendència amb representació del fenotip d'interès, *gfp*-(*hpt*-) *bar*+. De les sis línies, dues tenien una còpia de cada gen integrades independentment l'una de l'altra. La resta de línies presentaren patrons de segregació complexos.

El producte de la taxa de co-transformació per la freqüència observada de segregació independent de la progènie és un indicador de l'eficiència global de la co-transformació per l'obtenció de plantes transgèniques lliures de gens de selecció. En aquest cas, les dades indiquen que l'eficiència global de l'estratègia va ser del 19% (0.697·0,2727). Resultats que estan en lleugerament per sota que els descrits per altres autors, per exemple, en el treball del grup de Daley (1998), es descriu una eficiència global aproximada del 25%. També l'equip de Komari (1996) van obtenir dades molt similars tant en tabac com en arròs usant un plàsmid superbinari amb 2 T-DNA.

Per tant es va demostrar que és possible l'obtenció de plantes transgèniques d'arròs sense gens de selecció seguint l'estratègia de la co-transformació amb un plàsmid portador de dos T-DNA. Tanmateix la segregació simple de caràcters en la generació T1 ocorre en els casos en què s'integra una sola còpia de cada T-DNA i a distàncies gèniques suficients perquè per segregació de caràcters s'heretin independentment en la descendència.

1.3.2.3 Avaluació de la generació T2 per l'obtenció de línies d'interès "gfp-bar+" i "gfp+bar+"

Obtenir plantes que per segregació de caràcters haguessin perdut el gen de selecció i només portessin el gen d'interès (*bar*) era l'objectiu principal de la tesi. A més aquestes línies eren d'interès juntament amb les *gfp*+*bar*+ per portar a terme els assaigs de camp per l'estudi de flux de gens. Per identificar línies que a més estiguessin en homozigosi pels gens d'interès (gg BB, i GG BB), es van considerar les plantes G9-21 T1 i G9-23 T1, ja que havien integrat una sola còpia de cada gen i a més independentment una de l'altra.

La identificació de línies homozigòtiques es va fer estudiant la segregació de caràcters a la generació T2. Donat que es tractava d'events de transformació que havien

integrat una sola còpia de cada T-DNA la grandària de les poblacions T2 va ser de 24 individus. A la Figura 36 es mostra un esquema del procés.

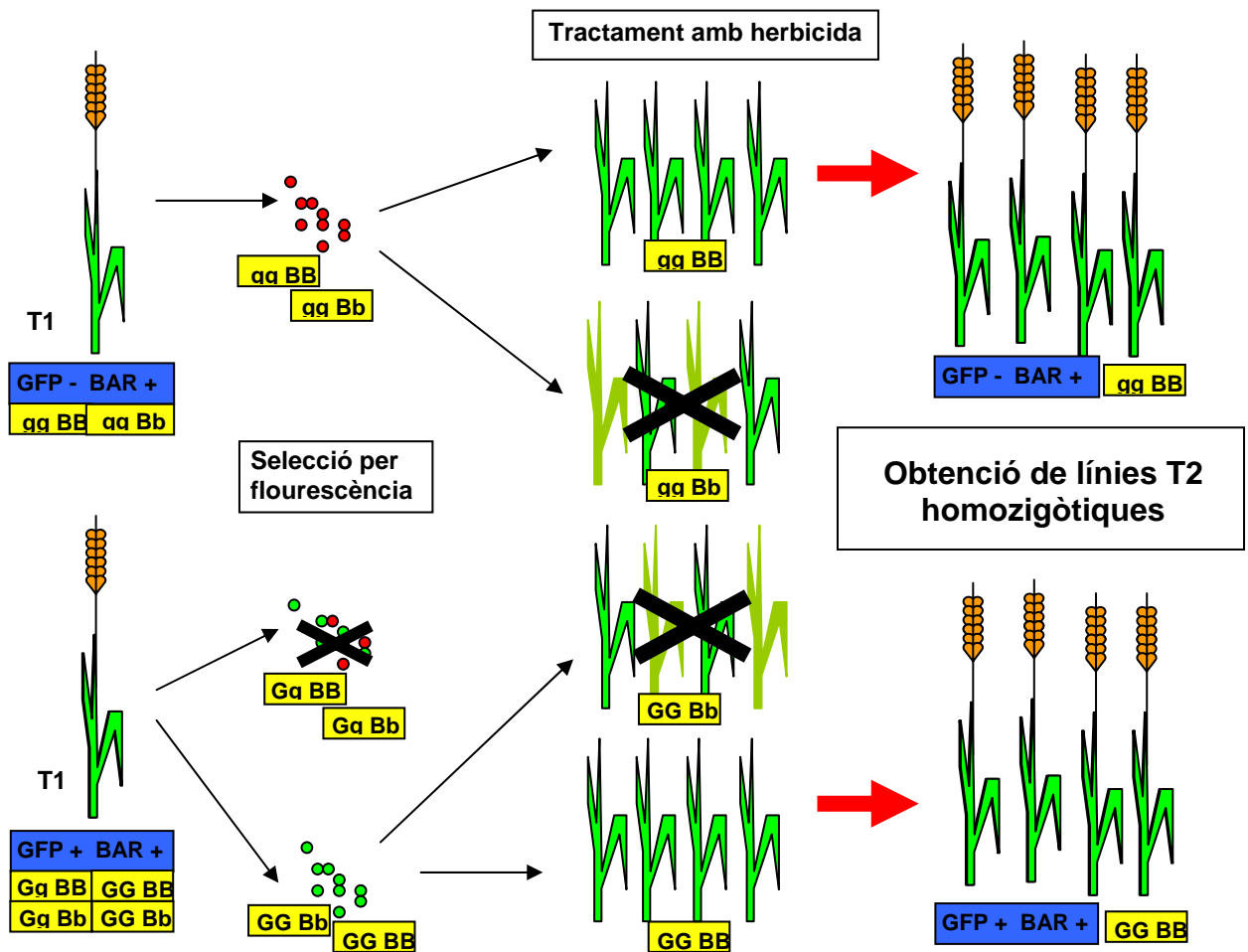


Figura 36. Esquema representatiu del procés d'obtenció de línies ggBB (part superior) i GG BB (part inferior). Per identificar les línies homocigòtiques ggBB, portadores tansols del gen *bar*, se sembraven poblacions de 24 llavors T2 i es comprovava que cap fos *gfp+*, aleshores es cultivaven a l'hivernacle fins que al assolir l'estadi de 3-4 fulles es ruixaven amb l'herbicida. Les poblacions majors de 16 plantes en què totes i cadascuna d'elles resistissin l'herbicida se seleccionaven com a homocigòtiques. Per localitzar les dobles transgèniques GG BB, primer es localitzaven les línies que no segreguessin pel caràcter *gfp*, i aquests eren les que es ruixaven amb herbicida seguint el procediment esmentat en el cas anterior.

Per l'obtenció de línies ggBB es van avaluar les descendències de sis plantes G9-21 i dotze G9-23 T1 que presentaren el fenotip *gfp-bar+*. Se sembraren poblacions de 24 llavors T2 de cada línia T1 en plaques de Petri on es portaven a terme les observacions de l'expressió del gen *gfp* aproximadament 48 hores després de l'inici de la germinació de les plàntules (apartat 4.2 de mètodes).

Tal com era d'esperar i es mostra a les Taula XXII, cap de les 459 plantes T2, procedents de les 18 línies G9-21 i G9-23 T1 fenotípicament *gfp-bar+*, van expressar fluorescència. Seguidament se sembraven les plantes a l'hivernacle on es ruixaven amb la solució aquosa d'herbicida (apartat 4.3 de mètodes). Una setmana després de la polvorització del glufosinat es feia en control de supervivència dels individus de cada població. Es consideraren homozigòtiques pel gen *bar* aquelles poblacions en què tots i cadascun dels individus van resistir l'aplicació de l'herbicida.

PLANTA T1	llavors T2 sem.	llavors GFP +	llavors GFP-	GFP-BAR+	GFP-BAR-	Genotip estimat
G9.21-1	28	0	28	28	0	gg BB
G9.21-2	24	0	24	16	8	gg Bb
G9.21-3	27	0	27	22	5	gg Bb
G9.21-7	25	0	25	14	11	gg Bb
G9.21-9	26	0	26	22	4	gg Bb
G9.21-10	25	0	25	25	0	gg BB
G9.23-1	26	0	26	17	9	gg Bb
G9.23-2	29	0	29	22	7	gg Bb
G9.23-3	23	0	23	14	9	gg Bb
G9.23-5	27	0	27	19	8	gg Bb
G9.23-6	21	0	21	16	5	gg Bb
G9.23-7	26	0	26	22	4	gg Bb
G9.23-8	22	0	22	27	0	gg BB
G9.23-9	26	0	26	19	7	gg Bb
G9.23-10	27	0	27	27	0	gg BB
G9.23-11	25	0	25	21	4	gg Bb
G9.23-12	27	0	27	27	0	gg BB
G9.23-13	25	0	25	14	11	gg Bb

Taula XXII. Resultats de l'avaluació de les descendències de 18 línies G9-21 i G9-23 T1 que presentaren el fenotip *gfp-bar+*. En vermell es ressalten les cinc línies homozigòtiques pel gen *bar* (ggBB) que es van determinar. A la columna de la dreta es mostren els genotips deduïts de l'estudi de descendències.

L'obtenció de cinc línies homozigòtiques pel gen *bar*, objectiu final del treball i línies per altra banda d'interès pels assaigs de flux, validaren l'estratègia de co-transformació amb un plàsmid portador de dos T-DNA per obtenir plantes transgèniques d'arròs sense gens de selecció.

* Per obtenir les línies GG BB es van avaluar les descendències de les plantes G9-21 T1 i G9-23 T1 *gfp+bar+*. Es van observar un total de 1420 plàntules a la lupa de fluorescència per determinar-ne l'expressió del gen *gfp*. De les 53 línies avaluades se'n van aclimatar 15 en què va ser positiva l'expressió del gen *gfp* en tots i cadascun dels individus de la població (Taules XXII i XXIII). Tal i com es descriu a l'apartat 4.3 de mètodes, quan aquestes plantes arribaven a l'estadi de 4 fulles eren testades pel gen *bar* mitjançant la polvorització de l'herbicida. Aproximadament una setmana més tard es feia el control de les poblacions i els resultats van ser l'obtenció de 4 línies homozigòtiques pels gens *gfp* i *bar* (Taules XXII i XXIII).

A la Figura 37 es mostren els resultats de l'avaluació molecular per "Southern blot" d'algunes de les línies que es van obtenir GGBB i ggBB. Es pot observar com les plantes T0 i T1*gfp+(hpt+)bar+* tenen els tres transgens mentre que les línies T1 *gfp-(hpt-)bar+* no presenten cap banda en les membranes híbrides amb la sonda GFP i HIGROMICINA i mantenen la còpia del gen *bar*.

L'anàlisi d'aquestes poblacions va permetre identificar fàcilment les línies homozigòtiques pels dos gens o només pel gen *bar*, degut al patró d'integració dels T-DNA senzill. S'havien integrat una còpia de cada T-DNA en regions del genoma de l'arròs prou separades com per permetre la recombinació independent dels caràcters.

Es van cultivar convencionalment les plantes als hivernacles i s'ha obtingut suficient llavors per portar a terme els assaigs de camp prevists.

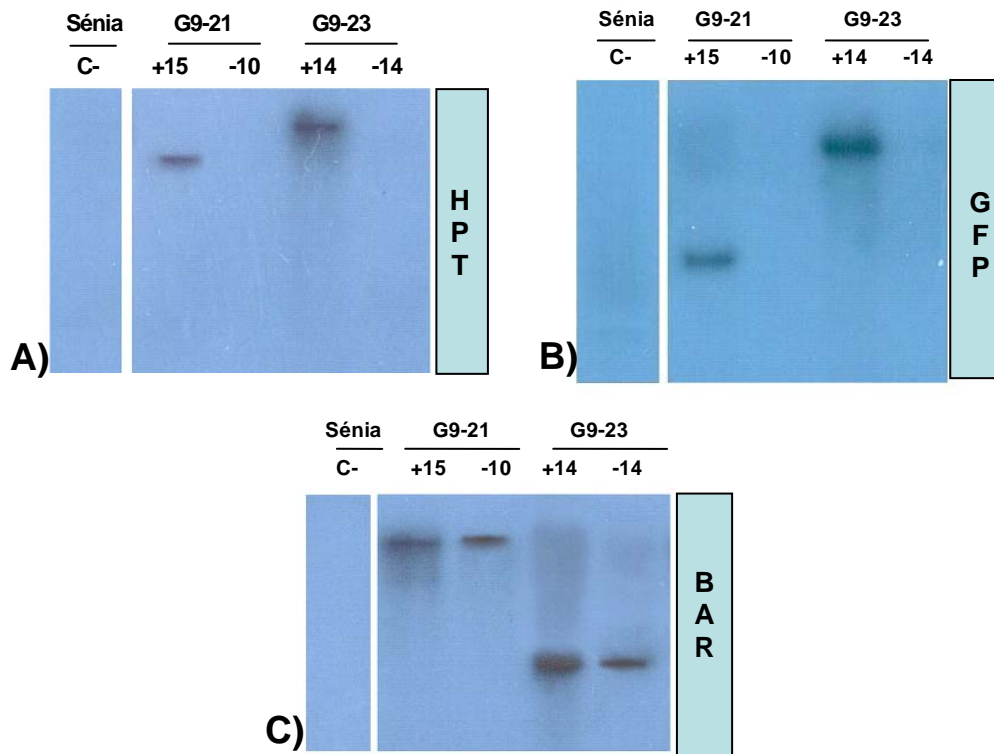


Figura 37. Anàlisi per “Southern Blot” de las línies T2 G9-21(+15) i G9-23(+14), totes dues homozigòtiques pels gens *gfp* i *bar* i de les línies G9-21(-10) i G9-23(-14) homozigòtiques pel gen *bar*. A) determinació del número de còpies integrades del gen *hpt*, B) del gen marcador *gfp*, i C) determinació del número de còpies integrades del gen *bar*. El DNA genòmic es va digerir amb l’enzim de restricció *KpnI*. Les sondes amb les que es van hibridar les membranes s’obtingueren per la *gfp*, per digestió enzimàtica del plàsmid pGEMT-GFP amb *Hind III* i *BamHI*, dianes que flanquegen el gen *gfp*, per la Higromicina, per amplificació per PCR del plàsmid pCAMBIA 1300, i per la sonda *bar* per amplificació d’un fragment intern del gen *bar* a partir del vector comercial pCAMBIA 3300.

RESULTATS

PLANTA T1	llavors T2 sem.	llavors GFP +	llavors GFP-	GFP+ BAR+	GFP+ BAR-
G9.21+2	24	19	5		
G9.21+3	48	48	0	29	8
G9.21+4	44	44	0	44	0
G9.21+5	24	18	6		
G9.21+6	24	24	0	15	7
G9.21+7	24	21	3		
G9.21+8	48	48	0	34	9
G9.21+9	24	21	3		
G9.21+10	24	16	8		
G9.21+11	24	21	3		
G9.21+13	24	20	4		
G9.21+14	24	21	3		
G9.21+15	25	25	0	25	0
G9.21+16	48	48	0	32	13
G9.21+17	24	15	9		
G9.21+18	48	48	0	38	8
G9.21+19	24	18	6		
G9.21+20	24	24	0	21	2
G9.21+22	25	20	5		
G9.21+23	26	19	7		
G9.21+25	24	18	6		
G9.21+26	28	20	8		
G9.21+27	24	21	3		
G9.21+28	24	17	7		
G9.21+29	23	17	6		
G9.21+31	26	19	7		
G9.21+32	24	17	7		

PLANTA T1	llavors T2 sem.	llavors GFP +	llavors GFP-	GFP+ BAR+	GFP+ BAR-
G9.23+1	24	24	0	17	7
G9.23+2	24	24	0	23	1
G9.23+3	25	15	10		
G9.23+4	25	18	7		
G9.23+5	27	19	8		
G9.23+6	26	21	5		
G9.23+8	26	21	5		
G9.23+9	26	20	6		
G9.23+10	20	16	4		
G9.23+11	25	20	5		
G9.23+12	24	20	4		
G9.23+13	24	24	0	24	0
G9.23+14	24	24	0	24	0
G9.23+15	26	20	6		
G9.23+16	26	21	5		
G9.23+17	26	20	6		
G9.23+20	24	16	8		
G9.23+21	23	17	6		
G9.23+22*	24	24	0	13	6
G9.23+23	26	18	8		
G9.23+24	28	21	7		
G9.23+25	25	22	3		
G9.23+26	24	24	0	20	4
G9.23+27	25	25	0	19	6
G9.23+28	26	18	8		
G9.23+29	24	17	7		

Taules XXII (esquerra) i **XXIII** (dreta). Resultats de les avaluacions de la descendència de les línies G9.21 T1 i G9.23 T1 *gfp+bar+* per l'obtenció de línies homocigòtiques pels dos gens (GGBB). Es van avaluar totes les llavors pel caràcter *gfp*, només les poblacions en què tots els components van ser *gfp+* (línies ressaltades en verd) es van testar pel gen *bar*. Es ressalten en vermell les línies en què tots els individus de la població avaluada van ser *bar+* (GGBB).* cinc plantes de la línia G9.23+22 van morir abans de ser ruixades amb l'herbicida.

1.3.2.4 Avaluació de la generació T2 de línies de patrons de comportament complexes

Es van triar dues línies, G9-9 i G9-18, que genèticament es van determinar per haver incorporat els dos T-DNA del plàsmid pX2-HB en *loci* molt propers de manera que es comportaren com un sol gen. A més la línia G9-9 semblava haver integrat una segona còpia del gen *gfp*. Avaluant la descendència d'un grup de línies representatives de cada event, s'obtidrien dades que podrien confirmar les hipòtesis formulades sobre els seus patrons d'integració i per altra banda es provaria d'obtenir les línies d'interès ja que ambdues línies presentaven molt bona expressió dels gens *gfp* i *bar*.

Estudis de segregació de caràcters en la generació T2 de la línia G9-9

Pels resultats de l'avaluació de la generació T1 es va plantejar la hipòtesi que la planta G9-9 T0 havia incorporat una còpia funcional de cada T-DNA en *loci* tan propers que es podien considerar un grup de lligament (GB) i una segona còpia del gen *gfp* en un *locus* genèticament independent del primer. Per tant i per definició de planta transgènica el genotip suposat per la planta G9-9 T0 era (GB)G(gb)g.

Acceptant aquesta hipòtesi les plantes G9-9 T1 haurien de presentar qualsevol dels genotips que es mostren a la Taula XXIV, seguint les freqüències que també es descriuen:

	(GB) G	(GB) g	(gb) G	(gb) g	FENOTIP	Freq.
(GB) G	(GB) G (GB) G	(GB) G (GB) g	(GB) G (gb) G	(GB) G (gb) g	GFP + BAR +	(12/16)
(GB) g	(GB) g (GB) G	(GB) g (GB) g	(GB) g (gb) G	(GB) g (gb) g	GFP + BAR -	(3/16)
(gb) G	(gb) G (GB) G	(gb) G (GB) g	(gb) G (gb) G	(gb) G (gb) g	GFP - BAR +	0
(gb) g	(gb) g (GB) G	(gb) g (GB) g	(gb) g (gb) G	(gb) g (gb) g	GFP - BAR -	(1/16)

Taula XXIV: Possibles genotips obtinguts per recombinació dels caràcters *gfp* i *bar* en la formació de la generació T1

En aquest sentit es va avaluar la descendència T2 de 31 plantes G9-9 T1 que van seguir aquest patró; 24, *gfp+bar+*; 4, *gfp+bar-*; i 3, *gfp-bar-*. Aquesta distribució fenotípica observada s'ajustava amb l'esperada de 12:3:1 (χ^2 (0.05)=1,172, màxim acceptat 5,99)

Les plantes G9-9 T1, que fenotípicament es caracteritzessin per ser *gfp+bar+*, presentarien qualsevol dels genotips ressaltats en vermell a la Taula XXIV. Estudiant la

RESULTATS

descendència d'aquestes plantes esperariem 4 comportaments fenotípics en funció del genotip T1, tal com es detalla a continuació:

1. De totes les combinacions de plantes T1 amb un genotip en què el grup de lligament es trobés en homozigosi s'esperaria una descendència T2 amb un sol fenotip, *gfp+bar+*, tal com es mostra a la Taula XXV.

	(GB)	(GB)	FENOTIP	Freq.
(GB)	(GB) (GB)	(GB) (GB)	GFP + BAR +	(1/1)
(GB)	(GB) (GB)	(GB) (GB)		

Taula XXV. Genotips que s'obtenen de l'encreuament de dues plantes portadores del grup de lligament (GB) en homozigosi.

La freqüència esperada de trobar plantes T2 procedents de plantes T1 fenotípicament *gfp+bar+* amb aquest patró de comportament seria 1/3. Quatre dels dotze genotips que resultarien en el fenotip *gfp+bar+* tindrien en homozigosi el grup de lligament (GB)(GB), Taula XXIV. I així es van comportar 8 de les 24 línies G9-9 T1 *gfp+bar+*. Va haver una novena línia (G9-32) en què 1 planta, de 64, tot i ser *gfp+* era *bar-*, aquest cas podria tractar-se d'una mutació puntual que silenciés o inactivés el gen *bar*. A la Taula XXIX es mostren les distribucions obtingudes.

Les línies amb aquest patró de segregació, és a dir que tenien els dos T-DNA lligats i per recombinació, en la formació de la descendència, en homozigosi, sempre seguirien essent *gfp+bar+*. En aquest sentit, es tractaria de línies d'interès pels assaigs de camp.

La resta de genotips responsables del fenotip *gfp+bar+* tindrien en hemizigosi el grup de lligament, essent (GB) (*gb*). Per determinar si la segona còpia del gen *gfp* es trobava en homozigosi, hemizigosi, o hagués segregat, caldria estudiar cadascuna de les tres combinacions gèniques que es detallen a continuació.

2. Considerant la còpia del gen *gfp* en homozigosi en el genotip T1. A la Taula XXVI es mostra els genotips i les freqüències fenotípiques esperades en la descendència de plantes la combinació de caràcters en el genotip (GB)G (*gb*)G.

	(GB) G	(gb) G	FENOTIP	Freq.
(GB) G	(GB)G	(GB)G	GFP + BAR +	(3/4)
(gb) G	(gb)G	(gb)G	GFP + BAR -	(1/4)

Taula XXVI. Genotips i les freqüències fenotípiques esperades en la descendència de plantes (GB)G (gb)G.

En aquest sentit esperariem que es comportessin amb aquests patrons 1/6 de les plantes T1 fenotípicament *gfp+bar+*. D'acord amb el model teòric proposat, 5 patrons de distribució fenotípica van coincidir amb l'esperat (Taula XXIX).

3. Considerant la còpia del gen *gfp* en hemizigosi en el genotip T1, ens trobaríem amb el mateix genotip hipotètic de la planta G9-9 T0, (GB)G (gb)g. Les freqüències fenotípiques esperades en la generació T2 serien les mateixes que suposades per la T1, 12/16 de plantes *gfp+bar+*, 3/16 de plantes *gfp+bar-* i 1/16 de plantes *gfp-bar-*, tal com es mostra a la Taula XXIV.

La freqüència esperada de trobar aquests patrons de comportament en un terç de les línies T1 *gfp+bar+* avaluades. I tal com es mostra a la Taula XXX, van ser 8 de 24.

4. Considerant que la segona còpia del gen *gfp* present en T0, per segregació de caràcters s'hagués perdut. Una sisena part dels casos G9-9 T1 amb fenotip *gfp+bar+* presentarien el genotip (GB)g (gb)g.

El comportament fenotípic de la descendència T2 en aquest cas seguiria el patró descrit a la Taula XXVII.

	(GB) g	(gb) g	FENOTIP	Freq.
(GB) g	(GB)g	(GB)g	GFP + BAR +	(3/4)
(gb) g	(gb)g	(gb)g	GFP - BAR -	(1/4)

Taula XXVII. Genotips i les freqüències fenotípiques esperades en la descendència de plantes (GB)g (gb)g.

Les freqüències fenotípiques observades en la descendència T2 de dues de les 24 línies procedents de plantes T1 *gfp+bar+* es van ajustar a les distribucions esperades.

RESULTATS

Per altra banda, les plantes G9-9 T1 que fenotípicament es caracteritzessin per ser *gfp+bar-*, presentarien qualsevol dels genotips ressaltats en verd a la Taula XXIV. Es tractaria de plantes que haurien perdut per segregació de caràcters el grup de lligament (GB), essent totes elles (gb) (gb).

La generació T2 d'aquestes plantes podria presentar dues distribucions fenotípiques en funció de la homozigosi o hemizigosi de la còpia del gen *gfp* no lligada al grup de lligament. Els patrons de comportament fenotípic resultants en cada cas es mostren a la Taula XXVIII.

	(gb) G	(gb) G	FENOTIP	Freq.
(gb)G	(gb)G (gb)G	(gb)G (gb)G	GFP + BAR -	(1/1)
(gb) G	(gb)G (gb)G	(gb)G (gb)G		
	(gb) G	(gb) g	FENOTIP	Freq.
(gb)G	(gb)G (gb)G	(gb)G (gb)g	GFP + BAR -	(3/4)
(gb) g	(gb)g (gb)G	(gb)g (gb)g	GFP - BAR -	(1/4)

Taula XXVIII. Genotips i les freqüències fenotípiques esperades en la descendència de plantes (gb)G (gb)G a la part superior i de plantes (gb)G (gb)g a la part inferior.

Les quatre línies T1 *gfp+bar-* es van ajustar a les freqüències esperades pel genotip (gb)G (gb) g, és a dir que no tenien en homozigosi la segona còpia del gen *gfp*.

Finalment, les plantes T1 fenotípicament *gfp-bar-*, ressaltades en groc a la Taula XXIV serien les plantes que per segregació de caràcters haurien perdut tant el grup de lligament GB com la segona còpia del gen *gfp*. Per tant s'esperaria que tots els individus de la les línies *gfp-bar-* presentessin el mateix fenotip.

A la Taula XXIX es mostren els resultats de les avaluacions de les descendències de les 31 línies G9-9 T2. Es van ressaltar de color verd les línies de les que es va determinar que no segregaven pel gen *gfp* al avaluar les plàntules T2. En vermell es mostren les 8 línies G9-9 T1 que no van segregar per cap dels dos gens (*gfp* i *bar*), esdevenint genotípicament (GB)(GB), per tant homozigòtiques pels dos caràcters (d'interès per les línies dels assaigs de flux.)

Planta T1	llavors T2 sem.	llavors T2 germ.	llavors GFP +	llavors GFP -	GFP+ BAR+	GFP+ BAR-	GFP- BAR+	GFP- BAR-
G9 9+1	64	60	50	10	0	50	0	10
G9 9+2	62	55	55	0	55	0	0	0
G9 9+3	62	44	42	2	40	2	0	2
G9 9+4	63	56	56	0	50	6	0	0
G9 9+5	64	46	33	13	0	33	0	13
G9 9+6	65	57	40	17	0	40	0	17
G9 9+7	70	62	62	0	43	19	0	0
G9 9+9	63	58	58	0	46	12	0	0
G9 9+10	65	51	49	2	39	10	0	2
G9 9+11	65	62	62	0	62	0	0	0
G9 9+12	66	62	49	13	0	49	0	13
G9 9+13	61	58	58	0	58	0	0	0
G9 9+14	64	50	50	0	50	0	0	0
G9 9+15	64	62	62	0	62	0	0	0
G9 9+16	65	51	51	0	46	5	0	0
G9 9+17	62	49	49	0	49	0	0	0
G9 9+18	64	47	46	1	35	11	0	1
G9 9+19	64	57	41	16	41	0	0	16
G9 9+20	64	59	59	0	59	0	0	0
G9 9+21	64	63	47	16	47	0	0	16
G9 9+22	61	61	57	4	47	10	0	4
G9 9+23	64	62	59	3	49	10	0	3
G9 9+24	64	56	56	0	56	0	0	0
G9 9+25	63	55	53	2	47	6	0	2
G9 9+29	63	60	60	0	56	4	0	0
G9 9+30	64	62	61	1	47	14	0	1
G9 9+31	66	55	52	3	40	12	0	3
G9 9+32	65	65	65	0	64	1	0	0
G9 9-1	75	61	0	61	0	0	0	61
G9 9-2	75	72	0	72	0	0	0	72
G9 9-3	26	15	0	15	0	0	0	15

Taula XXIX. Estudi de descendències de la línia G9-9. Es van avaluar 28 línies T1 *gfp+bar+*, el codi de cada planta fa referència al nom de l'assaig (G9), el següent número indica el succés T0, en aquest cas tot eren plantes T1 procedents de la línia 9 T0, per tant G9 9 (per no prestar a confusió donant valor negatiu al guionet fins ara usat en la nomenclatura de les línies (G9-9), s'ha obviat) i el tercer número indica el nom de planta T1, el signe positiu o negatiu entre la segona i tercera xifra dona indica si la planta T1 era *gfp+* o *gfp-*. En verd es van senyalar les línies que van presentar un 100% de plantes *gfp+*, i en vermell es va senyalar les línies que a més van ser 100% resistents a l'herbicida.

Tot i que es van obtenir línies homozigòtiques pels dos transgens, en el cas de la línia G9-9, al trobar-se lligada la única còpia del gen *bar* a una de les dues còpies del gen *gfp*, no seria possible l'obtenció de línies que per segregació fossin *gfp-bar+*.

RESULTATS

En total es van determinar fenotípicament 1733 plantes, i podent ser acceptat cada grup genotípic d'acord amb les freqüències esperades, es van deduir els possibles genotips per cada línia T1 avaluada. A la Taula XXX es poden observar el resultats dels càlculs estadístics amb que es van tractar les dades i que van permetre identificar el possible genotip de la plana T1.

	GFP + BAR +	GFP + BAR -	GFP- BAR +	GFP- BAR -	Model Fenotípic	χ^2	límit acceptació	Genotip Estimat
G9 9+2	55	0	0	0	1	/	/	(GB) - (GB) -
G9 9+11	62	0	0	0	1	/	/	(GB) - (GB) -
G9 9+13	58	0	0	0	1	/	/	(GB) - (GB) -
G9 9+14	50	0	0	0	1	/	/	(GB) - (GB) -
G9 9+15	62	0	0	0	1	/	/	(GB) - (GB) -
G9 9+17	49	0	0	0	1	/	/	(GB) - (GB) -
G9 9+20	59	0	0	0	1	/	/	(GB) - (GB) -
G9 9+24	56	0	0	0	1	/	/	(GB) - (GB) -
G9 9+32	64	1	0	0	1	/	/	(GB) - (GB) -
G9 9+4	50	6	0	0	3:1	6,09*	6,63*	(GB)G (gb)G
G9 9+7	43	19	0	0	3:1	1,05	3,84	(GB)G (gb)G
G9 9+9	46	12	0	0	3:1	0,57	3,84	(GB)G (gb)G
G9 9+16	46	5	0	0	3:1	6,28*	6,63*	(GB)G (gb)G
G9 9+29	56	4	0	0	3:1	10,75**	6,63*	(GB)G (gb)G
G9 9+3	40	2	0	2	12:3:1	6,42*	9,21*	(GB)G (gb)g
G9 9+10	39	10	0	2	12:3:1	0,48	5,99	(GB)G (gb)g
G9 9+18	35	11	0	1	12:3:1	1,82	5,99	(GB)G (gb)g
G9 9+22	47	10	0	4	12:3:1	0,22	5,99	(GB)G (gb)g
G9 9+23	49	10	0	3	12:3:1	0,56	5,99	(GB)G (gb)g
G9 9+25	47	6	0	2	12:3:1	3,2	5,99	(GB)G (gb)g
G9 9+30	47	14	0	1	12:3:1	2,62	5,99	(GB)G (gb)g
G9 9+31	40	12	0	3	12:3:1	0,37	5,99	(GB)G (gb)g
G9 9+19	41	0	0	16	3:1	0,28	3,84	(GB)g (gb)g
G9 9+21	47	0	0	16	3:1	0,05	3,84	(GB)g (gb)g
G9 9+1	0	50	0	10	3:1	2,22	3,84	(gb)G (gb)g
G9 9+5	0	33	0	13	3:1	0,26	3,84	(gb)G (gb)g
G9 9+6	0	40	0	17	3:1	0,71	3,84	(gb)G (gb)g
G9 9+12	0	49	0	13	3:1	0,54	3,84	(gb)G (gb)g
G9 9-1	0	0	0	61	1	/	/	(gb)g (gb)g
G9 9-2	0	0	0	72	1	/	/	(gb)g (gb)g
G9 9-3	0	0	0	15	1	/	/	(gb)g (gb)g

Taula XXX. Resultats de l'avaluació de la generació T2 de la línia G9-9, de la que es va suposar el genotip (GB)G (gb)g. A la columna de l'esquerra es ressalten amb diferents colors els fenotips de les 31 línies T1 de les que es va avaluar la descendència T2. En vermell plantes *gfp+bar+*; en verd, plantes *gfp+bar-*; i en groc, les que no eren ni fluorescents no resistents a l'herbicida. En funció de la distribució fenotípica de cada línia, i passant el test de la χ^2 , es van poder agrupar les línies en els diferents patrons esperats. D'aquesta manera es validava la hipòtesi en què se suposava el genotip de la planta G9-9 T0 (GB)G (gb)g. * valors de la χ^2 per sobre del marge d'acceptació en $p=0,05$, però dins del rang immediatament superior, amb $p=0,025$. ** valor de la χ^2 per sobre de l'acceptat tant en $p=0,025$ com en $p=0,01$.

Estudis de segregació de caràcters en la generació T2 de la línia G9-18

La distribució fenotípica que havien presentat les 150 plantes G9-18 T1 avaluades, es resolia en dos fenotips ($gfp+bar+$ o $gfp-bar-$). La proporció en què es van donar aquests fenotips, s'ajustava amb un valor χ^2 (0,99) de 0,08 obeint a la hipòtesi de lligament dels dos gens (3:1, $gfp+bar+ :gfp-bar-$) (Taula XXXI).

Suposant aquesta hipòtesi certa, la planta G9-18 T0 tindria el genotip (GB)(gb). Les plantes T1 presentarien dos possibles fenotips, $gfp+bar+$ o $gfp-bar-$. Avaluant la generació següent a les plantes G9-18 T1 $gfp+bar+$, esperariem trobar dos possibles patrons de distribució fenotípica:

- Si hi ha segregació de caràcters, en aquest cas del grup de lligament, obtindriem una proporció 3:1 de plantes $gfp+bar+ :gfp-bar-$. Aquest patró fenotípic adjudicaria a la planta T1 el genotip (GB) (gb).
- Si no hi ha segregació del grup de lligament (GB), totes les plantes serien $gfp+bar+$. En aquest cas el genotip més probable de la planta T1 seria (GB)(GB).

L'altre fenotip possible de trobar en T1 seria $gfp-bar-$, plantes que per segregació de caràcters perdessin el grup de lligament portador dels gens *gfp* i *bar*. La descendència d'aquests fenotips no podria en cap cas ser positiva en cap d'aquestes dues determinacions.

Es van cultivar 14 línies G9-18 T1 fenotípicament $gfp+bar+$ i disset línies $gfp-bar-$ per obtenir les llavors T2. Es va determinar el fenotip pels dos caràcters en un total de 1845 plantes T2. Els resultats es mostren a la Taula XXXI.

RESULTATS

Planta T1	GFP + BAR +	GFP + BAR -	GFP- BAR +	GFP- BAR -	Model Fenotípic	χ^2	límit acceptació	Genotip Estimat
G9 18+6	106	0	0	0	1	/	/	(GB) (GB)
G9 18+25	63	0	0	0	1	/	/	(GB) (GB)
G9 18+5	98	1*	0	0	1	/	/	(GB) (GB)
G9 18+1	39	0	0	15	3:1	0,22	3,84	(GB) (gb)
G9 18+2	35	0	0	15	3:1	0,67	3,84	(GB) (gb)
G9 18+4	42	0	0	14	3:1	0	3,84	(GB) (gb)
G9 18+8	30	0	0	13	3:1	0,63	3,84	(GB) (gb)
G9 18+12	43	0	0	15	3:1	0,02	3,84	(GB) (gb)
G9 18+17	36	0	0	24	3:1	7,2**	3,84	(GB) (gb)
G9 18+23	44	0	0	12	3:1	0,38	3,84	(GB) (gb)
G9 18+24	49	0	0	14	3:1	0,26	3,84	(GB) (gb)
G9 18+27	48	0	0	13	3:1	0,44	3,84	(GB) (gb)
G9 18+28	45	0	0	16	3:1	0,05	3,84	(GB) (gb)
G9 18+29	83	1*	0	33	3:1	0,64	3,84	(GB) (gb)
G9 18-2	0	0	0	38	1	/	/	(gb) (gb)
G9 18-4	0	0	0	59	1	/	/	(gb) (gb)
G9 18-8	0	0	0	53	1	/	/	(gb) (gb)
G9.18-13	0	0	0	28	1	/	/	(gb) (gb)
G9 18-14	0	0	0	61	1	/	/	(gb) (gb)
G9 18-16	0	0	0	55	1	/	/	(gb) (gb)
G9 18-18	0	0	0	73	1	/	/	(gb) (gb)
G9.18-19	0	0	0	42	1	/	/	(gb) (gb)
G9.18-20	0	0	0	54	1	/	/	(gb) (gb)
G9 18-21	0	0	0	44	1	/	/	(gb) (gb)
G9 18-22	0	0	0	58	1	/	/	(gb) (gb)
G9 18-23	0	0	0	53	1	/	/	(gb) (gb)
G9 18-24	0	0	0	47	1	/	/	(gb) (gb)
G9 18-25	0	0	0	52	1	/	/	(gb) (gb)
G9 18-26	0	0	0	59	1	/	/	(gb) (gb)
G9 18-27	0	0	0	63	1	/	/	(gb) (gb)
G9 18-28	0	0	0	59	1	/	/	(gb) (gb)

Taula XXXI. Resultats de l'avaluació de la generació T2 de la línia G9-9, de la que es va suposar el genotip (GB) (gb). A la columna de l'esquerra es ressalten amb diferents colors els fenotips de les 31 línies T1 de les que es va avaluar la descendència T2. En vermell plantes *gfp+bar+*; i en groc, les que no eren ni fluorescents no resistents a l'herbicida. En funció de la distribució fenotípica de cada línia, i passant el test de la χ^2 , es van poder agrupar les línies en els diferents patrons esperats. D'aquesta manera es validava la hipòtesi del genotip de la planta G9-18 T0. * es va obviar el cas puntual de la planta *gfp+bar-*; ** valors de la χ^2 per sobre del marge d'acceptació en $p=0,05$.

De les 14 línies G9-18 T1 amb fenotip *gfp+bar+*, 3 van ser homocigòtiques pel grup de lligament, presentant molt probablement un genotip (GB) (GB). Aquestes línies serien d'interès en referència a la doble homocigosi dels gens *gfp* i *bar*, tot i que es trobessin lligats.

Podent triar entre plantes homozigòtiques pels gens *gfp* i *bar* amb còpies úniques integrades independent i línies amb múltiples còpies integrades, amb o sense lligament, les primeres sempre resultarien més segures en el sentit de poder preveure amb més facilitat el comportament d'unes i altres.

Una vegada presentats els resultats dels anàlisis moleculars i fenotípics dels diferents events de transformació obtinguts utilitzant el vector 2T-DNA des de la generació T0 fins la generació T2, s'arribà a les següents conclusions:

Es van obtenir un total de 47 plantes G9 T0, 8 van morir i sis més van ser identificades com a clons. 23 dels restants 33 eren co-transformats, 9 havien incorporat només el T-DNA portador del gen de selecció i un no havia incorporat cap dels dos T-DNA.

A partir de l'estudi del comportament fenotípic de les plantes T1, es va poder determinar el patró d'integració més probable en T0. En dotze línies, els dos T-DNA s'haurien integrat en regions molt properes del genoma hoste, comportant-se com un grup de lligament. En tres línies a més s'hi va incorporar una segona còpia d'un dels dos T-DNA, en tres línies més es va silenciar o inactivar la funcionalitat d'un dels transgens i no es va arribar a determinar en dos casos el patró d'integració de les còpies. Tanmateix, en dues línies es va integrar una còpia única de cada T-DNA i en diferents *loci* del genoma hoste.

Dels 22 events de co-transformació independents, 6 van segregar caràcters a nivell de descendència obtenint-se línies amb el fenotip d'interès, *gfp*-(*hpt*-) *bar*+. De les sis línies, dues tenien una còpia única de cada gen integrades independentment l'una de l'altra. L'avaluació de la generació T2 d'aquestes dues línies segregants i de còpia única (G9-21 i G9-23) va permetre identificar fàcilment les línies homozigòtiques pel gen d'interès (*bar*) sense gens de selecció per antibiòtic (*hpt*), així com pels dos gens, acomplint amb els objectius descrits als objectius d'aquest treball. Aquestes línies es van cultivar convencionalment als hivernacles i s'ha obtingut suficient llavors per portar a terme els assaigs de camp prevists.

L'estudi del comportament fenotípic de la generació T2 de dues plantes T0 amb patrons d'integració aparentment complexes (G9-18 i G9-9) es va ajustar a les prediccions sobre les hipòtesis formulades.

2. ESTRATÈGIES DE CO-TRANSFORMACIÓ PER BIOLÍSTICA

Aquest treball es va plantejar amb l'objectiu de determinar la possible obtenció de plantes d'arròs co-transformades per biolística, utilitzant "cassettes" per a l'expressió de gens concrets enlloc de plàsmids sencers. Així, es van preparar fragments de DNA lineals en els que aquests mateixos cassettes d'expressió (pels gens *gfp* i *hpt*) es trobaven flanquejats per les seqüències dels extrems del T-DNA del plàsmid Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*.

2.1 Obtenció dels DNAs a utilitzar en la transformació per biolística

En primer lloc es van aïllar els cassettes CaMV35S:*gfp*:nos i CaMV35S:*hpt*:nos dels plàsmids pUC19-*gfp* i pILTAB227 respectivament (Figures 14 i 15). Per obtenir el cassette portador del gen *gfp* es va digerir el plàsmid pUC19-*gfp* amb els enzims PstI i EcoRI, i per obtenir el cassette amb la resistència a la higromicina es van utilitzar els enzims SmaI i HindIII (Figura 38).

Per l'obtenció d'aquests cassettes flanquejats pels extrems T-DNA es va dissenyar una estratègia que partia dels plàsmids pCAMBIA 0380 i 0390, amb les corresponents dianes de clonació dels "polilinker", flanquejats pels extrems dret i esquerre del T-DNA. Els cassettes 35S::*hpt*::tnos i 35S::*gfp*::tnos, amb el gen de selecció i marcador respectivament es van clonar en els vectors receptors pCAMBIA 0380 i 0390. El resum d'aquest procés s'esquematitza a la Figura 38.

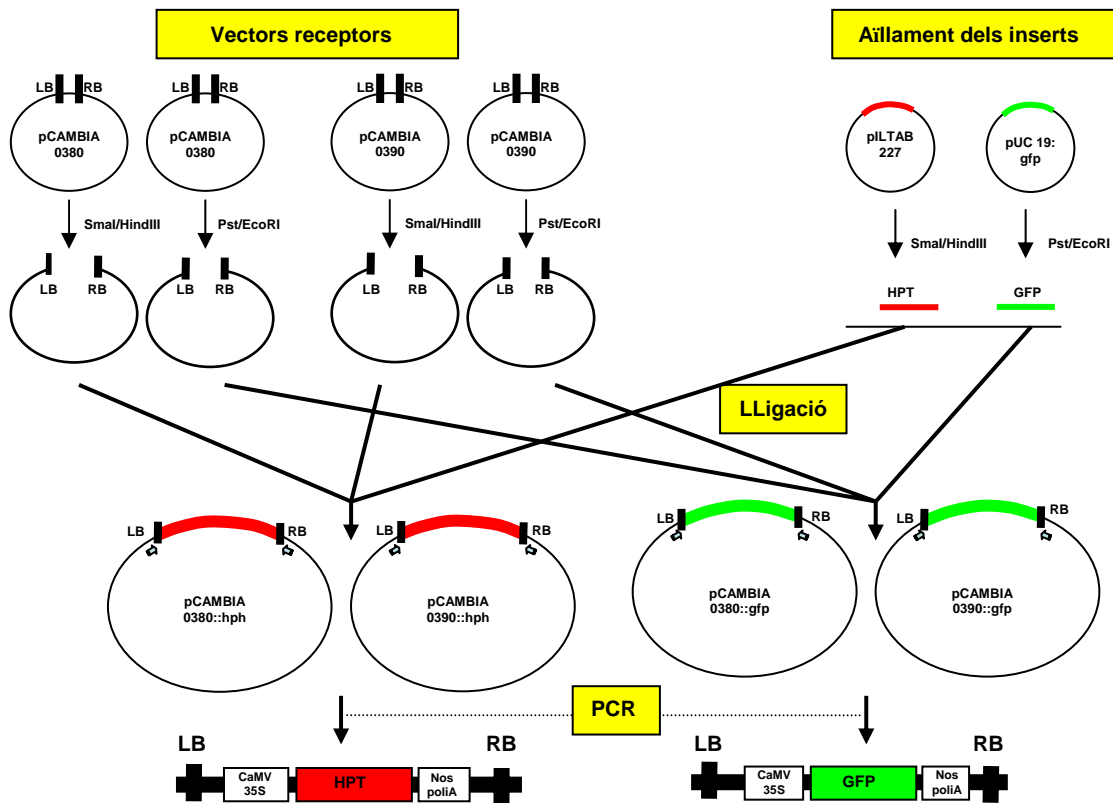


Figura 38. Representació esquemàtica del procés d'obtenció del T-DNA linealitzat utilitzats en la transformació per biolística. Per clonar els inserts dels vectors pILTAB 227 i pUC19:gfp en els vectors pCAMBIA 0380 i pCAMBIA 0390, es van utilitzar combinacions d'enzims de restricció (SmaI i HindIII, PstI i EcoRI). Un cop es va comprovar la correcta inserció dels inserts per seqüenciació, es van dissenyar els encebadors T-DNA (fletxes blaves) per amplificar les regions corresponents al T-DNA.

Així es van preparar els vectors portadors de cadascun dels cassetes d'expressió CaMV35S:gfp:nos i CaMV35S:hpt:nos flanquejats per les regions T-DNA presents en els pCAMBIA 0380 i pCAMBIA 0390. Cada clonació es va confirmar tant per digestió enzimàtica com per seqüenciació de DNA. A la Figura 39 es poden observar els vectors pCAMBIA linealitzats, i els inserts aïllats dels plàsmids pCAMBIA per digestió amb enzims de restricció.

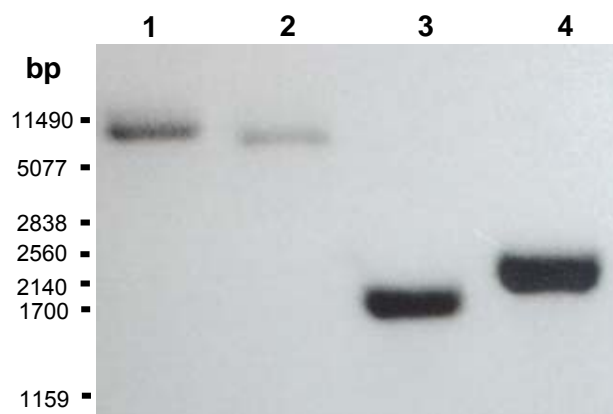


Figura 39. Electroforesi d'agarosa en el que trobem d'esquerra a dreta: M, marcador de pes molecular λ PstI; **1**, pCAMBIA 0380 (PstI/EcoRI); **2**, pCAMBIA 0390 (SmaI/HindIII); **3**, fragment de DNA corresponent a la digestió del plàsmid pUC19:gfp contenint el cassette CaMV35S:gfp:nos (1700pb) amb PstI/EcoRI; **4**, fragment de DNA corresponent a la digestió amb SmaI/HindIII del plàsmid pILTAB 227 contenint el cassette CaMV35S:hpt:nos (2500pb).

Per preparar el DNA a utilitzar per la transformació es va procedir a amplificar cadascun dels cassettes, incloses les regions flanquejants dels T-DNA, mitjançant PCR. Es van dissenyar els oligonucleòtids encebadors en les regions del vector properes als T-DNA (Figura 40).

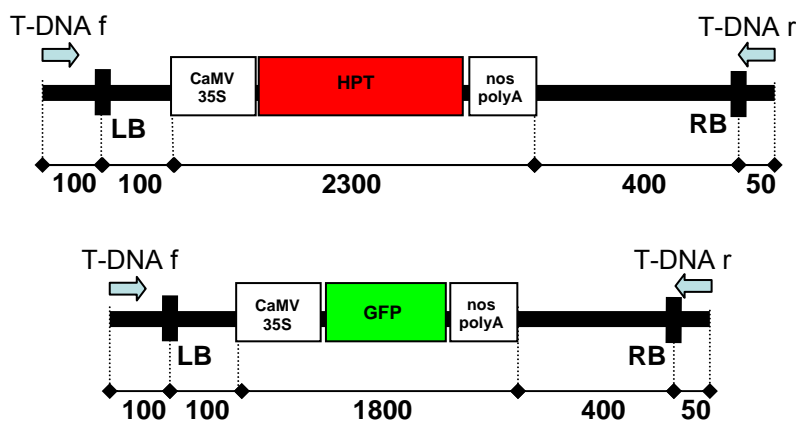


Figura 40. Representació lineal dels dos T-DNA obtinguts per clonació dels cassettes d'expressió dels gens *hpt* i *gfp* respectivament en els vectors pCAMBIA 0390. Es van dissenyar els encebadors T-DNA f i r situats a -100 i -50 pb dels extrems flanquejants d'*Agrobacterium tumefaciens*. La mida total dels fragments de DNA amplificats era de 2950 pb (amb el gen *hpt*) i 2450 bp (amb el gen *gfp*).

A la Figura 41 es mostra l'anàlisi electroforètic dels T-DNA lineals obtinguts mitjançant PCR i utilitzats en aquests estudis.

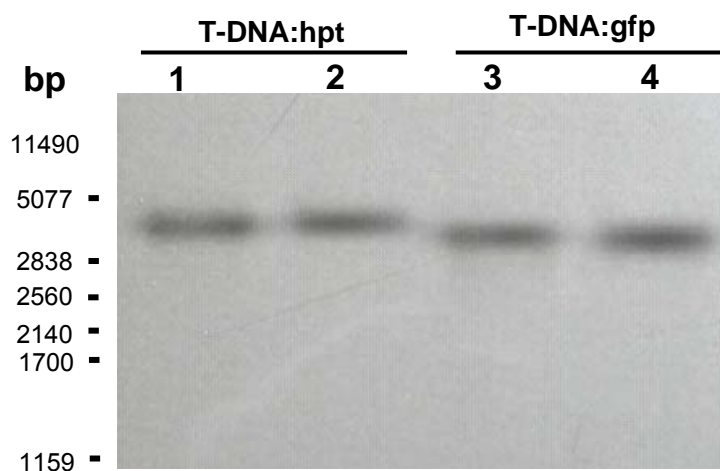


Figura 41. Electroforesi dels productes de l'amplificació per PCR obtinguts a partir dels plàsmids pCAMBIA portadors dels cassettes per l'expressió dels gens *gfp* i *hpt*. Es va utilitzar el DNA del bacteriòfag λ digerit amb Pst I com a marcador de pes molecular (**bp**). **1 i 2**, productes de l'amplificació obtinguts amb els plàsmids pCAMBIA 0380:hpt i pCAMBIA 0390:hpt com a motlles (3kb); **3 i 4**, productes de l'amplificació obtinguts amb els plàsmids pCAMBIA 0380:gfp i pCAMBIA 0390:gfp com a motlles (2,5kb). En cada cas es va analitzar 1/50 del volum total del producte d'amplificació per PCR.

Així doncs es van obtenir els T-DNA que contenien els cassettes a concentracions que oscil·laven entre els 0,2 i 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, amb els que es portarien a terme els assaigs de co-transformació per biolística.

2.2 Assaigs de co-transformació per biolística.

El disseny des assaigs per a la co-transformació per biolística amb dos fragments de DNA lineals és molt similar als assaigs amb *Agrobacterium*, en cultius bacterians inoculats conjuntament o amb decalatge en el temps. Les condicions experimentals utilitzades es detallen a continuació i es representen esquemàticament a la Figura 42.

Dia 0:

- Es van realitzar els disparats sobre dues plaques amb microprojectils portadors dels cassettes T-DNA:gfp i T-DNA:hpt en proporció 1:1. El call d'aquestes

plaques es transferia l'endemà a medi de creixement (N6) amb selecció (Higromicina), essent l'assaig anomenat G6.

- Sobre 4 plaques més (2 plaques per assaig) es van realitzar els dispars (2 dispars per placa) amb el T-DNA portador del cassette amb el gen *gfp*.

Dia 2:

- Es va procedir amb els dispars amb el T-DNA:hpt sobre dues de les quatre plaques que van ser disparades amb el T-DNA:gfp (dos dispars per placa). Un dia més tard d'aquesta segona aplicació es transferia el call a medi de creixement amb selecció. Aquest va ser l'assaig G7, el bombardeig de dos T-DNAs lineals amb dos dies de decalatge entre un i altre.

Dia 5:

- Es van realitzar els dispars amb el T-DNA:hpt sobre les dues últimes plaques (dos dispars per placa), que correspondrien al bombardeig de dos T-DNAs lineals amb cinc dies de decalatge entre un i altre.

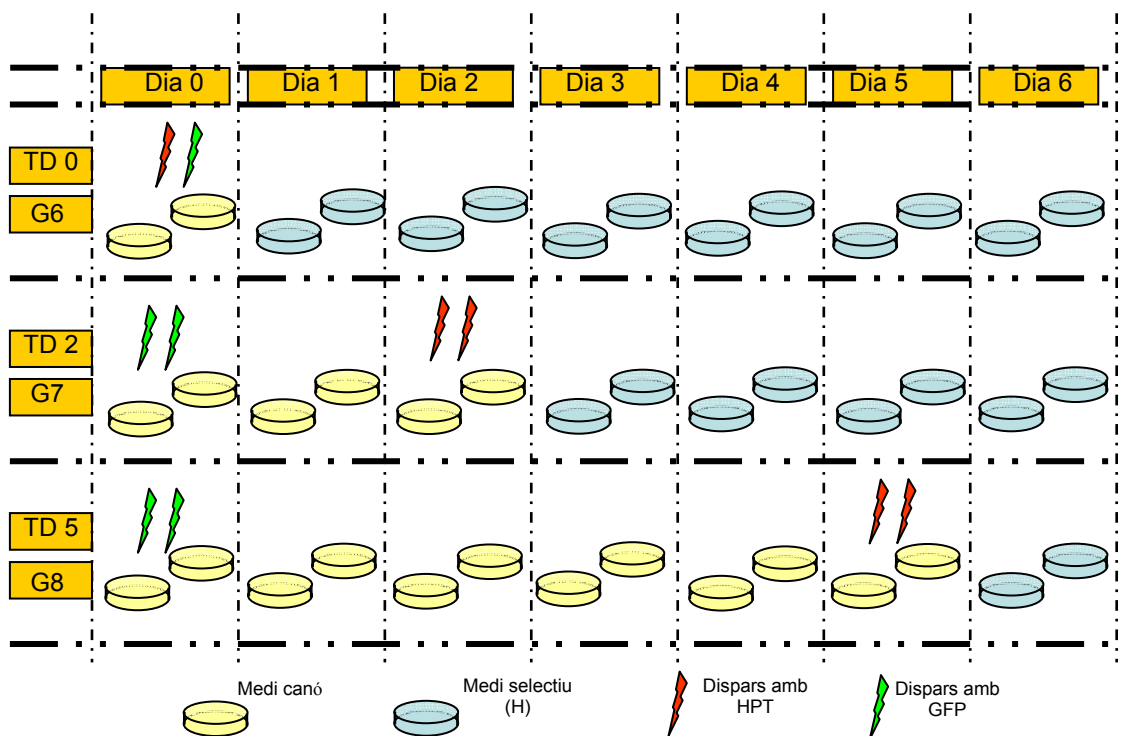


Figura 42. Esquema de les estratègies de co-transformació amb DNA lineals amb diferents temps de decalatge (TD) (en dies) portades a terme per biolística.

Es van realitzar tres repeticions dels assaigs de co-transformació per biolística, i en tots es van localitzar punts fluorescents en les diverses observacions que es van realitzar dels calls a la lupa de fluorescència. El número de calls fluorescents era major en l'assaig G6 que en els assaigs G7 i G8, essent l'assaig G8 el que menys punts fluorescents presentava. Paral·lelament a les dades objectives de les observacions de fluorescència amb la lupa (dades no quantificades), es va veure que l'aspecte general dels calls era diferent entre els assaigs. Amés dies de decalatge entre els dispars ed les micropartícules, menor proliferació del call i major enfosquiment del mateix. Tanmateix, no va arribar a regenerar cap planta ni en la primera ni en la segona sèrie d'aquests assaigs.

A la tercera repetició dels assaigs van regenerar 6 plantes G6 que provenien de dos calls independents. Donat que cap de les sis plantes expressava la proteïna GFP es van descartar per no ser co-transformades.

3. OBTENCIÓ D'ARRÒS MODIFICAT GENÈTICAMENT AMB UN GEN D'INTERÈS I SENSE GEN DE SELECCIÓ

D'acord amb els resultats obtinguts en les diferents estratègies de co-transformació d'arròs per obtenir plantes lliures de gens de selecció, es va triar la tècnica del doble T-DNA en un mateix plàsmid com la més adequada per obtenir arròs modificat genèticament amb el gen insecticida *CryIB* i sense gen de selecció.

Al laboratori de la doctora Blanca San Segundo (CID-CSIC, Barcelona), es va clonar el cassette d'expressió del gen *CryIB* en el T-DNA flanquejat pels extrems d'*A.rhizogenes* del vector pX2-H, donant lloc al plàsmid pX2-HCryIB. L'expressió del gen *CryIB* es troba regulada pel promotor del gen *mpi* de blat de moro. En aquest treball s'ha utilitzat el fragment C1 del gen *mpi*, el qual comprèn 689 bp del promotor i la regió 5' no traduïda del gen *mpi* (fragment -689/+197 del gen *mpi*) (Breitler et al., 2001). El gen *CryIB* era un gen sintètic preparat per M.Royer del CIRAD (Montpellier) adaptat a l'ús de codons de la planta d'arròs. Així en el T-DNA-1 es troben els gens *hpt* i *gfp* (cassettes 35S:hpt:tnos-gos2:gfp:trbcs) i en el T-DNA-2, el cassette C1mpi:cryIB:tnos,

amb el gen insecticida *Cry1B* regulat per un fragment de 900 pb del promotor induïble per ferida del gen *mpi* de blat de moro (Figura 43).

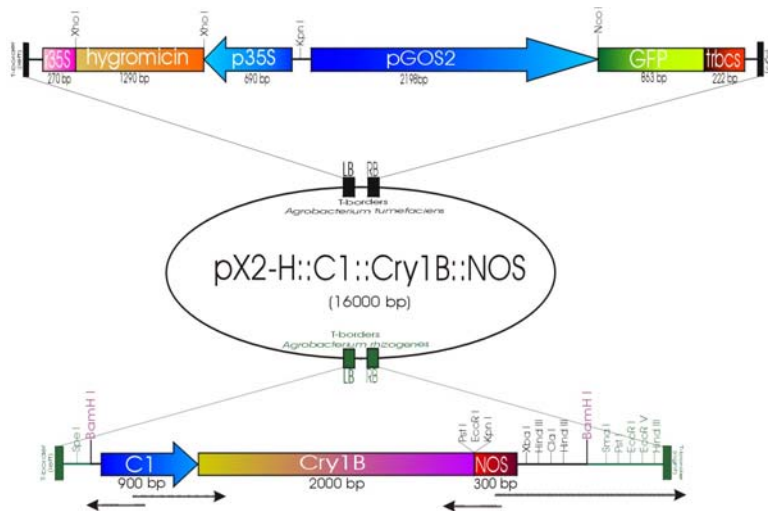


Figura 43. Representació esquemàtica del plàsmid pX2-HCryIB. C1 és el un fragment de 900 pb del fragment del promotor del *mpi* de blat de moro. Imatge cedida per Sònia Campo del CSIC de BCN.

Es va portar a terme un assaig de transformació genètica amb la soca EHA 105 d'*Agrobacterium tumefaciens* amb el plàsmid pX2-HCryIB, assaig R38. El call d'arròs es va seleccionar amb higromicina i només les plantes que regeneraven expressant el gen *gfp* es van considerar, obtenint-se'n un total de 45 plantes, procedents de 12 calls independents. Es van avaluar per immunotransferència extractes de proteïnes totals de fulles de plantes d'arròs sotmeses, o no, a ferida mecànica (un total de 27 plantes T0). D'aquestes, 14, que provenien de 7 calls expressaven en diferents nivells el gen *Cry1B* mentre que 13 plantes de 9 calls van ser negatives. Els resultats moleculars van ser obtinguts per Sònia Campo del CSIC de Barcelona i parcialment es mostren a la Figura 44. S'observen diferències entre les diferents línies regenerades tant en el nivell basal d'acumulació de la proteïna *Cry1B* (fulles no ferides) com en l'acumulació induïda per ferida en aquestes plantes (l'anàlisi d'acumulació de la proteïna *Cry1B* es va realitzar 24 hores després de realitzar-se el tractament per ferida mecànica).

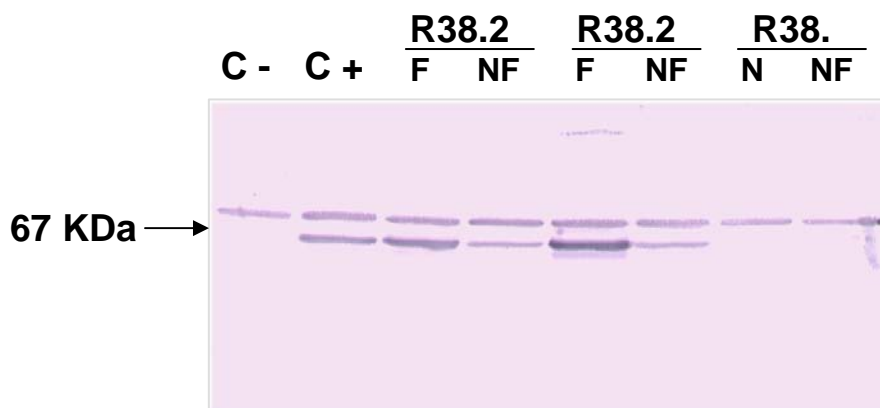


Figura 44. Anàlisi per immunotransferència d'extractes totals de proteïna de fulles de plantes T0 transformades amb el plàsmid pX2-HCry1B. Es pot observar una banda per sobre de la Cry1B que correspondria a una proteïna de més alt pes molecular fruit d'una reacció creuada amb l'anticòs. Es van analitzar alíquotes de 50 µg de proteïna per mostra.

La taxa de co-transformació en l'assaig R38 va ser del 51,85%, havent-se identificat 14 plantes que havien integrat els dos T-DNA de les 27 plantes T0 *gfp+* avaluades pels dos caràcters. Les plantes es van cultivar als hivernacles per obtenir la següent generació (T1) i avaluar-ne la segregació de caràcters.

Es va estudiar la descendència de 13 línies T0 co-transformades sembrant aproximadament 24 llavors T1 de cada línia i se'n determinà la segregació pel gen *gfp*. En 10 línies, la segregació del gen *gfp* obeïa al patró 3:1 esperat en cas d'una còpia del gen, en canvi, en una línia totes les plantes van ser *gfp+* (R38-20), i en dues més (R38-25 i R38-26) el comportament igualment suggeria múltiples còpies integrades del gen; les tres línies es van descartar.

La transmissió del gen *Cry1B* a la generació T1 es va determinar per PCR. Es van analitzar tant les plantes T1 *gfp-* (de les que identificaríem les línies d'interès (*gfp*-(*hpt*-)*cry+*) com les *gfp+* (per poder determinar el genotip T0 més probable). Els encebadors de la reacció de PCR es van dissenyar a partir de les seqüències 3' del promotor i 5' del gen *Cry1B* de tal manera que es pogués detectar la integració de dos elements del cassette d'expressió (Figura 45)

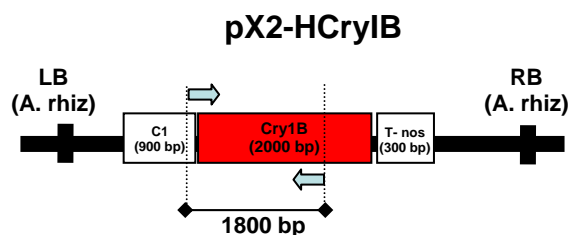


Figura 45. Localització dels encebadors utilitzats per l'anàlisi per PCR de les plantes T1 descendents de plantes co-transformades *gfp+cry+*. En blau es representen les fletxes en el sentit d'amplificació dels encebadors així com el fragment final de 1'8 Kb.

De les 46 plantes *gfp-* analitzades, 10 van ser PCR positives pel gen *Cry1B* i 36 van ser PCR negatives. Així, es van obtenir deu plantes *gfp-Cry1B+* que provenien de tres de les tretze línies avaluades (R38-12, R38-29, R38-35) derivant un 23,1% de segregació independent de les 168 plantes *gfp+*, i totes resultaren *cry+*.

La línia R38-23 al no segregar pel gen *gfp* es va descartar sense haver avaluat la segregació pel gen *Cry1B*. En les nou línies restants (R38-11, R38-13, R38-19, R38-24, R38-25, R38-26, R38-27, R38-30 i R38-41) els dos T-DNA probablement es van integrar lligats en el genoma hoste de la planta T0. Les dades d'aquests estudis de segregació de caràcters es mostra a la Taula XXXII.

Planta T0	Plantes T1							
	GFP+	GFP-	CRY+	CRY-	GFP+ CRY+	GFP+ CRY-	GFP- CRY+	GFP- CRY-
R38 - 11	15	5	12	4	12	0	0	4
R38 - 12	16	4	15	0	14	0	1	0
R38 - 13	15	5	13	3	13	0	0	3
R38 - 19	18	2	15	0	15	0	0	0
R38 - 23	20	0	/	/	/	/	/	/
R38 - 24	19	5	16	4	16	0	0	4
R38 - 25	23	2	16	2	16	0	0	2
R38 - 26	23	1	15	1	15	0	0	1
R38 - 27	16	9	16	9	16	0	0	9
R38 - 29	17	7	19	2	14	0	5	2
R38 - 30	16	4	15	4	15	0	0	4
R38 - 35	19	5	12	2	8	0	4	2
R38 - 41	19	6	14	5	14	0	0	5

Taula XXXII. Estudi de segregació de caràcters *gfp* i *Cry1B* en la generació T1 d'onze línies T0 *gfp+cry-*. Es va determinar la funcionalitat del gen *gfp* per determinació de la fluorescència amb lupa. La presència del gen *Cry1B*, es va comprovar molecularment, per PCR. Donat que no totes les plàntules observades a la lupa superaven l'aclimatació a condicions d'hivernacle, pot ser menor el número de plantes T1 avaluades pel gen *Cry1B* que pel *gfp*. En verd se senyalen les plantes *gfp-cry+* d'interès.

Es van avaluar per “Southern blot” alguna de les plantes T1 dels tres calls segregants així com de les seves predecessores T0 co-transformades (R38-12, R38-29, R38-35). El DNA genòmic es va digerir amb l’enzim de restricció HindIII i es va hibridar amb una sonda pel gen *Cry1B*. En les tres línies semblava que hi haguessin dues còpies integrades del gen *Cry1B* i una del *gfp* (Figura 46).

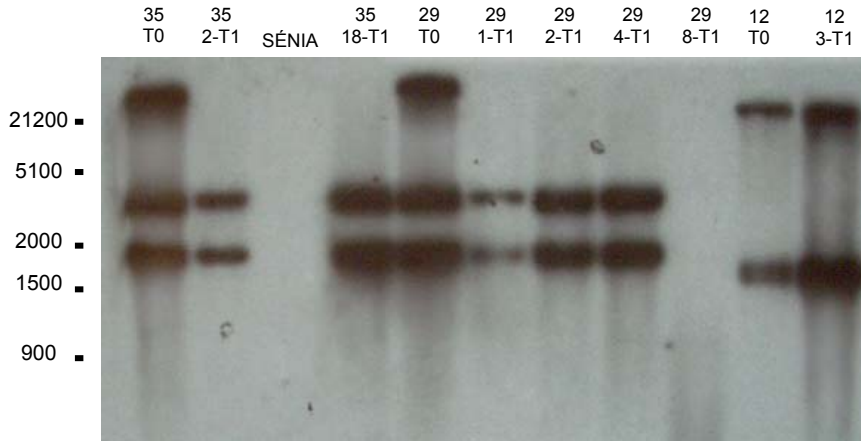


Figura 46. Anàlisi per “Southern blot” de les plantes T1 *gp-cry+* així com de les seves plantes mare T0 (*gfp+cry+*). Com a sonda d’hibridació es va fer servir el DNA del gen *Cry1B* obtingut amplificació per PCR del plàsmid pX2-HCry1B. Es pot observar que les plantes procedents tant de la línia R38-29 com R38-35 presenten aparentment dues còpies del gen *Cry1B* amb el mateix perfil d’integració indicant que molt possiblement es tracti de clons.

Les plantes R38-29, R38-35, R38-12 T0 i descendents segregants (*cry+ gfp-*)T1 de les mateixes, van ser també analitzades per detectar la presència o absència de les proteïnes *Cry1B* o GFP en fulla. En el segon cas es va utilitzar un anticòs policlonal produït en conill en front a la proteïna GFP (proteïna expressada en *E.coli*) en el CSIC de Barcelona. A les Figures 47 i 48 es mostren algun dels resultats.

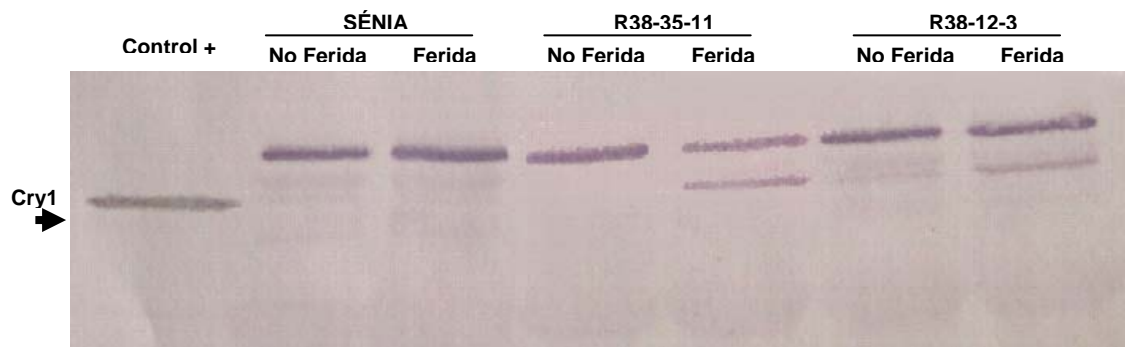


Figura 47. Immunodetecció de la proteïna CRY1B realitzada a les plantes T1 *gfp-cry+*. Hi ha dos carrils per cada planta avaluada, el de l’esquerra correspon a una mostra de fulla no induïda per ferida, mentre que el de la dreta correspon a fulla de la mateixa planta induïda a l’expressió del gen per ferida. Sènia no expressa la proteïna en cap cas, mentre que les diferents mostres avaluades mostren una major expressió quan hi ha hagut inducció per ferida. Es va utilitzar un anticòs policlonal preparat en conill enfront la proteïna *Cry1B* (cedit per Monique Royer del CIRAD de Montpellier). Com a control positiu es va utilitzar proteïna *Cry1B* purificada.

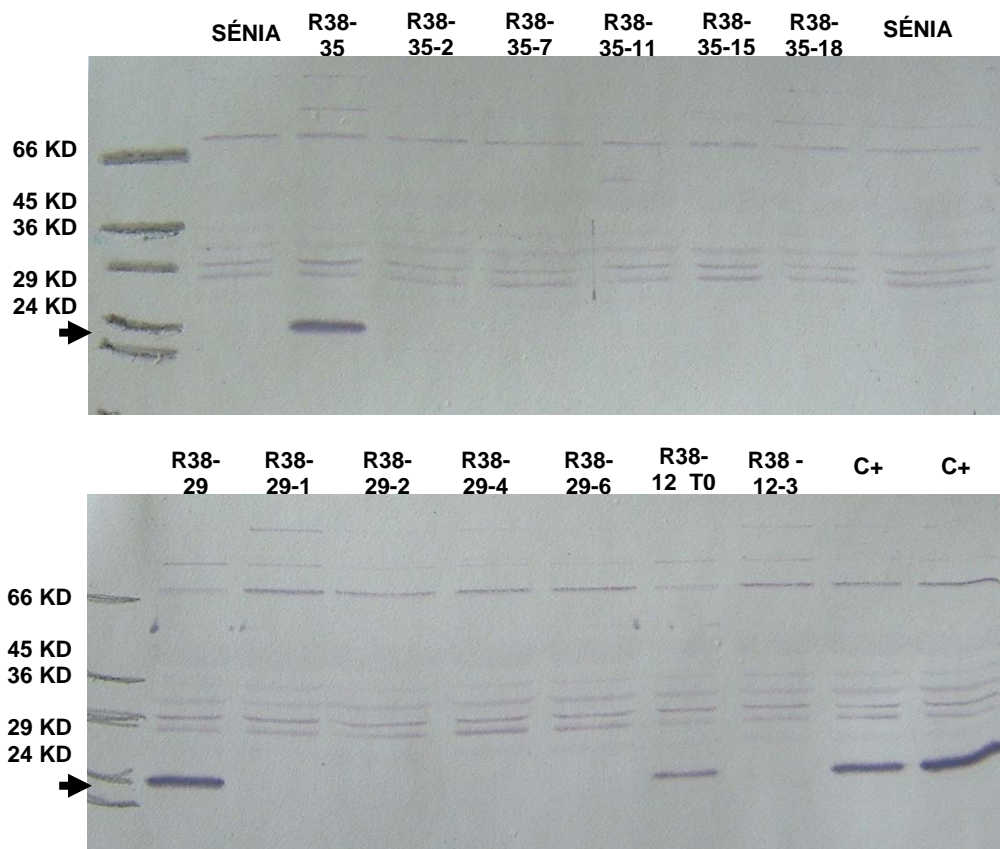


Figura 48. Immunodetecció de la proteïna GFP realitzat a les plantes T1 *gfp-cry+*. Els carrils Sénia són el control negatiu mentre que les mostres C+35, C+29 i C+12 són les tres plantes mare T0 co-transformades (*gfp+cry1B+*). Les línies T1 segregants pel caràcter *gfp* (*gfp-*), per a cadascuna d'elles es mostren a continuació.

De les 10 plantes T1 *gfp-cry+* (R38-29-1, R38-29-2, R38-29-4, R38-29-6, R38-35-2, R38-35-7, R38-35-11, R38-35-15, R38-35-18, i R38-12-3), es van triar les quatre que van donar una major acumulació en fulla en resposta a ferida (R38-29-6, R38-35-7, R38-35-11 i R38-12-3). En aquests moments s'estan avaluant la descendència T2 que per segregació del gen *Cry1B* d'aquestes quatre línies amb l'objectiu final d'obtenir línies homozigòtes pel gen d'interès.

Com a conclusió d'aquest estudi, l'estratègia de co-transformació de dos T-DNA vectoritzats en el mateix plàsmid va resultar eficient per l'obtenció de línies d'arròs de la varietat Sénia amb el gen codificant de la toxina *Cry1B* lliure de gens de selecció (*hpt* de resistència a antibiòtic).

4. AVALUACIÓ DEL FLUX GENÈTIC EN ARRÒS

4.1 Dades agronòmiques

Totes les operacions agronòmiques es varen portar a terme pel personal de la EEE de l'IRTA d'Amposta. Les llavors es varen sembrar el 24 d'abril i es varen transplantar manualment al camp el 29 de maig. Al cap de 10 dies es varen reposar les plantes que no havien sobreviscut al trasplantament. Durant tot el cultiu es va mantenir el camp lliure de males herbes i es varen fer els tractaments d'abonat i fitosanitaris corresponents. Durant el desenvolupament de les plantes se'n va avaluar l'alçada, el número de fillols, i el número d'espigues (Taula XXXIII).

	AS	NT	T
Mida de la planta (cm) 16 dies	7,06 ± 0,53	7,64 ± 0,06	7,27 ± 0,33
Mida de la planta (cm) 28 dies	25,52 ± 0,53	21,48 ± 0,14	23,18 ± 0,59
Mida de la planta (cm) Maduració	107 ± 0,7	88,7 ± 0,4	90,2 ± 1,3
Nº fillols/planta 28 dies	1,59 ± 0,19	1,21 ± 0,04	1,41 ± 0,14
Nº espigues/planta Maduració	30,8 ± 1,3	23,2 ± 0,4	10,8 ± 0,7

Taula XXXIII. Mida de la planta en cm als 16 i 28 dies després de la sembra i al final del cultiu (època de maduració). Nº de fillols per planta als 28 dies després de la sembra i Nº d'espigues a l'època de floració. AS: arròs salvatge; NT Sènia no transgènica; T Sènia transgènica.

Encara que a l'inici del cultiu les diferències de vigor entre l'arròs salvatge i Sènia no eren evidents, a mida que el cultiu va anar avançant, i tal com era d'esperar, les plantes d'arròs salvatge varen ser més altes i varen produir més espigues que les Sènia. En assaigs anteriors s'havia comprovat que la línia S1B de Sènia transgènica tenia una fenologia similar a Sènia convencional. El fet que en aquest assaig aquesta línia hagi produït menys espigues per planta pot atribuir-se a les característiques inherents de l'assaig. Així, l'arròs és una planta que s'adapta molt bé a les condicions ambientals en el sentit de que com més espai té, més afilla i produeix més. El fet de que les plantes de la línia S1B estiguessin concentrades al centre de l'assaig, on també s'hi varen intercalar

RESULTATS

plantes d'arròs salvatge, va disminuir notablement l'espai del que disposaven per afillar, en comparació al que tenien les plantes Sènia no transgèniques. Aquest fet podria explicar la diferència en la producció de fillols i espigues. A la Figura 49 es pot veure l'aspecte de l'assaig en el moment de l'espigat.



Figura 49. Assaig de camp per detectar el flux genètic en arròs. Estació Experimental del Delta de l'Ebre. IRTA. Amposta 2001. A, aspecte del camp en fases inicials de creixement de les plantes d'arròs. B, aspecte de l'assaig en època de maduració de les espigues, que s'embossaven en cas de plantes d'arròs salvatge amb la finalitat de no perdre la llavor (dehiscent). C, imatge ampliada de l'estació meteorològica col·locada en l'assaig.

Segons la normativa internacional, establerta per l'IRRI per a la valuació de la fenologia de l'arròs, s'estableix com a data de floració aquella en què el 50% de les espigues estan completament visibles. Seguint aquest criteri les dates de floració foren: 24 de juliol per l'arròs salvatge, 27 de juliol per la línia S1B i 28 de juliol per la varietat Sènia. Observant aquestes dades es podria pensar que no hi va haver-hi una suficient

coincidència de floració entre l'arròs salvatge i la línia S1B però cal tenir en compte que el període en que hi pot haver pol·linització es bastant ampli. Així, per exemple des del 20 de juliol fins el 3 d'agost, es varen poder trobar espigues de les tres varietats en l'estadi de desenvolupament adequat per ser pol·linitzades.

4.2 Anàlisi de les descendències

La mitjana de llavors que varen germinar per plata va ser de 456.8 en el cas de la varietat Sènia i de 477.9 en el cas de l'arròs salvatge. A la Figura 50 es mostren unes imatges del procés d'avaluació de les llavors T1.



Figura 50. Avaluació de les plantes T1 recollides en llavor a l'assaig de flux de gens. A, aspecte de les plantes en el moment de l'aplicació de l'herbicida. B, Aspecte de les mateixes plantes dues setmanes després, se senyalen amb vermell les safates amb plantes control + (S1B) i en blau les plantes que podien haver incorporat la resistència a l'herbicida a través del pol·len.

RESULTATS

Tenint en compte aquests valors, en total es varen analitzar, mitjançant el tractament amb herbicida Finale a la dosi de 800 gma/ha, un total de 66.992 plantetes d'arròs salvatge i 259.005 de la varietat Sènia. A la Taula XXXIV consta el % de flux detectat en funció de la varietat, del cercle i del número de plantes analitzades.

TIPUS	SITUACIÓ	PLANTES RESISTENTS/TOTAL	% FLUX ESTIMAT
AS	Nucli central	13 / 8680	0,15
AS	Cercle H (1 m)	3 / 14617	0,041
AS	Cercle I (2 m)	4 / 14617	0,027
AS	Cercle J (5 m)	2 / 14617	0,01
AS	Cercle K (10 m)	0 / 14161	0
SÉNIA	Cercle H (1 m)	11 / 45223	0,062
SÉNIA	Cercle I (2 m)	20 / 63952	0,04
SÉNIA	Cercle J (5 m)	6 / 54816	0,01
SÉNIA	Cercle K (10 m)	0 / 95014	0

Taula XXXIV. Percentatge de flux detectat a diferents distàncies en l'arròs salvatge (AS) i en Sènia no transgènica.

En general, el flux de gens cap a la varietat Sènia decreix ràpidament amb la distància el que confirma els resultats obtinguts al nostre laboratori en altres assaigs (Messeguer et al, 2001, 2004). De fet, a 10 m de distància ja no s'ha detectat, malgrat el gran número de llavors analitzades. La mateixa disminució del flux s'observa amb l'arròs salvatge i el flux detectat en el nucli central (plantes a tocar), és del mateix ordre de magnitud que el que es va trobar en l'assaig anterior (Messeguer et al, 2004).

En la Figura 51 es mostren els resultats del comportament del vent registrats per les sondes anemomètriques situades al mateix camp d'assaig. Els valors representats per a cada direcció del vent estan expressats en Km i representen el recorregut horari (metres recorreguts en una hora) mitjà del vent entre els dies 20 de juliol i 10 d'agost, en els que va tenir lloc la floració de les plantes de l'assaig.

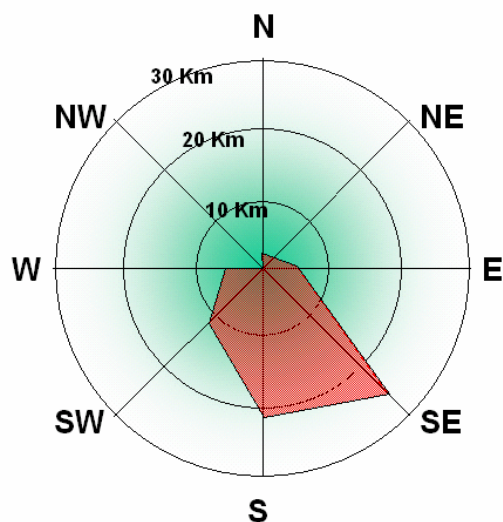


Figura 51. Recorregut estimat diari del vent durant l'època de floració de l'arròs de l'assaig. El recorregut s'obté a partir de la velocitat mitjana i de les freqüències corresponents a cada direcció del vent mesurades per l'estació meteorològica instal·lada al centre de l'assaig.

De cara a la dispersió del pol·len el recorregut horari del vent és el paràmetre més indicatiu doncs té en compte no solament la velocitat mitjana sinó també la freqüència relativa del vent en cada direcció considerada.

S'observà clarament una acumulació de plantes amb llavors híbrides en la part contrària a la direcció dominant del vent tant per la varietat Sénia com per l'arròs salvatge (Figures 52 i 53). Per avaluar la probabilitat de que aquestes distribucions asimètriques fossin degudes a l'atzar es va aplicar el test U^2 de Watson, especial per distribucions circulars i la hipòtesis nul·la ($p > 0.001$) d'una distribució homogènia es va haver de rebutjar tant per les plantes de Sénia com per les d'arròs salvatge. Per tant, la distribució asimètrica detectada, que disminueix ràpidament amb la distància al nucli transgènic, pot atribuir-se a l'efecte del vents dominants durant el període de floració.

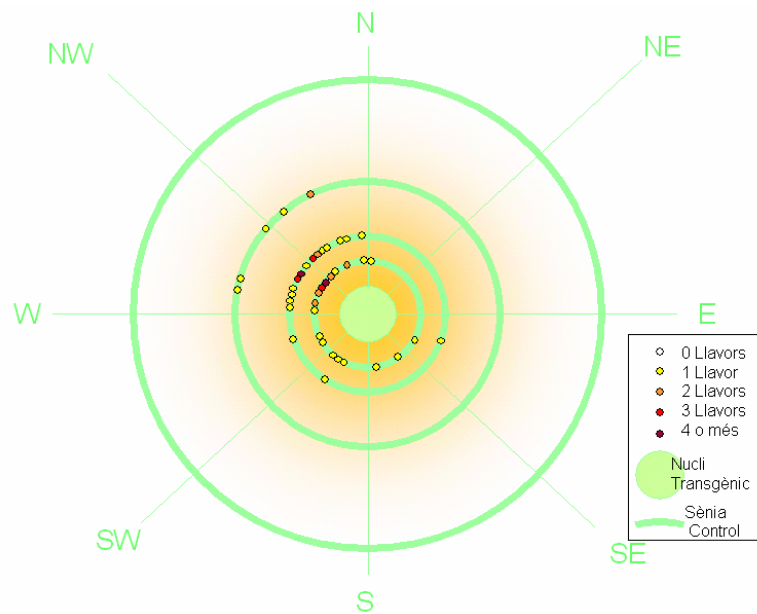


Figura 52. Situació originària de les plantes de Sènia en les que es varen detectar les llavors híbrides resistents al Glufosinat. La distribució asimètrica està orientada a favor de la direcció del vent dominant registrada durant l'època de floració.

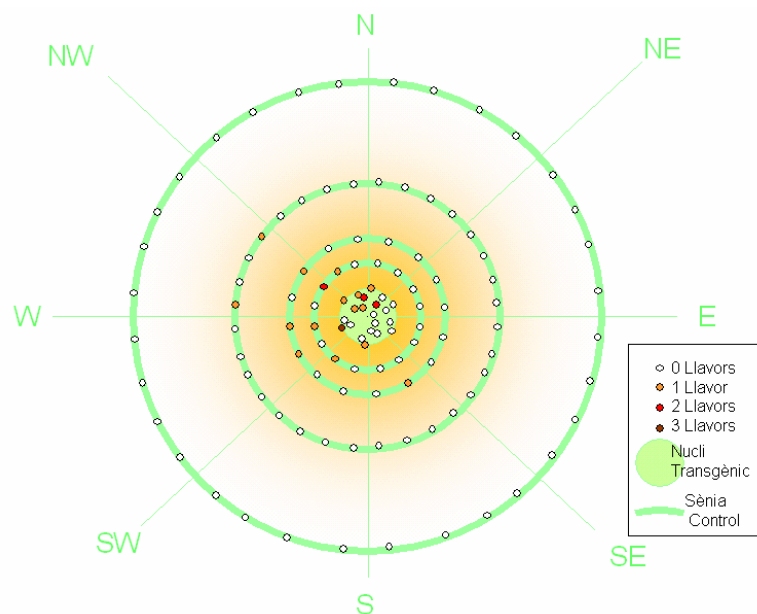


Figura 53. Situació en el camp de les plantes d'arròs salvatge tal com es varen plantar a l'inici de l'assaig. En color es representen les plantes en les que es varen detectar llavors híbrides transgèniques. També, com en el cas de Sènia, es nota clarament la influència del vent del sud-est.

DISCUSSIÓ

1. SOBRE L'ELIMINACIÓ DE GENS DE SELECCIÓ

Fa vint anys, es van publicar els resultats dels primers experiments en què es descrivia amb èxit la transferència i expressió de gens forans en cèl·lules vegetals. Des d'aleshores, les plantes transgèniques han esdevingut una eina essencial en biologia vegetal així com pel desenvolupament de noves varietats de plantes modificades genèticament que han estat cultivades extensament en algunes regions del món (EEUU, Argentina, Mèxic, Índia, Xina, Egipte, etc.).

L'obtenció de plantes transgèniques passa pel procés de transformació genètica. Actualment, la baixa eficiència del procés de transformació en moltes espècies d'interès agronòmic requereix l'ús de gens de selecció (Hohn et al., 2001; Ebinuma et al., 2001(a); Puchta, 2003(a); Breitler et al., 2004), que es basa en donar un avantatge selectiu com la resistència a antibiòtics o herbicides a les cèl·lules transformades, permetent que només aquestes creixin mentre que les cèl·lules no transformades moriran. La utilització de gens que confereixen resistència a antibiòtics com a gens de selecció està àmpliament extès.

En els darrers anys han incrementat les preocupacions respecte la presència de gens de selecció amb resistència a antibiòtics i herbicides al medi ambient o en la cadena alimentària, al·legant que podrien suposar perills imprevisibles per l'ecosistema o per la salut humana o animal. Un dels possibles efectes d'incloure gens de resistència a antibiòtics en productes alimentaris és la possible transferència d'aquestes resistències a través de la flora intestinal a la població humana. Tot i que fins ara no hi ha cap evidència que ho confirmi, a nivell europeu aquestes controvèrsies s'han traduït amb l'aparició de la directiva UE/18/EC en la què prohibeix l'alliberació en camp de línies de plantes amb gens de resistència a antibiòtics d'ús clínic a partir de 2005 per usos comercials i de 2009 per usos experimentals.

Un dels efectes negatius dels gens de selecció per resistència a antibiòtics o a herbicides és que les cèl·lules sensibles als agents de selecció, al morir inhibeixen l'aportació de nutrients a les cèl·lules transformades, o bé excreten compostos tòxics.

Aquests efectes negatius limiten significativament la capacitat de les cèl·lules transformades a proliferar i diferenciar-se a plantes transgèniques (Ebinuma et al., 2001(a)).

A més, a nivell de laboratori, el número de gens de selecció efectius així com de promotors constitutius utilitzats per expressar-los en una espècie donada, és limitat, i desafortunadament fins ara, la majoria de gens de selecció no s'han eliminat de les plantes transgèniques després del procés de transformació. Conseqüentment, les plantes transgèniques no es poden tornar a transformar utilitzant el mateix gen de selecció pel segon transgen, i l'encreuament sexual de dues línies portadores del mateix gen de selecció, incrementaria el problema de l'expressió dels transgens, tant del d'interès com del de selecció, donada la redundància de seqüències en el genoma hoste que podria afavorir fenòmens de silenciament depenent d'homologia (Vaucheret et al., 1998).

Així mateix, la incorporació consecutiva de diferents gens de resistència en cada transgen o conjunt de transgens incrementaria les preocupacions en aspectes de seguretat alimentària i medioambiental, alhora que encariria i endarreria el procés d'obtenció d'aquestes línies (Puchta 2003(a); Kuiper et al., 2001; Daniell, 2002; Smyth et al., 2002).

Per evitar tots aquests inconvenients associats als gens de selecció i més concretament als que confereixen resistència a antibiòtics i herbicides, s'han descrit diverses aproximacions que seguidament es discuteixen.

Així, s'han desenvolupat sistemes de selecció alternatius als gens de resistències a antibiòtics i herbicides en els que s'utilitzen gens de selecció positiva, amb una reducció important dels efectes negatius respecte els anteriors. En aquest sentit es substitueix l'ús de gens de selecció per antibiòtic per gens que, conferint un avantatge metabòlic a les cèl·lules transformades com per exemple el gen que codifica per la β -glucuronidasa (Joersbo et al., 1996) o el gen de la xilosa isomerasa (Haldrup et al., 1998), la fosfomanosa isomerasa (Joersbo et al., 1998; Negrotto et al., 2000), o la isopentasil transferasa (Kunze et al., 2001). La utilització d'aquests gens no implica la mort de les cèl·lules no transformades, fet pel qual no se'n deriven compostos tòxics. D'entrada aquests sistemes milloren l'eficiència de transformació (Joersbo et al., 1996; Hohn et al., 2001; Wright et al., 2001), incloses algunes espècies recalcitrants de regenerar. Però,

considerant la reducció de seqüències transgèniques innecessàries a un mínim absolut com a objectiu final, caldria, igual que amb els gens de selecció negativa, eliminar els gens de selecció positiva una vegada realitzada la transformació genètica i haver identificat les cèl·lules transgèniques (Ebinuma et al., 2001(a, b); Puchta, 2003(a, b)). Una altra alternativa ha estat la identificació visual, basada en la utilització del gen *gfp* (Kaepler et al. 2001)

Una possible via d'eliminació dels gens de selecció després de la transformació genètica es basa en l'aplicació de tècniques i tecnologies que escindeixen aquestes seqüències del genoma hoste com la recombinació de lloc específic, els transposons i la recombinació homòloga. Els sistemes de recombinació de lloc específic representen una estratègia d'eliminació de seqüències donades del genoma (Dale et al., 1991; Gleave et al., 1999), però esdevenen molt lentes en algun pas i les eficiències d'escissió per recombinació són baixes (Ebinuma et al., 2001(a); Breitler et al., 2004). Més recentment, han aparegut sistemes de recombinació de lloc específic per inducció química que obvien els problemes de regulació de l'escissió dels transgens tan bon punt esdevenen prescindibles (Hare et al., 2002). Tot i que el reposicionament de transgens d'interès mediat per transposons és una tècnica alternativa per eliminar els gens de selecció (Goldsbrough et al., 1993; Cotsaftis et al., 2002), en general no seria aplicable a sistemes de transformació que tendeixin a la integració de múltiples còpies en múltiples *locus* (Goldsbrough et al. 2001).

Amb tot, la co-transformació, basada en integrar en *loci* independents el gen de selecció i el gen d'interès de manera que per segregació de caràcters s'obtinguin en la descendència plantes transgèniques lliures de gens de selecció, és aparentment l'estratègia més interessant. Fins ara, en la transformació genètica per *Agrobacterium tumefaciens*, el gen de selecció i d'interès s'han clonat en el mateix T-DNA, de manera que la probabilitat de segregació independent dels dos transgens a nivell de la descendència esdevé gairebé inexistent.

Això ha permès el desenvolupament d'estratègies de co-transformació per *Agrobacterium* en les que s'utilitzen dos T-DNA, en els que es clonen per separat el gen d'interès i el gen de selecció, podent-se trobar en un mateix plàsmid (Depicker et al., 1985; Komari et al., 1996; Lu et al., 2001; Breitler et al., 2004) o en plàsmids separats. En el darrer cas, els plàsmids T-DNA poden haver estat introduïts conjuntament en una

mateixa soca bacteriana (De Framond et al., 1986; Daley et al., 1998) o per separat (Depicker et al., 1985; McKnight et al., 1987; De Block et al., 1991; Komari et al., 1996; De Neve et al., 1997). Tot i que s'han descrit amb èxit les tres, els diferents resultats obtinguts fan difícil donar una avaluació final coherent de les possibles vies de co-transformació aplicada, de manera que encara roman poc clar quina seria la més reproducible per l'obtenció de plantes transgèniques sense gens de selecció sobretot quan es treballa amb plantes no model (Ebinuma et al., 2001(a); Goldsbrough, 2001; Jaiwal et al., 2002; Puchta, 2003(a); Gelvin, 2003).

En primer terme la taxa de co-transformació ve donada per la capacitat transformativa del teixit en el moment de la transformació. Per tant la taxa de co-transformació dependrà en primer lloc de l'estat fisiològic del material vegetal i de les condicions de cultiu, bacterià i vegetal durant tot el procés de transformació genètica fins l'obtenció de plantes transgèniques. En aquest sentit, la diferència de resultats en la taxa de co-transformació descrita per diferents autors portant a terme una mateixa estratègia sol associar-se a l'estat del material vegetal, així com de les condicions de cultiu de teixits durant la infecció per *Agrobacterium* i el co-cultiu, ja que influeixen fortament en la competència tant de les cèl·lules vegetals com de les bacteries, incrementant el número d'unions entre bacteries i cèl·lules vegetals (Ebinuma et al., 2001(a)). En segon lloc la co-transformació dependrà de la capacitat del dos T-DNA a insertar-se en el genoma hoste.

Altres factors com el de la relació entre les longituds dels diferents T-DNA pot optimitzar la taxa de co-transformació dels mateixos (McCormac et al., 2001). També la intensitat lumínica o el fotoperíode podrien tenir un efecte favorable en la transferència de T-DNA. Així, altres autors van descriure els beneficiosos efectes de la llum durant el co-cultiu en la transformació genètica per *Agrobacterium* al transformar dues espècies vegetals, una de cultiu i una model (*Phaseolus actutifolius* i *Arabidopsis thaliana*) amb diferents tipus de soques bacterianes (nopalina, octopina, succinamopina), ja que van observar un increment notable de la transferència de DNA quan el co-cultiu tenia lloc amb fotoperíode 16/8 respecte les habituals condicions de foscor. Però encara van obtenir millors resultats quan s'exposava ininterrompudament a la llum el co-cultiu (Zambre et al., 2003).

L'expressió dels transgens en arròs depèn fortament de la integritat i organització del *locus* transgènic. Estudis previs sobre la caracterització dels patrons d'integració del T-DNA en diverses espècies han descrit que entre el 30 i el 90% dels T-DNA estan reorganitzats en repeticions directes o invertides (Jones et al., 1987; Jorgensen et al., 1987; Grevelding et al., 1993; De Neve et al., 1997; Krizkova et al., 1998; De Buck et al., 1999). Tot i que alguns autors han suggerit que el tipus de teixit transformat, el tipus de soca d'*Agrobacterium* utilitzada, i/o el sistema de vector binari poden influir en la proporció de repeticions en tàndem o invertides del T-DNA integrat (Grevelding et al., 1993; De Neve et al., 1997) no està clar perquè es dona aquesta proporció d'estructures repetitives tan freqüent. És per tant de gran importància estudiar i aclarir els mecanismes d'integració dels transgens, i com aquests afecten la integritat i la organització dels transgens, amb l'objectiu de dissenyar estratègies de transformació més eficients (Kholi et al. 1998).

La complexitat d'integració del *locus* transgènic pot donar lloc als freqüents fenòmens de silenciament o inestabilitat de l'expressió dels transgens al llarg de diferents generacions. Està descrit que múltiples còpies d'un gen en el DNA vegetal semblen tenir una major susceptibilitat tant de silenciament transcripcional com post-transcripcional (Meyer et al., 1996; Depicker et al., 1997; Stam et al., 1997).

En aquest treball s'han provat les diferents vies de co-transformació per *Agrobacterium* en Sènia, una varietat d'arròs comercial representativa de les varietats cultivades a la conca mediterrània. En les diferents estratègies s'han obtingut resultats molt diferents.

Cal considerar els principals processos que tenen lloc durant la transformació genètica per *Agrobacterium*, i que poden ser limitants en la co-transformació, com la unió de la bactèria a la cèl·lula vegetal, la interacció entre la bactèria i la cèl·lula vegetal, la transferència del T-DNA de la bactèria a la cèl·lula vegetal i l'acceptació del T-DNA en les cèl·lules vegetals (Ebinuma et al., 2001(a); Gelvin, 2003).

Referent a la unió de la bactèria a la cèl·lula, en la inoculació del call d'arròs amb dos cultius bacterians (cadascun portador d'un transgen diferent), durant la infecció almenys dues cèl·lules agrobacterianes provinents de cadascun dels dos cultius s'han d'unir a una mateixa cèl·lula vegetal i transferir els T-DNA. En canvi en la resta

d'estratègies l'acoblament d'una sola cèl·lula bacteriana a la cèl·lula vegetal pot donar lloc a una co-transferència de T-DNA. Així, per la pròpia competència entre bacteries a interactuar amb una cèl·lula vegetal, era d'esperar una taxa de co-transformació més elevada en l'assaig en que un sol plàsmid és portador dels dos T-DNA (G9 = 69'7%), que en els assaigs on s'utilitzaven dos vectors introduïts en dos cultius bacterians, simultàniament i amb decalatge de temps (G12 = 2,4-5,6% ; G13 = 0 %; G14 = 0%).

Per altra banda caldria denotar que, mentre el factor limitant de la interacció bactèria-planta en la inoculació simultània de dos cultius bacterians (G12) vindria donat per la competència entre diferents bacteries a interactuar amb una mateixa cèl·lula vegetal, en les inoculacions bacterianes amb 2 i 5 dies de decalatge (G13 i G14) podria ser que la no-susceptibilitat de la cèl·lula vegetal la que limités la co-transferència dels dos T-DNA.

Això explicaria perquè no es va obtenir cap planta co-transformada en cap dels assaigs en què es deixés un decalatge de temps entre les dues inoculacions amb *Agrobacterium*. A més, totes les plantes transformades que regeneraren havien integrat el gen *gfp*, inoculat en primer lloc en tots els casos (aparent bloqueig de la integració del segon T-DNA). A més el número de plantes que regeneraven de cada assaig era significativament menor a mida que es deixaren dies de decalatge (disminució de la viabilitat del call). A la Taula XXXV es mostra el número de plantes regenerades en cada assaig d'inoculació dels calls d'arròs amb dos cultius bacterians.

Soques d' <i>Agrobacterium</i>	EHA 105 pCAMBIA 1301 EHA 105 pCAMBIA 1302			EHA 105 pCAMBIA 1301 EHA 105 pX2-H		
	TD=0	TD=2	TD=5	TD=0	TD=2	TD=5
Codi assaig	G1	G2	G3	G12	G13	G14
Plantes regenerades	118	56	6	40	7	0
Calls	35	12	1	22	3	0
Co-transformació %	39,1 - 42,2*	0	0	2,7 - 5,26	0	0

Taula XXXV. Número de plantes obtingudes en cada assaig de co-transformació en què es va inocular el call d'arròs amb dos cultius d'*Agrobacterium tumefaciens*, un amb el plàsmid portador del gen marcador *uidA* (pCAMBIA 1301) i l'altra amb un plàsmid amb el gen *gfp* (pCAMBIA 1302 o pX2-H). S'observa que no hi ha co-transformació quan hi ha decalatge de temps així com una clara disminució en el número de plantes regenerades a mesura que se separen en el temps les dues infeccions. A la taula s'inclouen els resultats de transformació obtinguts en els experiments inicials en els que es va utilitzar el plàsmid pCAMBIA 1302.* Resultat de l'avaluació de les plantes G1 per PCR del gen *gfp*.

L'aparent bloqueig en la integració del segon T-DNA podria ser el resultat d'un canvi funcional d'algun dels gens que s'haguessin activat o inactivat durant la primera infecció bacteriana, aquests gens serien els responsables de segellar l'entrada de DNA extern. En aquesta direcció, recentment s'estan identificant gens de plantes així com diversos productes proteics implicats en el procés de transformació que poden ser induïts o silenciats just després de la infecció per *Agrobacterium* (Gelvin et al., 2003) i que poden estar estretament lligats a respostes de defensa (Veena et al., 2003).

També la disminució de la viabilitat del call entre els assaigs en què es deixà un decalatge de temps i les inoculacions simultànies podria ser degut a l'expressió o repressió d'algun gen que bloquegés la divisió cel·lular o d'algun derivat proteic responsable del procés necròtic. S'han descrit efectes similars en casos de plantes recalcitrants, amb incompatibilitat entre cèl·lules bacterianes i vegetals com a resultat de mecanismes de defensa associats a la resposta hipersensible (RH). En molts casos les bactèries són portadores de gens *hpr* (reacció hipersensible i patogenecitat) els productes dels quals estan implicats en l'elicitació de la resposta hipersensible (RH) en plantes resistents (Baker et al., 1997). En aquesta interacció una planta no hoste reconeix els fitopatogens induint la resposta hipersensible (RH) que resulta en la necrosi localitzada a la zona d'infecció, confinant posteriors infeccions.

Tot i que la millora dels protocols en transformació ha possibilitat la transformació genètica d'espècies recalcitrants com l'arròs, una immediata reinfecció quedaria pendent. En la literatura es troben exemples en què la millora de condicions durant la infecció bacteriana permet l'obtenció de plantes transgèniques d'espècies recalcitrants, innovacions que eviten l'activació de mecanismes de defensa com la HR o que puguin inhabilitar la transformació. En pollancre, es va veure que la necrosi induïda en el procés de transformació genètica per *Agrobacterium* era probablement deguda a l'acumulació d'amoni, i afegint gluconat càlcic es reduïa l'efecte (Block, 1990). En blat de moro, es va suggerir que un dels efectes de la incompatibilitat entre la bactèria i la cèl·lula vegetal radicava en un bloqueig en la integració del T-DNA i una manca de divisió cel·lular (Narasimhulu et al., 1996). I en vinya (*Vitis vinifera*), una espècie molt recalcitrant a la transformació genètica, quan s'exposa call embriogènic amb *Agrobacterium*, per incompatibilitat el call es necrosa i mor (Perl et al., 1996). S'ha descrit que aquesta reacció es correlaciona amb alts nivells de peròxids durant la transformació, i la seva prevenció té lloc per addició d'antioxidants tal com la

polivinilpirrolidona o el ditiotreiol (Perl et al., 1996). En arròs, està descrit que l'ús de tres compostos antinecròtics (40 mg/L L-cisteïna, 5 mg/L nitrat de plata i 15 mg/L d'àcid ascòrbic) (Enriquez-Obregon et al., 1999) en el protocol de regeneració de call transformat millora considerablement el rendiment de transformació per *Agrobacterium* (Dey et al., 2002).

Sembla molt probable que la resposta hipersensible jugui un rol important en la capacitat de reinfecció del call transformat d'arròs per *Agrobacterium*. Caldria seguir la línia d'investigació en pro d'identificar els gens vegetals implicats en el procés de transferència de T-DNA (Gelvin, 2003) per conèixer els mecanismes responsables de la sensibilització de les cèl·lules d'arròs a una segona inoculació bacteriana i poder redissenyar aquesta estratègia de co-transformació. Caldria provar si dues inoculacions seguides amb diferents soques bacterianes desencadenarien les mateixes reaccions, per saber l'especificitat del bloqueig infectiu. També caldria conèixer, si es tractés de fenòmens puntuals o definits en el temps, la durada del possible període d'immunització cel·lular per poder re-intentar la inoculació de dos T-DNA en diferents temps per avaluar la viabilitat de l'estratègia per l'afavoriment de la integració separada de dos transgens.

Per comprovar aquestes hipòtesis es podria avaluar diversos aspectes com possibles canvis de pH extracel·lulars, fragmentació del DNA per endonucleases (o típiques reaccions en cascada de la proteasa caspasa, relacionada amb mort cel·lular), considerar el temps de duplicació de les cèl·lules del call en la recuperació post-inoculativa, abans de l'organització embriogènica per evitar la formació de quimeres.

Així mateix, el fet d'haver obtingut la meitat i la desena part de plantes regenerades en l'assaig en què es van deixar dos dies de decalatge (G13) respecte l'assaig en què s'inocularen simultàniament els dos cultius bacterians (G1) indicava que la viabilitat del call al ser reinfectat baixava significativament en el temps. Aquesta disminució de la viabilitat del call entre G13 i G14, podria ser deguda, si més no acusada, per la prolongació de l'estat de co-cultiu del material vegetal amb bacteri.

Amb l'estratègia de dos plàsmids en el mateix cultiu d'*Agrobacterium* (G15), no hi jugaria tant la competència entre bactèries per unir-se a una mateixa cèl·lula vegetal, donat que en la mateixa bactèria hi hauria els dos plàsmids. En aquest cas un factor

limitant podria ser la competència per la transferència del T-DNA per part de cada plàsmid. Tanmateix, els resultats de l'assaig amb dos plàsmids en el mateix cultiu d'*Agrobacterium* (G15), en què només es van obtenir plantes que havien integrat un dels dos T-DNA, amb els gens *hpt* i *gfp*, i cap planta amb el segon T-DNA (*hpt* i *uidA*) suggeria que més que la competència entre els dos T-DNA a ser transferits, es tractés probablement del desplaçament d'un dels plàsmids per incompatibilitat dels mateixos.

Els dos vectors introduïts dins la mateixa soca d'*Agrobacterium*, pCAMBIA 1201 i pX2-H (vector també derivat del plàsmid pCAMBIA 5300), diferien en dos gens, el de selecció bacteriana conferint resistència al cloramfenicol i a la kanamicina respectivament, i situat fora de la regió del T-DNA, i pel gen marcador en planta (*uidA* i *gfp* resp.), que es troba dins del DNA de transferència (T-DNA), essent la resta de vector idèntica. En aquest sentit es podia produir una competència pels factors de replicació (comuns a ambdós plàsmids) o pels factors implicats en la transferència dels fragments T-DNA. Tanmateix el possible desplaçament d'un plàsmid per un altre no hauria anul·lat la presència del desafavorit, donat el creixement de la soca bacteriana en presència de dos antibiòtics als que és sensible (cloramfenicol i kanamicina). La resistència als antibiòtics era conferida pels dos plàsmids (pCAMBIA 1201 i pX2-H respectivament).

Tanmateix, per que aquesta estratègia sigui factible, els dos plàsmids han de ser compatibles a compartir la mateixa cèl·lula bacteriana (Daley et al., 1998), essent necessari un equilibri de les dues poblacions de plàsmids de manera que no hi ha hagi desplaçaments que afavoreixin la transferència d'un únic tipus de T-DNA. Probablement el que va succeir degut la competència pels mateixos elements de replicació per part dels dos plàsmids emprats.

Diversos autors que han provat la mateixa estratègia han utilitzat sistemes de plàsmids més adequats per la co-transferència de T-DNAs a una mateixa cèl·lula vegetal com: dos plàsmids que pertanyien a diferents grups d'incompatibilitat, pel que es podien replicar-se i mantenir a la mateixa cèl·lula, amb dos orígens de replicació diferents, dels es va assegurar la presència seleccionant la soca bacteriana LBA 4404 amb 2 antibiòtics, dels que hi havia 10-15 còpies d'un dels plàsmids per 1-2 de l'altre en cada cèl·lula d'*Agrobacterium*, un mesurava 27,2 kb i l'altre 15,4 kb (Daley et al., 1998); o com el grup d'Afolabi (2004), que van utilitzar el sistema de vectors pGreen/pSoup

(Hellens et al., 2000(b), en el que el plàsmid pGreen, que requereix la presència del pSoup per replicar-se en *Agrobacterium*, és portador del gen d'interès, dins del T-DNA, i fora, del gen de selecció bacteriana que mantindrà un equilibri entre els dos plàsmids dins el mateix cultiu; entre d'altres (De Framond et al., 1986).

Tot i que amb els resultats obtinguts en l'assaig amb dos plàsmids en el mateix cultiu d'*Agrobacterium* (G15) no podem treure conclusions, en la literatura, per altra banda, està descrit que la unió d'una sola cèl·lula bacteriana pot transferir i integrar diferents T-DNA durant una única inoculació, possibilitant la co-transformació de dos T-DNA diferents (Ebinuma et al., 2001(a)) i que aquesta estratègia és útil per l'obtenció de plantes transgèniques sense gens de selecció (Afolabi, et al., 2004; DeFramond, et al., 1986; Daley, et al., 1998). Però per evitar la pèrdua o l'aparent desplaçament dels plàsmids en el cultiu d'*Agrobacterium*, descrit en els resultats d'aquest treball, caldria dissenyar l'estratègia considerant l'ús de dos plàsmids portadors de diferents orígens de replicació.

Amb l'estratègia del doble T-DNA, els dos T-DNA s'amplifiquen per igual dins la cèl·lula bacteriana (Ebinuma et al., 2001(a)). La taxa de co-transformació obtinguda en aquest treball utilitzant el plàsmid pX2-HB, portador de dos T-DNA, un amb el gen de selecció *hpt* i el gen marcador *gfp* en un T-DNA, i l'altre amb el gen *bar* va ser del 69,7%, considerablement més efectiva que la transferència a partir de dos cultius diferents. Aquest resultat estan d'acord amb els obtinguts per altres autors que han provat estratègies similars (Depicker et al., 1985; Miller et al., 2002; Xing et al. 2000; Komari et al., 1996; Breitler et al., 2004). Amb l'estratègia de co-transformació, amb el plàsmid portador dels dos T-DNA pX2-HCryIB, assaig R-38, tot i que la taxa de co-transformació va ser lleugerament inferior que amb pX2-HB, 51,85%, es van obtenir línies de plantes d'arròs amb el gen *CryIB* lliures de gens de selecció.

En la co-transformació, els T-DNA poden haver-se integrat genèticament lligats, en el mateix *locus* o *loci* molt propers, o bé poden haver-se integrat independentment, en *loci* genèticament separats, però només si té lloc la darrera opció, avaluant la segregació de caràcters de la següent generació de plantes, resultants d'un encreuament sexual, s'obtidran les plantes amb el gen d'interès i sense el gen de selecció.

L'estudi de segregació de caràcters en la descendència de la planta co-transformada, obtinguda en l'assaig G12, en què es va inocular el call d'arròs amb dos cultius bacterians simultàniament, indicava que s'havien integrat independentment els dos gens marcadors. Tanmateix s'havien integrat almenys dues còpies del gen marcador *gfp* i una del gen marcador *uidA*, de manera que així com es van obtenir plantes que havien segregat pel gen marcador *uidA* (*gfp*+*gus*-), no es van localitzar plantes *gfp*-*gus*+. Així, aquests primers resultats indicaren que l'estratègia de co-transformació podia estar basada en un plantejament senzill sempre i quant s'integri una sola còpia de cada T-DNA, però si s'inserten més còpies dels transgens, encara que segreguin independentment, impliquen una major grandària de poblacions d'individus per avaluar i poder localitzar les plantes amb el fenotip d'interès.

Referent a l'expressió del gen *gfp* de les llavors T1 de G12-29, curiosament es va detectar que moltes llavors que al germinar no expressaven la *gfp* morien abans d'arribar a estadis juvenils. També van morir primerencament 12 de les plantes *gfp*+. Com si s'hagués insertat una còpia del cassette de tal manera en el genoma de l'event G12-29, que la descendència que per recombinació perdés el caràcter en veïes afectada negativament la seva viabilitat. Podria estar relacionat amb reorganitzacions en *locus* transgènics d'estructura complexa.

A l'assaig en què es van clonar dos T-DNA en el mateix plàsmid (G9), a diferència de la resta d'estratègies de co-transformació assajades per *Agrobacterium* en aquest treball, en comptes dels gens marcadors *uidA* i *gfp*, es van utilitzar els gens *gfp* i *bar*, i en comptes d'estar clonats cada gen marcador amb el gen de selecció per planta *hpt*, només ho estava el *gfp*. Així, en l'assaig G9 el gen *bar* figurava com el gen d'interès, per tant no es va utilitzar com a gen de selecció, el call transformat es va seleccionar exclusivament amb higromicina en els medis de cultiu en què regeneraren les plantes. Per tant en el disseny del plàsmid pX2-HB, portador dels dos T-DNA, quedava implícit que l'objectiu de l'assaig era l'obtenció de línies *gfp*-*bar*+. Per altra banda calia obtenir línies *gfp*+*bar*+ pels assaigs de flux genètic a portar a terme durant aquest any 2005.

A partir dels estudis de segregació de caràcters en la generació T1, juntament amb els anàlisis moleculars per Southern, amb els que es van estimar el número de còpies integrades de cada transgen en T0, es va determinar el genotip o patró d'integració més

probable en T0. Així, en 6 de les 22 línies G9 T0 co-transformades (gfp+bar+) va haver segregació de caràcters en la descendència permetent l'obtenció d'almenys un individu T1 amb el fenotip d'interès *gfp-bar+*. Per tant l'estratègia del doble T-DNA va resultar útil per l'obtenció de plantes d'arròs d'una varietat comercial mediterrània sense gen de selecció. Tanmateix només dues de les sis línies segregants presentaven un patró d'integració dels transgens senzill, amb una sola còpia de cada T-DNA i a distàncies genètiques que permetien que s'heretessin independentment en la descendència, G9-21 i G9-23.

Avaluant la segregació de caràcters en la generació T2 de línies G9-21 i G9-23 *gfp-bar+* així com es van localitzar línies homozigòtiques pel gen *bar* (suposat gen d'interès) i sense el gen de selecció per higromicina, objectiu final d'aquesta part de la tesi. A més, avaluant la generació T2 de les plantes T1 *gfp-bar+* de les mateixes línies (G9-21 i G9-23), es van obtenir les llavors pels assaigs de flux, actualment en marxa a l'Estació Experimental del Delta de l'Ebre.

També es va observar que en 15 de les 22 línies co-transformades avaluades hi havia almenys una còpia de cada T-DNA lligades, en tres línies es va silenciar un dels dos gens, en dues es va integrar una sola còpia de cada transgen i de manera independent, i en dues línies no es va arribar a determinar genotip, segurament complex i amb diverses còpies de cada transgen.

En un assaig realitzat gairebé en paral·lel per l'equip del CIRAD, es va transformar una altra varietat mediterrània d'arròs, Ariete, amb el mateix plàsmid pX2-HB (Breitler et al., 2004). Es van obtenir resultats tot i que lleugerament superiors, en la mateixa línia que en l'assaig G9. Tanmateix, en aquest estudi es van analitzar per Southern la integració de seqüències del plàsmid hibridant les membranes amb el DNA amb dues sondes BP1 i BP2, tal com es mostra a la Figura 54.

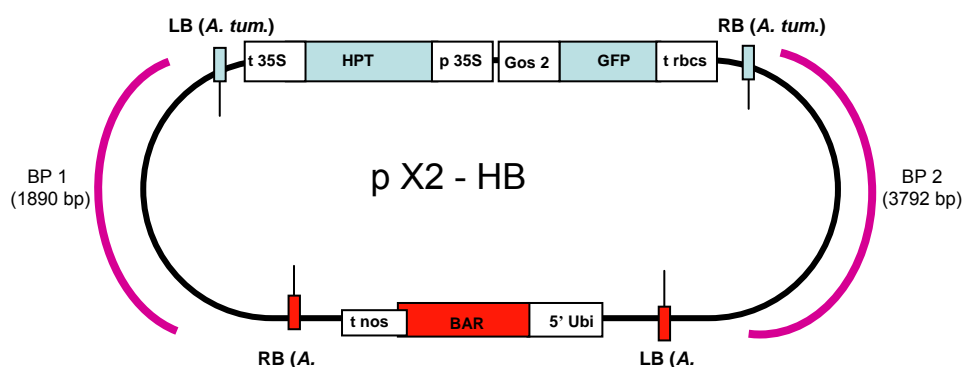


Figura 54. Representació esquemàtica del vector pX2-HB, es mostren les sondes utilitzades per revelar la integració de seqüències del plàsmid fora del T-DNA. BP1 representa la sonda per detectar inserció de plàsmid entre l'extrem dret d'*Agrobacterium rhizogenes* i l'extrem esquerre d'*Agrobacterium tumefaciens*, i BP2 és la sonda que cobreix la seqüència entre l'extrem dret d'*Agrobacterium tumefaciens* i l'esquerre d'*Agrobacterium rhizogenes*.

Hibridant les membranes amb les sondes PB1 i PB2, es va detectar que en un 28,7% de les plantes T0 s'havien integrat seqüències externes del vector, predominantment PB2, fet que suggeria que l'eficiència d'integració de la cadena de T-DNA a l'extrem esquerre d'*Agrobacterium rhizogenes*, mediada per els operons *vir* de la soca EHA 105 *Agrobacterium tumefaciens* era inferior a la de l'extrem esquerre d'*Agrobacterium tumefaciens* del vector binari (Breitler et al., 2004). De fet està descrit que les proteïnes virD1 i virD2 reconeixen les repeticions dels extrems dels T-DNA (borders), i s'uneixen entre la tercera i quarta base del final de cadena de cada extrem o repetició (border), essent aquestes unions les que determinen els llocs d'inici i terminació del T-DNA en els extrems dret i esquerre respectivament (Yanovsky et al., 1986). Així que podria haver un no reconeixement de la seqüència terminadora (tot i que sí s'havia reconegut la seqüència iniciadora).

Per altra banda també s'ha reportat que l'extrem LB pot servir com a lloc d'iniciació per la transferència de DNA, donant lloc a cadenes simples de transferència amb les seqüències del plàsmid externes al T-DNA (Ramanathan et al., 1995; Van der Graaff et al., 1996; Kim et al., 2003). Així, independentment de si el LB d'*Agrobacterium rhizogenes* fos mediat per operons *vir* propis o de l'altra espècie d'*Agrobacterium*, l'eficiència de l'extrem esquerra com a terminador de la transferència de T-DNA ja s'ha discutit per altres autors. Les seqüències del plàsmid que queden per

fora del T-DNA s'han trobat freqüentment integrades en el genoma hoste de plantes transgèniques (Cluster et al., 1996; Kononov et al., 1997; Wenck et al., 1997; Wolters et al., 1998; De Buck et al., 2000), amb proporcions que oscil·len entre el 15 i el 75% de les plantes transgèniques obtingudes en cada assaig. Prèviament s'havia suggerit que, durant el procés d'infecció per *Agrobacterium*, es produeixen cadenes simples de T-DNA entre les seqüències flanquejants dreta i esquerra (RB i LB), protegides per xaperones i conduïdes pels productes dels gens *vir* cap al nucli de les cèl·lules vegetals, on s'integren al genoma per recombinació no homòloga o il·legítima (Tinland et al., 1994).

També s'ha descrit que així com en qualsevol *locus* amb T-DNA l'extrem dret flanquejant (RB) es conserva de manera precisa, l'extrem esquerre no es comporta així (De Buck et al., 1999). El disseny del doble extrem dret (DRB) de l'equip de Lu (2001), es basa en l'assumpció que es poden generar dos tipus d'insert a partir de la construcció RB1::hpt::RB2::bar::LB, la que va de RB1 a LB i la que va de RB2 a LB. Basant-se en què si LB pot funcionar com a iniciador de síntesi de transferència de cadena-T (Horsch et al., 1986), RB2 pot funcionar com a punt terminador. Aquests autors van obtenir plantes d'arròs que havien integrat independentment els dos tipus d'inserts (RB1::hpt::RB2::bar::LB i RB2::bar::LB) validant aquesta estratègia (Lu et al., 2001).

Breitler i col·laboradors (2004), també van trobar que entre un 10,3 i un 16,6 % de les plantes havien integrat les dues seqüències (BP1 i BP2), suggerint la integració del plàsmid sencer o lectures independents de l'extrem LB en els dos T-DNA. Ambdós fenòmens ja estaven descrits; l'equip de Ooms (1982) i el d'Ursic (1983), per exemple ja havien observat que sovint es trobaven seqüències més enllà del LB en teixits agroinfectats, i d'altres autors també han descrit insercions del plàsmid sencer (De Buck et al., 2000; Kim et al., 2003).

En l'avaluació de descendències, Breitler i col·laboradors (2004) van desestimar les línies de transformació que haguessin integrat seqüències dels vectors (fora dels T-DNA) donat que podien reflectir-se en lligament dels dos T-DNA i que impossibilitaria la separació de transgens en la descendència. Tanmateix, en el nostre cas, en dinou de les vint-i-cinc plantes T0 de les que van determinar el genotip per estudis de segregació i avaluacions moleculars, hi havia lligament entre còpies de T-DNA, i en deu d'elles

almenys una còpia de cadascun dels dos T-DNA estaven lligades. Per tant, només una part dels casos de lligament observats en l'assaig G9 es podrien explicar per inserció del plàsmid sencer o per la integració de seqüències dels vectors entre els extrems RB (*A. rhizogenes*) i LB (*A. tumefaciens*), o RB (*A. tumefaciens*) i LB (*A. rhizogenes*).

Diversos autors afirmen haver obtingut més plantes en què s'haguessin integrat lligats els dos T-DNA amb l'estratègia de co-transformació amb el plàsmid portador dels dos T-DNA, que quan es van utilitzar diferents plàsmids portadors dels T-DNA (Goldsbrough, 2001) Però fins i tot amb l'estratègia en què s'inocula el material vegetal amb dos cultius d'*Agrobacterium*, en què aparentment es pot pensar que s'afavoriria la integració separada en el genoma hoste dels dos T-DNA es descriuen freqüents casos de lligament entre els dos T-DNA (Gelvin, 2003). Així, el fenomen de lligació de transgens en el genoma hoste és molt comú, està àmpliament descrit per molts autors i limita la segregació independent de caràcters.

Està descrit en la literatura que és abans de la inserció del T-DNA al genoma hoste que es formen complexes integratius en què s'uneixen els diferents gens i així s'integren en *loci* molt propers. Es formen estructures complexes de T-DNA, per processos semblants a la conjugació entre plàsmids, en què s'uneixen diverses cadenes T, una darrera l'altra o invertides, podent ser d'un tipus de T-DNA o de dos si es transforma amb dos T-DNA diferents (De Neve et al., 1997). En aquest sentit, un decalatge de temps entre dues inoculacions podria permetre l'estabilització de material extra-cromosòmic d'una primera infecció, alhora que podria afavorir la integració del segon T-DNA en un *locus* genèticament independent del primer. Lamentablement no es van obtenir plantes als assaigs amb decalatge de temps entre les agroinfeccions, probablement per mecanismes de defensa que inhabilitaren una immediata reinfecció

El tipus de soca d'*Agrobacterium* també té una gran influència en l'organització dels transgens durant la transformació genètica (Jones et al., 1987; Jorgensen et al., 1987; De Block et al., 1991). Així, les soques d'*Agrobacterium* tipus nopalina afavoririen la inserció lligada dels T-DNA, mentre que les tipus octopina afavoreixen la inserció independent. Es descriuen taxes per sota del 25% de segregació utilitzant tipus nopalina (De Block et al., 1991) i per sobre del 50% inoculant amb soques tipus octopina (Komari et al., 1996; Daley et al., 1998; Miller et al., 2002). Contràriament, el grup de De Neve (1997) va obtenir almenys una còpia lligada de cada T-DNA en un

72% de les plantes co-transformades utilitzant soques bacterianes del tipus octopines. En el present treball es va utilitzar en gairebé tots els assaigs de transformació la soca EHA 105 d'*Agrobacterium tumefaciens*, derivada de la soca EHA 101 (Hood et al., 1993) que és del tipus succinamanopina amb un fons cromosòmic C58, idèntic al de les soques tipus nopalina. I es va utilitzar la soca LBA 4404, tipus octopina pels assaigs en què s'introduïren dos plàsmids en una mateixa cultiu bacterià. Donat que amb aquest darrer assaig no es van obtenir plantes co-transformades no es poden establir diferències entre uns i altres tipus de soques bacterianes utilitzades per la transformació genètica.

Ebinuma i col·laboradors (2001(a)) suggeriren que si es baixava el número de T-DNA a transferir, es baixaria la probabilitat de co-integració en el mateix *locus*, però també baixaria l'eficiència de transformació.

Tot i que a la literatura es descriuen freqüències de co-transformació al voltant del 50%, tant per transformació per *Agrobacterium* com per biolística, en la transferència directe de DNA ocorre amb més freqüència la integració dels dos T-DNA en *loci* genèticament lligats (Hiei et al., 1997; Puchta, 2003(a)). Molts investigadors han abandonat aquesta tècnica degut a la tendència de patrons d'integració de DNA complexes, amb múltiples còpies, que poden causar fenòmens de silenciament. Alguns laboratoris han resolt aquest inconvenient reduint la quantitat de DNA carregat a les micropartícules o bé usant cassettes de DNA lineals (Fu et al., 2000).

Amb tot la biolística pot oferir altres avantatges, com l'ús de cassettes d'expressió lineals (anomenada tecnologia de gens neta) eliminant la possibilitat d'integració de seqüències externes al T-DNA com pot passar utilitzant plàsmids sencers o inclòs per *Agrobacterium* (Fu et al., 2000). En aquest sentit es van dissenyar tres assaigs de co-transformació en què es van aïllar dos cassettes lineals de DNA, concretament van ser dos T-DNA (un amb el gen *gfp* i l'altre amb el *hpt* de selecció). De la mateixa manera que en G1, G2 i G3, en els assaigs per biolística es dispararen els dos T-DNA simultàniament així com amb decalatge de temps (2 i 5 dies), en pro d'afavorir la integració en *loci* independent els diferents T-DNA.

Els resultats dels assaigs per biolística, si bé no va regenerar cap planta co-transformada indicaren la viabilitat de disparar amb cassettes lineals de DNA ja que es van localitzar diferents zones del call fluorescents. No haver obtingut plantes co-

transformades en aquests assaigs podria atribuir-se a diverses raons referents al DNA amb el que es van portar a terme els disparats així com al call sobre el qual es va disparar.

Per una banda es podia pensar que a l'haver treballat amb concentracions de DNA per sota de les habituals, podia haver estat causa suficient per no haver obtingut plantes transformades. Per la transformació per biolística amb plàsmids sencers al nostre laboratori normalment s'utilitzen quantitats de DNA plasmídic de l'ordre de 5 µg de DNA per dispar. En aquests experiments amb T-DNA lineals es van utilitzar quantitats de 2-4 µg de DNA per dispar. Es va pensar en utilitzar una quantitat menor de DNA ja que quan es transforma per un plàsmid sencer (pCAMBIA aproximadament 12Kb) sols una part d'aquest DNA correspon a la regió T-DNA (cassette CaMV35S:gfp:nos, 1,7 Kb; cassette CaMV35S:hpt:nos, 2,5Kb). Però el fet d'haver observat calls que expressaven el gen *gfp* va constatar que haver treballat a una concentració per sota de l'establerta podia haver afectat la taxa de transformació, però no la va anul·lar.

Per altra banda haver vist punts fluorescents en els tres assaigs de bombardeig de cassettes de T-DNA lineals, va provar la funcionalitat del cassette portador del gen *gfp*. En canvi es podria contemplar una possible no funcionalitat del cassette CaMV35S:hpt:nos. De no ser funcional el cassette portador del gen de selecció, s'hauria d'acceptar la hipòtesi del mosaicisme del call transformat en què podrien regenerar brots no transformats en medis selectius (De Buck et al., 1998) per justificar les plantes de l'assaig en què es van disparar simultàniament els dos T-DNA aïllats (G6) que van regenerar (i eren *gfp*-). Tanmateix s'hauria d'haver comprovat la inserció del gen *hpt* per altres tècniques com la reacció en cadena de la polimerasa en aquestes plantes.

Si es comparaven les mides dels cassettes amb els que es va disparar, el fragment portador del gen *hpt* era 500 bp més gran que el del gen *gfp*, però la distància entre els extrems dels cassettes i el final dels fragments era exactament la mateixa, es tractava de cassettes clonats en el mateix vector i amplificats amb els mateixos primers. La poca diferència en grandària entre els dos cassettes no semblava justificar la diferència de funcionalitat dels dos. La possible no funcionalitat del cassette portador del gen de selecció, CaMV35S:hpt:nos quedaria pendent de demostrar.

De la mateixa manera es podrien formular hipòtesis referents a la viabilitat del call sobre el qual es va disparar. Per una banda els calls dels assaigs amb decalatge de temps

entre els dispars per biolística (G7 i G8) van estar sotmesos a unes condicions osmòtiques donades pel medi N6_{canó} durant 72 i 144 hores respectivament, temps considerablement superiors a les 24 hores que hi va estar el call de l'assaig en què es dispararen simultàniament les partícules (G6). La diferència en la composició del medi N6_{canó} rau en què aquest porta sorbitol i manitol que canvia les condicions osmòtiques de les cèl·lules afavorint la retracció del contingut cel·lular reduint els danys causats pels impactes de les micropartícules.

Una de les hipòtesis que es podrien formular seria que passades certes hores en el medi N6_{canó}, el call podria patir una notable davallada en la seva viabilitat per regenerar. La inicial protecció organular de les cèl·lules del call podria a la llarga comprometre la pròpia divisió cel·lular. Per altra banda, caldria considerar que així com en l'assaig en què es dispararen els dos T-DNA conjuntament (G6) les cèl·lules del call d'arròs rebien un total de dos dispars, els assaigs en què va haver decalatge entre dispars (G7 i G8) rebien el doble d'impactes de micropartícules, augmentant greument la probabilitat de trencament d'òrgànuls cel·lulars impossibilitant la regeneració de call a planta.

Donada la possible validesa de les hipòtesis fins ara citades, es podria plantejar un nou disseny dels assaigs variant algun paràmetre com: no deixar més de 24 hores el call en contacte amb el medi N6_{canó}, de manera que el call dels assaigs amb decalatge (G7 i G8) hauria de ser transferit a un altre medi, segurament de creixement (N6) sense selecció a no ser que es disparés primer amb el cassette del gen *hpt*, abans de tornar a ser disparat, de nou en medi N6_{canó}. Tampoc es poden comparar assaigs que reben la meitat d'impactes de microprojectils l'un que l'altre, de manera que si es fessin els assaigs de nou, cada placa rebria la mateixa quantitat de dispars, dos en total enlloc de quatre.

Pel fet de comprovar la viabilitat d'almenys un dels dos T-DNA disparats al call fa que no es desestimi aquesta estratègia en l'obtenció de plantes transgèniques lliures de gens de selecció. Tanmateix caldria localitzar-ne les mancances per optimitzar-la. Ja que com en qualsevol mètode de transformació vegetal, cal optimitzar diversos paràmetres per maximitzar l'efectivitat del mètode. En el nostre laboratori s'han optimitzat o ajustat moltes d'aquestes condicions de manera que la biolística resulta una eina útil per la transformació de varietats mediterrànies d'arròs, moltes plantes o línies d'interès en altres treballs han estat obtingudes per aquesta tècnica. Tanmateix, és

possible que diversos factors hagin estat involucrats en els resultats d'aquests assaigs de co-transformació, potser deguts a canvis en alguns dels paràmetres que hagin afectat negativament el call o la seva regeneració. La relació de paràmetres implicats amb la biolística es poden dividir en tres grups, físics, biològics i ambientals. Els físics inclouen aspectes com la composició i mida de les partícules, la unió del DNA a elles, i tota una sèrie paràmetres instrumentals. En els paràmetres biològics cal atendre diferents aspectes com la construcció gènica, en forma circular, lineal, o en forma de cassette d'expressió (promotor-gen-terminador); el tipus de teixit i la mida cel·lular, l'edat del cultiu cel·lular, l'estat mitòtic i l'estat general de la cèl·lula, la tolerància del teixit al buit, la densitat cel·lular i la pressió de turgència de la cèl·lula. Tot això en compatibilitat a la regeneració per obtenir plantes senceres. I, en els paràmetres ambientals cal citar una sèrie de factors que poden comprometre la viabilitat de la tècnica en el moment de fer-la servir com la temperatura, la humitat, la intensitat, qualitat i durada de llum (McCabe et al., 1993).

En una revisió de setze treballs publicats sobre la co-transformació a partir de mètodes de transferència directe, en els que es va treballar amb deu espècies diferents (tabac, petúnia, *Arabidopsis*, blat de moro, arròs, colza, ordi, pèsol i blat) les freqüències de co-transformació oscil·laven entre 18-100% (Goldsbrough, 2001). En la majoria dels casos se situava per sobre del 50% de co-transformació. En canvi, només cinc dels setze treballs van exposar dades de segregació, i només en un d'ells hi va haver segregació de caràcters. Herve i col·laboradors (1993), va obtenir segregació independent entre el gen de selecció i el gen d'interès en almenys dos dels 13 co-transformants T0 que tenia de colza generats per electroporació de protoplasts. En la resta de casos la co-transformació de DNA es va veure co-segregada entre la progènie de tots els transformants analitzats. El propi autor va obtenir dades similars, analitzant més d'un centenar de línies de blat transformades per co-bombardeig amb dos plàsmids van obtenir un 85% de co-transformació. Però només una de les 20 línies avaluades en T1 va ser segregant independent pels dos caràcters, resultant amb una eficiència global de co-transformació del 5% (Goldsbrough, 2001) Tot i que resulta difícil treure grans conclusions amb tant poques experiències referides, els resultats per ara, dirien que o tendrien a indicar que els mètodes habituals amb els que es transfereix directament el DNA al genoma hoste, no són viables per una eficient obtenció de plantes transgèniques

lliures de gens de selecció, donat l'elevat grau de co-integració de les seqüències co-transformants. (Goldsbrough, 2001).

El producte de la taxa de co-transformació per la freqüència observada de segregació independent de la progenie és un indicador de l'eficiència global de la co-transformació per l'obtenció de plantes transgèniques lliures de gens de selecció. En aquest sentit, per exemple en el treball de Daley et al., 1998, l'eficiència global seria aproximadament del 25%. Komari et al., 1996 van obtenir dades molt similars tant en tabac com en arròs i tant usant un plàsmid superbinari amb 2 T-DNA com 2 soques d'*Agrobacterium*. Una eficiència global del 25% requeriria de producció de 4 vegades més de primers transformants (T0) per aconseguir un número equivalent de transformants potencialment útils que serien requerits si l'objectiu no fos obtenir plantes transgèniques lliures de gens de selecció (Goldsbrough, 2001).

Sovint es descriu que la limitació inherent de la co-transformació és que la separació dels transgens no lligats només pot ocórrer a la descendència. En l'arròs, donat que aquest es dispersa de forma natural per llavors aquest fet no és limitant. En espècies que normalment es propaguen vegetativament, l'estratègia de co-transformació caldria portar-la a terme en els parentals, abans d'una possible fixació varietal. En canvi, des del punt de vista pràctic, la co-transformació no seria l'estratègia més aplicable a la producció d'arbres transgènics, donats els llargs períodes entre generacions (Puchta, 2003(a)).

És necessari conèixer el procés d'integració del T-DNA en el genoma hoste per evitar el lligament així com la integració de múltiples còpies dels transgens, fenòmens correntment descrits en qualsevol de les estratègies de transformació genètica. És evident que aquest fet limita en gran part l'eficiència de la co-transformació per l'obtenció de plantes transgèniques lliures de gens de selecció.

En aquest sentit, la biotecnologia s'ha centrat en la millora i el desenvolupament d'eines, amb dos objectius principals, la integració dirigida de seqüències a qualsevol punt definit del genoma hoste (gene targeting) i l'eliminació de seqüències específiques del genoma vegetal que, com els gens de selecció, són dispensables més enllà del procés de transformació. Tot i que s'han realitzat diferents temptatives per establir estratègies

generals i eficients per dirigir la integració del DNA forani, en plantes encara no s'ha assolit aquest objectiu (Kumar et al., 2001; Puchta, 2002, 2003(a); Hohn et al., 2003).

Per altra banda el punt d'inserció del transgen podria jugar un paper molt important en la determinació de les característiques d'estabilitat i expressió del gen introduït. Seria bo saber la localització del transgen dins del genoma hoste. La hibridació fluorescent *in situ* (FISH), és una tècnica que permet la localització dels transgens tant en cromosomes com en regions cromosòmiques específiques. S'han publicat molts treballs en els que s'ha utilitzat la FISH en un ample rang d'espècies com petúnia (Ten Hoopen et al., 1996), tabac (Iglesias et al., 1997), arròs (Dong et al., 2001), fava (Snowdon et al., 2001), ordi (Pedersen et al., 1997; Salvo-Garrido et al., 2001; Choi et al., 2002), blat, (Pedersen et al., 1997; Abranches et al., 2000; Bourdon et al., 2002), civada (Pedersen et al., 1997) i avena (Leggett et al., 2000; Svitashv et al., 2000). Aquesta tècnica es podria utilitzar per identificar plantes homozigòtiques en estadis molt primerencs (Bourdon et al., 2002), i junt amb el mapatge i tantes altres tècniques moleculars es podria conèixer el procés d'integració del transgen al genoma hoste.

A fi que la tecnologia transgènica sigui profitosa els transgens han de tenir una expressió predeïble i estable. Uns controls intensius, que apugen els costos de producció, no és garantia de que un tret aparentment estable romangui estable al llarg de subseqüents generacions (Finnegan et al., 1994) sota condicions ambientals (Meyer et al., 1992). En aquest sentit hi ha tecnologies que podrien millorar la nostra capacitat de creació de plantes transgèniques amb característiques d'expressió controlades. Una d'aquestes tecnologies són les MARs, seqüències de DNA que s'uneixen especialment a una xarxa de fibres proteiques, anomenada matriu nuclear, que permeten el nucli. Aquestes interaccions MAR-matriu es creu que organitzen la cromatina en unes sèries de dominis independents en llaç. Diversos laboratoris han trobat que les MARs augmenten i estableixen l'expressió dels transgens (en certa manera). Aquestes característiques fan dels MARs eines prometedores per controlar l'expressió transgènica (Allen et al., 2000)

La biotecnologia agrícola moderna es troba fortament lligada a l'ús d'*Agrobacterium* per crear plantes transgèniques, i és difícil pensar una àrea de la recerca vegetal que no s'hagi beneficiat d'aquesta tecnologia. Per ampliar el rang

d'hostes i millorar l'eficiència de transformació d'*Agrobacterium* caldria superar alguns del reptes que romanen com: I) L'ús d'*Agrobacterium* per recombinació homòloga o de lloc-directe. II) L'expressió estable en plantes. III) Saber més sobre genoma *Agrobacterium* per desenvolupar nous mètodes que permetin la transformació de varietats o espècies que fins ara esdevenen recalcitrants.

Fins que aquests reptes no quedin resolts, i no es pugui controlar la inserció del T-DNA al genoma hoste, l'estratègia de la co-transformació amb un plàsmid portador de dos T-DNA ha demostrat ser la més adequada per l'obtenció de línies transgèniques d'arròs portadores únicament del gen d'interès i lliures del gen de selecció. Així es van obtenir línies d'arròs (Sénia) amb el gen *CryIB* sense gen de selecció. També es van obtenir les línies de l'assaig de flux de la campanya d'enguany.

Treballs anteriors han demostrat que l'expressió del gen *CryIB* en plantes transgèniques d'arròs, sigui mitjançant expressió constitutiva o expressió regulada per promotors induïbles, confereix protecció a les plantes d'arròs enfront a l'atac del barrinador, l'insecte *Chilo suppressalis*. Aquesta protecció ha estat demostrada no sols en condicions d'hivernacle sinó també en condicions de camp. En principi, aquesta estratègia de co-transformació amb un plàsmid portador de dos T-DNA podrà aplicar-se a l'obtenció de noves línies transgèniques portadores d'altres gens d'interès (gens que codifiquen per altres proteïnes insecticides, fungicides, etc.).

2. SOBRE L'AVALUACIÓ DEL FLUX DE GENS

El disseny que es va escollir per a fer aquest assaig era una combinació dels dissenys utilitzats en assaigs anteriors, ja que cadascun d'elles presentava certs avantatges e inconvenients. Així el disseny utilitzat amb la varietat Thaibonet (Messeguer et al., 2001), en que hi havia un nucli de plantes transgèniques en el centre dels cercles va permetre, d'una manera molt clara, determinar el flux genètic cap a la mateixa varietat, l'efecte del vent dominant de la zona en la pol·linització creuada i la disminució del flux al augmentar la distància. Així però, en aquest assaig no es podia avaluar el flux entre plantes adjacents. En el segon assaig (Messeguer et al., 2004) el disseny va permetre avaluar el flux entre les plantes transgèniques i l'arròs salvatge situades a tocar (tal i com es troben normalment en el camp) ja que estaven situades en cercles concèntrics adjacents. Així però, el disseny era menys adequat per determinar, en el cas de l'arròs salvatge, l'efecte del vent i la variació de la taxa de flux amb la distància ja que les plantes d'arròs salvatge solament estaven situades adjacentment a les transgèniques. En aquest assaig, el fet de situar plantes d'arròs salvatge tant en el centre (adjacents a les transgèniques) com en els diferents cercles ha permès avaluar la taxa de flux tant a dins del camp com a diferents distàncies. Per altra banda, al situar els cercles complets amb plantes no transgèniques ha permès confirmar les dades obtingudes en els assaigs anteriors.

La influència del vent en la pol·linització creuada és força clara, tant en el cas de l'arròs salvatge com en el cas de Sénia . El vent de la direcció SE és el vent predominant de la zona a l'estiu, durant les hores del migdia/tarda. Aquest vent, anomenat "Vent de Baix" es produeix pel diferent escalfament de la terra i del mar i és bastant constant a la zona, degut a la particular orografia del Delta de l'Ebre.

S'ha descrit que durant l'antesi de l'arròs, les espiguetes s'obren de bon matí i es tanquen cap a les 11 (Khush, 1993). Això depèn de la climatologia i de la varietat. Quan es tanquen les flors, les anteres romanen fora. Donat que durant el matí no hi ha cap vent dominant i que el Vent de Baix es produeix al migdia/tarda, es pot deduir que la pol·linització creuada detectada és deguda als grans de pol·len que han quedat a les anteres i que es desprenen per acció del vent. Tenint en compte que la viabilitat del pol·len d'arròs es força baixa (uns quants minuts segons Khush, 1993) i que el pol·len

de l'arròs és relativament pesat, es lògic obtenir unes taxes de pol·linització creuada relativament baixes i que disminueixin ràpidament amb la distància. El fet de que a 10 m ja no es detecti el flux, ni tan sols en la direcció del vent dominant, reforça la idea de que unes distàncies mínimes de seguretat entre camps transgènics i no transgènics o bé una petita barrera d'una línia de canyes o blat de moro per exemple, serien unes mesures suficients per assegurar la coexistència no solament entre els camps transgènics i els convencionals si no també amb els camps ecològics on, segons la normativa que regula la producció ecològica, no s'admet la presència adventiva d'OGMs.

De tota manera, al nostre laboratori tenim previst realitzar un assaig de camp, de dimensions més assimilables a les d'un camp comercial, per veure fins a quin punt els resultats obtinguts en aquests assaig i en els anteriors són extrapol·lables als camps cultivats i poder confirmar aquesta hipòtesi. Les línies transgèniques bar i gfp-bar obtingudes en l'assaig G9 descrit a l'apartat 1.3 de resultats d'aquesta tesi són les que juntament amb la línia S 1B es faran servir en aquest assaig.

La pol·linització creuada detectada cap a l'arròs salvatge en el nucli central, on es simulen les condicions reals de camp (ja que l'arròs salvatge creix entremig de l'arròs cultivat) és menor que la que varen trobar altres autors (Langevin et al., 1990; Wheeler et al. 2000). Langevin i col·laboradors (1990) varen descriure diferents taxes de pol·linització creuada depenent de la varietat i del tipus d'arròs salvatge. En el nostre cas, encara que l'arròs salvatge emprat en aquest assaig era molt similar morfològicament a la varietat Sénia, era uns 20 cm més alt i considerant que el pol·len de l'arròs és relativament pesat, és més fàcil que el pol·len caigui i no que, encara que sigui per l'efecte del vent, ascendeixi fins arribar a les flors de l'arròs salvatge. Els resultats preliminars que tenim al nostre laboratori sobre l'avaluació del flux revers confirmen aquesta hipòtesi. Així, anomenem flux revers el que té lloc mitjançant la pol·linització creuada de pol·len d'arròs salvatge cap a les plantes transgèniques. Mitjançant l'anàlisi de les descendències de les plantes transgèniques de l'assaig del any 2000, vàrem detectar una taxa de flux revers del 0.45% superior a la del 0.15% detectada en aquest assaig.

La disminució del flux de gens cap a l'arròs salvatge en funció de la distància apunta al fet de que les mateixes estratègies per controlar el flux cap a camps veïns podrien ser útils per controlar el flux cap a l'arròs salvatge situat als marges dels camins

o bé les que creixin en camps veïns. Així però, si en un camp transgènic hi ha arròs salvatge, els nostres resultats demostren que hi haurà una certa taxa d'encreuament. L'impacte ecològic que pugui tenir dependrà del gen concret que s'hagi incorporat i també, del grau d'introgressió real que es doni en condicions de camp. Cal tenir en compte que fins ara, no hi ha dades experimentals que demostrin que realment hi ha una introgressió dels transgens en l'arròs salvatge, encara que les dades obtingudes per altres autors (Langevin et al 1990; Cho et al. 1995; Suh et al. 1997; Bres Patry et al 2002) treballant amb arròs no transgènic, apunten en aquesta direcció. Per altra banda, donat que l'arròs salvatge és una mala herba, existeixen tota una sèrie d'estratègies agronòmiques orientades a combatre-la.

Així doncs, per tal de determinar el grau d'introgressió dels transgens en l'arròs salvatge, en funció de diferents estratègies agronòmiques per combatre'l, l'any passat es va iniciar un assaig de camp de tres anys de durada. Les línies transgèniques bar i gfp-bar obtingudes en l'assaig G9 descrit a l'apartat 1.3 de resultats d'aquesta tesi són les que juntament amb la línia S 1B es faran servir en aquest assaig.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. SOBRE L'ELIMINACIÓ DE GENS DE SELECCIÓ

1.1- La co-transformació és una estratègia viable per l'obtenció de plantes transgèniques d'arròs lliures de gens de selecció.

1.2- L'eficiència de les tècniques de co-transformació depèn per una banda de la correcta inserció dels dos transgens i per altra de la taxa de segregació que es pugui donar en la descendència.

1.3- Les diferents estratègies estudiades han donat resultats molt dispars. En l'estratègia en què es van inocular els calls simultàniament amb dos cultius d'*Agrobacterium* cadascun portador d'un plàsmid diferent, tot i que la taxa de co-transformació va ser baixa, va ser possible la segregació de caràcters en la descendència. En canvi, quan la inoculació dels dos cultius tenia lloc en diferents temps no s'obtingueren events co-transformats, suggerint que altres fenòmens, possiblement relacionats amb els mecanismes de defensa, bloquejaven la integració d'un segon T-DNA. L'estratègia en què es van introduir els dos tipus de plàsmids (cadascun portador d'un T-DNA amb un gen marcador diferent) en el mateix cultiu d'*Agrobacterium*, no es van obtenir els resultats esperats possiblement pel desplaçament d'un dels dos plàsmids per incompatibilitat.

1.4- En canvi, amb l'estratègia de co-transformació amb el plàsmid portador de dos T-DNA es van obtenir plantes T0 co-transformades que per segregació de caràcters es van obtenir en la descendència línies que havien incorporat un o l'altre gen.

1.5- La identificació d'aquells casos en què a més va haver integració neta dels dos T-DNA (còpies úniques i integrades independentment), es van obtenir també les línies homozigòtiques pels dos caràcters (gfp+bar+) i línies bar+ que permetran portar a terme els assaigs de flux de gens en camp d'arròs durant la campanya d'enguany.

1.6- L'obtenció de línies homozigòtiques resistents al barrinador (*Chilo suppressalis*) sense que hagin incorporat el gen de selecció confirma la eficiència d'aquesta estratègia.

1.7- En les estratègies basades en l'ús de cassetes lineals en biolística en comptes dels plàsmids sencers, tot i no haver obtingut els resultats desitjats, es va demostrar la funcionalitat d'almenys un dels dos transgens. Per tant, caldria ajustar altres paràmetres a fi d'obtenir bons resultats amb aquesta estratègia.

1.8- Així doncs, malgrat és possible aconseguir línies transgèniques que solament tinguin integrat el gen d'interès cal un major coneixement de processos clau com la integració del DNA extern en el DNA hoste per poder controlar la integració única i localitzada del transgen. Mentrestant, les noves tecnologies i les cada cop més acurades tècniques de genètica molecular avancen per permetre la caracterització primerenca abans d'iniciar el procés de regeneració del teixit per obtenir taxes de co-transformació i segregació més òptimes.

2. SOBRE L'AVALUACIÓ DEL FLUX DE GENS

2.1- Com a conclusió d'aquest treball podem dir que els resultat obtinguts, juntament amb les característiques particulars de les varietats d'arròs com són l'auto-polinització, el procés de fertilització i la viabilitat del pol·len, suggereixen que la coexistència és possible entre cultius OGMs, tradicionals i ecològics d'arròs. Així, una distància de seguretat petita (10 m com a màxim) ja podria ser més que suficient per garantir que la presència adventiva d'OGMs fos pràcticament indetectable i per descomptat, per sota del llindar del 0.9% establert en la normativa de traçabilitat i etiquetatge de la UE.

2.2- Nogensmenys, en el cas de l'arròs salvatge les mesures de coexistència hauran d'incloure, molt probablement, alguna estratègia que permeti minimitzar la presència d'aquesta mala herba als camps cultivats d'arròs.

BIBLIOGRAFIA

- * **Abdullah, R., Thompson, J., Khush, GS., Kaushik, RP, Cocking, EC.** 1989. Protoclonal variation in the set progeny of plants regenerated from rice protoplasts. *Plant Sci* 65: 97-101

- * **Abranches, R., Santos, AP., Weger, E., et al.** 2000. Widely separated multiple transgene integration sites in wheat chromosomes are brought together at interphase. *Plant J.* 24:713-723

- * **Adams, WT. and Birkes, DS.** 1990. Estimating mating patterns in forest trees populations, in *Biochemical Markers in the Populations Genetics of Forest Trees*. S.P.B. Academic Publishing, the Hague, the Netherlands, pp 157-172

- * **Afolabi, A.S., Worland, B., Snape, J.W. and Vain, P.** 2004. A large-scale study of rice plants transformed with different T-DNA provides new insights into locus composition and T-DNA linkage configurations. *Theor. Appl Genet.* 109 (4):815-826

- * **Ahlandsberg, S., Sathish, P., Sun, C. and Jansson, C.** 1999. Green fluorescent protein as a reporter system in the transformation of barley cultivars. *Physiol. Plant.* 107: 194–200

- * **Allen, GC., Spiker, S. and Thompson, WF.** 2000. Use of Matrix Attachment Regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Mol. Biol.* 43:361-376

- * **Arraudeau, M.** 1998. *Le riz irrigué. Le technicien d'agriculture tropicale.* Edition Maisonneuve et Larose 1, pp321

- * **Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. i Struhl K** (Eds). 1998. *Current protocols in Molecular Biology.* Vol I, II & III. John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y.

- * **Ayres, N.M. and Park W.D.** 1994. Genetic transformation of rice. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 219-239

- * **Aziz, N., Machray, GC.** 2003. Efficient male germ line transformation for transgenic tobacco production without selection. *Plant Mol. Biol.* 23:203-211
- * **Baker, B., Zambryski, P. C., Staskawicz, B., and Dinesh-Kumar, S. P.** 1997. Signaling in plant microbe interactions. *Science* 276:726-733.
- * **Bennett, M., Livesey, C. T, Nathwani, D., Reeves, D. S., Saunders, J. R and Wise, R.** 2004. An assessment of the risks associated with the use of antibiotic resistance genes in genetically modified plants: report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 53: 418-431
- * **Bevan, MW., Flavell, RB. and Chilton, MD.** 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304: 184-187
- * **Block, M.** 1990. Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. *Plant phys* 93(3):1110-1116.
- * **Bourdon, V., Ladbroke, Z., Wickham, A., Lonsdale, D. And Harwood, WA.** 2002. Homozigous transgenic wheat plants with increased luciferase activity do not maintain their high level of expression in the next generation. *Plant Sci.* 163:297-305
- * **Breitler, JC, Marfà, V., Royer, M., Meynard, D., Vassal, JM., Vercambre, B., Frutos, R., Messeguer, J., Gabarra, R. and Guiderdoni, E.** 2000. Expression of *Bacillus thuringiensis* cry1B synthetic gene protects Mediterranean rice against the striped stem borer. *Plant Cell Rep.* 19: 1195-1202
- * **Breitler J.-C., Cordero M.-J., Royer M., Meynard D., San Segundo B., Guiderdoni E.,** 2001. The -689/+197 region of the maize protease inhibitor gene directs high level, wound inducible expression of the cry1B gene which protects transgenic rice plants from stemborer attack. *Molecular Breeding* 7, 259-274.
- * **Breitler, JC, Meynard, D., Boxtel, JV., Royer, M., Bonnot, F., Cambillau, L. and Guiderdoni, E.** 2004. A novel two T-DNA binary vector allows efficient generation of marker-free transgenic plants in three elite cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) *Transgenic Research* 13: 271-287

- * **Bres-Patry, C., Lorieux, M., Clément, G., Bangratz, M., Ghesquière, A.** 2001. Heredity and genetic mapping of domestication-related traits in a temperate japonica weedy rice. *Theor Appl Genet*, 102: 118-126
- * **Bres-Patry, C., Bangratz, M., Ghesquière, M.** 2002. Genetic diversity and population dynamics of weedy rice in France. In *Proc. EuroRice 2001 Symposium*, Cirad, Ird, KSAU, 3-8 September 2001, Krasnodar, Russia, pp 153-162
- * **Broothaerts, W., Mitchell, HJ., Weir, B., Kaines, S., Smith, LMA., Yang, W., Mayer, J., Roa- Rodriguez, C. and Jefferson, R.** 2005. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature*, 433:629-633
- * **Brown, FB.** 1957. Natural cross-pollination in rice in Malaya. *Malay Agric J* 40: 264-67
- * **Chakraborty, S., Chakraborty, N. and Datta, A.** 2000. Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypocondriacus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3724-3729
- * **Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. and Prasher, D.** 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805
- * **Chan, M.T., Chang, H.H., Ho, S.L., Tong, W.F. and Yu, S.M.** 1993. *Agrobacterium tumefaciens* production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promotor/ beta-glucoronidase gene. *Plant Mol. Biol.* 22:491-506
- * **Cho, YC., Chung, TY., Suh, HS.** 1995. Genetic characteristics of Korean weedy rice (*Oryza sativa* L.) by RFLP analysis. *Euphytica* 86: 103-110
- * **Choi, HW., Lemaux, PG. and Cho, M-J.** 2002. Use of fluorescence in situ hybridization for gross mapping of transgenes and screening for homozygous plants in transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 92-100
- * **Chowdhry, C.N., Tyagi, A.K., Maheshwari, N., and Maheshwari, S.C.,** 1993. Effect of L-proline and L-tryptophan on somatic embryogenesis and plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L. Cv. Pusa 169). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32: 357-361

- * **Christensen, AH., Sharrock, RA., Quail, PH.** 1992. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol* 18: 675-689
- * **Christou, P., Ford, TL. And Kofron, M.** 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa*, L.) from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Biotechnology* 9:957-962
- * **Christou, P., Ford, TL. And Kofron, M.** 1992. The development of a variety-independent gene-transfer method for rice. *TIBTECH* 10: 239-246
- * **Cluster, P.D., O'Dell, M., Metzloff, M. and Flavell, R.B.** 1996. Details of T-DNA structural organization from a transgenic *Petunia* population exhibiting co-suppression. *Plant Mol. Biol.* 32: 1197–1203
- * **Coca, M., Bortolotti, C., Rufat, M., Peñas, G., Eritja, R., Tharreau, D., Martínez del Pozo, A., Messeguer, J. and San Segundo, B.** 2004. Transgenic rice plants expressing antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaphorte grisea*. *Plant. Mol. Biol.* 54: 245-259.
- * **Coca, M., Peñas, G., Gómez, J., Campo, J., Bortolotti, C., Messeguer, J. and San Segundo, B.** 2005. Enhanced disease resistance conferred by expression of a cecropin A gene in transgenic rice. Submitted to *Planta*.
- * **Coligan, JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW and Wingfield PT.** 2002. *Current Protocols in Protein Science*. Ed. Board. John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y.
- * Commission Recommendation of 23 July 2003 on guidelines for the development of national strategies and best practices to ensure the co-existence of genetically modified crops with conventional and organic farming. *Official Journal L* 189, 29/07/2003 pp 0036-0047
- * **Cordero, MJ., Raventos, D., San Segundo, B.** 1994. Differential expression and induction of chitinases and β -1, 3-glucanases in response to fungal infection during germination of maize seeds. *Mol Plant-Microbe Interact* 7: 23-31

-
- * **Cotsaftis O, Sallaud C, Breitler JC, Meynard D, Greco R, Pereira A, Guiderdoni E.** 2002. Transposon-mediated generation of T-DNA and marker free rice plants
- * **Crouzet, P. and Hohn, B.** 2002. Transgenic plants. Encyclopedi of Life Sciences. Nature Publishing Group, London, UK, pp.1-7
- * **Dale, EC., and Ow, DW.** 1990. Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene* 91: 79-85.
- * **Dale, EC. and Ow, DW.** 1991. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10558-10562
- * **Daley, M., Knauff, V.C., Summerfelt, K.R. and Turner, J.C.** 1998. Co-transformation with one *Agrobacterium* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants. *Plant Cell Reports* 17: 489-496
- * **Dandekar, AM.** 1994. Genetic transformation of angiosperms, in *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Vol. 1 (Jain, SM, Gupta, PK. And Newton, R., eds.) Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, pp. 193-225.
- * **Daniell, H.** 2002. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat. Biotechnol.* 20: 581-586
- * **DARP.** 2005. Web del Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya: <http://www.gencat.net/darp/camp.htm>
- * **Datta, SK., Peterhans, A., Datta, K. and Potrykus, I.** 1990. Genetically engineered fertile Indica-rice recovered from protoplasts. *Bio-technology* 8: 736-740
- * **Datta, SK., Datta, K., Soltanifer, N., Donn, G. and Potrykus, I.** 1992. Herbicide-resistant Indica rice plants from IRRI breeding line IR72 after PEG-mediated transformation of protoplast. *Plant Mol. Biol.* 20: 619-627
- * **De Block, M., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, Schell, J. and Zambryski, P.** 1984. Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. *EMBO J.* 3: 1681-1689

- * **De Block, M. and Debrower, D.** 1991. Two T-DNA's co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium tumefaciens* are mainly integrated at the same locus. *Theor. Appl. Genet.* 82:257-263
- * **De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu, M. and Depicker, A.** 1998. *Agrobacterium tumefaciens* Transformation and Cotransformation Frequencies of *Arabidopsis thaliana* Root Explants and Tobacco Protoplasts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11(6): 449-457
- * **De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu, M. and Depicker, A.** 1999. The DNA sequences of T-DNA junctions suggest that complex DNA loci are formed by recombination process resembling T-DNA integration. *Plant J.* 20, 295–304.
- * **De Buck, S., De Wilde, C., Van Montagu, M. and Depicker, A.** 2000. T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol. Breed.* 6: 459–468.
- * **De Framond, AJ., Back, EW., Cholton, WS, Kayes, L., Chilton, MD.** 1986. Two unlinked T-DNA can transform the same Tobacco plant cell and segregate in the F1 generation. *Mol. Gen. Genet.* 202: 125-131
- * **De Neve, M., De Buck, S., Jacobs, A, Van Montagu, M. and Depicker, A.** 1997. T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from co-integration of separate T-DNAs. *Plant J.* 11:15-29
- * **De Pater, S, Van der Mark, F., Rueb, S., Katagiri, F, Chua, NH., Schilperoort, RA. and Hensgens, LAM.** 1992. The promoter of rice gene GOS2 is active in various different monoco tissues and binds rice nuclear factor ASF-1. *The Plant Journal*, 2(6): 837-844
- * **De Vetten, N., Wolters, AM., Raemakers, K., et al.** 2003. A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nat Technol.* 21: 439-442
- * **Depicker, A., Herman, L., Jacobs, A., Schell, J. and Van Montagu, M.** 1985. Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNA and their relevance to *Agrobacterium* /plant cell interactions. *Mol. Gen. Genet.* 201: 477-484

-
- * **Depicker, A., and Van Montagu, M.** 1997. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 373-382
- * **Dey, M., Jiang, H., and Wu, R.** 2002. Antinecrotic substances improved regeneration frequency of transgenic rice: *Rice Genetic Newsl.* 19: 35-38.
- * **Directive 2001/18/CE** of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms. *Official Journal L* 106, 17/04/2001 pp 0001-0039
- * **Dong, J., Teng, W, Buchholz, WG. and Hall, TC.** 1996. *Agrobacterium* mediated transformation of Javanica rice. *Molecular Breeding* 2: 267-276
- * **Dong, J., Kahrb, P., Teng, W. And Hall, TC.** 2001. Characterization of rice transformed by an *Agrobacterium*-mediated inflorescence approach. *Mol. Breed.* 7:187-194
- * **Dow, BD. and Ashley, MV.** 1998. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. *J. Hered.*89: 62-70
- * **Doyle, J.,J. & Doyle, J.L.** 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull.* 19: 11-15
- * **Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E,Yamakado M & Komamine A.** 1997. Principle of MAT vector. *Plant Biotechnol.* 14: 133–139
- * **Ebinuma, H., Sugita, K., Matsunaga, E. and Endo, S.** 2001 (a). Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker. *Plant Cell Rep.* 20: 383-392
- * **Ebinuma, H. and Komamine, A.** 2001 (b). MAT (Multi-Auto-Transformation) Vector System. The oncogenes of *Agrobacterium* as positive markers for regeneration and selection of marker-free transgenic plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37: 103–113
- * **Ellstrand, N.C., Delvin, B., Marshall, D.L.** 1989. Gene flow by pollen into small populations: data from experimental and natural strands of wild radish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9044-9047

- * **Ellstrand, N.C.** 1992. Gene flow among seed plant populations. *New For.* 6: 241-256
- * **Ellstrand NC, Prentice HC, Hancock JF.** 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30: 539-563
- * **Ellstrand, N.C.** 2001. When transgenes wander, should we worry? *Plant Physiology* 125: 1543-1545
- * **Enriquez-Obregon, G. A., D. L. Prieto-Samsonov, G. A. de la Riva, M. Perez, G. Selman-Housein and R. I. Vazquez-Padron,** 1999. *Agrobacterium*-mediated japonica rice transformation: a procedure assisted by antinecrotic treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59: 159-168
- * **Farinós G.P., de la Poza M., Hernández-Crespo P., Ortego F., Castañera P.,** 2004. Resistance monitoring of field populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis* after 5 years of Bt maize cultivation in Spain. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 110: 23-30
- * **Faure, J. and Mazaud, F.** 1995. Rice quality in the European Union. *Agriculture et developpement, CIRAD.* Dec: 2-12
- * **Federoff, N., Wessler, S., and Shure, M.** 1983. Isolation of the transposable maize. Controlling elements *Ac* and *Ds* *Cell* 35: 243-251.
- * **Finnegan, J. and McElroy, D.** 1994. Transgene inactivation: Plants fight back! *Bio Technology* 12: 883-888
- * **Fraley, RT., Rogers, SG., Horsch, RB., Sanders, PR., Flick, JS., Adams, SP, Bittner, ML, Brand, LA., et al.** 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4803-4807
- * **Friedman, ST. and Adams, DL.** 1985. Estimation of gene flow into two seed orchards of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) *Theor. Appl. Genet.* 69: 609-615
- * **Fu, X., Du, LT., Fonatana, S., et al.** 2000. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgen. Res.* 9: 11-19

- * **Gelvin, SB.** 2003. *Agrobacterium*-mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Micro. Mol. Biol. Rev.* 67:16-37
- * **Ghosh-Biswas, GC., Burkhardt, PK., Wünn, J., Klöti, A. and Potrykus, I.** 1994. Fertile Indica rice plants regenerated from protoplasts isolated from scutellar tissue of immature embryos. *Plant Cell Rev* 13: 528-532
- * **Gidoni, D. Fuss, E., Burbidge, A., et al.** 2003. Multi-functional T-DNA/Ds tomato lines designed for gene cloning and molecular and physical dissection of the tomato genome. *Plant Mol. Biol.* 51: 83-98
- * **Gilbertson, L., Ekena, J., House, I., Huang, S., Krieger, E., Luethy, M., et al.** 2003. Novel T-DNA vector designs to facilitate the production of transgenic marker genes and vectors backbones. In. 7th International Congress of Plant Molecular Biology, 23-28 June, Barcelona, Spain
- * **Gleave, AP., Mitra, DS., Mudge, SR. and Morris, BAM.** 1999. Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Mol Biol*, 40: 223 – 235.
- * **Goldsbrough, AP., Lastrella, CN. and Yoder, JI.** 1993. Transposition mediated repositioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato. *Bio/technology* 11: 1286-1992
- * **Goldsbrough, A.** 2001. Methods for avoidance and removal of selectable marker genes used in crop transformation systems, in Unnecessary Transgene Integration and Expression in Plants: How do we minimise and manage this? DEFRA, ACRE. <http://www.defra.gov.uk/environment/acre/uti/08.htm>
- * **Gorbunova, V. and Levy, AA.** 2000. Analysis of extrachromosomal Ac/Ds transposable elements. *Genetics* 155: 349-359
- * **Gordon-Kamm, W.J., Spencer, T.M., Mangano, M.L., Adams, T.R., Daines, R.J., Start, W.G.** et al., 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2: 603-618

- * **Grevelding, C., Fantes, V., Kemper, E., Schell, J. and Masterson, R.** 1993. Single-copy T-DNA insertions in *Arabidopsis* are the predominant form of integration in toot-derived transgenics, whereas multiple insertions are found in leaf discs. *Plant Molecular Biology*, vol. 23 (4): 847-860

- * **Haldrup, A. Petersen, S. G. and Okkels, F. T.** 1998. The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent. *Plant Mol. Biol.* 37: 287-296

- * **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 136: 557-580.

- * **Hare,P., Chua, N-H.** 2002. Excision of selectable marker genes from transgenic plants. *Nat Biotechnol* 20: 575–580

- * **Harper, BK., Mabon, SA., Leffel, SM., et al.,** 1999. Green fluorescent protein as a marker for expression of a second gene in transgenic plants. *Nat. Biotech* 17: 1125-1129

- * **Haseloff, J., Siemerins, KR., Praser, DC. And Hodge, S.** 1997. Removal of a criptic intron and subcellular localization of GFP are required to mark transgenic *Arabidopsis* plant brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2122-2127

- * **Hayashimoto, A., Li, Z., Murai, N.** 1990. A polyethylene glycol-mediated protoplasts transformation system for production of fertile transgenic rice plants. *Plant Physiol* 93: 857-863

- * **Heim, R., Cubitt, AB. and Tsien, RY.** 1995. Improved green fluorescence. *Nature* 373: 663-664

- * **Hellens, R and Mullineaux, P.** 2000 (a) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*. October Vol.5, No 10: 446-451.

- * **Hellens, R.P., Edwards, A., Leyland, N.R., Bean, S. and Mullineaux, P.M.** 2000 (b). pGreen. A versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol. Biol.* 42: 819-832

- * **Herrera-Estrella, L., Depickeret, A., Van Montagu, M. And Schell, J.** 1983. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303: 209-213
- * **Herrera-Estrella, A., Chen, Z.M., Van Montagu, M., and Wang, K.** 1988. VirD proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are required for the formation of a covalent DNA-protein complex at the 5' terminus of T-strand molecules. *EMBO J.* 7: 4055-4062
- * **Herrera-Estrella, L., Simpson, J. and Martínez-Trujillo, M.** 2005. Transgenic plants: An historical perspective, in *Methods in Molecular Biology*. Vol. 286: Transgenic plants: Methods and Protocols Edited by Leandro Peña. Humana Press Inc. 2005. Totowa, New Jersey, pp3-23
- * **Herve, C., Rouan, D., Guerche, P., Montane, MH. And Yot, P.** 1993. Molecular analysis of transgenic rapeseed plants obtained by direct transfer of two separate plasmids containing respectively the CaMV coat protein gene and a selectable marker gene. *Plant Sci.* 91: 181-193
- * **Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. And Kumashiro, T.** 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*, L) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6: 271-282
- * **Hiei, Y., Komari, T. and Kubo, T.** 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 35:205-218
- * **Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schiperoort, R.A.,** 1983. A binary vector based on separation of vir and T-DNA region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids. *Nature*, 303: 179-183.
- * **Hohn, B., Levy, AA. And Puchta, H.** 2001. Elimination of selection markers from transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:139-143
- * **Hohn B, Puchta H.** 2003 Some like it sticky: targeting of the rice gene Waxy. *Trends Plant Sci.* Feb;8(2):51-3.
- * **Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, Hoekema, A.,** 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic research*, 2: 208-218.

- * **Horsch, R. B., and Klee, H. J.** 1986. Rapid assay of foreign gene expression in leaf discs transformed by *Agrobacterium tumefaciens*: Role of T-DNA borders in the transfer process. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4428-4432

- * **Hossain, F., Pray, CE., Lu, Y., Hunag, J., Fan, C. and Hu, R.** 2004. Genetically Modified Cotton and Farmer's Health in China. Inter. Jour. Occup. Envir. Health 10(3): 296-303

- * **Hudson, LC., Halfhill, M. and Stewart, JRN.** 2005. Transgene dispersal through pollen. In Methods in Molecular Biology. Vol. 286: Transgenic plants: Methods and Protocols Edited by Leandro Peña. Humana Press Inc. 2005. Totowa, New Jersey, pp365-374

- * **Iamtham, S and Day, A.** 2000. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. Nat. Biotechnol. 18: 1172-1176

- * **Iglesias, VA., Moscone, EA., Papp, I.** et al., 1997. Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. Plant Cell 9: 1251-1264

- * **ISAAA** (International Service for the acquisition of Agri-biotech applications) 2004. Global Status of GM Crops. Summary Report 1996-2003. <http://www.isaaa.org>.

- * **Jacquot, M. and Clement, G.** 1995. Une richesse porteuse d'avenir. Riz. Du débouché à la culture. ITCF and CFR 8-12

- * **Jaiwal, PK., Sashoo, L., Singh, ND. And Singh, RP.** 2002. Strategies to deal with the concern about marker genes in transgenic plants: some environment-friendly approaches. Curr. Sci. 83, 128-136

- * **Jefferson, RA., Burgess, SM. and Hirsh, D.** 1986. Beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8447-8451

- * **Jeon, JS., Lee, S, Jung, KH,** et al. 2000. T-DNA insertional mutagenesis for functional genetics in rice. Plant J. 22:561-570

- * **Joersbo M. and Okkels F.T.** 1996. A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. Plant Cell Rep. 16: 219-221

- * **Joersbo M., Donalson I., Kreiberg J., Petersen S.G., Brunstedt J. and Okkels F.T.** 1998. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol breed.* 4: 111-117
- * **Jones, JDG, Gilbert DE, Grady KL, Jorgensen RA.** 1987. T-DNA structure and gene expression in petunia plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Mol Gen Genet* 207: 478–485
- * **Jordan, MC.** 2000. Green fluorescent protein as a visual marker for wheat transformation. *Pl. Cell Rep.* 19: 1069-1075
- * **Jorgensen R, Snyder C, Jones JDG.** 1987. T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *MolGen Genet* 207: 471–477
- * **Kaeppler, H., Carlson, AR. and Menon, GK.** 2001. Routine utilization of green fluorescent protein as a visual selectable marker for cereal transformation. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 37:120-126
- * **Kahl, G:** Molecular biology of wound healing: the conditioning phenomenon. In: Kahl, G., Schell, J (eds) *Molecular Biology of Plant Tumors*, pp211-267. Academic Press. New York. 1982
- * **Khush GS.** 1993. Floral Structure, Pollination Biology, Breeding Behaviour, Transfer Distance and Isolation Considerations. World Bank Technical Paper. Biotechnology Series N° 1. Rice Biosafety. The Rockefeller Foundation.
- * **Kikkert, JR.** 1993. The Biolistic® PDS-1000/He device. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33:221-226
- * **Kim, SR., Lee, J., Jun, SH., Park, S., Kang, HG., Kwon, S. And An, G.** 2003. Transgen estructures in T-DNA inserted rice plants. *Plant Mol Biol* 52: 761-773
- * **Kiyokawa, S., Kobayashi, K., Kikuchi, Y., Kamada, H. and Harada, H.** 1994. Root-inducing region of mikimopine type Ri plasmid pRi724. *Plant Physiol* 104: 801–802

- * **Kohli, A., Leech, M., Vain, P., Laurie, DA. and Christou, P.** 1998. Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 7203-7208

- * Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. And Kumashiro, T. 1996. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. Plant J. 10: 165-174

- * **Kononov, M.E., Bassuner, B. and Gelvin, S.B.** 1997. Integration of T-DNA binary vector 'backbone' sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. Plant J. 11: 945–957.

- * **Krizkova, L. and Hroudá, M.** 1998. Direct repeats of T-DNA integrated in tobacco chromosome: characterization of junction regions. Plant J. 16: 673–680

- * **Kunze I., Ebneith M., Heim U., Geiger M., Sonnewald U., Herbers K.** 2001. 2-Deoxyglucose resistance: a novel selection marker for plant transformation », Molecular Breeding, 7: 221-227

- * **Kuiper, HA., Kleter, GA, Noteborn, H. And Kok, JK.** 2001. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. Plant J. 27: 505-528

- * **Kumar, S. and Fladung, M.** 2001. Controlling transgene integration in plants. Trends Plant Sci 6: 155-159

- * **Kunik, T., Tzafira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C. and Citovski, V.** 2001. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 1872-1876

- * **Laemmli, UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685

- * **Langevin, SA., Clay, K, Grace, JB.** 1990. The incidence and effects of hybridisation between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza sativa* L.). Evolution 44: 1000-1008

-
- * **Leffel, S., Mabon, SA. and Stewart, C.N. Jr.** 1997. Application of green fluorescent protein in plants. *Biotechniques* 23: 912-918
- * **Leggett, JM., Perret, SJ., Harper, J., and Morris, P.** 2000. Chromosomal localization of co-transformed transgenes in hexaploid cultivated oat (*Avena sativa* L.) using fluorescence in situ hybridization. *Heredity* 84: 46-53
- * **Li, Z., Burow, MD., Murai, N.** 1990. High frequency generation of fertile transgenic rice plants after PEG mediated protoplasts transformation. *Plant MOL. Biol. Rev.* 8: 276-291
- * **Liu, YG., Chen, Y. and Zhang, Q.** 2005. Amplification of genomic sequences flanking T-DNA insertions by Thermal Asymmetric Interlaced Polymerase Chain Reaction, in *Methods in Molecular Biology*. Vol. 286: Transgenic plants: Methods and Protocols Edited by Leandro Peña. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey
- * **Lloyd AM, Davis RW.** 1994. Functional expression of the yeast FLP/FRT site-specific recombination system in *Nicotiana tabacum*. *Mol. Gen. Genet.* 242: 653-657
- * **Lord L.** 1935. The cultivation of rice in Ceylan. *J. Exp Agric.* 3: 119-28
- * **Losey, J. E., Rayor, L. S., & Carter, M. E.** 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 399, 214.
- * **Lu, H., Zhou, X., Gong, Z. and Upadhyaya, N.** 2001. Generation of selectable marker-free transgenic rice using a double right-border. *Austr. J. Plant Physiol.* 28: 241-248
- * **Luria, S.E., Adam, J.N., and Teng, R.C.** 1960. Transduction of lactose utilizing ability among strains of *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. *Virology*. v.12: 348-390
- * **Lyznik LA, Mitchell JC, Hiyarama L, Hodges TK.** 1993. Activity of yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts. *Nucleic Acids Res.* 21:969-975.
- * **Lyznik LA, Rao KV, Hodges TK.** 1996. FLP-mediated recombination of FRT sites in the maize genome. *Nucleic Acids Res* 24: 3784-3789

- * **Maeser S, Kahmann R.** 1991. The Gin recombinase of phage Mu can catalyze site-specific recombination in plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 230: 170-176
- * **Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.,** 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- * **Marfà, V., Melé, E., Vassal, JM. and Messeguer, J.** 2002. In vitro insect-feeding bioassay to determine the resistance of transgenic rice plants transformed with insect resistance genes against Striped ítem borer (*Chilo suppressalis*). *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* 38: 310-315
- * **Matsuoka M, Kano-Murakami Y, Tanaka Y, Ozeki Y, Yamamoto N.** 1988. Classification and nucleotide sequence of cDNA encoding the small subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase from rice. *Plant and Cell Physiology* **29**, 1015–1022.
- * **Matthews, P.R., Wang, M-B., Waterhouse, P.M., Thornton, S., Fieg, S.J., Gubler, F. and Jacobsen, J.V.** 2001. Marker gene elimination from transgenic barley, using co-transformation with adjacent 'twin T-DNAs' on a standard *Agrobacterium* transformation vector. *Molecular Breeding* 7: 195-202
- * **McCabe, D. and Chrisou, P.** 1993. Direct DNA transfer using electric discharge particle acceleration(ACCELL™ technology) *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33, 227-236
- * **McCallum C.M., Comai L., Greene E.A., Henikoff S.** 2000. Targeted screening for induced mutations. *Nature Biotechnol.* 18:455-7
- * **McCormac, AC., Fowker, Mr., Chen, DF. and Elliot, MC.** 2001. Efficient Co-Transformation of *Nicotiana tabacum* by two Independent T-DNAs, the Effect of T-DNA Size and Implications for Genetic Separation. *Transgen. Res* 10: 143-155
- * **McKnight, T.D., Lillis, M.T. and Simpson, RB.** 1987. Segregation of genes transferred to one plant cell from two separate *Agrobacterium* strains. *Plant Mol.Biol.* 8: 439-445
- * **Meinke, DH., Cherri, M., Dean, C., Rounsley, SD. And Koorneef, M.** 1998. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282: 662-682

- * **Messeguer J, Fogher C, Guiderdoni E, Marfà V, Català MM, Baldi G, Melé E.** 2001. Field assessments of gene flow from transgenic to cultivated rice (*Oryza sativa* L.) using a herbicide resistance gene as tracer marker. *Theor. Appl. Genet.* 103:1151-1159
- * **Messeguer, J., Marfà, V., Català, MM., Guiderdoni, E. and Melé, E.** 2004. A field study of pollen-mediated gene flow from Mediterranean GM rice to conventional rice and red rice weed. *Mol. Breed* 13:103-112
- * **Meyer, P., Linn, F., Heidmann, I., Meyer, HZA, Niedenhof, I. and Saedler, H.** 1992. Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of maize A 1 gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype. *Mol Gen Genet* 231:345-352
- * **Meyer, P., and Saedler, H.** 1996. Homology-dependent gene silencing in plants. *Annu. Rev. Plant Phisysiol. Plant Mol. Biol.* 47: 23-48
- * **Miller, M., Tagliani, L., Wang, N., Berka, B., Bidney, D. and Zhao, ZH.** 2002. High efficiency transgene segregation in co-transformed maize plants using an *Agrobacterium tumefaciens* 2 T-DNA binary system. *Transgenic Res.* 11: 381-396
- * **Moreno, AB., Peñas, G., Rufat, M., Bravo, JM., Estopa, M., Messeguer, J. and 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* In press.
- * **Mullis, K., Falooma, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. i Erlich, H.** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polimerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51(1): 263-273.
- * **Murakami, T., Anzai, H., Imai, S., Satoh, A., Nagaoka, K. and Thompson, CJ.** 1986. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* 205: 42-50
- * **Murashige, T. and Skoog, F.,** 1962. A reviserd medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.,* 15: 473-497

- * **Nabors, M.W., Heyser, J.W., Dykes, T.A., DeMott, K.J.** 1983. Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. *Planta*, 157: 385-391
- * **Narasimhulu, S. B., Deng, X.-B., Sarria, R., and Gelvin, S. B.** 1996. Early transcription of *Agrobacterium* T-DNA genes in tobacco and maize. *Plant Cell* 8:873-886.
- * **Netherwood, J., Martin-Orúe, S., O'Donnell, A., Gockling, S., Graham, J., Mathers, JC. And Gilbert, H.** 2004. Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nat. Biotech.* 22: 204-209
- * **Negrotto, D., Jolley, M., Beer, S., Wench, A.R. and Hansen, J.** 2000. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep.* 19: 798-803
- * **Noldin, JA., Chandler, JM., McCauley, GN.** 1999. Red rice (*Oryza sativa*) Biology. I. Characterization of Red rice Ecotypes. *Weed Technology* 13: 12-18
- * **Noldin, JA., Yokoyama, S., Stuker, H., Rampelotti, FT., Gonçalves, MIP., Eberhardt, DS., Abreu, A., Antunez, P. and Vieira J.** 2004. Desempenho de populações híbridas F₂ de arroz-vermelho (*Oryza sativa*) com arroz transgênico (*O. Sativa*) resistente ao herbicida amonio-glufosinate. *Planta Daninha, Viçosa-MG*: 22(3):381-395
- * **Oard, J., Cohn, M.A., Linscombe, S., Gealy, D. and Gravois, K.** 2000. Field evaluation of seed production, shattering and dormancy in hybrid populations of transgenic rice (*Oryza sativa*) and the weed, red rice (*Oryza sativa*). *Plant Science* 155: 13-22
- * **Odell, J., Caimi, P., Sauer, B. and Russell, S.** 1990. Site-directed recombination in the genome of transgenic tobacco. *Mol.Gen Genet.* 223: 369-378
- * **Oka.** 1988. Origin of cultivated rice. Japan Sci Soc Press, Tokyo. Pp 254
- * **Onouchi, H., Yokoi, K., Machida, C., Matsuzaki, H., Oshima, Y., Matsuoka, K., Nakamura, K. and Machida, Y.** 1991. Operation of an efficient site-specific

recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. Nucl Acids Res 19: 6373-6378

* **Ooms, G., P. Hooykaas, R. V. Veen, P. V. Beelen, T. Regensburg-Tuink and R. Schilperoort.** 1982. Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. Plasmid. 7: 15-29.

* **Ormo, M., Cubbit, A., Kallio, K., Gross, L., Tsien, R. and Prasher, D.** 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. Science 273: 1392-1395

* **Paques, F., Leung, WX. and Haber, J.** 1998. Expansions and Contractions in a Tandem Repeat Induced by Double-Strand Break Repair. Mol Cell Biol 18: 2045-2054

* **Pedersen, C., Zimny, J., Becker, D., Jahne-Gartner, A. And Lorz, H.** 1997. Localization of introduced genes of the chromosomes of transgenic barley, wheat, and triticale by fluorescence in situ hybridization. Theor. Appl. Genet. 94:749-757

* **Peng., J., Wen, F., Lister, RL., Hodges, TK.** 1995. Inheritance of gusA and neo genes in transgenic rice. Plant Mol. Biol. 27:91-104

* **Peñas, G.** 2003. Transformació d'arròs (*Oryza sativa*) amb el gen *b32* dirigit per diferents promotors. UAB (treball de recerca).

* **Perl, A., Lotan, O., Abu-Abied, M. and Holland, D.** 1996. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): The role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. Nat Biotech 14: 624-628.

* **Peterson, G., Smith, R.,** 1991. Effect of abscisic acid and callus size on regeneration of american and international rice varieties. Plant cell reports, 10: 35-38

* **Petit, A., Berkaloff, A., and Tempé, J.** 1986. Multiple transformation of plant cells by *Agrobacterium* may be responsible for the complex organization of T-DNA in crown gall and hairy root. Mol. Gen. Genet. 202: 388-393

* **Phipps RH & Park JR.** 2002. Environmental benefits of genetically modified crops: Global and European perspectives on their ability to reduce pesticide use. Journal of Animal and Feed Sciences: 11: 1-18

- * **Pons, M.J., Marfà V., Melé E. and Messeguer J.** 2000. Regeneration and genetic transformation of Spanish rice cultivars using mature embryos. *Euphytica* 114: 117-122
- * **Puchta H, Swoboda P, Hohn B.** 1995. Induction of intrachromosomal homologous recombination in whole plants. *The Plant Journal* 7, 203–210.
- * **Puchta, H.** 2002. Gene replacement by homologous recombination in plants. *Plant Mol Biol* 48: 173-182.
- * **Puchta, H.** 2003(a) Marker free transgenic plants. *Plant Cell, Tiss Org. Cult.* 74:123-134
- * **Puchta, H.** 2003(b) Towards the ideal GMP: homologous recombination and marker gene excision. *J Plant Physiol.* 2003 Jul;160(7):743-54.
- * **Ramanathan, V. and Veluthambi, K.** 1995. Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of TL-DNA. *Plant Mol. Biol.* 28:1149–1154
- * **RAMSAR,** Advisory Missions: No. 43, Ebro Delta, Catalonia Spain (2000) www.ramsar.org
- * **Rashid, H., Yokoi, S., Toriyama, K., Hinata, K.** 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. *Plant Cell Rep* 15: 727-730
- * **Reano R, Pharm L.** 1998. Does cross-pollination occur during seed regeneration at the International Rice Genebank? *Rice Genetics Newsletter* 23:5-6
- * **Rueb, S., Leneman, M., Schilperoort, R.A., & Hensgens, L.A.M.,** 1994. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36: 259-264.
- * **Russell, S. H., Hoopes, J. L., and Odell, J. T.** 1992. Directed excision of a transgene from the plant genome. *Mol. Gen. Genet.* 234: 49-59.
- * **Sallaud, C., Meynard, D., van Boxtel, J., Gay, C., Bès, M., Brizard J.P., et al.** 2003. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa*, L.) functional genomics. *Theor. Appl. Genet* 106: 1396-1408.

- * **Sallaud, C., Gay C., Larmande,P., Bès, M., Piffanelli, P., Piégu , B., Droc, G., Regad F., Bourgeois, E., Meynard, D., Périn, C., Ghesquière, A., Glaszmann, J.C., Delseny, M., Guiderdoni, E.** 2004. High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice : A first step towards *in silico* reverse genetics. *Plant J.* 39: 450-464
- * **Salvo-Garrido, H., Travella, S., Schwarzacher, T., Harwood, WA. And Snape, JW.** 2001. An efficient method for the physical mapping of transgenes in barley using *in situ* hybridization. *Genome* 44: 104-110
- * **Sambrook, R.,, Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning : A laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.
- * **Sanford, JC.** 2000. The development of the biolistic process. *In Vitro Cell Dev. Biol.Plant* 36: 303-308
- * **Shelton, A.M., Sears, M.K.** 2001. The Monarch butterfly controversy: scientific interpretations of a phenomenon. *The Plant Jour.* 27(6): 483-488
- * **Schilton, M.D., Drummond, M.H., Merlo, D.J., et al.,** 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular bases of crown-gall tumorigenesis. *Cell* 11: 263-271
- * **Shimamoto, K., Terada, R., Yzawa, T., Fujimoto, H.** 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338: 274-276.
- * **Simpson, R.B.; Spielmann, A.; Margossian, L. and McKnight, T.**1986. A disarmed binary vector from *Agrobacterium tumefaciens* function in *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Molecular Biology* 6: 403- 415
- * **Slatkin, M.** 1985. Gene flow in natural populations. *Annu. Ref. Ecol. Syst.* 16: 393-430
- * **Smith, RH. and Hood, EE.** 1995. Review and interpretation: *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. *Crop Sci* 35: 301-309
- * **Smyth, S., Khachatourians, GG. And Phillips, PW.** 2002. Liabilities and economics of transgenic crops. *Nature Biotechnology* 20 537–542

- * **Snowdon, R.J., Bottinger, P., Picakardt, T., Kohler, W., and Friedt, W.** 2001. Physical localization of transgenes on *Vicia fava* Chromosomes. *Chromosome Res.* 9:607-610
- * **Southgate, E.M., Davey, M.R., Power, J.B. And Marchant, R.** 1995. Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment. *Biotech. Adv.* 13:631-651
- * **Srinivasan V, Subramanian A.** 1961. A note on natural cross-pollination in rice at Agroicultural Research Station, Aduthurai (Thanjavur District). *Madras Agric. J* 48(7): 292-293
- * **Srivastava, V. and Ow, D.** 2001. Biolistic mediated site-specific integration in rice. *Mol. Breed.* 8:345-350
- * **Stachel, S.E. and Zambryski, P.C.** 1985. VirA and VirG control the plant-introduced activation of the T-DNA transfer of *Agrobacterium tumefaciens*. *Cell* 46:325-333
- * **Stam, M., Mol, J.N., and Kooter, J.M.** 1997. The silence of genes in transgenic plants. *Ann. Bot.* 79: 3-12
- * **Stewart, C.N. Jr.** 1996. Monitoring transgenic plants using *in vivo* markers. *Nat. Biotech.* 14: 682
- * **Suh, H.S., Sato, Y.I., Morishima, H.** 1997. Genetic characterisation of weedy rice (*Oryza sativa* L.) based on morpho-physiology, isozymes and RAPD markers. *Theor Appl Genet* 94: 316-321
- * **Svitashev, S.K., Ananiev, E., Pawlowski, W.P. And Somers, D.A.** 2000. Association of transgene integration sites with chromosomal rearrangements in hexaploid oat. *Theor. Appl. Genet.* 100: 872-880
- * **Tachibana, K., Watanabe, T., Sekizawa, T., Takematsu, T.** 1986. Action mechanism of bialaphos II: accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. *J Pest Sci* 11: 33-37

-
- * **Tada, Y., Sakamoto, M., Fujimura, T.** 1990. Efficient gene introduction into rice by electroporation and analysis of transgenic plants: use of electroporation buffer lacking chloride ions. *Theor. Appl. Genet* 80: 475-480
- * **Taylor, NJ. and Fouquet, CM.** 2002. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA Cell Biol.* 21: 963-977
- * **Ten Hoopen, R., Robbins, TP., Fransz, PF., et al.,** 1996. Localization of T-DNA insertions in petunia by fluorescence in situ hybridization: physical evidence for suppression of recombination. *Plant Cell* 8:83-830
- * **Tinland, B., Hohn, B. and Puchta, H.** 1994. *Agrobacterium tumefaciens* transfers single-stranded transfer DNA (T-DNA) into the plant cell nucleus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91: 8000–8004
- * **Toriyama, K., Arimoto, Y., Uchimiya, H., Hinata, K.** 1988. Transgenic plants after direct gene transfer into protoplasts. *Bio. Technology* 6: 1072-1074
- * **Thompson CJ, Mova NR, Tizard R, Cramer R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J.** 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J* 6: 2519–2523
- * **Tzfira, T. and Citovsky, V.** 2002. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol.* 12:121-128
- * **Ursic, D., Slightom, J.L. and Kemp, J.D.** 1983. *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA integrates into multiple sites of the sunflower crown gall genome. *Mol. Gen. Genet.* 190: 494–503
- * **Van Attikum, H., Bundock, P. and Hooykaas, PJJ.** 2001. Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration. *EMBO J.* 20: 6550-6558
- * **Van der Graaff, E., den Dulk-Ras, A. and Hooykaas, P.J.J.** 1996. Deviating T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants. *Plant Mol. Biol.* 31: 677–681

- * **Van Den Elzen, PJM., Townsend, J., Lee, KY. and Bedbrook, JR.** 1985. A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Mol. Biol.* 5:299-302.
- * **Vain, P., Worland, B., Kohli, A., Snape, J.W. and Christou, P.** 1998. The green fluorescent protein (GFP) as a vital marker in rice transformation. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 164-169
- * **Vaucheret, H., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J-B., Mourrain, P., Palauqui, Jean-Christophe., Vernhettes, S.** 1998. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant Journal* 16:651-659.
- * **Veluthambi, K, Aditya K. Gupta and Sharma, A.** 2003. The current status of plant transformation technologies. *Current Science*, vol. 84(3): 368-380
- * **Veena, A., Jiang, H., R.W. Doerge, RW. and Gelvin, S.** 2003. Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression *The Plant Journal* 35: 219-236
- * **Vergunst, A.C., Schrammeijer, B., der Dulk-Rus, A., de Vlaam, C.M.T., Regensburg-Tuink, TJG. and Hooykaas, PJJ.** 2000. VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science* 290:979-982.
- * **Vervliet, G., Holsters, H., Teuchy, H., Van Montagu, and J Schell.** 1975. Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium*. *J.Gen. Virol.* 26: 33-48
- * **Vila, L.** 2003. Estratègies per la milora de la resistència de l'arròs (*Oryza sativa*) front al lepidòpter *Chilo suppressalis* i front a fongs fitopatògens. Bellaterra, 2003.
- * **Vila, L., Quilis, J., Meynard, D., Breitler, JC., Marfà, V., Murillo, I., Vassal, JM., Messeguer, J., Guiderdoni, E. and 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 Biotech. Jour.* 3 : 187-202

- * **Wabiko H, Kagaya M, Kodama I, Masuda K, Kodama Y, Yamamoto H, Shibano Y, Sano H.** 1989. Isolation and characterization of diverse nopaline type Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* from Japan. Arch Microbiol 152: 119–124
- * **Watson, GS.** 1962. Goodness of fit tests on a circle, II. Biometrika 43: 344-352
- * **Wenck, A., Czako, M., Kanevski, I. and Marton, L.** 1997. Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Mol.Biol. 34: 913–922.
- * **Wheeler, CC., Gealy, D., TeBeest, DO.** 2000. Bar gene transfer from transgenic rice (*Oryza sativa*) to red rice (*Oryza sativa*). In: Ongoing studies: breeding, genetics and Physiology. Wells BR, (eds) AAES Research Series:33-36
- * **White, J., Chang, S.Y.P. and Bibb, M.J.,** 1990. A cassette containing the *bar* gene of *Streptomyces higroscopicus* a selectable marker for plant transformation. Nucleic Acids Research, 4 : 1062
- * **Winans, S.C.** 1992. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. Microbiol. Rev. 56: 12-31
- * **Wohleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E., Pühler A.** 1988. Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. Gene 70: 25-37
- * **Wolters, A.M.A., Trindade, L.M., Jacobsen, E. and Visser, R.G.F.** 1998. Fluorescence *in situ* hybridization on extended DNA fibres as a tool to analyse complex T-DNA loci in potato. Plant J. 13: 837–847.
- * **Wright, M., Dawson, J., Dunder, E., Suttie, J., Reed, J., Kramer, C., Chang, Y., Novitzky, R., Wang, H. and Artim-Moore, L.** 2001. Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. Plant Cell Rep 20: 429-436
- * **Wu, Y., Buchholz, WG., DeRose, RT. and Hall, TC.** 1995. Characterization of a rice gene family encoding root-specific proteins. Plant Mol. Biol. 27: 237-248

- * **Wu, L, Nandi, S., Chen, L. Rodríguez, RL. And Huang, N.** 2002. Expression and inheritance of nine transgenes in rice. *Trans. Res.* 11: 533-541.

- * **Xing, A., Zhang, Z., Sato, S., Staswick, P. and Clemente, T.** 2000. The use of the two T-DNA binary system to derive marker-free transgenic soybeans. *In vitro Cell Dev Biol* 36: 456-463

- * **Yanovsky, M.F., Porter, S.G., Young, C., Albright, L.M., Gordon, M.P. and Nester, E.W.** 1986. The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. *Cell.* 47: 471–477

- * **Yoder, JI, and Goldsbrough, AP.** 1994. Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. *Bio/technology* 12: 263-267

- * **Yoshida S.** 1981. Growth and Development of Rice Plant. In: *Fundamentals of Rice Crop Science.* The International Rice Research Institute (IRRI) Ed.

- * **Zambre, M, Terryn A., De Clercq, J., De Buck, S., Dillen, W., Van Montagu , M., Van Der Straeten, D. And Angenon, G.** 2003. Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Planta* 216: 580–586

- * **Zhang, HM., Yang, H., Rech, EL., Gold, TJ., Davis, AS, Mulligan, BJ., Cocking EC. and Davey, MR.** 1988 (a). Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. *Plant Cell Rev* 7: 379-383

- * **Zhang, W., Wu, R.** 1988 (b). Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. *Theor. Appl. Genet* 76: 835-840

- * **Ziemienowicz, A., Tinland, B., Briant, J., Gloeckler, V. And Hohn, B.** 2000. Plant enzymes but not *Agrobacterium VirD2* mediate T-DNA ligation *in vitro*. *Mol. Cell Biol.* 20: 6317-6322

- * **Zubco, E., Scutt, C. and Meyer, P.** 2000. Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool of remove selectable marker genes from tobacco. *Nat. Biotechnol* 18: 442-445

- * **Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O. And Zambryski, P.** 2000. Transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a first of fundamental insights. *Plant J* 23: 11-28