



Universidad de Murcia
Departamento de Biología Vegetal



Centro de Edafología y Biología
Aplicada del Segura

**TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DEL
ALBARICOQUERO (*Prunus armeniaca* L.),
MEDIADA POR *Agrobacterium*, Y
REGENERACIÓN DE PLANTAS
TRANSFORMADAS**

César Petri Serrano

Director:
Dr. Lorenzo Burgos

**Tesis Doctoral
Murcia, 2005**

ÍNDICE

RESUMEN -----	7
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS -----	11
INTRODUCCIÓN-----	15
<i>El albaricoquero</i> -----	17
Descripción taxonómica y botánica de la especie-----	17
Importancia económica del cultivo-----	18
Mejora genética del albaricoquero -----	19
<i>Regeneración</i> -----	22
Regeneración indirecta -----	23
Regeneración directa-----	24
Factores que afectan la regeneración -----	25
El explanto -----	25
Componentes del medio de regeneración -----	27
Condiciones de cultivo-----	28
Genotipo -----	28
<i>Transformación</i> -----	32
Técnicas directas -----	32
Técnicas indirectas -----	33
Genes marcadores -----	37
Marcadores de selección-----	38
Marcadores de información (“genes chivatos”) -----	39
Factores que afectan la eficiencia de transformación y la regeneración de planta transformada-----	41
El explanto -----	41
La técnica-----	41
Selección de transformantes -----	43
<i>Plantas comercializadas que han sido genéticamente modificadas</i> -----	45
<i>Transformación genética de frutales leñosos</i> -----	48
Cítricos-----	48
Kiwi -----	49
Manzano -----	50
Nogal-----	51
Peral-----	54
Vid-----	54
<i>Transformación genética de especies de Prunus</i> -----	56
Albaricoquero (<i>Prunus armeniaca</i> L.)-----	56
Almendro (<i>Prunus dulcis</i> [Miller] D.A. Webb) -----	57
Cerezo (<i>Prunus avium</i> L.), guindo (<i>Prunus cerasus</i> L.) y patrones de cerezo -----	58
Ciruelo (<i>Prunus domestica</i> L.)-----	59
Melocotonero (<i>Prunus persica</i> L.) -----	60
<i>Estado actual y perspectivas de futuro</i> -----	66
MATERIALES Y MÉTODOS-----	71
<i>Material vegetal</i> -----	73
Helena-----	73
Canino -----	73
<i>Optimización de la regeneración</i> -----	75
Estrategia general de regeneración-----	75
Efecto del volumen de medio -----	76
Efecto del agente solidificante-----	76
Efecto del medio de proliferación-----	76
Efecto de inhibidores de la acción del etileno -----	76
Efecto de las poliaminas solas o en combinación con los inhibidores del etileno -----	77

Efecto de pulsos con auxinas-----	77
<i>Efecto de los antibióticos sobre el material no transformado</i> -----	78
Efecto de los antibióticos en la regeneración-----	78
Antibióticos aminoglicósidos para seleccionar plántulas transformadas -----	78
Antibióticos para controlar el crecimiento de <i>Agrobacterium</i> -----	78
Efecto de los antibióticos sobre la proliferación-----	79
Efecto de los antibióticos sobre el enraizamiento -----	79
<i>Ensayos previos a la transformación</i> -----	81
Cepas bacterianas -----	81
Infectividad de las cepas oncogénicas de <i>Agrobacterium</i> en albaricoquero (en invernadero)----	83
Curvas de crecimiento de <i>Agrobacterium</i> -----	83
Infectividad de las cepas desarmadas (<i>in vitro</i>)-----	84
Detección y evaluación de los genes marcadores-----	86
Detección y evaluación del gen <i>sgfp</i> -----	86
Detección y evaluación del gen <i>uidA</i> (<i>gus</i>) -----	86
<i>Experimentos de transformación</i> -----	88
Establecimiento de un protocolo básico de transformación -----	88
Factores que afectan la virulencia de <i>Agrobacterium</i> -----	91
Aplicación de acetosiringona en el medio de cocultivo-----	91
Aplicación de acetosiringona en el medio de cultivo de <i>Agrobacterium</i> -----	91
Influencia del pH del medio de cocultivo-----	92
Tratamientos de las hojas con celulasa-----	92
Transformación en vacío-----	92
Producción de microheridas en las hojas mediante pinzas o sonicación-----	92
Factores que afectan al estado fisiológico de la planta-----	93
Retraso de la transformación -----	93
Efecto sinérgico de las poliaminas y los inhibidores del etileno -----	94
Influencia de pulsos de auxinas -----	94
Producción y cultivo de callos transformados -----	94
Evaluación molecular de los callos transgénicos. -----	95
PCR-----	95
Southern blot -----	96
<i>Selección de plántulas transformadas</i> -----	97
Selección con kanamicina -----	98
Efecto de los antibióticos aminoglicósidos en la selección y estímulo del crecimiento de las células transformadas-----	98
Selección progresiva con paromomicina-----	98
Recuperación de brotes transformados-----	99
Evaluación molecular de las plantas transformadas -----	100
PCR-----	100
Southern blot -----	101
<i>Tratamientos estadísticos</i> -----	102
RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	103
<i>Optimización de la regeneración</i> -----	105
Efecto del volumen de medio -----	105
Efecto del agente solidificante -----	106
Efecto del estado fisiológico de los explantos -----	108
Efecto de los inhibidores de la acción del etileno -----	109
Efecto de las poliaminas solas o en combinación con los inhibidores del etileno-----	114
Efecto de los pulsos de auxinas -----	118
Descripción del protocolo optimizado -----	120
<i>Efecto de los antibióticos sobre material no transformado</i> -----	122
Efecto de los antibióticos sobre la regeneración -----	122
Antibióticos aminoglicósidos para seleccionar plántulas transformadas -----	122
Antibióticos para controlar el crecimiento de <i>Agrobacterium</i> -----	127
Efecto de los antibióticos sobre la proliferación -----	129
Efecto de los antibióticos sobre el enraizamiento -----	131

<i>Ensayos previos a la transformación</i> -----	135
Infectividad de las cepas oncogénicas-----	135
Infectividad de las cepas desarmadas-----	137
Evolución de la transformación transitoria y estable-----	138
<i>Experimentos de transformación</i> -----	141
Establecimiento de un protocolo básico de transformación-----	141
Factores que afectan la virulencia de <i>Agrobacterium</i> -----	144
Aplicación de acetosiringona-----	144
Influencia del pH del medio de cocultivo-----	146
Efecto de otros tratamientos-----	148
Factores que afectan el estado fisiológico de la planta-----	148
Retraso de la transformación-----	148
Influencia de pulsos de auxinas y efecto sinérgico de las poliaminas y los inhibidores del etileno-----	149
Evaluación molecular de los callos transgénicos-----	151
Descripción del protocolo de transformación-----	153
<i>Selección de plantas transformadas</i> -----	156
Selección con kanamicina-----	156
Evaluación de diferentes antibióticos aminoglicósidos sobre las células transformadas-----	157
Estrategias de selección con paromomicina-----	159
Comparación con la misma construcción utilizando <i>gus</i> -----	163
Producción y recuperación de brotes transformados-----	165
Detección de los genes chivatos-----	169
Evaluación molecular-----	173
Descripción del protocolo de selección-----	174
CONCLUSIONES-----	177
BIBLIOGRAFÍA-----	181



RESUMEN

En términos económicos, el albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) es una de las especies más importantes dentro de los frutales de hueso. Sin embargo, la aparición y expansión del virus de la sharka (*Plum Pox Virus*, PPV) amenaza con reducir la extensión de este cultivo en Europa. Varios programas de mejora en Francia, Grecia, Italia y España intentan introducir la resistencia a Sharka, mediante mejora tradicional, utilizando como fuentes de resistencia variedades que en la mayoría de los casos son autoincompatibles. El objetivo final de estos programas de mejora es la obtención de nuevas variedades autocompatibles, resistentes a Sharka y con buena calidad agronómica y comercial para su utilización en las regiones Mediterráneas.

La transformación genética podría permitir la obtención de variedades mejoradas de forma discreta (por ejemplo resistencia a un determinado herbicida, toxicidad frente a insectos) en un plazo relativamente corto. Con esta tecnología se pueden mejorar variedades de gran interés agronómico, y consecuentemente económico, introduciendo genes que confieran una ventaja sin modificar ningún otro carácter del individuo. Una vez introducido el carácter de interés (asumiendo estabilidad en la expresión del transgén) dado que la forma de propagación habitual de las variedades comerciales es vegetativa (mediante injerto) se puede producir una cantidad ilimitada de material vegetal de la línea transformada. Además, el hecho de que la mayoría de la producción se basa en unas pocas variedades en el caso de muchas especies como peral, manzano, guindo y cítricos, hace que el impacto de la variedad transformada pueda ser mucho mayor.

Para la aplicación de la mayoría de estas técnicas genéticas a la mejora vegetal se requiere una regeneración *de novo* eficiente de plantas a partir de células y cultivo de tejidos. Sólo unos pocos años atrás la regeneración de especies de frutales leñosos era considerada difícil o imposible. Sin embargo, actualmente existen numerosos artículos científicos en los que se da cuenta de la regeneración con éxito de plantas a partir de material adulto de variedades establecidas.

En esta tesis se ha optimizado un protocolo de regeneración a partir de material adulto de las variedades 'Helena' y 'Canino', desarrollado previamente en

nuestro laboratorio, aumentando la tasa de regeneración más de un 200% en el caso de la variedad 'Helena'.

Mediante el estudio de los diversos factores que afectan la transformación de material adulto, se ha establecido por primera vez un protocolo eficiente de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de una variedad comercial de albaricoquero.

El diseño de una estrategia de selección gradual con paromomicina ha permitido la regeneración de plántulas transformadas con los genes marcadores *npII* y *sgfp* o *gus*, con las eficiencias más elevadas que se han publicado hasta el momento para transformar material adulto en especies del género *Prunus*, aunque la baja viabilidad de las yemas transformadas redujo el número final de plantas obtenidas.

El protocolo establecido en esta tesis sienta las bases que permitirán la introducción de genes de interés agronómico y comercial, modificando de manera discreta variedades élite aceptadas y establecidas en el mercado.



***JUSTIFICACIÓN Y
OBJETIVOS***

La mejora genética clásica de las especies de *Prunus* es un proceso que presenta serias limitaciones. La producción de descendientes de cruzamientos controlados supone la recolección y preparación del polen de los parentales masculinos, la estratificación, germinación de las semillas y establecimiento de las plántulas en campo. La posterior evaluación de descendientes para llevar a cabo la selección de los individuos sobresalientes debe esperar a que terminen los prolongados periodos de juvenilidad característicos de este material vegetal, de 3 a 6 años. La inversión en tierra de cultivo y mano de obra necesaria para el cuidado de los árboles es considerable. Generalmente, desde que se planta una semilla híbrida hasta el registro o patente de una nueva variedad transcurren entre 10 o 15 años, según la especie.

Determinados caracteres, como la resistencia a Sharka, tienen la dificultad añadida de que las fuentes de resistencia se encuentran en variedades muy alejadas y mal adaptadas a nuestras condiciones de cultivo y/o en especies diferentes. Esto implica que el tiempo necesario para obtener una variedad resistente será mucho mayor, pues aunar los caracteres de resistencia y de calidad suficientes para que la obtención tenga una aceptación comercial podría requerir varias generaciones de descendientes de cruzamientos controlados. Para otros caracteres, como el gusano cabezudo (*Capnodis tenebriosis*) o ciertos hongos patógenos, ni siquiera existen fuentes conocidas de resistencia en el germoplasma de albaricoquero.

La ingeniería genética se está convirtiendo en una tecnología muy poderosa y revolucionaria que ofrece una alternativa para superar las limitaciones de la mejora clásica mediante la introducción de genes, hasta ahora no disponibles para los mejoradores de plantas, y de esta manera proporcionar la posibilidad de realizar cambios discretos que confieran el carácter deseado sin que se modifiquen el resto de características que hacen que una determinada variedad sea aceptada por los agricultores y consumidores.

En una región como la nuestra donde la fruticultura tiene una gran importancia económica es vital contar con grupos de investigación capaces de utilizar estas nuevas tecnologías para aplicarlas a la consecución de objetivos de interés económico para las empresas y agricultores de la región. Enmarcado en el

programa de mejora genética que se lleva a cabo en el Departamento de Mejora de Frutales del CEBAS, existe el interés de desarrollar esta tecnología el albaricoquero. Determinados problemas como la obtención de variedades resistentes al virus de la Sharka se podrían afrontar de forma mucho más eficiente que por medio de la mejora clásica.

Para la aplicación de la mayoría de estas técnicas genéticas a la mejora vegetal se requiere una regeneración *de novo* eficiente de plantas a partir de células y cultivo de tejidos. Solo unos pocos años atrás la regeneración de especies de frutales leñosos era considerada difícil o imposible. Sin embargo, actualmente existen numerosos artículos científicos en los que se da cuenta de la regeneración con éxito de plantas a partir de material adulto de variedades establecidas.

Después de que se desarrollaran protocolos eficientes de micropropagación de albaricoquero (Pérez-Tornero y Burgos, 2000) y se diseñara por primera vez un protocolo reproducible de regeneración a partir de material adulto (Pérez-Tornero *et al.*, 2000) en el Departamento de Mejora de Frutales del CEBAS, el siguiente objetivo, y primero de esta tesis, es optimizar al máximo el protocolo de regeneración establecido para poder transformar genéticamente variedades de albaricoquero.

El segundo objetivo, y fundamental del presente trabajo, es la obtención y optimización de un protocolo de transformación genética de material adulto de albaricoquero mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Disponer de un protocolo eficiente de transformación con genes marcadores permitirá en un futuro modificar genéticamente variedades de albaricoquero para introducir cambios pequeños y discretos de forma controlada.



INTRODUCCIÓN

EL ALBARICOQUERO

Descripción taxonómica y botánica de la especie

El albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) pertenece a la familia de las Rosáceas, subfamilia *Prunoidea*, género *Prunus*, y subgénero *Prunophora*. A este género corresponden un amplio grupo botánico de árboles y arbustos, tanto de hoja caduca como perenne, con origen en Oriente Medio. La importancia económica de este grupo reside en sus frutos con más de 100 especies cultivadas, aunque también existen variedades de determinadas especies cuyo uso principal es como plantas ornamentales. Requieren un clima templado, entre las latitudes 30° y 45° Norte y Sur, soportando temperaturas de hasta -20°C en invierno, pero el momento crítico se sitúa en primavera, ya que los órganos florales son muy sensibles a las bajas temperaturas en estas fechas. También pueden ser perjudiciales los inviernos demasiado templados, al no cubrirse las necesidades de frío invernal, que oscilan entre 350 y 1100 horas por debajo de 7°C según cultivares (Rodrigo y Herrero, 2002), lo que puede provocar anomalías en la floración.

La mayoría de los albaricoqueros cultivados pertenecen a la especie *P. armeniaca*. Esta especie es diploide ($2n = 16$), de flores solitarias, blancas o rosadas. El árbol es de porte globoso, raíz pivotante, tronco erguido, corteza parda y hojas



brillantes alternas y puede alcanzar entre 3 y 7 metros de altura. El fruto es una drupa de 3 cm o más de diámetro, de color amarillento. El hueso es liso, presentando una costilla gruesa asurcada. Dentro de la especie *P. armeniaca* existe una gran diversidad varietal. En Europa, por ejemplo, hay descritos más de 1.300 cultivares diferentes (Audergon, 1995). Por otro lado, existen censados en el mundo más de 60 bancos de germoplasma de albaricoquero, según la Comisión de Recursos Fitogenéticos de la FAO.

Importancia económica del cultivo

El albaricoque es dentro del grupo de los frutos con hueso la segunda especie en importancia, aunque muy lejos del melocotonero y mucho más localizada geográficamente por sus peculiares exigencias ecológicas. La superficie dedicada en España al cultivo del albaricoquero son unas 22.000 ha en Murcia, Valencia, Albacete, Baleares y Aragón principalmente (Tabla 1), de las que la mayoría son regadíos, solamente se censan unas 1.300 ha de secano.

Tabla 1.- Superficie dedicada al cultivo de albaricoquero.

Comunidad autónoma	Superficie (ha)
R. DE MURCIA	13.434
C. VALENCIANA	4.356
ARAGON	1.699
CASTILLA LA MANCHA	1.279
BALEARES	506
CATALUÑA	392
NAVARRA	160
ANDALUCIA	61
EXTREMADURA	43
CANARIAS	31
CASTILLA Y LEON	7
GALICIA	3

Fuente: MAPYA, 2004. (<http://www.mapya.es/>)

Durante los últimos años la producción mundial de albaricoques ha oscilado en torno a los 2,5 millones de toneladas (t), concentrándose en los países ribereños del mediterráneo más de la mitad de la producción mundial. La producción de

albaricoques por países, en el año 2004, está encabezada por Turquía seguida de Irán e Italia (Tabla 2).

En cuanto al destino de la producción se constata que, aproximadamente, entre un 10% y un 20% de la misma se dirige a la exportación como fruto fresco (entre 12.000 y 30.000 t), figurando España como primer país exportador europeo, seguido de Francia y Grecia. Alrededor del 30% se dedica a la industria de transformación, quedando para el consumo interno en fresco del orden del 50-60% de la producción nacional. No obstante, el consumo medio “per capita” español (2 kg/hab. año) se sitúa por debajo de Grecia (3 kg/hab. año) e Italia, Suiza y Austria (2,5 kg/hab. año), por encima de Francia, Portugal (1 kg/hab. año) y Alemania, Bélgica y Países Bajos (0,3 kg/hab. año) (Egea *et al.*, 1994a).

Tabla 2.- Principales países productores en el 2004.

País	Producción (miles de t)
Turquía	440
Irán	280
Italia	209
Francia	157
Pakistán	135
España	126
Siria	100
Ucrania	100
Marruecos	98
E.E.U.U.	87
TOTAL MUNDIAL	2.685

Fuente: FAOSTAT database, 2004 (<http://apps.fao.org/>)

Mejora genética del albaricoquero

La revolución biotecnológica, basada en el desarrollo de nuevas estrategias derivadas de técnicas de genética microbológica y molecular, incluye la selección a escala celular, el rescate de embriones, la fusión de protoplastos, y la tecnología del ADN recombinante. Esta última, también conocida como ingeniería genética, se ha convertido en la tecnología más poderosa y revolucionaria de la nueva genética. Estas técnicas ofrecen una alternativa para superar las limitaciones de la mejora

clásica mediante la introducción de genes, hasta ahora no disponibles para los mejoradores de plantas, y de esta manera producir cambios pequeños, discretos y definidos en genotipos establecidos.

La mejora clásica ha producido variedades élite en casi todas las especies pero tiene el inconveniente de que la obtención de una variedad mejorada en una especie leñosa requiere tiempos muy largos dados los prolongados periodos juveniles característicos de estas especies. Las variedades comerciales de *Prunus*, con la excepción del melocotonero que es autocompatible, incluyen genotipos autocompatibles y autoincompatibles, incluso en algunas especies, como el caso del almendro y del cerezo, casi todas las variedades son autoincompatibles. Esto implica la recolección del polen de los parentales masculinos deseados, la emasculación manual de las flores del parental femenino en el caso de variedades autofértiles, la polinización manual, la recolección de las semillas de los frutos, la estratificación y germinación de las semillas, el cultivo en invernadero de los descendientes, su plantación en campo y la posterior evaluación y selección de los descendientes de fenotipo superior. El tiempo mínimo necesario desde que se planta la nueva semilla hasta que se patenta una nueva variedad en *Prunus* es de 10 años, aunque en algunos casos es muy superior.

En los últimos años la biotecnología ha desarrollado técnicas con las cuales podemos obtener variedades mejoradas de forma discreta (por ejemplo resistencia a un determinado herbicida, toxicidad frente a insectos) en un plazo relativamente corto, mediante transformación genética. Con esta tecnología podemos obtener variedades mejoradas a partir de otras variedades de gran interés agronómico y consecuentemente económico e introducir genes que confieran una ventaja sin modificar ningún otro carácter del individuo. Una vez introducido el carácter de interés (asumiendo estabilidad en la expresión del transgén) dado que la forma de propagación habitual de las variedades comerciales es vegetativa (mediante injerto) se puede producir una cantidad ilimitada de material vegetal de la línea transformada. No hay necesidad de fijar el carácter por medio de cruzamientos. Además, el hecho de que la mayoría de la producción se basa en unas pocas

variedades en el caso de muchas especies, como peral, manzano, guindo y cítricos, hace que el impacto de la variedad transformada pueda ser mucho mayor.

Las principales líneas de mejora en *Prunus* están enfocadas en la búsqueda de resistencia a enfermedades y plagas, cambios en el crecimiento, tolerancia a condiciones ambientales adversas y control de la maduración de frutos. Los objetivos son obtener plantas resistentes a virus, bacterias, nemátodos e insectos sin necesidad de ningún tratamiento químico, o bien plantas de porte más pequeño consiguiendo una mayor productividad en la misma superficie de cultivo. Modificar el periodo de floración y el control de la maduración permitiría al agricultor obtener cosechas fuera de las temporadas de mayor saturación de los mercados y alargar la presencia de una determinada fruta en el mercado. En lo que se refiere a la tolerancia a climas adversos se podría extender el cultivo de determinadas especies a latitudes donde hace unos años era impensable.

En albaricoquero los programas de mejora se concentran principalmente en la obtención de nuevas variedades resistentes al virus “plum pox virus” (PPV), autocompatibles y que presenten buenas características agronómicas y comerciales. Los primeros trabajos de mejora del albaricoquero en el mundo se inician en la primera mitad de siglo en la Unión Soviética dirigidos por Vavilov. Hacia mediados de siglo, otros países como Estados Unidos y Francia inician importantes programas de mejora. En el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) se plantaron las primeras familias procedentes de cruzamientos controlados en 1991. A este programa se unió en 1993 un equipo del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Estos programas introducen la resistencia a PPV mediante métodos de mejora convencionales a partir de fuentes de resistencia, la mayoría de las cuales son albaricoqueros norteamericanos. Estas variedades resistentes al virus se adaptan mal a nuestras condiciones climáticas, son autoincompatibles y, en ocasiones, la calidad del fruto no es buena. Esto implica la entrada de estos caracteres no deseables en el germoplasma autóctono y, por tanto, el análisis de los descendientes para seleccionar los individuos con frutos de calidad, resistentes a PPV y autocompatibles.

REGENERACIÓN

Para poder llegar a transformar las distintas especies es necesario establecer protocolos eficientes de micropropagación (cultivo *in vitro*) y regeneración. La importancia de tener una buena técnica de micropropagación reside en que podremos multiplicar vegetativamente nuestra variedad de manera sencilla y económica, obteniendo así un gran número de individuos genéticamente idénticos en un corto espacio de tiempo. Disponer de un protocolo de regeneración es indispensable como paso previo a la transformación de modo que a partir de una o varias células transformadas sea posible obtener un individuo adulto con las características deseadas. Pocos años atrás, la regeneración *in vitro* de especies frutales leñosas era considerada difícil o imposible y los protocolos de regeneración de algunas de estas especies han sido descritos sólo recientemente. Debido a que la biotecnología permitiría la alteración discreta de uno o más caracteres, un objetivo fundamental de la investigación actual y futura es desarrollar rutas de regeneración eficientes que impliquen el uso de explantos cuyo origen sea material adulto de variedades ya establecidas comercialmente o selecciones avanzadas de los programas de mejora.

Al contrario que en animales, donde la diferenciación celular es generalmente irreversible, en plantas, incluso en células maduras y diferenciadas, se retiene la capacidad para volver al estado meristemático. El proceso de reversión de una célula diferenciada a un estado meristemático se denomina desdiferenciación. La capacidad inherente de una célula vegetal para dar una planta completa (una capacidad que es, con frecuencia, retenida incluso después de que experimente una diferenciación final en la planta) es conocida como totipotencia celular. Para que una célula diferenciada exprese su totipotencia es necesario que primero experimente una desdiferenciación y a continuación una nueva diferenciación que la capacita para responder a ciertos estímulos del cultivo o ambientales (Bhojwani y Razdan, 1986). En otras palabras, la célula adquiere competencia y va a poder expresar su potencial organogénico.

Las células que han adquirido competencia para la morfogénesis *in vitro* están preparadas para expresar un patrón de desarrollo en un apropiado medio ambiente *in vitro*. El patrón de desarrollo está determinado por los constituyentes del medio y por factores genéticos y epigenéticos. Aunque algunas especies pueden regenerar a partir de tejido somático de acuerdo a protocolos estándar, otras especies cercanas podrían no responder a los mismos protocolos. Las dificultades para regenerar ciertos genotipos podrían ser debidas a que la adquisición de competencia, inducción y diferenciación celular estarían mediadas de diferente manera en cada genotipo (Litz y Gray, 1992).

La inducción de formación de yemas en tejido somático (hojas, tallos, raíces o tejidos florales) se denomina regeneración somática o adventicia u organogénesis somática, y generalmente se considera que puede ser indirecta si existe una formación intermedia de callo o directa si ocurre sin callogénesis (Figura 1).

Regeneración indirecta

En el caso de organogénesis indirecta a partir de hojas, los callos organogénicos se inician por división celular de las capas celulares del mesófilo, especialmente alrededor del tejido vascular, en los primeros 2-6 días después de poner el explanto en el medio de cultivo. Las células comienzan a dividirse al azar y se forman grupos pequeños y densos de centros meristemáticos (meristemoides) aproximadamente 6 días después del cultivo. En el medio de inducción, los centros meristemoides se agrandan, y cada uno de ellos forma eventualmente un montículo en la superficie del explanto. Los primordios foliares son visibles 14-25 días después del inicio del cultivo (Welander, 1988). En brotes adventicios bien definidos el tejido vascular se continúa con la masa de callo subyacente.

La propagación por regeneración indirecta conlleva el riesgo de que las plantas regeneradas difieran genéticamente de la planta madre, lo que se denomina variación somaclonal. Debido a esto, el uso de callos para su posterior propagación no es recomendado a menos que tengan una naturaleza altamente organizada. La variación somaclonal es más frecuente en plantas regeneradas por organogénesis

indirecta que las formadas por embriogénesis indirecta (formación de embriones somáticos), al menos en algunas especies (George, 1993).

Regeneración directa

La organogénesis somática puede ocurrir también directamente desde el explanto sin la formación de callo. Esta forma de regeneración ha sido observada raramente o es desconocida en algunas especies, y en los casos en los que se ha descrito las evidencias histológicas han sido, en ocasiones, insuficientes para confirmar estas observaciones (Litz y Gray, 1992).

Un ejemplo de organogénesis directa fue el observado por Welander y Maheswaran (1992) en la regeneración de hojas de patrones micropropagados de manzano. Un examen histológico reveló que el principal origen de los brotes fueron células de parénquima del mesófilo no diferenciadas localizadas alrededor del tejido vascular. El primer cambio se produjo dentro de la primera semana y consistió en el aumento del tamaño de los explantos por división activa de las células parenquimáticas. Durante los siguientes 7 a 14 días continuó la actividad meristemática de las células sub-epidérmicas y se produjo la formación de los primordios de los brotes adventicios que rompieron la superficie del explanto.

Algunas veces la regeneración directa está acompañada por proliferación celular local, que en algunos casos da lugar a la formación de un callo primario, por lo que para decidir si la morfogénesis ha sido directa o no se requiere un estudio histológico de los tejidos (George, 1996). La formación de este callo puede ser reducida, normalmente, por ajuste de los reguladores del crecimiento del medio de cultivo (George, 1993).

Factores que afectan la regeneración

El explanto

La mayoría de los autores utilizan como explantos hojas obtenidas de brotes micropropagados (Ainsley *et al.*, 2000; Pérez-Tornero *et al.*, 2000; Hammatt y Grant, 1998; Bassi y Cossio, 1991). Normalmente, las hojas son seccionadas con cortes perpendiculares al eje vascular aunque algunos autores también han utilizado hojas cortadas en discos (Laimer da Câmara Machado *et al.*, 1988). Otros autores usan otros tipos de explantos como cotiledones (Mante *et al.*, 1989), embriones (Schneider *et al.*, 1992) e incluso protoplastos (Ochatt y Power, 1988).

El estado fisiológico del explanto suele ser crítico. Normalmente se utilizan explantos que provienen de material micropropagado en fase de proliferación (Pérez-Tornero *et al.*, 2000) y, en general, se ha observado que las condiciones a las que está sometido el material durante el último subcultivo son muy importantes. Varios autores destacan la importancia de la utilización de una baja concentración de citoquininas durante el último subcultivo (Escalettes y Dosba, 1993). Miguel *et al.* (1996) observaron un aumento en el porcentaje de regeneración cuando se eliminaba el BAP del medio durante el último subcultivo.

La edad del explanto también influye en la tasa de regeneración. Diversos autores que usaban hojas como explanto inicial han descrito mejores resultados en hojas jóvenes (Druart, 1990) por lo que se suelen utilizar las 4 primeras hojas de los ápices. Por otra parte, en almendro, Miguel *et al.* (1996) observaron que los explantos que provenían de material juvenil (material de semilla), producían un mayor porcentaje de regeneración, aunque requerían una mayor concentración de TDZ en la inducción, que los explantos de origen adulto (material proveniente de micropropagación introducido a partir de segmentos nodales). Mante *et al.* (1989) observaron una gran diferencia en la capacidad regenerativa de cotiledones de melocotonero dependiendo de la edad de los mismos.

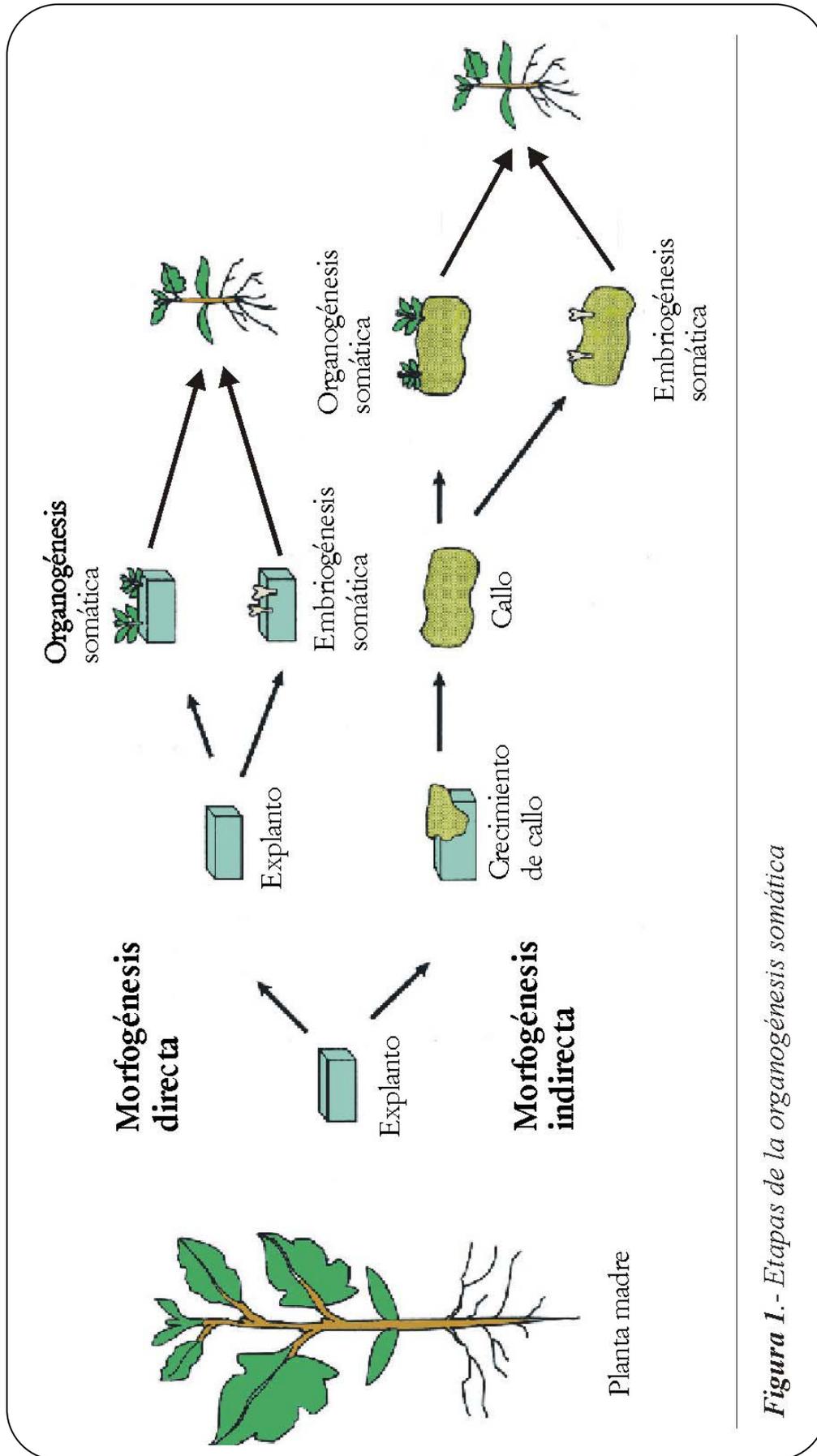


Figura 1.- Etapas de la organogénesis somática

La posición de los explantos en el medio de cultivo también varia los resultados. En albaricoquero se han obtenido mejores resultados con la cara adaxial en contacto con el medio (Pérez-Tornero *et al.*, 2000), mientras que en otras especies los resultados son diferentes (Ainsley *et al.*, 2001).

Componentes del medio de regeneración

Generalmente, en el medio de regeneración, se utiliza la misma composición de macronutrientes que en proliferación, a la concentración normal o en forma diluida (Bassi y Cossio, 1991), y la misma fuente de hidratos de carbono, que suele ser sacarosa. Sin embargo, la fuente de carbono puede tener una gran influencia en la regeneración, tal y como se ha demostrado en melocotonero (Declerck y Korban, 1996) y en ciruelo (Nowak *et al.*, 2004).

La principal diferencia, con respecto al medio de proliferación, suele ser los reguladores del crecimiento. Tanto el tipo de auxina y citoquinina utilizada como sus concentraciones modifican significativamente los resultados (Mante *et al.*, 1989). Goffreda *et al.* (1995) encontraron grandes diferencias entre el uso de dos auxinas distintas, 2,4-diclorofenoxi acético (2,4-D) y ácido indol-butírico (IBA), en la regeneración a partir de embriones de albaricoquero. Resultados similares fueron observados en hojas de *Prunus serotina* cuando se utilizó bencilaminopurina (BAP) o tidiazurón (TDZ) (Hammatt y Grant, 1998). Antonelli y Druart (1990) observaron que un pulso de 2 días con 10 mg/l de 2,4-D favoreció la regeneración en *Prunus canescens*. Cada uno de los autores ha establecido una determinada combinación de los distintos reguladores de crecimiento en su protocolo de regeneración con los que se obtienen valores óptimos.

Otros compuestos como los inhibidores del etileno o poliaminas en el medio de regeneración han mejorado los resultados (Escalettes y Dosba, 1993), aunque en otros casos no se han detectado diferencias significativas con el uso de estos compuestos (Rugini, 1992).

El agente solidificante más extendido es el agar. Pérez-Tornero *et al.* (2000) muestran los efectos del uso de distintos agentes observando un claro descenso en la regeneración con el uso de gelrita como solidificante, mientras que el agargel produjo resultados similares que el agar y un medio más transparente que ayudó a la observación de los explantos.

Condiciones de cultivo

Aunque normalmente se mantienen las condiciones de luz y temperatura utilizadas durante la fase de proliferación del material, diversos autores aconsejan el uso de intensidades de luz menores. Druart (1990), estudiando la regeneración de brotes de manzano y de *Prunus canescens*, observó que una intensidad luminosa de 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ producía porcentajes de regeneración mayores que con la utilización de 54 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

Generalmente se utiliza un periodo inicial de oscuridad para la inducción de la regeneración (Csányi *et al.*, 1999). Los porcentajes en albaricoquero (Pérez-Tornero *et al.*, 2000) y en almendro (Miguel *et al.*, 1996) descendieron drásticamente o fueron nulos en ausencia de un periodo inicial de oscuridad.

Genotipo

Todos los factores anteriormente citados están influidos, en gran medida, por el genotipo (Tabla 3). La composición del medio, las condiciones de cultivo y el tiempo de inducción en oscuridad dependen en gran medida de la variedad. Todos los autores que han trabajado con distintas variedades de cualquiera de las especies del género *Prunus* han observado que el genotipo influye significativamente en la tasa de regeneración. Esto ha sido descrito en albaricoquero (Escalettes y Dosba, 1993; Pérez-Tornero *et al.*, 2000), almendro (Ainsley *et al.*, 2000), melocotonero (Pooler y Scorza, 1995) y en ciruelo (Escalettes y Dosba, 1993).

Ainsley *et al.* (2001) demostraron en almendro una disminución de la variabilidad dependiente del genotipo utilizando material juvenil. En la Tabla 3, donde se muestran los principales resultados de regeneración con diferentes

especies de *Prunus*, se puede observar que junto con un incremento general de las tasas de regeneración obtenidas al utilizar material juvenil, se produce una disminución de la variabilidad dependiente del genotipo en varias especies donde se han realizado experimentos con material adulto y juvenil. Estos resultados ponen de manifiesto la mayor complejidad de trabajar con material adulto.

Tabla 3.- Regeneración adventicia obtenida en *Prunus spp.*

Especie	Variedad / Patrón	Explanto	Eficiencia de regeneración ^a		Referencia
			Tasa de regeneración (%)	Brotos por explanto	
<i>P. armeniaca</i>	NJA82	Embriones inmaduros	92	--	Goffreda <i>et al.</i> , 1995
	Zard		100	--	
	Bulida		10	1-1,5	Pérez-Tornero <i>et al.</i> , 2000
	Canino	Hojas	50	1-1,5	
	Helena		30	1-1,5	
	Royal	Embriones inmaduros		--	
	Sundrop	Cotiledones de embriones inmaduros	100	--	Lane y Cossio, 1986
	H.152		15	--	Escalettes y Dosba, 1993
H.146	Hojas	20	--		
<i>P. avium</i>	Van	Cotiledones de embriones inmaduros	70	--	Lane y Cossio, 1986
	Burlat		12	3,7	Tang <i>et al.</i> , 2002
	Hedelfinger	Hojas	4	3,8	
	Napoleon		30	4,1	
	Schneiders		7	3,4	
	Pontavium	Callos derivados de protoplastos del mesófilo ^c	12	5,0	
	F12/1		31	--	Hammatt y Grant, 1998
	Charger	Hojas	47	--	
	Lapins		71	--	Bhagwat & Lane 2004
	Sweetheart	Hojas	54	--	
<i>P. avium x pseudocerasus</i>		Segmentos internodales de tallo	22	--	James <i>et al.</i> , 1984
		Raíces	--	--	Jones <i>et al.</i> , 1984
	Colt	Callos derivados de protoplastos electroporados	90	12,0	Ochatt <i>et al.</i> , 1988
		Protoplastos obtenidos de suspensiones celulares de raíz	40	5,9	Ochatt <i>et al.</i> , 1987
<i>P. avium x sargentii</i>	1		33	--	Hammatt y Grant, 1998
	16	Hojas	9	--	
<i>P. canescens</i>	GM79	Hojas	29	3,4	Druart, 1990
<i>P. cerasifera</i>	P2980	Callos derivados de protoplastos del mesófilo ^c	59	7,0	Ochatt, 1992
<i>P. cerasus</i>	Vladimir	Peciolos	--	--	Durzan <i>et al.</i> , 1990
	CAB4D	Callos derivados de protoplastos de raíz ^c	30	3,0	Ochatt, 1990
	CAB5H	Callos derivados de protoplastos del mesófilo ^c	50	--	Ochatt y Power, 1988
	CAB4D	Raíces derivadas de callos originados de protoplastos	40	4,9	
	Morellenfeuer		6	3,1	Tang <i>et al.</i> , 2002
	Beutal Spacher	Hojas	41	4,9	
	Rexelle				
	Montmorency	Cotiledones de semillas maduras	58	9,4	Mante <i>et al.</i> , 1989

Tabla 3 (continuación)

Especie	Variedad / Patrón	Explanto	Eficiencia de regeneración ^a		Referencia
			Tasa de regeneración (%)	Brotos por explanto	
<i>P. domestica</i>	Besztercei	Hojas	32	--	Csányi <i>et al.</i> , 1999
	Bluefre	Hojas	25	2,0	Bassi y Cossio, 1991
	Susina di Dro		17	2,3	
	Wegierka Zwykla	Hojas	63	10,0	Nowak <i>et al.</i> , 2004
	Stanley	Hipocotilos	63	6,8	Mante <i>et al.</i> , 1991
	B70173	Cotiledones de semillas maduras	85	18,7	Mante <i>et al.</i> , 1989
<i>P. dulcis</i>	Boa Casta	Hojas de brotes micropropagados	29	2,2	Miguel <i>et al.</i> , 1996
		Hojas de semillas germinadas	40	2,7	
	Ne Plus Ultra	Hojas	44	3,4	Ainsley <i>et al.</i> , 2000
	Nonpareil		5	4,0	
	Ne Plus Ultra	Cotiledones de semillas inmaduras	93	16,0	Ainsley <i>et al.</i> , 2001
	Nonpareil		80	9,3	
	Carmel		100	11,5	
	Parkinson		93	13,5	
<i>P. fructicosa x cerasus</i>	Black Eagle	Hojas	60	2,5	Dolgov, 1999
<i>P. persica</i>	Suncrest	Cotiledones de semillas inmaduras	67	15,5	Mante <i>et al.</i> , 1989
	Loring		67	5,8	
	Belle		50	9,4	
	Boone County		60	4,8	
	Nemared		18	1,0-5,0	
	Nemaguard	Cotiledones	5	1,0-5,0	Pooler y Scorza, 1995
	Flordaguard		50	1,0-5,0	
	P16CL5		23	--	
	Babygold 6		13	--	
	842 Standard	Hojas	28	--	Gentile <i>et al.</i> , 2002
	San Giorgio		17	--	
	Yumyeong		22	--	
	-- ^b	Callos embriogénicos de embriones inmaduros	10	1,0	Dosba <i>et al.</i> , 1991
<i>P. serotina</i>	PSB		24	--	
	2322	Hojas	78	--	Hammatt y Grant, 1998
	2339		8	--	
	Pavia E		45	--	
<i>P. spinosa</i>	P51	Callos derivados de protoplastos del mesófilo ^c	72	15,0	Ochatt, 1992

^a Cuando no se indican tasas de regeneración o número de brotes obtenidos por explanto regenerante es porque no ha sido posible deducirlos de la información proporcionada por los autores.

^b Los autores no indican de qué variedad obtuvieron las semillas.

^c Las tasas de regeneración indicadas corresponden al porcentaje de microcallos derivados de protoplastos que regeneran brotes adventicios.

TRANSFORMACIÓN

Las distintas técnicas de transformación de células vegetales se dividen en directas, induciendo la permeabilidad de la célula al ADN (mediante electroporación, agentes químicos, microláser, microinyección, ultrasonidos o bombardeo), e indirectas mediante el uso de vectores tanto biológicos (*Agrobacterium*, virus) como no biológicos (liposomas).

Técnicas directas

Las técnicas de transformación directa se han aplicado raramente en leñosas. Lindsey y Jones (1990) demostraron que la pared celular dificulta el paso de moléculas de mas de 4,9 kb, por lo que habitualmente estas técnicas se aplican sobre protoplastos o bien sobre células parcialmente digeridas con pectinasas.

La electroporación consiste en la aplicación de un campo eléctrico mediante el cual se puede inducir un cambio en el potencial de membrana de la célula dando lugar a la aparición de “microporos” que la hacen permeable a moléculas de gran tamaño (Fromm *et al.*, 1987) incluso en células vegetales provistas de pared celular (Lindsey y Jones, 1990). La aparición de poros o aperturas en la pared y membrana celular se puede provocar también mediante la utilización del láser (Weber *et al.*, 1998) o de ultrasonidos (Joersbo y Brunstedt, 1990). Otra estrategia consiste en la utilización de polietilenglicol (PEG) que es un polímero capaz de aumentar la permeabilidad de la membrana (Krüger-Lebus y Potrykus, 1987).

Otras técnicas directas no requieren el manejo de protoplastos para obtener un mayor rendimiento, como son la microinyección y la biolística. La primera consiste en la inyección de disoluciones de ADN directamente en el interior de la célula. Con esta técnica se puede llegar incluso al núcleo celular (Neuhaus y Spangenberg, 1990) y en principio sería válida en todas las especies vegetales. Sin embargo, tiene la desventaja de requerir un elevado grado de manipulación y la transformación se realiza en células individuales, lo que lo convierte en un proceso muy laborioso, que requiere una alta especialización y que consume una gran cantidad de tiempo.

Entre las técnicas que han tenido una mayor aceptación y que han sido aplicadas más frecuentemente, y claramente la más habitual de las directas, están las técnicas biolísticas o de bombardeo con ADN desarrollada por Sanford (1990). Consiste básicamente en bombardear la célula (o tejido) con partículas recubiertas con ADN. Las partículas son de un metal pesado (tungsteno u oro) recubierto de ADN, son aceleradas mediante un “cañón” o “pistola” e impactan sobre el material vegetal atravesando la pared celular, la membrana celular y la membrana nuclear. Una vez en el núcleo el ADN se libera y, por recombinación, puede ser insertado en el genoma de la célula. Este método de transformación tiene algunos inconvenientes como el hecho de ser bastante agresivo con el material vegetal y que el porcentaje de transformación estable es escaso, ya que la probabilidad de que el ADN se inserte en los cromosomas del tejido es bastante baja. Además cuando el tejido bombardeado es totipotente (excepto polen) los individuos regenerantes suelen ser quiméricos (Sanford, 1990).

Técnicas indirectas

Como técnicas indirectas, que utilizan vectores para introducir el ADN foráneo, se pueden citar la utilización de vesículas lipídicas o liposomas en el interior de las cuales se pueden incluir las moléculas de ADN. El ADN penetraría al interior celular bien por fusión entre la membrana celular y el liposoma o bien mediante un proceso de endocitosis. Esta técnica ha tenido poca aplicación debido a su baja eficiencia de transformación estable y la limitación del tamaño de la molécula de ADN (10 kb), aunque parece adecuada para transfecciones con ARNs virales (Caboche, 1990).

Los virus fitopatógenos también pueden ser utilizados como vectores genéticos. Son virus modificados mediante ingeniería genética de tal manera que tienen la capacidad de infectar a la planta, de autoduplicarse y de duplicar el gen o genes quiméricos que al mejorador le interesan sin causar síntomas indeseables ni pérdidas en la producción (Agrios, 1999). El virus del mosaico de la coliflor (CaMV)

ha sido utilizado como vector para la expresión de genes foráneos en plantas (Füterer *et al.*, 1990).

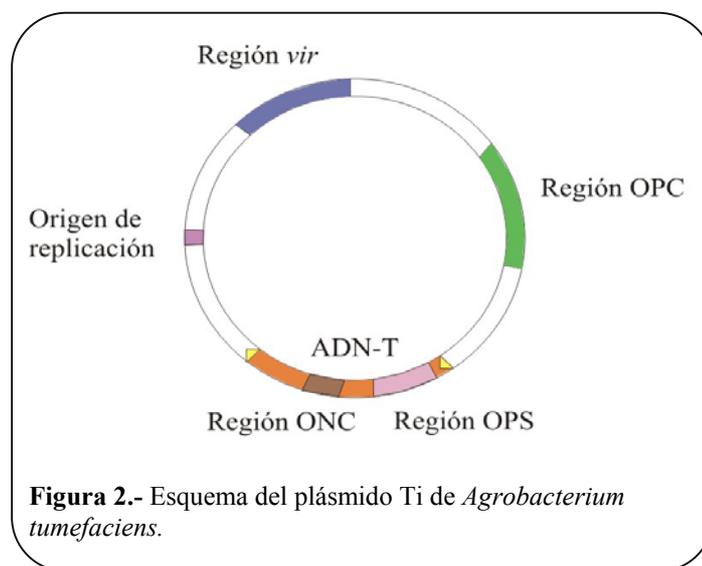
Ciertos elementos cromosómicos y extracromosómicos parecen tener la capacidad de introducir e incorporar material genético en el genoma de las células vegetales y pueden ser potenciales vectores genéticos. Se han utilizado algunos de estos elementos para transformar células animales aunque aún no se han utilizado en plantas (Agrios, 1999).

Quizás la técnica más versátil y ampliamente utilizada sea la transformación mediada por *Agrobacterium*. El descubrimiento de la capacidad de *Agrobacterium* de introducir ADN en células vegetales supuso una revolución en la transformación ya que constituye uno de los sistemas más efectivos para introducir material genético en plantas. *Agrobacterium* es un caso particular de organismo procariota ya que es capaz de introducir un fragmento de ADN en las células vegetales e insertarlo en el genoma. Además sus genes son reconocidos y expresados por la célula eucariota.

Agrobacterium es una bacteria Gram negativa que ataca a células vegetales dañadas generando un tumor en la planta, la llamada enfermedad de las agallas de la corona. La bacteria es capaz de modificar el metabolismo de la planta haciendo que esta sintetice unos aminoácidos conocidos como opinas. Dichas opinas tienen la función de alimento para la bacteria ya que solo pueden ser metabolizadas por ella, además son específicas para cada cepa determinada, lo que confiere una gran ventaja ecológica para la bacteria ya que crea su propio nicho eliminando así la competencia interespecífica e intraespecífica.

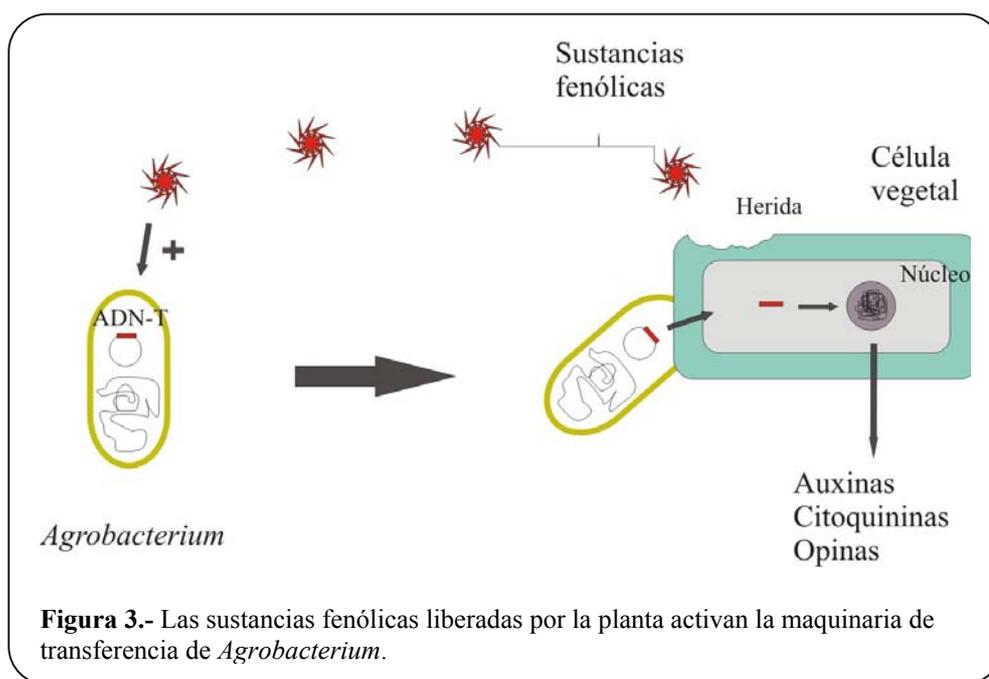
La bacteria contiene un plásmido conocido como plásmido Ti (inductor de tumores) en el que se encuentran los genes involucrados en la aparición del tumor, en los cambios metabólicos y también los genes responsables de la transferencia y posterior inserción del ADN. Dentro de este plásmido hay un segmento, llamado ADN-T (ADN de transferencia), que es la fracción que será transferida a la célula eucariota. Este ADN-T está delimitado por unos bordes de 25 nucleótidos que son las secuencias reconocidas por la maquinaria de transferencia.

En el plásmido se pueden diferenciar distintas regiones que son conocidas como la región OPS y la región OPC, relacionadas con la síntesis y catabolismo de las opinas. También se encuentra la región *vir* con genes que controlan la transferencia del ADN-T y la región ONC con genes responsables de la aparición del tumor mediante el aumento de la síntesis de auxinas y citoquininas que estimulan el crecimiento y la división celular. Dentro del ADN-T solo se encuentran las regiones OPS y ONC (Figura 2).



Además de los genes bacterianos incluidos en el plásmido, para que la bacteria sea capaz de infectar las células vegetales, son necesarios determinados genes cromosómicos de virulencia *chv*, implicados tanto en el movimiento quimiotáctico bacteriano como en la unión de la bacteria a receptores específicos de la célula vegetal (Figura 3). Para su utilización en un proceso controlado de transformación genética la bacteria es desarmada por delección de la región ONC y las regiones OPS y OPC. De esta manera obtenemos un plásmido Ti no oncogénico que mantiene la capacidad de transformación. Con técnicas de ingeniería genética es posible introducir el gen o genes de interés entre los bordes del ADN-T, de manera que estos serán introducidos en la célula e integrados en el núcleo por la maquinaria de *Agrobacterium*.

Existen dos tipos de vectores en función de que la región *vir* actúe en *cis* o en *trans* respecto al ADN-T. Los vectores cointegrados consisten en un plásmido de *E. coli*, donde se ha introducido el gen foráneo, y el plásmido Ti desarmado que contiene un fragmento de la secuencia del plásmido de *E. coli* entre los bordes del ADN-T. Al transferir el plásmido de *E. coli* a *Agrobacterium* el gen foráneo queda entre los bordes del ADN-T por un hecho de recombinación homóloga. En este caso la región *vir* actúa en *cis* respecto al ADN-T (Figura 4). En los vectores binarios la región *vir* actúa en *trans*. Consiste en dos plásmidos dentro de *Agrobacterium*, por un lado el plásmido Ti desarmado con solo la región *vir* y por otro lado un segundo plásmido con el ADN foráneo entre los bordes del ADN-T. Actualmente este tipo de vectores es el más utilizado ya que su construcción es más sencilla.



Además de *A. tumefaciens* también se puede utilizar para transformar *Agrobacterium rhizogenes* (Tepfer, 1990). Esta bacteria contiene un plásmido, llamado Ri, que induce la formación de raíces por lo que su utilización con especies leñosas difíciles de enraizar es de gran interés. Los genes implicados en esta inducción son *rol A*, *rol B* y *rol C*, situados en el ADN-T de *A. rhizogenes*, siendo *rol B* el que parece

ser más importante en el proceso de enraizamiento. En el caso de transformación mediada por *A. rhizogenes* se suele utilizar el plásmido Ri sin desarmar y, además, se introduce otro plásmido con los genes foráneos entre los bordes reconocidos por la maquinaria de transferencia. En este caso la región *vir* actúa tanto en *cis* como en *trans*, es decir, a la célula vegetal son transferidos tanto el ADN-T de *A. rhizogenes* como los genes quiméricos. El gen bacteriano *ipt*, situado en el ADN-T, está implicado en la síntesis de citoquininas. Provoca un aumento en los niveles endógenos de citoquininas y reduce la dominancia apical, haciendo que la planta tenga un aspecto más achaparrado. Esto da la posibilidad de obtener árboles más pequeños, más ramificados y con igual o mayor producción frutícola, optimizando así la relación producción-superficie cultivada. Este gen ya ha sido introducido en melocotonero con buenos resultados (Smigocki y Hammerschlag, 1991).

La transformación con *Agrobacterium rhizogenes* implica la introducción de genes que incrementan la síntesis de citoquininas. En *Prunus* y otros frutales leñosos es frecuente encontrar dificultades en el enraizamiento. La transformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes*, o bien con *A. tumefaciens* portando el gen *rol B*, genera fenotipos que enraízan más fácilmente.

Desafortunadamente, este sistema presenta varios inconvenientes. Uno es que el rango de huéspedes es más limitado que en *A. tumefaciens* y otro es que la expresión de los genes del ADN-T en las plantas confiere fenotipos aberrantes a las mismas. Para solucionar este tipo de problemas se ha introducido el gen *rol B* en un vector binario de *A. tumefaciens* (Rugini y Mariotti, 1991).

Genes marcadores

En un ensayo de transformación son muy pocas las células que llegan a ser transformadas. Con los genes marcadores es posible reconocer y seleccionar las células que han sido transformadas (Miki y McHugh, 2004). Los genes marcadores se introducen junto al gen quimérico que queremos expresar en la planta. Hay dos tipos de marcadores, de selección e informadores (Tabla 4).

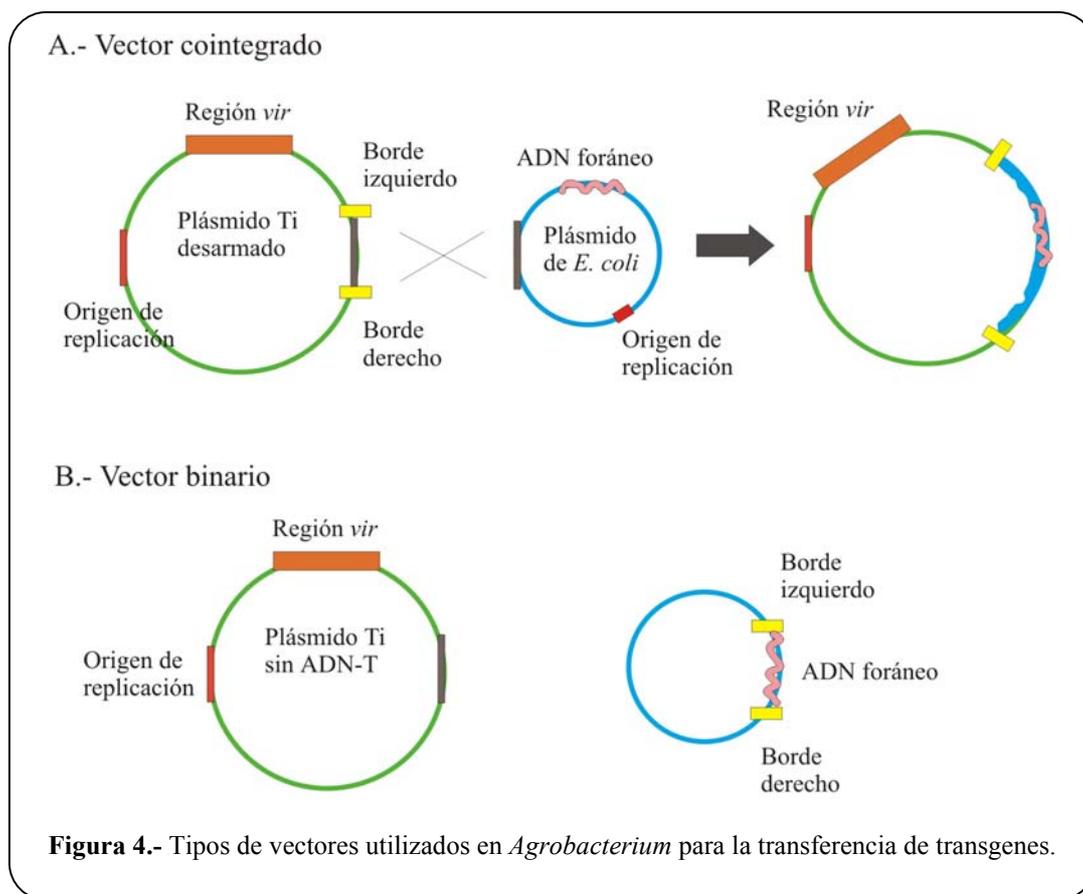


Figura 4.- Tipos de vectores utilizados en *Agrobacterium* para la transferencia de transgenes.

Marcadores de selección

Confieren ventaja a las células transformadas frente a las no transformadas en un medio selectivo. El agente selectivo suele ser un antibiótico o un herbicida.

Dentro de estos genes el más utilizado, y en *Prunus* casi en exclusiva, es el gen de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) que confiere resistencia frente a antibióticos de la familia de los aminoglicósidos, como la kanamicina, mediante la fosforilación del antibiótico. Son pocas las excepciones en que se ha utilizado el gen de resistencia a higromicina (*hpt*) (Dolgov y Firsov, 1999) o el gen de resistencia al herbicida 'basta' (Druart *et al.*, 1998). Teóricamente, la adición al medio de la sustancia tóxica es suficiente para la selección de las células transformadas, estableciendo previamente

Tabla 4.- Genes marcadores más comúnmente utilizados.

	Nombre	Siglas
Resistencia a antibióticos	Kanamicina fosfotransferasa	APH(3')II
	Higromicina fosfotransferasa	HYG
	Gentamicina acetiltransferasa	GENT
	Neomicina fosfotransferasa	NPT II
	Estreptomina fosfotransferasa	STR
	Resistencia a bleomicina	BLE
Inhibidores metabólicos	Dihidrofolato reductasa	DHFR
	EPSP sintasa	EPSPS
	Acetolactato sintasa	ALS
	Bromoxynil nitrilasa	BNR
	Fosfinotricina acetiltransferasa	PAT
Actividad enzimática	Nopalina sintasa	NOS
	Octopina sintasa	OCS
	Cloranfenicol acetiltransferasa	CAT
	β -glucuronidasa	GUS
	β -galactosidasa	LAC
	Luciferasa bacteriana	LUX
	Luciferasa de luciérnaga	LUC
	Proteína amarilla fluorescente	YFP
	Proteína verde fluorescente	GFP

la concentración de dicha sustancia que inhibe la regeneración para cada una de las especies, variedades y tipo de explanto correspondientes.

Marcadores de información (“genes chivatos”)

Dan a la célula que ha incorporado el gen una característica que la hace distinguible de las demás. Suelen ser genes que codifican para enzimas que actúan sobre sustratos cromogénicos, fluorogénicos, emisores de fotones o radiactivos, de tal manera que cuando añadimos el sustrato al medio podemos identificar las células transformadas visualmente.

El más usual es el gen de la β -glucuronidasa (*uidA* o *gusA*), aislado de *E. coli*, que hidroliza β -glucurónidos (Vancanneyt *et al.*, 1990). Si incubamos las células con el sustrato incoloro 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido (X-Gluc) aparece un precipitado azul sobre las células transformadas. Con esta enzima también se puede usar el sustrato 4-metil-umbeliferil- β -D-glucurónido (4-MUG) el cual al ser

hidrolizado forma un compuesto fluorescente, 4-metilumbeliferona (MU), que se puede medir por fluorimetría (Jefferson *et al.*, 1987).

Otro marcador relativamente nuevo es la proteína verde fluorescente, *gfp* (Chiu *et al.*, 1996). Este gen proviene de la medusa *Aequorea victoria*, y codifica una proteína que al ser excitada con luz azul o ultravioleta (óptimo a 395 nm) emite una fluorescencia verde. Este sistema permite detectar las células transformadas de una manera no destructiva y sin necesidad de añadir ningún sustrato al medio.

Los genes marcadores no se expresan en la bacteria, de lo contrario sería imposible detectar si la expresión del gen se debe a células del material vegetal o a la expresión de la proteína en *Agrobacterium*. Para evitar esta expresión se recurre a distintas estrategias como por ejemplo introducir un intrón en el gen de tal manera que solo puede ser expresado correctamente en una célula eucariota, ya que la bacteria carece del sistema de maduración de ARN mensajero necesario para la eliminación de dicho intrón. Otra posibilidad es poner los genes bajo el control de un promotor específico de eucariotas como son el CaMV 35S (del Virus del Mosaico de la Coliflor) o el *mas*. Estos promotores pueden ser constitutivos, es decir, la proteína que está bajo su control se expresa continuamente, o bien pueden ser inducibles, de tal manera que el gen solo se expresará en unas determinadas condiciones, como pueden ser un sustrato específico, un aumento de la temperatura o un cambio en el pH.

Aunque con los marcadores genéticos se seleccionan las células y los individuos que han sido transformados, para disponer de una prueba definitiva de la integración de los transgenes se utilizan técnicas moleculares como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y especialmente la prueba de hibridación molecular Southern (Southern, 1975). Si estas pruebas dan positivo es irrefutable que la integración de los transgenes en el genoma de la planta se ha producido.

Factores que afectan la eficiencia de transformación y la regeneración de planta transformada

El explanto

El tipo de explanto utilizado es muy variable, se han utilizado hojas (Ye *et al.*, 1994), cotiledones (Laimer da Câmara Machado *et al.*, 1992), hipocotilos (Scorza *et al.*, 1995b), meristemos (Druart *et al.*, 1998), embriones (Ye *et al.*, 1994), callos embriogénicos (Scorza *et al.*, 1990) e incluso brotes (Escalettes *et al.*, 1994).

El estado fisiológico del explanto influye en gran medida en la tasa de transformación. Así, son varios los autores que indican un mayor éxito con tejidos que presentan una división activa (Schuerman y Dandekar, 1993) y muchos autores han utilizado como tejido diana material con una gran tasa de división, como líneas de callos embriogénicos, hipocotilos y cotiledones (Mante *et al.*, 1991).

El genotipo, al igual que en regeneración, es determinante. Con un protocolo establecido para una determinada especie no se obtienen los mismos resultados que para otra, incluso entre variedades las eficiencias de transformación varían de manera significativa.

La técnica

Indudablemente la técnica elegida por el investigador es un factor muy importante. En *Prunus* se ha trabajado principalmente con *Agrobacterium tumefaciens*, aunque puntualmente también se ha utilizado *Agrobacterium rhizogenes* y biolística. No ha sido descrito el uso de otras técnicas de transformación en este género.

Cada técnica tiene una serie de peculiaridades que hacen que sea más o menos efectiva. La optimización del bombardeo con ADN lleva consigo el establecimiento de varios parámetros como la distancia entre el proyectil y el tejido diana, el tamaño y composición de los microproyectiles y la presión ejercida. Ye *et al.* (1994) presentan un estudio comparativo de los diversos factores que afectan la

transformación mediante bombardeo y establecen un protocolo de transformación eficiente en diversos tejidos de melocotonero.

La virulencia de las distintas cepas de *Agrobacterium* es diferente en cada especie, e incluso en distintas variedades. Experimentos de inoculación preliminares deberían ser realizados para comprobar la compatibilidad entre la especie hospedadora y la estirpe de *Agrobacterium* antes de llevar a cabo la transformación (Cervera *et al.*, 1998b). Dolgov *et al.* (1999) describen resultados muy diferentes, según la cepa utilizada, con hojas del híbrido 'Black Eagle' (*P. fruticosa* x *P. avium*). Ainsley *et al.* (2002) y Miguel y Oliveira (1999), en almendro, y Yancheva *et al.* (2002) en ciruelo, encontraron diferencias significativas según el genotipo y la cepa de agrobacteria utilizada. Se han hallado diferencias significativas en el número de puntos GUS positivos en almendro (Miguel y Oliveira, 1999) así como en la eficiencia de transformación en ciruelo (Yancheva *et al.*, 2002) en función de la construcción introducida en una misma cepa de *Agrobacterium tumefaciens*. Modificaciones en la bacteria, como un número adicional de copias de los genes *vir* A, B y G, parecen aumentar su virulencia (Ghorbel *et al.*, 2001a). Diversos factores externos como pH, temperatura y condiciones osmóticas parecen activar los genes *vir* (Alt-Mörbe *et al.*, 1989).

En la naturaleza, *Agrobacterium* infecta las partes de la planta donde se localiza una herida y hay una liberación de compuestos fenólicos al medio. La adición al medio de estos compuestos, como la acetosiringona (3',5'-dimetoxi-4'hidroxiacetofenona), estimulan la transcripción de los genes de virulencia de *Agrobacterium* (Stachel *et al.*, 1985). En *Prunus* este efecto potenciador de la acción de la bacteria ha sido descrito en albaricoquero (Laimer da Câmara Machado *et al.*, 1992) y en almendro (Miguel y Oliveira, 1999). Sin embargo, en ciruelo no se hallaron diferencias significativas tras la adición de acetosiringona (Mante *et al.*, 1991). El tiempo de cocultivo con la bacteria es variable según los autores aunque el más usual es un periodo de 48 horas, además tiempos superiores a 3-4 días suelen originar problemas para controlar el crecimiento posterior de *Agrobacterium*.

Selección de transformantes

No todas las células del tejido vegetal diana son transformadas y por lo tanto no todas las yemas regeneradas, ya sea por embriogénesis o por organogénesis, darán lugar a una planta transformada. Es necesario establecer un protocolo de selección mediante el cual se impida, o al menos se reduzca, la aparición de escapes (brotes no transformados) y se conceda una ventaja a las células que han sido modificadas genéticamente para que estas lleguen a diferenciarse y dar lugar a un individuo completo. Es aquí donde tienen un papel muy importante los genes marcadores de selección.

La concentración del agente selectivo afecta severamente la aparición de hechos de transformación y por lo tanto de individuos transformados. Por lo general se suele utilizar la concentración umbral del agente selectivo que inhibe totalmente la regeneración en material sin transformar (Mante *et al.*, 1991). Sin embargo, Laimer *et al.* (1992) aplicaron una concentración no inhibitoria de kanamicina en la regeneración de plantas transgénicas de albaricoquero.

El momento de aplicación de la selección es igualmente importante. Los explantos son transferidos a un medio selectivo pasado un tiempo durante el cual el ADN se integra al genoma de la célula vegetal (en el caso de *Agrobacterium* coincide con el tiempo de cocultivo). Este tiempo suele ser de 48 horas en la mayoría de las referencias. En almendro Miguel y Oliveira aplican una dosis baja de kanamicina (10-15 mg/L) inmediatamente después del cocultivo y tras 20 días, cuando ya se han desarrollado algunas yemas, aplican una concentración de 50 mg/L debido a la extrema sensibilidad a la kanamicina detectada en los explantos control (Miguel y Oliveira, 1999). Yancheva *et al.* (2002) observaron que altas concentraciones iniciales de kanamicina inhibían por completo la regeneración, incluso de plantas transformadas con el gen *nptII*, en ciruelo y una baja concentración inicial daba lugar a gran cantidad de escapes, por lo que aplicaron un incremento progresivo de la concentración de kanamicina en subcultivos posteriores a la infección con *Agrobacterium*. En ciruelo se ha publicado recientemente un eficiente protocolo de selección de plántulas transformadas de ciruelo a partir de hipocotilos (Gonzalez-

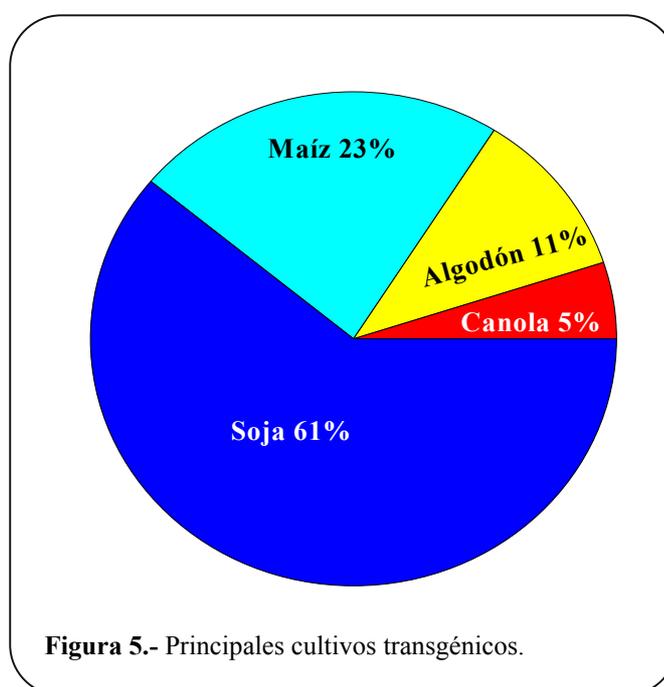
Padilla *et al.*, 2003). Aplicando el agente selectivo en una etapa temprana obtienen igual número de plantas transformadas que retrasando la selección, sin embargo esta selección temprana mejora la eficiencia de selección (número de plantas transformadas frente al número total de plántulas regeneradas) debido a la disminución del número de escapes.

En el caso de infección con *A. rhizogenes*, en ocasiones, no se incorpora ningún gen de selección debido a que se inserta en el material vegetal el gen *ipt*, implicado en la síntesis de citoquininas. Así, en un medio libre de reguladores de crecimiento, las células transformadas son capaces de regenerar (Gutiérrez-Pesce *et al.*, 1998). Smigocki *et al.* (1991) describen un protocolo de selección parecido en melocotonero utilizando una cepa de *A. tumefaciens* tipo “Shooty mutant”, que también contiene el gen *ipt*.

Además del gen *ipt*, se han identificado genes inductores de la regeneración en plantas. Mediante una manipulación adecuada, solamente las células transformadas con dichos genes serían capaces de regenerar en la ausencia de reguladores del crecimiento (Zuo *et al.*, 2002).

PLANTAS COMERCIALIZADAS QUE HAN SIDO GENÉTICAMENTE MODIFICADAS

Desde 1996 hasta el 2003 el área dedicada al cultivo de especies genéticamente modificadas (GM) se ha visto incrementada 40 veces, de 1,7 millones de ha a 67,7 que existen actualmente. Esto representa un valor estimado en el mercado de 4.500 millones de dólares, un 15 % del global (James, 2003).



En la actualidad no existe ningún producto procedente de una planta leñosa GM de clima templado en el mercado, la única leñosa comercializada es el frutal tropical papaya (*Carica papaya* L.) con resistencia al PRSV (Papaya Ringspot Virus) (<http://www.agbios.com/>). La mayoría de la producción de plantas GM se basa en soja, maíz y algodón (Figura 5). Estos cultivos presentan incorporaciones o modificaciones genéticas que les confieren tolerancia a un determinado herbicida, aunque también destacan los cultivos Bt resistentes al ataque de insectos (Tabla 5).

Tabla 5.- Algunas de las especies genéticamente modificadas presentes en el mercado.

Especie	Compañía	Inserción/Modificación	Rasgo fenotípico
Achicoria (<i>Chichorium intybus</i>)	Bejo Zaden BV	Bar de <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Resistencia a fosfinotricina (PPT)
Algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>)	Monsanto Company	<i>cry2Ab</i> y <i>cry1Ac</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistencia a insectos
	Calgene Inc.	Enzima EPSPS de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerancia al herbicida glifosato
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	BASF Inc.	Nitrilasa de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio
	Aventis CropScience	Mutación del enzima acetolactato sintetasa	Tolerancia al herbicida imidazolinona
Calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>)	Asgrow (USA); Seminis Vegetable Inc. (Canada)	fosfinotricin-acetiltransferasa (PAT) de <i>S. hygroscopicus</i>	Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio
Girasol (<i>Helianthus annuus</i>)	BASF Inc.	CP de los virus CMV, ZYMV y WMV	Resistencia a dichos virus
Maíz (<i>Zea mays</i>)	Syngenta Seeds Inc.	<i>cry1Ab</i> de <i>B. thuringiensis</i>	Resistencia al taladro del maíz
	Aventis CropScience	<i>cry1AC</i> de <i>B. thuringiensis</i> y PAT de <i>S. hygroscopicus</i>	Resistencia a insectos y al herbicida glufosinato de amonio
	Monsanto Company	<i>cry9C</i> y PAT de <i>S. hygroscopicus</i>	Resistencia a insectos y al herbicida glufosinato de amonio
		<i>cry1Ab</i> y EPSPS	Resistencia a insectos y al herbicida glifosato
Melón (<i>Cucumis melo</i>)	Agrotipe Inc.	<i>cry3Bb1</i> de <i>B. thuringiensis</i>	Raíces resistentes a gusanos
Nabo (<i>Brassica napus</i>)	Pioneer Hi-Bred International Inc.	S-adenosilmetionina hidrolasa	Reduce la acumulación de SAM y en consecuencia la producción de etileno, retraso en la maduración
	Aventis CropScience	Mutación en una desaturasa de ácidos grasos	Alto contenido en ácido oleico y bajo en linoleico
	Bayer CropScience	Nitrilasa de <i>K. pneumoniae</i>	Tolerancia a los herbicidas bromoxinil e ioxinil
	Monsanto Company	PPT-acetiltransferasa	Resistencia a PPT
Nabo forrajero (<i>Brassica rapa</i>)	Bayer CropScience	EPSPS	Tolerancia a glifosato
Patata (<i>Solanum tuberosum</i>)	Monsanto company	<i>PAT</i> de <i>S. hygroscopicus</i>	Resistencia al CPB y al virus PLRV
			Resistencia al CPB y al virus PVY
			Resistencia al escarabajo de patata de Colorado (CPB)

Tabla 5 (continuación)

Especie	Compañía	Inserción/Modificación	Rasgo fenotípico
Soja (<i>Glycine max</i>)	Aventis CropScience	PAT de <i>Streptomyces</i>	Tolerancia a glufosinato de amonio
	Bayer CropScience	<i>viridochromogenes</i>	
	Dupont Canada Argicultura Products	Introducción de otra copia del gen <i>Gmfad2-1</i> , una desaturasa de ácidos grasos	Alto contenido en ácido oleico
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Societe National d'Exploitation des Tabacs et Allumettes	Nitrilasa de <i>K. pneumoniae</i>	Tolerancia a los herbicidas bromoxinil e ioxinil
	Vector Tobacco Inc.	Introducción de otra copia del gen de la ácido quinolínico fosforibosiltransferasa (QTPasa) en antisentido	Reducción en los niveles de nicotina
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	DNA Plant Tecnology Corporation	Copia truncada del gen ACC-sintasa	Retraso en la maduración
	Agritope Inc.	S-adenosilmetionina hidrolasa	
	Monsanto Company	<i>cryIAc</i>	Resistencia a lepidópteros
	Zeneca Seeds Calgene Inc.	Versión de la poligalacturonasa	Retraso del reblandecimiento del fruto

Fuente de información www.agbios.com.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE FRUTALES LEÑOSOS

En frutales leñosos, diferentes de *Prunus*, el estado actual en la aplicación de las técnicas biotecnológicas está mucho más avanzado que en el caso de *Prunus* donde aún son pocos los trabajos en los cuales el gen o los genes introducidos en la planta representan una mejora genética para la misma. Manzano, peral y cítricos, principalmente, son las especies donde más se ha desarrollado este tipo de investigación (Tabla 6).

En todas estas especies ha sido necesario el establecimiento de protocolos eficientes de transformación. En diferentes especies de cítricos se han establecido protocolos muy eficientes con material juvenil (Yu *et al.*, 2002) e incluso, en algunos casos, con material adulto (Cervera *et al.*, 1998a). En los trabajos con material juvenil las eficiencias de transformación varían desde el 1,2% en pomelo (Luth y Moore, 1999) hasta al 80% en citrange (Yu *et al.*, 2002), mientras que no superan el 6% cuando se trabaja con material adulto (Cervera *et al.*, 1998a).

De forma similar se han establecido protocolos de transformación en material adulto de manzano (Puite y Schaart, 1999) con eficiencias inferiores al 3%, y en variedades de peral (Zhu y Welander, 2000) con eficiencias en este caso que varían desde menos del 1% hasta el 42,7%, dependiendo fundamentalmente de la variedad.

Cítricos

En España se han desarrollado distintas líneas de mejora incluyendo resistencia al virus de la tristeza de los cítricos (CTV) mediada por la introducción de genes del patógeno (Domínguez *et al.*, 2002) y ha sido identificada la región p23 del genoma de CTV como principal causante de los síntomas de la enfermedad, siendo el primer caso en el que se determina que una proteína viral está directamente relacionada con la patogénesis de la planta (Ghorbel *et al.*, 2001b). También se ha trabajado en la búsqueda de resistencia a *Phytophthora citrophthora*

mediante proteínas antifúngicas (Fagoaga *et al.*, 2001), en la reducción del periodo juvenil mediante la inserción de genes florales de *Arabidopsis*, como *Leafy* (LFY) y *Apetala1* (AP1) (Peña *et al.*, 2001), en tolerancia a salinidad con genes de levadura (HAL2) (Cervera *et al.*, 2000). Muchos de estos cítricos transgénicos se están evaluando en invernadero e incluso en ensayos de campo bajo malla (Peña, comunicación personal)

Aparte de los trabajos desarrollados por el grupo del Dr. Peña en España, también se ha abordado el problema del CTV en E.E.U.U. transformando la variedad 'Rio Red' con una versión no traducible de la cubierta del virus (Yang *et al.*, 2000). Estas plantas han demostrado presentar mayor resistencia a la enfermedad (Herron, 2003). Además, este grupo ha producido cítricos expresando la lisozima bovina que induce resistencia a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* causante del cancer de los cítricos, y lectina que induce resistencia a insectos, y están actualmente siendo analizados en invernadero o en campo. Concretamente, plantas procedentes de semillas de las variedades 'Rio Red' y 'Carrizo' expresando lectina y lisozima bovina, respectivamente, son los únicos ensayos de campo con cítricos transgénicos en E.E.U.U. (Mirkov, comunicación personal).

La variedad comercial de mandarina 'Ponkan', que produce un elevado número de semillas en sus frutos, ha sido transformada con un gen que codifica una ribonucleasa sintética (*barnasa*). Se ha descrito que este gen induce androesterilidad en numerosas especies con lo que su introducción en esta variedad de mandarina, que produce frutos partenocárpico, podría producir una variedad con mandarinas sin semillas (Li *et al.*, 2002). Estas plantas todavía no han sido evaluadas en campo.

Kiwi

En variedades comerciales de kiwi se han introducido los genes *rol A, B, C* de *A. rhizogenes* consiguiendo plantas con mayor capacidad de enraizamiento (Rugini *et al.*, 1991) pero con mayor susceptibilidad a varias especies de *Pseudomonas*. Este efecto no deseado se hereda y se ha relacionado con una mayor producción de auxinas (Balestra *et al.*, 2001).

Kiwi también ha sido transformado con el gen de una endoglucanasa de soja (Nakamura *et al.*, 1999) incrementando su resistencia frente al hongo *Botrytis cinerea*, y con el gen del enzima estilbeno sintasa de *Vitis* aumentando así los niveles de resveratrol en fruto (Kobayashi *et al.*, 2000).

Manzano

Se han conseguido plantas resistentes al fuego bacteriano (Ko *et al.*, 2000), causado por *Erwinia amylovora*, y plantas que son menos afectadas por la llamada sarna del manzano (*Venturia inaequalis*) mediante la expresión de endoquitinasas (enzimas hidrolíticos) (Bolar *et al.*, 2000; Faize *et al.*, 2003), por la expresión de proteínas con actividad antifúngica (Faize *et al.*, 2004; Szankowski *et al.*, 2003), o por la expresión de un gen de resistencia de un manzano silvestre (Belfanti *et al.*, 2004).

La obtención de plantas resistentes a plagas se ha conseguido gracias a los genes *cry* de la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Estos genes codifican una protoxina insecticida que se proteoliza en el intestino del insecto debido a la alcalinidad del medio. También con éxito el grupo del Dr. Dandekar ha evaluado en campo manzanos expresando una versión modificada del gen *cryIIA* de *Bacillus thuringiensis* para el control del gusano del manzano (*Cydia pomonella*) (citado como comunicación personal por Scorza, 2001).

Investigaciones sobre el control de la maduración mediante modificaciones de la ruta de biosíntesis de etileno se están llevando a cabo por investigadores de la Agritope, Inc. (Beaverton, Oregon). El gen que codifica para la S-adenosilmetionina hidrolasa (SAMasa) ha sido introducido en manzano (Bommineni *et al.*, 2000) y actualmente existen ensayos en campo aunque los resultados de estas modificaciones en la maduración de los frutos todavía no se conocen.

El Dr. Dandekar y sus colaboradores han desarrollando en Davis (California) un programa de mejora de manzano mediante el control y modificación de la ruta de síntesis del etileno mediante la transformación con ADNc sentido y antisentido codificando para la ACC-sintasa y ACC-oxidasa con el fin de llegar a tener un mayor conocimiento de la acción de este gas en los procesos de senescencia y maduración.

Después de evaluar en campo e invernadero las diferentes líneas transgénicas obtenidas observaron que los frutos de las plantas transformadas presentaban mayor firmeza e incrementó su vida (Dandekar *et al.*, 2004).

El crecimiento en plantas de manzano ha sido modificado mediante la introducción del gen *rol B*, aislado de *Agrobacterium rhizogenes*, en patrones de manzano consiguiendo plantas con entrenudos más cortos y con mayor facilidad de enraizamiento (Welander *et al.*, 1998), que se están evaluando en campo (Zhu, comun. pers.).

En la página <http://gmoinfo.jrc.it/> se pueden encontrar varias liberaciones voluntarias en Europa de manzanos transgénicos que corresponden a algunos de los casos descritos arriba (B/SE/04/1227), además de la introducción de posibles resistencias a hongos y bacterias (B/NL/02/03 y B/DE/03/140) o ADNc de alelos de compatibilidad (B/BE/03/V1). Una reciente publicación describe la obtención de fenotipo autocompatible mediante el silenciamiento del gen-S (que controla la autoincompatibilidad) mediante la producción de plantas con copias extras del gen-S (Broothaerts *et al.*, 2004).

El grupo del Dr. James ha desarrollado un interesante trabajo en manzano. Como alternativa a las construcciones típicas con los promotores constitutivos CaMV 35S y Nos, han transformado con promotores que permiten que el transgén se exprese solamente en determinados órganos de la planta (Gittins *et al.*, 2000; Gittins *et al.*, 2001).

Nogal

Esta especie, al igual que manzano, es atacada por *C. pomonella* y se han desarrollado plantas totalmente resistentes mediante la inserción del gen *cryIIAc* (Dandekar *et al.*, 1998).

Tabla 6.- Mejoras genéticas introducidas en frutales distintos de *Prunus spp.*

Especie	Variedad	Genes	Fenotipo	Referencia
Carrizo (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck x <i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf.)	Citrango	<i>HAL 2</i>	Tolerancia a salinidad	Cervera <i>et al.</i> , 2000
	Citrango	<i>LEAFY</i> y <i>APETALA</i>	Menor duración de la etapa juvenil	Peña <i>et al.</i> , 2001
	Citrango	Lisozima bovina	Resistencia al cancer de los cítricos (<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri)	Mirkov (comunicación personal)
Kaki (<i>Diospyros kaki</i> L.)	Jiro	<i>CryIA(c)</i>	Resistencia a lepidópteros	Tao <i>et al.</i> , 1997
Kiwi (<i>Actinidia deliciosa</i> A. Chev.)		<i>rol A, B, C</i>	Mayor capacidad de enraizamiento	Rugini <i>et al.</i> , 1991
	Hayward	β -1,3- <i>Endoglucanasa</i>	Resistencia a <i>Botrytis cinerea</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 1999
		<i>Estilbeno sintasa</i>	Aumento en los niveles de resveratrol	Kobayashi <i>et al.</i> , 2000
Lima (<i>Citrus aurantifoliata</i> Swing.)	Mexican	<i>Cp-CTV</i>	Resistencia al Citrus Tristeza Virus (CTV)	Domínguez <i>et al.</i> , 2000
Mandarino (<i>Citrus reticulata</i> Blanco)	Ponkan	<i>pTA29-barnasa</i>	Frutos sin semillas	Li <i>et al.</i> , 2002
Manzano (<i>Malus x domestica</i> Borkh.)	-- ^a	<i>SAMasa</i>	Modificación en la biosíntesis de etileno	Bommineni <i>et al.</i> , 2000
	-- ^a	<i>Endoquitinasa</i>	Resistencia a la sarna del manzano (<i>Venturia inaequalis</i>)	Bolar <i>et al.</i> , 2000
	Jonagold	<i>bar</i>	Resistencia al herbicida fosfinotricina	De Bondt <i>et al.</i> , 1996
		<i>Rs-AFP2</i> y <i>AMP1</i>	Actividad antimicrobiana y antifúngica	De Bondt <i>et al.</i> , 1999
	Patrón M.26 Patrón M.9/29	<i>rol B</i>	Mayor capacidad de enraizamiento	Welander <i>et al.</i> , 1998 Zhu <i>et al.</i> , 2001
	Galaxy patrón M.26	<i>attE</i>	Resistencia al fuego bacteriano (<i>Erwinia amylovora</i>)	Ko <i>et al.</i> , 2000
	Elstar	Silenciamiento del <i>gen-S</i>	Autocompatible	Broothaerts <i>et al.</i> , 2004
	Galaxy Ariane	<i>Quitinasa</i>	Resistencia a la sarna del manzano (<i>Venturia inaequalis</i>)	Faize <i>et al.</i> , 2003
	Elstar Holsteiner Cox	<i>Vst1</i> y <i>PGIP</i>	Resistencia frente a hongos (<i>Venturia inaequalis</i>)	Szankowski <i>et al.</i> , 2003
	Ariane Galaxy	<i>pinB</i>	Resistencia a <i>Venturia inaequalis</i>	Faize <i>et al.</i> , 2004
	Gala	<i>HcrVf2</i>	Resistencia a <i>Venturia inaequalis</i>	Belfanti <i>et al.</i> , 2004

Tabla 6 (continuación)

Especie	Variedad	Genes	Fenotipo	Referencia	
Naranja amargo (<i>Citrus aurantium</i> L.)	-- ^a	<i>Cp-CTV</i>	Resistencia al CTV	Ghorbel <i>et al.</i> , 2000	
Naranja dulce (<i>Citrus sinensis</i> L. Obs.)	Pineapple	<i>PR-5</i>	Resistencia frente al hongo <i>Phytophthora citrophthora</i>	Fagoaga <i>et al.</i> , 2001	
Nogal (<i>Juglans regia</i> L.)	-- ^a	<i>cryIA(c)</i>	Resistencia a <i>Cydia pomonella</i>	Dandekar <i>et al.</i> , 1998	
Papaya (<i>Carica papaya</i> L.)	Sunset	<i>Cp-PRV</i>	Resistencia al Papaya Ringspot Virus (PRV)	Fitch <i>et al.</i> , 1992	
	Kapoho				
Peral (<i>Pyrus communis</i> L.)	Barlett	<i>D5C1</i>	Resistencia a <i>Erwinia amylovora</i>	Puterka <i>et al.</i> , 2002	
	Passé Crassane	<i>attE</i>	Resistencia a <i>Erwinia amylovora</i>	Reynoird <i>et al.</i> , 1999	
	Conference	<i>gus</i>	Expresión de GUS bajo promotores inducibles por la presencia de <i>E. amylovora</i>	Malnoy <i>et al.</i> , 2003	
	Patrón BP10030	<i>rol B</i>	Mayor capacidad de enraizamiento	Zhu <i>et al.</i> , 2003	
	Beurre Bosc	<i>rol C</i>		Bell <i>et al.</i> , 1999	
		-- ^a	<i>SAMasa</i>	Modificación en la biosíntesis de etileno	Bomineni <i>et al.</i> , 2000
Pomelo (<i>Citrus paradisi</i> Macf.)	Rio Red	<i>Cp-CTV</i> y <i>gna</i>	Resistencia al CTV y actividad insecticida	Yang <i>et al.</i> , 2000	
		<i>Cp-CTV</i>	Resistencia al CTV	Herron, 2003	
		<i>Snow Drop Lectin</i>	Actividad insecticida	Mirkov (comunicación personal)	
	Duncan	Genes implicados en la ruta de síntesis de carotenos	Mayores niveles de β -carotenos	Costa <i>et al.</i> , 2002	
Vid (<i>Vitis vinifera</i> L.)	Thompson Seedless	<i>Shiva 1</i> y <i>TomRSVCp</i>	Resistencia a hongos patógenos y al TomRSV	Scorza <i>et al.</i> , 1996	
	Neo Muscat	<i>RCC 2</i> , <i>nptII</i>	Resistencia a hongos patógenos	Yamamoto <i>et al.</i> , 2000	
	Russalka 3	<i>GFLVCp</i>	Resistencia al Grape Fanleaf virus (GFLV)	Gutoranov <i>et al.</i> , 2001	
	Russalka3 x Corinth white	<i>afp</i>	Proteína anticongelante		
	Silcora Thompson Seedless	<i>DefH9-iaaM</i>	Partenocarpia	Mezzetti <i>et al.</i> , 2002	
	Chardonnay	Peptidos microbicidas	Resistencia a ataques bacterianos	Vidal <i>et al.</i> , 2003	
	(<i>Vitis rupestris</i> S.)	-- ^a	Gen de la movilidad de GVA	Resistencia a Grapevine virus A (GVA)	Martinelli <i>et al.</i> , 2002

^a Variedad no indicada por los autores.

Peral

Al igual que el manzano esta especie se ve afectada por la enfermedad conocida como fuego bacteriano por lo que los programas de mejora tienen como objetivo la obtención de variedades resistentes. Perales transgénicos expresando el gen *attacin E* han demostrado presentar una gran resistencia a la enfermedad en comparación con controles no transformados (Reynoird *et al.*, 1999).

Recientemente se ha detectado que la inserción de un gen artificial con actividad similar al *attacin E*, el D5C1, también afecta a otros organismos patógenos del peral como *Psylla pyri*. Parece ser que el asentamiento prolongado de dicho insecto sobre un árbol transgénico provoca una disminución en el número de huevos depositados por la hembra y un peor desarrollo de las larvas (Puterka *et al.*, 2002). Otras aproximaciones en la búsqueda de resistencia a *Erwinia amylovora* han sido realizadas por Malnoy *et al.* (2003) en un interesante estudio de transformación con construcciones bajo el control de promotores inducibles en presencia de la bacteria.

También se han conseguido patrones enanizantes mediante la inserción del gen *rol C* de *A. rhizogenes* (Bell *et al.*, 1999) y patrones enanizantes con dificultad para enraizar han sido modificados con el gen *rol B* optimizando la producción de raíces (Zhu *et al.*, 2003). Se están solicitando permisos para la evaluación en campo de estas plantas (solicitud de liberación B/SE/04/1227, <http://www.gmo.info/jrc.it/>). Asimismo se han desarrollado investigaciones sobre el control de la maduración con idéntica metodología a la aplicada en manzano (Bommineni *et al.*, 2000).

Vid

Diferentes variedades de uva de mesa y de vino han sido transformadas con distintos objetivos. Callos embriogénicos de la variedad 'Neo Muscat' han sido transformados con el gen RCC2 que codifica para quitinasas confiriendo a las plantas transgénicas obtenidas resistencia a hongos patógenos (Yamamoto *et al.*, 2000).

Otras variedades de *Vitis vinifera* han sido transformadas con la proteína de cubierta del GFLV (Grape fanleaf virus) y proteínas anticongelantes (Gutoranov *et al.*, 2001) o con genes que codifican diferentes péptidos con actividad antimicrobiana (Vidal *et al.*, 2003; Scorza *et al.*, 1996), así como con el gen DefH9-iaaM que confiere partenocarpia en flores de diferentes especies (Mezzetti *et al.*, 2002). En otros casos se ha evaluado el efecto de diferentes promotores sobre la expresión de un gen bifuncional, resultado de la fusión de los genes marcadores *gfp* y *npII* (Li *et al.*, 2001). El efecto de estos genes sobre las plantas transformadas no ha sido descrito.

Vitis rupestris es otra especie de este género que también ha sido transformada. Embriones somáticos se han transformado con el gen GVA (Grapevine virus A) que codifica la proteína de movimiento del virus (Martinelli *et al.*, 2002) aunque el efecto del transgén en las plantas obtenidas aun no ha sido evaluado.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE ESPECIES DE PRUNUS

La Tabla 7 recoge los principales logros alcanzados en la transformación de algunas de las especies de *Prunus*. En los casos donde se ha conseguido producir planta transformada, las eficiencias de transformación (cuando son indicadas) son en general muy bajas, no superando en ningún caso el 30% a partir de material juvenil (Mante *et al.*, 1991), aunque a menudo las frecuencias obtenidas oscilan entre 0,2% (Miguel y Oliveira, 1999) y 3% (Scorza *et al.*, 1995b).

Albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.)

Quizás sea la especie en la que menos estudios se han publicado que utilicen la transformación genética como técnica de mejora. Una de las más importantes líneas de investigación está basada en la búsqueda de individuos resistentes al PPV, causante de la enfermedad denominada sharka. La sharka afecta al ciruelo, melocotonero y albaricoquero. Ocasiona pérdidas en la cantidad y en la calidad de los frutos y debilita a los árboles infectados, de hecho, es considerada la enfermedad más importante que afecta al género *Prunus*.

Hamilton (1980) postuló que la expresión de proteínas virales en plantas transgénicas podría conferir a estas inmunidad frente al virus. Son numerosos los trabajos donde se hace referencia a este tipo de resistencia adquirida (Sturtevant y Beachy, 1993).

También se ha conseguido resistencia a virus mediada por ARN. En este caso se introducen en la planta versiones truncadas del ARN viral o zonas no traducibles. Este tipo de resistencia parece haber dado mejores resultados e individuos totalmente resistentes, cosa difícil de conseguir mediante la introducción de una proteína viral (Prins, 2003).

La primera publicación sobre transformación de *Prunus armeniaca* L. aparece en el año 1992. En un medio selectivo con kanamicina se consiguieron regenerar

plantas transformadas a partir de embriones inmaduros (Laimer da Câmara Machado *et al.*, 1992). Posteriormente, tras enraizar y aclimatar plantas con la proteína de la cubierta del PPV, se observó que estos individuos eran más resistentes a la infección que los controles no transformados (da Câmara Machado *et al.*, 1995a). Estos excelentes resultados permiten anticipar la posibilidad de utilizar en variedades comerciales de albaricoquero la protección mediada por genes del patógeno.

Una publicación posterior (Escalettes *et al.*, 1994) describe el primer intento de transformación de material adulto en albaricoquero, en concreto hojas. La transformación y posterior selección disminuyeron drásticamente los niveles de regeneración pero se consiguieron obtener tres plantas quiméricas.

Almendro (*Prunus dulcis* [Miller] D.A. Webb)

En el primer trabajo con almendro (Archilletti *et al.*, 1995) se estableció un eficiente protocolo de transformación de hojas mediada por *A. tumefaciens*. Observaron que el factor más influyente, junto con el genotipo, fue el tiempo de cocultivo debiendo retrasar la selección con kanamicina al menos seis días para obtener resultados. Con tiempos menores las zonas GUS positivas en los explantos eran de proporciones muy reducidas. Estos resultados fueron corroborados en un trabajo posterior (Ainsley *et al.*, 2002) en el que se estableció en 5 días el tiempo óptimo de cocultivo. Además, se detectaron diferencias en función no solo del genotipo sino también de la cepa de *Agrobacterium* utilizada y se observó una mejoría en los resultados al añadir acetosiringona en el medio de crecimiento de la bacteria.

El primer trabajo en el que se comunicó la obtención de planta transformada de almendro expresando genes marcadores es relativamente reciente (Miguel y Oliveira, 1999). Después de transformar hojas con dos cepas diferentes de *Agrobacterium* y la regeneración de brotes adventicios en un medio selectivo con kanamicina consiguieron 4 clones, un individuo totalmente transformado y tres quimeras. Para la obtención de dichos individuos fue necesario aplicar una presión de selección muy baja o retrasarla 20 días. Aunque el material vegetal utilizado

fueron hojas, dichas hojas provenían de brotes de semillas germinadas *in vitro* de la variedad 'Boa Casta'. Por lo tanto, se trata de material juvenil de características agronómicas desconocidas.

Cerezo (*Prunus avium* L.), guindo (*Prunus cerasus* L.) y patrones de cerezo

Mediante biolística se transformó la variedad Summit (*P. avium*) y dos patrones enanizantes de cerezo, Inmil[®] (*P. incisa* x *serrula*) y Damil[®] (*P. davyckensis*) (Druart *et al.*, 1998). Al intentar disociar las quimeras formadas no tuvieron éxito por lo que fue imposible establecer una línea totalmente transformada.

La transformación con *A. rhizogenes* permitió la obtención de planta transgénica a partir de raíces del patrón de cerezo 'Colt' (*P. avium* x *pseudocerasus*) (Gutiérrez-Pesce *et al.*, 1998). La infección con *A. rhizogenes* indujo la formación de raíces adventicias. Estas raíces, cultivadas por separado o aún unidas a los brotes, generaron brotes adventicios. Los brotes transgénicos fueron capaces de enraizar en medio sin auxinas o con muy bajas concentraciones. Resultados similares se obtuvieron tras transformar brotes de los patrones Inmil[®] (*P. incisa* x *P. serrula*) y Damil[®] (*P. davyckensis*) (Druart *et al.*, 1998). En estos trabajos se utilizaron genes que inactivan o degradan herbicidas, lo que tiene gran aplicación sobre todo en patrones. Cuando el gen introducido tiene estas características, es decir, confiere resistencia a un determinado agente, el propio gen sirve como gen marcador. Las plantas transformadas se obtienen en un medio selectivo con el herbicida para el que se ha adquirido tolerancia.

Mediante embriogénesis somática se obtuvo planta transformada a partir del patrón de cerezo *Prunus subhirtella autumnosa* (da Câmara Machado *et al.*, 1995b). Con una determinada combinación de reguladores de crecimiento, una línea de callos resultó ser altamente embriogénica. Utilizando estos callos como diana para *Agrobacterium tumefaciens* establecieron una estirpe de callos embriogénicos que habían integrado los genes *nptII* y *gus*. A lo largo de diversos subcultivos, en un medio

selectivo con kanamicina, consiguieron que la totalidad de las células de dichos callos estuvieran transformadas. De estos callos regeneraron brotes. Un protocolo similar fue aplicado posteriormente con éxito en el patrón Inmil[®] (Druart *et al.*, 1998).

Adaptar especies a climas más fríos permitirá extender su cultivo a zonas nuevas. Callahan *et al.* (1991) hacen referencia a la dificultad de obtener individuos resistentes al frío y la costosa identificación de los individuos con fenotipo resistente, debido al tiempo necesario para la evaluación en campo. Se ha trabajado sobre un híbrido cerezo-guindo (Dolgov, 1999) introduciendo el gen *aff* (antifreeze protein), que codifica para una proteína protectora de la congelación perteneciente a una especie de pez ártico, *Pseudopleuronectes americanus*. Se obtuvo planta transformada, pero los híbridos transgénicos caracterizados no presentaron fenotipo diferente a las plantas control, probablemente debido a una insuficiente expresión del transgén. La expresión de esta proteína ha tenido éxito en tabaco, donde redujo la temperatura de congelación en 3-5°C en las plantas transformadas (Lee *et al.*, 1990) citado por Dolgov, 1999).

Ciruelo (*Prunus domestica* L.)

El equipo del Dr. Scorza en Virginia (Estados Unidos) ha desarrollado un extenso trabajo a lo largo de los últimos años utilizando hipocotilos de semillas de ciruelo. Después de optimizar un protocolo de transformación y conseguir regenerar plantas expresando los genes marcadores *npII* y *gus* a partir de segmentos de hipocotilo (Mante *et al.*, 1991) pasaron a insertar una construcción que contenía el gen que codifica para la proteína de cubierta del virus de la sharka (CP-PPV) (Scorza *et al.*, 1994). De estos ensayos se seleccionó un clon, conocido como C-5, que resultó ser altamente resistente a la infección por el virus (Ravelonandro *et al.*, 1997). En este trabajo se pone de manifiesto la relación entre el número de copias integradas y la resistencia de la planta al virus. El clon C-5 presenta, además de varias copias insertadas, bajos niveles de transcrito y niveles indetectables de proteína lo que indica un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional (Scorza

et al., 2001). Recientemente, mediante el cruzamiento de los clones C-5 con las variedades comerciales ‘Prunier d’Ente 303’ y ‘Quetsche 2906’ se han conseguido híbridos con fenotipo resistente al PPV, heredándose el transgén de forma mendeliana y produciéndose un número de descendientes resistentes próximo al 50% (Ravelonandro *et al.*, 2002).

Este mismo grupo publicó un trabajo en el que mediante la introducción del gen que codifica la proteína de cubierta del PRSV (Papaya Ringspot Virus) intentaron conseguir resistencia al PPV. Aunque en un principio las plantas presentaban cierta resistencia al cabo de 32 meses se detectó la presencia del virus en toda la planta (Scorza *et al.*, 1995b).

Otros investigadores han trabajado con material adulto de ciruelo (Escalettes *et al.*, 1994), transformando con *A. tumefaciens* o con *A. rhizogenes*, obteniendo mejores resultados con *A. tumefaciens*, con la que consiguieron individuos quiméricos. Sin embargo, las raíces obtenidas después de la infección con *A. rhizogenes* resultaron ser altamente recalcitrantes a la regeneración. En este trabajo se puso de manifiesto una fuerte influencia del genotipo y una reducción drástica en la tasa de regeneración al aplicar un medio selectivo a las hojas. Estas observaciones fueron corroboradas en trabajos posteriores (Yancheva *et al.*, 2002) donde si se consiguió planta transformada, para los dos genotipos con los que trabajaban, incrementando paulatinamente en cada subcultivo la presión de selección.

Melocotonero (*Prunus persica* L.)

Ye *et al.* (1994) optimizaron las técnicas biolísticas para esta especie. Los proyectiles utilizados consisten en partículas de tungsteno recubiertas con el plásmido pBI426 que incluye los genes *npII* y *gus*. Obtuvieron 65 líneas de callos resistentes a kanamicina a partir del bombardeo de tejido embrionario. Aunque no se obtuvo regeneración, 19 de estas líneas dieron lugar a estructuras similares a brotes. Adicionalmente, se aplicó esta técnica sobre diversos tejidos aunque solo se obtuvo transformación estable cuando se utilizaron callos provenientes de

embriones, no con el resto de tejidos bombardeados, donde toda la transformación obtenida fue transitoria.

Scorza *et al.* (1995a) desarrollaron un procedimiento donde combinaron la técnica descrita anteriormente y la infección con *Agrobacterium tumefaciens* utilizando meristemos apicales. Al bombardeo con partículas de oro le seguía un cocultivo con la bacteria durante 48 horas. Sin embargo, el daño mecánico producido en los meristemos provocó una alta mortalidad en el material vegetal y el crecimiento de la bacteria fue difícil de controlar.

Una línea de estudio muy interesante que se ha desarrollado en melocotón, se basa en el uso de cepas de *A. tumefaciens* conocidas como “shooty mutants”. Son cepas sin desarmar que tienen una mutación, consistente en una interrupción con el transposón tn5, en un gen implicado en la síntesis de auxinas pero que mantienen intacto el gen *ipt*, implicado en la síntesis de citoquininas. La infección con una cepa “shooty mutant” provoca en la planta diana la aparición de una serie de tumores a partir de los cuales se diferencian brotes transgénicos. Este tipo de transformación produce plantas con una mayor síntesis endógena de citoquininas dando lugar a un fenotipo más ramificado y con entrenudos más cortos. En trabajos iniciales se intentó transformar tallos de brotes propagados *in vitro* y, aunque se obtuvieron callos transgénicos (en los que quedó demostrada la inserción del ADN-T) capaces de crecer en ausencia de citoquinina exógena, no se obtuvieron plantas transformadas (Hammerschlag *et al.*, 1989). Posteriormente, mediante la transformación de hipocotilos de semillas germinadas de ‘Redhaven’, se consiguieron varias líneas transgénicas caracterizadas por una elevada expresión de citoquininas (Smigocki y Hammerschlag, 1991). Al tener las células transgénicas unos mayores niveles de citoquininas, la estrategia para seleccionar las células transformadas consistió en un medio pobre en reguladores del crecimiento. En estas condiciones se desarrollaron yemas axilares diferenciadas a partir de embriones infectados por la bacteria. Demostrando la integración del transgén mediante PCR y Southern, este trabajo fue el primero en comunicar la obtención de plantas transformadas de melocotonero. La evaluación *in vitro* y en invernadero de estas

plantas demostró una senescencia retardada en ausencia de citoquinina exógena comparada con el control. Asimismo, dos de las tres líneas mostraron un menor desarrollo en invernadero y una de ellas mostró mayor ramificación que las plantas control (Hammerschlag y Smigocki, 1998).

En el género *Prunus* el periodo de maduración es muy corto por lo que conseguir aumentar el calendario de producción es muy interesante. En melocotonero se han estudiado ampliamente los genes que participan en este proceso (Callahan *et al.*, 1989). El reblandecimiento de frutos se ha conseguido retrasar en tomate mediante la expresión de genes antisentido en la planta (Gray *et al.*, 1992). Este sistema anula parcialmente la acción de los enzimas causantes del reblandecimiento ya que el ARN antisentido híbrida con el ARN correcto formando un ARN de doble cadena impidiendo así la correcta traducción de la proteína. En la variedad de melocotonero 'Redhaven' ya se han caracterizado tres ADNc que codifican diferentes endo- β -1,4-glucanasas, enzimas muy importantes en el proceso de reblandecimiento y caída del fruto (Trainotti *et al.*, 1997).

Tabla 7.- Transformación en *Prunus* spp.

Especie	Varietad	Técnica	Construcción (Cepa)	Genes introducidos	Explantos	E. T. (%) ^a	Referencia
<i>P. armeniaca</i>	Keckskemeter	<i>A. tumefaciens</i>	pBinGUSint (LBA 4404)	<i>nptII, gus</i>	Cotiledones	--	Laimer da Câmara Machado <i>et al.</i> , 1992
			pRi (A4)	ADN-T (<i>ipt</i>)	Brotos	--	
	H152 (Screara x Stark Early Orange)	<i>A. tumefaciens</i>	pRipMarcel35Pp vCp (C7)	ADN-T (<i>ipt</i>), <i>ppvCp</i>		--	
			pBin19NPTII- GUSint (C58GI)	<i>nptII, gus</i>	Hojas	0	Escalettes <i>et al.</i> , 1994
<i>P. avium</i>	Mazzard	<i>A. rhizogenes</i>	pGANPTII- PPVcP-GUS- HYG (C58C)	<i>nptII, gus, ppvCp, hyg</i>		--	
			pRi1855 (NCPPB 1855)	ADN-T (<i>ipt</i>)	Brotos ^b	0	Gutiérrez-Pesce <i>et al.</i> , 1998
<i>P. avium</i> x <i>pseudocerasus</i>	Colt	<i>A. rhizogenes</i>		ADN-T (<i>ipt</i>)	Brotos ^b	2,5 ^c	
<i>P. davykensis</i>	Damil®	<i>A. rhizogenes</i>	pRi 15834 + pBin19 'Basta' ATCC	ADN-T (<i>ipt</i>), <i>bar</i>	Brotos ^b	--	Druart <i>et al.</i> , 1998
<i>P. domestica</i>	Stanley	<i>A. tumefaciens</i>	pCGN 7001, pCGN 7314 (EHA 101)	<i>nptII, gus</i>	Hipocotilos	10 - 30	Mante <i>et al.</i> , 1991
Damas de Toulouse		<i>A. rhizogenes</i>	pRi (A4)	ADN-T (<i>ipt</i>)	Brotos ^b	0	Escalettes <i>et al.</i> , 1994
			pRipMarcel35PP vCp (C7)	ADN-T (<i>ipt</i>), <i>ppvCp</i>			

Tabla 7 (continuación)

Especie	Varietal	Técnica	Construcción (Cepa)	Genes introducidos	Explanto	E. T. (%) ^a	Referencia
<i>P. domestica</i>							
Marianna (GF8-1)	<i>A. tumefaciens</i>		pBin19NPTII-GUSint (C58G1)	<i>nptII, gus</i>	Hojas	--	Escaliettes <i>et al.</i> , 1994
			pGANPTII-PPVCp-GUS-HYG (C58C)	<i>nptII, gus, ppvCp, hyg</i>			
			pGA482GG/PPV-CP33 (C58 / Z707, EHA 101)	<i>nptII, gus, ppvCp</i>		1,2	Scorza <i>et al.</i> , 1994
Stanley	<i>A. tumefaciens</i>		pGA482GG/PPP RV (C58 / Z707)	<i>nptII, gus, prvCp</i>	Hipocotilos	2	Scorza <i>et al.</i> , 1995
B70146	<i>A. tumefaciens</i>		pGA482GG/PPP RV (C58 / Z707)	<i>nptII, gus, prvCp</i>	Hipocotilos	3	
Quetsche			psmGFP (LBA 4404)	<i>nptII, gfp</i>	Hojas	0,8 2,7	Yancheva <i>et al.</i> , 2002
Kyustendilska sinya	<i>A. tumefaciens</i>						
Supernova						0	
MN51	<i>A. tumefaciens</i>		pBinGUSint (LBA 4404)	<i>nptII, gus</i>	Hojas	0	Archilietti <i>et al.</i> , 1995
Boa Casta	<i>A. tumefaciens</i>		pFAJ3003, p35SGUSint (EHA 105)	<i>nptII, gus</i>	Hojas de semillas germinadas	0,2	Miguel y Oliveira, 1999
Nonpareil						0	
Ne Plus Ultra	<i>A. tumefaciens</i>		p35SGUSint (LBA 4404, EHA 105)	<i>nptII, gus</i>	Hojas	0	Ainsley <i>et al.</i> , 2002

Tabla 7 (continuación)

Especie	Variiedad	Técnica	Construcción (Cepa)	Genes introducidos	Explantó	E. T. (%) ^a	Referencia
<i>P. fruticosa</i> x <i>avium</i>	Black Eagle	<i>A. tumefaciens</i>	pPCV635 (GV3101)	<i>afp</i> , <i>hpt</i>	Hojas	--	Dolgov, 1999
			p3SSGUSint (EHA 105)	<i>nptII</i> , <i>gus</i>		--	Dolgov <i>et al.</i> , 1999
<i>P. incisa</i> x <i>serrula</i>		<i>A. tumefaciens</i>	p3SSGUSint (LBA 4404)	<i>nptII</i> , <i>gus</i>	Callos embriogénicos	--	
	Inmil®	<i>A. rhizogenes</i>	pRi 15834 + pBin19 'Basta' (ATCC)	ADN-T (<i>ipt</i>), <i>bar</i>	Brotos ^b	--	Druart <i>et al.</i> , 1998
<i>P. persica</i>	14DR60				Callos embriogénicos		
	Tennessee Natural PER 2D	<i>A. tumefaciens</i>	pGA472 (A281)	<i>nptII</i>	Hojas Embriones inmaduros	0	Scorza <i>et al.</i> , 1990
Redhaven	<i>A. tumefaciens</i>	pTiA6 (tms328::Tn5) "Shooby mutant"	ADN-T (<i>ipt</i>)	Ejes de embriones, embriones inmaduros, callos de embrión, cotiledones, hoja y ápices de brotes	Brotos	0	Hammerschlag <i>et al.</i> , 1989
					Embriones inmaduros	--	Smigoeki y Hammerschlag, 1991
Lovell	Biolistica	pBI505, pBI426	<i>nptII</i> , <i>gus</i>	Callos embriogénicos de peciolo de hojas	Embriones inmaduros	0	Ye <i>et al.</i> , 1994
Autumno rosa	<i>A. tumefaciens</i>	pBinGUSint (LBA 4404)	<i>nptII</i> , <i>gus</i>	Callos embriogénicos de peciolo de hojas	--	da Câmara Machado <i>et al.</i> , 1995	

^a Eficacia de transformación. Cuando no se indican es porque no se han podido deducir de la información proporcionada por los autores.

^b Estos brotes produjeron raíces transgénicas que posteriormente regeneraron brotes transformados.

^c Eficacia referida al número de raíces formadas después de la infección con *A. rhizogenes*.

ESTADO ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

En cítricos se han producido avances muy importantes con material juvenil, normalmente con material procedente de semillas apomícticas germinadas de una determinada variedad, permitiendo estudiar el efecto de diferentes transgenes en plantas transformadas con idénticas características que la variedad madre. Sin embargo, sería conveniente transformar material adulto debido a que las variedades del género *Citrus* tienen periodos juveniles muy largos. Mientras que los naranjos dulces (que representan aproximadamente el 70% de la producción mundial de cítricos) necesitan más de 20 años para perder completamente los caracteres juveniles y comenzar la producción (Peña y Navarro, 1999), la utilización de tejido adulto durante la transformación del naranjo dulce 'Pineapple' produjo plantas que florecieron y dieron frutos en apenas 14 meses (Cervera *et al.*, 1998a). Sin embargo, cuando se comparan las eficiencias de transformación obtenidas en cítricos utilizando material juvenil y adulto estas disminuyen dramáticamente en este último caso. Por ejemplo, en el caso de la naranja dulce 'Pineapple' la eficiencia de transformación es tres veces inferior utilizando material adulto que juvenil (Cervera *et al.*, 1998a). Otros autores han obtenido resultados similares siendo capaces de transformar tan solo una de cuatro variedades ensayadas y con eficiencias relativamente bajas (Almeida *et al.*, 2003).

También en el caso de *Prunus* se ha transformado en muchas ocasiones material juvenil y en la mayoría de los casos se han utilizado solo genes marcadores (Tabla 7). En todos los casos, en los que se han introducido genes de interés, el material de partida ha sido hipocotilos (Scorza *et al.*, 1995b; Laimer da Câmara Machado *et al.*, 1992). Tan solo unos patrones comerciales de cerezo han sido transformados con el ADN-T de *A. rhizogenes* induciendo un mejor enraizamiento en las plantas transformadas (Gutiérrez-Pesce *et al.*, 1998).

El genotipo es un factor crítico en el desarrollo de los protocolos de transformación. Por lo general, protocolos desarrollados para una determinada

variedad no son válidos para otras. En especies como manzano o peral, que son transformadas eficientemente, la información proporcionada en esta introducción indica que son muy pocos genotipos de una especie en particular los que han sido transformados y, en algunos casos, esos genotipos no son variedades comercialmente importantes. El desarrollo de protocolos de transformación que no dependan del genotipo a transformar será difícil de conseguir con las metodologías actuales. Diferentes autores han intentado transformar sin éxito meristemos provenientes de brotes micropropagados (Ye *et al.*, 1994; Druart *et al.*, 1998). La transformación de meristemos podría eliminar la necesidad del proceso de regeneración para la obtención de plantas transgénicas, permitiendo la manipulación genética de las variedades comerciales ya establecidas. Sin embargo, la alta mortalidad de los explantos y las dificultades a la hora de controlar el crecimiento de *Agrobacterium* han limitado el desarrollo de esta metodología (Scorza *et al.*, 1995a). Recientemente, se ha desarrollado un protocolo para diferentes variedades de vid que podría ser una solución para esta cuestión (Mezzetti *et al.*, 2002). Los autores generaron un tejido que denominaron “agregado meristemático” a partir de brotes *in vitro* mediante métodos mecánicos (eliminación de los meristemos apicales) y químicos (incremento progresivo en la concentración de citoquininas) con el fin de eliminar la dominancia apical y estimular la proliferación basal de meristemos. Este agregado es un tejido con una gran capacidad regenerativa y que puede ser transformado eficazmente por *Agrobacterium* dada la gran cantidad de células en división activa presentes en él. Este sistema parece ser fácilmente adaptable para otras especies de frutales leñosos; por ejemplo, en nuestro laboratorio han sido producidos agregados meristemáticos de tres variedades diferentes de albaricoquero con tasas de regeneración similares a las descritas en vid.

A pesar de la importancia económica del género *Prunus*, hasta la fecha los resultados han sido mucho menores que en otros frutales leñosos. Las razones para este aparente retraso pueden estar en una mayor dificultad para obtener regeneración en estas especies que parecen ser bastante recalcitrantes y en una elevada sensibilidad a los antibióticos. Mientras que en especies poco sensibles

como los cítricos, peral, nogal u olivo se utilizan sistemáticamente 100 mg/L de kanamicina para seleccionar las células transformadas, en *Prunus* es frecuente que no solo las concentraciones inhibitorias sean mucho menores (entre 5 y 10 mg/L en almendro, por ejemplo) sino que sea necesario utilizar estrategias específicas de selección. Por estas razones la transformación de *Prunus* podría ser sensiblemente mejorada con la utilización de la llamada selección positiva basada en proporcionar a las células transformadas una ventaja metabólica en vez de destruir a las no transformadas (Joersbo, 2001). La utilización de esta estrategia ha redundado en eficiencias de transformación 10 veces mayores que la selección con kanamicina en especies recalcitrantes como la remolacha azucarera (Joersbo *et al.*, 1998). Probablemente, la razón de esta mayor eficiencia está en el hecho de que los explantos se necrosan menos y esto podría mejorar la emergencia de brotes transgénicos, ya que la regeneración de las células transgénicas embebidas en tejido necrótico podría verse inhibida (Joersbo, 2001).

La transformación con genes que inducen regeneración es otra posibilidad que se está explorando ampliamente. Con frecuencia se ha utilizado el gen de la isopentenil transferasa, *ipt*, un gen de *Agrobacterium* implicado en la síntesis de citoquininas. Sin embargo, la expresión constitutiva de este gen produce unos niveles de citoquininas que afectan el crecimiento de la planta y su desarrollo, por lo que su utilización está condicionada a su control mediante un sistema de expresión inducible (Zuo *et al.*, 2002) o a su eliminación posterior (Ebinuma *et al.*, 1997). Se está desarrollando un importante trabajo para identificar genes que promuevan la regeneración, presumiblemente relacionados con la síntesis o reconocimiento de citoquininas o que promueven la transición del estado vegetativo a embriogénico u organogénico (Zuo *et al.*, 2002). La utilización de este tipo de genes ofrece la posibilidad de una transformación sin marcadores pero además tiene un gran potencial para mejorar las eficiencias de transformación en especies recalcitrantes puesto que la inserción de estos genes en las células induce su división y la regeneración adventicia en ausencia de reguladores del crecimiento y de selección con antibióticos.

Las nuevas técnicas tienen la capacidad potencial de revolucionar la mejora de frutales leñosos. Hay varias ventajas inherentes en la transferencia de genes a frutales para su mejora. Una vez que una línea transgénica útil es identificada, asumiendo la estabilidad del transgén, la propagación vegetativa que es el modo normal de multiplicar árboles frutales, permite una ilimitada producción. No se requiere fijación del transgén a través del ciclo sexual. El hecho de que unas pocas variedades suelen suponer la mayoría de la producción en muchos frutales incrementa el impacto que una variedad transgénica podría tener. Aunque, en la actualidad los avances en la transformación de frutales están muy por detrás de los conseguidos en muchas especies hortícolas, es de esperar que en los próximos años se produzca un incremento en los éxitos conseguidos insertando genes de interés en variedades comerciales de estas especies.



***MATERIALES Y
MÉTODOS***

MATERIAL VEGETAL

En este estudio se han utilizado la variedad americana ‘Helena’, cedida por el Dr. Craig A. Ledbetter del Agricultural Research Service (U.S.D.A) en Fresno (California), y la variedad española ‘Canino’. Ambas variedades fueron introducidas *in vitro* y multiplicadas en un medio de proliferación diseñado específicamente para cada una de ellas (Pérez-Tornero y Burgos, 2000). Los brotes se subcultivan cada tres semanas, y se mantienen a $22\pm 1^\circ\text{C}$, con luz fluorescente blanca ($55\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) y un fotoperiodo de 16 horas.

Helena

Variedad americana que fructifica dentro de la primera quincena del mes de Junio. El diámetro de los frutos es de 6 a 6,5 cm y tienen un peso medio de 125 g. Los árboles son vigorosos y ligeramente abiertos. Aunque es heterocigótica para la androesterilidad las flores son autocompatibles y los árboles producen fruta regularmente (Ledbetter, 1994). Esta variedad fue obtenida en el programa de mejora desarrollado en el Horticultural Crops Research Laboratory en Fresno, California.

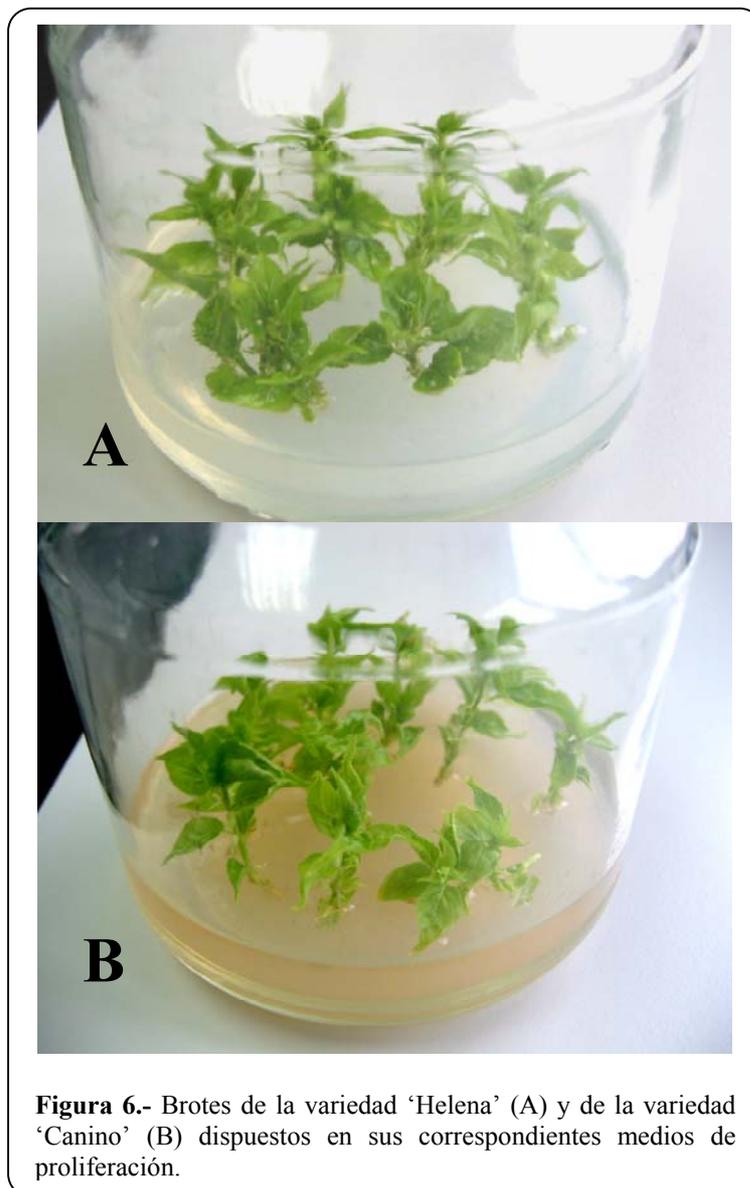
El medio de proliferación para ‘Helena’ (medio A) consistió en los macronutrientes de QL (Quoirin y Lepoivre, 1977) y los micronutrientes, vitaminas y componentes orgánicos de DKW (Driver y Kuniyuki, 1984), 3% de sacarosa y 0,7% de agar (HispanLab, S.A.). Como reguladores del crecimiento se añaden $3,31\ \mu\text{M}$ de N⁶-bencilaminopurina (BAP) y $0,2\ \mu\text{M}$ de ácido indol-3-butírico (IBA) (Figura 6 A). El pH se ajustó a 5,7 antes de esterilizar en el autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Canino

Variedad española de origen valenciano, autocompatible y principalmente cultivada en la Comunidad Valenciana (Egea *et al.*, 1994b). De maduración mediantardía, muy productiva ya desde los primeros años, con vigor medio y buena calidad

del fruto (Della Strada *et al.*, 1989). Es una de las variedades de albaricoquero que posee una mayor plasticidad en cuanto a su adaptación a diferentes zonas (Pérez-Gonzales, 1992). Sus semillas son utilizadas para la producción de patrones francos de albaricoquero.

El medio de proliferación para ‘Canino’ (medio B) tenía la misma composición que el descrito para ‘Helena’ al que se le añade CaCl_2 3 mM. Además, se adicionó $1,12 \mu\text{M}$ de BAP ribósido (BAPr), $0,05 \mu\text{M}$ de IBA, $2,1 \mu\text{M}$ de 6(3hidroxibencilamino) purina (Meta-Topolina), $29,6 \mu\text{M}$ de adenina y $0,8 \text{mM}$ de floriglucinol (Figura 6 B). El pH se ajustó a 5,7 antes de esterilizar en el autoclave a 121°C durante 20 minutos.



OPTIMIZACIÓN DE LA REGENERACIÓN

En el Departamento de Mejora del CEBAS se diseñó por primera vez un protocolo reproducible de regeneración de albaricoquero a partir de material adulto (Pérez-Tornero *et al.*, 2000) consiguiendo, en función del genotipo, porcentajes de regeneración de casi el 60% utilizando un medio de regeneración en el que todos los componentes fueron los mismos que los utilizados en el medio de proliferación, excepto el agente solidificante y los reguladores del crecimiento.

Estrategia general de regeneración

El medio de regeneración tenía la misma composición que el medio de proliferación descrito para la variedad 'Helena', con la excepción de los reguladores del crecimiento, que consisten en 9,0 μM de tidiazurón (TDZ) y 4,0 μM de ácido naftalenacético (NAA), y el agente gelificante, agargel (Sigma) a 0,45%. El pH se ajusta a 5,7 antes de ser esterilizado en el autoclave a 121°C durante 20 minutos, después se deja enfriar hasta 50°C y se dispensan 25 mL de medio en placas de Petri (8,5 cm de diámetro x 1,5 cm de profundidad) en condiciones asépticas en la cabina de flujo laminar.

Los explantos utilizados consistieron en las cuatro primeras hojas expandidas de brotes de 3 semanas de edad que se separaron y se colocaron en agua estéril. Cada hoja se cortó transversalmente al nervio central 3 ó 4 veces sin llegar a separar totalmente las secciones de hoja. Se dispusieron 7 hojas por placa con la cara adaxial en contacto con el medio. Las placas se sellaron con Parafilm[®] y se incubaron en oscuridad a $22\pm 1^\circ\text{C}$ durante 2 semanas. Posteriormente se expusieron a la luz, con un fotoperiodo de 16 horas, una intensidad luminosa de $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 60% de humedad relativa.

Para cada tratamiento se prepararon al menos 5 placas de Petri y los tratamientos que mejoraron la regeneración, respecto al control, fueron repetidos al menos 2 veces.

Efecto del volumen de medio

Hojas de ‘Canino’ y ‘Helena’ de brotes en proliferación se dispusieron en medio de regeneración previamente dispensado, mediante una pipeta electrónica, en volúmenes exactos de 15, 20, 25 ó 30 mL por placa Petri.

Efecto del agente solidificante

Se colocaron hojas de ‘Canino’ y ‘Helena’ en medio de regeneración con 0,45% de agargel (Sigma), 0,7% de “Agar purificado” (HispanLab, S.A.) ó 0,9% de agarosa “Seaplaque” (Duchefa).

Efecto del medio de proliferación

Se utilizaron hojas de brotes de ‘Canino’ y ‘Helena’ mantenidos en diferentes medios durante la etapa de proliferación para estos ensayos.

En ‘Helena’, se comparó la regeneración cuando las hojas provenían de brotes que se encontraban en los dos medios de proliferación citados con anterioridad para las dos variedades (medio A y medio B).

Para ‘Canino’ se tomaron hojas de brotes mantenidos en medio B y hojas de brotes que habían permanecido durante el último subcultivo (tres semanas) en un medio denominado M2 (Pérez-Tornero y Burgos, 2000), una modificación del medio “Woody Plant” (WPM) (Lloyd y McCown, 1981).

Efecto de inhibidores de la acción del etileno

Hojas de ‘Canino’ y ‘Helena’ se dispusieron en medio de regeneración añadiendo 30, 60 ó 120 μM de ion plata (Ag^+) en la forma de tiosulfato de plata (STS) ó 0,5, 1, 5, 10 ó 25 μM de aminoetoxyvinilglicina (AVG).

También se estudió el efecto de la adición simultánea de los dos inhibidores del etileno. Para ello se colocaron hojas de la variedad ‘Helena’ en medio de regeneración con la adición de 60 μM de STS y 0,5 μM de AVG.

La solución de trabajo de STS fue preparada mezclando una solución 0,465 mM de nitrato de plata (AgNO_3) con una solución 1,865 mM de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (relación 1:4). La solución de AgNO_3 se añadió sobre la de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ agitando continuamente. La solución de trabajo de AVG se preparó disolviéndolo en agua. Las dos disoluciones fueron esterilizadas por filtración y añadidas al medio después del autoclave.

Efecto de las poliaminas solas o en combinación con los inhibidores del etileno

Se estudió el efecto de dos poliaminas diferentes sobre la regeneración de 'Helena' añadiendo al medio de regeneración putrescina 0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10 ó 20 mM o espermidina 0,5; 1; 2 ó 5 mM. Se probó su efecto en solitario y en combinación con los inhibidores de etileno STS (60 μM) o AVG (0,5 μM). Las soluciones de trabajo de las poliaminas fueron esterilizadas por filtración y añadidas al medio después del autoclave.

Efecto de pulsos con auxinas

Se dispusieron hojas de 'Helena' en medio de regeneración enriquecido con cantidades adicionales de NAA, 5,37 ó 10,74 μM , o de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), 4,52 ó 9,04 μM , durante 4 días y después fueron transferidas al medio de regeneración con la adición de 60 μM de STS.

EFECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS SOBRE EL MATERIAL NO TRANSFORMADO

La utilización de construcciones que contienen el gen *npII* permite la selección de las plantas transformadas mediante la adición de un antibiótico aminoglicósido. Para diseñar los medios con la concentración adecuada de antibiótico es necesario estudiar previamente su efecto sobre el material vegetal no transformado.

Todos los antibióticos se esterilizaron por filtración y se añadieron al medio después de la esterilización en el autoclave.

Efecto de los antibióticos en la regeneración

Antibióticos aminoglicósidos para seleccionar plántulas transformadas

Se adicionaron al medio de regeneración distintos antibióticos aminoglicósidos a diferentes concentraciones con el fin de conocer a que concentraciones inhibían total o parcialmente la regeneración en material sin transformar. De esta manera se pretende establecer la concentración inhibitoria y el antibiótico óptimo para seleccionar plántulas transgénicas y eliminar o reducir el número de escapes.

Para ello se dispusieron hojas de 'Helena' en medio de regeneración y se añadieron 8,6; 17,1; 25,7; 34,3; 42,9 ó 85,8 μM de kanamicina, o 10, 20 ó 40 μM de paromomicina o estreptomomicina, o 0,75; 1,5; 2,5; 5; 10; 20 ó 40 μM de geneticina[®] y se compararon con un control sin la adición de antibióticos.

Antibióticos para controlar el crecimiento de Agrobacterium

Se examinó el efecto de distintos antibióticos en el control y eliminación de *Agrobacterium tumefaciens*. Los antibióticos se utilizaron por separado o combinados entre ellos. Las combinaciones probadas fueron carbenicilina con vancomicina HCl y cefotaxima sódica con vancomicina HCl o con timentina (Tabla 8).

Tabla 8.- Concentraciones de antibióticos utilizados para el control de crecimiento de *Agrobacterium*.

Antibiótico	Concentración solo (mM)	Concentración combinado (mM)
Cefotaxima sódica	1,04	0,63
Timentina*	0,98	0,36
Vancomicina HCl	0,27	0,13
Carbenicilina	1,2	0,71

* La timentina consiste en una mezcla de ticarcilina y ácido clavulánico en una proporción de 15:1.

Efecto de los antibióticos sobre la proliferación

Se estudió el efecto de dos antibióticos aminoglicósidos, geneticina[®] (G418) y paromomicina, sobre la proliferación de brotes de 'Helena' sin transformar con el fin de diseñar un medio que permitiera una correcta proliferación de los brotes transformados e impidiera o retrasara el crecimiento de los escapes.

Para observar el efecto de la geneticina[®] se añadió al medio de proliferación B, descrito anteriormente 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100, 200 ó 500 μM del antibiótico.

Para ver el efecto de la paromomicina los brotes fueron pretratados con medio líquido de regeneración con 10, 20, 40 ó 100 μM de paromomicina mediante inmersión y emersión en un agitador de balanceo (13 rpm) durante 17 ó 24 horas y posteriormente se dispusieron en medio B con 40, 60, 80, 100 ó 200 μM de paromomicina.

Efecto de los antibióticos sobre el enraizamiento

Se dispusieron brotes de 'Helena' en medio de enraizamiento adicionando 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 ó 80 μM de paromomicina. El medio de enraizamiento consiste en los macronutrientes de QL (Quoirin y Lepoivre, 1977) y los micronutrientes, vitaminas y componentes orgánicos de DKW (Driver y Kuniyuki, 1984), 2% de sacarosa y 0,7% de agar (HispanLab, S.A.). Además, se adicionó 1,5

mM de CaCl₂, 0,8 mM de floroglucinol, 2,95 μM de IBA y 29,6 μM de adenina. El pH se ajustó a 5,7 antes de esterilizar en el autoclave a 121°C durante 20 minutos.

ENSAYOS PREVIOS A LA TRANSFORMACIÓN

Se llevaron a cabo una serie de ensayos para seleccionar la cepa de *Agrobacterium* más virulenta para albaricoquero y la más adecuada para el desarrollo de un protocolo de transformación *in vitro*. Las diferentes cepas fueron amablemente cedidas por el Dr. Leandro Peña (Departamento de Biotecnología Vegetal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias) con permiso previo de la Dra. Jen Sheen (Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital and Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, USA) para el uso del plásmido pBin19-*sgfp*.

Cepas bacterianas

Para probar la virulencia de *Agrobacterium tumefaciens* en albaricoquero se utilizaron las cepas silvestres C58 y Ach5, portando los plásmidos pTiC58 y pTiAch5, respectivamente. También se utilizó la cepa A281 conteniendo el plásmido Ti de la cepa silvestre Bo542 y el ADN cromosómico de C58.

Para los ensayos de transformación *in vitro*, se utilizó la cepa desarmada EHA105 (pEHA105), derivada de A281, y la cepa C58C1 (pMP90), derivada de C58. Ambas cepas contienen el plásmido binario pBin19-*sgfp* (Chiu *et al.*, 1996). En el ADN-T de este plásmido se encuentra la construcción Nospro-*nptII*-Noster como marcador de selección y 35Spro-*sgfp*-Noster como gen “chivato” (Figura 7). El gen de selección *nptII* confiere resistencia a antibióticos aminoglicósidos, mientras que el gen marcador *sgfp* produce una proteína fluorescente.



También se realizaron experimentos con la cepa EHA105 conteniendo el plásmido binario p35SGUSINT (Vancanneyt *et al.*, 1990). Esta construcción es una variante de pBin19 (Frisch *et al.*, 1995) con la diferencia de tener, en lugar del *sgfp* como gen “chivato”, el gen *gus*. Este gen presenta unas modificaciones para evitar su expresión en la agrobacteria que consisten en la inserción de un intrón y una señal de poliadenilación final que impiden que la maquinaria de transcripción y traducción bacteriana sintetice una proteína funcional, y solamente permite su correcta expresión en la célula vegetal (Vancanneyt *et al.*, 1990).

Todas las cepas se almacenaron en glicerol al 30% a una temperatura de -70°C y, cuando fueron requeridas, se cultivaron durante toda la noche en medio de cultivo “Luria” (LB) a 27°C con los antibióticos correspondientes (Tabla 9).

Tabla 9.- Listado de las diferentes cepas de *Agrobacterium* y de los antibióticos de selección utilizados para cada una de ellas.

CEPA	PLÁSMIDOS	RESISTENCIAS ANTIBIÓTICOS		
		Cromosómica	Plásmido Ti	Plásmido binario
Oncogénicas				
Ach5	pTiAch5	Rif (100 µg/mL)	--	--
C58	pTiC58	Rif (100 µg/mL)	--	--
A281	pTiBo542	Rif (100 µg/mL) Nal (25 µg/mL)	--	--
No oncogénicas				
C58C1 (Procede de C58)	pMP90	Rif (100 µg/mL)	Gent (40 µg/mL)	--
EHA 105 (Procede de A281)	pEHA105	Nal (25 µg/mL) Rif (100 µg/mL)	--	--
No oncogénicas con la <i>gfp</i>				
C58C1	pMP90/pBin19- <i>sgfp</i>	Rif (100 µg/mL)	Gent (40 µg/mL)	Km (25 µg/mL)
EHA 105	pEHA105/pBin19- <i>sgfp</i>	Nal (25 µg/mL) Rif (100 µg/mL)	--	Km (25 µg/mL)
No oncogénicas con el <i>gus</i>				
EHA105	pEHA105/p35SGUSINT	Nal (25 µg/mL) Rif (100 µg/mL)	--	Km (25 µg/mL)

Gent: gentamicina Km: kanamicina
Nal: ácido nalidíxico Rif: rifampicina

Infectividad de cepas oncogénicas de *Agrobacterium* en albaricoquero (en invernadero)

Se inocularon las cepas oncogénicas silvestres C58, Ach5 y A281 en plantas procedentes de semillas germinadas de la variedad ‘Canino’ de un año de edad, mantenidas en invernadero a 25-30°C y 60% de humedad relativa. Se utilizaron 36 plantas en total divididas en tres bloques diseñados para cubrir un gradiente de temperatura existente en el invernadero. En cada bloque, se inocularon 3 plantas por cada cepa, y tres plantas por bloque fueron inoculadas con agua estéril como control. A cada planta se le practicaron tres cortes a diferentes alturas del tallo separados unos 5 cm, el primer corte a 5 cm del suelo. La infección se realizó colocando 5 µL de solución bacteriana en agua estéril ($D.O_{600} = 0,3$) en cada herida con una micropipeta, sellándola después con Parafilm® para evitar la desecación de la misma. A las plantas control se les aplicó 5 µL de agua estéril en las heridas realizadas.

El desarrollo de los tumores fue evaluado cada 2 semanas midiendo el diámetro del mismo hasta que se estabilizó su crecimiento (12 semanas), momento en el que se cortaron y se pesaron. La virulencia relativa de cada cepa se determinó de acuerdo con la frecuencia de la formación del tumor, peso final y tiempo de aparición de los tumores.

El experimento completo se llevó a cabo dos veces, una en febrero, cuando la planta está aún en reposo, y otra en marzo, cuando la planta ha comenzado ya su crecimiento vegetativo.

Curvas de crecimiento de *Agrobacterium*

Uno de los ensayos previos a la transformación con *Agrobacterium* fue la determinación de las curvas de crecimiento de la bacteria. De este modo, una vez conocida la pauta de crecimiento se puede establecer la concentración de bacteria en función de los valores de densidad óptica del cultivo.

Se estudiaron las cepas no oncogénicas, C58C1 y EHA105 ambas con el plásmido pBin19-*sgfp*.

Para realizar la medida de la curva de crecimiento de la bacteria, se partió de una colonia y se cultivó durante 14 horas en medio LB líquido (20 mL), con los antibióticos correspondientes (Tabla 9). Se midió la D.O. a 600 nm y se inoculó un volumen de este cultivo en medio LB fresco para diluirlo hasta la densidad óptica de 0,005 a 600 nm. A partir de este momento el cultivo se incubó a 27°C y se tomaron muestras a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 21 y 30 horas, midiéndose la densidad óptica y realizando diluciones seriadas y recuento en placa. El proceso se repitió en tres ocasiones para cada una de las cepas. Las curvas obtenidas aparecen representadas en la Figura 8.

Infectividad de las cepas desarmadas (*in vitro*)

Estos ensayos se llevaron a cabo con hojas de brotes micropropagados de la variedad 'Helena'. Para la determinación de la cepa desarmada más adecuada para la infección *in vitro* se utilizaron la C58C1 y la EHA105.

La solución bacteriana se preparó inoculando una colonia de la bacteria la noche anterior en medio LB líquido con los antibióticos adecuados (Tabla 9) y se incubó en agitación (0,1g) a 27°C. Antes de la transformación, se centrifugó y resuspendió el inóculo en medio líquido de regeneración, sin antibióticos, se midió la absorbancia a 600 nm y se diluyó hasta la D.O. de 0,02.

Las hojas se prepararon tal y como se describió para los ensayos de regeneración. Se incubaron en la suspensión bacteriana durante 10 minutos y posteriormente fueron secadas en papel estéril. Después se cultivaron con la cara adaxial en contacto con el medio de cocultivo, medio de regeneración sin STS y enriquecido con 100 µM de acetosiringona. Las placas fueron selladas con Parafilm® e incubadas en oscuridad a 22±1°C durante 4 días antes de ser transferidas a medio de regeneración con 25,7 µM de kanamicina y los antibióticos para controlar el crecimiento de *Agrobacterium*. Se evaluó el número de eventos de transformación por explanto después de 4 semanas y el porcentaje de explantos transformados. La

evaluación se realizó basándose en la expresión de GFP tal y como se describe a continuación.

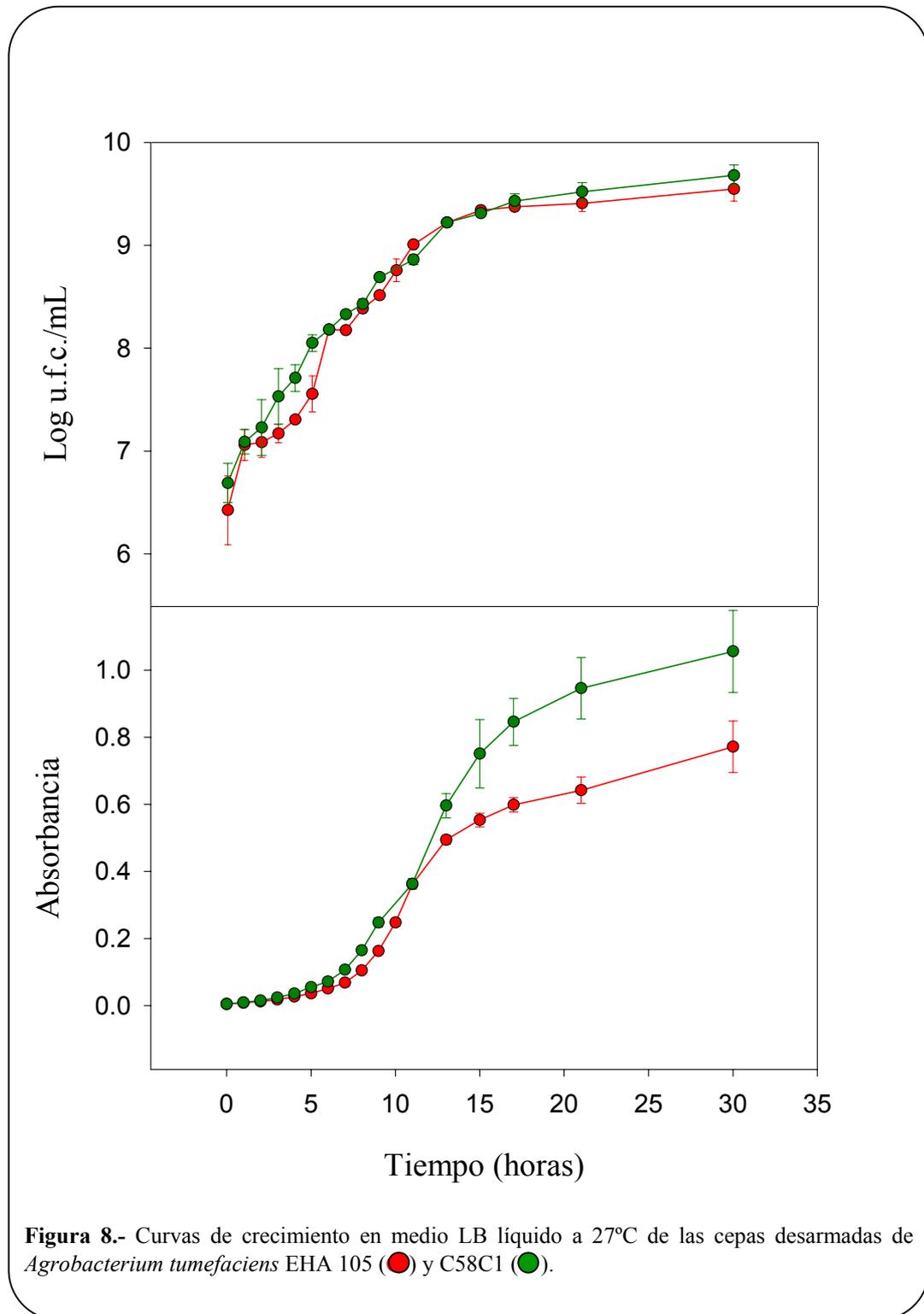


Figura 8.- Curvas de crecimiento en medio LB líquido a 27°C de las cepas desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 (●) y C58C1 (●).

DetECCIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS GENES MARCADORES

*DetECCIÓN Y EVALUACIÓN DEL GEN *sgfp**

Después del cocultivo, los explantos fueron examinados para detectar la expresión de GFP por estereomicroscopía de fluorescencia. Para ello se utilizó una lupa Leica modelo MZ75 equipada con un módulo de fluorescencia GFP Plus. Este módulo contiene un filtro de excitación 480/40, es decir, produce una transmisión de más del 50% en una banda de 40 nm centrada en 480 nm, un filtro dicróico LP (Long Pass) 505 que deja pasar longitudes de onda a partir de 505 nm reflejando longitudes menores y dirigiendo la luz hacia la muestra, y un filtro barrera LP 510 que impide el paso hacia los ojos de longitudes menores a 510 nm.

El producto del gen *sgfp* es una proteína fluorescente bajo luz azul (óptimo a 490 nm). Presenta un pico máximo de fluorescencia a 509 nm y otro secundario a 540 nm (Elliot *et al.*, 1999). Esta proteína es una modificación de la GFP original por el cambio en la posición 65 de una serina por una treonina, produciendo una fluorescencia 100 veces más intensa que la proteína silvestre de la medusa *Aequorea victoria* (Chiu *et al.*, 1996).

Se utilizó este gen marcador para establecer el momento en que se debía evaluar la transformación estudiando la evolución de transformación transitoria a estable. Para ello se midieron los resultados diariamente los primeros días tras la transformación y semanalmente después hasta las seis semanas.

*DetECCIÓN Y EVALUACIÓN DEL GEN *uidA* (*gus*)*

Este gen, procedente de *E. coli*, codifica el enzima β -glucuronidasa que cataliza la reacción de hidrólisis de los β -D-glucuronidos. La hidrólisis del sustrato incoloro produce un precipitado de color, detectable visualmente (Jefferson *et al.*, 1987). Se utilizó una versión quimérica del gen que contiene un intrón, derivado de una planta, que impide la expresión del enzima en el interior de la bacteria (Vancanneyt *et al.*, 1990).

El sustrato utilizado fue el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronato sódico.3H₂O (X-GlcA), que al ser hidrolizado produce un precipitado de color azul.

Al finalizar los ensayos los explantos y yemas regeneradas, en su totalidad o solamente algunas hojas, fueron sometidos a la prueba de detección de GUS. El tampón para la reacción consistió en una disolución con las siguientes concentraciones finales: 0,8 mM de X-GlcA, 50 mM de tampón fosfato (pH 7), 5 mM de EDTA disódico, 0,1 mM de ferricianida de potasio y 0,1 mM de ferrocianida de potasio. La solución fue preparada en el momento de su utilización. Las muestras fueron incubadas durante 24 horas a 37°C en agitación. Posteriormente se realizaron una serie de lavados, primero en etanol 35%, luego 70% y finalmente en etanol absoluto, con el fin de producir una decoloración de la clorofila presente en los tejidos y poder observar las zonas transformadas con mayor claridad.

EXPERIMENTOS DE TRANSFORMACIÓN

Como se mencionó anteriormente en la introducción son muchos los factores a tener en cuenta para el establecimiento de un protocolo de transformación con *Agrobacterium*. En general, consta de una serie de pasos que se muestran esquemáticamente en la Figura 9. En primer lugar, se establece la cepa bacteriana adecuada con la construcción elegida para la transformación de las células vegetales. Después, se cultiva la bacteria en un medio líquido y se diluye hasta la concentración utilizada para la infección. Posteriormente, se infectan los explantos y son transferidos a medio de regeneración. Este periodo se denomina cocultivo. Después del cocultivo, los explantos se transfieren a medio de regeneración al que, generalmente, se le añade el agente de selección, un antibiótico aminoglicósido en este caso, y el/los antibióticos para controlar el crecimiento de la bacteria.

Establecimiento de un protocolo básico de transformación

Para desarrollar un protocolo de transformación y optimizar el porcentaje de transformación (proporción de explantos con al menos un hecho de transformación) y el número de eventos de transformación por explanto, se establecieron previamente diferentes parámetros como el modo de infección, la concentración y fase de crecimiento de la bacteria y el tiempo de cocultivo.

Las condiciones generales de transformación fueron las que han sido descritas anteriormente en el apartado de infectividad de las cepas desarmadas *in vitro*. Solo se cambió el agente solidificante, “Agar purificado” (HispanLab S.A.) al 0,7%, que a partir de este momento sustituye al agargel 0,45% en el medio de regeneración. A partir de este protocolo básico se comenzó a variar una serie de parámetros con el fin de optimizarlo al máximo.

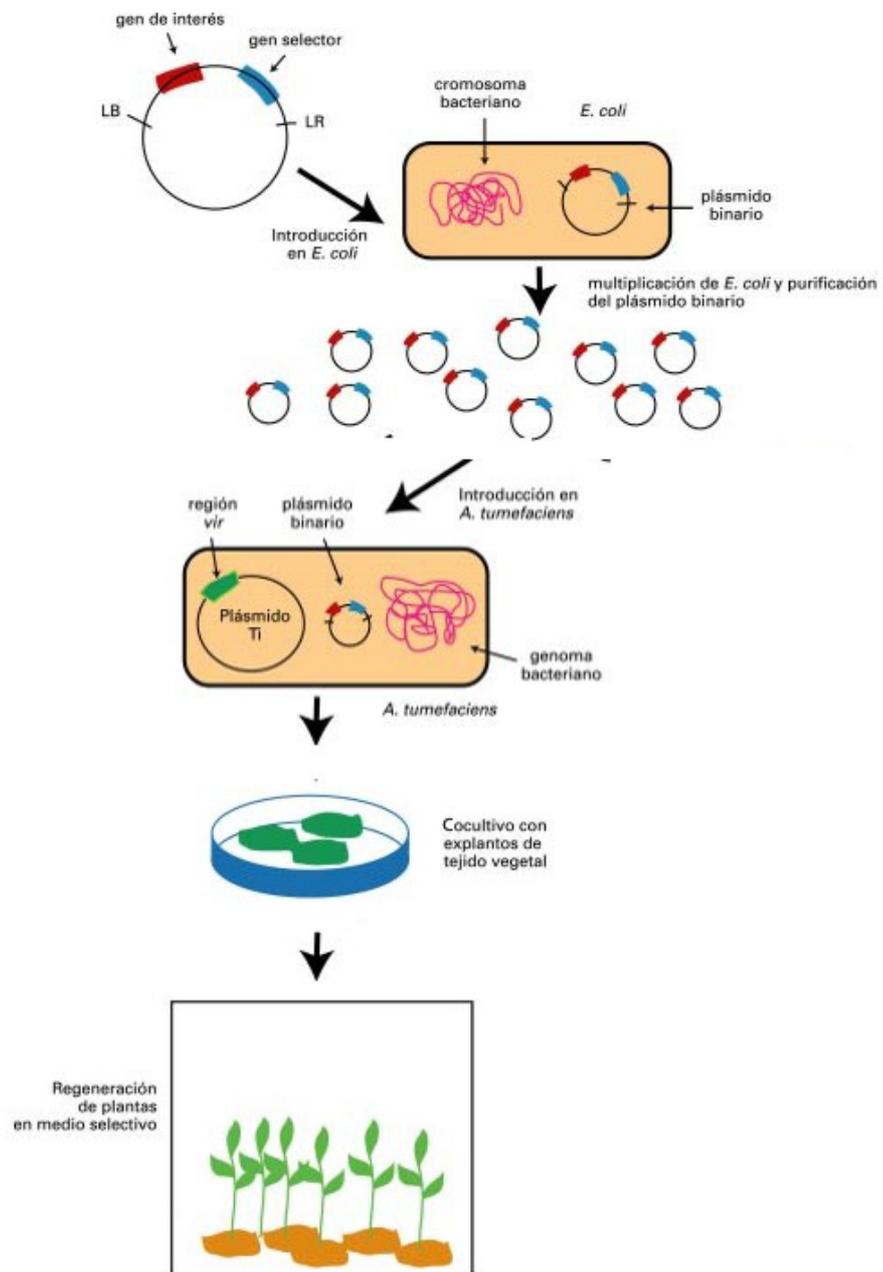


Figura 9.- Esquema general de un proceso de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens*.

Todos estos experimentos se llevaron a cabo con la cepa supervirulenta desarmada EHA105 conteniendo el plásmido binario pBin19-*sgfp*. Se cultivó durante toda la noche en un agitador orbital, a 27°C y 0,1g, en LB líquido con los antibióticos correspondientes, hasta que alcanzó la fase logarítmica media (4×10^8 ufc mL⁻¹), después se precipitó a 1.000g durante 15 minutos y se diluyó en medio líquido de regeneración a las concentraciones deseadas.

Para establecer el modo de infección las hojas se cortaron con un bisturí infectado con *Agrobacterium* o fueron incubadas en una suspensión bacteriana (D.O.₆₀₀=0,05) durante 1, 5 ó 10 minutos. En ambos casos las hojas fueron cocultivadas durante 2 días.

En otra serie de ensayos se probaron diferentes tiempos de cocultivo (0, 2, 4 ó 6 días) infectando las hojas mediante incubación durante 10 minutos con diluciones de tres concentraciones diferentes de bacteria, $1,5 \times 10^7$, 4×10^7 ó $1,5 \times 10^8$ ufc mL⁻¹.

Para estudiar el efecto de la fase de crecimiento de la bacteria se compararon diluciones de *Agrobacterium tumefaciens* cultivados hasta la fase logarítmica temprana (2×10^8 ufc mL⁻¹), logarítmica media (4×10^8 ufc mL⁻¹) o logarítmica tardía (6×10^8 ufc mL⁻¹). En estos ensayos los cultivos fueron diluidos a una D.O.₆₀₀=0,02 y los explantos se infectaron por inmersión durante 10 minutos en el cultivo bacteriano para, posteriormente, ser cocultivados durante 4 días.

Una vez transferidos los explantos a medio de regeneración fueron examinados, después de cuatro semanas, para detectar la expresión de GFP por estereomicroscopía.

Para cada tratamiento se prepararon al menos 5 placas de Petri, cada una de ellas con 7 hojas. Todos estos tratamientos y los que se presentan a continuación se compararon con un control sin transformar en las mismas condiciones con el fin de observar el efecto de estos tratamientos en la regeneración. De esta manera, aunque un tratamiento aumentase drásticamente el número de hechos de transformación por explanto, si redujo o anuló la regeneración fue desestimado.

Factores que afectan la virulencia de *Agrobacterium*

Se llevó a cabo un estudio para determinar el efecto de diferentes factores para estimular la virulencia de *Agrobacterium*.

En todos los casos las hojas de albaricoquero se infectaron por inmersión en una suspensión bacteriana de $D.O_{.600}=0,02$ durante 10 minutos en agitación (0,1g) y fueron cocultivadas con la bacteria durante 4 días, si no se indica lo contrario. *Agrobacterium* se cultivó en LB líquido, con los antibióticos correspondientes, a 27°C y 0,1g durante toda la noche hasta la fase logarítmica media, salvo que se indiquen otras condiciones.

Aplicación de acetosiringona en el medio de cocultivo

El efecto de la adición de compuestos fenólicos al medio de cocultivo se comprobó añadiendo al medio 100 ó 200 μM de acetosiringona, con una duración del cocultivo de 2 ó 4 días en el caso de 100 μM de acetosiringona.

*Aplicación de acetosiringona en el medio de cultivo de *Agrobacterium**

La bacteria se cultivó en medio LB líquido, con la adición de 100 μM de acetosiringona y los antibióticos correspondientes, durante toda la noche en un agitador orbital a 27°C y 0,1g hasta la fase logarítmica media. Posteriormente se precipitó a 1.000g y se resuspendió y diluyó a una $D.O_{.600}=0,02$ en medio líquido de regeneración.

También se probó el efecto de la acetosiringona al ser añadida a un medio de cultivo empobrecido. La bacteria se cultivó hasta fase estacionaria en LB y entonces fue centrifugada y diluida a $D.O_{.600}=0,2$ y cultivada durante 24 horas a 25°C en un agitador orbital a 0,1g en un medio pobre en nutrientes, denominado SIM por “Simplified Induction Medium”. El medio SIM está compuesto por 20 mM de citrato de sodio y 2% de sacarosa (Alt-Mörbe *et al.*, 1989) y se ajustó el pH a 5,5 antes de ser esterilizado en el autoclave en las condiciones habituales. A este medio se le añadió 100, 200, 500, 1.000, 1.500 ó 2.000 μM de acetosiringona.

Posteriormente, la bacteria se precipitó a 1.000g, se resuspendió y diluyó a 0,02 (D.O.₆₀₀) en medio líquido de regeneración.

Influencia del pH del medio de cocultivo

Se estudió el efecto de una mayor acidez en el medio de cocultivo sobre la virulencia de *Agrobacterium*. Para ello se prepararon diferentes medios de cocultivo ajustando el pH antes de ser esterilizados en el autoclave a 5,0; 5,2 ó 5,5. Los resultados se compararon con un control en el que el pH se ajustó a 5,7 antes del autoclave.

Tratamientos de las hojas con celulasa

Los explantos se trataron previamente con celulasa con el fin de facilitar y estimular la infección por parte de la bacteria. Los tratamientos consistieron en sumergir las hojas en una solución de celulasa al 1% (p/v) en medio líquido de regeneración durante 2 ó 4 horas antes de la infección.

Transformación en vacío

Se sumergieron hojas en una suspensión bacteriana con D.O.₆₀₀=0,02 durante 10 minutos al vacío a una presión de -760 mm de Hg para facilitar la entrada del inóculo al tejido vegetal. El cocultivo tuvo una duración de 2 días.

Producción de microheridas en las hojas mediante pinzas o sonicación

Las hojas fueron presionadas con unas pinzas especiales antes de ser introducidas en la suspensión bacteriana. Son pinzas de disección de 200 mm de longitud. En la parte interior de los extremos tienen una superficie de grafito diseñada a modo de fina rejilla, de manera que las protuberancias de cada lado coinciden y presionan el material vegetal cuando las pinzas cierran. El cocultivo tuvo una duración de 2 días.

Para estudiar la influencia del sonicador se introdujeron las hojas sumergidas en la suspensión bacteriana en tubos de vidrio o plástico y fueron sonicados durante

unos segundos (1, 5, 10, 15, 20, 30, 60 ó 120) a potencia media (55 Hz) y máxima (60 Hz).

Factores que afectan al estado fisiológico de la planta

Para el estudio de estos factores se infectó mediante inmersión en una suspensión bacteriana de $D.O_{600}=0,02$ durante 10 minutos en agitación y 4 días de cocultivo. La bacteria se cultivó durante una noche en un agitador orbital, a 27°C y $0,1g$, en medio LB líquido, con los antibióticos correspondientes, hasta que alcanzó la fase estacionaria. Después se precipitó a $1.000g$ y se diluyó a una $D.O_{600}=0,2$ en medio SIM adicionando los antibióticos correspondientes y $500\ \mu\text{M}$ de acetosiringona. En este medio se incubó la bacteria durante 24 horas a 25°C y $0,1g$. Posteriormente se precipitó nuevamente y se resuspendió en medio líquido de regeneración a la densidad óptica utilizada para la infección. Tras el cocultivo en medio de regeneración enriquecido con $100\ \mu\text{M}$ de acetosiringona, los explantos fueron transferidos a medio de regeneración con la adición de $60\ \mu\text{M}$ de STS, $25,7\ \mu\text{M}$ de kanamicina, $0,63\ \text{mM}$ de cefotaxima y $0,13\ \text{mM}$ de vancomicina.

Los explantos se mantuvieron en oscuridad, a $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ y 60% de humedad relativa, durante 2 semanas y posteriormente se expusieron a la luz con un fotoperiodo de 16 horas y $55\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$.

La transformación, basada en la expresión de GFP, fue evaluada con la lupa a las 4 semanas del inicio del ensayo.

Retraso de la transformación

Hojas de 'Helena' se dispusieron en medio de regeneración enriquecido con $60\ \mu\text{M}$ de STS y se retrasó el momento de la transformación en 3, 7 ó 14 días. Cuando se retrasó en dos semanas se diseñaron dos estrategias diferentes: transformar y exponer los explantos a la luz (cocultivo a la luz), o bien, transformar y mantener los explantos una semana más en oscuridad (cocultivo en oscuridad).

Efecto sinérgico de las poliaminas y los inhibidores del etileno

Al medio de regeneración tras el cocultivo se le añadieron, además de los antibióticos descritos anteriormente, 2 mM de espermidina combinada con 60 μ M STS o 0,5 μ M AVG. La espermidina fue esterilizada por filtración y añadida al medio después del autoclave.

Influencia de pulsos de auxinas

En este caso se le añadió al medio de cocultivo, además de 100 μ M acetosiringona, cantidades adicionales de NAA (5,37 ó 10,74 μ M) o de 2,4-D (4,52 ó 9,04 μ M).

Producción y cultivo de callos transformados

Callos GFP positivos provenientes de experimentos de transformación de hojas de la variedad 'Helena' con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (pBin19-*sgfp*) se recuperaron en un medio selectivo a las 8 semanas del inicio de los ensayos.

El medio selectivo de estos callos está compuesto por macronutrientes QL (Quoirin y Lepoivre, 1977), micronutrientes y vitaminas DKW (Driver y Kuniyuki, 1984), 0,45% de agargel (Sigma), 3% de sacarosa, 1 mg/L de polivinilpirrolidona (PVP) y 0,15% de hidrolizado de caseína. Además, se añadieron los reguladores de crecimiento BAP (0,20 μ M) y 2,4-D (4,52 μ M) y los antibióticos kanamicina (172 μ M), cefotaxima (0,63 mM) y vancomicina (0,13 mM). El pH del medio se ajustó a 5,7 antes de esterilizarlo a 121°C durante 20 minutos. Los antibióticos fueron esterilizados por filtración y añadidos después de esterilizar los medios y enfriarlos a 50°C.

Los callos se mantuvieron en oscuridad a 22 \pm 1°C con una frecuencia de subcultivo de 4 semanas.

Evaluación molecular de los callos transgénicos.

PCR

Se realizó una extracción de ADN de callos de 8 semanas desde el inicio del ensayo mediante el protocolo de extracción descrito por Murray y Thompson (1980). Previamente a la extracción se procedió a una desinfección de los callos mediante un lavado de 1 minuto en etanol al 76% y 5 minutos en solución de lejía comercial al 10% para la completa eliminación de *Agrobacterium*.

Se utilizó la PCR para detectar la presencia tanto del gen *sgfp* como del gen *nptII*. También se utilizaron cebadores específicos para *virG*, gen que sólo se encuentra en *Agrobacterium*, y así comprobar la ausencia de la bacteria. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 10.

Las reacciones se ajustaron a un volumen final de 50 μ L, conteniendo 1 μ L de ADN, 200 μ M de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 16 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 67 mM de Tris-HCl (pH 8,8), 0,01% de Tween-20, 0,5 μ M de cada cebador y 1 unidad de polimerasa de ADN (EcoTaq). Las condiciones de reacción fueron 1 ciclo de 1 minuto a 94°C, 30 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C y, por último, una extensión de 5 minutos a 72°C.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) y después de teñir con bromuro de etidio se detectó el ADN bajo luz ultravioleta.

Tabla 10.- Cebadores utilizados para la amplificación de los diferentes genes mediante PCR.

Gen a detectar	Cebadores		Tamaño de la señal amplificada (pares de bases)
<i>sgfp</i>	F	5'-ATGGTGAGCCAAGGGCGAGGA-3'	690
	R	5'-GGA CCATGTGATCGCGCTTC-3'	
<i>nptII</i>	F	5'-GAC GAGGCAGCGCGGCTAT-3'	592
	R	5'-AAGAAGGCCGATAGAAGGCCGA-3'	
<i>virG</i>	F	5'-CCGTTGAAACAC GTTCTT-3'	660
	R	5'-CCGGCACCTCTTGCTGTTTT-3'	

Southern blot

Para este análisis se extrajo el ADN (Murray y Thompson, 1980) de callos cultivados por más de un año en el medio selectivo descrito anteriormente. Se procedió a la digestión de 20 µg de ADN con el enzima de restricción *Bam*HI. Se separaron los fragmentos en un gel de agarosa al 1% (p/v) y se transfirió el ADN por capilaridad a una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim GMBH, Mannheim, Alemania). Se diseñó una sonda mediante PCR para la región *sgf* marcada con digoxigenina (DIG) (Boehringer Mannheim) y se hibridó con la membrana.

SELECCIÓN DE PLÁNTULAS TRANSFORMADAS

Una vez establecido un protocolo eficiente de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de hojas de albaricoquero mediante los ensayos descritos anteriormente, se procedió a desarrollar una estrategia de selección basada en antibióticos que permitiera la obtención de plántulas transformadas. Para ello se determinó el antibiótico de selección más adecuado y se evaluó la eficiencia de transformación (número de brotes transformados frente al número de explantos infectados) y la eficiencia de selección (número de brotes transformados frente al número total de yemas regeneradas) de diferentes estrategias.

Teóricamente, la adición al medio del antibiótico debería ser suficiente para la selección de las células transformadas, estableciendo previamente la concentración de dicho antibiótico que inhibe la regeneración para cada una de las especies, variedades y tipo de explanto correspondientes. Sin embargo, a veces no basta con la adición de la concentración inhibitoria para la obtención de plantas transgénicas, también influye cuando y como se alcanza dicha concentración, siendo necesario el establecimiento de una estrategia de selección.

En este estudio se utilizaron hojas de 'Helena' que fueron infectadas con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, conteniendo la construcción pBin19-*sgfp* o p35SGUSINT.

Los experimentos de selección fueron examinados semanalmente y todas las yemas regeneradas fueron observadas con luz U.V. para detectar la expresión de GFP. Las yemas GFP positivas fueron rescatadas para su análisis posterior mediante PCR y Dot-blot. En los experimentos con *gus* todas las yemas regeneradas fueron analizadas mediante la prueba de detección del gen *gus*, los individuos que dieron positivo fueron posteriormente analizados con las pruebas moleculares citadas antes.

Selección con kanamicina

Se añadió al medio de regeneración kanamicina a la concentración de 40 μM inmediatamente después del cocultivo o 25,7 μM en diferentes momentos después del cocultivo (0, 5, 7 ó 10 días).

Efecto de los antibióticos aminoglicósidos en la selección y estímulo del crecimiento de las células transformadas

Los antibióticos geneticina[®], kanamicina, paromomicina y estreptomicina se añadieron al medio de regeneración, después del cocultivo, a las concentraciones inhibitorias determinadas previamente. A las 4 semanas desde el inicio del experimento los explantos fueron examinados para cuantificar la expresión de GFP. Se determinó el peso fresco de los explantos para cada uno de los tratamientos a las 7 semanas del comienzo del experimento como una expresión de la proliferación y crecimiento de los tejidos transformados.

Selección progresiva con paromomicina

Se utilizaron las concentraciones del antibiótico y los tiempos de aplicación de la Tabla 11.

Se estudió también el posible efecto en las eficiencias de transformación y selección del tipo de gen marcador. Para ello se compararon diversas estrategias de selección utilizando la cepa EHA105 con el plásmido binario p35SGUSINT (Tabla 11).

Tabla 11.- Distintas concentraciones (μM) y tiempos utilizados en la aplicación del antibiótico paromomicina.

Estrategia	Días después del cocultivo		
	0 días (concentración inicial)	10 días	24 días (concentración final)
A	50		50
B	40		40
C	20	40	40
D	20		40
E	10	40	40
F	0	20	40

Las diferentes estrategias están ordenadas de mayor a menor presión selectiva.

Recuperación de brotes transformados

Para la recuperación de las yemas se utilizaron medios específicos elaborados en nuestro laboratorio para el desarrollo de meristemas de albaricoquero (Pérez-Tornero *et al.*, 1999). Las yemas fueron rescatadas en un medio compuesto por macros y micronutrientes de QL (Quoirin y Lepoivre, 1977), suplementado con 2% de sorbitol y 0,7% de agar (HispanLab, S.A.) como agente solidificante y los siguientes compuestos orgánicos: 50 mg/L de myo-inositol, 1 mg/L de tiamina, 1 mg/L de ácido nicotínico, 100 $\mu\text{g/L}$ de biotina, 10 $\mu\text{g/L}$ de ácido p-aminobenzóico, 100 $\mu\text{g/L}$ de riboflavina y 500 $\mu\text{g/L}$ de pantotenato de calcio. Como reguladores de crecimiento se añadieron 7,09 μM de BAP y 0,05 μM de IBA. También se adicionó 40 μM de paromomicina.

Con una frecuencia de subcultivo de dos semanas, a las 2 ó 4 semanas desde su aislamiento, dependiendo de su crecimiento, las yemas fueron transferidas a un medio de elongación. La composición de este medio es idéntica al medio anterior con la excepción de los reguladores de crecimiento, ya que contiene una concentración de BAP reducida a la mitad (3,55 μM), manteniendo el IBA (0,05 μM) y añadiendo ácido giberélico (5,8 μM). Una vez elongados, los brotes fueron transferidos al medio B descrito para la proliferación de la variedad 'Canino' añadiendo 40 μM de paromomicina.

La paromomicina se esterilizó por filtración y fue añadida después de ajustar el pH de los medios a 5,7 y de esterilizarlos en el autoclave a 121°C durante 20 minutos. Los medios se dispensaron en tubos de vidrio (25 x 150 mm) cubiertos con un tapón no hermético, 15 mL por tubo.

Evaluación molecular de las plantas transformadas

PCR

Para el análisis de las plántulas desarrolladas en condiciones selectivas se extrajo ADN de 100 mg de peso fresco de hojas mediante el DNeasy[®] Plant Mini Kit de Qiagen (Cat. No. 69104).

La reacción de amplificación se utilizó para detectar la presencia del transgén *npII*, válido tanto para las plantas transformadas con la construcción pBin19-*sgfp* como para las transformadas con la construcción p35SGUSINT. Los cebadores específicos utilizados fueron 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' y 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3' que amplifican un fragmento de 700 pares de bases. No estimamos necesario realizar la reacción con los cebadores específicos para el gen bacteriano *virG* ya que las plántulas se encontraban durante un periodo de tiempo superior a un mes en medio selectivo sin los antibióticos de control de *Agrobacterium* y nunca se detectó crecimiento de la bacteria.

Las reacciones se ajustaron a un volumen final de 25 µL, conteniendo 2 µL de ADN, 400 µM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 16 mM de (NH₄)₂SO₄, 67 mM de Tris-HCl (pH 8,8), 0,01% de Tween-20, 0,4 µM de cada cebador y 0,5 unidades de polimerasa de ADN (EcoTaq). Las condiciones de reacción fueron 1 ciclo de 1 minuto a 94°C, 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 63,8°C y 1 minuto a 72°C y, por último, una extensión de 5 minutos a 72°C.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) y después de teñir con bromuro de etídio se detectó el ADN bajo luz ultravioleta.

Dot blot

Para este análisis se extrajo el ADN (Lodhi, *et al.*, 1994), tratando las extracciones finalmente con proteinasa K (100 µg/mL) durante 30 minutos a 37°C, de plántulas cultivadas en medio selectivo de proliferación, descrito anteriormente, durante un año aproximadamente. Se procedió a la digestión de 200 ng de ADN con el enzima de restricción *Bam*HI. Se fijó el ADN con ultravioleta a una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim GMBH, Mannheim, Alemania). Se diseñó una sonda mediante PCR para la región *sgfp* marcada con digoxigenina (DIG) (Boehringer Mannheim) y se hibridó con la membrana.

TRATAMIENTOS ESTADÍSTICOS

Las diferencias en el número de eventos de transformación por explanto infectado fueron analizadas mediante un ANOVA y se utilizó un test LSD para separar las medias. Los datos fueron transformados mediante la fórmula $(x+0,5)^{1/2}$ para cumplir los requisitos necesarios para la aplicación de un ANOVA. También el análisis del efecto de los distintos antibióticos aminoglicósidos sobre el peso de los explantos transformados se llevó a cabo mediante un ANOVA.

Para el estudio de la evolución de la transformación de transitoria a estable fue utilizado un ANOVA de medidas repetidas, ya que la transformación fue evaluada sobre los mismos explantos a diferentes tiempos.

Para el análisis de los porcentajes, tanto de regeneración como de transformación y enraizamiento, lo que tenemos es una respuesta dicotómica, es decir, se trata de una variable que solo tiene dos valores (regenera o no, enraíza o no y está transformado o no) distribuyéndose como una variable binomial. En estos casos los datos no cumplen el requerimiento de la normalidad del análisis de varianza y por tanto fue necesario emplear otros métodos estadísticos. Se utilizó el análisis de la varianza de máxima verosimilitud y, cuando fue necesario, se diseñaron contrastes de máxima verosimilitud específicos. El estadístico que se utiliza en estos análisis para decidir si el efecto de un tratamiento sobre la variable dependiente es significativo es la χ^2 , en lugar del estadístico F típicamente empleado en el análisis de varianza. El uso de contrastes específicos para responder determinadas preguntas nos ayudó a discriminar entre diferentes niveles de un determinado tratamiento.

El error estándar se calculó como: $E.S. = (P_1 \times P_2 / n)^{1/2}$.

Donde: P_1 : Probabilidad de que ocurra un suceso.

P_2 : $1 - P_1$

n : Tamaño de la muestra.

Los coeficientes de variación (CV) fueron calculados a partir de un número (indicado donde procede) de experimentos independientes constituidos por cinco placas cada uno, lo que supone 35 explantos (hojas) por tratamiento.



***RESULTADOS Y
DISCUSIÓN***

OPTIMIZACIÓN DE LA REGENERACIÓN

La ausencia de protocolos eficientes de regeneración es el principal factor limitante para establecer un protocolo de transformación en plantas leñosas. Los árboles frutales están dentro del grupo de las plantas más recalcitrantes a la regeneración adventicia. Aunque en los últimos años se han desarrollado con éxito protocolos de regeneración en diferentes especies del género *Prunus* (Tabla 3), solamente existen unas pocas publicaciones donde se describa la obtención de plantas transformadas (Laimer da Câmara Machado *et al.*, 1992; Gutiérrez-Pesce *et al.*, 1998; Hammerschlag y Smigocki, 1998; Scorza *et al.*, 1995a; Yancheva *et al.*, 2002; Miguel y Oliveira, 1999) y en todas ellas se utilizó material juvenil. A partir de material adulto únicamente se han obtenido plantas transformadas de *Prunus subhirtella* (da Câmara Machado *et al.*, 1995b) y del patrón de cerezo ‘Colt’ (Gutiérrez-Pesce *et al.*, 1998).

En albaricoquero se ha conseguido regeneración adventicia a partir de material juvenil o endospermo (Goffreda *et al.*, 1995), pero el uso de material derivado de semilla debería ser evitado siempre que hayan sido ya seleccionadas variedades élite. La primera publicación sobre regeneración adventicia de albaricoquero a partir de hojas mostró baja reproducibilidad (Escalettes y Dosba, 1993). Más tarde, como ya se ha mencionado anteriormente, se estableció en nuestro laboratorio un método de regeneración más efectivo y reproducible (Pérez-Tornero *et al.*, 2000). Dadas las bajas eficiencias de transformación encontradas normalmente en las especies leñosas, los porcentajes de regeneración deben ser optimizados al máximo posible. En la primera parte de este trabajo se estudiaron diferentes factores que podrían mejorar la regeneración.

Efecto del volumen de medio

Cuando se utilizaron diferentes volúmenes de medio en las placas Petri no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para ninguna de las dos variedades estudiadas (Tabla 12). La variabilidad dentro de cada tratamiento fue

similar cuando el medio se dispensó exactamente mediante una pipeta electrónica (el coeficiente de variabilidad obtenido a partir de 6 experimentos independientes fue de 36,1 y 35% para hojas de ‘Helena’ y ‘Canino’, respectivamente) o cuando se dispensó un volumen aproximado de forma manual (coeficiente de variación de 31,8 y 41% para ‘Helena’ y ‘Canino’, respectivamente).

Tabla 12.- Efecto del volumen del medio en la regeneración.

Volumen dispensado (mL)	Regeneración (%)	
	‘Helena’	‘Canino’
15	22,8 ± 5,0	20,0 ± 4,8
20	42,8 ± 5,9	17,1 ± 4,5
25	34,9 ± 6,0	21,4 ± 4,9
30	34,3 ± 5,7	2,8 ± 16,6

El número de explantos utilizados fue de 273 para ‘Helena’ y de 245 para ‘Canino’.

La reproducibilidad y consistencia de los resultados es un problema común cuando se estudia la regeneración adventicia a partir de material adulto en *Prunus* (Escalettes y Dosba, 1993). Murai *et al.* (1992) sostienen que el volumen del medio de cultivo afecta los cambios con el tiempo en las concentraciones de los diferentes componentes del medio y, por lo tanto, el crecimiento de las plántulas *in vitro*. Pequeñas diferencias en el volumen de medio entre diferentes placas han sido sugeridas como posibles responsables de las diferencias relativamente grandes encontradas entre placas Petri dentro de un mismo tratamiento. Sin embargo, nuestros resultados no confirmaron esta hipótesis y no se encontraron diferencias entre diferentes volúmenes de medio.

Efecto del agente solidificante

El agente gelificante influyó en la regeneración ($P < 0,001$). Aunque en la variedad ‘Canino’ el “Agar Purificado” no mejoró significativamente los porcentajes de regeneración, para la variedad ‘Helena’ dobló la regeneración (Figura 9). En

ambas variedades la agarosa redujo drásticamente la proporción de hojas que produjeron yemas adventicias.

Los tres agentes solidificantes se utilizaron a las concentraciones recomendadas por los fabricantes consiguiendo aproximadamente el mismo grado de gelificación para los tres. Los agentes gelificantes han demostrado influir en el crecimiento *in vitro*, dependiendo del tipo (Chevreau *et al.*, 1997), del fabricante y de su concentración (Debergh, 1983). La pureza del agar afecta a la solidez del medio, a la cantidad de impurezas y al estado de los nutrientes en el medio (Mackay y Kitto, 1998).

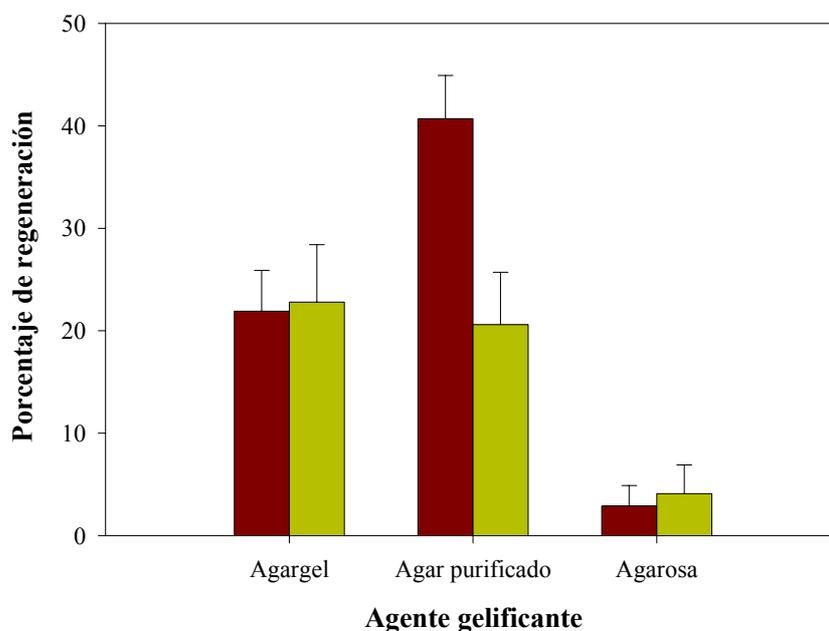


Figura 9.- Efecto de los diferentes agentes gelificantes en la regeneración de 'Helena' (■) y 'Canino' (■). Los porcentajes de regeneración fueron calculados como el número de explantos produjeron alguna yema frente al número total de explantos utilizados (315 y 169 hojas para 'Helena' y 'Canino', respectivamente). Las barras verticales indican los errores estándar.

Estudios previos en manzano (Welander y Maheswaran, 1992), en peral (Chevreau *et al.*, 1997) y en albaricoquero (Pérez-Tornero *et al.*, 2000) demostraron que el agente gelificante afecta en gran medida la regeneración. Esto está de acuerdo con nuestros resultados, donde el "Agar Purificado", un agente gelificante con

menos impurezas que el agar común, dobló los porcentajes de regeneración en la variedad 'Helena' mientras que no afectó a la regeneración a partir de hojas de 'Canino', comparado con los resultados obtenidos en medio solidificado con agargel.

La concentración de agarosa utilizada para obtener un gel firme probablemente resultó inhibitoria para la regeneración, ya que en experimentos previos se obtuvo una regeneración mayor del 66% a partir de hojas de 'Helena' en un medio solidificado con "Seaplaque Agarosa" al 0,8% (datos no mostrados). Sin embargo, esta concentración produjo un medio muy blando y las yemas regeneradas sufrieron hiperhidratación.

Efecto del estado fisiológico de los explantos

El medio donde el material vegetal se propagó tuvo una fuerte influencia sobre la regeneración, dependiendo del genotipo. Aunque la regeneración a partir de hojas de 'Helena' fue independiente de la procedencia de los explantos, en 'Canino' resultó fuertemente influenciada ($P < 0,01$) y la regeneración fue más del doble cuando se utilizaron hojas de brotes que permanecieron en medio basado en WP durante el último subcultivo en la fase de propagación (Tabla 13).

Los porcentajes de regeneración para 'Canino' mostrados en esta tesis son menores que los publicados en trabajos anteriores de nuestro laboratorio (Pérez-Tornero *et al.*, 2000). El medio basado en QL, medio B descrito en materiales y métodos, permite una propagación de 'Canino' mucho mejor, sin embargo los explantos propagados en ese medio regeneran pobremente. Cuando 'Canino' fue propagado previamente en el medio basado en WP durante un ciclo de tres semanas, se alcanzaron porcentajes de regeneración similares a los publicados previamente. La posible explicación puede residir en que una ligera situación de estrés puede favorecer la desdiferenciación y posterior organogénesis celular. La importancia del medio de propagación, es decir del estado fisiológico del material vegetal, ha sido descrita por diferentes autores (Antonelli y Druart, 1990; Escalettes y Dosba, 1993).

Tabla 13.- Efecto del medio de propagación en la regeneración de las variedades ‘Helena’ y ‘Canino’.

Medio de propagación	Variedad	Porcentaje de hojas regenerantes ^b (Media ± E.S.)	Nº de yemas/ hoja regenerantes (Media ± E.S.)
Medio A	Helena	37,5 ± 3,7	2,0 ± 0,2
Medio B	Helena	44,3 ± 5,9	2,4 ± 0,2
Medio B	Canino	24,7 ± 4,9	1,6 ± 0,2
Medio M2 ^a	Canino	51,4 ± 8,4	1,4 ± 0,1

^a Medio descrito en Pérez-Tornero y Burgos (2000) basado en WP. Los brotes de ‘Canino’ se mantuvieron en este medio durante las tres últimas semanas (el último subcultivo) antes de iniciar el experimento de regeneración.

^b El número total de explantos utilizados fueron 238 de ‘Helena’ y 112 de ‘Canino’.

Efecto de los inhibidores de la acción del etileno

El STS incrementó la regeneración en las dos variedades cuando se añadió al medio a cualquiera de las concentraciones ensayadas (Figura 10).

Los porcentajes de regeneración fueron significativamente diferentes entre las distintas concentraciones del ion Ag^+ ($P < 0,001$) y también entre las dos variedades ($P < 0,01$). Los niveles óptimos de STS fueron de 60 μM para ‘Helena’ y de 30 μM para ‘Canino’ (Figura 10). Aunque muchas hojas cultivadas en medio con Ag^+ presentaron zonas necrosadas, los callos formados en los explantos generalmente desarrollaron yemas (Figura 11). En la variedad ‘Canino’ las zonas necróticas fueron más frecuentes que en la variedad ‘Helena’ (datos no mostrados).

Los brotes regenerados mostraron un aspecto muy saludable y a menudo un color rojizo. En la variedad ‘Helena’ aparecieron algunas flores perfectas cuando las hojas fueron tratadas con 30 μM de STS (Figura 11).

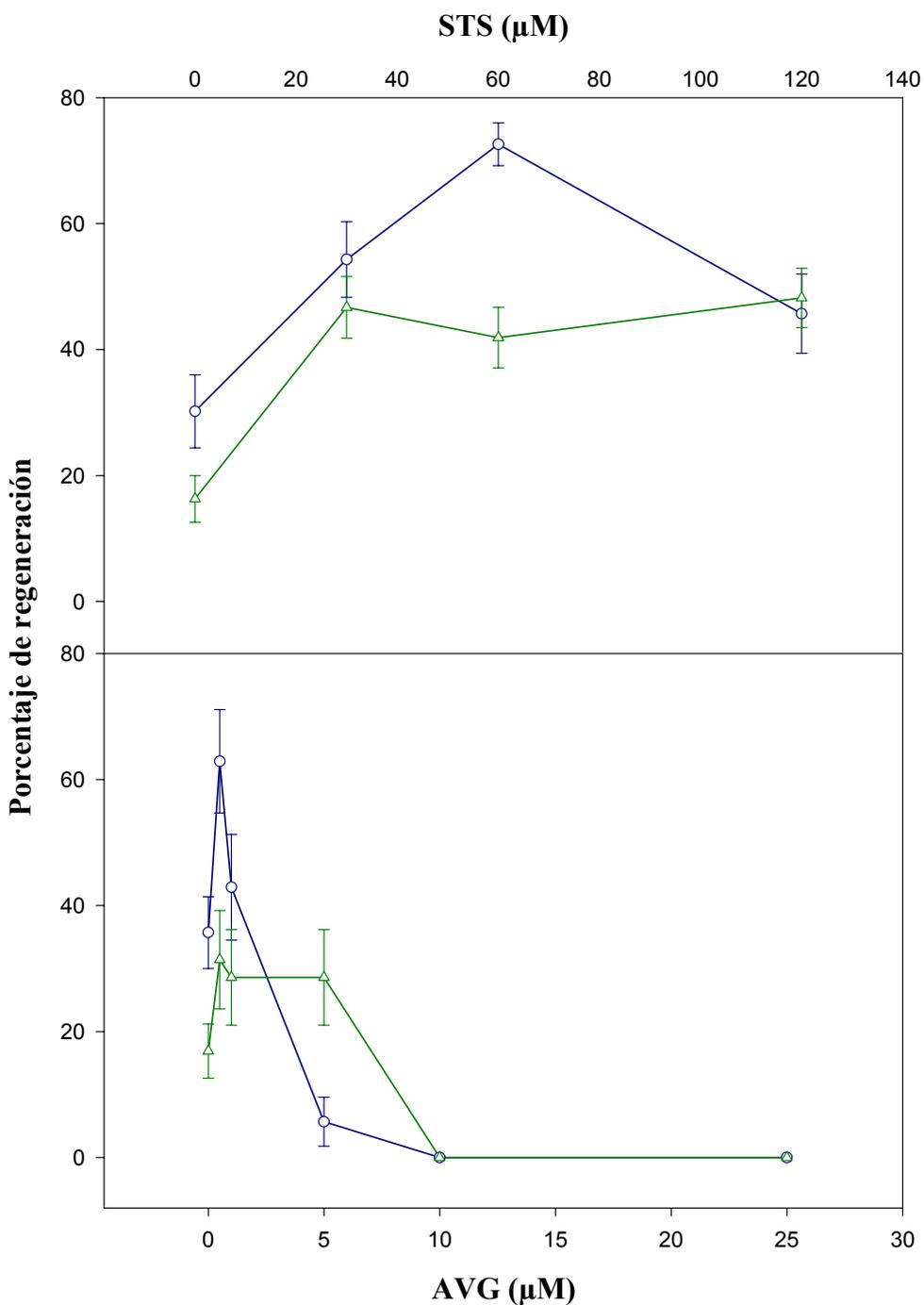


Figura 10.- Efecto de las diferentes concentraciones de los inhibidores del etileno AVG y STS en la regeneración adventicia en 'Helena' (●) y 'Canino' (△). Los porcentajes de regeneración se han calculado como el número de hojas sobre las cuales se ha diferenciado algún brote frente al número total de explantos (581 de Helena y 665 de Canino). Las barras verticales indican los errores estándar.

Cuando se utilizó AVG, su concentración influyó significativamente la tasa de regeneración ($P < 0,01$). Los mejores resultados se produjeron con la concentración más baja de AVG ensayada ($0,5 \mu\text{M}$). Concentraciones superiores fueron reduciendo progresivamente la regeneración y por encima de $5 \mu\text{M}$ la inhibieron completamente en ambas variedades (Figura 10).

Los efectos beneficiosos de los inhibidores del etileno sobre la organogénesis han sido ampliamente descritos para varias especies (Songstad *et al.*, 1988; Chi *et al.*, 1990; Chraibi *et al.*, 1991; Bais *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1997). Sin embargo, solamente un trabajo previo (Escalettes y Dosba, 1993) muestra el efecto de los inhibidores del etileno sobre la regeneración en el género *Prunus*.

Tanto los iones Ag^+ como el AVG inhiben la acción del etileno, pero actúan a distinto nivel. El ion Ag^+ parece que actúa impidiendo la unión del etileno con sus receptores (Beyer, 1979), mientras que el AVG bloquea la actividad de la ácido aminociclopropano carboxílico (ACC es un precursor del etileno) sintasa, enzima clave en la ruta de síntesis del etileno (Yang y Hoffman, 1984) (Figura 12).

El efecto positivo observado de los inhibidores del etileno sugiere que esta hormona vegetal producida por los explantos cultivados inhibe la organogénesis (Chi *et al.*, 1990). La regeneración de plantas a partir de un cultivo de callos de maíz disminuyó cuando a estos se les suministro ACC, y aumentó cuando fueron tratados con nitrato de plata (Songstad *et al.*, 1988). La adición al medio de $60 \mu\text{M}$ de STS conjuntamente con $0,5 \mu\text{M}$ de AVG no mejoró los resultados de regeneración en 'Helena' respecto a la adición de cada compuesto por separado (datos no mostrados).

La ausencia de un efecto sinérgico entre los dos inhibidores del etileno podría ser explicada si nuestra concentración optimizada de STS produjese una inhibición máxima de la acción del etileno supliendo por completo la acción del AVG.

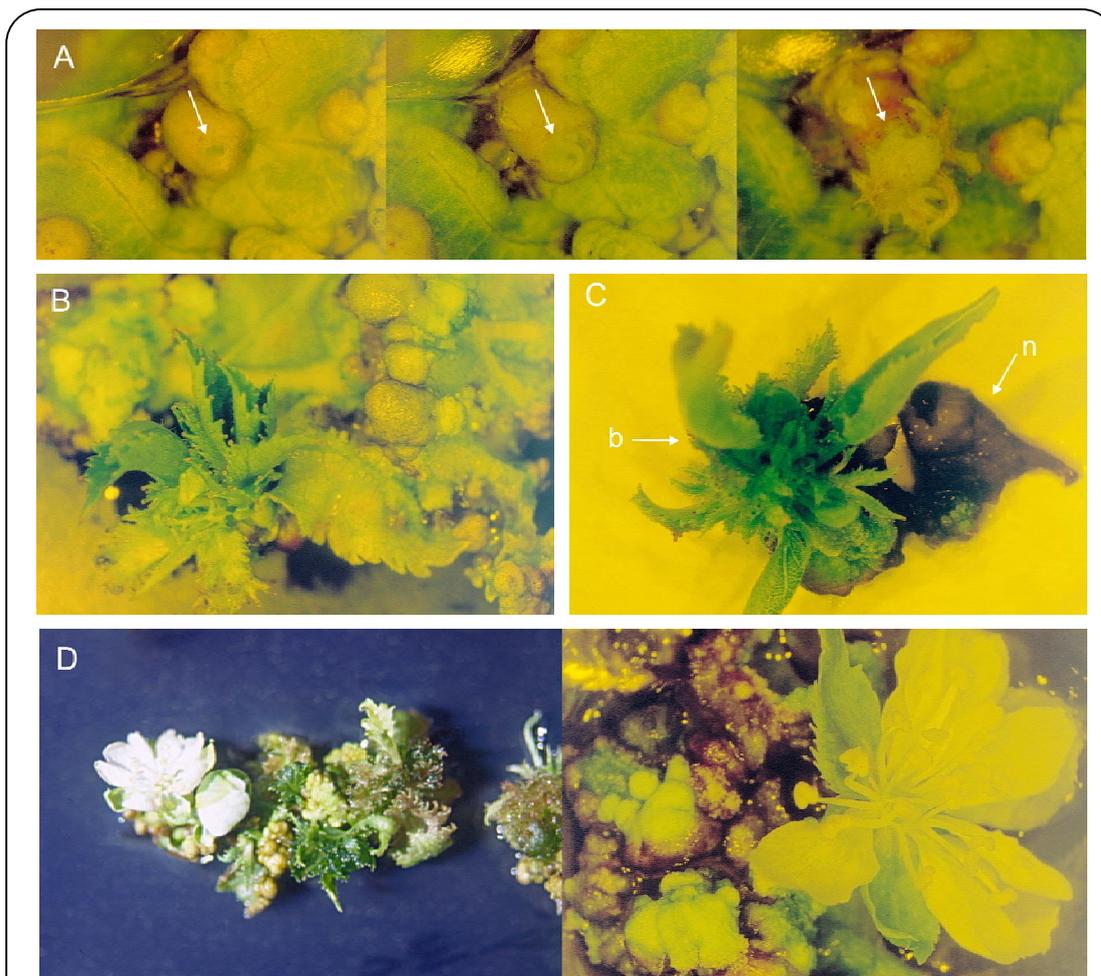
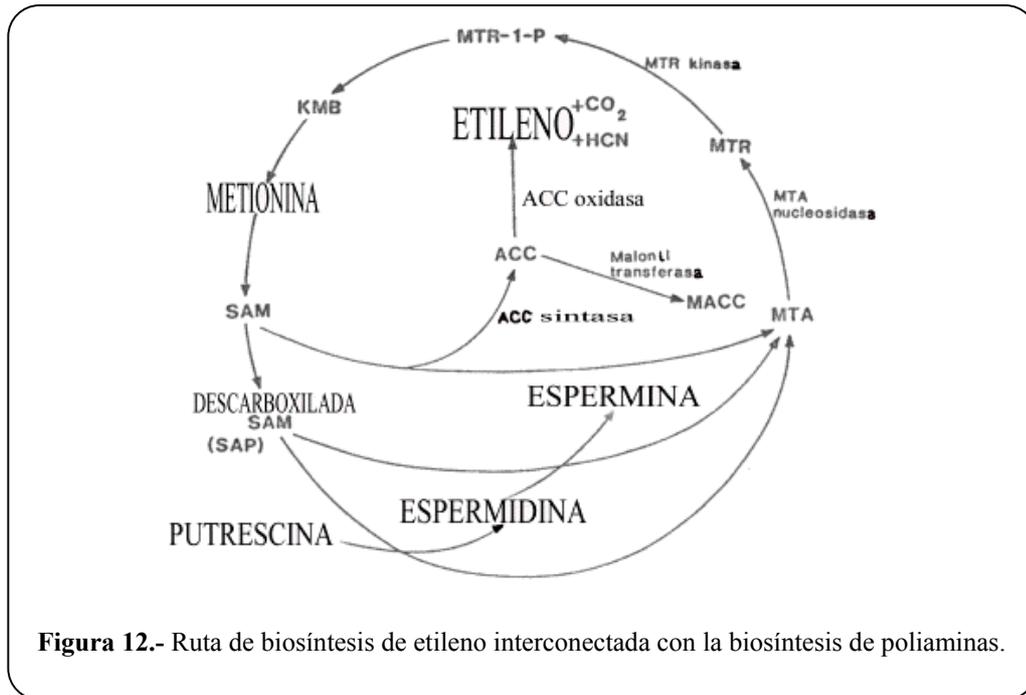


Figura 11A-D.- Regeneración adventicia a partir de hojas de albaricoquero. **(A)** Evolución de la regeneración de una yema adventicia (flechas) en las primeras etapas; las fotos se tomaron a los 18, 24 y 27 días desde el inicio del experimento (x50). **(B)** Brote regenerado a partir de una hoja de la variedad ‘Helena’ en medio con 60 μM de STS (x25). **(C)** Necrosis (n) presente en una hoja de ‘Canino’ cultivada en medio con 30 μM de STS. Sobre la hoja necrótica está apareciendo una yema (b) a partir de un callo verde (x25). **(D)** Yemas y flores adventicias regenerando a partir de una hoja de ‘Helena’ en medio con 30 μM de STS (x10), y detalle de una flor abierta mostrando las anteras perfectamente desarrolladas (x50).

Un efecto adicional observado del STS fue reducir la variabilidad dentro de un mismo tratamiento. La consistencia de los resultados de experimentos independientes se incrementó cuando se adicionó al medio STS, solo o en combinación con bajas concentraciones de kanamicina (la kanamicina a dosis bajas estimuló la regeneración como se verá más adelante en este capítulo), comparado con un control de regeneración con las condiciones normales descritas en materiales y métodos, y también en comparación con un tratamiento con la adición de kanamicina solamente (Tabla 14).



Nuestros resultados demuestran que el STS, y no la kanamicina, incrementó la consistencia de los resultados entre experimentos independientes y, por lo tanto, redujo la variabilidad dentro de un tratamiento concreto (Tabla 14). Esto es muy importante ya que la variabilidad en este tipo de experimentos es generalmente muy alta, como se mencionó en la discusión del efecto del volumen del medio. Este efecto del STS en la regeneración adventicia de diferentes especies de *Prunus* ha sido sugerido previamente (Escalettes y Dosba, 1993), pero, que sepamos, es la primera vez que ha sido demostrado.

Tabla 14.- Porcentajes de regeneración obtenidos a partir de varios experimentos independientes y variabilidad en los resultados afectados por kanamicina (km) y STS.

Tratamiento	Experimentos independientes									C.V. (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Control	34,3	21,4	27,3	35,7	17,1	28,6	46,4	25,7	-	30,0
Km (8,6µM)	77,1	26,5	17,6	51,4	37,5	-	-	-	-	55,5
STS (60µM)	57,1	74,3	77,1	77,1	77,1	48,6	57,1	-	-	18,2
Km + STS	60,0	80,0	82,8	51,4	65,7	57,1	54,3	74,3	71,4	17,0

Condiciones de regeneración para el control descritas en Pérez-Tornero *et al.* (2000).

La leve necrosis que apareció sobre las hojas cuando se añadió al medio STS sugiere que este compuesto podría ser ligeramente tóxico para las hojas de albaricoquero. Se ha demostrado previamente un efecto tóxico del AgNO₃ en cotiledones de girasol (Chraibi *et al.*, 1991). El AVG también resultó ser fitotóxico, inhibiendo la regeneración en albaricoquero a concentraciones superiores a 5 µM lo que concuerda con resultados obtenidos en *Brassica campestris* (Chi *et al.*, 1990) donde altas concentraciones de AVG también provocaron una reducción de la regeneración.

Efecto de las poliaminas solas o en combinación con los inhibidores del etileno

Las poliaminas son cationes orgánicos de bajo peso molecular implicados en diversos procesos fisiológicos y de crecimiento en bacterias, animales y plantas. La diamina putrescina es la precursora de la triamina espermidina y la tetramina espermina. En plantas, putrescina, espermidina y espermina están presentes en concentraciones que pueden variar desde micromolar hasta más de milimolar (Galston y Sawhney, 1990). Están involucradas en la estimulación de la división celular, regulación de rizogénesis, embriogénesis, desarrollo floral, maduración del fruto y otros procesos (Evans y Malmberg, 1989; Kakkar *et al.*, 2000). Se ha estudiado el efecto de las poliaminas sobre la regeneración de brotes en varias especies (Pua *et al.*, 1996; Chi *et al.*, 1994; Bais *et al.*, 2001; Shoeb *et al.*, 2001; Bernet *et al.*, 1998) y el efecto sinérgico de los inhibidores del etileno con la putrescina (Pua *et al.*, 1996; Bais *et al.*, 2001). Las poliaminas han sido consideradas como una nueva clase de reguladores del crecimiento en plantas y como segundos mensajeros, al menos en el cultivo de tejidos (ver revisión de Kakkar *et al.* (2000)).

Además, las poliaminas libres se encuentran cargadas positivamente a pH intracelular y alguna de sus posibles funciones biológicas podría estar relacionada con interacciones iónicas con fragmentos de pectinas que se sabe actúan en la morfogénesis (Messiaen *et al.*, 1997). Todavía se desconoce mucho sobre los mecanismos moleculares que participan en la regulación de la biosíntesis de

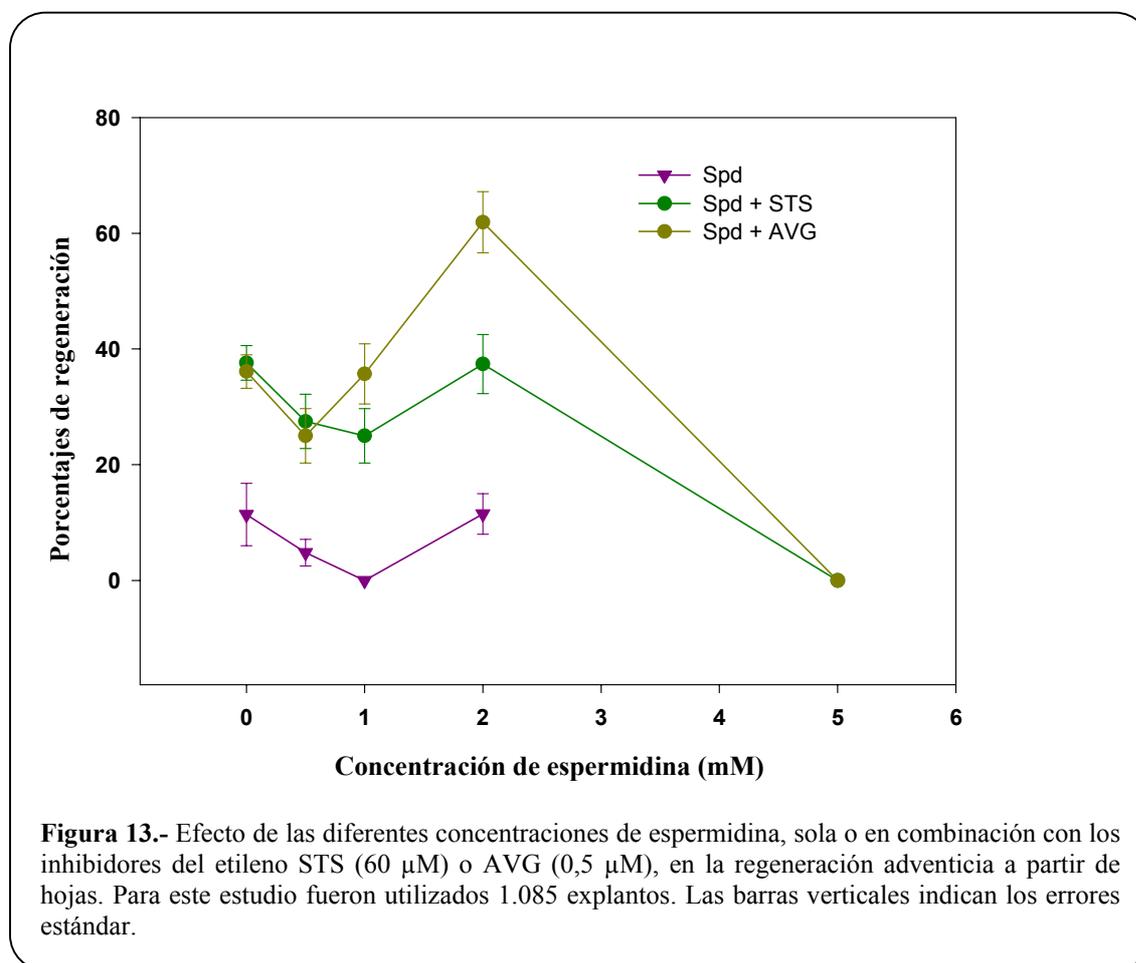
poliaminas y su modo de acción en los procesos de crecimiento y desarrollo vegetal (Kakkar y Sawhney, 2002).

Sin embargo, la aplicación de poliaminas al medio de regeneración no produjo un aumento significativo de la regeneración en albaricoquero respecto a un control sin la adición de poliaminas (Figuras 13 y 14). Cuando las poliaminas fueron aplicadas en combinación con los inhibidores del etileno se obtuvieron diferentes resultados dependiendo del tipo de poliamina utilizada. Espermidina, sólo cuando se aplicó a 2 mM, mejoró significativamente la regeneración en combinación con AVG ($P < 0,001$). No tuvo ningún efecto en combinación con STS o cuando se aplicó a concentraciones inferiores combinada con AVG. La aplicación de concentraciones superiores, en combinación con STS o con AVG, tuvo un efecto negativo comparado con un control con únicamente la adición del inhibidor del etileno (Figura 13). Por otro lado, la aplicación de putrescina a diferentes concentraciones, en combinación con STS o AVG, no produjo ninguna diferencia significativa respecto al control y por encima de 2 mM tuvo un efecto negativo sobre la regeneración (Figura 14). Sin embargo, la adición de poliaminas al medio de regeneración a concentraciones dentro del rango de 1 a 2 mM produjo explantos muy saludables, color verde oscuro y con gran cantidad de callos en su superficie.

Se ha descrito que la adición de poliaminas al medio incrementó los índices de regeneración en varias especies (Shoeb *et al.*, 2001; Bernet *et al.*, 1998; Chi *et al.*, 1994). Se ha sugerido que los niveles celulares de poliaminas y la relación entre putrescina y espermidina son un factor importante (biomarcadores) para establecer la habilidad de regeneración en arroz (Shoeb *et al.*, 2001). Sin embargo, en esta tesis el uso de putrescina o espermidina solas no mejoró la regeneración, coincidiendo con resultados en otras especies donde la putrescina no tuvo ningún efecto sobre la regeneración adventicia cuando fue adicionada sola al medio (Pua *et al.*, 1996).

Las poliaminas y el etileno regulan sus niveles mutuamente mediante competición metabólica por un precursor común, S-adenosilmetionina (SAM) (Yang y Hoffman, 1984). SAM descarboxilado, producido por la acción de SAM

descarboxilasa, es utilizado como el donador de grupos aminopropilos para el paso de putrescina a espermidina y posteriormente el paso de espermidina a espermina (Kumar *et al.*, 1997) (Figura 12). En algunas especies o tejidos la cantidad de SAM puede ser limitante, sin embargo, existen ejemplos en los que el etileno y las poliaminas no son antagonistas y que la regulación de los niveles de ambos no ocurre por competición por SAM (Evans y Malmberg, 1989). En estos casos, la cantidad de SAM presente es suficiente para satisfacer las dos rutas de biosíntesis sin que se observe competición aparente entre ellas (Quan *et al.*, 2002).



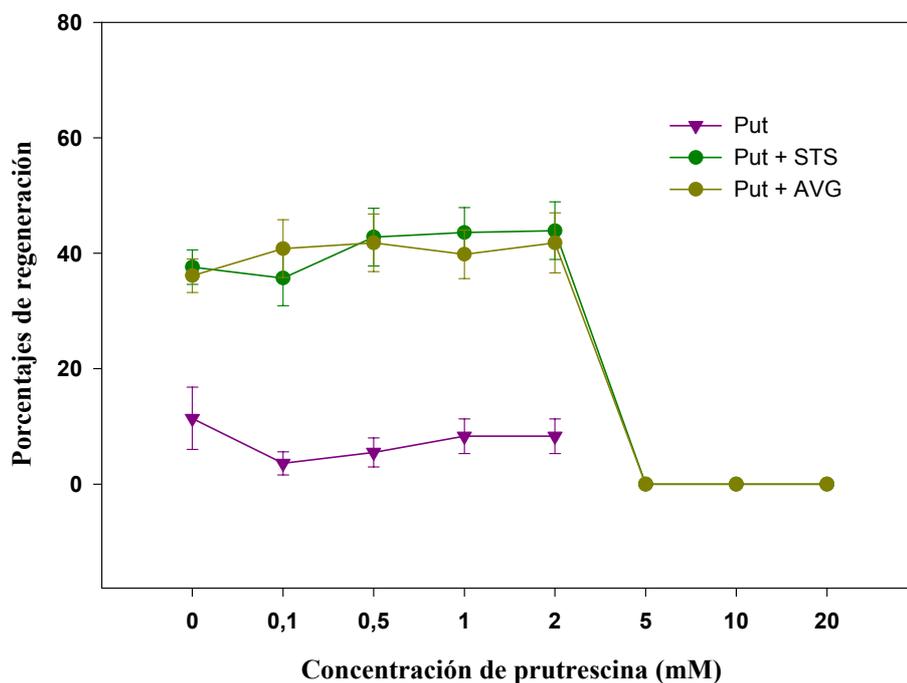


Figura 14.- Efecto de diferentes concentraciones de putrescina, sola o en combinación con los inhibidores del etileno STS (60 μ M) o AVG (0,5 μ M), en la regeneración adventicia a partir de hojas. Para este estudio fueron utilizados 1.722 explantos. Las barras verticales indican los errores estándar.

A veces, en algunas células, la ruta de síntesis de las poliaminas está regulada mayormente por las enzimas espermidina sintetasa y espermina sintetasa y no por SAM descarboxilasa (Quan *et al.*, 2002). El tejido de albaricoquero utilizado en este trabajo parece ser uno de estos casos ya que la adición de poliaminas exógenas no parece afectar la síntesis de etileno, al menos no es observable en las tasas de regeneración adventicia.

Se ha descrito una mayor acumulación de clorofila en los tejidos, apareciendo callos de color verde oscuro, como uno de los efectos provocados por el suministro de poliaminas exógenas (Kumar *et al.*, 1997), lo que coincide con nuestros resultados.

Se ha descrito en diferentes especies un efecto sinérgico entre poliaminas e inhibidores del etileno incrementando la regeneración (Pua *et al.*, 1996; Bais *et al.*, 2001). Nuestros resultados parecen sugerir que la espermidina exógena, en

combinación con AVG, es más efectiva en la producción de brotes a partir de hojas de albaricoquero. La posible explicación podría residir en que, según algunos autores, la relación entre los niveles celulares de putrescina y espermidina es crítica para la capacidad morfogénica de una célula en algunas especies (Shoeb *et al.*, 2001).

Las diferentes respuestas en la regeneración del material vegetal frente a la combinación de espermidina con uno u otro inhibidor del etileno, podrían estar relacionadas con los diferentes mecanismos de acción del AVG y la plata descritos en el apartado anterior. La ausencia de efecto sinérgico observada entre la espermidina y el STS podría ser explicada porque el STS no bloquea la ruta de síntesis del etileno sino que impide la acción de este. Por lo tanto, si la adición de las poliaminas solas no provocó ningún efecto en la regeneración, cabe esperar que si las combinamos con STS sólo se observe el efecto del STS.

Sin embargo, el AVG sí que bloquea la ruta de síntesis del etileno provocando la acumulación de SAM. Esta acumulación de SAM junto con la adición de espermidina exógena desplaza el equilibrio hacia la síntesis de poliaminas favoreciendo así los procesos de organogénesis y reduciendo los de senescencia y envejecimiento.

Efecto de los pulsos de auxinas

Un adecuado balance de citoquininas y auxinas en el medio de cultivo es necesario para regular la organogénesis somática (Litz y Gray, 1992). Cuando se estableció el protocolo de regeneración a partir de hojas de albaricoquero en nuestro laboratorio (Pérez-Tornero *et al.*, 2000) se probaron diferentes concentraciones de NAA aplicadas constantemente a lo largo de todo el experimento. Sin embargo, no se probaron otros tipos de auxinas ni tampoco pulsos a diferentes tiempos.

Pulsos con cantidades adicionales de auxinas durante 4 días produjeron explantos con aspecto muy saludable, con gran cantidad de callos en su superficie, e incrementaron de manera significativa ($P < 0,001$) las tasas de regeneración (Tabla 15). Cuando los diferentes tratamientos fueron comparados por separado con el control, el incremento significativo en la regeneración fue únicamente debido a la adición de 2,4-D ($P < 0,001$).

Tabla 15.- Porcentajes de regeneración tras un pulso de cuatro días con una cantidad adicional de auxinas en el medio de regeneración.

Auxina adicionada	Concentración adicional (μM)	Regeneración (%)	N° de yemas/ /explanto regenerante
Ninguna (control)	--	25,7 \pm 7,4	1,6
NAA	5,37	44,3 \pm 5,9	1,8
	10,74	42,9 \pm 8,4	1,6
2,4-D	4,52	67,1 \pm 5,6	2,1
	9,05	68,6 \pm 5,5	2,0

Se utilizaron un total de 245 hojas en este estudio.

Pretratamientos del material vegetal con reguladores del crecimiento, similares a los aquí descritos, han incrementado la regeneración (Burnett *et al.*, 1994; Yancheva *et al.*, 2003) en algunas especies. Se ha demostrado que el tipo de auxina y el momento de su aplicación son factores críticos en la regeneración a partir de hojas de manzano (Yancheva *et al.*, 2003). Esta influencia del estado fisiológico del material vegetal sobre su capacidad regenerativa se ha descrito previamente en esta tesis cuando se demostró que el medio de cultivo de los brotes micropropagados de albaricoquero, de los que se obtienen las hojas para los ensayos de regeneración posteriores, influyó de forma significativa en los porcentajes obtenidos (ver efecto del estado fisiológico de los explantos).

Descripción del protocolo optimizado

El protocolo de regeneración (Figura 15) a partir de hojas de albaricoquero que se utilizará en el resto de esta tesis es el que se describe a continuación:

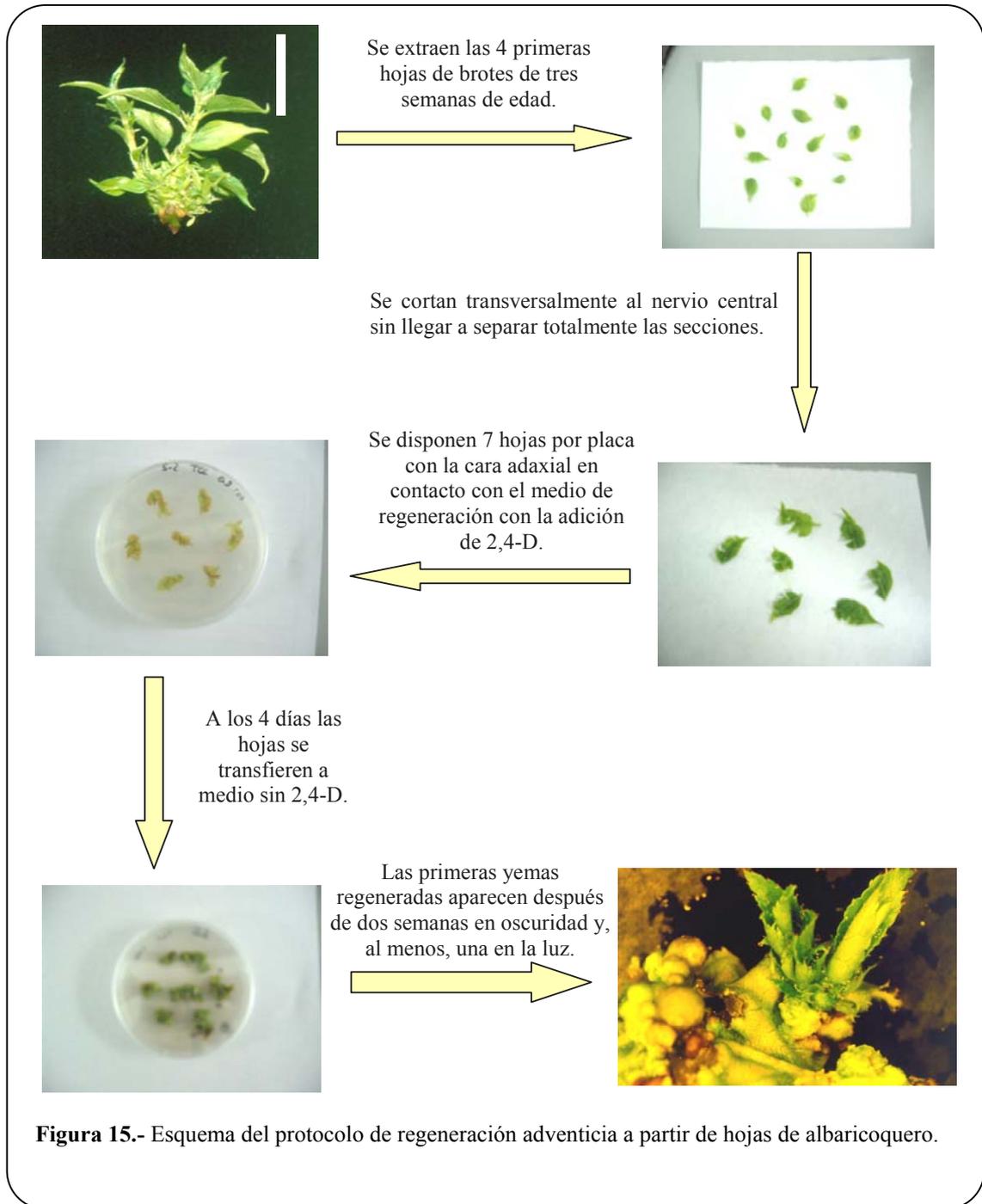
1.- Las cuatro primeras hojas expandidas de brotes de tres semanas de edad mantenidos en medio de propagación, medio A para 'Helena' y WPM modificado para 'Canino', se cortan transversalmente al nervio central 3 ó 4 veces sin llegar a separar totalmente las secciones.

2.- Se disponen 7 hojas por placa con la cara adaxial en contacto con el medio de regeneración (ver materiales y métodos), con 0,7% de "Agar purificado" (HispanLab, S.A.) como agente solidificante, y la adición de 60 ó 30 μM de STS (para 'Helena' o 'Canino', respectivamente) y de 9,04 μM de 2,4-D, dispensando de forma manual aproximadamente 25 mL en placas Petri. Las placas se sellan con Parafilm[®] y se incuban en oscuridad a $22\pm 1^\circ\text{C}$.

3.- A los 4 días los explantos se transfieren a medio de regeneración, pero sin la adición del 2,4-D.

4.- Las placas se incuban en oscuridad a $22\pm 1^\circ\text{C}$ hasta completar 2 semanas y posteriormente se exponen a la luz, con un fotoperiodo de 16 horas y una intensidad luminosa de $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La regeneración se examina periódicamente desde la cuarta semana del inicio del experimento.



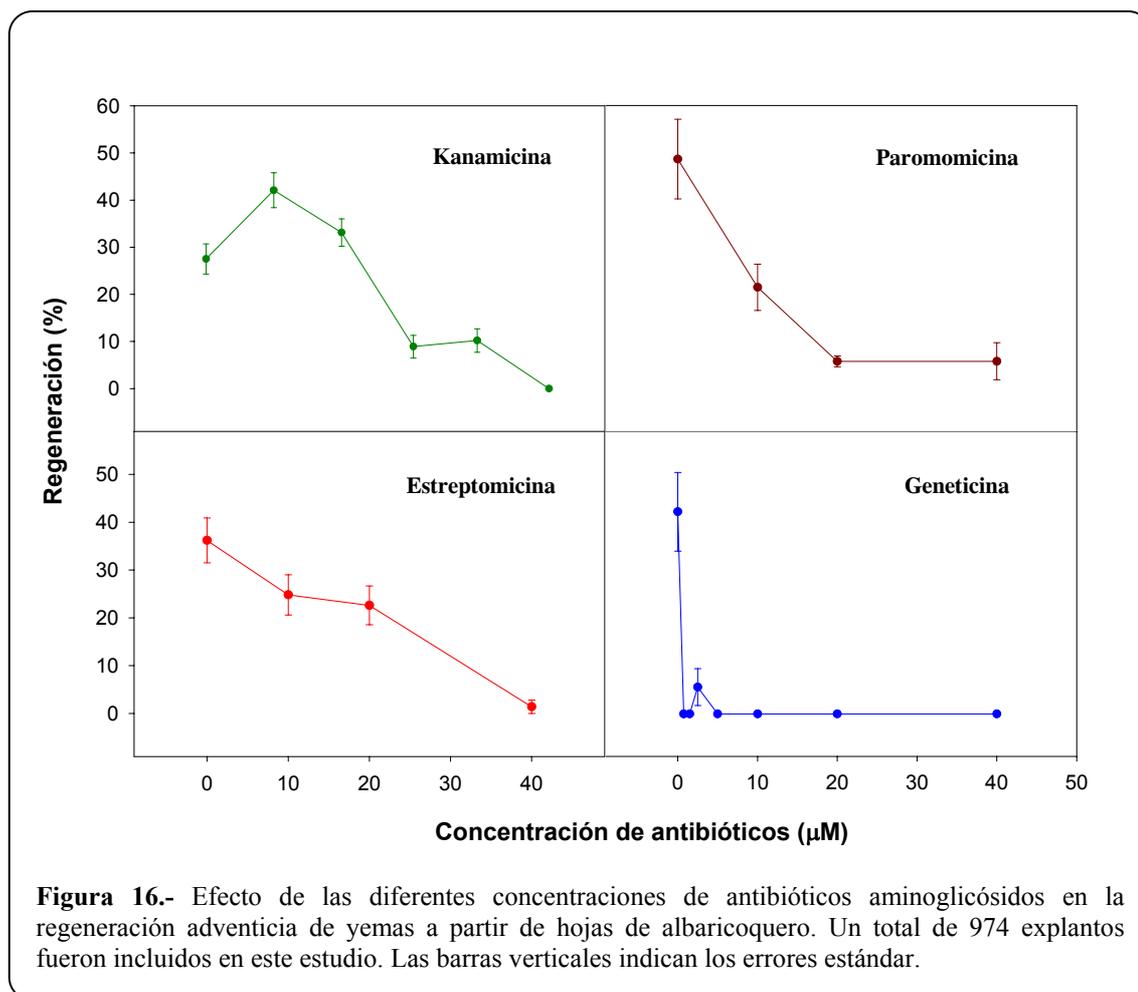
EFEECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS SOBRE MATERIAL NO TRANSFORMADO

Efecto de los antibióticos sobre la regeneración

Antibióticos aminoglicósidos para seleccionar plántulas transformadas

El gen de la neomicina fosfotransferasa (*np^tII*) es ampliamente utilizado en transformación como gen marcador de selección (ver introducción). El producto de este gen inactiva los antibióticos aminoglicósidos mediante fosforilación. Estos antibióticos actúan uniéndose a las diferentes subunidades del ribosoma, dependiendo del antibiótico, inhibiendo la síntesis de proteínas y generando errores en la traducción del código genético (Davis *et al.*, 1984). La kanamicina es utilizada frecuentemente para la selección de plántulas transgénicas *np^tII* (Miki y McHugh, 2004). Sin embargo, en algunos trabajos se han utilizado antibióticos diferentes en la selección de plantas transformadas con el gen *np^tII* (Norelli y Aldwinckle, 1993; Jelenska *et al.*, 2000; Eapen y George, 1990).

Se estudió el efecto de los antibióticos aminoglicósidos estreptomycin, geneticina[®] (G418), kanamicina y paromomicina sobre la regeneración adventicia a partir de hojas de albaricoquero. La regeneración obtenida con cada una de las concentraciones de los distintos antibióticos está recogida en la Figura 16. La sensibilidad de las hojas a los diferentes antibióticos ensayados fue muy diferente. Estreptomycin y paromomicina produjeron una reducción progresiva en los porcentajes de regeneración, en comparación con un control sin antibióticos, cuando se aumentó su concentración. Se alcanzó una inhibición casi completa en la regeneración cuando se utilizó 20 μM de paromomicina, sin embargo se necesitó 40 μM de estreptomycin para alcanzar el mismo nivel de inhibición.



Por otro lado, la geneticina[®] resultó tener un efecto altamente tóxico para las hojas de albaricoquero y la regeneración fue inhibida en todas las concentraciones probadas. Incluso las concentraciones más bajas ensayadas de este antibiótico (la menor fue de 0,75 µM) mostraron un efecto letal en la regeneración. A concentraciones de geneticina de 5 µM o mayores, las células de las hojas murieron. Concentraciones por debajo de 2,5 µM permitieron la presencia de callos normales, pero aparecieron solamente unas pocas yemas.

Cuando se utilizaron niveles bajos de kanamicina (8,6 y 17,2 µM) los explantos mostraron un aspecto verde claro, con muchos callos y los porcentajes de regeneración aumentaron o no se vieron afectados. Con concentraciones mayores (25,7 y 34,3 µM) los explantos se volvieron cloróticos, con pocos callos y la

regeneración disminuyó drásticamente. Las demás concentraciones probadas inhibieron por completo la regeneración.

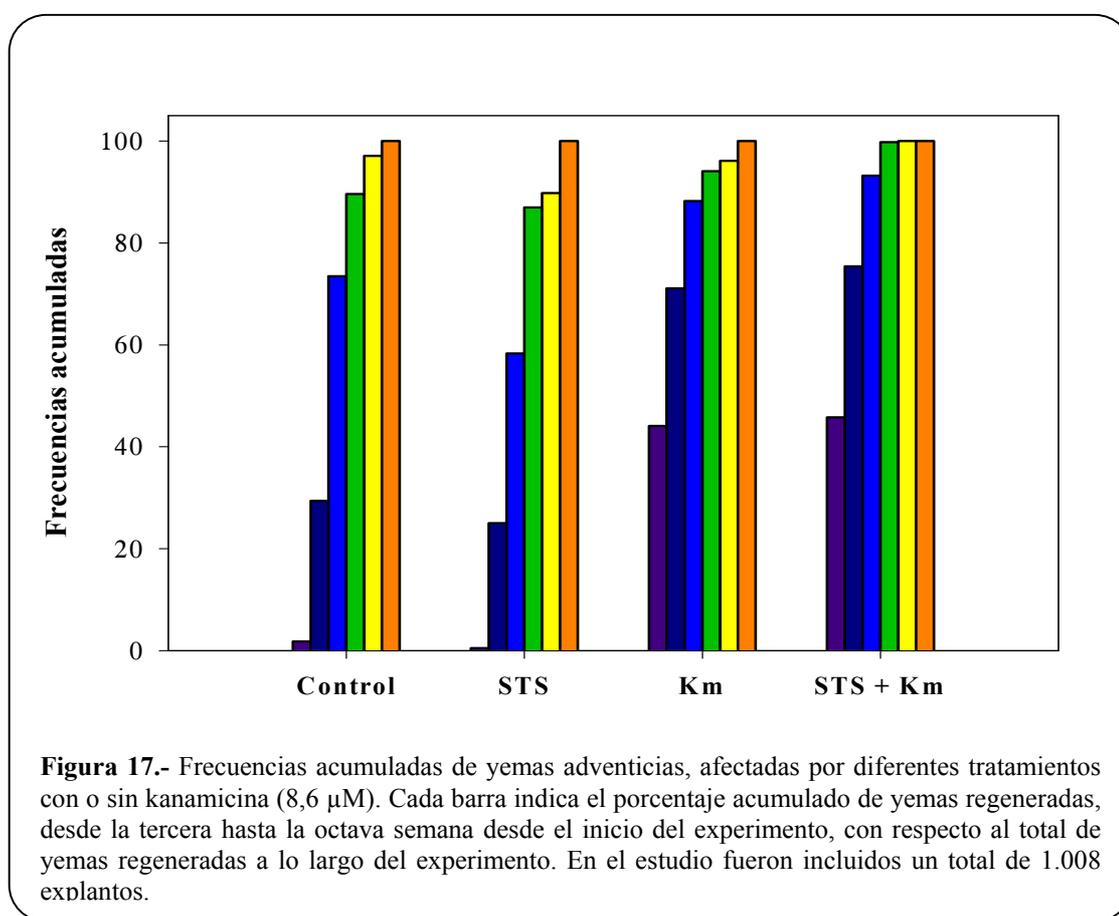
Este comportamiento del material vegetal frente a distintos antibióticos aminoglicósidos ha sido descrito anteriormente. Otros autores encontraron diferentes respuestas en la regeneración de hojas de manzano cuando probaron geneticina[®], paromomicina, kanamicina y neomicina (Norelli y Aldwinckle, 1993). Estas diferentes respuestas del material vegetal a los antibióticos aminoglicósidos podrían deberse a la distinta afinidad que presenta cada uno de ellos a las subunidades del ribosoma, y a proteínas específicas dentro de estas subunidades, afectando de diferente manera a la síntesis de proteínas (Davis *et al.*, 1984).

Cuando se utilizó 8,6 μM de kanamicina, adicionalmente al incremento de la regeneración, se detectó un adelanto en la aparición de las yemas regeneradas. Se diseñaron entonces, experimentos específicos para comprobar este efecto adicional de la kanamicina. En la Figura 17 están representados los porcentajes acumulados por semanas de las yemas regeneradas (calculados sobre el número total de yemas obtenidas al finalizar los ensayos) cuando se utilizó kanamicina, sola o en combinación con el inhibidor del etileno STS. Cuando no se añadió kanamicina al medio de regeneración, la aparición de las yemas se retrasó en, al menos, una semana comparado con aquellos medios con 8,6 μM de kanamicina, sola o en combinación con STS. Más del 75% de las yemas regeneraron dentro de las 4 primeras semanas desde el inicio del experimento, cuando la kanamicina estuvo presente. En el resto de tratamientos y en el control el mismo porcentaje se alcanzó, al menos, una semana más tarde.

No observamos ningún efecto beneficioso en la regeneración, a ninguna de las concentraciones probadas, de los antibióticos estreptomomicina, geneticina[®] y paromomicina, similar al incremento en la regeneración y adelanto en la aparición de las yemas producido por 8,6 μM de kanamicina. Se ha descrito que la kanamicina y la estreptomomicina mejoraron la diferenciación de brotes a partir de secciones de hojas de tabaco y que la kanamicina estimuló la producción de brotes a partir de callos de zanahoria (Owens, 1979). La estreptomomicina también potenció la

diferenciación celular en embriones somáticos de mijo indio (Eapen y George, 1990). Norelli y Aldwinckle (1993) encontraron que la regeneración en hojas de manzano fue estimulada en gran medida por concentraciones de neomicina o paromomicina por debajo de la inhibitoria.

Se ha descrito un efecto beneficioso de algunos antibióticos sobre la organogénesis en diferentes especies leñosas (Yepes y Aldwinckle, 1994a; Chevreau *et al.*, 1997; Hammerschlag *et al.*, 1997; Humara y Ordás, 1999). En la mayoría de los



casos este efecto ha sido atribuido a que los antibióticos imitan a hormonas vegetales, por ejemplo, se ha demostrado que el efecto estimulador de la penicilina G y la carbenicilina se debe a que su degradación produce ácido fenilacético, que es una hormona vegetal en algunas especies vegetales (Holford y Newbury, 1992). Sin embargo, la estructura química de los aminoglicósidos no sugiere un producto de su

degradación con propiedades similares a una auxina y, por tanto, se debe encontrar una explicación diferente del modo de acción de estos compuestos que justifique su efecto en la regeneración.

Una hipótesis que podría explicar el efecto de las bajas concentraciones de kanamicina, incrementando las tasas de regeneración a partir de hojas de albaricoquero y acortando el tiempo necesario para el desarrollo de las yemas adventicias, aquí descritos, podría estar en la generación de un ligero estrés sobre las células vegetales sin dañarlas excesivamente. Este estrés podría estimular la desdiferenciación de esas células, su entrada en división y su posterior diferenciación para producir un nuevo meristemo. Una evidencia que podría apoyar esta hipótesis es la influencia del medio de proliferación del material en la regeneración, donde hojas de brotes de ‘Canino’, mantenidos en un medio de propagación más estresante regeneraron mucho mejor (ver resultados y discusión del apartado “Efecto del estado fisiológico de los explantos en la regeneración”).

La sensibilidad a kanamicina parece depender en gran medida del tipo de explanto y de la especie. En la literatura se puede encontrar un amplio rango de concentraciones inhibitorias de la organogénesis para este antibiótico. Especies muy sensibles como el almendro (Miguel y Oliveira, 1999), la vid (Colby y Meredith, 1990), el manzano (Norelli y Aldwinckle, 1993) o el pino (Humara y Ordás, 1999), donde 8,6-17,1; 12; 8,6 y solamente 4,3 μM respectivamente, inhibieron la regeneración, contrastan con especies altamente tolerantes como el peral (Chevreau *et al.*, 1997), el nogal (Dandekar *et al.*, 1998), el olivo (Mencuccini *et al.*, 1999) o los cítricos (Domínguez *et al.*, 2000), que necesitaron 171,6 μM para inhibir la regeneración de brotes no transformados. En albaricoquero, la regeneración disminuyó drásticamente con 25,7 μM , y los explantos se volvieron cloróticos y murieron. Aunque esta concentración podría ser la adecuada para el uso de la kanamicina como agente de selección, el hecho de que mejore la regeneración a concentraciones menores podría hacer necesario el diseño de una estrategia de selección muy específica o bien el uso de los otros antibióticos probados,

paromomicina, estreptomicina o geneticina[®], a las concentraciones inhibitorias de la regeneración adventicia en albaricoquero que se han determinado en este trabajo.

Antibióticos para controlar el crecimiento de *Agrobacterium*

En los experimentos de transformación mediada por *Agrobacterium*, tras el periodo de cocultivo, es necesario eliminar la bacteria o, al menos, controlar su crecimiento. Para ello se utilizan antibióticos, pero el efecto de estos sobre la regeneración debe ser estudiado previamente. El tipo de antibióticos y las concentraciones probadas en este trabajo son utilizadas frecuentemente en los trabajos de transformación para controlar el crecimiento de *Agrobacterium* después del cocultivo.

En la Tabla 16 se muestran los efectos de la vancomicina, cefotaxima, carbenicilina y timentina en la regeneración de la variedad 'Helena'.

La timentina, cuando se utilizó en solitario, y la carbenicilina, sola o en combinación, fueron perjudiciales para la regeneración a partir de hojas de 'Helena'. Estos antibióticos β -lactámicos son inhibidores de la síntesis de la pared celular bacteriana. Debido a su modo de acción, se considera que estos antibióticos no son tóxicos o poco tóxicos para las células vegetales. La timentina mejoró la regeneración cuando se utilizó a una concentración baja (0,36 mM) en combinación con cefotaxima, lo que podría sugerir que únicamente afecta a las células vegetales a altas concentraciones, de hecho, ha sido utilizada con tabaco (Nauerby *et al.*, 1997) y tomate (Costa *et al.*, 2000) sin afectar a la regeneración.

Por otro lado, se ha demostrado que la carbenicilina es degradada hasta alcanzar niveles fisiológicamente activos de la auxina ácido fenilacético, lo que podría explicar el efecto positivo que tiene este antibiótico sobre la organogénesis en diferentes especies (Nakano y Mii, 1993; Hammerschlag *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2001). Esta degradación, en el caso de albaricoquero, podría haber producido una concentración excesiva de auxinas en las células vegetales, ya que previamente se observó que un incremento en la concentración de NAA reducía y retrasaba la regeneración en hojas de albaricoquero (Pérez-Tornero *et al.*, 2000). Además, se ha

descrito también un efecto nocivo de este antibiótico en otras especies (Yepes y Aldwinckle, 1994a; Nauerby *et al.*, 1997).

Tabla 16.- Efecto de los diferentes antibióticos (solos o combinados) sobre la regeneración adventicia a partir de hojas de la variedad ‘Helena’.

Antibióticos	Concentración ^a (mM)	Porcentaje de hojas regenerantes ^b (Media±E.S.)	Nº de brotes/ Nº hojas regenerantes (Media±E.S.)
Ninguno	0,00	20,2 ± 4,3	1,7 ± 0,10
Timentina	0,98	9,6 ± 2,9	2,6 ± 0,17
Cefotaxima	1,04	28,8 ± 4,4	3,0 ± 0,22
Vancomicina	0,27	61,4 ± 5,8	2,2 ± 0,16
Carbenicilina	1,20	14,3 ± 4,7	1,5 ± 0,09
Timentina/Cefotaxima	0,36/0,63	23,1 ± 4,1	1,8 ± 0,10
Vancomicina/Cefotaxima	0,13/0,63	40,0 ± 5,9	1,6 ± 0,10
Vancomicina/Carbenicilina	0,13/0,71	15,7 ± 4,3	1,2 ± 0,05

^a Concentraciones normales, encontradas en la literatura, para el control del crecimiento de *Agrobacterium*.

^b Evaluados un total de 667 explantos.

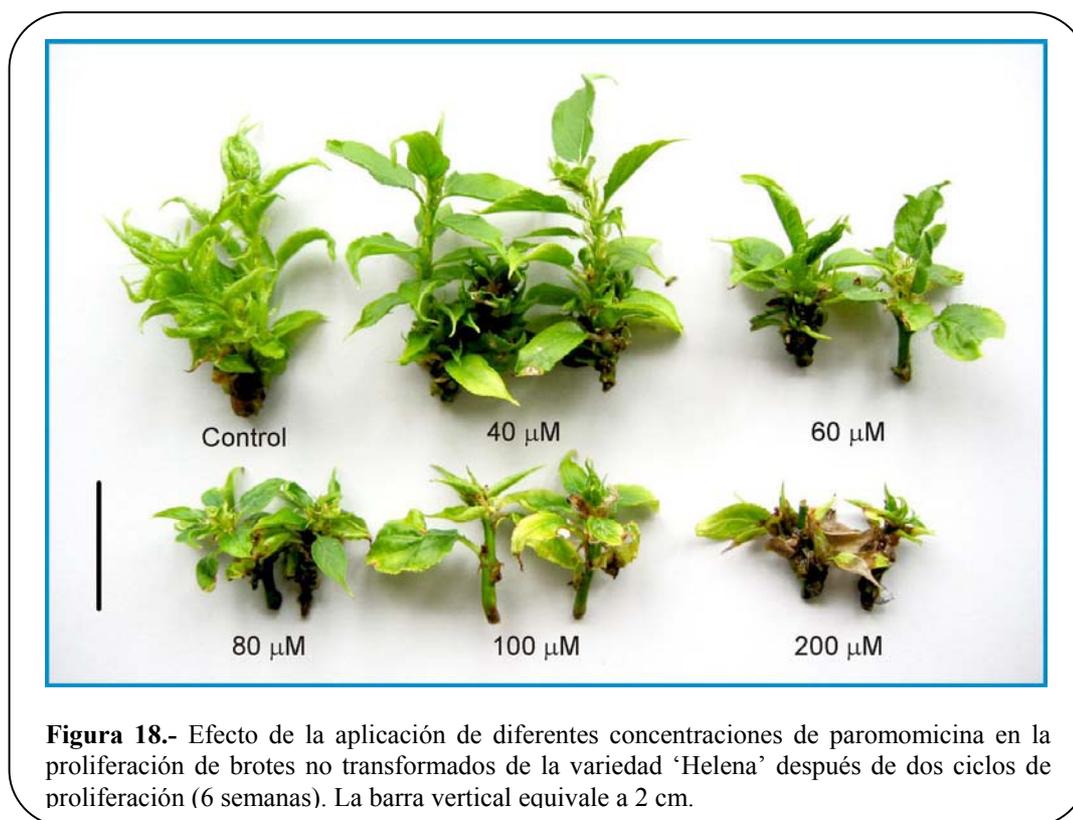
La cefotaxima, sola o en combinación con timentina o vancomicina, estimuló levemente la organogénesis de brotes en albaricoquero. La estructura química de este antibiótico no sugiere que un producto de su degradación tenga propiedades parecidas a una auxina (Holford y Newbury, 1992) y un modo de acción diferente debe ser responsable de los resultados observados. En otras especies se han obtenido resultados similares (Borrelli *et al.*, 1992; Nakano y Mii, 1993; Yepes y Aldwinckle, 1994a; Nauerby *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2001) donde la cefotaxima no afectó la organogénesis o la mejoró hasta una determinada concentración.

El uso de vancomicina incrementó en un 204% la regeneración adventicia de brotes cuando se utilizó sola, y en un 98% en combinación con cefotaxima. La vancomicina es un glicopéptido, efectivo contra la mayoría de las bacterias Gram-positivas. Cuando es utilizada en combinación con un antibiótico β-lactámico, se muestra efectiva contra bacterias Gram-negativas como es el *Agrobacterium*, ya que el

antibiótico β -lactámico destruye la membrana externa de la bacteria permitiendo a la vancomicina alcanzar la pared bacteriana e inhibir su síntesis. Humara y Ordás (1999) comprobaron que la vancomicina no era tóxica y que mejoró significativamente la regeneración y el desarrollo de brotes en cotiledones de *Pinus pinea*.

Efecto de los antibióticos sobre la proliferación

Cuando los brotes se trataron mediante inmersión en medio líquido con 10, 20 ó 40 μM de paromomicina y posteriormente se dispusieron en medio de proliferación con la adición de 40 μM de paromomicina no se observó efecto alguno en el aspecto y crecimiento de los brotes (datos no mostrados).



Después del tratamiento en medio líquido con 100 μM de paromomicina los brotes quedaron visiblemente dañados, pero después del primer subcultivo, los brotes dispuestos en medio de proliferación con 40 μM de paromomicina se recuperaron, teniendo un aspecto similar al control sin tratar. En las demás concentraciones se detectó una inhibición del crecimiento de los brotes e incluso una fuerte necrosis en el caso de 200 μM de antibiótico (Figura 18).

El efecto de la geneticina[®] se muestra en la Figura 19. Las concentraciones ensayadas de geneticina[®] por debajo de 20 μM no tuvieron ningún efecto (datos no mostrados). En el rango de concentraciones desde 20 hasta 80 μM hicieron falta seis semanas (2 subcultivos) para observar alguna diferencia respecto al control. Las demás concentraciones resultaron altamente tóxicas y solamente fue necesario un ciclo de proliferación para advertir los efectos del antibiótico.

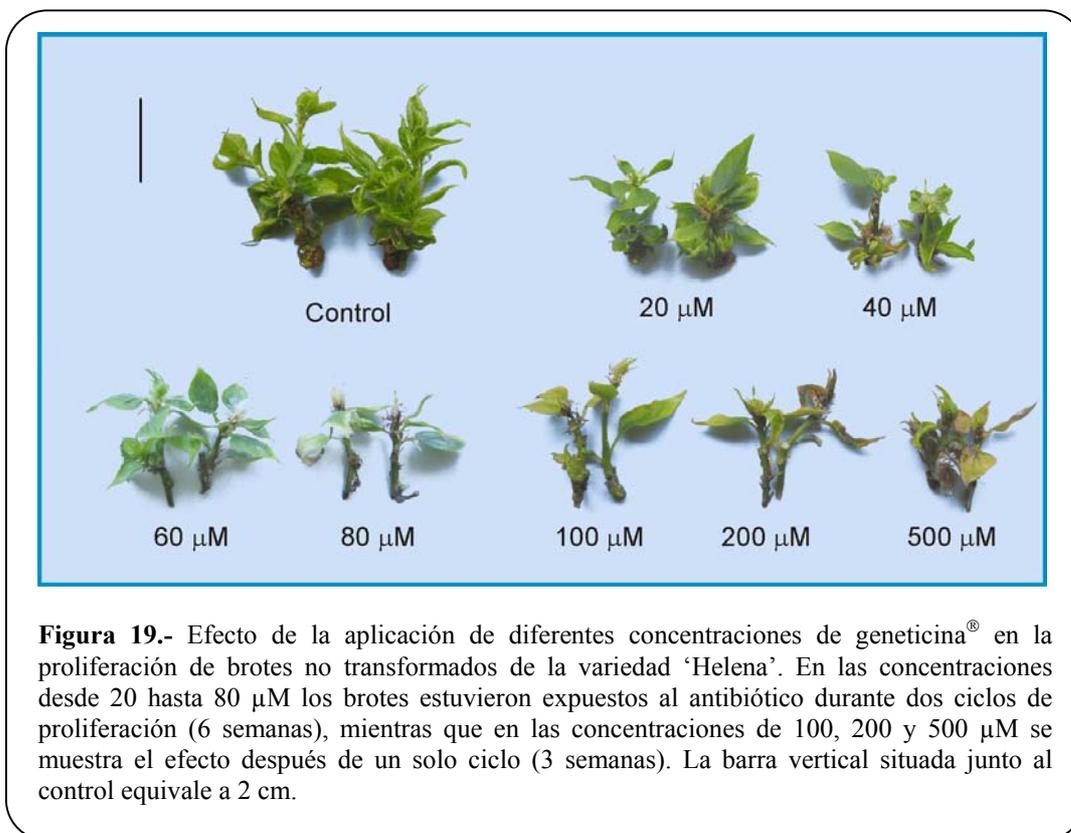


Figura 19.- Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de geneticina[®] en la proliferación de brotes no transformados de la variedad 'Helena'. En las concentraciones desde 20 hasta 80 μM los brotes estuvieron expuestos al antibiótico durante dos ciclos de proliferación (6 semanas), mientras que en las concentraciones de 100, 200 y 500 μM se muestra el efecto después de un solo ciclo (3 semanas). La barra vertical situada junto al control equivale a 2 cm.

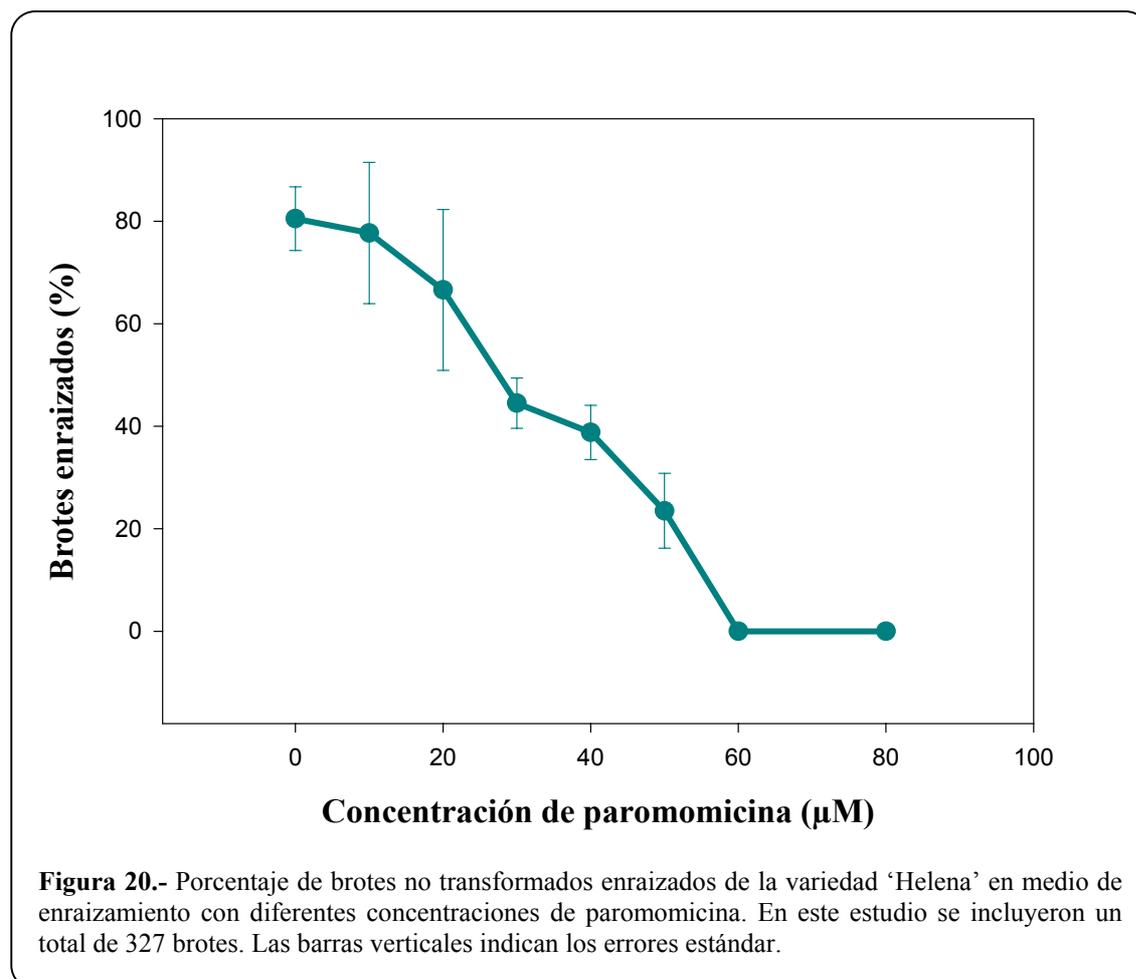
Estos resultados sorprenden ya que se observa una alta tolerancia de los brotes no transformados frente a los dos antibióticos probados. Fue necesaria la utilización de concentraciones mucho mayores a las que inhibieron la regeneración, hasta 13 veces mayor en el caso de la geneticina[®], para observar algún efecto sobre su crecimiento. Resultados similares fueron observados en manzano, mientras que 5 mg/L de kanamicina son suficientes para inhibir la regeneración adventicia a partir de hojas, los efectos del antibiótico sobre brotes son apreciables a partir de 25 mg/L después de seis semanas de cultivo (Yepes y Aldwinckle, 1994b). En cierto modo es lógico que un proceso de diferenciación celular y organogénesis sea más sensible a la presencia de antibióticos aminoglicósidos ya que estos inhiben la síntesis proteica impidiendo, en consecuencia, una correcta organogénesis.

Efecto de los antibióticos sobre el enraizamiento

Las mayores concentraciones de paromomicina ensayadas (60 y 80 μM) inhibieron por completo la aparición de raíces en brotes no transformados de 'Helena' (Figura 20). El gráfico muestra la relación inversamente proporcional existente entre la tasa de enraizamiento y el aumento en la concentración del antibiótico, aunque se produjo algún enraizamiento incluso en presencia de 50 μM de paromomicina.

El número medio de raíces por brote enraizado disminuyó progresivamente con el aumento del antibiótico en el medio, desde 5,9 raíces por brote en el control hasta 3,6 en medio con 50 μM de paromomicina. Analizando la longitud y aspecto de las raíces formadas, también se observaron diferencias notables en los diferentes tratamientos. En los controles las raíces alcanzaron a las tres semanas una longitud de unos 10 cm y presentaron frecuentemente raíces secundarias. En los tratamientos con antibióticos nunca aparecieron raíces secundarias y la longitud decreció hasta menos de 1 cm en las concentraciones de 40 y 50 μM .

Las tasas de enraizamiento registradas en los controles de los experimentos diseñados para este trabajo, 80,5%, coinciden con las publicadas previamente por este grupo de investigación para la variedad ‘Helena’ (Pérez-Tornero y Burgos, 2000). Estos datos son la media de varios experimentos independientes, pero se registró una variabilidad muy elevada entre experimentos. En los controles sin antibiótico las tasas de enraizamiento variaron del 100% al 63,6%. Esta variabilidad se acentuó en los tratamientos con antibiótico, por ejemplo, en ensayos independientes añadiendo 40 μM de paromomicina al medio se registraron tasas del 0% al 50%. Esta alta variabilidad podría reducirse aumentando la muestra en cada uno de los experimentos independientes, pero esto supondría la utilización de un elevado número de brotes.



Existe poca información sobre el efecto de los antibióticos en la formación de raíces en especies del género *Prunus*. Un trabajo en ciruelo describe que 30 mg/L de kanamicina inhibe la organogénesis de raíces en brotes no transformados de las variedades ‘Stanley’ y ‘Bluebyrd’ (Gonzalez-Padilla *et al.*, 2003). Para especies de otros géneros la sensibilidad del enraizamiento a antibióticos aminoglicósidos presenta una alta variabilidad, desde 10 mg/L hasta 100 mg/L de kanamicina en vid (Colby y Meredith, 1990) y chopo blanco (Confalonieri *et al.*, 2000), respectivamente.

El estudio del efecto de la paromomicina sobre el enraizamiento se inició con la idea de diseñar un medio de enraizamiento selectivo en el cual solamente fueran capaces de enraizar los brotes transformados y así poder discriminar de manera sencilla y rápida, solamente en tres semanas, los posibles escapes. Dada la variabilidad detectada entre experimentos independientes sería necesario contar con un elevado número de brotes para poder realizar una discriminación fiable. Desde el inicio de un ensayo hasta que regenera una yema y esta elonga para dar lugar a un brote pueden pasar más de tres meses. Para llegar a tener un número de brotes aceptable, y así poder poner el ensayo de enraizamiento, son necesarios al menos 4 ciclos de proliferación en el mejor de los casos 12 semanas adicionales. Esto supone un total de entre 6 y 12 meses para poder evaluar una yema regenerada en un ensayo de transformación mediante este método.

Con 50 μ M de paromomicina la tasa de enraizamiento de los brotes transformados disminuyó drásticamente hasta 41,6%, valores similares a los del control sin transformar. Concentraciones mayores de paromomicina, 60 ó 80 μ M, no permitieron que ningún brote transformado enraizara, al igual que en el control.

Para otras especies, como el ciruelo, el establecimiento de un medio de enraizamiento selectivo ha sido una herramienta muy útil para la selección de plantas transgénicas (Gonzalez-Padilla *et al.*, 2003). Mientras que 30 mg/L de kanamicina inhibió el enraizamiento de brotes no transformados, los brotes transformados fueron capaces de enraizar en medio con 80 mg/L con tasas de enraizamiento del 91%. Con esta concentración de antibiótico se aseguran que

todos los brotes capaces de enraizar están transformados. Otros autores han advertido una menor capacidad de enraizamiento de los brotes transgénicos comparado con los controles, sugiriendo que es debido a aspectos no deseados de variación somaclonal, incluso entre clones las tasas de enraizamiento fueron diferentes (James *et al.*, 1989). En algunos casos la capacidad de enraizamiento de las plantas transformadas, siendo menor que la de los controles, no fue afectada por el aumento de la concentración del antibiótico en el medio, mientras que en los controles fue disminuyendo progresivamente hasta cero (James *et al.*, 1989; Sriskandarajah *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 2002).

ENSAYOS PREVIOS A LA TRANSFORMACIÓN

Infectividad de las cepas oncogénicas

La virulencia de las tres cepas de *Agrobacterium* en las plantas germinadas a partir de semillas de la variedad ‘Canino’ fue similar (Tabla 17). Tampoco se encontraron diferencias significativas en el número de heridas que produjeron tumores o en el peso de los tumores 12 semanas después de la inoculación con la suspensión bacteriana. Con la cepa A281 los tumores aparecieron ligeramente antes que con las otras cepas, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

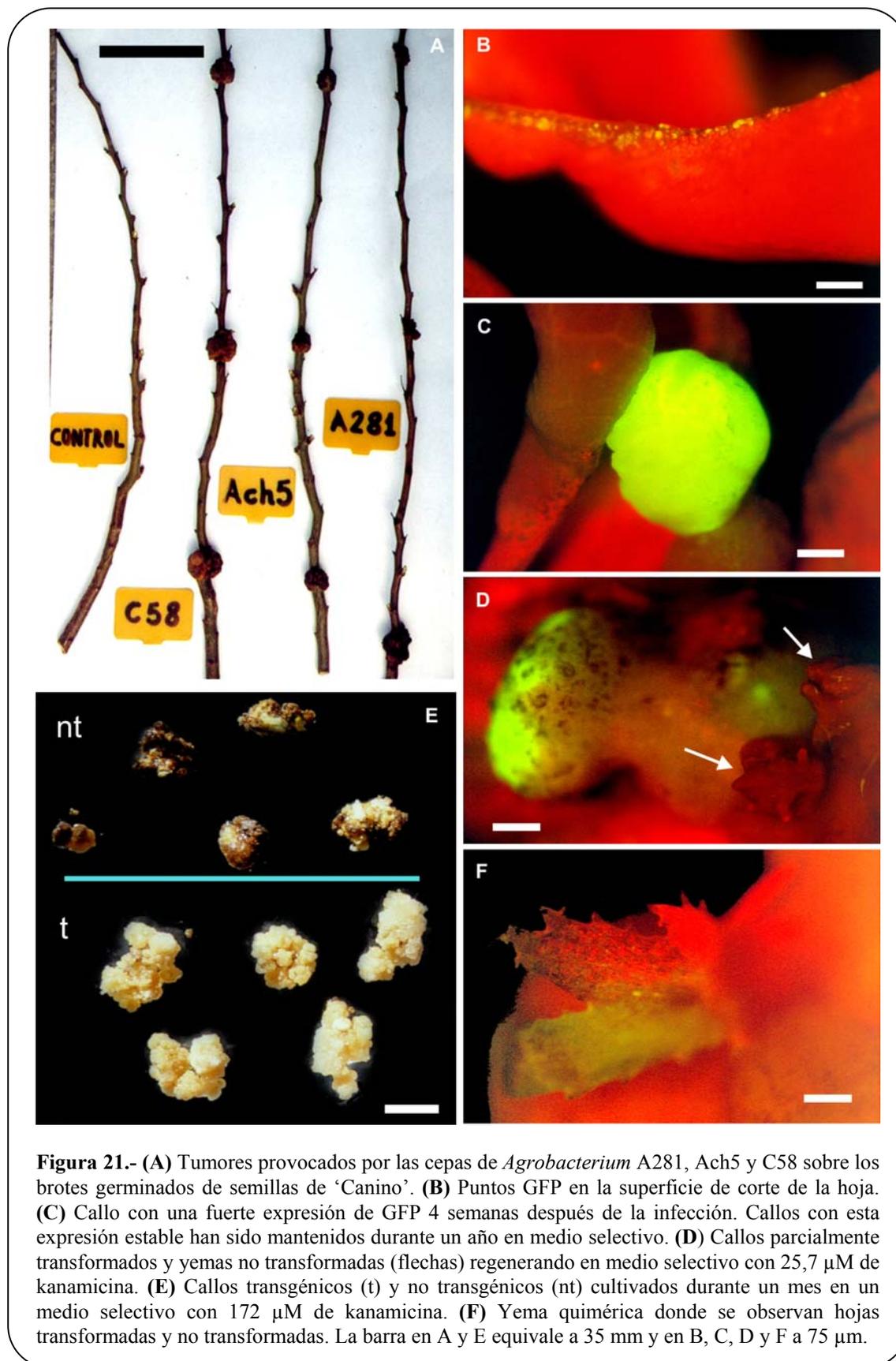
Tabla 17.- Respuesta a la infección por diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens* de brotes germinados a partir de semillas de albaricoquero de la variedad ‘Canino’^a.

Cepa	Número de tumores (número de inoculaciones) ^b		Frecuencia final de tumores (%) ± E.S.	Peso tumoral (g) ± E.S.
	2 semanas	12 semanas		
C58	38 (54)	54 (54)	100	1,4 ± 0,2
Ach5	33 (54)	52 (54)	96,3 ± 2,6	0,9 ± 0,1
A281	40 (54)	54 (54)	100	1,2 ± 0,2
Control	0 (54)	0 (54)	0	--

^a El experimento se repitió dos veces. Los datos mostrados son la media de 18 plantas, heridas en tres sitios diferentes para cada cepa de *Agrobacterium* y para el control, donde se inoculó agua estéril.

^b No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de formación de tumores ni en el peso de los mismos entre los tres sitios de inoculación (el superior, el medio y el inferior), por lo tanto cada tumor se consideró como una repetición independiente.

Las tres cepas de *Agrobacterium* fueron equivalentes en la frecuencia con la que produjeron tumores y en el peso de estos. En todos los casos los tumores fueron de color marrón y con un aspecto parecido (Figura 21A).



Las especies de *Prunus* son hospedadoras naturales de *A. tumefaciens* y esto podría explicar la alta susceptibilidad a la infección por la bacteria. Nuestros resultados concuerdan con datos previos (Cervera *et al.*, 1998b) donde el albaricoquero mostró una alta susceptibilidad a *Agrobacterium* comparado con otras especies de *Prunus* y otras hospedadoras rosáceas.

Infectividad de las cepas desarmadas

Los resultados fueron diferentes para las dos cepas desarmadas de *Agrobacterium* que se utilizaron. Aunque no se encontraron diferencias significativas en el número de explantos transformados, el número de puntos GFP por explanto fue significativamente afectado por la cepa bacteriana y EHA105 produjo mayor número de puntos que C58C1 (Figura 22).

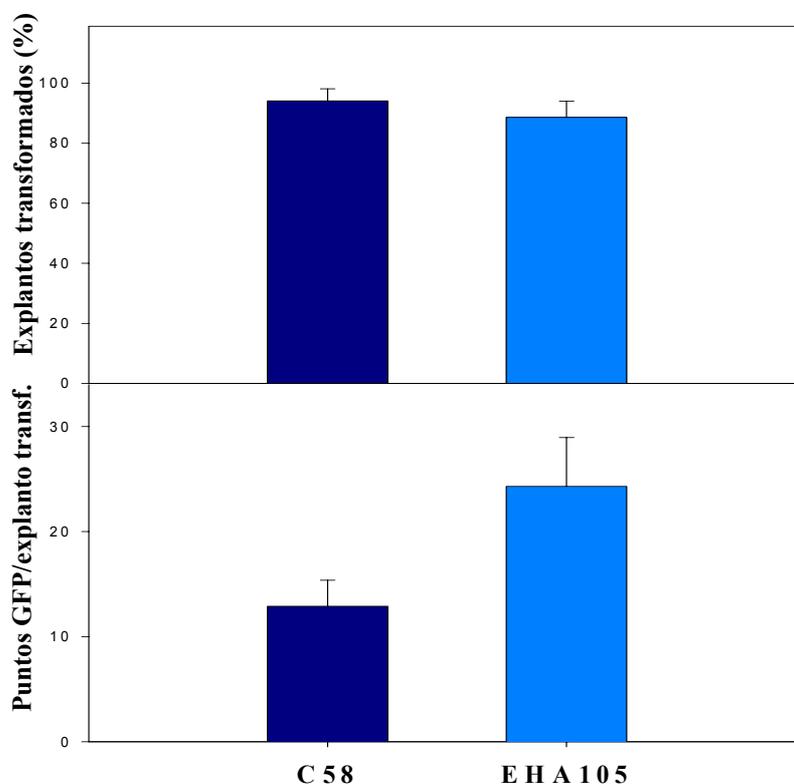


Figura 22.- Capacidad de transformación de las dos cepas desarmadas derivadas de C58 y A281, C58C1 y EHA105 respectivamente, conteniendo el plásmido binario pBin19-sgfp, estimada como el porcentaje de explantos transformados y el número medio de puntos GFP por explanto.

La cepa EHA105 (y la A281, de la que deriva) está reconocida como la más apta para la transferencia de genes a células vegetales de diferentes especies leñosas, como por ejemplo el álamo blanco (Han *et al.*, 2000) o el manzano (De Bondt *et al.*, 1994), pero su supervirulencia parece depender del hospedador y por lo tanto es impredecible (Cervera *et al.*, 1998b). Nuestros resultados sugieren que la virulencia también puede depender de interacciones entre la cepa bacteriana y el estado fisiológico de la planta, lo que podría explicar los resultados discrepantes entre los dos experimentos realizados.

Evolución de la transformación transitoria y estable

Cuando se evaluó la evolución de la expresión transitoria de la GFP, después del cocultivo de las hojas con la cepa desarmada de *Agrobacterium* EHA105 (pBin19-*sgfp*), se encontró una expresión máxima alrededor de los 7-9 días después de la infección (Figura 23), con una media de más de 200 puntos GFP por explanto. Muchos de esos puntos se observaron en los bordes de los cortes hechos en las hojas (Figura 21B) representando cada punto un evento de transformación independiente. La expresión transitoria disminuyó rápidamente, quedando estabilizada entre la tercera y cuarta semana después de la infección. En ese momento muchos de los puntos GFP eran callos o grandes zonas expresando GFP (Figura 21C).

La proteína verde fluorescente de la medusa *Aequorea victoria* es un sistema de información genético (Sheen *et al.*, 1995) y ha llegado a ser un importante marcador en plantas vivas (Ghorbel *et al.*, 1999; Elliot *et al.*, 1999; Niwa *et al.*, 1999; Maximova *et al.*, 1998). Cuando es iluminada con luz azul, la GFP produce una fluorescencia verde. Esta fluorescencia es estable, independiente de la especie y puede ser detectada no destructivamente. La fluorescencia de GFP al ser estimulada por la luz no requiere ningún cofactor, sustrato o productos adicionales de otros genes. La acumulación de GFP no parece tener un efecto tóxico en diferentes especies vegetales donde ha sido expresada con éxito (Niwa *et al.*, 1999; Ghorbel *et al.*, 1999; Elliot *et al.*, 1999; Maximova *et al.*, 1998; Molinier *et al.*, 2000).

En hojas de albaricoquero transformadas, la expresión transitoria de GFP se encontró, a menudo, asociada a las zonas donde se habían producido las heridas (Figura 21B) pero también aleatoriamente distribuida en otras partes de la hoja. La expresión estable se encontró como amplias zonas expresando GFP o callos enteros (Figura 21C, D), y también como pequeños puntos discretos en zonas de la hoja donde no se produjeron callos.

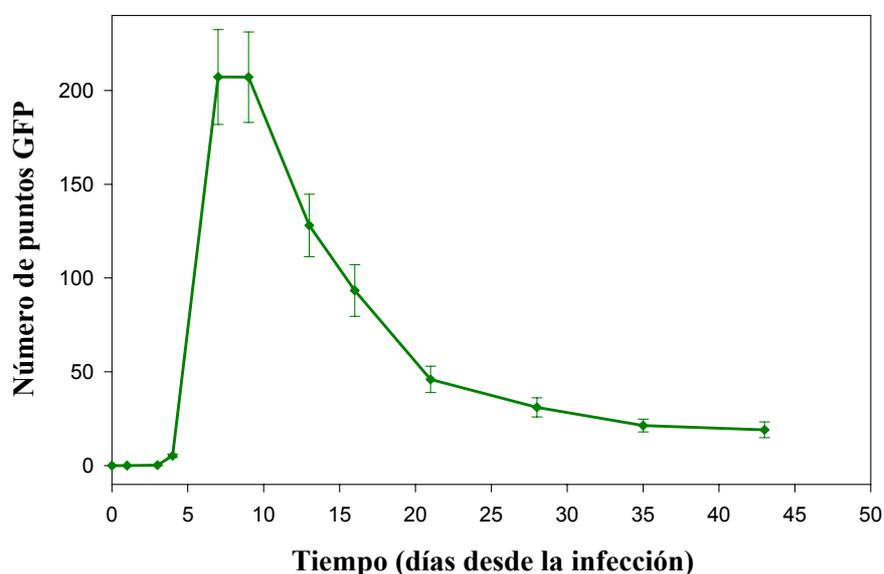


Figura 23.- Evolución de la expresión transitoria de GFP con el tiempo. Las hojas se sumergieron en una suspensión de *Agrobacterium* (10^7 cfu mL⁻¹) durante 10 minutos y se cocultivaron durante 4 días en medio de regeneración con la adición de 100 μ M de acetosiringona.

La expresión transitoria no siempre se puede correlacionar correctamente con la transformación estable. Otros autores han mostrado que mientras que la transferencia del ADN-T desde *Agrobacterium tumefaciens* hasta la célula vegetal puede ocurrir de una manera muy eficaz, como queda demostrado por una abundante transformación transitoria, la integración del ADN-T al genoma celular podría estar limitada, dando como resultado una transformación estable pobre.

Una integración inadecuada en el genoma celular implicaría que un incremento en los niveles de transformación transitoria no necesariamente se traducirá en una mejor transformación estable (Maximova *et al.*, 1998). Aunque en nuestro estudio no encontramos discrepancias en el efecto de los diferentes tratamientos sobre la expresión de GFP transitoria y estable, este marcador vital fue utilizado para controlar visualmente la evolución de su expresión en el tiempo. Por lo tanto, los resultados de los experimentos que vienen a continuación fueron evaluados basándose en la expresión estable de GFP cuatro semanas después de la infección.

EXPERIMENTOS DE TRANSFORMACIÓN

Establecimiento de un protocolo de transformación

Se compararon diferentes modos de infección y los mejores resultados, en lo que se refiere al porcentaje de explantos transformados y puntos GFP por explanto transformado, se obtuvieron cuando las hojas se sumergieron durante 10 minutos en una solución de *Agrobacterium* (Tabla 18). Los resultados fueron peores cuando las hojas fueron heridas con un bisturí infectado. Miguel y Oliveira (1999) utilizaron un bisturí infectado para transformar hojas de almendro con buenos resultados, sin embargo solamente evaluaron transformación transitoria y no lo compararon con otro método diferente. En la mayoría de los trabajos sobre transformación de especies leñosas, las hojas son infectadas por inmersión en una solución de *Agrobacterium*, aunque los tiempos de inmersión recomendados varían bastante. No obstante, existe poca información sobre el efecto de diferentes tiempos de infección. En hojas de almendro se observó que tiempos mayores de 30 minutos de duración no incrementaron la frecuencia de transformación y causaron problemas en la posterior eliminación de la bacteria (Archilletti *et al.*, 1995).

En otro experimento, las hojas fueron infectadas durante 10 minutos con suspensiones bacterianas a distintas densidades ópticas y durante diferentes periodos de cocultivo (Tabla 18). El porcentaje de explantos transformados se vio afectado significativamente tanto por el tiempo de cocultivo como por la dilución de la bacteria (aunque en el último caso la χ^2 fue 7,8 solamente, indicando diferencias muy leves), mientras que el número de puntos GFP por explanto fue afectado solamente por el tiempo de cocultivo. Cuando los explantos se transfirieron a medio selectivo inmediatamente después de la inoculación con *Agrobacterium* (sin cocultivo) no se observó transformación alguna. Los resultados mejoraron con el aumento del tiempo de cocultivo pero fue muy difícil de controlar el crecimiento de *Agrobacterium* cuando se utilizaron 6 días de cocultivo y/o diluciones de alta densidad. En la práctica, la longitud del cocultivo está limitada a un máximo de 4 días ya que

periodos mayores dieron como resultado una abundante proliferación de *A. tumefaciens* sobre las hojas de albaricoquero y, por consiguiente, pérdidas después del cocultivo debido a la infección bacteriana. De hecho, en la mayoría de los trabajos sobre transformación de plantas leñosas se utilizan periodos de cocultivo entre 2 y 4 días (De Bondt *et al.*, 1994; Ainsley *et al.*, 2002; Cervera *et al.*, 1998c).

Algunos autores han utilizado altas concentraciones en las suspensiones bacterianas para la infección de los explantos. Hasta $2,5 \times 10^9$ ufc mL⁻¹ ha permitido resultados óptimos en la transformación de hojas de manzano (De Bondt *et al.*, 1994) o hasta D.O.₆₀₀=0,2 para la transformación de diferentes especies de *Citrus* (Yu *et al.*, 2002).

Nosotros hemos observado en nuestros experimentos un leve efecto perjudicial de la transformación sobre la capacidad de regeneración de los explantos. La transformación (en ausencia de selección con kanamicina) redujo los porcentajes de regeneración en un 7%, como media de cinco experimentos independientes, comparado con los controles sin transformar (datos no mostrados). Este resultado coincide con otro trabajo (Yu *et al.*, 2002) que demostró un incremento en las frecuencias de regeneración y transformación conforme el valor de la densidad óptica del inóculo disminuyó. Este efecto podría estar relacionado con daños causados a los explantos por una cantidad excesiva de células bacterianas.

Para determinar el efecto de la fase de crecimiento en la que se encontraba el inóculo de *A. tumefaciens*, se utilizaron tres cultivos con densidades ópticas diferentes que fueron diluidas hasta D.O.₆₀₀=0,02. No se detectaron diferencias significativas, ni en los porcentajes de transformación ni en el número de hechos de transformación por explanto (Tabla 18). Nuestros resultados coinciden con los de De Bondt *et al.*, (1994) que no mostraron diferencias inducidas por la fase de crecimiento de la bacteria. En contraste, se han encontrado grandes diferencias en el número de zonas expresando *nidA* cuando fueron utilizados cultivos de *Agrobacterium* en diferentes fases de crecimiento (De Clercq *et al.*, 2002) y los mejores resultados fueron obtenidos con una fase logarítmica temprana. Sin embargo, la comparación se realizó con una suspensión bacteriana procedente de un cultivo

crecido hasta una $D.O_{.600}=2,5$, una densidad mucho mayor que la utilizada en este trabajo, y esos resultados podrían estar relacionados con una gran proporción de células muertas y compuestos tóxicos en un cultivo tan sobrecrecido.

Tabla 18.- Efecto de diferentes factores sobre el porcentaje de explantos transformados con la cepa EHA105 y el número de zonas expresando GFP por explanto transformado, medido a las 4 semanas después de la infección de hojas de albaricoquero.

Tratamiento		Zonas GFP (media \pm E.S.)	Explantos transformados (% \pm E.S.)
Modo de infección ^a :	Bisturí infectado	3,0 \pm 0,4	48,6 \pm 8,5
	Incubación:	1 min	1,4 \pm 0,2
		5 min	2,9 \pm 0,5
		10 min	9,0 \pm 1,2
Cocultivo:	cfu mL ⁻¹		
Sin cocultivo	1,5 x 10 ⁷	0	0
	4 x 10 ⁷	0	0
	1,5 x 10 ⁸	0	0
2 días	1,5 x 10 ⁷	7,0 \pm 1,1	75,7 \pm 7,1
	4 x 10 ⁷	13,5 \pm 3,3	85,3 \pm 6,1
	1,5 x 10 ⁸	9,0 \pm 1,2	71,4 \pm 7,0
4 días	1,5 x 10 ⁷	11,5 \pm 1,4	88,6 \pm 5,4
	4 x 10 ⁷	13,4 \pm 1,8	94,4 \pm 3,8
	1,5 x 10 ⁸	9,8 \pm 1,2	71,4 \pm 7,0
6 días	1,5 x 10 ⁷	13,7 \pm 2,1	91,4 \pm 4,7
	4 x 10 ⁷	12,2 \pm 1,3	97,1 \pm 2,8
	1,5 x 10 ⁸	18,1 \pm 2,8	94,4 \pm 3,8
Fase de crecimiento de <i>Agrobacterium</i> ^b :			
	Fase lag (2 x 10 ⁸)	15,7 \pm 1,9	90,0 \pm 6,7
	Fase logarítmica (4 x 10 ⁸)	21,5 \pm 2,8	97,1 \pm 2,8
	Fase estacionaria (6 x 10 ⁹)	28,8 \pm 1,1	92,8 \pm 3,1

^a El cultivo bacteriano se diluyó a $D.O_{.600} = 0,05$ y los explantos se cocultivaron durante 2 días después de la infección.

^b El cultivo bacteriano se diluyó a $D.O_{.600} = 0,02$ y los explantos se cocultivaron durante 4 días después de la infección en medio con 100 μ M de acetosiringona.

Factores que afectan la virulencia de *Agrobacterium*

Las plantas leñosas tienen tendencia a ser recalcitrantes en lo que se refiere al cultivo de tejidos y a la transformación (Schuerman y Dandekar, 1993). Para mejorar la eficiencia de la transformación mediada por *Agrobacterium* se ha trabajado en el incremento de su virulencia mediante la introducción de copias adicionales de los genes *vir* (Ghorbel *et al.*, 2001a; Tang, 2003), o bien mediante otras estrategias como las que se discuten en este apartado.

Aplicación de acetosiringona

La acetosiringona es un compuesto fenólico producido cuando son dañadas las células vegetales que induce la transcripción de los genes de virulencia de *Agrobacterium tumefaciens* (Stachel *et al.*, 1985).

El uso de acetosiringona mejoró claramente tanto el porcentaje de explantos transformados como el número de puntos GFP por explanto transformado, comparado con un control sin acetosiringona (Tabla 19). La adición de acetosiringona al medio de cocultivo mejoró, entre 3 y 7 veces, el número de puntos GFP observados y produjo un incremento de más del 20% en el número de explantos transformados. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se adicionó 100 μ M de acetosiringona durante un cocultivo de 4 días de duración.

Ha sido demostrado el papel beneficioso de la acetosiringona en la transformación genética de diferentes especies, desde *Arabidopsis* (Sheikholeslam y Weeks, 1987) hasta citrange (Cervera *et al.*, 1998c) o manzano (James *et al.*, 1993), aunque, por otro lado, la acetosiringona no mejoró la transformación en almendro (Ainsley *et al.*, 2002).

James *et al.*, (1993) demostraron que la acetosiringona es necesaria solamente durante la etapa de inducción y no durante el periodo de cocultivo, y también que es necesaria la presencia de betaina y prolina para hacerla efectiva en manzano.

Tabla 19.- Estudio del efecto de la acetosiringona (AS) sobre la eficiencia de transformación de hojas de albaricoquero por medio de la cepa EHA105 de *Agrobacterium*.

Tratamiento	AS (μM)	Tiempo de cocultivo (días)	Puntos GFP (media ± E.S.)	Explantos transformados (% ± E.S.)
Control	0	2	4,0 ± 0,7	75,7 ± 7,0
AS durante el cultivo de la bacteria	100	2	8,1 ± 1,2	73,2 ± 6,9
AS durante el cocultivo	100	2	15,3 ± 1,6	100
	100	4	23,6 ± 3,5	96,4 ± 2,5
	200	2	4,4 ± 0,6	90,0 ± 5,5
Estadístico^a				
			F	χ²
Control vs adición AS			7,1**	4,5*
100 AS vs 200AS			7,3**	1,3 n.s.
AS y 2 d vs 4 d cocultivo			4,5**	0,6 n.s.
Cocultivo (100 μM y 2 d) vs cultivo bacteriano			3,1 n.s.	5,8*

^a Valores F y χ² significativos a los niveles de probabilidad de 99,9% (***) , 99% (**) ó 95% (*). Los valores no significativos están indicados como n.s.

La adición de acetosiringona al medio LB donde se cultivó la bacteria, no mejoró los resultados respecto a la adición de la misma en el medio de cocultivo, incluso disminuyó el número de hechos de transformación por explanto transformado (Tabla 19). Cuando se estudió el efecto de su adición en un medio empobrecido donde se cultivó *Agrobacterium*, aunque no se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de transformación, el número de puntos GFP fue significativamente mayor cuando se utilizó 500 μM de acetosiringona, comparado con un control donde no se adicionó acetosiringona (Tabla 20).

Alt-Mörbe *et al.* (1989) recomendaron la adición de acetosiringona en un medio de inducción empobrecido durante, al menos, 5 horas antes de la infección. Pero, aparentemente, un medio basado en MS (James *et al.*, 1993) o el medio LB (Sheikholeslam y Weeks, 1987) pueden también ser utilizados para cultivar el *Agrobacterium* e inducir virulencia en presencia de acetosiringona. En este estudio, la incorporación de acetosiringona durante el cultivo de *Agrobacterium* en medio LB no tuvo un efecto beneficioso. Sin embargo, cuando la virulencia de la bacteria fue

inducida en un medio empobrecido con 500 μM de acetosiringona produjo significativamente más puntos GFP que el control.

Recientemente, se ha publicado un trabajo donde se describe que un pretratamiento con poliaminas anterior al de acetosiringona provocó una inducción en la expresión de los genes *vir* de *Agrobacterium* (Kumar y Rajam, 2005). Este efecto de las poliaminas en el cultivo de la bacteria no ha sido ensayado en esta tesis, pero podría ser un factor más a tener en cuenta para la optimización de los resultados aquí mostrados.

Tabla 20.- Efecto de la adición de diferentes concentraciones de acetosiringona (AS), en un medio empobrecido durante el cultivo de la bacteria, en la transformación de hojas de albaricoquero mediante la cepa de *Agrobacterium* EHA105.

Concentración de As ^a (μM)	Puntos GFP/explanto transformado (media \pm E.S.)	Explantos transformados (% \pm E.S)
0	12,1 \pm 2,3	87,5 \pm 4,4
100	13,0 \pm 3,5	62,9 \pm 8,2
200	11,7 \pm 1,9	92,9 \pm 4,9
500	23,4 \pm 3,7	72,6 \pm 5,3
1.000	19,8 \pm 3,3	77,4 \pm 4,6
1.500	3,8 \pm 1,0	80,9 \pm 8,6
2.000	6,1 \pm 1,5	80,9 \pm 8,6

^a En todos los tratamientos las hojas estuvieron en cocultivo con la bacteria durante 4 días en presencia de 100 μM de AS.

Influencia del pH del medio de cocultivo

Nuestros resultados no muestran ningún efecto, estadísticamente significativo, del pH en combinación con 100 μM de acetosiringona durante el cocultivo sobre la transformación de hojas de albaricoquero de la variedad ‘Helena’ (Tabla 21). Además, la mayor acidez del medio provocó una solidificación deficiente, más apreciable a pH 5,0, produciendo medios semilíquidos y la consiguiente hiperhidratación del material vegetal.

Algunos autores han demostrado que un pH menor de 5,7 incrementa la virulencia de *Agrobacterium* (James *et al.*, 1993; Alt-Mörbe *et al.*, 1989; Vernade *et al.*, 1988), pero únicamente durante el periodo de inducción de virulencia de la bacteria previo a la transformación. Experimentos realizados por Vernade *et al.* (1988) demostraron que un incremento del pH en el medio de inducción a las 10 ó 20 horas desde el inicio de la inducción, bloquea la expresión de los genes de virulencia *virG* o *virE*, respectivamente.

Tabla 21.- Efecto de la acidez del medio durante el cocultivo con la cepa de *Agrobacterium* EHA105 en la transformación de hojas de ‘Helena’.

pH	Nº de hechos de transformación/ /explantos transformados (Media ± E.S.) ^a	Explantos transformados (% ± E.S.)
5,0	17,7 ± 1,4	94,1 ± 5,7
5,2	14,3 ± 1,4	87,1 ± 6,4
5,5	11,7 ± 1,1	80,9 ± 4,6
5,7 (control)	17,7 ± 1,1	89,2 ± 1,2

^a Total de zonas, callos o puntos discretos expresando *gfp* por explanto transformado. El total de explantos utilizados en este estudio fue 837.

En semillas de *Antirrhinum majus* se observó que la transformación era dependiente del pH (Holford *et al.*, 1992). El número de tumores producidos por explanto aumentó conforme disminuyó el pH en el medio de cocultivo en presencia de acetosiringona. Por otro lado, la transformación mejoró conforme aumentó el pH en presencia de siringaldehído, análogo formil de acetosiringona. La magnitud del efecto de ambos factores, pH y compuesto fenólico, varió dependiendo del genotipo vegetal. Este trabajo sugiere que la transformación máxima, con un genotipo determinado, depende de la correcta elección del compuesto inductor y del uso de un pH apropiado durante el periodo de cocultivo.

Efecto de otros tratamientos

La infiltración mediante vacío, la utilización de pinzas para producir pequeñas heridas en las hojas, el tratamiento de las hojas con celulasa durante 2 ó 4 horas antes de la infección y los diferentes tratamientos probados con el sonicador no incrementaron significativamente el porcentaje de explantos transformados comparado con un control, aunque la infiltración al vacío y ambos tratamientos con celulasa produjeron un aumento significativo en el número de puntos GFP respecto a los controles (datos no mostrados). Sin embargo, las hojas fueron afectadas fuertemente por todos estos tratamientos y, como resultado, muchos explantos desarrollaron severas necrosis y murieron.

La producción de heridas en hojas mediante aplastamiento con pinzas especiales incrementó significativamente la transformación en manzano (Norelli *et al.*, 1996) y la regeneración en peral (Zhu y Welander, 2000).

En nuestro estudio, aunque alguno de los tratamientos aumentó significativamente el número de puntos GFP por explanto transformado, los diferentes tratamientos disminuyeron drásticamente la regeneración adventicia. Por esta razón todos los tratamientos fueron desestimados y no fueron incorporados al protocolo.

Factores que afectan el estado fisiológico de la planta

Los esfuerzos para mejorar la eficiencia de la transformación mediada por *Agrobacterium* se han enfocado en el incremento de la virulencia de la bacteria, discutido en el apartado anterior, o en la modificación de las condiciones del material vegetal diana para hacerlas óptimas para la infección bacteriana.

Retraso de la transformación

Cuando las hojas fueron colocadas en el medio de regeneración y se retrasó la transformación en 3, 7 ó 14 días, las tasas de regeneración no variaron significativamente respecto a un control, donde se siguió el protocolo normal de

regeneración, pero los eventos de transformación disminuyeron (datos no mostrados).

Nuestros resultados no parecen coincidir con los observados en otras especies donde periodos de precultivo antes de la infección con *Agrobacterium tumefaciens* mejoraron la regeneración de brotes transformados (McHughen *et al.*, 1989; Villar *et al.*, 1999). Esto se podría explicar por el mecanismo de transferencia del ADN-T. Las células durante el precultivo están experimentando una serie de cambios fisiológicos de desdiferenciación y posterior diferenciación hasta llegar a desarrollar un meristemo y generar una nueva yema. Podría ser que al inicio de este proceso la transferencia e integración del ADN-T sea más efectiva que posteriormente cuando las células ya han adoptado un determinado patrón de desarrollo.

Además, el precultivo de las hojas de albaricoquero dificultó la eliminación del exceso de *Agrobacterium* después de la infección, ya que las hojas presentaban una forma irregular y tenían callos en su superficie (sobre todo después de 14 días de precultivo), dificultando el acceso del antibiótico y provocando el sobrecrecimiento de la bacteria en muchas placas después del cocultivo.

Influencia de pulsos de auxinas y efecto sinérgico de las poliaminas y los inhibidores del etileno

Se estudió el efecto sobre los porcentajes de transformación y el número de eventos de transformación por explanto de todos los tratamientos que incrementaron la regeneración (significativamente o no). Los resultados aparecen mostrados en la Tabla 22. El porcentaje de explantos transformados fue de más del 75% en todos los casos y no fue significativamente afectado por el tratamiento. El número total de eventos de transformación y el número de callos o zonas expresando GFP sí fueron significativamente afectados por el tratamiento ($P < 0,01$ para ambas variables independientes). De acuerdo con la prueba de Dunnett (que compara cada tratamiento con el control), solamente los pulsos de auxina con 9,05 μM de 2,4-D y la combinación de espermidina 2 mM y STS 60 μM produjeron un incremento significativo en el número de hechos de transformación y callos GFP

positivos. Aunque la razón nos es desconocida, los medios con espermidina resultaron frecuentemente contaminados. Además, en experimentos posteriores no conseguimos regenerar plantas transformadas cuando se añadió espermidina. Todo esto nos condujo a desechar su utilización.

Agrobacterium transforma preferentemente células metabólicamente activas y/o en división activa (Dandekar, 1995). Algunos componentes, que promueven la división celular, como son auxinas y poliaminas, han mejorado la transformación mediante *A. Tumefaciens*. Pretratamientos con altas dosis de auxinas durante el cocultivo han incrementado la transformación en varias especies (McHughen *et al.*, 1989; Villar *et al.*, 1999) (Cervera *et al.*, 1998c; Yu *et al.*, 2002).

La aplicación exógena de reguladores del crecimiento vegetal, principalmente auxinas, también potenciaron la formación de raíces adventicias y la formación de tumores (ver revisión de Dandekar, 1995). El papel de las poliaminas en la división, crecimiento y diferenciación celular ha sido ampliamente descrito (Chi *et al.*, 1994) y en hojas de albaricoquero, su adición al medio de regeneración produjo gran cantidad de callos color verde oscuro sugiriendo mayor división celular que en los

Tabla 22.- Efecto de los pulsos con auxinas durante el cocultivo o la combinación de espermidina y los inhibidores del etileno en la transformación de albaricoquero.

Tratamiento	Concentración adicional de auxina (µM)	Inhibidor del etileno y concentración (µM)	Explantos transformados (% ± E.S.)	Total GFP+/explanto (Media ± E.S.)	Zonas ^a GFP+/explanto (Media ± E.S.)
Ninguno (control)	--	STS (60)	85,0 ± 4,0	10,3 ± 1,1	6,7 ± 0,8
NAA	5,37	STS (60)	75,6 ± 6,7	10,3 ± 1,3	7,6 ± 1,1
	10,74	STS (60)	80,0 ± 8,9	14,3 ± 3,9	10,1 ± 3,1
2,4-D	4,52	STS (60)	89,2 ± 5,1	12,8 ± 2,3	8,0 ± 1,3
	9,05	STS (60)	94,6 ± 3,7	15,1 ± 2,0	9,5 ± 1,3
Espermidina (2mM)	--	STS (60)	100	15,1 ± 2,1	13,0 ± 2,0
	--	AVG (0,5)	80 ± 6,8	7,9 ± 1,6	5,7 ± 1,2

^a Las zonas GFP+ son grandes áreas o callos expresando GFP.

controles sin poliaminas.

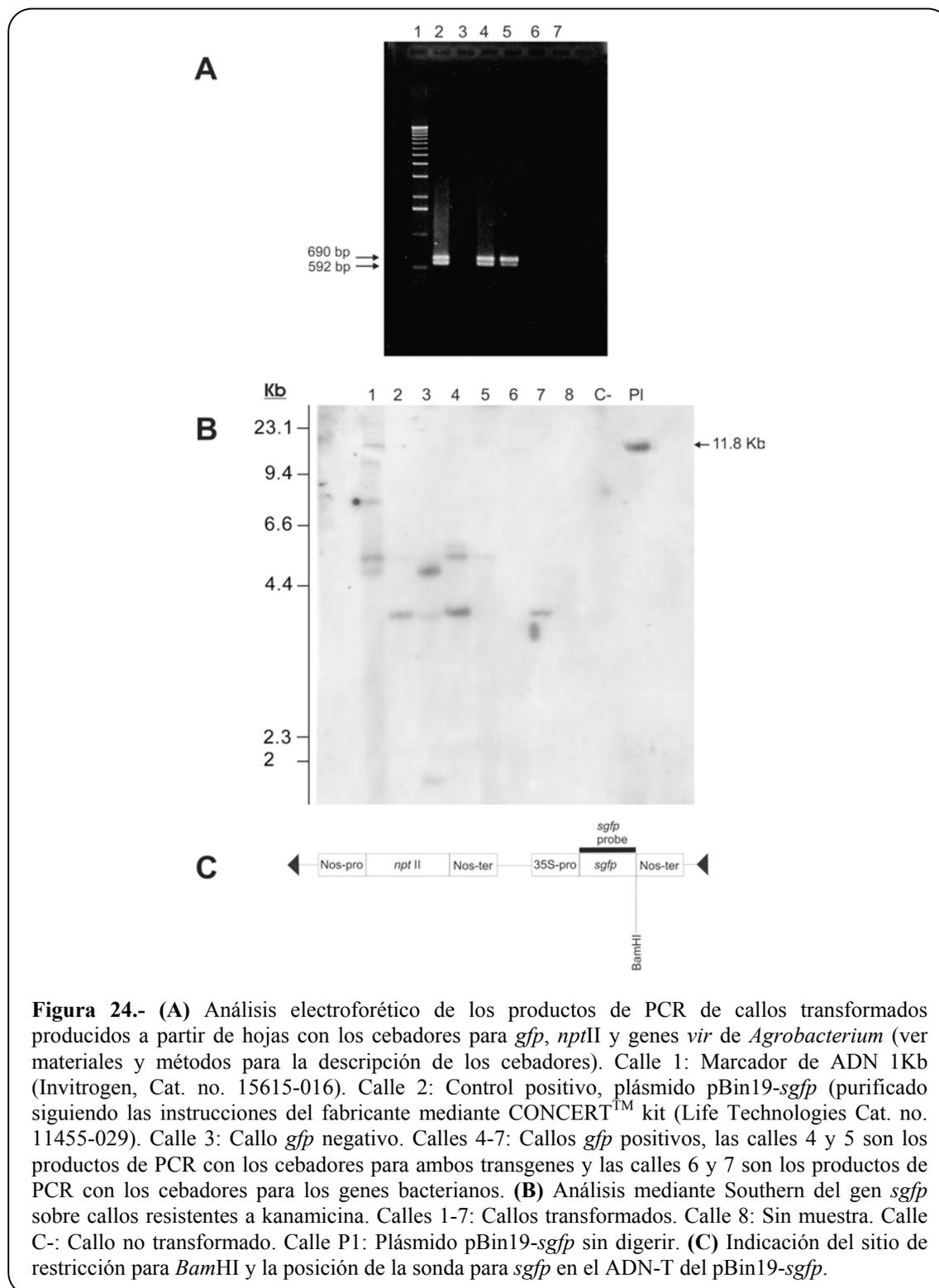
Según nuestros resultados, la mayoría de los tratamientos probados incrementaron el número total de hechos de transformación y la producción de callos transgénicos, o no fueron significativamente peores que el control. Ya que la regeneración en hojas de albaricoquero ocurre mayoritariamente a partir de los callos desarrollados, es importante la obtención de muchos callos expresando GFP y dado que las eficiencias de transformación (número de brotes transformados por el total de explantos infectados) en plantas leñosas son generalmente muy bajas, las condiciones que permitan una optimización de la transferencia del ADN-T y del número total de células transformadas, incrementaría las probabilidades de obtención de brotes transformados.

Evaluación molecular de los callos transgénicos

Callos que expresaban GFP fueron aislados y utilizados para la extracción de ADN o cultivados en un medio apropiado, descrito en materiales y métodos, con 172 μ M de kanamicina (Figura 21E). Se ha demostrado la transferencia de los transgenes a las células vegetales y la proliferación de estas células transgénicas hasta producir callos expresando GFP y resistentes a altos niveles de kanamicina (y algunas yemas quiméricas). Los transgenes han sido detectados en estos callos mediante PCR utilizando los cebadores apropiados, descartando una posible contaminación de *Agrobacterium* (Figura 24A). Algunos de estos callos transgénicos, cultivados durante más de un año en medio con 172 μ M de kanamicina, se han utilizado para determinar la integración estable de los transgenes por hibridación Southern (Figura 24B).

Por primera vez se muestra en este trabajo la transformación de explantos de material adulto de una variedad de albaricoquero. Debido a que se ha utilizado un marcador vital (GFP) para el seguimiento de los eventos de transformación, en todos los experimentos descritos hasta el momento, se observó atentamente la posible producción de brotes transformados. Solamente se obtuvieron unas pocas yemas quiméricas (Figura 21F). Sin embargo, la eficacia del proceso, en términos de

expresión estable del gen marcador, es comparable a protocolos donde se producen rutinariamente plantas transformadas.



Las eficiencias de transformación esperadas (brotes transformados / número total de explantos infectados) en plantas leñosas son, generalmente, muy bajas y esto podría explicar la ausencia de brotes transformados en nuestro caso. En manzano, la eficiencia de transformación respecto al número inicial de eventos de transformación observados, después de la infección con *Agrobacterium*, disminuyó unas 10.000 veces (Maximova *et al.*, 1998). Por tanto, será necesario transformar un gran número de explantos para evaluar correctamente la eficiencia de transformación en albaricoquero.

Descripción del protocolo de transformación

Después del análisis y optimización de los factores que afectan a la transformación mediada por *Agrobacterium* de hojas de albaricoquero de la variedad 'Helena', se estableció el siguiente protocolo (Figura 25)

1.- Material vegetal (estado fisiológico)

Los explantos (hojas) utilizados provienen de brotes de tres semanas de edad mantenidos en medio A (medio de proliferación de la variedad 'Helena' descrito en materiales y métodos).

2.- Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento de la misma

La cepa seleccionada para la transformación fue la EHA105. La bacteria se crece durante una noche en un agitador orbital, a 27°C y 0,1g, en medio LB líquido, con los antibióticos correspondientes, hasta que alcanza la fase estacionaria. Después se precipita a 1.000g y se diluye a una D.O.₆₀₀=0,2 en medio SIM (Alt-Mörbe *et al.*, 1989) adicionando los antibióticos correspondientes y 500 µM de acetosiringona. En este medio se incuba la bacteria durante 24 horas a 25°C y 0,1g. Posteriormente se precipita nuevamente y se resuspende en medio líquido de regeneración a la densidad óptica utilizada para la infección.

3.- Condiciones de infección

Las hojas son infectadas mediante inmersión en una suspensión bacteriana de D.O.₆₀₀=0,02, durante 10 minutos en agitación (0,1g)

4.- Condiciones de cocultivo

El medio de cocultivo consiste en el medio de regeneración con la adición de 100 µM de acetosiringona y con una concentración adicional de auxina (9,04 µM de 2,4-D). La duración es de 4 días en oscuridad.

5.- Condiciones después del cocultivo

Los explantos son transferidos a medio de regeneración al que se adiciona 60 µM de STS, además de 0,63 mM de cefotaxima y 0,13 mM de vancomicina, para controlar el crecimiento de *Agrobacterium* y 25,7 µM de kanamicina, como antibiótico de selección. Las hojas se mantienen en oscuridad hasta completar un tiempo de dos semanas (contando con el periodo de cocultivo) y posteriormente son incubadas a la luz siguiendo las condiciones normales de regeneración, descritas en el capítulo anterior.

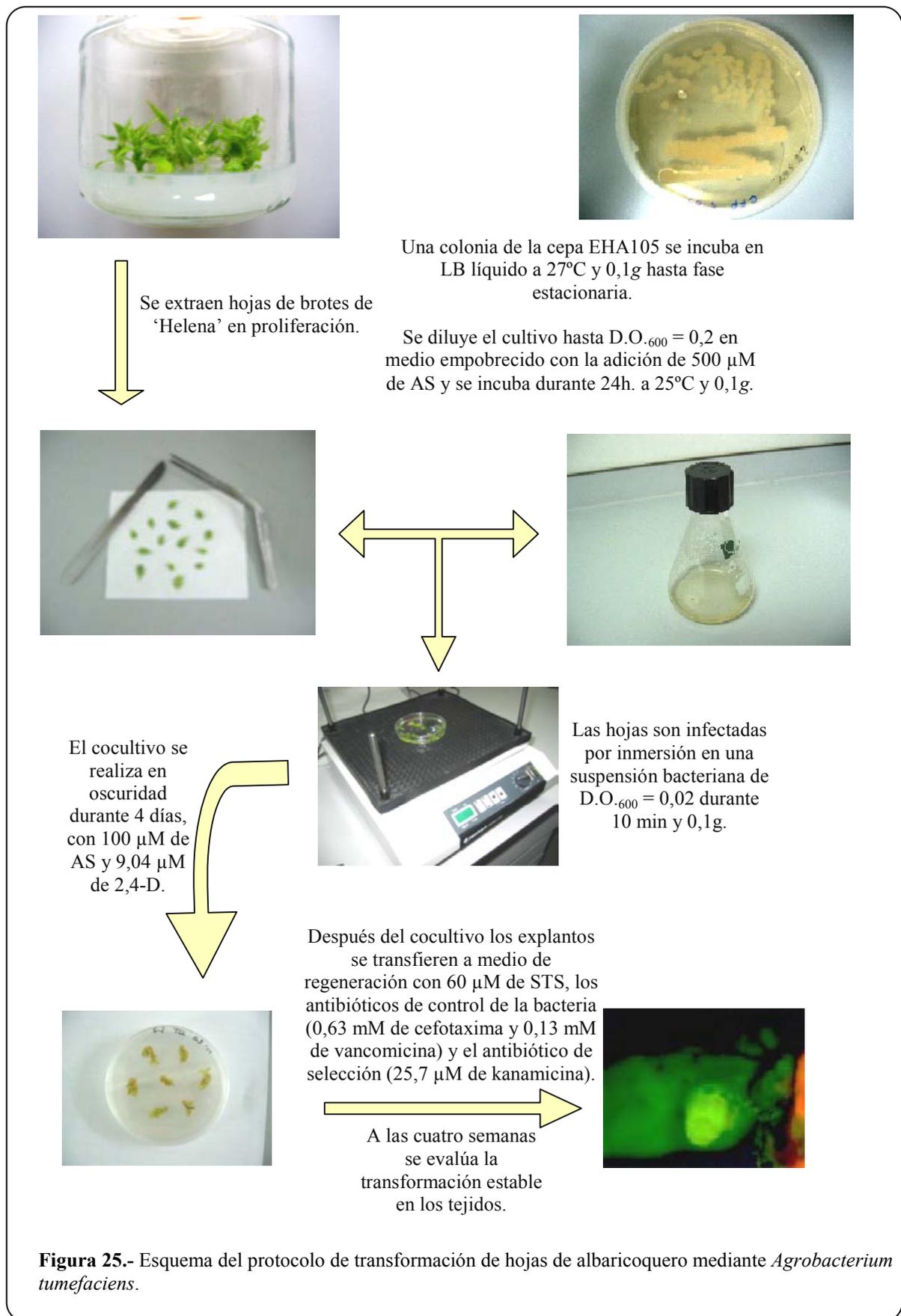


Figura 25.- Esquema del protocolo de transformación de hojas de albaricoquero mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

SELECCIÓN DE PLANTAS TRANSFORMADAS

Selección con kanamicina

La selección con una concentración de kanamicina por encima de la inhibitoria en la regeneración (40 μM) aplicada inmediatamente después del cocultivo disminuyó drásticamente la regeneración e impidió la aparición de brotes transformados (Tabla 23). Una concentración menor, pero también inhibitoria (25,7 μM), aplicada después del cocultivo o retrasando su aplicación en 5, 7 ó 10 días tampoco fueron eficientes. Solamente se obtuvo un brote transgénico cuando el antibiótico se aplicó inmediatamente después del cocultivo de 1.330 explantos infectados (eficiencia de transformación de 0,07%), y se obtuvieron dos quimeras de 700 explantos cuando no se aplicó selección. El número de escapes en todos estos experimentos aumentó conforme disminuyó la presión de selección (Tabla 23).

Estudiando el efecto de los antibióticos aminoglicósidos en la regeneración detectamos que concentraciones bajas de kanamicina (8,6 μM) mejoraron la regeneración adventicia en hojas de albaricoquero e indujeron adelanto en la aparición de las yemas (ver resultados “Antibióticos aminoglicósidos para seleccionar plántulas transformadas”). Esto podría afectar la eficacia de este antibiótico para seleccionar plántulas transformadas y, por lo tanto, se llevó a cabo una evaluación del efecto de diferentes antibióticos aminoglicósidos en la selección de células transformadas con el gen *nptII*.

El elevado número de brotes GFP negativos obtenidos podrían deberse a una pérdida de expresión del transgén (Horsch *et al.*, 1985), o a una selección poco eficiente cuando hay células transformadas cerca, de hecho se observó que ocasionalmente los brotes GFP negativos se originaron cercanos a callos transgénicos, probablemente siendo protegidos por este tejido transformado (Domínguez *et al.*, 2004) (Figura 21D). El análisis de seis de estas yemas mediante PCR y Southern blot demostró que ninguna contenía los transgenes (datos no mostrados).

Tabla 23.- Estrategia de selección con kanamicina. Efecto del retraso en la aplicación de la presión de selección sobre la aparición de escapes y brotes transformados.

Selección: Días después del cocultivo	Km [μ M]	N° explantos	Explantos transformados (%)	Regeneración (%)	Brotes (<i>gfp</i> +)
0	40,0	1.050	81,7	2,0	0
0	25,7	1.330	91,7	11,1	1
5	25,7	483	88,8	33,8	0
7	25,7	255	87,5	5,1 ^a	0
10	25,7	573	97,3	31,8	0
Sin selección	0	700	89,2	47,3	2 quimeras

^a En este experimento la regeneración fue anormalmente baja como pudimos comprobar con un control sin transformar en el que se obtuvo tan solo un 3,7% de regeneración.

Evaluación del efecto de diferentes antibióticos aminoglicósidos sobre las células transformadas

Cuando las hojas de albaricoquero fueron transformadas con *Agrobacterium* y la selección de las células transformadas se llevó a cabo con kanamicina (a 25,7 ó 40 μ M) y los diferentes antibióticos aminoglicósidos, a la concentración inhibitoria determinada para los tejidos no transformados, se encontraron diferencias significativas ($P < 0,001$) en los porcentajes de explantos transformados en cada una de los tratamientos (Tabla 24). En presencia de cualquiera de los antibióticos, con la excepción de geneticina[®], el número de explantos transformados fue mayor que en el control sin selección con antibióticos ($P < 0,01$). Paromomicina y kanamicina permitieron una mayor supervivencia de las células transformadas y con estos antibióticos se observó el mayor número de puntos GFP. Además, únicamente con kanamicina 25,7 μ M y paromomicina se encontraron un número de zonas o callos GFP positivos significativamente mayor, sugiriendo que estos antibióticos permiten

una mejor proliferación de las células transformadas a las concentraciones ensayadas.

Los pesos frescos de las hojas transformadas, tomados 7 semanas después del inicio de los experimentos, fueron significativamente afectados por la selección con antibióticos ($P < 0,001$) y fueron mayores en el control sin selección que cuando fue aplicada selección con cualquiera de los antibióticos probados. Paromomicina y geneticina[®] permitieron un mayor incremento del peso fresco que los otros dos antibióticos (Tabla 24). La geneticina[®] fue altamente letal, matando a las células transformadas y no permitiendo el crecimiento de los tejidos transformados, los callos que aparecieron a la concentración inhibitoria de 1,5 μM estaban formados por células no transformadas.

Tabla 24.- Efecto de los antibióticos aminoglicósidos, a concentraciones inhibitorias de la regeneración, sobre la transformación de hojas de albaricoquero.

Antibiótico probado	[μM]	Explantos transformados (% \pm E.S.)	Total de hechos GFP/explanto	Zonas GFP+/explanto (callos o áreas grandes)	Peso fresco de las hojas transformadas (mg)
Ninguno (control)	--	50,0 \pm 9,4	2,4 c	0,4 c	329 a
Kanamicina	25,7	85,0 \pm 5,6	8,4 a	5,8 a	124 c
	40,0	78,6 \pm 7,7	5,9 ab	2,8 ab	98 c
Estreptomocina	40,0	71,4 \pm 8,5	3,9 bc	1,0 bc	128 c
Paromomicina	40,0	71,4 \pm 8,5	8,1 a	6,1 a	199 b
Geneticina	1,5	35,7 \pm 9,1	1,1 c	0,3 c	203 b

Las medias seguidas por la misma letra, dentro de una misma columna, no son significativamente diferentes conforme a la prueba LSD a un nivel de significación de 0,05. Los pesos frescos fueron tomados 7 semanas después del inicio de los experimentos.

Kanamicina y paromomicina parecen conferir mayor ventaja a las células transformadas que los otros antibióticos probados. Sin embargo, la kanamicina a una concentración de 25,7 μM produce una selección ineficiente y la aparición de gran cantidad de escapes después del cocultivo de hojas de albaricoquero con *Agrobacterium* (ver apartado anterior, “Selección con kanamicina”) y, a las dos concentraciones probadas, permitió un crecimiento significativamente menor de los

tejidos transformados que la paromomicina. En albaricoquero la mayoría de la regeneración se da a partir de callos (Pérez-Tornero *et al.*, 2000) por lo tanto, un aumento en el número de callos transformados incrementaría la probabilidad de la aparición de un brote transformado.

Por tanto, la paromomicina a una concentración de 40 μM podría ser más adecuada para seleccionar brotes adventicios transformados. También otros autores describen a la paromomicina como mejor agente selectivo en comparación con la kanamicina, permitiendo una mejor selección de las células transformadas e induciendo el desarrollo de plantas transgénicas (Wang *et al.*, 2005; Mauro *et al.*, 1995).

Estrategias de selección con paromomicina

Se diseñaron diferentes estrategias basadas en la selección con paromomicina tal y como se muestra en la Tabla 11 (“Materiales y Métodos”).

De manera similar a los resultados obtenidos con kanamicina, cuando se aplicó una concentración de paromomicina inhibitoria de la regeneración o mayor (40 y 50 μM , respectivamente) inmediatamente después del cocultivo, la regeneración se redujo drásticamente y no se obtuvo ninguna yema transformada. La reducción de la presión selectiva provocó claramente un incremento en las tasas de regeneración y un número total mayor de yemas regeneradas por explanto infectado (Tabla 25). Cuando se retrasó la aplicación del antibiótico en 10 días o se redujo la concentración inicial a 20 ó 10 μM antes de aplicar la concentración inhibitoria, se consiguió la regeneración de algunas yemas expresando la proteína GFP. El número de posibles yemas transformadas por explanto aumentó conforme disminuyó la presión selectiva, aunque el número de escapes también fue mucho mayor en esas estrategias de selección.

Tabla 25.- Estrategias de selección con paromomicina. Efecto de las diferentes concentraciones, modos y momento de la aplicación del antibiótico en la regeneración de brotes transformados.

Estrategia de selección ^a	Nº de explantos infectados	Explantos transformados (%)	Regeneración (%)	Nº de yemas	Nº de yemas GFP+
A	70	78,6	8,6	8	0
B	1.400	69,1	6,8	106	0
C	420	79,5	9,0	49	16
D	490	65,9	13,9	101	17
E	994	75,7	35,0	497	56
F	518	51,2	45,9	406	30

^a Estrategias descritas en la Tabla 11.

Las cuatro estrategias que produjeron yemas transformadas presentaron eficiencias de transformación similares y las diferencias entre ellas no fueron significativas. Sin embargo, las eficiencias de selección sí fueron significativamente diferentes ($P < 0,001$). Por lo tanto, una selección intermedia, como la utilizada en la estrategia C, sería óptima, con una eficiencia de transformación cerca del 4% y una eficiencia de selección por encima del 32% (Figura 26).

Aunque la kanamicina es el antibiótico más ampliamente utilizado para la selección de plántulas transformadas con el gen *npII*, la paromomicina se ha utilizado con éxito y ha sido más efectiva que la kanamicina como agente selectivo en algunos casos. En células transformadas de patrones de vid tuvo un efecto más rápido sobre la muerte celular permitiendo una mejor selección (Mauro *et al.*, 1995). También fue más efectiva en la inducción del desarrollo de embriones somáticos transformados en vid durante la selección (Wang *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos previamente cuando se estudió el efecto de los diferentes antibióticos aminoglicósidos sobre el desarrollo y proliferación de las células transformadas, donde la paromomicina parecía más adecuada como agente selectivo, quedaron confirmados con estos resultados, ya que estrategias de selección con kanamicina similares a las utilizadas con paromomicina fueron casi incapaces de producir yemas

transformadas, mientras que la paromomicina permitió la regeneración de yemas transgénicas con eficiencias relativamente altas.

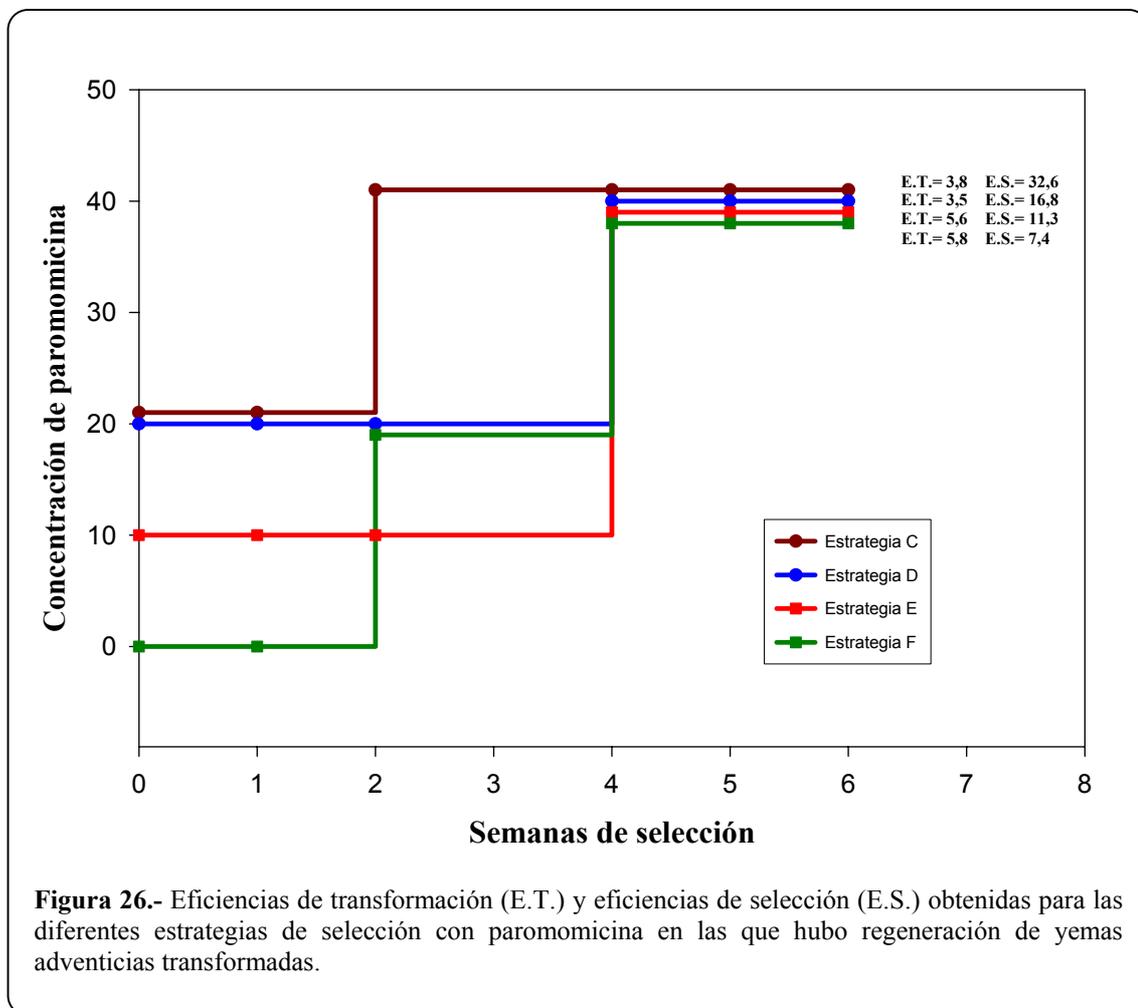


Figura 26.- Eficiencias de transformación (E.T.) y eficiencias de selección (E.S.) obtenidas para las diferentes estrategias de selección con paromomicina en las que hubo regeneración de yemas adventicias transformadas.

Según nuestros resultados parece que es necesario un retraso en la aplicación de la selección después del cocultivo, o bien, una reducción en la concentración del antibiótico hasta un mínimo, probablemente permitiendo así el inicio de la organogénesis en las células transformadas. Los primeros 14 días, incluyendo el cocultivo, constituyen el periodo de inducción en oscuridad necesario para obtener regeneración adventicia en hojas de albaricoquero (Pérez-Tornero *et al.*, 2000). Este periodo clave probablemente permite la desdiferenciación de las células foliares y la

diferenciación de esas células de nuevo en meristemas, lo que podría explicar la importancia del momento en la aplicación del agente selectivo. Un incremento en la presión selectiva una vez transcurrido este periodo de tiempo evitaría la regeneración de un número demasiado elevado de yemas no transformadas.

Estos resultados concuerdan con los observados por Gonzalez-Padilla *et al.* (2003) en ciruelo donde una selección temprana disminuyó el número de escapes y una selección tardía, aunque disminuyó la eficiencia de selección, aumentó la eficiencia de transformación.

Para la obtención de plantas transformadas de ciruelo a partir de discos de hipocotilos se retrasó la aplicación de la selección de 6 a 14 días (Scorza *et al.*, 1994; Scorza *et al.*, 1995b), y fue necesaria una selección progresiva con antibióticos para obtener plantas transformadas de almendro (Miguel y Oliveira, 1999) y vid (Mauro *et al.*, 1995; Motioike *et al.*, 2002). También una selección progresiva con fosfotricina permitió la regeneración de manzanos transformados (Szankowski *et al.*, 2003). Los autores consideraron que la aplicación inmediata del agente selectivo al inicio de la regeneración podría conducir a una muerte celular masiva que probablemente afectaría la viabilidad de las células transformadas. Una concentración inicial baja del agente selectivo podría permitir que las células alcanzaran una masa crítica, que se supone necesaria para la organización de *novi* de meristemas. Inducir necrosis en los tejidos no transformados podría inhibir la regeneración, incluso en las células transformadas. Para otros autores la aplicación inicial de una concentración baja del agente selectivo solamente permitiría el desarrollo de las células transformadas, inhibiendo la división de las no transformadas y, en sucesivos incrementos de la concentración del antibiótico, se eliminarían las células no transformadas y solamente permanecerían las estructuras transgénicas (Motioike *et al.*, 2002).

Las eficiencias de transformación mostradas aquí están basadas en el número total de yemas que se detectaron expresando GFP recuperadas para cada una de las estrategias. Sin embargo, la supervivencia de estas yemas fue muy baja incluso cuando no se aplicó selección, del 15,4 al 50% dependiendo de diversos factores que serán discutidos más adelante en esta tesis.

Basándose en la expresión del gen marcador *gfp*, las eficiencias de transformación y selección obtenidas son las mayores descritas hasta el momento en el género *Prunus* (ver “Introducción”). Sin embargo, basando las eficiencias en los brotes supervivientes, confirmados por PCR, estas están dentro de la media de los resultados publicados para la transformación de material adulto en otras especies del género *Prunus*. Los autores de estos trabajos utilizaron otros genes marcadores para confirmar la transformación, por ejemplo el *gus*. De esta manera no pudieron detectar si existía una baja supervivencia de las yemas transformadas y, probablemente, sus eficiencias podrían haber sido mayores optimizando el protocolo de recuperación de las yemas transformadas.

Comparación con la misma construcción utilizando *gus*

Las yemas recuperadas, que expresaban GFP, presentaron una tasa de supervivencia muy baja (Tabla 26). La supervivencia de las yemas que expresaban fuertemente la GFP pareció ser menor incluso que la supervivencia de yemas que expresaban la GFP levemente (16,1% *vs* 20,8% como media de diferentes experimentos), mientras que la supervivencia de yemas no transformadas recuperadas en medio sin selección fue de 97,3%. Estos resultados podrían indicar cierto grado de toxicidad de la proteína GFP en albaricoquero. En la mayoría de los trabajos de transformación en los que se utiliza *gfp* consideran que la acumulación de la proteína parece no tener ningún efecto tóxico para la planta (Niwa *et al.*, 1999; Ghorbel *et al.*, 1999; Molinier *et al.*, 2000; Elliot *et al.*, 1999; Maximova *et al.*, 1998). No obstante, se ha sugerido que altos niveles de expresión de la proteína podrían ser tóxicos para el crecimiento y desarrollo de la planta. Por ejemplo, resultó difícil regenerar de manera eficiente plantas transgénicas a partir de células altamente fluorescentes de *Arabidopsis* (Haseloff *et al.*, 1997), y fue necesario dirigir la GFP al retículo endoplasmático para poder regenerar eficazmente a partir de estas células. Esto coincide con el hecho de que no hemos detectado ningún efecto tóxico en albaricoquero cuando la proteína contiene una secuencia específica que la conduce al interior del núcleo celular (datos no mostrados).

También ha sido publicada la toxicidad de la GFP en células animales donde se demostró que la GFP indujo apoptosis en las células que expresaban el marcador, aunque se desconoce todavía como la GFP disparó el proceso de muerte celular (Liu *et al.*, 1999).

Tabla 26.- Supervivencia de las yemas transformadas con los genes *sgfp* o *gus*.

Gen marcador	Explantos infectados	Nº de yemas GFP+	Brotos supervivientes (%)	Eficiencias de transformación ^a (media ± E.S.)
<i>gfp</i>	665	59	11 (18,6)	1,65 ± 0,5
<i>gus</i>	763	--	7	0,92 ± 0,3

^a Las eficiencias de transformación, basadas en la expresión del gen marcador, son la media de diferentes experimentos repetidos con ambas construcciones.

Se decidió diseñar un experimento para determinar si la GFP tenía algún efecto tóxico en albaricoquero transformando hojas con la misma construcción conteniendo el gen *uidA*. En los ensayos donde se utilizó la construcción con el gen *sgfp* sólo se rescataron las yemas que expresaban GFP, mientras que en los ensayos con el plásmido p35SGUSINT todas las yemas regeneradas se recuperaron en medio selectivo. Una vez que las yemas supervivientes fueron evaluadas para el GUS, las eficiencias de transformación, basadas en la expresión del gen marcador, se compararon entre ambos experimentos para determinar si existían diferencias debidas a la construcción utilizada. Los resultados fueron similares (Tabla 26) y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las dos construcciones. Por lo tanto, ya que la única diferencia entre ambas construcciones era el gen marcador, se concluyó que la GFP no era tóxica en albaricoquero, y se debe encontrar una razón diferente para explicar la baja supervivencia de las yemas transformadas.

Producción y recuperación de brotes transformados

Una excesiva manipulación de los explantos cultivados puede aumentar los riesgos de contaminación, por lo tanto se intentó recuperar las yemas regeneradas coincidiendo con el momento de subcultivo. Esto significa que la yema podría ser recuperada desde la misma semana que aparecía hasta tres semanas después, ya que las yemas regeneraron en diferentes momentos del ciclo de subcultivo.

La mayor supervivencia se obtuvo cuando las yemas se rescataron una semana después de que fueran visibles o inmediatamente cuando aparecieron y esta disminuyó cuando permanecieron en el medio de regeneración durante más tiempo (Figura 27).

Aunque las citoquininas se conocen por su actividad antisenescente, se ha demostrado que 13 μM de BAP produjo muerte celular programada en suspensiones celulares y en plantas enteras, probablemente por aceleración de los procesos de senescencia (Carimi *et al.*, 2003). Otros reguladores del crecimiento, generalmente auxinas, pueden ser responsables de un efecto o su contrario dependiendo de la concentración a la que se encuentren. En nuestro medio de regeneración la concentración de TDZ es relativamente alta (9,0 μM) para poder inducir la dediferenciación de las células foliares y la subsiguiente diferenciación en meristemas. El TDZ es probablemente la citoquinina más potente, efectiva a concentraciones de 10 a 1.000 veces menores que otros reguladores vegetales del crecimiento, y ha sido ampliamente utilizada para inducir organogénesis en muchas especies leñosas (Huetteman y Preece, 1993). La exposición prolongada de las yemas regeneradas al medio de regeneración podría haber reducido la supervivencia de las yemas que no fueron rescatadas inmediatamente de acuerdo con el hecho de que las citoquininas inducen apoptosis dependiendo de la duración de la exposición (Carimi *et al.*, 2003). Las yemas que se rescataron la misma semana que aparecieron eran muy pequeñas, lo que probablemente limitó su viabilidad en comparación con las que fueron rescatadas una semana después.

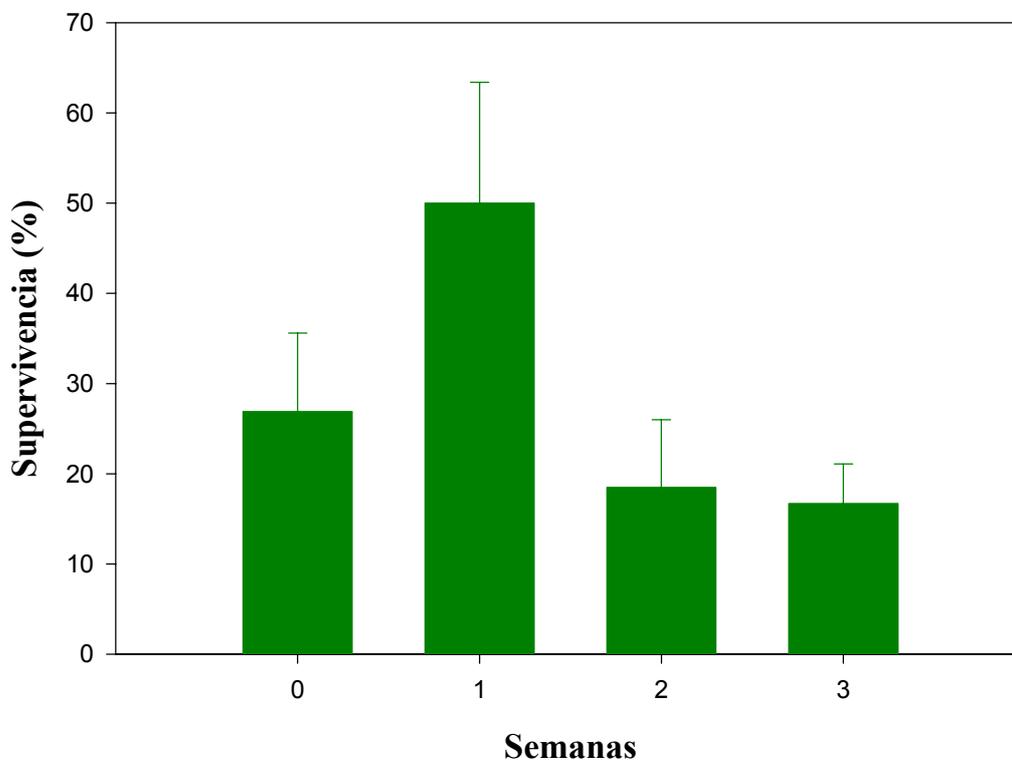


Figura 27.- Supervivencia de las yemas, rescatadas en medio sin selección, dependiendo del tiempo de exposición en el medio de regeneración antes de ser aisladas.

Una selección continuada en presencia de 40 μM de paromomicina permitió la eliminación progresiva de los escapes, y las yemas que fueron capaces de crecer y elongar para dar brotes que fueron multiplicados en medio de proliferación con el antibiótico, se confirmaron como transformadas mediante PCR. Sin embargo, fueron necesarios muchos meses hasta que se completó la selección y limitó la supervivencia de las yemas GFP positivas.

Cuando estudiamos el efecto de disminuir la presión de selección o no aplicarla, tras el rescate de las yemas la semana siguiente a su aparición, estas sobrevivieron en mayor número si no se aplicó selección o se redujo hasta que los brotes fueron transferidos a medio de proliferación (Tabla 27). Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, probablemente debido al

tamaño de las muestras comparadas, la aplicación continua de 40 μM de paromomicina redujo la supervivencia de las yemas a la mitad comparado con los otros dos casos.

Tabla 27.- Efecto de la estrategia de selección con antibiótico en la supervivencia de yemas GFP positivas después de que fueran rescatadas del medio de regeneración.

Selección con paromomicina (μM)				
Medio de meristemos	Medio de elongación	Medio de proliferación	Yemas GFP+	Yemas supervivientes (%)
0	0	40	40	14 (35,0)
20	20	40	20	7 (35,0)
40	40	40	20	3 (15,4)

Intentos para desarrollar un procedimiento más rápido de selección, incrementando la concentración del antibiótico o utilizando un antibiótico más letal para el albaricoquero (geneticina[®]), no fueron efectivos. Los tratamientos con 80 ó 100 μM de paromomicina, descritos en “Materiales y Métodos”, no fueron eficaces y afectaron de manera similar a brotes transformados y brotes control sin transformar, haciendo imposible una discriminación visual de los escapes frente a los brotes transformados (datos no mostrados). Cuando los brotes transformados se cultivaron en medio de proliferación con 40, 60, 80 ó 100 μM de geneticina[®] durante seis semanas (dos subcultivos) los brotes fueron gravemente afectados, de hecho, tampoco se detectaron diferencias frente al control no transformado en este caso (datos no mostrados).

Estudios histológicos previos de hojas de albaricoquero en medio de regeneración mostraron que numerosos meristemos caulinares se originaban muy próximos dando lugar a una roseta o agregado de brotes imposible de distinguir en las etapas tempranas de la regeneración (Figura 28) (Pérez-Tornero *et al.*, 2000). Cuando los brotes comenzaron a elongar se produjeron una media de 8 ± 8 brotes

por yema regenerada con un rango variable desde 1 hasta 24 brotes por yema. Dentro de estos se detectaron brotes transformados y brotes sin transformar. Sin embargo, las eficiencias de transformación mostradas en esta tesis están calculadas considerando solamente las yemas originales cuando, al menos, uno de los brotes elongados de una yema se confirmó como transformado. Por lo tanto, las eficiencias de transformación podrían ser mayores si se demostrara que cada uno de esos brotes proviene de un hecho de transformación diferente.

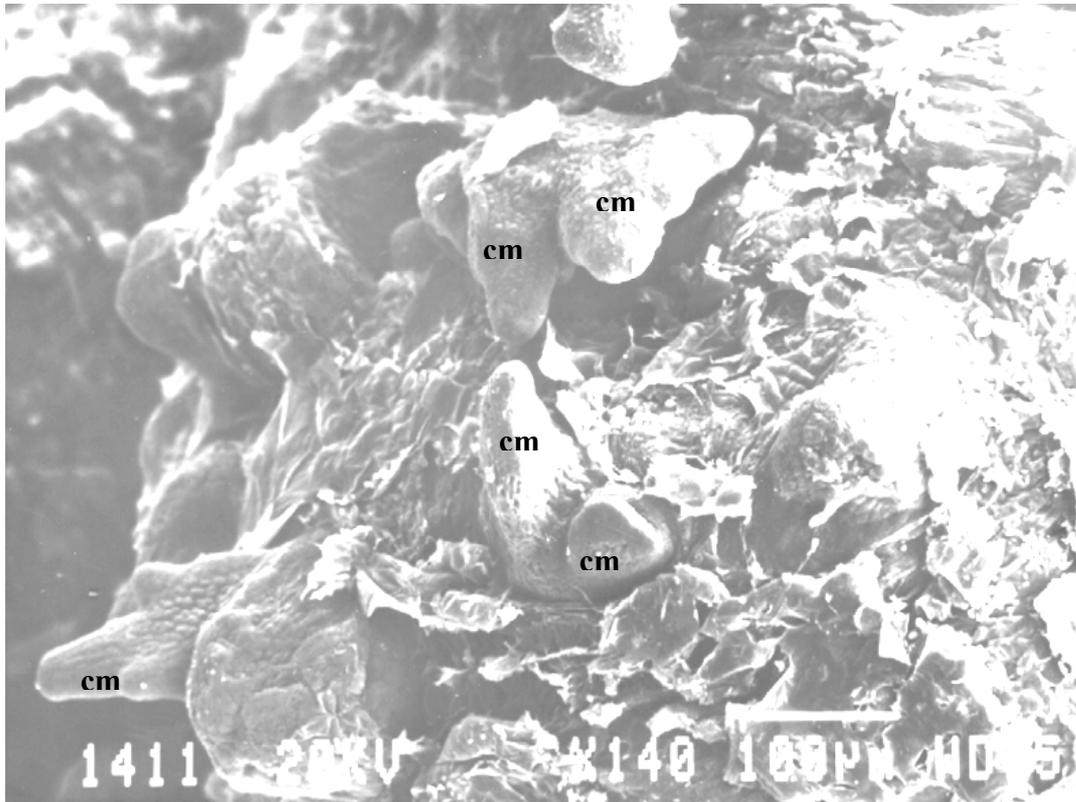


Figura 28.-Imagen de microscopio electrónico de hojas de 'Canino' donde se muestra la aparición de un grupo de meristemas caulinares (cm) regenerando de la misma zona. Imagen tomada de Pérez-Tornero *et al.* (2000).

Evaluación de plantas transformadas

*Detección de los genes *chivatos**

Sgfp

La fluorescencia de la GFP se detectó claramente sólo en algunas de las yemas transformadas durante los primeros estadios de crecimiento (Figura 29 A y C). En muchos casos, las yemas presentaron un tono amarillento bajo la luz azul, entre el verde brillante de la GFP y el rojo oscuro de la clorofila (Figura 29 B) pero fueron claramente diferentes de las yemas no transformadas (Figura 29 D). Se aislaron los dos tipos de yemas para su posterior análisis.

Cuando las yemas se desarrollaron fue imposible detectar la presencia de la proteína mediante estereomicroscopía de fluorescencia. Hojas de brotes transformados fueron idénticas bajo luz azul que las de los controles sin transformar.

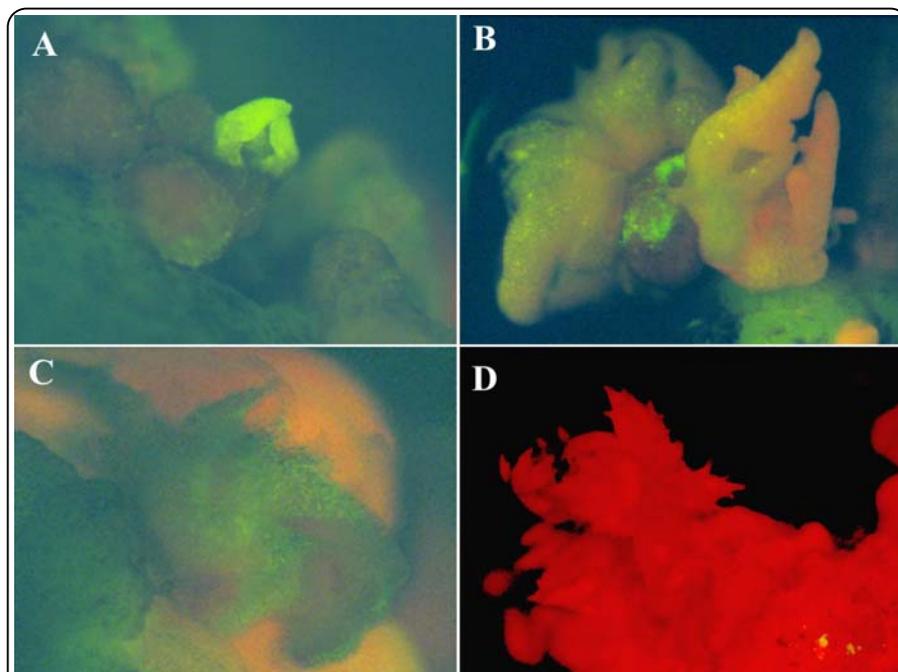


Figura 29.- Imágenes de estereomicroscopía de fluorescencia. (A) Yema adventicia en las primeras fases de crecimiento expresando GFP (25x). (B) y (C) Yemas regeneradas con diferente expresión de GFP bajo luz azul (40x). (D) Aspecto de una yema no transformada (25x).

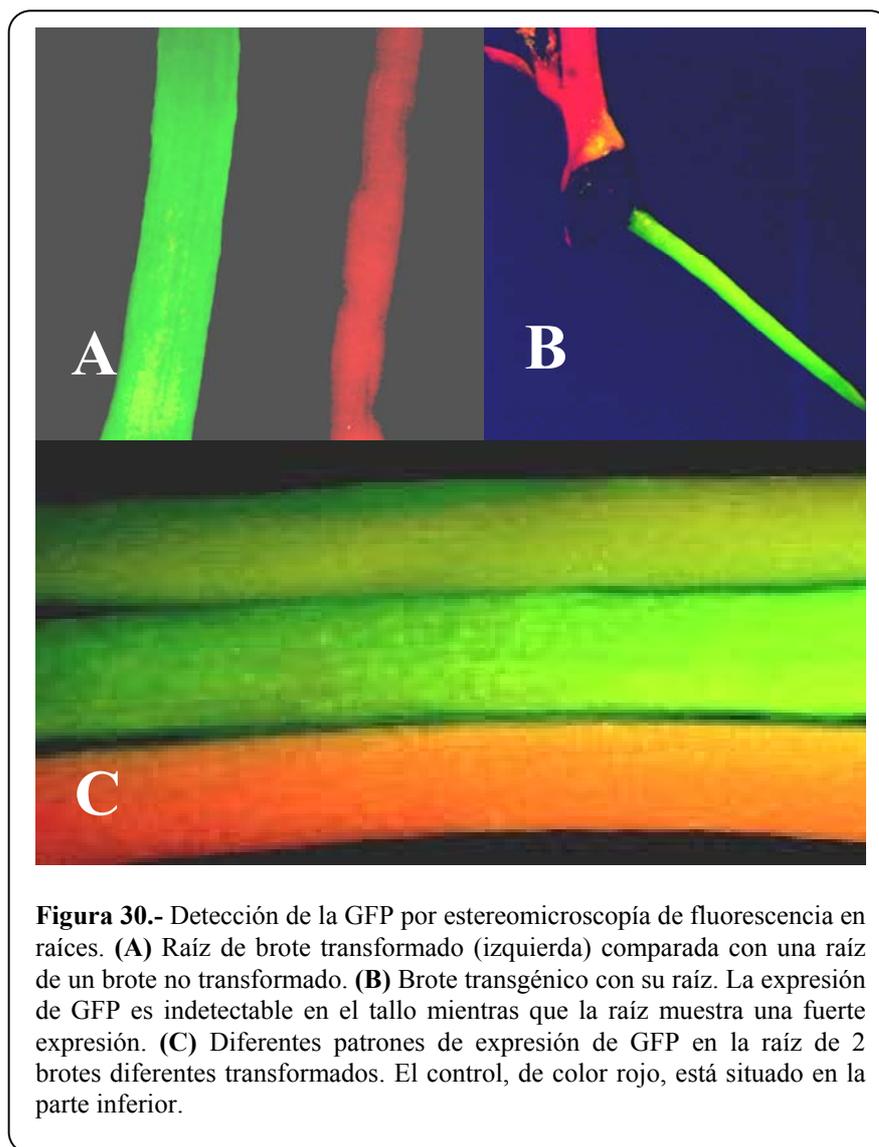
Sin embargo, cuando se examinaron raíces de brotes transformados bajo luz azul la expresión de la proteína GFP fue claramente visible y perfectamente distinguible de las raíces no transformadas del control (Figura 30). Por lo tanto, la proteína está presente en la planta y el hecho de que no sea detectable en los tejidos verdes es debido, probablemente, a la interferencia de la autofluorescencia debida a pigmentos presentes en el albaricoquero. Esto coincide con la alta expresión de GFP detectada en los callos transformados, obtenidos a partir de hojas de albaricoquero, cultivados en oscuridad durante más de un año donde la interferencia de la clorofila, obviamente, no estuvo presente. Un estudio más profundo con láser confocal reveló la presencia de alguna o algunas sustancias en hojas de material vegetal no transformado que al ser estimuladas con luz azul (480 nm) emitían luz en longitud de onda similares a la GFP haciendo imposible su detección en los brotes a evaluar (datos no mostrados).

Otros autores también describen un color verde amarillento cuando se examina la fluorescencia de la GFP, debido a que el verde brillante de la GFP se combina con la fluorescencia roja de los cloroplastos (Niwa *et al.*, 1999). También se ha descrito que la fluorescencia de la GFP disminuye con el tiempo en una misma zona de la hoja y que difiere según la posición de la hoja en la planta siendo mayor en hojas jóvenes (Halfhill *et al.*, 2005). Otros autores también han encontrado mayor o menor fluorescencia dependiendo del órgano de la planta (Li *et al.*, 2001; Iocco *et al.*, 2001). El número de copias, la posición del transgén en el genoma celular, el estado fisiológico de la planta, la parte del explanto que observemos, así como diferentes factores ambientales afectan la expresión de fluorescencia. Esto es debido a que la fluorescencia depende en gran medida de la concentración de proteína soluble en el tejido (Halfhill *et al.*, 2005).

Además, la autofluorescencia es normal en la mayoría de las células de organismos vegetales y su espectro es generalmente muy amplio, superponiéndose a la longitud de onda a la que emite la GFP (Billinton y Knight, 2001).

Cuando se mide la GFP, la presencia de autofluorescencia a menudo conduce a proporciones entre ruido y señal muy bajas, restricción en la sensibilidad de

detección y en algunos casos, como el nuestro, incluso a impedir su detección por completo. La autofluorescencia parece ser altamente dependiente de cada especie, ya que en otros *Prunus*, como el melocotonero, la expresión de GFP pudo ser detectada durante el desarrollo de plantas transgénicas sin problemas (Pérez-Clemente *et al.*, 2004).

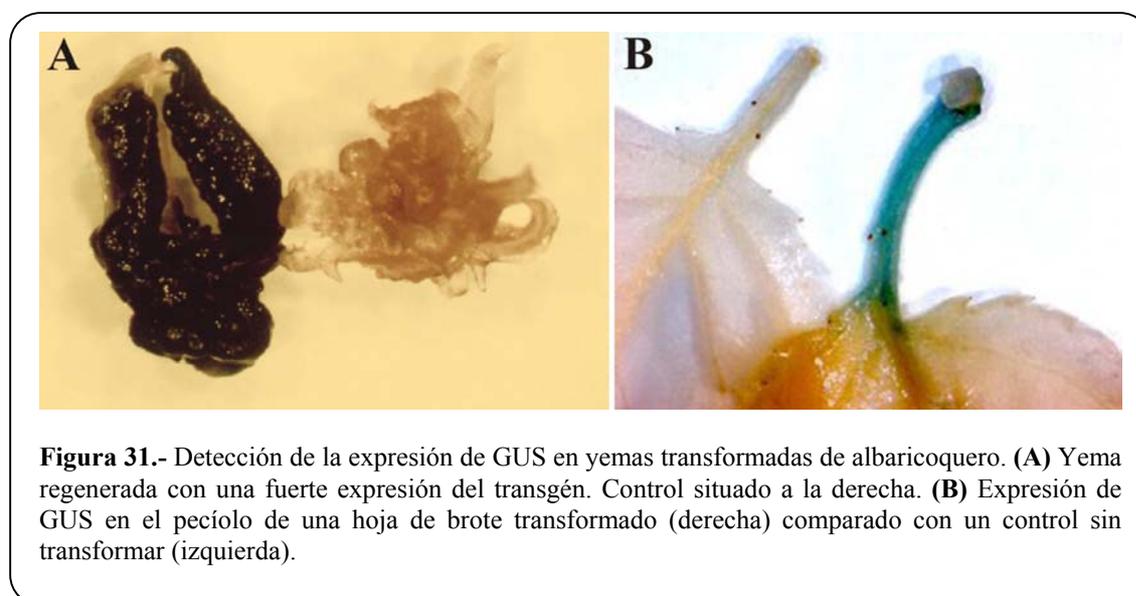


Aunque la GFP fue muy útil para optimizar los primeros pasos del protocolo de transformación, permitiendo una determinación de manera rápida y no destructiva de la transformación estable, así como la evaluación de diferentes factores que afectan la eficiencia de transferencia de genes y la supervivencia de las

yemas transformadas, la autofluorescencia en los brotes elongados complicó el seguimiento de la evolución de los posibles individuos transformados.

Gus

La expresión del gen marcador *gus* tampoco fue intensa en muchos de los individuos transformados y no fue homogénea en los diferentes tejidos examinados. Por ejemplo, en hojas GUS positivas el precipitado azul, producto de la acción de la enzima con el sustrato, fue visible principalmente asociado a los nervios y al pecíolo (Figura 31), y solamente alguna yema de pequeño tamaño presentó una expresión continua e intensa en la expresión del gen (Figura 31).



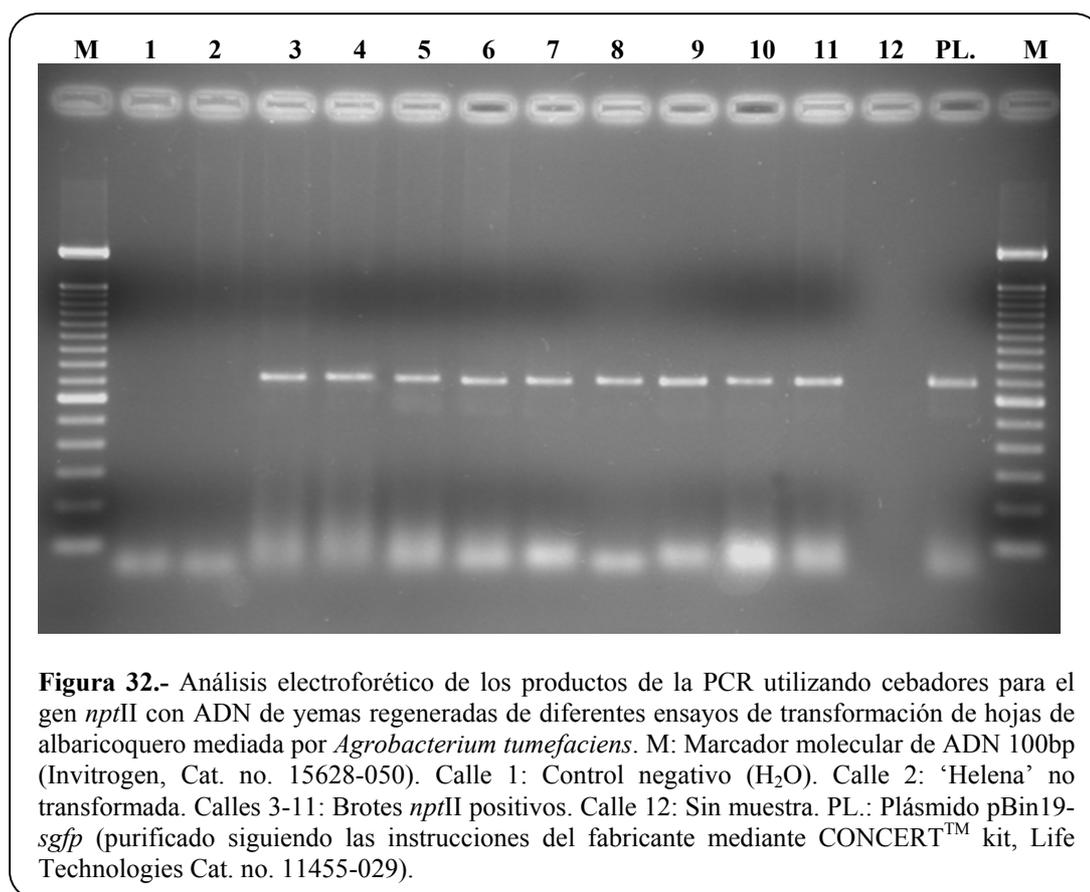
Esta localización espacial en la expresión del gen *gus* ha sido descrita por varios autores. Luth y Moore (1999) han descrito que sólo el 11,9% de los brotes de pomelo GUS positivos expresó con claridad e intensidad el gen marcador. En varios casos la expresión fue mayor en las raíces que en los tejidos verdes (Gutoranov *et al.*, 2001; Motioike *et al.*, 2002). La expresión no uniforme del gen podría estar asociada a procesos de silenciamiento génico, a su posición en el cromosoma o a silenciamiento postranscripcional (Iocco *et al.*, 2001), siendo también muy importante el promotor del gen en la construcción utilizada (Gittins *et al.*, 2001).

Evaluación molecular

El transgén *nptII* se detectó en brotes desarrollados en medio selectivo mediante PCR utilizando los cebadores apropiados (Figura 32).

Algunos de estos transgénicos, cultivados durante más de un año en presencia de antibiótico hasta tener el suficiente material para hacer la extracción de ADN, se utilizaron para determinar la integración estable de los transgenes por análisis Dot-blot (Figura 33).

En este trabajo se muestra por primera vez la obtención de plantas transformadas a partir de explantos de material adulto de una variedad de albaricoquero.



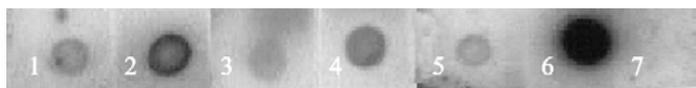


Figura 33.- Análisis por Dot-Blot del gen *sgfp* sobre plantas supervivientes cultivadas en medio selectivo durante un año aproximadamente. 1-4: Plantas transformadas. 5 y 6: Control positivo, plásmido pBin19-*sgfp*, diluciones 1/1000 y 1/10, respectivamente (purificado siguiendo las instrucciones del fabricante mediante CONCERT™ kit. Life Technologies Cat. no. 11455-029). 7: Control negativo, ‘Helena’ no transformada.

Descripción del protocolo de selección

Después del estudio y análisis de cada estrategia de selección quedó establecido el siguiente protocolo de selección y recuperación de plantulas transformadas de albaricoquero (Figura 34) a partir de hojas de ‘Helena’.

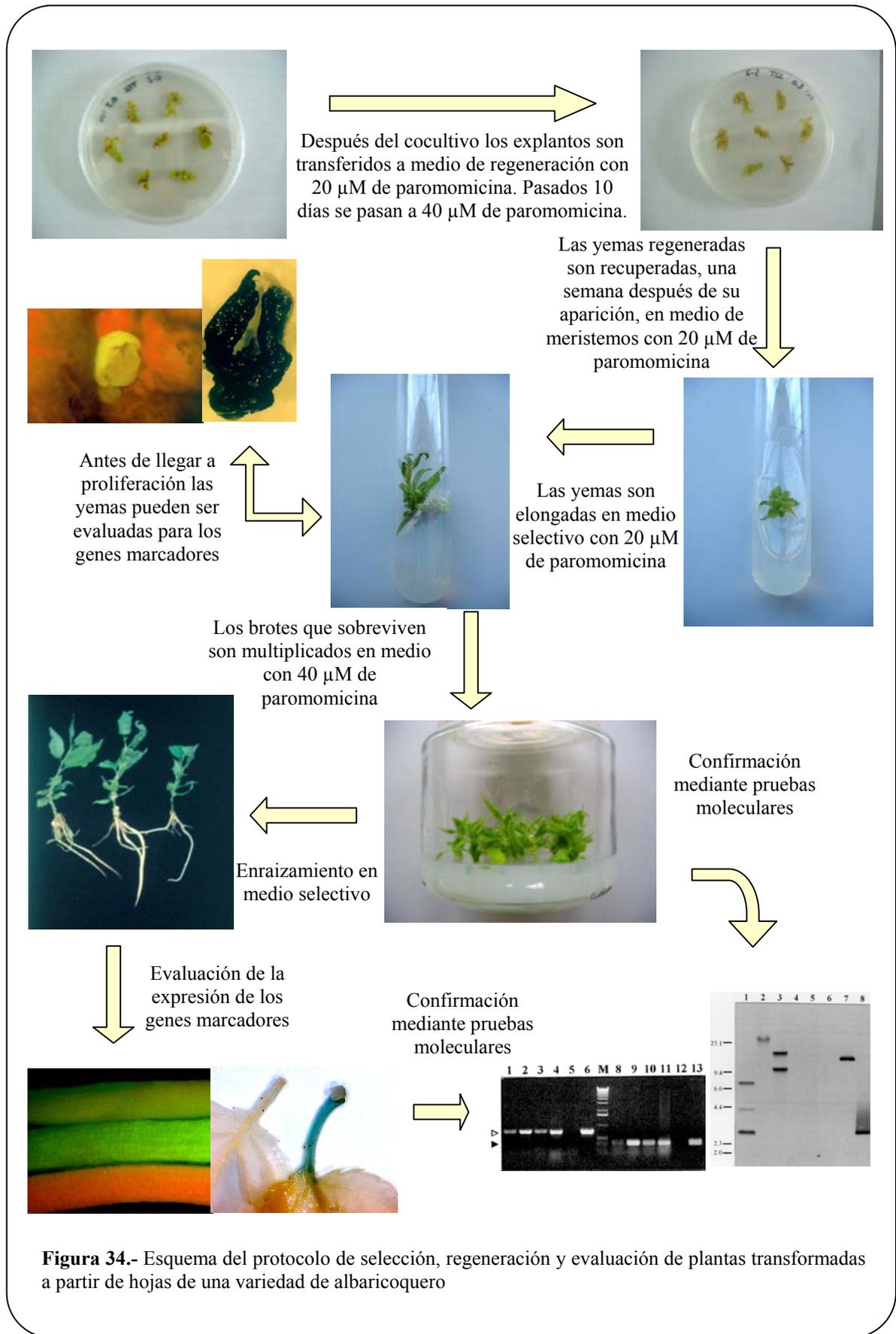
1.- Después del cocultivo los explantos son transferidos a medio de regeneración al que se adiciona 60 μM de STS y 2 mM de espermidina, además de los antibióticos para controlar el crecimiento de *Agrobacterium* y 20 μM de paromomicina.

2.- A los 10 días, una vez transcurrido el periodo de inducción en oscuridad, se aumenta la concentración de la paromomicina a 40 μM . Los explantos son subcultivados cada 4 semanas en medio fresco.

3.- Las yemas regeneradas se recuperan, una semana después de su aparición, en un medio elaborado para desarrollar meristemas (Pérez-Tornero *et al.*, 1999) con la adición de 20 μM de paromomicina. Una vez desarrolladas, son transferidas a medio de elongación con 20 μM de paromomicina. Las yemas se subcultivan con una frecuencia de 2 semanas.

4.- Los brotes supervivientes son multiplicados en medio de proliferación con 40 μM paromomicina.

5.- Los brotes transformados son comprobados mediante PCR e hibridación molecular.





CONCLUSIONES

1. En esta tesis se ha optimizado un protocolo eficiente de regeneración adventicia a partir de hojas de albaricoquero. Con el protocolo optimizado, la regeneración en la variedad 'Helena' se ha incrementado en un 200%, comparado con los máximos resultados publicados previamente. También, el número de yemas por explanto que regeneró es más del doble de los anteriormente publicados.
2. De los diferentes factores estudiados, aquellos que incrementaron consistentemente la regeneración para las dos variedades probadas ('Canino' y 'Helena') fueron los inhibidores del etileno. La adición de STS al medio de regeneración incrementó la regeneración en ambas variedades y también aumentó enormemente la consistencia de los resultados obtenidos, reduciendo la variabilidad entre ensayos de un mismo tratamiento.
3. El protocolo adecuado de regeneración a partir de hojas de albaricoquero es altamente dependiente del genotipo, dadas las importantes diferencias que hemos encontrado entre las dos variedades estudiadas en este trabajo así como en resultados anteriores de nuestro grupo. Por lo tanto, la adecuación del protocolo a diferentes variedades podría requerir un estudio pormenorizado de los diferentes factores que puedan determinar su viabilidad con diferentes genotipos.
4. El antibiótico aminoglicósido paromomicina resultó ser más adecuado para seleccionar plantas transgénicas *npII* en albaricoquero. Posiblemente debido a que permitió un mejor crecimiento de las células transformadas que el resto de antibióticos probados. En cualquier caso, solamente la aplicación de una selección gradual permitió la regeneración de plantas transformadas con eficiencias aceptables. Probablemente, esto se debe a que la des-diferenciación celular, que debe ocurrir en las células de la hoja antes de que estas adquieran capacidad meristemática, es un proceso muy sensible que se ve negativamente afectado por concentraciones excesivamente elevadas de antibiótico. El incremento posterior del agente de selección evita una aparición excesiva de escapes.

5. Se ha establecido, por primera vez, un protocolo de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para una variedad comercial de albaricoquero. Se ha desarrollado una metodología eficaz que permite la regeneración de plantas expresando resistencia a antibióticos aminoglicósidos y la proteína verde fluorescente o actividad glucuronidasa. Además, las eficiencias de transformación y selección aquí mostradas están dentro de las más elevadas publicadas para material adulto en especies del género *Prunus*.

6. La viabilidad de las yemas transformadas es muy baja, y pocas de ellas llegan a desarrollar brotes. Esta baja viabilidad parece estar relacionada, al menos en parte, con la manipulación de las yemas. El rescate de las yemas la semana siguiente a su aparición y rebajar la presión de selección durante las primeras semanas de su desarrollo ha permitido incrementar la viabilidad. Posiblemente, un estudio adicional más detallado podría aumentar las eficiencias de regeneración y transformación a partir de material adulto en albaricoquero y otras especies de *Prunus*.



BIBLIOGRAFÍA

- Agrios G.N.** (1999) Plant Pathology. (2 ed.). Academic Press, Inc., pp.: 838.
- Ainsley P.J., Collins G.G. y Sedgley M.** (2000) Adventitious shoot regeneration from leaf explants of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, **36**: 470-474.
- Ainsley P.J., Collins G.G. y Sedgley M.** (2002) Factors affecting *Agrobacterium*-mediated gene transfer and the selection of transgenic calli in paper shell almond (*Prunus dulcis* Mill.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, **76**: 522-528.
- Ainsley P.J., Hammerschlag F.A., Bertozzi T., Collins G.G. y Sedgley M.** (2001) Regeneration of almond from immature seed cotyledons. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **67**: 221-226.
- Almeida W.A.B., Mourao-Filho F.A.A., Pino L.E., Boscariol R.L., Rodriguez A.P.M. y Mendes B.M.J.** (2003) Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. *Plant Science*, **164**: 203-211.
- Alt-Mörbe J., Kühlmann H. y Schröder J.** (1989) Differences in induction of Ti plasmid virulence genes *virG* and *virD* and continued control of *virD* expression by four external factors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **2**: 301-308.
- Antonelli M. y Druart P.** (1990) The use of a brief 2,4-D treatment to induce leaf regeneration on *Prunus canescens* Bois. *Acta Horticulturae*, **280**: 45-50.
- Archilletti T., Lauri P. y Damiano C.** (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation of almond leaf pieces. *Plant Cell Reports*, **14**: 267-272.
- Audergon J.M.** (1995) Variety and breeding. *Acta Horticulturae*, **384**: 35-45.
- Bais H.P., Sudha G. y Ravishankar G.A.** (2001) Influence of putrescine, silver nitrate and polyamine inhibitors on the morphogenetic response in untransformed and transformed tissues of *Cichorium intybus* and their regenerants. *Plant Cell Reports*, **20**: 547-555.
- Balestra G.M., Rugini E. y Varvaro L.** (2001) Increased susceptibility to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Pseudomonas viridiflava* of kiwi plants having transgenic *rolABC* genes and its inheritance in the T1 offspring. *Journal of Phytopathology*, **149**: 189-194.
- Bassi G. y Cossio F.** (1991) In vitro shoot regeneration on "Bluefre" and "Susina di Dro" prune cultivars (*Prunus domestica* L.). *Acta Horticulturae*, **289**: 81-82.
- Belfanti E., Silfverberg-Dilworth E., Tartarini S., Patocchi A., Barbieri M., Zhu J., Vinatzer B.A., Gianfranceschi L., Gessler C. y Sansavini S.** (2004) The HcrVf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **101**: 886-890.
- Bell R.L., Scorza R., Srinivasan C. y Webb K.** (1999) Transformation of 'Beurre Bosc' pear with the *rolC* gene. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **124**: 570-574.
- Bernet E., Claparols I., Santos M.S. y Torné J.M.** (1998) Role of putrescine metabolic pathways in the differentiation process of maize meristematic callus. *Plant Physiol Biochem*, **36**: 759-766.
- Beyer E.M.** (1979) Effect of silver ion, carbon dioxide, and oxygen on ethylene action and metabolism. *Plant Physiology*, **63**: 169-173.
- Bhagwat B. y Lane W.D.** (2004) In vitro regeneration from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) 'Lapins' and 'Sweetheart'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **78**: 173-181.
- Bhojwani S.S. y Razdan M.K.** (1986) Plant tissue culture: theory and practice. (3rd ed.) (Bhojwani, S.S. y Razdan, M.K. eds.) Elsevier science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands. pp.: 488.
- Billinton N. y Knight A.W.** (2001) Seeing the wood through the trees: A review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Analytical Biochemistry*, **291**: 175-197.
- Bolar J.P., Norelli J.L., Wong K.W., Hayes C.K., Harman G.E. y Aldwinckle H.S.** (2000) Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology*, **90**: 72-77.
- Bommineni V.R., Mathews H., Clendennen S.K., Wagoner W., Dewey V., Kellogg J., Peters S., Matsumura W., Pieper M., Kramer M. y Wagner D.R.** (2000) Genetic engineering of fruits and vegetables with the ethylene control gene encoding S-adenosylmethionine hydrolase (SAMase). En: Plant genetic engineering: Towards the third millennium. (Arenicibia, A.D. ed.) Elsevier Science, B.V., pp.: 206-214.
- Borrelli G.M., Di Fonzo N. y Lupotto E.** (1992) Effect of Cefotaxime on callus culture and plant regeneration in durum wheat. *Journal of Plant Physiology*, **140**: 372-374.

- Broothaerts W., Keulemans J. y Van Nerum I. (2004) Self-fertile apple resulting from S-RNase gene silencing. *Plant Cell Reports*, **22**: 497-501.
- Burnett L., Arnoldo M., Yarrow S. y Huang B. (1994) Enhancement of shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica rapa* ssp. *oleifera* through pretreatment with auxin and cytokinin and use of ethylene inhibitors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **37**: 253-256.
- Caboche M. (1990) Liposome-mediated transfer of nucleic acids in plant protoplasts. *Physiologia Plantarum*, **79**: 173-176.
- Callahan A., Morgens P.H. y Walton E. (1989) Isolation and *in vitro* translation of RNAs from developing peach fruit. *HortScience*, **24**: 356-358.
- Callahan A., Scorza R., Morgens P.H., Mante S., Cordts J. y Cohen R. (1991) Breeding for cold hardiness: Searching for genes to improve fruit quality in cold-hardy peach germplasm. *HortScience*, **26**: 522-526.
- Carimi F., Zottini M., Formentin E., Terzi M. y Lo Schiavo F. (2003) Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta*, **216**: 413-421.
- Cervera M., Juárez J.A., Navarro A., Pina J.A., Durán-Vila N., Navarro L. y Peña L. (1998a) Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Research*, **7**: 51-59.
- Cervera M., López M.M., Navarro L. y Peña L. (1998b) Virulence and supervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* in woody fruit plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **52**: 67-78.
- Cervera M., Ortega C., Navarro L., Navarro A. y Peña L. (2000) Generation of transgenic citrus plants with the tolerance-to-salinity gene HAL2 from yeast. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, **75**: 30
- Cervera M., Pina J.A., Juárez J.A., Navarro L. y Peña L. (1998c) *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Reports*, **18**: 271-278.
- Chevreau E., Mourgues F., Neveu M. y Chevalier M. (1997) Effect of gelling agents and antibiotics on adventitious bud regeneration from *in vitro* leaves of pear. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, **33**: 173-179.
- Chi G.L., Barfield D.G., Sim G.E. y Pua E.C. (1990) Effect of AgNO₃ and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. *Plant Cell Reports*, **9**: 195-198.
- Chi G.L., Lin W.S., Lee J.E.E. y Pua E.C. (1994) Role of polyamines on *de novo* shoot morphogenesis from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson *in vitro*. *Plant Cell Reports*, **13**: 323-329.
- Chiu C., Niwa Y., Zeng W., Hirano T., Kobayashi H. y Sheen J. (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology*, **6**: 325-330.
- Chraïbi K.M., Latche A., Roustan J.P. y Fallot J. (1991) Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt. *Plant Cell Reports*, **10**: 204-207.
- Colby S.M. y Meredith C.P. (1990) Kanamycin sensitivity of cultured tissues of *Vitis*. *Plant Cell Reports*, **9**: 237-240.
- Confalonieri M., Belenghi B., Balestrazzi A., Negri S., Facciotto G., Schenone G. y Delledonne M. (2000) Transformation of elite white poplar (*Populus alba* L.) cv. "Vilafranca" and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Reports*, **19**: 982
- Costa M.G.C., Nogueira F.T.S., Figueira M.L., Otoni W.C., Brommonschenkel S.H. y Cecon P.R. (2000) Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Plant Cell Reports*, **19**: 327-332.
- Costa M.G.C., Otoni W.C. y Moore G.A. (2002) An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. *Plant Cell Reports*, **21**: 365-373.
- Csányi M., Wittner A., Nagy A., Balla I., Vértessy J., Palkovics L. y Balázs E. (1999) Tissue culture of stone fruit plants basis for their genetic engineering. *J Plant Biotechnology*, **1**: 91-95.
- da Câmara Machado A., Knapp E., Puhlinger H., Seifert G., Hanzer V., Weiss H., Wang Q.C., Katinger H.W.D. y Laimer da Câmara Machado M. (1995a) Gene transfer methods for the pathogen-mediated resistance breeding in fruit trees. *Acta Horticulturae*, **392**: 193-202.

- da Câmara Machado A., Puschmann M., Puhringer H., Kremen R., Katinger H.W.D. y Laimer da Câmara Machado M. (1995b) Somatic embryogenesis of *Prunus subhirtella autumnosa* and regeneration of transgenic plants after *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports*, **14**: 335-340.
- Dandekar A.M. (1995) Genetic transformation of Angiosperms. En: Somatic embryogenesis in woody plants. (Jain,P., Gupta,P., y Newton,R. eds.) Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp.:193-226.
- Dandekar A.M., McGranahan G.H., Vail P.V., Uratsu S.L., Leslie C. y Tebbets J.S. (1998) High levels of expression of full length cryIA(c) gene from *Bacillus thuringiensis* in transgenic somatic walnut embryos. *Plant Science*, **131**: 181-193.
- Dandekar A.M., Teo G., Defilippi B.G., Uratsu S.L., Passey A.J., Kader A.A., Stow J.R., Colgan R.J. y James D.J. (2004) Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. *Transgenic Research*, **13**: 373-384.
- Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N. y Ginsberg S. (1984) Microbiology. (3 ed.) Anonymous Harper and Row, Hagerstown. pp.: 1097.
- De Bondt A., Eggermont K., Penninckx I., Goderis I. y Broekaert W.F. (1996) *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh): An assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, **15**: 549-554.
- De Bondt A., Eggermont K., Druart P., De Vil M., Goderis I., Vanderleyden J. y Broekaert W.F. (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh): An assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Reports*, **13**: 587-593.
- De Bondt A., Zaman S., Broekaert W.F., Cammue B. y Keulemans J. (1999) Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) for increased fungal resistance: *in vitro* antifungal activity in protein extracts of transgenic apple expressing RS-AFP2 or ACE-AMP1. *Acta Horticulturae*, **484**: 565-570.
- De Clercq J., Zambre M., Van Montagu M., Dillen W. y Angenon G. (2002) An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray. *Plant Cell Reports*, **21**: 333-340.
- Debergh P.C. (1983) Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum*, **59**: 270-276.
- Declerck V. y Korban S.S. (1996) Influence of growth regulators and carbon sources on callus induction, growth and morphogenesis from leaf tissues of peach (*Prunus persica* L Batsch). *Journal of Horticultural Science*, **71**: 49-55.
- Della Strada G., Pennone F., Fideguelli C., Monastra F. y Cobianchi D. (1989) Monografia di Cultivar di Albicocco. (1 ed.) Anonymous Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, Roma. pp.: 239.
- Dolgov S.V. (1999) Genetic transformation of sour cherry (*Cerasus vulgaris* Mill.). En: Transgenic trees. (Bajaj,Y.P.S. ed.) Springer-Verlag, Berlin, pp.:29-38.
- Dolgov S.V. y Firsov A.P. (1999) Regeneration and *Agrobacterium* transformation of sour cherry leaf discs. *Acta Horticulturae*, **484**: 577-579.
- Domínguez A., Cervera M., Pérez R.M., Romero J., Fagoaga C., Cubero J., López M.M., Juárez J.A., Navarro L. y Peña L. (2004) Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. *Molecular Breeding*, **14**: 171-183.
- Domínguez A., Guerri J., Cambra M., Navarro L., Moreno P. y Peña L. (2000) Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports*, **19**: 427-433.
- Domínguez A., Hermoso de Mendoza A., Guerri J., Cambra M., Navarro L., Moreno P. y Peña L. (2002) Pathogen-derived resistance to *Citrus tristeza virus* (CTV) in transgenic mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Molecular Breeding*, **10**: 1-10.
- Dosba F., Massonie G., Maison P. y Audergon J.M. (1991) Plum pox virus resistance of apricot. *Acta Horticulturae*, **293**: 569-579.

- Driver J.A. y Kuniyuki A.H. (1984) *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, **19**: 507-509.
- Druart P. (1990) Effect of culture conditions and leaf selection on organogenesis of *Malus domestica* cv. McIntosh "Wijcik" and *Prunus canescens* Bois GM79. *Acta Horticulturae*, **280**: 117-124.
- Druart P., Delporte F., Brazda M., Ugarte-Ballon C., da Câmara Machado A., Laimer da Câmara Machado M., Jacquemin J. y Watillon B. (1998) Genetic transformation of cherry trees. *Acta Horticulturae*, **468**: 71-76.
- Durzan D.J., Hansen J. y Peng C. (1990) Micropropagation and somatic embryogenesis in cherry rootstock. [Abstract] *XXIII International Horticultural Congress, Florence*: 3113
- Eapen S. y George L. (1990) Influence of phytohormones, carbohydrates, aminoacids, growth supplements and antibiotics on somatic embryogenesis and plant differentiation in finger millet. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **22**: 87-93.
- Ebinuma H., Sugita K., Matsunaga E. y Yamakado M. (1997) Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 2117-2121.
- Egea J., García J.E. y Berenguer T. (1994a) El albaricoquero. Situación y perspectivas del cultivo. *Hortofruticultura*, **6**: 53-54.
- Egea J., García J.E. y Berenguer T. (1994b) Variedades de albaricoquero. *Hortofruticultura*, **6**: 56-62.
- Elliot A.R., Campbell J.A., Dugdale B., Brettell R.I.S. y Grof C.P.L. (1999) Green-fluorescent protein facilitates rapid *in vivo* detection of genetically transformed plant cells. *Plant Cell Reports*, **18**: 707-714.
- Escalettes V., Dahuron F., Ravelonandro M. y Dosba F. (1994) Utilisation de la transgénese pour l'obtention de pruniers et d'abricotiers exprimant le gène de la protéine capsid du plum pox potyvirus. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **24**: 705-711.
- Escalettes V. y Dosba F. (1993) *In vitro* adventitious shoot regeneration from leaves of *Prunus* spp. *Plant Science*, **90**: 201-209.
- Evans P.T. y Malmberg R.L. (1989) Do polyamines have roles in plant development? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **40**: 235-269.
- Fagoaga C., Rodrigo I., Conejero V., Hinarejos C., Tuset J.J., Arnau J., Pina J.A., Navarro L. y Peña L. (2001) Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Molecular Breeding*, **7**: 175-185.
- Faize M., Malnoy M., Dupuis F., Chevalier M., Parisi L. y Chevreau E. (2003) Chitinases of *Trichoderma atroviride* induce scab resistance and some metabolic changes in two cultivars of apple. *Phytopathology*, **93**: 1496-1504.
- Faize M., Sourice S., Dupuis F., Parisi L., Gautier M.F. y Chevreau E. (2004) Expression of wheat puroindoline-b reduces scab susceptibility in transgenic apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Science*, **167**: 347-354.
- Fitch M.M.M., Manshardt R.M., Gonsalves D., Slightom J.L. y Sanford J.C. (1992) Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Bio-Technology*, **10**: 1466-1472.
- Frisch D.A., Harris-Haller L.W., Yokubaitis N.T., Thomas T.L., Hardin S.H. y Hall T.C. (1995) Complete sequence of the binary vector Bin 19. *Plant Molecular Biology*, **40**: 405-409.
- Fromm M., Callis J., Taylor L.P. y Walbot V. (1987) Electroporation of DNA and RNA into plant protoplasts. *Methods in Enzymology*, **153**: 351-366.
- Füterer J., Bonneville J.M. y Hohn T. (1990) Cauliflower mosaic virus as a gene expression vector for plants. *Physiologia Plantarum*, **79**: 154-157.
- Galston A.W. y Sawhney R.K. (1990) Polyamines in plant physiology. *Plant Physiology*, **94**: 406-410.
- Gentile A., Monticelli S. y Damiano C. (2002) Adventitious shoot regeneration in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Plant Cell Reports*, **20**: 1011-1016.
- George E.F. (1993) Plant propagation by tissue culture. Part 1: The technology. (2 ed.) (George, E.F. ed.) Exegetics Ltd., Edington, Wilts. pp.: 574.
- George E.F. (1996) Plant propagation by tissue culture. Part 2: In Practice. (2nd ed.) (George, E.F. ed.) Exegetics Ltd., Edington, Wilts. pp.: 1333.

- Ghorbel R., Domínguez A., Navarro L. y Peña L. (2000) High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Tree Physiology*, **20**: 1183-1189.
- Ghorbel R., Juárez J.A., Navarro L. y Peña L. (1999) Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating transgenic woody fruit plants. *Theoretical and Applied Genetics*, **99**: 350-358.
- Ghorbel R., La-Malfa S., López M.M., Petit A., Navarro L. y Peña L. (2001a) Additional copies of *virG* from pTiBo542 provide a super-transformation ability to *Agrobacterium tumefaciens* in citrus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **58**: 103-110.
- Ghorbel R., López C., Fagoaga C., Moreno P., Navarro L., Flores R. y Peña L. (2001b) Transgenic citrus plants expressing the citrus tristeza virus p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Molecular Plant Pathology*, **2**: 27-36.
- Gittins J.R., Hiles E.R., Pellny T.K., Biricolti S. y James D.J. (2001) The *Brassica napus extA* promoter: a novel alternative promoter to CaMV 35S for directing transgene expression to young stem tissues and load bearing regions of transgenic apple trees (*Malus pumila* Mill.). *Molecular Breeding*, **7**: 51-62.
- Gittins J.R., Pellny T.K., Hiles E.R., Rosa C., Biricolti S. y James D.J. (2000) Transgene expression driven by heterologous ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small-subunit gene promoters in the vegetative tissues of apple (*Malus pumila* Mill.). *Planta*, **210**: 232-240.
- Goffreda J.C., Scopel A.L. y Fiola J.A. (1995) Indole butyric acid induces regeneration of phenotypically normal apricot (*Prunus armeniaca* L.) plants from immature embryos. *Plant Growth Regulation*, **17**: 41-46.
- Gonzalez-Padilla I.M., Webb K. y Scorza R. (2003) Early antibiotic selection and efficient rooting and acclimatization improve the production of transgenic plum plants (*Prunus domestica* L.). *Plant Cell Reports*, **22**: 38-45.
- Gray J., Picton S., Shabbeer J., Schuch W. y Grierson D. (1992) Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. *Plant Molecular Biology*, **19**: 69-87.
- Gutiérrez-Pesce P., Taylor K., Muleo R. y Rugini E. (1998) Somatic embryogenesis and shoot regeneration from transgenic roots of the cherry rootstock Colt (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*) mediated by pRi 1855 T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*, **17**: 574-580.
- Gutoranov G.P., Tsvetkov I.J., Colova-Tsolova V.M. y Atanassov A.I. (2001) Genetically engineered grapevines carrying GFLV coat protein and antifreeze genes. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, **66**: 71-76.
- Halfhill M.D., Millwood R.J. y Stewart C.N., Jr. (2005) Green fluorescent protein quantification in whole plants. (1 ed.) En: *Transgenic Plants: Methods and Protocols*. (Peña, L. ed.) Humana Press, Inc., Totowa, NJ, pp.:215-225.
- Hamilton R.I. (1980) Defenses triggered by previous invaders: viruses. En: *Plant disease: an advanced treatise*. Vol. 5. (Horsfall, J.G. y Cowling, E.B. eds.) Academic Press, New York, pp.:279-303.
- Hammatt N. y Grant N.J. (1998) Shoot regeneration from leaves of *Prunus serotina* Ehrh. (black cherry) and *P. avium* L. (wild cherry). *Plant Cell Reports*, **17**: 526-530.
- Hammerschlag F.A., Owens L.D. y Smigocki A.C. (1989) *Agrobacterium*-mediated transformation of peach cells derived from mature plants that were propagated *in vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **114**: 508-510.
- Hammerschlag F.A. y Smigocki A.C. (1998) Growth and *in vitro* propagation of peach plants transformed with the shooty mutant strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *HortScience*, **33**: 897-899.
- Hammerschlag F.A., Zimmerman R.H., Yadava U.L., Hunsucker S. y Gercheva P. (1997) Effect of antibiotics and exposure to an acidified medium on the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from apple leaf explants and on shoot regeneration. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **122**: 758-763.
- Han K.H., Meilan R., Ma C. y Strauss S.H. (2000) An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*). *Plant Cell Reports*, **19**: 315-320.

- Haseloff J., Siemering K.R., Prasher D.C. y Hodge S. (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 2122-2127.
- Herron C.M. (2003) Citrus tristeza virus: Characterization of Texas isolates, studies on aphid transmission and pathogen-derived control strategies. (Tesis), pp.:1-258.
- Holford P., Hernandez N. y Newbury H.J. (1992) Factors influencing the efficiency of T-DNA transfer during co-cultivation of *Antirrhinum majus* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, **11**: 196-199.
- Holford P. y Newbury H.J. (1992) The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Antirrhinum majus*. *Plant Cell Reports*, **11**: 93-96.
- Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz D., Rogers S.G. y Fraley R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, **227**: 1229-1231.
- Huetteman C.A. y Preece J.E. (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **33**: 105-119.
- Humara J.M. y Ordás R.J. (1999) The toxicity of antibiotics and herbicides on *in vitro* adventitious shoot formation on *Pinus pinea* L. cotyledons. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, **35**: 339-343.
- Iocco P., Franks T. y Thomas M.R. (2001) Genetic transformation of major wine grape cultivars of *Vitis vinifera* L. *Transgenic Research*, **10**: 105-112.
- James C. (2003) Preview: Global status of commercialized transgenic crops: 2003. 1-7.
- James D.J., Passey A.J., Barbara D.J. y Bevan M. (1989) Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Reports*, **7**: 658-661.
- James D.J., Passey A.J. y Malhotra S.B. (1984) Organogenesis in callus derived from stem and leaf tissues of apple and cherry rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **3**: 333-341.
- James D.J., Uratsu S.L., Cheng J., Negri P., Viss P. y Dandekar A.M. (1993) Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *Plant Cell Reports*, **12**: 559-563.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. y Bevan M.W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, **6**: 3901-3907.
- Jelenska J., Tietze E., Tempe J. y Brevet J. (2000) Streptothricin resistance as a novel selectable marker for transgenic plants. *Plant Cell Reports*, **19**: 298-303.
- Joersbo M. (2001) Advances in the selection of transgenic plants using non-antibiotic marker genes. *Physiologia Plantarum*, **111**: 269-272.
- Joersbo M. y Brunstedt J. (1990) Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonication. *Plant Cell Reports*, **9**: 207-210.
- Joersbo M., Donaldson I., Kreiberg J., Petersen S.G., Brunstedt J. y Okkels F.T. (1998) Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Molecular Breeding*, **4**: 111-117.
- Jones O.P., Gayner J.A. y Watkins R. (1984) Plant regeneration from callus tissue cultures of the cherry rootstock Colt (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*) and the apple rootstock M.25 (*Malus pumila*). *Journal of Horticultural Science*, **59**: 463-467.
- Kakkar R.K., Nagar P.K., Ahuja P.S. y Rai V.K. (2000) Polyamines and plant morphogenesis. *Biologia Plantarum*, **43**: 1-11.
- Kakkar R.K. y Sawhney V.K. (2002) Polyamine research in plants. A changing perspective. *Physiologia Plantarum*, **116**: 281-292.
- Ko K., Norelli J.L., Reynoird J.P., Borejsza-Wysocka E., Brown S.K. y Aldwinckle H.S. (2000) Effect of untranslated leader sequence of AMV RNA 4 and signal peptide of pathogenesis-related protein 1b on attacin gene expression, and resistance to fire blight in transgenic apple. *Biotechnology Letters*, **22**: 373-381.
- Kobayashi S., Ding C.K., Nakamura Y., Nakajima I. y Matsumoto R. (2000) Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside). *Plant Cell Reports*, **19**: 904-910.
- Krüger-Lebus S. y Potrykus I. (1987) A simple and efficient method for direct gene transfer to *Petunia hybrida* without electroporation. *Plant Molecular Biology Reporter*, **5**: 289-294.
- Kumar A., Altabella T., Taylor M.A. y Tiburcio A.F. (1997) Recent advances in polyamine research. *Trends in Plant Sciences*, **2**: 124-130.

- Kumar S.V. y Rajam M.V. (2005) Polyamines enhance *Agrobacterium tumefaciens vir* gene induction and T-DNA transfer. *Plant Science*, **168**: 475-480.
- Laimer da Câmara Machado M., da Câmara Machado A., Hanzer V., Mattanovich D., Himmler G. y Katinger H.W.D. (1988) Regeneration of shoots from leaf discs and stem microcuttings of fruit trees as a tool for transformation. *Acta Horticulturae*, **235**: 85-92.
- Laimer da Câmara Machado M., da Câmara Machado A., Hanzer V., Weiss H., Regner F., Steinkeliner H., Mattanovich D., Plail R., Knapp E., Kalthoff B. y Katinger H.W.D. (1992) Regeneration of transgenic plants of *Prunus armeniaca* containing the coat protein gene of Plum Pox Virus. *Plant Cell Reports*, **11**: 25-29.
- Lane W.D. y Cossio F. (1986) Adventitious shoots from cotyledons of immature cherry and apricot embryos. *Canadian Journal of Plant Science*, **66**: 953-959.
- Ledbetter C.A. (1994) Notice to fruit growers and nurserymen relative to the naming and release of the Helena apricot cultivar. *Cultivar release notice*,
- Lee J.S., Cetiner M.S., Blackmon W.J. y Jaynes J.M. (1990) The reduction of the freezing point of tobacco plants transformed with the gene encoding for the antifreeze protein from winter flounder. *Journal of Cellular Biochemistry*, [Suppl] **14E**: 303
- Lee T., Huang M.E.E. y Pua E.C. (1997) High frequency shoot regeneration from leaf disc explants of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.) *in vitro*. *Plant Science*, **126**: 219-226.
- Li D.D., Shi W. y Deng X.X. (2002) *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses of Ponkan mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. *Plant Cell Reports*, **21**: 153-156.
- Li Z., Jayasankar S. y Gray D.J. (2001) Expression of a bifunctional green fluorescent protein (GFP) fusion marker under the control of three constitutive promoters and enhanced derivatives in transgenic grape (*Vitis vinifera*). *Plant Science*, **160**: 877-887.
- Lindsey K. y Jones M.G.K. (1990) Electroporation of cells. *Physiologia Plantarum*, **79**: 168-172.
- Litz R.E. y Gray D.J. (1992) Organogenesis and somatic embryogenesis. (1 ed.) En: Biotechnology of perennial fruit crops. (Hammerschlag, F.A. y Litz, R.E. eds.) C.A.B. International, Oxon, pp.:3-34.
- Liu H.S., Jan M.S., Chou C.K., Chen P.H. y Ke N.J. (1999) Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **260**: 712-717.
- Lloyd G. y McCown B. (1981) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc Intl Plant Prop Soc*, **30**: 421-427.
- Lodhi M.A., Ye G.N., Weeden N.F. y Reisch B.I. (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, **12**: 6-13.
- Luth D. y Moore G. (1999) Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **57**: 219-222.
- Mackay W.A. y Kitto S.L. (1998) Factors affecting *in vitro* shoot proliferation of French tarragon. *HortScience*, **113**: 282-287.
- Malnoy M., Venisse J.S., Reynoird J.P. y Chevreau E. (2003) Activation of three pathogen-inducible promoters of tobacco in transgenic pear (*Pyrus communis* L.) after abiotic and biotic elicitation. *Planta*, **216**: 802-814.
- Mante S., Morgens P.H., Scorza R., Cordts J.M. y Callahan A.M. (1991) *Agrobacterium*-mediated transformation of plum (*Prunus domestica* L) hypocotyl slices and regeneration of transgenic plants. *Bio-Technology*, **9**: 853-857.
- Mante S., Scorza R. y Cordts J.M. (1989) Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica*, and *Prunus cerasus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **19**: 1-11.
- Martinelli L., Candioli E., Costa D. y Minafra A. (2002) Stable insertion and expression of the movement protein gene of Grapevine Virus A (GVA) in grape (*Vitis rupestris* S.). *Vitis*, **41**: 189-193.
- Mauro M.C., Toutain S., Walter B., Pinck L., Otten L., Coutos-Thevenot P., Deloire A. y Barbier P. (1995) High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. *Plant Science*, **112**: 97-106.
- Maximova S.N., Dandekar A.M. y Gultinan M.J. (1998) Investigation of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expression and

- low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. *Plant Molecular Biology*, **37**: 549-559.
- McHughen A., Jordan M. y Feist G.** (1989) A preculture period prior to *Agrobacterium* inoculation increases production of transgenic plants. *Journal of Plant Physiology*, **135**: 245-248.
- Mencuccini M., Micheli M., Angiolillo A., Baldoni L., Frugis G. y Mariotti D.** (1999) *Agrobacterium* mediated DNA transfer in olive callus (*Olea europaea* L.). *Advances in Horticultural Science*, **13**: 25-28.
- Messiaen J., Cambier P. y Van Cutsem P.** (1997) Polyamines and Pectins. I. Ion exchange and selectivity. *Plant Physiology*, **113**: 387-395.
- Mezzetti B., Pandolfini T., Navacchi O. y Landi L.** (2002) Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis. *BMC Biotechnology*, **2**: 18
- Miguel C.M., Druart P. y Oliveira M.M.** (1996) Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill.) explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, **32**: 148-153.
- Miguel C.M. y Oliveira M.M.** (1999) Transgenic almond (*Prunus dulcis* Mill.) plants obtained by *Agrobacterium* mediated transformation of leaf explants. *Plant Cell Reports*, **18**: 387-393.
- Miki B. y McHugh S.** (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology*, **107**: 193-232.
- Molinier J., Himber C. y Hahne G.** (2000) Use of green fluorescent protein for detection of transformed shoots and homozygous offspring. *Plant Cell Reports*, **19**: 219-223.
- Motioike S.Y., Skirvin R.M., Norton M.A. y Otterbacher A.G.** (2002) Development of methods to genetically transform American grape (*Vitis x labruscana* L. H. Bailey). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, **77**: 691-696.
- Murai Y., Kubota C. y Kozai T.** (1992) Culture medium volume as a factor affecting changes with time in concentrations of medium components and growth of plantlets *in vitro*. [Abstract] *Abstract of the International Symposium on Transplant Production Systems*, 139
- Murray M.G. y Thompson W.F.** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, **8**: 4321-4325.
- Nakamura Y., Sawada H., Kobayashi S., Nakajima I. y Yoshikawa M.** (1999) Expression of soybean α -1,3-endoglucanase cDNA and effect on disease tolerance in kiwifruit plants. *Plant Cell Reports*, **18**: 527-532.
- Nakano M. y Mii M.** (1993) Antibiotics stimulate somatic embryogenesis without plant growth regulators in several dianthus cultivars. *Journal of Plant Physiology*, **141**: 721-725.
- Nauerby B., Billing K. y Wyndaele R.** (1997) Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, **123**: 169-177.
- Neuhaus G. y Spangenberg G.** (1990) Plant transformation by microinjection techniques. *Physiologia Plantarum*, **79**: 213-217.
- Niwa Y., Hirano T., Yoshimoto K., Shimizu M. y Kobayashi H.** (1999) Non-invasive quantitative detection and applications of non-toxic, S65T-type green fluorescent protein in living plants. *The Plant Journal*, **18**: 455-463.
- Norelli J.L. y Aldwinckle H.S.** (1993) The role of aminoglycoside antibiotics in the regeneration and selection of Neomycin Phosphotransferase-transgenic apple tissue. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **118**: 311-316.
- Norelli J.L., Mills J. y Aldwinckle H.** (1996) Leaf wounding increases efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *HortScience*, **31**: 1026-1027.
- Nowak B., Miczynski K. y Hudy L.** (2004) Sugar uptake and utilisation during adventitious bud differentiation on *in vitro* leaf explants of 'Wegierka Zwyczajna' plum (*Prunus domestica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **76**: 255-260.
- Ochatt S.J.** (1991) Strategies for plant regeneration from mesophyll protoplasts of the recalcitrant fruit and farmwoodland species *Prunus avium* L (Sweet Wild Cherry), *Rosaceae*. *Journal of Plant Physiology*, **139**: 155-160.
- Ochatt S.J.** (1992) The development of protoplast-to-tree systems for *Prunus cerasifera* and *Prunus spinosa*. *Plant Science*, **81**: 253-259.

- Ochatt S.J., Chand P.K., Rech E.L., Davey M.R. y Power J.B. (1988) Electroporation-mediated improvement of plant regeneration from colt cherry (*Prunus avium* × *pseudocerasus*) protoplasts. *Plant Science*, **54**: 165-169.
- Ochatt S.J., Cocking E.C. y Power J.B. (1987) Isolation, culture and plant regeneration of colt cherry (*Prunus avium* × *pseudocerasus*) protoplasts. *Plant Science*, **50**: 139-143.
- Ochatt S.J. y Power J.B. (1988) An alternative approach to plant regeneration from protoplasts of sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Plant Science*, **56**: 75-79.
- Owens L.D. (1979) Kanamycin promotes morphogenesis of plant tissues. *Plant Science Letters*, **16**: 225-230.
- Peña L., Martín-Trillo M., Juárez J.A., Pina J.A., Navarro L. y Martínez-Zapater J.M. (2001) Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. *Nature Biotechnology*, **19**: 263-267.
- Peña L. y Navarro A. (1999) Transgenic Citrus. En: Transgenic trees. (Bajaj, Y.P.S. ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp.:39-54.
- Pérez-Clemente R.M., Pérez-Sanjuán A., García-Férriz L., Beltrán J.P. y Cañas L.A. (2004) Transgenic peach plants (*Prunus persica* L.) produced by genetic transformation of embryo sections using the green fluorescent protein (GFP) as an in vivo marker. *Molecular Breeding*, **14**: 419-427.
- Pérez-Gonzales S. (1992) Associations Among Morphological and Phenological Characters Representing Apricot Germplasm in Central Mexico. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **117**: 486-490.
- Pérez-Tornero O. y Burgos L. (2000) Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **63**: 133-141.
- Pérez-Tornero O., Burgos L. y Egea J. (1999) Introduction and establishment of apricot *in vitro* through the regeneration of shoots from meristem tips. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, **35**: 249-253.
- Pérez-Tornero O., Egea J., Vanoostende A. y Burgos L. (2000) Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. *Plant Science*, **158**: 61-70.
- Pieterse R.E. (1989) Regeneration of plants from callus and embryos of 'Royal' apricot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **19**: 175-179.
- Pooler M.R. y Scorza R. (1995) Regeneration of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] rootstock cultivars from cotyledons of mature stored seed. *HortScience*, **30**: 355-356.
- Prins M. (2003) Broad virus resistance in transgenic plants. *Trends in Biotechnology*, **21**: 373-375.
- Pua E.C., Sim G.E., Chi G.L. y Kong L.F. (1996) Synergistic effect of ethylene inhibitors and putrescine on shoot regeneration from hypocotyl explants of Chinese radish (*Raphanus sativus* L. var. *longipinnatus* Bailey) *in vitro*. *Plant Cell Reports*, **15**: 685-690.
- Puite K. y Schaart J. (1999) *Agrobacterium* mediated transformation of the apple cultivars 'Gala', 'Golden' and 'Elstar', and the strawberry cultivars 'Gariguette', 'Polka' and 'Elsanta'. *Acta Horticulturae*, **484**: 547-553.
- Puterka G.J., Bocchetti C., Dang P., Bell R.L. y Scorza R. (2002) Pear transformed with a lytic petide gene for disease control affects nontarget organism, Pear *Psylla* (Homoptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology*, **95**: 797-802.
- Quan Y., Minocha R. y Minocha S.C. (2002) Genetic manipulation of polyamine metabolism in poplar II: effects on ethylene biosynthesis. *Plant Physiol Biochem*, **40**: 929-937.
- Quoirin M. y Lepoivre P. (1977) Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Horticulturae*, **78**: 437-442.
- Ravelonandro M., Briard P., Monsion M., Scorza R. y Renaud R. (2002) Stable transfer of the plum pox virus (PPV) capsid transgene to seedlings of two French cultivars 'Prunier d'Ente 303' and 'Quetsche 2906', and preliminary results of PPV challenge assays. *Acta Horticulturae*, **577**: 91-96.
- Ravelonandro M., Scorza R., Bachelier J.C., Labonne G., Levy L., Damsteegt V.D., Callahan A.M. y Dunez J. (1997) Resistance of transgenic *Prunus domestica* to plum pox virus infection. *Plant Disease*, **81**: 1231-1235.

- Reynold J.P., Mourgues F., Norelli J.L., Aldwinckle H.S., Brisset M.N. y Chevreau E. (1999) First evidence for improved resistance to fire blight in transgenic pear expressing the *attacin E* gene from *Hyalophora cecropia*. *Plant Science*, **149**: 23-31.
- Rodrigo J. y Herrero M. (2002) Effects of pre-blossom temperatures on flower development and fruit set in apricot. *Scientia Horticulturae*, **92**: 125-135.
- Rugini E. (1992) Involvement of polyamines in auxin and *Agrobacterium rhizogenes* induced rooting of fruit trees *in vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **117**: 532-536.
- Rugini E. y Mariotti D. (1991) *Agrobacterium Rhizogenes* T-DNA genes and rooting in woody species. *Acta Horticulturae*, **300**: 301-308.
- Rugini E., Pellegrineschi A., Mencuccini M. y Mariotti D. (1991) Increase of rooting ability in the woody species kiwi (*Actinidia deliciosa* A. Chev.) by transformation with *Agrobacterium rhizogenes* rol genes. *Plant Cell Reports*, **10**: 291-295.
- Sanford J.C. (1990) Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum*, **79**: 206-209.
- Schneider K.E., Speranzini D. y Biggs A.R. (1992) Ontogeny of shoot regenerants on excised immature peach embryos. *Canadian Journal of Plant Science*, **72(2)**: 497-506.
- Schuerman P.L. y Dandekar A.M. (1993) Transformation of temperate woody crops - Progress and Potentials. *Scientia Horticulturae*, **55**: 101-124.
- Scorza R. (2001) Progress in tree fruit improvement through molecular genetics. *HortScience*, **36**: 855-858.
- Scorza R., Callahan A., Levy L., Damsteegt V.D., Webb K. y Ravelonandro M. (2001) Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant transgenic European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene. *Transgenic Research*, **10**: 201-209.
- Scorza R., Cordts J.M., Gray D.J., Gonsalves D., Emershad R.L. y Ramming D.W. (1996) Producing transgenic 'Thompson Seedless' grape (*Vitis vinifera* L.) plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **121**: 616-619.
- Scorza R., Hammerschlag F.A., Zimmerman T.W. y Cordts J.M. (1995a) Genetic transformation in *Prunus persica* (peach) and *Prunus domestica* (plum). En: Plant protoplasts and genetic engineering VI. (Bajaj, Y.P.S. ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp.:255-268.
- Scorza R., Levy L., Damsteegt V.D., Yepes L.M., Cordts J.M., Hadidi A., Slightom J. y Gonsalves D. (1995b) Transformation of plum with the papaya ringspot virus coat protein gene and reaction of transgenic plants to plum pox virus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **120**: 943-952.
- Scorza R., Morgens P.H., Cordts J.M., Mante S. y Callahan A.M. (1990) *Agrobacterium*-mediated transformation of peach (*Prunus persica* L. Batsch) leaf segments, immature embryos, and long-term embryogenic callus. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, **26**: 829-834.
- Scorza R., Ravelonandro M., Callahan A.M., Cordts J.M., Fuchs M., Dunez J. y Gonsalves D. (1994) Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the plum pox virus coat protein gene. *Plant Cell Reports*, **14**: 18-22.
- Sheen J., Hwang S., Niwa Y., Kobayashi H. y Galbraith D. (1995) Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *The Plant Journal*, **8**: 777-784.
- Sheikholeslam S.N. y Weeks D.P. (1987) Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, **8**: 291-298.
- Shoeb F., Yadav J.S., Bajaj S. y Rajam M.V. (2001) Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. *Plant Science*, **160**: 1229-1235.
- Smigocki A.C. y Hammerschlag F.A. (1991) Regeneration of plants from peach embryo cells infected with a shooty mutant strain of *Agrobacterium*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **116**: 1092-1097.
- Songstad D.D., Duncan D.R. y Widholm J.M. (1988) Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, silver nitrate, and nobornadiene on plant regeneration from maize callus cultures. *Plant Cell Reports*, **7**: 262-265.
- Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, **98**: 503-517.
- Sriskandarajah S., Goodwin P.B. y Speirs J. (1994) Genetic transformation of the apple scion cultivar 'Delicious' via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **36**: 317-329.

- Stachel S.E., Messens E., Van Montagu M. y Zambryski P. (1985) Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, **318**: 624-629.
- Sturtevant A.P. y Beachy R.N. (1993) Virus resistance in transgenic plants - coat protein - mediated resistance. En: Transgenic Plants. Fundamentals and Applications. (Hiatt, A. ed.) Marcel Dekker, Inc., New York. Basel. Hong Kong, pp.:93-112.
- Szankowski I., Briviba K., Fleschhut J., Schönherr J., Jacobsen H.J. y Kiesecker H. (2003) Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*). *Plant Cell Reports*, **22**: 141-149.
- Tang H.R., Ren Z.L., Reustle G. y Krczal G. (2002) Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars. *Scientia Horticulturae*, **93**: 235-244.
- Tang W. (2003) Additional virulence genes and sonication enhance *Agrobacterium tumefaciens*-mediated loblolly pine transformation. *Plant Cell Reports*, **21**: 555-562.
- Tao R., Dandekar A.M., Uratsu S.L., Vail P.V. y Tebbets J.S. (1997) Engineering genetic resistance against insects in japanese persimmon using the *cryIA(c)* gene of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **122**: 764-771.
- Tepfer D. (1990) Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiologia Plantarum*, **79**: 140-146.
- Trainotti L., Spolaore S., Ferrarese L. y Casadoro G. (1997) Characterization of *ppEG1*, a member of a multigene family which encodes endo- β -1,4-glucanase in peach. *Plant Molecular Biology*, **34**: 791-802.
- Vancanneyt G., Schmidt R., O'Connor-Sanchez A., Willmitzer L. y Rocha-Sosa M. (1990) Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular General Genetics*, **220**: 245-250.
- Vernade D., Herrera-Estrella A., Wang K. y Van Montagu M. (1988) Glycine betaine allows enhanced induction of the *Agrobacterium tumefaciens vir* genes by acetosyringone at low pH. *Journal of Bacteriology*, **170**: 5822-5829.
- Vidal J.R., Kikkert J.R., Wallace P.G. y Reisch B.I. (2003) High-efficiency biolistic co-transformation and regeneration of 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) containing *npt-II* and antimicrobial peptide genes. *Plant Cell Reports*, **22**: 252-260.
- Villar B., Oller J.J., Teulieres C., Boudet A.M. y Gallego P.P. (1999) *In planta* transformation of adult clones of *Eucalyptus globulus* spp using an hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain. En: Proceedings of application of biotechnology to forest genetics. Biofor-99. (Espinell, S. y Ritter, E. eds.) Vitoria, pp.:373-385.
- Wang Q., Li P., Hanania U., Sahar N., Mawassi M., Gafny R., Sela I., Tanne E. y Perl A. (2005) Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency and transgenic plant regeneration of *Vitis vinifera* L. by optimizing selection regimes and utilizing cryopreserved cell suspensions. *Plant Science*, **168**: 565-571.
- Weber G., Monajembashi S., Greulich K.O. y Wolfrum J. (1998) Genetic manipulation of plant cells and organelles with a laser microbeam. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **12**: 219-222.
- Welander M. (1988) Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised *in vitro* from mature apple trees. *Journal of Plant Physiology*, **132**: 738-744.
- Welander M. y Maheswaran G. (1992) Shoot regeneration from leaf explants of dwarfing apple rootstocks. *Journal of Plant Physiology*, **140**: 223-228.
- Welander M., Pawlicki N., Holefors A. y Wilson F. (1998) Genetic transformation of the apple rootstock M26 with the *RoB* gene and its influence on rooting. *Journal of Plant Physiology*, **153**: 371-380.
- Yamamoto T., Iketani H., Ieki H., Nishizawa Y., Notsuka K., Hibi T., Hayashi T. y Matsuta N. (2000) Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Reports*, **19**: 639-646.
- Yancheva S.D., Druart P. y Watillon B. (2002) *Agrobacterium*-mediated transformation of plum (*Prunus domestica* L.). *Acta Horticulturae*, **577**: 215-217.
- Yancheva S.D., Golubowicz S., Fisher E., Lev-Yadun S. y Flaishman M.A. (2003) Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during *in vitro* organogenesis in apple. *Plant Science*, **165**: 299-309.

- Yang S.F. y Hoffman N.E.** (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol*, **35**: 155-189.
- Yang Z.N., Ingelbrecht I.L., Louzada E., Skaria M. y Mirkov T.E.** (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). *Plant Cell Reports*, **19**: 1203-1211.
- Ye X.J., Brown S.K., Scorza R., Cordts J.M. y Sanford J.C.** (1994) Genetic transformation of peach tissues by particle bombardment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **119**: 367-373.
- Yepes L.M. y Aldwinckle H.S.** (1994a) Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **37**: 257-269.
- Yepes L.M. y Aldwinckle H.S.** (1994b) Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. *Plant Growth Regulation*, **15**: 55-67.
- Yu C.H., Huang S., Chen C.X., Deng Z.N., Ling P. y Gmitter F.G.** (2002) Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrange. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **71**: 147-155.
- Yu T.A., Yeh S.D. y Yang J.S.** (2001) Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. *Bot Bull Acad Sin*, **42**: 281-286.
- Zhu L.H., Holefors A., Ahlman A., Xue Z.T. y Welander M.** (2001) Transformation of the apple rootstock M.9/29 with the *roB* gene and its influence on rooting and growth. *Plant Science*, **160**: 433-439.
- Zhu L.H., Li X.Y., Ahlman A. y Welander M.** (2003) The rooting ability of the dwarfing pear rootstock BP10030 (*Pyrus communis*) was significantly increased by introduction of the *roB* gene. *Plant Science*, **165**: 829-835.
- Zhu L.H. y Welander M.** (2000) Adventitious shoot regeneration of two dwarfing pear rootstocks and the development of a transformation protocol. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, **75**: 745-752.
- Zuo J., Niu Q.W., Ikeda Y. y Chua N.H.** (2002) Marker-free transformation: increasing transformation frequency by the use of regeneration-promoting genes. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**: 173-180.