

Mejora del Tritordeum



Escuela de Ingeniarías Agraria Badajoz
(5ºI. Agrónomo)

María Martínez de la Concha Doncel

Eloy Píriz Murga

Santiago Lledó Gómez

22/12/2010

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 AGRASYS.....	3
1.2 TAXONOMIA.....	4
1.3 CENTROS DE ORIGEN	4
1.4 MORFOLOGIA.....	5
1.5 REPRODUCCIÓN	6
1.6 POLIPLOIDIA	6
2 SINTESIS DE TRITORDEUM.....	8
2.1 ORIGEN:.....	8
2.2 HIBRIDACIÓN	9
2.2.1 HIBRIDACIÓN INTERGENÉRICA.	10
2.3 OBJETIVO DE MEJORA:	11
3 METODOS DE MEJORA	12
3.1 METODO GENEALOGICO CLASICO	12
3.2 METODO DE DOBLES HAPLOIDES	13
3.2.1 MÉTODO DE DOBLE HAPLOIDE APLICADO AL TRITORDEUM	15
3.3 MUTACION MEDIANTE EMS	16
3.4 INGENIERIA CROMOSOMICA. LINEAS TRANSGENICAS DE TRITÓRDEO	18
3.4.1 LA BIOBALÍSTICA:	19
3.4.1.1 APLICACIÓN DE LA BIOBALÍSTICA EN EL TRITORDEUM	19
3.4.2 INTROGRESIÓN.....	22
3.5 RETROCRUZAMIENTO	25
3.5.1 EFECTOS DEL RETROCRUZAMIENTO EN LA MEJORA DEL TRITORDEUM....	27

4 POTENCIAL DEL CULTIVO Y SUS APLICACIONES	29
5 CUALIDADES ORGANOLÉPTICAS.....	30
6 CALIDAD PANADERA.....	31
6.1 LUTEINA	32
6.2 FIBRA DIETETICA	33
6.3 PROTEINA.....	34
6.4 ALMIDON	35
6.5 VITROSIDAD	36
7 CONCLUSIONES GENÉTICAS	37
8 IMPORTANCIA ECONOMICA.....	38
9 GLOSARIO	39
10 BIBLIOGRAFÍA	41
10.1 DOCUMENTOS	41
10.2 LIBROS.....	41
10.3 DOCUMENTACION APORTADA POR AGRASYS	42
10.4 INTERNET	42

1 INTRODUCCIÓN

1.1 AGRASYS

Es una empresa del ámbito agroalimentario, que utiliza técnicas avanzadas de mejora genética y de biotecnología para desarrollar nuevas variedades de cultivos con valor añadido. Estas nuevas variedades de cultivos están enfocadas a productos específicos u oportunidades de mercado que hayan sido identificados por la empresa o por sus colaboradores de negocio.

Agrasys tiene su oficina principal en el Parc Científic de Barcelona y desarrolla su investigación de mejora vegetal en Córdoba. Su investigación relativa a la alimentación, se realiza en Barcelona, Córdoba y otros Centros de Investigación.

Tecnologías aplicadas en:

1. TRITORDEUM

- a) Genética, mejora clásica y molecular
- b) Análisis de caracteres, bioquímicos, cualitativos y moleculares
- c) Agronomía, ensayos en invernadero y campo
- d) Tecnología de alimentos, desarrollo de aplicaciones

2. HYBRIDS

- Desarrollo de sistemas de generación de cultivos híbridos en cereales

3. TRITICALE

- Cultivos alternativos y mejorados de biomasa

Los proyectos actuales y los productos de la compañía se dirigen a los sectores de alimentos funcionales naturales y cultivos para biocombustibles. Dentro del área de alimentación, el primer producto que ha sido lanzado al mercado es un nuevo tipo de cereal, el tritordeum, resultante de la hibridación entre trigo duro y una especie de cebada silvestre. El tritordeum contiene varios rasgos funcionales y nutricionales que permiten el desarrollo de productos alimenticios saludables e innovadores

El producto de tritordeum comercializable es:

Mejora del Tritordeum

“Vivagran®”, es la marca registrada de tritordeum, un nuevo cereal que ofrece a las compañías de alimentación la posibilidad de desarrollar nuevos productos naturales con propiedades nutricionales muy valiosas.

Es una respuesta ideal a las tendencias de mercado actual y a las necesidades del consumidor.

(Documento Agrasys -1)

1.2 TAXONOMIA

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Subfamilia: Pooideae

Tribu: Triticeae

Género: *Tritordeaceae*

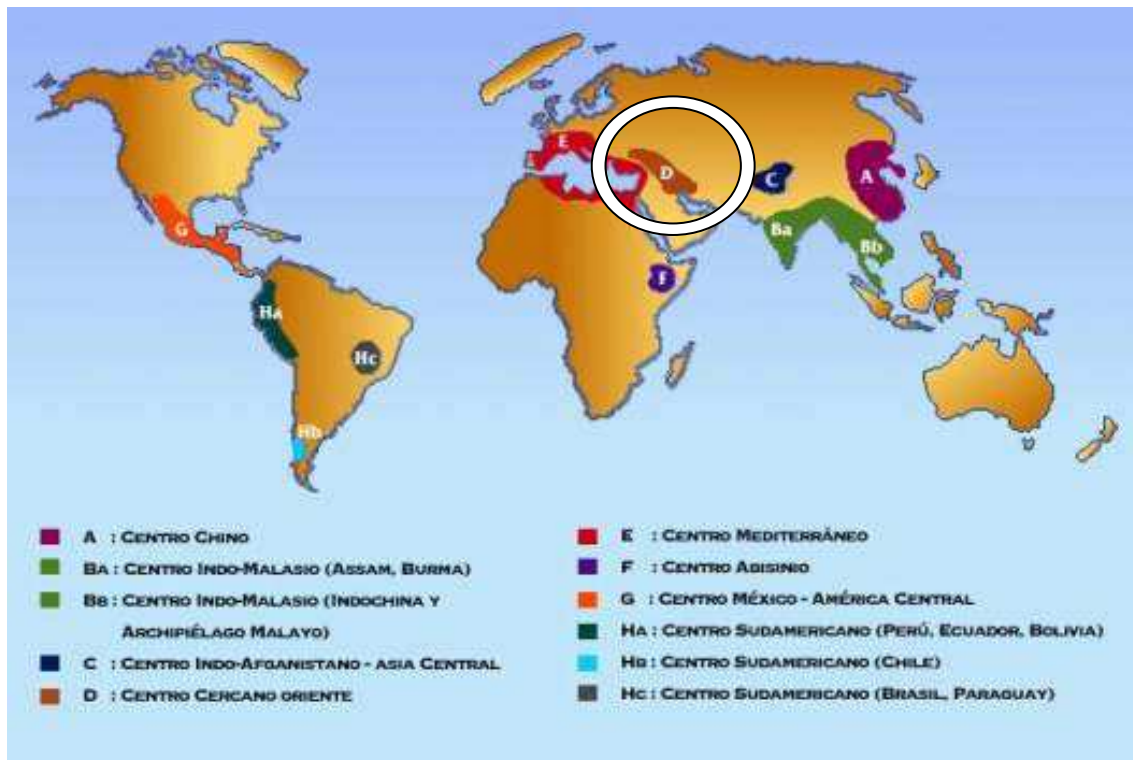
Especie: *Tritordeum Ascherson et Graebner*

(Documento-1)

1.3 CENTROS DE ORIGEN

Centros de origen de Vavilov, son aquellas regiones en donde se inició su proceso de domesticación, selección, mejoramiento y donde aún se encuentran parientes silvestres de dichas especies.

El centro de origen del trigo común y de la cebada es el D (centro cercano oriente)



(Internet-3)

1.4 MORFOLOGIA

Morfológicamente es igual al trigo; es una planta monocotiledónea, su sistema radicular es fasciculado, su tallo, al comienzo de la fase vegetativa, se halla dentro de una masa celular que constituye el nudo de ahijamiento. Sus hojas son cintiformes, paralelinervias y terminadas en punta. Las inflorescencias son en forma de espiga y con respecto a la flor, da lugar a un fruto único, denominado grano, que lleva un embrión o germen junto a la sustancia de reserva.

1.5 REPRODUCCIÓN

Es una planta monoica, autógamas y sus flores son hermafroditas:

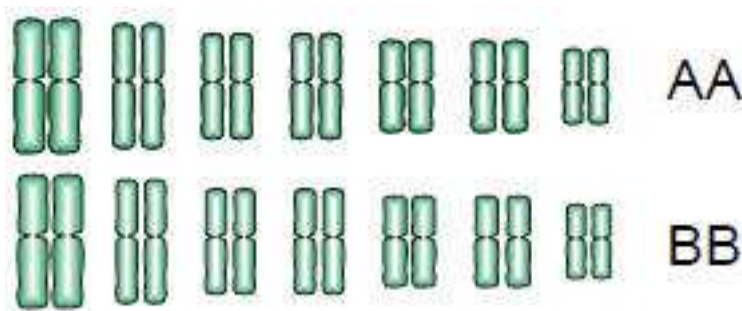
- Monoica: en un mismo pie de planta presenta los dos sexos.
- Autógama: la planta se autofecunda, en este caso estamos ante una planta cleistogama, es decir que cuando las flores se abren el ovario ya está fecundada.
- Flores hermafroditas: flor con órganos sexuales masculinos y femeninos completos.

1.6 POLIPLOIDIA

Una especie poliploide es aquella que tiene más de dos genomas (totalidad de información genética que posee un organismo en particular, tanto el ADN contenido en el núcleo, como el genoma mitocondrial)

Pongamos como ejemplo un trigo tetraploide (AA BB), $2n=4x=28$, donde:

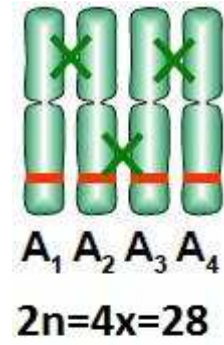
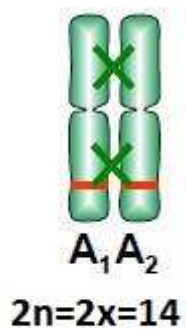
- $2n$ → Número cromosómico de las células somáticas
- n → Número cromosómico de los gametos
- 4 → Número de genomas distintos
- x → Número de cromosomas de un genoma (número básico)



-Alopoliploides (anfiploidía): los distintos genomas no se aparean entre sí en meiosis. (Los genomas son homeólogos)

Mejora del Tritordeum

-Autopoliploide: los genomas se aparean entre sí (genomas homólogos). Híbridos interespecíficos



(Documento-8)

2 SINTESIS DE TRITORDEUM

2.1 ORIGEN:

El tritordeum (*Tritordeum Ascherson et Graebner*) es un híbrido que procede del cruce del *Hordeum chilense* y *Triticum durum*. Morfológicamente y agronómicamente es similar al trigo, el tritordeum tiene una mayor eficiencia en la recogida de nitrógeno que su parental el trigo, también tiene la capacidad de absorber el agua con mayor eficiencia que el trigo. El gen H^{ch} de la cebada sustituye al gen D del trigo panadero. La calidad de la harina del tritordeum está determinada tanto por las cualidades del trigo como de la cebada. La cebada presenta una serie de proteínas que son transferidas a las semillas de tritordeum, proporcionando una gran variabilidad, convirtiéndose en una especie puente. Las proteínas de la semilla del tritordeum han sido modificadas mediante transformaciones y manipulación cromosómicas con genes gluteínicos del trigo.

Los cultivadores de plantas están interesados en el cruce entre trigo y cebada desde principio del siglo XX, los primeros anfiploides no fueron obtenidos hasta que se utilizó el *Hordeum vulgare*, como por ejemplo *Hordeum chilense*. *Hordeum chilense* Roem. Et Schult es una cebada diploide salvaje del sur de América (Chile y Argentina).

En Reino Unido se obtuvo el primer anfiploide de tritordeum, a partir de *Hordeum chilense* y *Triticum aestivum* por Martin and Chapmand, obteniendo un tritordeum octoploide con fertilidad extremadamente baja. Sin embargo, cuando cruzaban *Hordeum chilense* con diferentes trigos panaderos obteniendo fertilidades algo más grandes, aunque mostraban frecuentemente aneuploidia³, limitando su uso como cultivo extensivo.

Por el contrario al cruzar *Hordeum chilense* por *Triticum durum* obteniendo un tritordeum hexaploide ($2n=6x=42$) $H^{ch}H^{ch}AABB$, mostrando menor frecuencia de aneuploidia², buena fertilidad y características agronómicas favorable, dando lugar a buenas producciones de biomasa, contenido proteico, mayor número de semillas por espiga y de mayor tamaño. Esto hace considerar el potencial de estos anfiploide como un nuevo posible cultivo, hecho que ha sido ya confirmado.

Este cultivo fue originado por el consejo superior de investigaciones científicas, por el Doctor Antonio Martín Muñoz, en el departamento de agronomía y mejora

Mejora del Tritordeum

genética vegetal, de la escuela técnica superior de ingenieros agrónomos de la universidad de Córdoba (1998).

(Documento-6)

2.2 HIBRIDACIÓN

Hibridación, es el proceso de unir dos hebras complementarias de ADN.

Existen dos tipos:

Híbrido intergenérico: unión sexual entre individuos de diferentes géneros

Híbrido interespecífico: unión sexual entre individuos de diferentes especies

(Documento-7)

Su utilidad es la introducción de genes de especies silvestres en especies cultivadas.

-Objetivos:

- Transferencia de genes específicos
- Síntesis de híbridos asexuales
- Nuevas especies híbridas

-Metodología:

- Retrocruzamiento
- Propagación asexual de los híbridos
- Varias hibridaciones y mejoramiento de la “nueva especie”

El principal problemas que nos vamos a encontrar es el de la esterilidad de la F1

-Debido a:

- Falta de homología cromosómica¹³
- Genotipo
- Nivel de ploidía

Mejora del Tritordeum

- Factores citoplasmáticos

-Soluciones:

- Duplicación cromosómica
- Uso de genotipos específicos
- Manipulación del nivel de ploidía
- Cambio de la dirección del cruzamiento

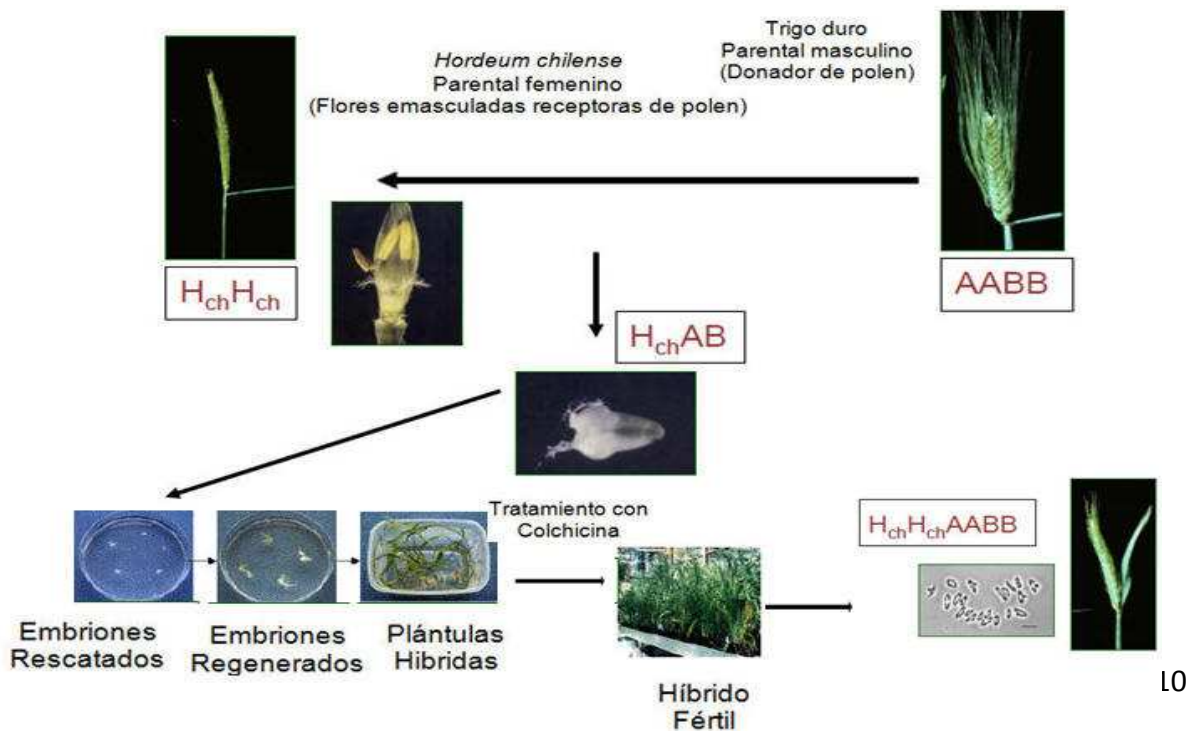
La duplicación cromosómica de uno de estos híbridos supone la rotura de una de las barreras de la esterilidad y la posibilidad de propagarse y establecerse en su nicho ecológico.

(Documento-8)

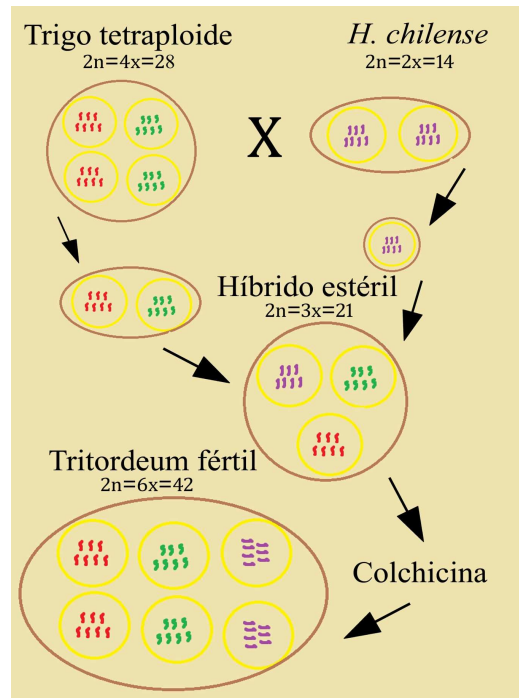
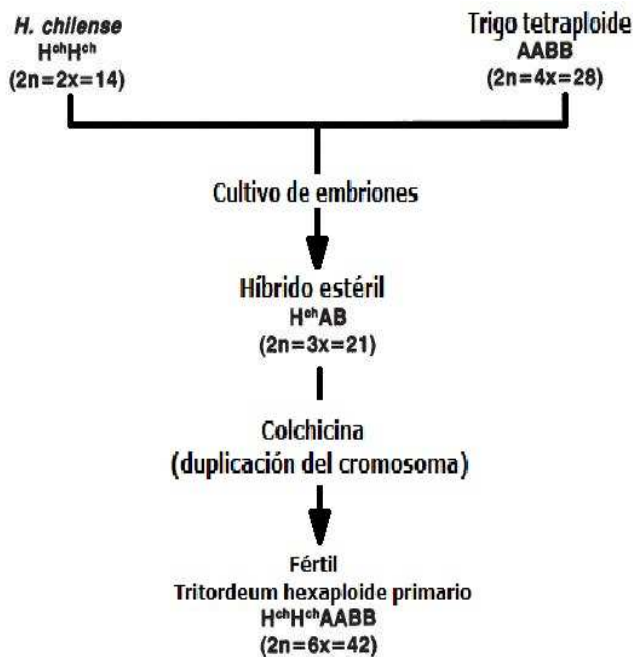
2.2.1 HIBRIDACIÓN INTERGENÉRICA.

El tritordeum, se obtiene mediante una hibridación intergenérica, entre los géneros *Hordeum* (*Hordeum chilense*) y *Triticum* (*Triticum durum*), como se muestra a continuación.

(Documento-6)



Mejora del Tritordeum



(Documento-6)

(Elaboración propia)

2.3 OBJETIVO DE MEJORA:

El principal objetivo de mejora, ha sido mejorar el tritordeum con el fin de obtener un nuevo cultivo. Una vez conseguido este nuevo cereal, el objetivo de mejora está más enfocado a incrementar el valor añadido que puede aportar esta nueva especie de cereal; obtención de líneas con un elevado contenido en luteína, fibra soluble, antioxidantes fenólicos y microelementos.

Otros objetivos de mejora son: plantas resistentes a herbicidas, mejorar las calidades harino-panaderas y obtención de tritordeum que promuevan la trilla perfecta.

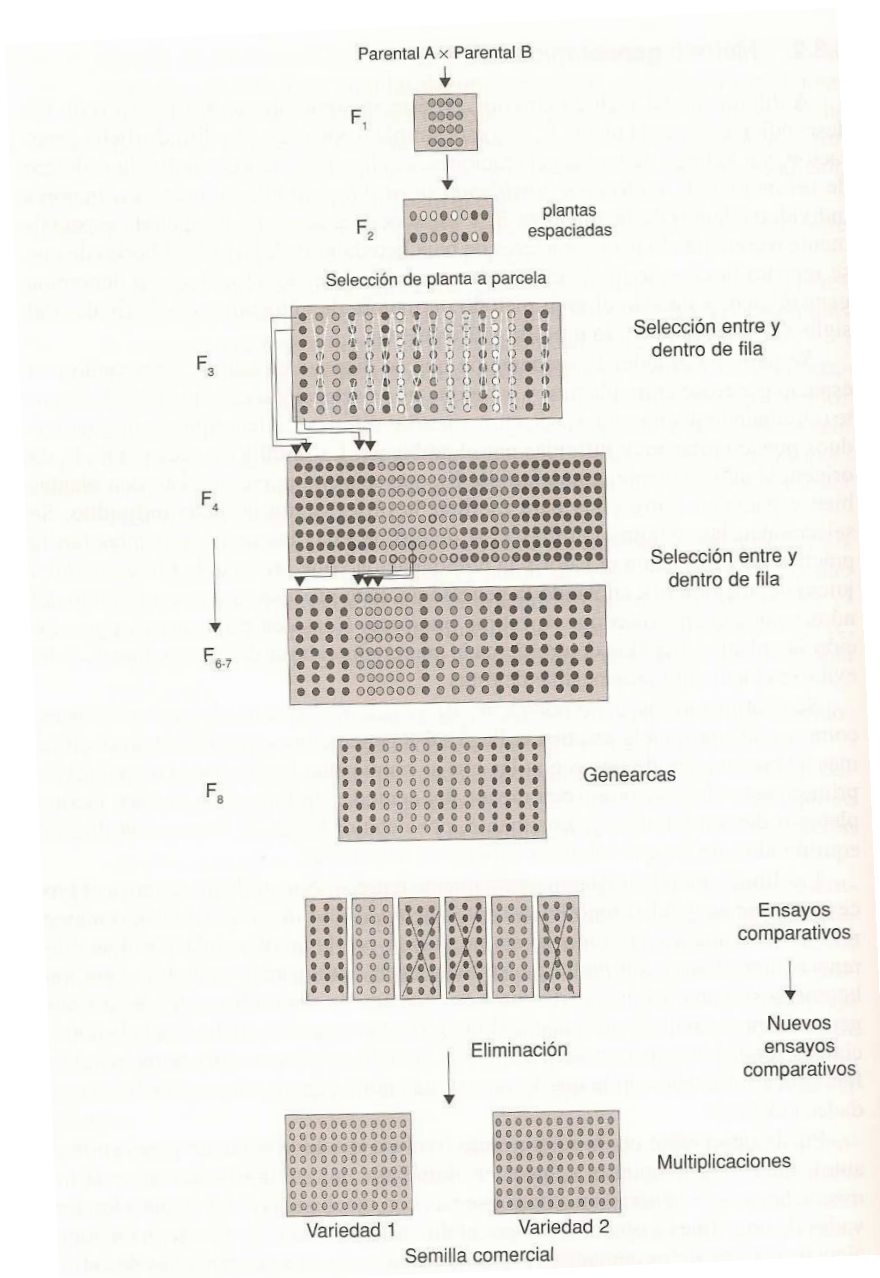
Además, en las líneas más avanzadas se están buscando variaciones de otros componentes funcionales tales como: composición de almidón, azúcares, vitaminas o distintos perfiles de proteínas.

Otro de los objetivos de la mejora del tritordeum es la ampliación de la base genética para mejorar la calidad del pan y trigos duros. Con respecto a esto, podría ser usado como una especie puente para transferir propiedades del *H. chilense* al trigo independientemente de usarlo como un nuevo cultivo.

3 METODOS DE MEJORA

3.1 METODO GENEALOGICO CLASICO

Este método sigue un control riguroso de los descendientes de cada planta F₂. A partir de dicha generación, y a lo largo de varias generaciones, se eligen los mejores individuos dentro de las mejores F₃, luego los mejores individuos dentro de las mejores F₄ y así sucesivamente. Es un método especialmente recomendado para carácter de baja heredabilidad¹². Debido al hecho de que se registran las genealogías de cada individuo seleccionado, el método se denomina genealógico, y ha sido el gran método de mejora de autógamias desde finales del siglo XIX.



(Libro-2)

Mejora del Tritordeum

Se parte de grandes F_2 , generación que se disponen en campo sembrando con espacio generoso entre plantas, y en la que no se selecciona más que negativamente (eliminando plantas enfermas, etc.), pues las diferencias fenotípicas entre individuos pueden estar muy influidas por el ambiente. La semilla de cada planta F_2 da origen, el año siguiente, a una familia F_3 , que se siembra en un surco con plantas bien espaciadas entre ellas para facilitar la observación de cada individuo. Se seleccionan las mejores familias F_3 y dentro de ellas las mejores plantas (en la práctica de 1 a 3 según el valor y la homogeneidad que presente la fila o familia a juicio del mejorador), anotando la genealogía. Este proceso se repite a lo largo del número de generaciones que se estime oportuno. Como en cada sucesiva generación las plantas elegidas dentro de cada surco son cabeza de nuevas líneas, debe evitarse el aumento inmanejable de estas.

Se continúa así hasta homocigosis: 10-12 generaciones pueden ser suficientes; en la práctica se llega a 6-8 generaciones, que no debe producir más de un centenar de líneas con las que se comienzan los ensayos comparativos. El proceso debe continuarse hasta la homocigosis total, pero en la práctica finaliza cuando se alcanza una homogeneidad fenotípica suficiente como la que se supone una homocigosis adecuada a las necesidades prácticas.

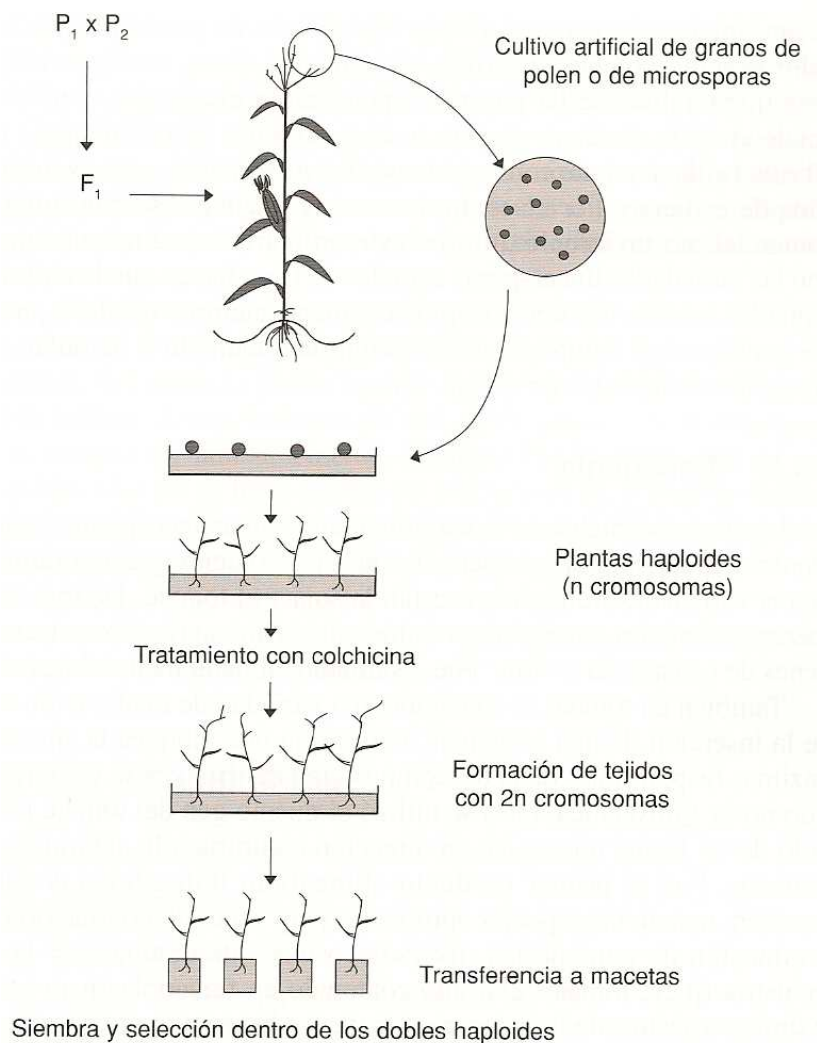
Mediante este método de mejora, se obtienen semillas certificadas.

(Libro-2)

3.2 METODO DE DOBLES HAPLOIDES

El método consiste en el cultivo artificial de granos de polen o de microsporas que dará lugar a plantas haploides con n cromosomas. Después tendrá lugar un tratamiento con colchicina⁵ para duplicar el cromosoma de estas plántulas y se formaran tejidos con $2n$ cromosomas. En un solo paso tenemos plantas totalmente homocigóticas.

Mejora del Tritordeum



(Libro-2)

Ventajas:

- Técnica relativamente simple.
- Fácil de inducir divisiones celulares en las células inmaduras que darán lugar al polen. Una proporción importante de anteras usadas en cultivo de tejido responden a esta metodología.
- Se puede obtener un número grande de haploides de forma rápida.
- Acorta el tiempo para obtener líneas homocigóticas.
- Evaluación de la variedad genética, permite el desenmascaramiento de genes recesivos que no se expresan en heterocigóticos
- Se pueden combinar este método con técnicas de Transformación génica para la obtención de plantas haploides.

Entre las desventajas que suelen citarse se cuentan las siguientes:

Mejora del Tritordeum

- En algunas especies la mayoría de las plantas obtenidas no son haploides.
- En cereales se obtienen muy pocas plantas normales (con clorofila). La mayoría de ellas son albinas o quimeras (albina-normal).
- Es tedioso remover las anteras sin dañarlas.

3.2.1 MÉTODO DE DOBLE HAPLOIDE APLICADO AL TRITORDEUM

Una avanzada línea de tritordeum (HT-31) que está bien adaptada a los campos de cultivo en Córdoba, ha sido usada como una planta experimental siendo cultivada en un ambiente controlado. En primer lugar se procede a la selección de las espigas que contienen las anteras que posteriormente vamos a cultivar. Éstas se someten a un tratamiento de frío previo (4°C durante 10 días), a continuación se cultivan las anteras en un medio de inducción (se utilizan 3 medios de hormonas diferentes) en placas de Petri y son incubadas en la oscuridad a 28 °C. Tras 6-7 semanas se trasladan a otro medio libre de hormonas y se incuban a 25°C con 16 horas de luz.

La frecuencia en las respuestas de las anteras fue medida como el número de embriones medidos en 100 placas Petri.

Para duplicar los cromosomas se utilizaron 2 métodos diferentes:

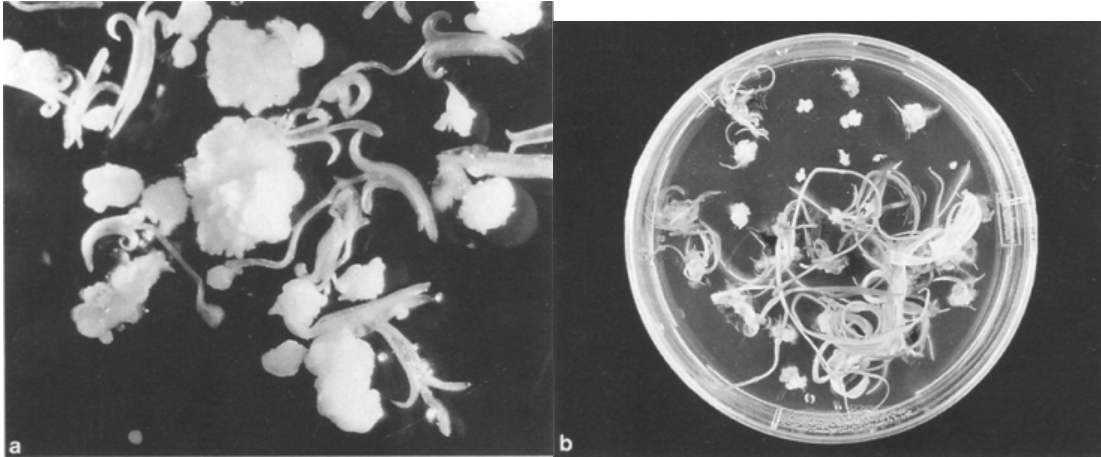
- A) Cultivo de las anteras en un medio que contiene un 0,02% de colchicina⁵. Después de 3 días es transferida al mismo medio pero sin colchicina⁵ para terminar su desarrollo. Para contar el número de cromosomas somáticos, las puntas de las raíces de las plantas que ya han crecido totalmente se mezclan en alcohol. Utilizamos el método de Feulgen¹⁶.
- B) Se escogen aquellas plantas que se encuentran en el 4º o 5º estadio de hoja. Se cortan las puntas de las raíces, y el resto de la planta es inmersa en colchicina⁵ al 1,5 %. Se utilizaron también otras dos concentraciones de colchicina⁵ (0,05% y 0,25 %). Tras 5 horas la planta se baña en agua durante una hora y después se replanta.

Resultados:

- La diferencia en la frecuencia de las respuestas de las anteras con las tres diferentes combinaciones de hormonas no fue significativa.
- El tratamiento de frío aplicado a la espiga es beneficioso ya que aumenta la frecuencia del cultivo de las anteras.

Mejora del Tritordeum

- Un incremento del porcentaje de dobles haploides se produce cuando utilizamos en el método B un porcentaje de 0,25% con respecto al 0,05%. Sin embargo el método A con respecto al método B es más efectivo.
- El método A produce más dobles haploides fértiles que el método B.



Regeneración de plantas mediante el cultivo de anteras del tritordeum

(Documento-3)

3.3 MUTACION MEDIANTE EMS

La definición de mutación, a partir del conocimiento de que el material hereditario es el ADN y de la propuesta de la Doble Hélice para explicar la estructura del material hereditario (Watson y Crick, 1953), sería que una mutación es cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos del ADN.

La mutación es la fuente primaria de variabilidad genética en las poblaciones, mientras que la recombinación, al crear nuevas combinaciones a partir de las generadas por la mutación, es la fuente secundaria de variabilidad genética.

El objetivo de la mutación del tritordeum era conseguir plantas resistentes a herbicidas mediante EMS (etilmetanosulfonato): que produce fundamentalmente transiciones GC→AT (guanina y citosina a adenina y timina)

Métodos de mutación con el EMS:

1. Mutágenos que alteran las bases produciendo emparejamientos erróneos específicos: existen varios tipos de agentes mutagénicos que alteran las bases nitrogenadas produciendo emparejamientos erróneos

Mejora del Tritordeum

2. Agentes alquilantes: como el EMS que añade radicales etilo y produce transiciones GC→AT (ESTE ES EL UTILIZADO EN LA MUTACION DEL TRITORDEUM)
3. Hidroxilamina (HA): produce específicamente transiciones GC→AT.
4. Iones bisulfito y ácido nitroso: producen desaminación. El ácido nitroso transforma la Citosina (C) en Uracilo (U), el Uracilo (U) empareja con la Adenina (A) produciendo transiciones. La desaminación de las Adenina (A) la convierte en hipoxantina (H) que empareja con la Citosina (C) produciendo transiciones.

(Internet-2) (Internet-3)

TRITORDEUM MUTADO



(Documento Agrasys-2)

TRITORDEUM RESISTENTES A HERBICIDAS.



(Documento Agrasys-2)



(Documento Agrasys-2)

3.4 INGENIERIA CROMOSOMICA. LINEAS TRANSGENICAS DE TRITÓRDEO

Transformar genéticamente, significa, adicionar información genética novedosa a un genoma, lo cual modifica su fisiología original. Esto implica la introducción de genes en una célula o tejido con el uso de un vector (generalmente un plásmido) el cual lleva integrado los genes que se desean transferir.

Estas técnicas incluyen el uso de cultivos in vitro¹⁴, de tejidos vegetales, el cual es necesario para promover la formación de plantas fenotípicamente normales a través de dos vías principales:

-Organogénesis¹⁷, regeneración de las plantas a través de células

-Embriogénesis⁸ somática, consiste en el desarrollo de embriones a partir de células que no son el producto de una fusión gamética

Las técnicas de cultivo in vitro¹⁴³ han sido exitosamente aplicadas en el tritordeum

El método de transformación genética que se ha utilizado con el tritordeum ha sido el siguiente:

3.4.1 LA BIOBALÍSTICA:

Es un sistema universal, el cual ha tenido una aplicación muy amplia para el desarrollo de la ingeniería genética. La técnica consiste en disparar partículas de metal (oro o tungsteno) recubiertas con el material genético deseado (ADN purificado), impulsadas mediante descargas eléctricas, o presión de aire o gas. Actualmente el sistema de helio es el más utilizado y consiste básicamente en una cámara donde son colocados los tejidos vegetales, conectada a una bomba de vacío, que a su vez recibe el gas helio. En el momento del bombardeo de las partículas a los tejidos, se deja entrar el helio a una presión dada por la resistencia de una membrana, al romperse deja pasar el aire a presión e impulsa a la membrana que contiene las micropartículas recubiertas de ADN, de manera que estas son disparadas hacia los tejidos y al azar. Los tejidos bombardeados son incubados para producir plantas completas vía embriogénesis⁸ somática u organogénesis¹⁷.

Ventajas:

- Se incorporan los genes de manera directa y al azar, no debe existir una relación entre el vector y el tejido de la planta para que funcione como ocurre con el método de *Agrobacterium tumefaciens*¹⁵.

Inconvenientes:

- Costoso, suministros de alta calidad, y equipos y personal especializado en el tritordeum.

(Documento-5)

3.4.1.1 APLICACIÓN DE LA BIOBALÍSTICA EN EL TRITORDEUM

Las proteínas en las semillas de los cereales son particularmente importantes porque determinan la calidad de las variedades y su uso. En el trigo, concretamente un grupo de proteínas de almacenamiento, el de las subunidades de gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS), se considera el principal factor determinante de la visco-

Mejora del Tritordeum

elasticidad del trigo, propiedad que determinará que el trigo sea para pan, pastas u otros alimentos diferentes.

Los análisis comparativos entre tritordeum, trigo y triticale, confirman que el tritordeum tiene características más parecidas con el trigo panadero que con el trigo duro y triticale. Esto sugiere que tritordeo es más adecuado para la panificación que para hacer pasta.

Esto es particularmente interesante si consideramos que el tritordeum hexaploide no tiene genoma D, el cual está asociado con la propiedad de viscoelasticidad del trigo panadero. Un blanco atractivo para la mejora es la adición de G-APM (HMW-GS) codificados por el genoma: La introducción en tritordeum de los genes codificadores de G-APM(HMW-GS) 1Ax1 y 1Dx5

El material y método utilizados:

Dos líneas transgénicas de la línea HT28 tritordeum han sido evaluadas, bajo condiciones de campo (los ensayos de campo se llevaron a cabo en Córdoba), para rendimientos agronómicos y calidad del procesamiento. Una línea (línea 3) contiene el gen (subunidad 1Dx5) que codifica para el HMW-GS y el segundo (línea 8) dos genes (subunidades 1Ax1 y 1Dx5) que también codifican para el HMW-GS. Las dos líneas transgénicas mostraron rendimientos agronómicos similares, pero inferiores a la línea de control no transformadas.

La calidad panificable de las líneas tritordeum se estimó mediante un alveógrafo que mide cuatro parámetros principales. Se trata de la tenacidad (P), tomada como la altura de la curva, que mide la resistencia inicial a la extensión (que forma la burbuja); la longitud de la curva (L), que es un índice de extensibilidad de la masa, la relación P / L , lo que indica el equilibrio de los componentes visco-elásticas de la masa; y la energía de deformación (W).

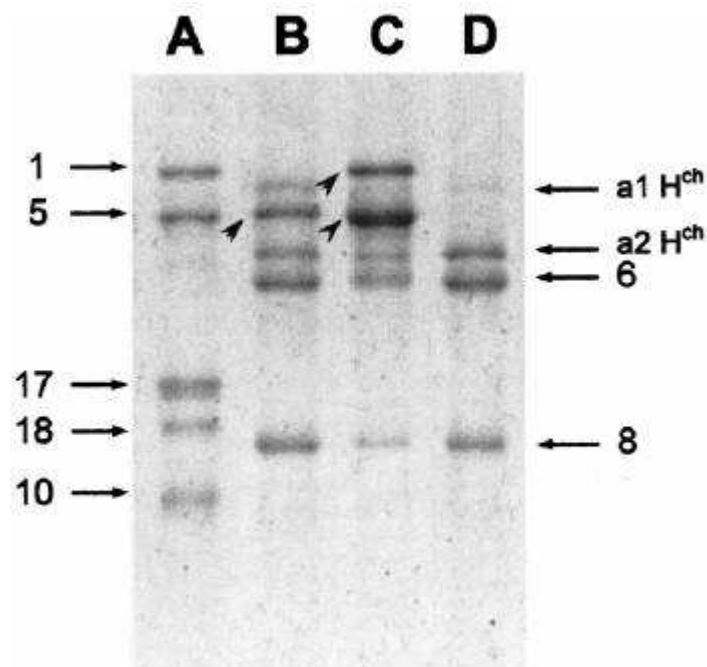
Estudios con un alveógrafo concluyeron que la adición de subunidad 1Dx5 (línea 3), que representaron el 27% del total de las HMW-GS, mejora claramente la calidad de la masa de tritordeum, el aumento de la tenacidad y la energía de deformación. Esta línea mostró propiedades de la masa tan buenas como las de una buena variedad de trigo panificable. En contraste, la adición de G-APM 1Ax1 y 1Dx5 juntos tenían poco efecto en la tenacidad, la extensibilidad o la energía de deformación en comparación con la línea HT28 de control, a pesar de que representaban el 25% y 37% de HMW-GS de la proteína total, respectivamente.

Mejora del Tritordeum

Las líneas transgénicas de tritordeum fueron obtenidas mediante bombardeo de partículas. Inflorescencias inmaduras de líneas HT28 de tritordeum se transformaron con una combinación de dos plasmidios: el p1Dx5 que contiene un fragmento de genoma que codifica para la activación e inhibición del gen de la HMW-GS o el p1Ax1 que contiene un fragmento del genoma que codifica para la HMW-GS.

Calidad panadera de las líneas transgénicas

HT28 tritordeo expresa dos HMW-GS codificadas por el genoma de *H. chilense* (Etiquetado como A1 y A2 en la figura. 1) y dos subunidades (1Bx6, 1By8) codificada por el cromosoma 1B del parental de trigo duro. Este no expresa HMW-GS codificado por el genoma A del trigo duro y carece del genoma D del trigo panadero.

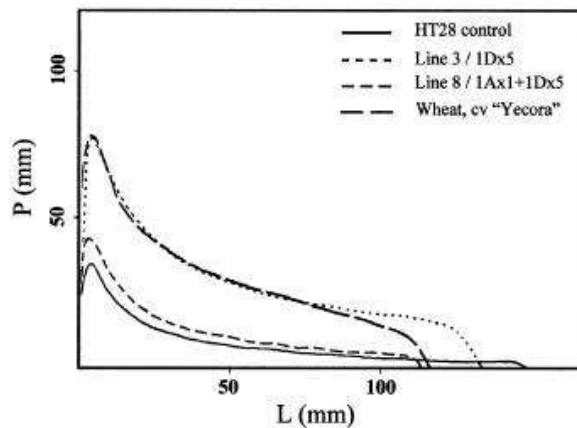


(Figura-1)

Las líneas de tritordeum HT28 presentan características similares a algunas variedades de trigos panaderos que se cultivan en España como “Marius” o “Chamorro”, excepto en la extensibilidad (L) que es ligeramente superior. Sin embargo, la adición de subunidades transgénicas 1Ax1 y/o 1Dx5 modifican sustancialmente las propiedades visco-elásticas. La adición de subunidades 1Dx5 (línea 3) dio como resultado significativos aumentos en la tenacidad (P) y en la energía de deformación (W), y una pequeña reducción en la extensibilidad (L), por lo tanto la relación P/L y la energía de deformación se ven incrementadas. Esto indica que la masa tiene un mejor equilibrio visco-elástico y mayor resistencia que la de la línea de control, dando al tritordeum calidades como las de una buena variedad de trigo panadero, ejm. Var.

Mejora del Tritordeum

Yécora (figura2). En contraste la adición de subunidades 1Dx5 y 1Ax1 juntas tuvo poco efecto sobre la tenacidad (P), extensibilidad (L) o energía de deformación (W) en comparación con las líneas de control HT28.



(Figura-2)

El presente trabajo, pone de manifiesto que la expresión de la subunidad 1Dx5 sola en tritordeo dio lugar a la mejora de la calidad de la masa sin ser detectado anomalías.

En resumen, la adición de subunidad 1Dx5 mejora claramente la calidad de la masa de tritordeo, el aumento de la tenacidad y la energía de deformación y proporcionar una masa más equilibrada de calidad. Mejorando el rendimiento panadero, así como la mejorar de la calidad de la elaboración de pasta o fideos. Sin embargo, los rendimientos agronómicos de las líneas transgénicas fueron menores que los que se dieron en la línea de control.

(Documeto-4)

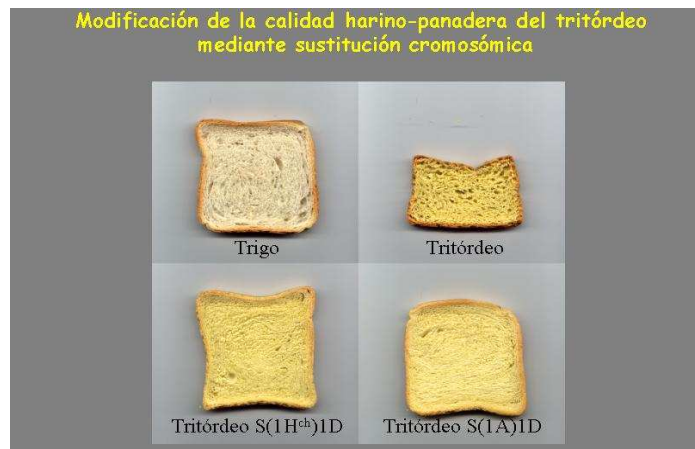
3.4.2 INTROGRESIÓN

Se utilizo este método para mejorar la calidad panadera del cultivo del tritordeo. Introgresion del cromosoma 1D en el tritordeum

Los usos de tritordeum hexaploide como un cultivo para el consumo humano requiere la mejora de sus calidades panaderas. El cromosoma 1D de trigo panadero codifica las subunidades de gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS) DX5 y DY10. Diferentes tritordeo primarios fueron cruzados con trigos portadores de subunidades DX5 y DY10. Los híbridos de tritordeum fueron retrocruzados siendo seleccionados aquellos con presencia del cromosoma 1D. Cuarenta y dos plantas portadoras de las subunidades fueron obtenidas después de dos retrocruzamiento.

Mejora del Tritordeum

Para la verificación de la introgresión del cromosoma 1D en el tritordeum se utiliza la hibridación in situ fluorescente (FISH¹¹).

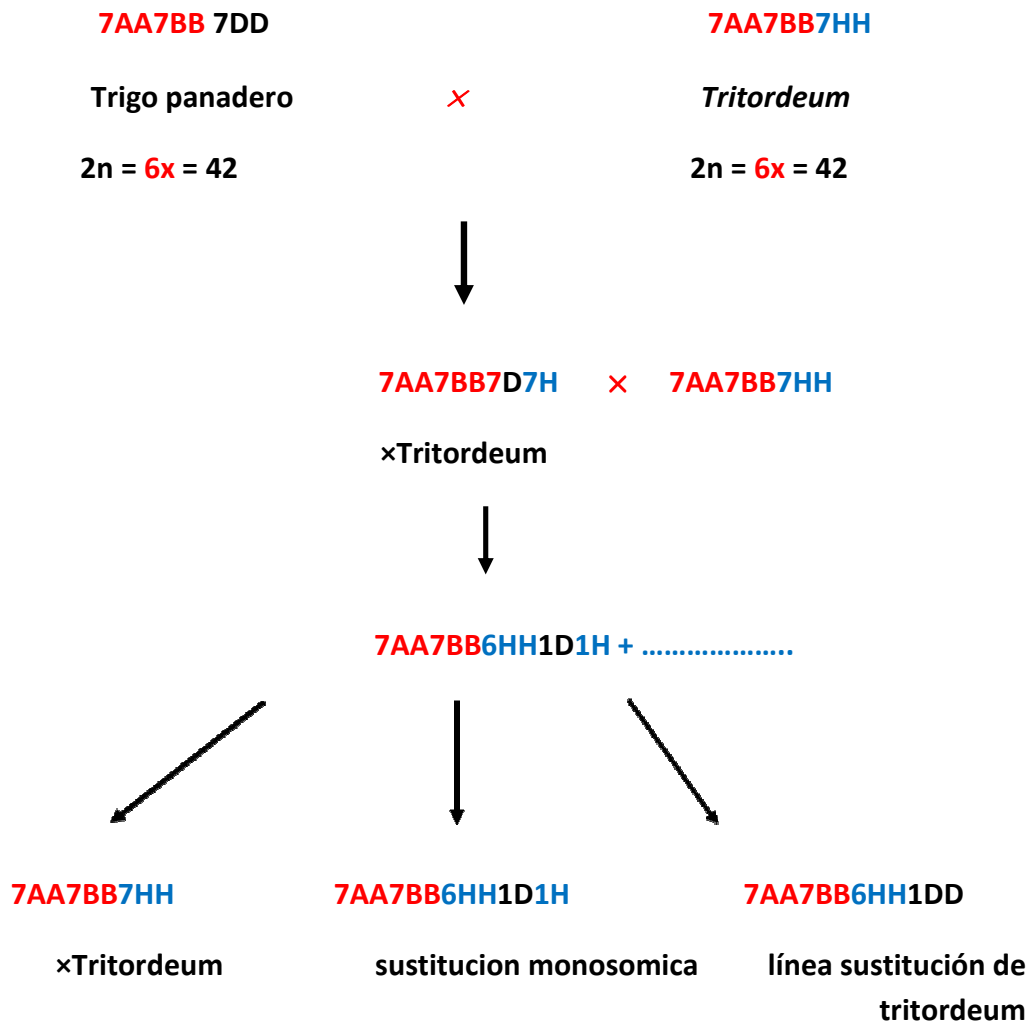


(Documento Agrasys-3)

El pan de tritordeum tiene color amarillo por el alto contenido en pigmentos carotenoides de su harina. También hemos mejorado la calidad de la harina panadera mediante sustituciones cromosómicas. Se ha sustituido el cromosoma 1H^{ch} de Hordeum chilense por el cromosoma 1D del tritordeum hexaploide.

(Documento-2)

INTROGRESIÓN DEL CROMOSOMA 1D DENTRO DEL TRITORDEUM



(Documento Agrasys-3)

TRITORDEUM SIN MEJORAR



(Documento Agrasys-2)

TRITORDEUM MEJORADO



(Documento Agrasys-2)

El tritórdeo de la izquierda es el híbrido duplicado (sin mejora) el de la derecha el resultado de 30 años de Mejora. Entre otras cosas tiene un brazo cromosómico de chilense sustituido por otro de trigo que promueve la trilla perfecta.

(Documento Agrasys-2)

3.5 RETROCRUZAMIENTO

Consiste en cruzar el híbrido de la F_1 con el parental con objetivo de incluir en este una característica que no posee, recuperando al final del proceso todo el resto de su propio genotipo. Es un procedimiento de uso universal, enormemente eficaz para un sinnúmero de operaciones Genéticas y en Mejora.

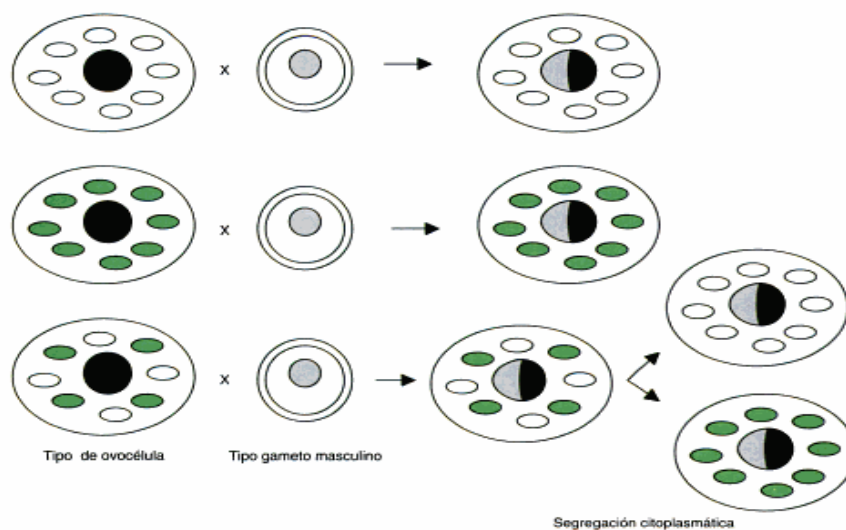
Existen diferentes tipos de retrocruzamiento:

Mejora del Tritordeum

mitocondrias. Aunque la influencia del ADN mitocondrial está bastante inexplorada, su influencia ha sido descrita en diversas características como la tolerancia al calor o la resistencia a la fusariosis en la espiga de cereales.

Uno de los mejores métodos para conocer las interacciones entre núcleo y citoplasma, es mediante retrocruzamientos.

En todos estos cruces *H. chilense* actúa como parental femenino. Consecuentemente el tritordeum hexaploide primario tiene el *H. chilense* citoplasmático; esto es debido a que los cloroplastos son aportados exclusivamente por el parental femenino, existiendo una distribución aleatoria de los cloroplastos de la célula madre a las dos células hija como podemos observar en el siguiente esquema.



(Libro-3)

Para evaluar los efectos del citoplasma en características agronómicas mediante retrocruzamientos, el genoma del tritordeum hexaploide (A) primario se introduce en el citoplasma de *T. aestivum* (B), *T. turgidum* (B) y *H. chilense* (B) para producir líneas aloplasmáticas¹ de tritordeum. Sería ((AxB)xB)xBxB... donde B representa la especie cultivada cuyo citoplasma va a ser sustituido por el de la especie A. Sin embargo, los efectos del citoplasma no cambiaron los caracteres ya estudiados.

(Libro-4)

Mejora del Tritordeum

Otro método para evaluar los efectos del citoplasma en características agronómicas es mediante cruces recíprocos.

Se llevan a cabo alternando el parental masculino y femenino. Esto permite obtener líneas F1 idénticas en su genoma pero con ADN mitocondrial diferentes. Se desarrollaron 4 pares de líneas de F1 recíprocas. La línea de tritordeum usada es THC1377 que posee el citoplasma del trigo parental. Ésta es cruzada con otros 4 tritordeum (HT61, HT111, HT126, HT141) que poseen el citoplasma de *H. chilense* alternando el parental masculino y femenino. Posteriormente se evaluó el rendimiento obtenido en esta F1: fertilidad de las principales espigas, peso de la planta, número de hojas y tallos un mes después de la siembra, número de espiguillas por espiga, longitud y anchura de la hoja bandera y fecha de antesis³.

Como conclusión las características obtenidas no eran diferentes unas de otras a excepción de la fecha de antesis³, por lo tanto podemos decir que tanto el citoplasma del trigo como del *H. chilense* pueden ser empleados en la mejora del tritordeum

(Libro-3)

4 POTENCIAL DEL CULTIVO Y SUS APLICACIONES

Los hexaploides primarios de tritordeum muestran una buena fertilidad, estabilidad cromosómica¹⁰ y similitudes morfológicas con el trigo junto con un alto contenido proteico en el grano, esto fue lo que llevo a los investigadores a estudiar el potencial agronómico de esta nueva especie.

Trigos panaderos (AABB), triticales (AABBDD) y tritordeum ($H^{ch}H^{ch}AABB$) fueron comparados junto con los parentales del trigo duro AABB. Las producciones esperadas para los tritordeum fueron similares a los del triticales y trigos panaderos. Y por lo tanto se podía considerar como un nuevo cultivo.

Tanto tritordeum primario como trigos panaderos sintetizados tienen menores granos y niveles de biomasa más bajos, índice de rendimientos menores que sus parentales de trigo panadero y que el triticales. Sin embargo la proteína contenida en los trigos panaderos obtenidos fue más baja que las del trigo parental, mientras que la proteína contenida en el tritordeum fue más alta que la de su trigo parental. Estos datos evidencia el potencial del tritordeum primario para llegar a ser considerado como un cultivo.

Mejora del Tritordeum

Uno de las claves del alto potencial del tritordeum es debido a que presenta un parental salvaje (*H. chilense*).

El metabolismo del nitrógeno y las características fotosintéticas ha sido estudiado en el tritordeum y sus parentales. Estos procesos son esenciales para determinar el crecimiento y el rendimiento de las especies cultivadas. Tritordeum hexaploide presenta un sistema de absorción mucho más eficaz que el trigo parental. Estas características son debidas al parental femenino *H. chilense* y es posible obtener tritordeum con mayor potencial de absorción de nitrógeno del suelo que el trigo, y por lo tanto incrementar los niveles proteicos.

El tritordeum es más eficaz en el uso del agua por este motivo. Tiene un mayor potencial para climas mediterráneos secos y cálidos debido a mejores conformaciones estomáticas y fotosintéticas.

Tritordeum se cultiva usando las técnicas clásicas de cultivo. Crece bien con pocos cuidados, resistente a la sequía, al calor y a enfermedades. Actualmente se está cultivando en España (Andalucía).

Está protegido en Europa en la CPVO⁶ (Oficina comunitaria de variedades oficiales)

(Documento-6)

5 CUALIDADES ORGANOLÉPTICAS

El tritordeum tiene cualidades y funcionalidades diferentes de otros cereales, por lo que ofrece oportunidades para producir alimentos funcionales basados en cereales novedosos. Aparte de sus cualidades nutricionales y funcionales, el tritordeum tiene unas cualidades organolépticas muy buenas. Sus productos tienen un gusto agradable y una estabilidad en el aroma y sabor.

Ciertos componentes del tritordeum proporcionan beneficios nutricionales para la salud, favoreciendo la función intestinal y combatiendo la obesidad y la diabetes, reduciendo la incidencia del cáncer de colon y mejorando la salud cardiovascular. La luteína, presente hasta diez veces más que en el trigo harinero, está fuertemente implicada en el mantenimiento de la salud ocular, actuando contra la degeneración macular.

Existen líneas de tritordeum disponibles para ser utilizadas en varias aplicaciones cerealistas, incluyendo pan, galletas, bizcochos, cereales, etc. Agrasys y

sus socios están trabajando en el desarrollo de otras aplicaciones del tritordeum en alimentación.

El tritordeum ofrece a los usuarios de cereales la posibilidad de desarrollar productos innovadores con valiosas propiedades nutricionales y funcionales en un amplio espectro de aplicaciones cerealistas. El tritordeum es el único cereal nuevo presente en el mercado que es apto para consumo humano.

(Documento-6)

6 CALIDAD PANADERA

Una propiedad fundamental del tritordeum es su contenido en proteínas de gluten que lo hacen apto para hacer pan, diferenciándolo de otros cereales como la cebada y la avena que no se pueden usar para hacer pan blando.

Las proteínas almacenadas de ambos genomas, cebada y trigo, son las responsables de la calidad del tritordeum.

Siendo el parental el *Triticum durum* que son destinados para pasta, el tritordeum tendrá sin embargo, mejores calidades panaderas. En la siguiente tabla comprobamos a que es debido y lo comparamos con trigo duro, triticale y trigos panaderos.

	TRITORDEUM	TRITICALE	TRIGO DURO	TRIGOS PANADEROS
Contenido en proteína/gluten seco (%)	87,1	52,8	77,9	81,0
Caroteno (ppm)	12,7	3,5	5,6	2,1
Vitrosidad (%)	11,0	2,0	74,0	4,0
Dureza (%)	35,0	38,8	19,9	31,0
Rendimiento harina (%)	66,5	61,3	60,5	63,5

(Documento Agrasys 4)

Tritordeum tiene bajos niveles de vitrosidad y dureza, y altos rendimientos de harina. Esto sugiere que el tritordeum es más adecuado para panificación que para

Mejora del Tritordeum

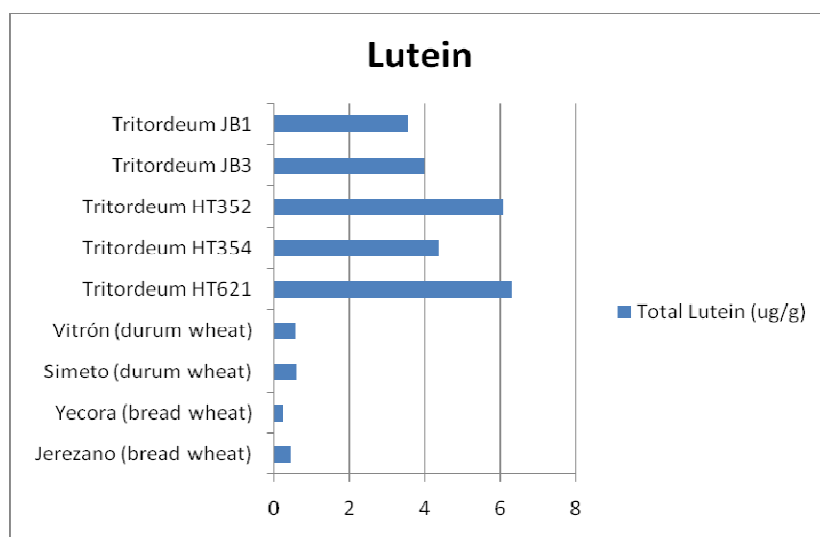
hacer pasta. Esto es más interesante al saber que el tritordeum carece del genomio D del trigo parental siendo este asociado con las propiedades para hacer pan del trigo blando.

Tritordeum tienen características de calidad similares que los trigos blandos pero diferentes del triticale y trigo duros.

Una de las características de la harina obtenida del tritordeum es su intenso color amarillo debido al alto contenido de pigmentos carotenoides.

6.1 LUTEINA

Carotenoides antioxidantes: Elevado contenido de luteína (10-20 veces más que trigo), con una acción antioxidante que protege los ojos de la degeneración macular y de los efectos nocivos de la luz del sol. Ayuda a proteger la piel de los rayos UV.



(Documento Agrasys 4)

Luteína total(ug/g)								
Jerezano (bread wheat)	Yecora (bread wheat)	Simeto (durum wheat)	Vitrón (durum wheat)	Tritordeum HT621	Tritordeum HT354	Tritordeum HT352	Tritordeum JB3	Tritordeum JB1
0,43	0,25	0,6	0,57	6,31	4,35	6,07	3,97	3,55

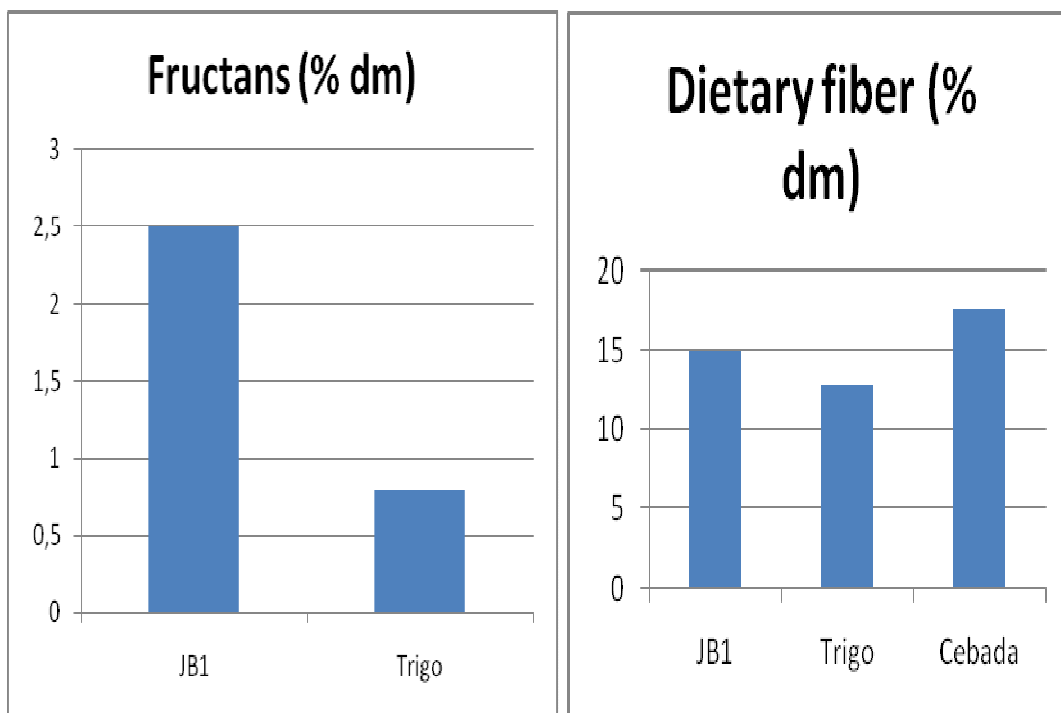
(Documento Agrasys 4)

6.2 FIBRA DIETETICA

Tritordeum tiene niveles de fibra dietética que permite etiquetar productos derivados con el símbolo “keyhole”. Este símbolo ayuda a los consumidores a elegir productos saludables (Swedish National Food Administration)

Fibra dietética: en una proporción más elevada que el trigo, principalmente de arabinoxilanos con efectos positivos en la salud cardiovascular

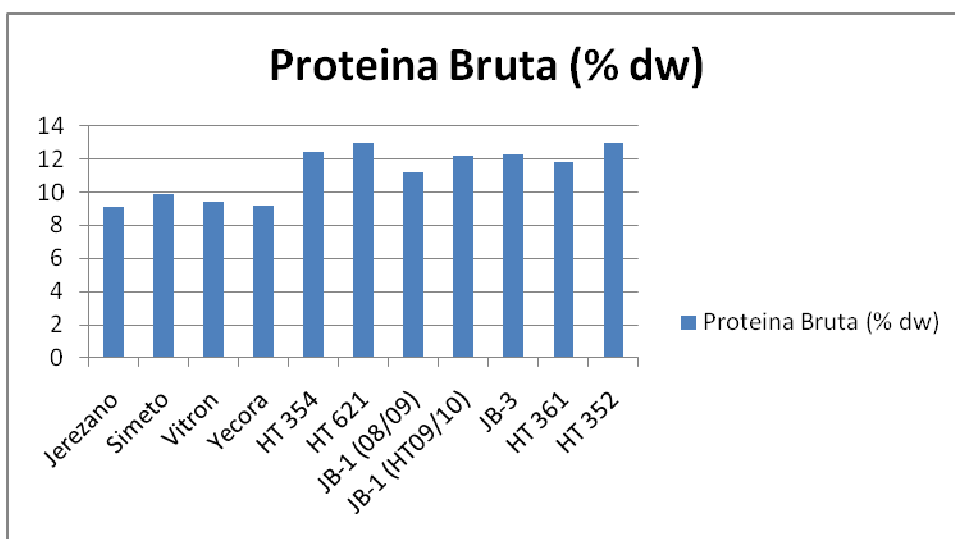
Fructanos: Compuestos de acción prebiótica, que contribuyen a mantener en buen estado la flora bacteriana intestinal.



(Documento Agrasys 4)

6.3 PROTEINA

Proteína: nivel superior a la del trigo. Bueno contenido de gluten y de aminoácidos esenciales



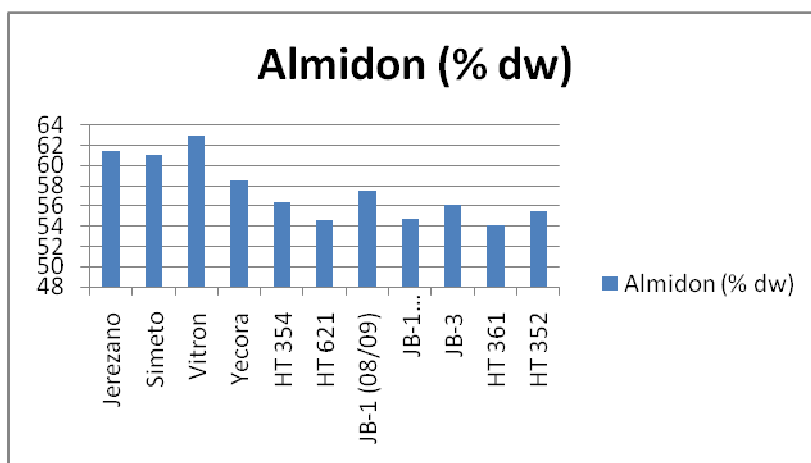
(Documento Agrasys 4)

Proteína Bruta (%dw ⁷)								
Jerezano (bread wheat)	Yecora (bread wheat)	Simeto (durum wheat)	Vitrón (durum wheat)	Tritordeum HT621	Tritordeum HT354	Tritordeum HT352	Tritordeum JB3	Tritordeum JB1
9,1	9,2	9,9	9,4	13	12,4	13	12,3	12,2

(Documento Agrasys 4)

6.4 ALMIDON

Presenta un alto contenido en almidón.



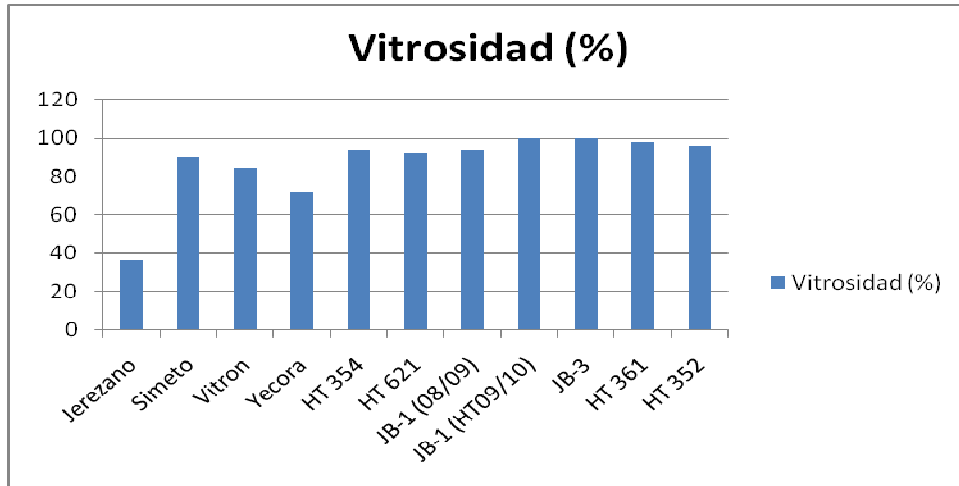
(Documento Agrasys 4)

Almidón (% dw ²)								
Jerezano (bread wheat)	Yecora (bread wheat)	Simeto (durum wheat)	Vitrón (durum wheat)	Tritordeum HT621	Tritordeum HT354	Tritordeum HT352	Tritordeum JB3	Tritordeum JB1
61,41	58,46	61,08	62,94	54,63	56,38	55,5	56,16	57,47

(Documento Agrasys 4)

6.5 VITROSIDAD

Presenta altos niveles de vitrosidad.



(Documento Agrasys 4)

Vitrosidad (%)								
Jerezano (bread wheat)	Yecora (bread wheat)	Simeto (durum wheat)	Vitrón (durum wheat)	Tritordeum HT621	Tritordeum HT354	Tritordeum HT352	Tritordeum JB3	Tritordeum JB1
36	72	90	84	92	94	96	100	100

(Documento Agrasys 4)



(Documento Agrasys 3)

Tritordeo HT352 (izq) y trigo duro 'Yavaros'(dcha)

(Documento-6)

7 CONCLUSIONES GENÉTICAS

Tritordeum, siendo hexaploide, presenta características agronómicas, morfofisiológicas, químicas, físico-químicas y reológicas⁴ similares a los trigos panaderos. Aunque las líneas de tritordeum analizadas a día de hoy para panificación representan solo una pequeña fracción de la variabilidad genética disponible en el programa de reproducción o mejora del tritordeum como un nuevo cultivo, una gran variabilidad genética ha sido detectada para todas estas características.

Estos estudios han sugerido que la variabilidad podría ser debida además de la conocida influencia de las proteínas del trigo, a la variación en el almacenamiento de las proteínas codificadas por el genoma de *H. chilense*.

Se considera que el papel de tritordeum en la industria alimentaria podría ser similar al del trigo panadero, una vez resuelto los problemas relacionados con la trillada a la hora de la cosecha.

H. chilense podría ser útil como una fuente valiosa de propiedades para la mejora del trigo.

Además de su resistencia a factores bióticos y abióticos *H. chilense* podría contribuir a la ampliación de la base genética para mejorar la calidad del pan y trigos duros.

Con respecto a esto, tritordeum podría ser usado como una especie puente⁹ para transferir propiedades del *H. chilense* al trigo independientemente de usarlo como un nuevo cultivo.

(Documento-6)

8 IMPORTANCIA ECONOMICA

“Vivagran®”, es la marca registrada de tritordeum, un nuevo cereal que ofrece a las compañías de alimentación la posibilidad de desarrollar nuevos productos naturales con propiedades nutricionales muy valiosas. Es una respuesta ideal a las tendencias de mercado actual y a las necesidades del consumidor. Tritordeum es un nuevo cereal con buenas propiedades organolépticas y con características saludables y funcionales que permiten el desarrollo de una amplia gama de productos con valor añadido. Agrasys posee los derechos exclusivos de comercialización y puede ofrecer exclusividad a empresas de su interés. Tritordeum está protegido a nivel Europeo y “Vivagran®” es su marca registrada. Actualmente la compañía produce el nuevo cereal con Semillas *Miluma*, una empresa andaluza, pero mantiene contactos con otras compañías productoras de grano y de semillas y empresas alimentarias –como la multinacional sueca *Lantmannen*, primer productor europeo de pan y masas congeladas– para vender tanto los derechos de producción como de incorporación y comercialización de este ingrediente a otros productos acabados, pasteles, galletas, pastas, barritas energéticas y cereales de desayuno, alimentos infantiles, productos dietéticos, productos enriquecidos con cereales, cervezas, yogurts y alimentación animal.

Ya que su contenido de proteínas de gluten lo hacen apto para la elaboración de pan, una aplicación que no tienen otros cereales conocidos como la cebada o la avena, es la aplicación saludable. El objetivo actual de la empresa es obtener nuevas variedades de este cereal con nuevas características funcionales, ya que se trata de un producto que tiene cualidades y funcionalidades específicas, que no se encuentran en otros cereales, lo que abre una vía a la producción de productos innovadores en el ámbito de los alimentos funcionales, un hecho que responde a la demanda del consumidor actual y a las nuevas tendencias de mercado.

Según explica Pilar Barceló, directora general de Agrasys, “cualquier empresa que esté interesada en probar este producto o incorporarlo a otros que produzca puede dirigirse a nosotros para recibir una muestra y hablar de los derechos de

comercialización. Estamos abiertos a diferentes modelos. En Europa, nuestro modelo es trabajar de forma directa tanto con los productores de grano como con los fabricantes de productos a partir de los cereales y de sus ingredientes. Fuera de Europa, nuestro modelo es vender los derechos a una o varias empresas para que sean ellas las que hagan esta labor, ya que nosotros no nos planteamos llegar a mercados tan lejanos”.

(Internet-1)

9 GLOSARIO

1. Aloplasmática (heteroplasmático): cuyas células tienen el núcleo de una especie cultivada que se pretende mejorar, mientras que el citoplasma procede de una especie extraña. Es decir la información genética intraespecífica introducida queda reducida a la contenida en los orgánulos citoplasmáticos. Desde el punto de la mejora de las plantas, la utilización más importante de aloplasmia es la obtención de plantas androestériles que permite producir híbridos y, en consecuencia, explotar comercialmente la heterosis o vigor híbrido
2. Aneuploidia: cambios en el número de cromosomas. Un aneuploide es un individuo cuyo número de cromosomas difiere del tipo salvaje en parte de su dotación cromosómica, debido a uno o varios cromosomas extra o ausente.
3. Antesis: es el periodo de florecencia o floración de las plantas con flores; estrictamente, es el tiempo de expansión de una flor hasta que está completamente desarrollada y en estado funcional, durante el cual ocurre el proceso de polinización, si bien es frecuentemente usado para designar el período de floración en sí; el acto de florecer.
4. Características reológicas: *“Estudio de los principios físicos que regulan el movimiento de los fluidos”* aplicado a cereales las propiedades reológicas básicas son la consistencia, viscosidad, elasticidad y plasticidad.
5. Colchicina: es un fármaco antimitótico que detiene o inhibe la división celular en metafase o en anafase. Es un compuesto que evita el reparto de los cromátidas de un cromosoma durante la mitosis, provocando la poliploidía de la célula filial, ya que aunque no haya separación, sí hay duplicación del material genético. Su efecto se debe a su acción sobre las proteínas citoesqueléticas del huso mitótico.

6. CPVO (Oficina comunitaria de variedades oficiales): esta oficina es una agencia de la Unión Europea, que gestiona un sistema de derechos de variedades vegetales que engloba a 27 Estados miembros.
7. Dw: peso seco
8. Embriogénesis: en plantas es el conjunto de procesos fisiológicos que conducen a la transformación de una sola célula, el cigoto, en un individuo multicelular más complejo, contenido en la semilla madura.
9. Especie puente: especie con alta trazabilidad. No interesa en el proceso de transmisión génica, no es ni portadora ni receptora de los genes objeto de estudio, por lo que se desecha. Sirve para hacer de nexo entre dos especies diferentes.
10. Estabilidad cromosómica: se mantiene la integridad génica de las células
11. FISH: es una técnica de marcado de cromosomas en la que se provoca que los cromosomas específicos brillen bajo el microscopio. Esta técnica permite la rápida determinación de aneuploidía, la ausencia del cromosoma completo o la presencia de un cromosoma adicional, así como la adjudicación de un marcador genético a un cromosoma
12. Heredabilidad: la proporción de la variación fenotípica en una población, atribuible a la variación genotípica entre individuos. La variación entre individuos se puede deber a factores genéticos y/o ambientales.
13. Homología cromosómica: especies con el mismo número de cromosomas de las células somáticas.
14. In vitro: se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo, o generalmente en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.
15. Método *Agrobacterium*: vector biológico que posee un megaplasmido el cual transmite el ADN transferido.
16. Método de Feulgen: específica para detectar la presencia de ADN, algunos hidratos de carbono y lípidos.
17. Organogénesis: conjunto de cambios que permiten que las capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) se transformen en los diferentes órganos que conforman un organismo. Debemos recordar, que antes de esto, ocurre la formación de órganos rudimentarios, quiere decir, la formación de órganos sin forma ni tamaño definido.

10 BIBLIOGRAFÍA

10.1 DOCUMENTOS

1. Atienza S.G., Ramírez M.C., Martín A and Ballesteros J. Effects of reciprocal crosses on agronomic performance of tritordeum. (2006)
2. Ballesteros J, Álvarez J., Giménez M., Cabrera A. and Martín A. Introgression of 1Dx⁵ + 1Dy10 into tritordeum (2004)
3. Barceló P., Cabrera A., Hagel C. and Lörz H. Production of doubled-haploid plants from tritordeum anther culture (1993)
4. Barro F., Barceló P., Lazzeri P. A., Shewry P. R., Martín A and Ballesteros J. Functional Properties and Agronomic Performance of Transgenic Tritordeum Expressing High Molecular Weight Glutenin Subunit Genes 1Ax1 and 1Dx5 (2002)
5. Gutiérrez M. Antonia/ Santacruz R. Fernando/ Cabrera P. José L./ Rodríguez G. Benjamín. Mejoramiento genético vegetal in vitro. (2003)
6. Martín A., Alvarez J.B., Martion L.M., Barros F. and Ballesteros J. The development of tritordeum: A novel cereal for food processing (1998)
7. Pascual Trillo, J.A. El arca de la biodiversidad
8. Speranza Pablo. Curso de Fitotecnia

10.2 LIBROS

1. Bernardo Angeles, Jouve M., Soler Consuelo. El triticale, un cereal de origen citogenético /
2. Cubero J.I. Introducción a la mejora genética vegetal.(1999)
3. Fernández Pigueras José, Fernández Peralta Antonia María, Santo Hernández Javier, González Aguilera Juan José. Genética (2002)
4. Lacadena Juan Ramón. Citogenética (1996)

10.3 DOCUMENTACION APORTADA POR AGRASYS

1. Presentación Agrasys VIVAGRAN 2010
2. Documento Agrasy uno
3. Documento Agrasys dos
4. Documento Agrasys tres

10.4 INTERNET

1. www.agrasys.es
2. www.plant.uoguelph.ca/research/biotech/haploid/haploids.htm
3. www.prodiversitas.bioetica.org
4. www.ucm.es/info/genetica/grupod/Mutacion/mutacion.htm