



UNIVERSIDAD DE MURCIA



CEBAS-CSIC

**Desarrollo de un Protocolo de Transformación
Genética de Albaricoquero Independiente del Genotipo**

Hong Wang

2011

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 5 |
| SUMMARY | 7 |
| JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | 9 |
| CAPÍTULO I..... | 11 |
| 1. LIMITACIONES DE LA MEJORA GENÉTICA CLÁSICA DE ESPECIES FRUTALES LEÑOSOS | 15 |
| 2. POSIBILIDADES Y LIMITACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL | 16 |
| 2.1. Cultivo de tejidos | 16 |
| 2.2. Transformación genética | 17 |
| 2.3. Limitaciones de la transformación genética de frutales..... | 19 |
| 3. FACTORES QUE AFECTAN LA REGENERACIÓN DE FRUTALES LEÑOSOS | 21 |
| 3.1. Explanto | 21 |
| 3.2. Estado fisiológico..... | 21 |
| 3.3. Edad..... | 22 |
| 3.4. Reguladores..... | 22 |
| 3.5. Agente solidificante..... | 22 |
| 3.6. Otros compuestos | 22 |
| 3.7. Condiciones de cultivo | 23 |
| 3.8. Genotipo..... | 23 |
| 4. FACTORES CRÍTICOS EN LA TRANSFORMACIÓN DE FRUTALES LEÑOSOS..... | 23 |
| 4.1. El tipo de explanto, estado fisiológico y genotipo..... | 23 |
| 4.2. La técnica | 24 |
| 4.3. Selección de transformantes | 25 |
| 5. PRINCIPALES APLICACIONES DE LOS FRUTALES LEÑOSOS TRANSGÉNICOS. “ESTADO DEL ARTE” | 26 |
| 5.1. Manzano (<i>Malus × domestica</i> Borkh.) | 27 |
| 5.2. Uva (<i>Vitis vinifera</i> L.) | 27 |
| 5.3. Peral (<i>Pyrus communis</i> L.) | 28 |
| 5.4. Melocotonero (<i>Prunus persica</i> L.) | 29 |
| 5.5. Ciruelo (<i>Prunus domestica</i> L. y <i>Prunus salicina</i> L.)..... | 30 |
| 5.6. Almendro (<i>Prunus dulcis</i> [Miller] D.A. Webb) | 31 |
| 5.7. Albaricoquero (<i>Prunus armeniaca</i> L.) | 32 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 33 |
| CAPÍTULO II..... | 45 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 49 |
| 2. MATERIAL Y MÉTODOS | 51 |
| 2.1. Cotiledón | 51 |
| 2.2. Hipocotilo..... | 55 |
| 2.3. Toma de datos y tratamientos estadísticos | 59 |

| | |
|---|------------|
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 60 |
| 3.1. Cotiledón | 60 |
| 3.2. Hipocotilo | 68 |
| 4. CONCLUSIÓN | 79 |
| 5. BIBLIOGRAFÍA..... | 81 |
| CAPÍTULO III..... | 87 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 91 |
| 2. MATERIAL Y MÉTODOS | 95 |
| 2.1. Material vegetal | 95 |
| 2.2. Preparación del explanto | 95 |
| 2.3. Experimentos de regeneración..... | 95 |
| 2.4. Efecto de la concentración de antibióticos sobre la regeneración de ‘Helena’ sin transformar.... | 96 |
| 2.5. Transformación de cuatro variedades de albaricoquero | 96 |
| 2.6. Recuperación, proliferación, elongación | 98 |
| 2.7. Evaluación de plantas transgénicas..... | 98 |
| 2.8. Toma de datos y tratamientos estadísticos..... | 98 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 100 |
| 3.1. Regeneración | 100 |
| 3.2. Efecto de los antibióticos sobre la regeneración de ‘Helena’ | 103 |
| 3.3. Transformación..... | 104 |
| 3.4. Producción de quimeras..... | 109 |
| 4. CONCLUSIÓN | 110 |
| 5. BIBLIOGRAFÍA..... | 112 |
| CAPÍTULO IV | 119 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 123 |
| 1.1. Selección de plantas transgénicas utilizando genes de resistencia a agentes tóxicos | 123 |
| 1.2. Marcadores alternativos a los de resistencia a antibióticos o herbicidas | 124 |
| 1.3. El sistema <i>pmi/manosa</i> | 124 |
| 2. MATERIAL Y MÉTODOS | 128 |
| 2.1. Material vegetal y cultivo <i>in vitro</i> | 128 |
| 2.2. Efecto de la manosa sobre el material no transformado | 128 |
| 2.3. Transformación..... | 129 |
| 2.4. Recuperación de yemas regeneradas y estrategia de selección..... | 130 |
| 2.5. Evaluación de las plantas transformadas | 131 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 132 |
| 3.1. Curvas dosis-respuesta a manosa para la regeneración de ‘Helena’ sin transformar..... | 132 |
| 3.2. Efecto de la manosa sobre la micropropagación del material no transformado..... | 132 |
| 3.3. Regeneración y selección de plantas transgénicas..... | 136 |
| 3.4. Evaluación de las plantas transgénicas | 137 |
| 4. CONCLUSIÓN | 141 |
| 5. BIBLIOGRAFÍA..... | 142 |

| | |
|----------------------------------|------------|
| CAPÍTULO V | 149 |
| 1. DISCUSIÓN GENERAL..... | 151 |
| 2. CONCLUSIONES | 157 |
| 3. BIBLIOGRAFÍA | 159 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 162 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 163 |

RESUMEN

El albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) es una de las especies más relevantes, a nivel económico, dentro de los frutales de hueso, en los países de la Cuenca Mediterránea. Los programas de mejora genética de esta especie se han centrado en varios aspectos fundamentales: calidad, época de maduración, autocompatibilidad y resistencia a virus.

El desarrollo de protocolos de transformación genética podría permitir obtener variedades mejoradas de forma discreta en un plazo relativamente corto. La mayoría de los protocolos de transformación desarrollados en especies de *Prunus* han utilizado explantos juveniles procedentes de semillas. Entre ellos cabe destacar un protocolo desarrollado para ciruelo europeo que transforma hipocotilos con elevada eficiencia. Sería muy interesante disponer en albaricoquero de un protocolo eficiente de transformación similar utilizando como explantos semillas maduras, ya que sería muy útil para abordar diferentes objetivos como pruebas de concepto (comprobación de construcciones, desarrollar protocolos para eliminar marcadores, etc.) o estudios de genómica funcional evaluando la actividad de determinados genes en esta especie. Asimismo, resultaría de gran interés para la obtención de patrones de albaricoquero transgénicos ya que la mayoría de las variedades de albaricoquero se injertan sobre patrones francos (semillas germinadas de albaricoquero) porque no existen patrones comerciales de esta especie. Otra ventaja que tiene utilizar semillas maduras es que podemos disponer de este material durante todo el año si se conserva en frío.

En este trabajo se ha estudiado la posibilidad de desarrollar un método de regeneración y transformación para producir plantas transgénicas de albaricoquero con secciones de hipocotilo y cotiledones a partir de semillas maduras de las variedades de albaricoquero ‘Canino’, ‘Moniquí’ y ‘Dorada’ y de la subespecie de albaricoquero, *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim, cuyas semillas se utilizan para producir patrones para albaricoquero y otros frutales en China. Se ha conseguido establecer un protocolo de regeneración con los cotiledones de semillas de ‘Canino’ y del patrón, *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim obteniendo porcentajes de regeneración muy elevados (66%) que no se vieron afectados por el genotipo. Sin embargo, la falta de coincidencia de las células que regeneran con las células que son transformadas por *Agrobacterium* ha impedido la obtención de plantas transformadas hasta el momento.

Utilizando los explantos de secciones de hipocotilos de semillas maduras de tres variedades comerciales de albaricoquero, ‘Dorada’, ‘Moniquí’ y ‘Canino’, se ha

establecido un protocolo de regeneración eficiente, con un mínimo del 32% de regeneración para las tres variedades estudiadas, que ha permitido abordar experimentos de transformación. Además, se han conseguido plantas transgénicas de las variedades 'Dorada' y 'Moniquí'.

El principal interés de la transformación genética de especies frutales reside en la posibilidad de transformar variedades comerciales con interés agronómico y ampliamente aceptadas. Sin embargo, para que la transformación genética se convierta en una herramienta de uso común en los programas de mejora de frutales leñosos se requiere que los procedimientos sean reproducibles, de elevada eficiencia e independientes del genotipo. La utilización de material adulto garantiza la identidad genética del material vegetal y evita los problemas de juvenilidad en aquellas especies en las que estos periodos son muy largos. Con el fin de explorar la posibilidad de desarrollar un protocolo de transformación independiente del genotipo, en esta tesis se ha estudiado el desarrollo de una nueva metodología basada en la transformación de células con capacidad meristemática. Se ha conseguido transformar cuatro variedades de albaricoquero, 'Helena', 'Canino', 'Rojo Pasión' y 'Lorna', con eficiencias de transformación que se encuentran entre las más elevadas descritas en especies de *Prunus*. Las ventajas de esta metodología son la sencillez del protocolo utilizado, su consistencia y rapidez. Sin embargo, hemos detectado que con mucha frecuencia se producen plantas quiméricas al transformar las células meristemáticas.

Otro inconveniente en los protocolos de transformación es la utilización de genes marcadores. Estos genes producen un rechazo social e incluso existe una directiva europea (2001/18/CE) que regula las plantas transformadas con genes de resistencia a antibióticos. El uso del gen *pmi* como marcador de selección podría reducir el rechazo de la opinión pública y facilitar los tramites legales para la comercialización de plantas transgénicas, ya que la proteína que codifica este gen no representa un riesgo para la salud humana ni para el medio ambiente. En la presente tesis se ha estudiado el desarrollo de un protocolo de transformación genética de albaricoquero que utiliza el sistema *pmi*/manosa para seleccionar las plantas transformadas. Con este sistema se ha conseguido producir plantas transgénicas de albaricoquero con una eficiencia similar a la obtenida con genes marcadores de selección que confieren resistencia a antibióticos, demostrando que puede ser un sistema de selección alternativo al uso de antibióticos.

SUMMARY

Apricot (*Prunus armeniaca* L.) is one of the most economically relevant species, within the stone fruit trees, in Mediterranean countries. Breeding programmes are aimed to produce new cultivars with high fruit quality, extended ripening time, self-compatibility and virus resistance.

Genetic engineering may allow the production of new improved cultivars by mean of discrete changes in a relatively short period.

Most of developed transformation procedures for *Prunus* species use juvenile material from seeds. Among them, a very high efficient *Agrobacterium*-mediated transformation protocol from plum hypocotyls can be highlighted. In the present work we studied the possibility of developing a similar *Agrobacterium*-mediated transformation protocol of mature seed-derived tissues from apricot. Such methodology would allow the confirmation of an hypothesis when there is no need or interest in producing improved cultivars (i.e. testing new constructions or developing protocols for marker genes elimination), and also would be useful for functional genomic studies by evaluating the activity of genes in this species. Furthermore, it will be of interest for producing transgenic rootstocks, since most apricot cultivars are grafted onto apricot seedlings. Other advantage of this methodology is that mature seeds can be available during long periods of time under cold storage conditions.

Mature seed hypocotyl slices or cotyledons from the apricot cultivars ‘Canino’, ‘Dorada’, ‘Moniquí’ and apricot subspecies *Prunus armeniaca* L. cv. *ansu* Maxim, used as apricot rootstocks in China, were used as the source of explants. Adventitious shoot regeneration from apricot mature seeds cotyledons from ‘Canino’ and the rootstock, *Prunus armeniaca* L. cv. *ansu* Maxim, has been achieved in high percentages (66%), which were not affected by genotype. However, transgenic plants have not been recovered due to lack of coincidence between cells regenerating and those transformed by *Agrobacterium*.

An efficient regeneration protocol from the cultivars ‘Canino’, ‘Moniquí’ and ‘Dorada’ have been established using mature seeds hypocotyl slices, with regeneration percentages higher than 32% for all cultivars, which has allowed transformation experiments. Furthermore, transgenic plants of ‘Dorada’ and ‘Moniquí’ cultivar were produced.

Plant transformation could be a powerful tool for fruit breeding if transformation procedures for elite and commercially appreciated cultivars was available. Gene transfer technologies should be reproducible, efficient and genotype-independent. Transformation of adult material guarantees genetic identity of transgenic plants and avoids long juvenile periods. In this Ph.D. thesis a methodology to develop such a procedure has been studied, based in cells with meristematic capability. We have transformed the apricot cultivars 'Helena' 'Canino', 'Rojo Pasión' and 'Lorna', with transformation efficiencies, based on PCR analysis, among the highest reported after transformation of other *Prunus* species. The advantages of this methodology are that is simple, fast and consistent. However, a large frequency of chimerical plants has been detected when transforming meristematic cells.

Another problem of most transformation procedures is that they use marker genes. These produce a social rejection and there is an European law that neither allow deliberate release of plants carrying antibiotic resistance genes, used in veterinary or medicine, after 2004 nor their commercialisation after 2008 (Directive 2001/18/EEC of the European Parliament and the Council of the European Union). Since the PMI protein has revealed no adverse effects on human health and on the environment, the use of the *pmi* gen as a selectable marker could reduce the social rejection, facilitating legalisation and commercialisation of transgenic plants.

In this Ph.D. thesis we have evaluated a transformation procedure using the *pmi*/mannose system for selecting apricot transgenic plants. Transformation efficiencies were similar to those obtained using antibiotic selection, demonstrating that this system could be an alternative for producing apricot transgenic plants under safe conditions for human health and the environment.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Más de la mitad de la producción mundial de albaricoques, que oscila alrededor de los 2,6 millones de toneladas (FAO, 2005), corresponde a los países de la cuenca mediterránea. España es uno de los principales países productores de albaricoque del mundo. Tiene una gran tradición exportadora, siendo a su vez este fruto la base de una importante industria de transformación, de tal forma que el volumen total de negocio asociado al mismo puede cifrarse en unos 150 millones de euros anuales. Dentro de España, las Comunidades de Murcia y Valencia poseen el 76% de la superficie cultivada y el 80% de la producción.

La ingeniería genética 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 introducir cambios pequeños, discretos y definidos en genotipos establecidos.

Para la aplicación de la mayoría de las modernas aproximaciones genéticas a la mejora de plantas se requiere una regeneración *de novo* eficiente de plantas a través del cultivo de células y tejidos. Sólo unos pocos años atrás, las especies de frutales leñosos eran consideradas difíciles o imposibles de regenerar *in vitro*. Para muchas especies leñosas se han descrito, sólo recientemente, procedimientos eficientes y reproducibles de regeneración.

En el caso concreto del albaricoquero, nuestro grupo ha desarrollado protocolos para la regeneración adventicia de brotes a partir de hojas así como para la transformación eficiente de las hojas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Además, se ha optimizado una estrategia de selección de plantas transformadas basada en un gen introducido que confiere resistencia a antibióticos.

El protocolo de transformación que se desarrolló en nuestro grupo para la variedad de albaricoquero 'Helena' es muy dependiente del genotipo y funciona bien con esta variedad, muy mal con la variedad 'Canino' y nada con otras variedades probadas. Para los objetivos de nuestro grupo resultaría muy importante disponer de un protocolo que nos permitiera transformar la variedad más adecuada en función de la característica que queremos introducir. Por esta razón, en este trabajo hemos explorado la posibilidad de desarrollar un protocolo que fuera independiente del genotipo o, al menos, que solo necesitara pequeños cambios para adaptarlo a diferentes variedades. Puesto que el

cuello de botella de los protocolos de transformación suele estar en la regeneración adventicia intentamos desarrollar un protocolo que se basara en células meristemáticas, induciendo su formación o bien utilizando las que permanecen tras eliminar las yemas axilares.

Por otra parte, nos interesa poner a punto un método fácil y eficiente de transformación utilizando material de semillas maduras de distintas variedades de albaricoquero que nos permita abordar diferentes objetivos como realizar pruebas de concepto o estudios de genómica funcional y evaluar la actividad de determinados genes en esta especie. Asimismo, resultaría de gran interés para la obtención de patrones de albaricoquero transgénicos ya que hasta el momento las variedades de albaricoquero se injertan sobre patrones francos (semillas de albaricoquero) ya que no existen patrones comerciales de esta especie.

Los sistemas de selección basados en la resistencia a antibióticos tienen varios problemas que se deben afrontar. La Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea, prohíbe explícitamente la liberación voluntaria (es decir ensayos en campo) de plantas transformadas con genes de resistencia a antibióticos, empleados en veterinaria o medicina, después del 31 de Diciembre del 2004 y su comercialización después del 31 de Diciembre del 2008. Además la preocupación pública con respecto a las consecuencias para el medio ambiente y la salud humana de algunos genes marcadores de selección limita la comercialización de los cultivos transgénicos.

La producción de plantas transgénicas que no utilicen como marcadores de selección genes de resistencia a antibióticos o herbicidas, podría resultar imprescindible para el desarrollo y expansión comercial de las plantas transformadas. En este trabajo se pretende desarrollar un protocolo de transformación genética de albaricoquero que utilice el sistema *pmi/manosa* para seleccionar las plantas transformadas como un sistema de selección alternativo al uso de antibióticos.

El objetivo fundamental de este trabajo es desarrollar un/os protocolo/s de transformación que nos permitan transformar diferentes variedades de albaricoquero de forma eficiente y no tan dependiente del genotipo como el que hasta la fecha se ha desarrollado en el grupo de investigación. Para ello se utilizarán explantos de semillas maduras con características juveniles y agronómicas desconocidas, y por otra parte se trabajará con material adulto que garantice la identidad genética del material vegetal transformando células con capacidad meristemática.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. LIMITACIONES DE LA MEJORA GENÉTICA CLÁSICA DE ESPECIES FRUTALES LEÑOSOS | 15 |
| 2. POSIBILIDADES Y LIMITACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL | 16 |
| 2.1. Cultivo de tejidos | 16 |
| 2.1.1. Micropropagación | 16 |
| 2.1.2. Cultivo de embriones | 16 |
| 2.1.3. Regeneración adventicia vía organogénesis o embriogénesis somática..... | 16 |
| 2.2. Transformación genética | 17 |
| 2.3. Limitaciones de la transformación genética de frutales..... | 19 |
| 3. FACTORES QUE AFECTAN LA REGENERACIÓN DE FRUTALES LEÑOSOS | 21 |
| 3.1. Explanto | 21 |
| 3.2. Estado fisiológico | 21 |
| 3.3. Edad..... | 22 |
| 3.4. Reguladores..... | 22 |
| 3.5. Agente solidificante..... | 22 |
| 3.6. Otros compuestos | 22 |
| 3.7. Condiciones de cultivo | 23 |
| 3.8. Genotipo | 23 |
| 4. FACTORES CRÍTICOS EN LA TRANSFORMACIÓN DE FRUTALES LEÑOSOS..... | 23 |
| 4.1. El tipo de explanto, estado fisiológico y genotipo..... | 23 |
| 4.2. La técnica | 24 |
| 4.3. Selección de transformantes | 25 |
| 5. PRINCIPALES APLICACIONES DE LOS FRUTALES LEÑOSOS TRANSGÉNICOS. “ESTADO DEL ARTE” | 26 |
| 5.1. Manzano (<i>Malus × domestica</i> Borkh.) | 27 |
| 5.2. Uva (<i>Vitis vinifera</i> L.) | 27 |
| 5.3. Peral (<i>Pyrus communis</i> L.)..... | 28 |
| 5.3.1. Explantos con características genéticas desconocidas | 28 |
| 5.3.2. Explantos con características genéticas conocidas..... | 28 |
| 5.4. Melocotonero (<i>Prunus persica</i> L.) | 29 |
| 5.4.1. Explantos con características genéticas desconocidas | 29 |
| 5.4.2. Explantos con características genéticas conocidas..... | 30 |
| 5.5. Ciruelo (<i>Prunus domestica</i> L. y <i>Prunus salicina</i> L.)..... | 30 |
| 5.5.1. Explantos con características genéticas desconocidas | 30 |
| 5.5.2. Explantos con características genéticas conocidas..... | 31 |
| 5.6. Almendro (<i>Prunus dulcis</i> [Miller] D.A. Webb) | 31 |
| 5.6.1. Explantos con características genéticas desconocidas | 31 |
| 5.6.2. Explantos con características genéticas conocidas..... | 31 |
| 5.7. Albaricoquero (<i>Prunus armeniaca</i> L.) | 32 |
| 5.7.1. Explantos con características genéticas desconocidas | 32 |

5.7.2. Explantos con características genéticas conocidas.....32

1. LIMITACIONES DE LA MEJORA GENÉTICA CLÁSICA DE ESPECIES FRUTALES LEÑOSOS

Los programas de mejora genética de frutales se han centrado en varios aspectos fundamentales: calidad, época de maduración, autocompatibilidad, resistencia a virus, etc.

La mejora clásica ha producido variedades élite en casi todas las especies. Sin embargo, la obtención de una variedad mejorada en una especie frutal requiere mucho tiempo debido a los prolongados periodos juveniles característicos de estas especies, que oscila entre 3 y 6 años.

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 o vivero 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 registra una nueva variedad es de 10 años, aunque en algunos casos es muy superior.

La gran cantidad de superficie necesaria para el cultivo y estudio de las poblaciones de descendientes segregantes, así como la mano de obra requerida en el cuidado de los árboles hasta que fructifican representan una inversión considerable.

Aunque la mayoría de las variedades frutales comerciales han sido desarrolladas a partir de un germoplasma base restringido, permanecen en gran medida heterocigóticas para muchos loci y su autopolinización generalmente produce una población de descendientes muy variable. Los efectos de la heterocigosidad son más evidentes cuando el cruzamiento se realiza entre genotipos de orígenes alejados o entre formas cultivadas y no cultivadas comercialmente. Generaciones adicionales pueden ser necesarias para producir frutos de calidad comercial.

Otra limitación de la mejora genética clásica es cuando no existe el carácter deseado en el germoplasma de una determinada especie. Puede ser el caso de la resistencia a

determinados insectos, hongos, virus o nemátodos.

2. POSIBILIDADES Y LIMITACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

2.1. Cultivo de tejidos

2.1.1. Micropropagación

Las técnicas de cultivo *in vitro* han permitido a los mejoradores incrementar las eficiencias de los programas de mejora. La micropropagación ha sido empleada para la producción comercial de variedades de frutales desde los años 70. Se ha descrito la propagación clonal de varias especies frutales *in vitro*, entre las que se incluyen almendro (Joersbo *et al.*, 1998; Rugini y Verma, 1982; Tabachnik y Kester, 1977), melocotonero y nectarina (Hammerschlag, 1982; Hammerschlag, 1986; Hammerschlag *et al.*, 1987), híbridos de melocotonero x almendro (Marino y Ventura, 1997; Scorza *et al.*, 1990; Tabachnik y Kester, 1977), cerezo y guindo (Hammatt y Grant, 1993; Snir, 1982), ciruelo (Druart, 1992) y albaricoquero (Murai *et al.*, 1997; Pérez-Tornero y Burgos, 2000b; Pérez-Tornero *et al.*, 2000b; Snir, 1984). La mayoría de la producción comercial de frutales micropropagados se ha enfocado a la producción de patrones, aunque existen ejemplos de micropropagación de variedades comerciales. El cultivo de meristemas ha sido utilizado para obtener material vegetal libre de virus (Kartha, 1984) y para introducir y establecer material vegetal *in vitro* (Pérez-Tornero *et al.*, 1999).

2.1.2. Cultivo de embriones

El cultivo de embriones inmaduros permite la utilización de variedades tempranas, como parental femenino, en programas de mejora, permitiendo germinar semillas que, debido al rápido desarrollo del fruto, aún no han completado su maduración y, por tanto, no son viables utilizando técnicas normales de estratificación y germinación. Varios autores han descrito las metodologías que mejoran el rescate de embriones de vid, melocotonero, ciruelo y albaricoquero (Burgos y Ledbetter, 1993; Emershad y Ramming, 1994; Ramming, 1985; Ramming *et al.*, 2003).

2.1.3. Regeneración adventicia vía organogénesis o embriogénesis somática

También, se han dedicado grandes esfuerzos para desarrollar sistemas eficientes de regeneración de plantas para especies frutales vía organogénesis o embriogénesis somática (Bassi y Cossio, 1991; Druart, 1999; Pérez-Tornero *et al.*, 2000a), lo que es imprescindible para poder desarrollar protocolos de transformación genética.

2.2. Transformación genética

En los últimos años la biotecnología ha desarrollado técnicas con las cuales poder obtener variedades comerciales 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, se puede producir una cantidad ilimitada de material vegetal de la línea transformada, sin necesidad de fijar el carácter por medio de cruzamientos. Además, el hecho de que en la mayoría de especies cultivadas la producción se basa en unas pocas variedades, como por ejemplo en el caso de peral, manzano, guindo o los cítricos, hace que el impacto de la variedad transformada pueda ser mucho mayor (Petri y Burgos, 2005).

Entre las técnicas de transformación genética que han tenido una mayor aceptación y que han sido más aplicadas están la biolística o de bombardeo con ADN desarrollada por Sanford (1990). Consiste básicamente en el bombardeo de la célula (o tejido) con partículas de tungsteno u oro recubiertas con ADN que son aceleradas mediante un “cañón” o “pistola” e impactan sobre el material vegetal atravesando la pared celular, la membrana celular y la 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. Cuando el tejido bombardeado es totipotente (excepto polen), los individuos regenerantes suelen ser quiméricos (Sanford, 1990).

De las técnicas que utilizan vectores, la más versátil y ampliamente utilizada es la transformación mediada por *Agrobacterium*. El descubrimiento de la capacidad de *Agrobacterium* para introducir ADN en células vegetales supuso una revolución en la transformación ya que se ha convertido en 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 transformada. *Agrobacterium* es una bacteria Gram negativa que ataca a tejidos vegetales dañados produciendo un tumor en la planta, la llamada enfermedad de la agalla 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, lo que confiere una gran ventaja ecológica a la bacteria, ya que crea su propio nicho, eliminando así la competencia interespecífica e intraespecífica.

Agrobacterium tumefaciens 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 de transferencia (ADN-T), 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 Ti se pueden diferenciar distintas regiones. Dentro del ADN-T se encuentran la región ONC (responsable de la aparición del tumor mediante el aumento de la síntesis de auxinas y citoquininas) y la región OPS (relacionada con la síntesis de opinas). Fuera del ADN-T se encuentran la región OPC (relacionada con el catabolismo de opinas) y la región *vir* con genes que controlan la transferencia del ADN-T (Gelvin, 2000).

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 los receptores específicos de la célula vegetal. 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* (Gelvin, 2003).

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 donde se ha

introducido un gen foráneo y por un hecho de recombinación homóloga el transgén se introduce entre los bordes del ADN-T. En este caso la región *vir* actúa en *cis* respecto al ADN-T. En los vectores binarios la región *vir* actúa en *trans*. Consiste en dos plásmidos dentro del *Agrobacterium*, por un lado el plásmido Ti desarmado con tan 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 ha utilizado *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 marcadores de selección han sido necesarios para el desarrollo de las tecnologías implicadas en la transformación de plantas porque sólo una proporción muy pequeña de células son transformadas. Por lo tanto, la probabilidad de recuperación de líneas transgénicas sin selección es, normalmente, muy baja.

Los 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 *gus*), aislado de *E. coli*, que hidroliza β -glucurónidos (Vancanneyt *et al.*, 1990) o el gen *gfp* que proviene de la medusa *Aequorea victoria* (Chiu *et al.*, 1996).

Aunque con los marcadores genéticos se seleccionan las células y los individuos transformados, la prueba definitiva de la integración de los transgenes son técnicas moleculares como la PCR (Polymerase Chain Reaction), la prueba de hibridación molecular Southern (Southern, 1975) y la PCR cuantitativa, con la que se ha desarrollado una metodología para detectar quimeras y determinar la obtención de plantas uniformemente transformadas (Faize *et al.*, 2010).

2.3. Limitaciones de la transformación genética de frutales

Dado que la producción de la mayoría de especies de frutales está basada en unos pocos cultivares, el impacto de transformar uno de ellos sería muy importante. Pero en la

mayoría de las especies leñosas, la transformación y regeneración de variedades comerciales no son procesos rutinarios, y sólo son aplicables a algunos genotipos. Este obstáculo supone la limitación más seria para la aplicación de la biotecnología en frutales.

Otro obstáculo es que la legislación europea no permite la liberación voluntaria de plantas transformadas con genes de resistencia a antibióticos que se utilicen en medicina o veterinaria después del 2004 ni su comercialización después del 2008 (Directiva 2001/18/EEC del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea). Por tanto, será prioritario desarrollar procedimientos alternativos a la selección con antibióticos o que permitan la eliminación de los genes marcadores de las plantas transformadas.

Numerosos factores pueden influir de forma crítica en la regeneración y la transformación. El futuro de la transformación genética como una herramienta para la mejora de frutales requiere el desarrollo de procedimientos independientes del genotipo, basados en la transformación de células meristemáticas con un alto potencial de regeneración y/o la utilización de genes promotores de la regeneración (Petri y Burgos, 2005).

El problema de las quimeras ha sido muy poco discutido en la bibliografía y sólo unos pocos autores reconocen su existencia. Su origen parece estar en el hecho de que la organogénesis no se produce a partir de una sola célula sino de un conjunto de células (Poethig, 1989; Zhu *et al.*, 2007). Esto complica la obtención de plantas uniformemente transformadas y, hace que disponer de una estrategia de selección restrictiva y eficiente sea muy determinante. Las quimeras pueden ser interesantes en algunas especies y han sido ampliamente estudiadas en el caso de las plantas ornamentales donde a veces es deseable disponer de quimeras estables. Sin embargo, para la obtención de plantas transformadas de frutales, que es el objetivo de este trabajo, no son deseables y para evitar su producción se debería profundizar más en el estudio de su origen y en la posibilidad de su disociación.

3. FACTORES QUE AFECTAN LA REGENERACIÓN DE FRUTALES LEÑOSOS

Los métodos de transformación requieren la disponibilidad de sistemas de cultivo de tejidos eficientes para que nuevos brotes o plantas puedan ser regenerados vía organogénesis o embriogénesis somática. En frutales, la eficiencia de regeneración adventicia de plantas en la mayoría de las especies es generalmente baja y/o muy dependiente del genotipo. Esto es debido, al menos en parte, a nuestra falta de comprensión de los procesos básicos que subyacen en la organogénesis y en la embriogénesis somática. En última instancia, la utilización de sistemas de cultivo de tejidos para transformar genéticamente, dependerá de una mejor comprensión y control de los mecanismos implicados en el desarrollo de la planta adventicia.

3.1. Explanto

La elección de los explantos apropiados es crítica para la morfogénesis en frutales ya que puede afectar mucho al potencial embriogénico u organogénico. Los explantos más comúnmente utilizados son hojas obtenidas de brotes micropropagados (Ainsley *et al.*, 2000; Druart *et al.*, 1998; Pérez-Tornero y Burgos, 2000b; Pérez-Tornero *et al.*, 2000b). Además de las hojas se han utilizado otros tipos de explantos como cotiledones (Canli y Tian, 2008; Canli y Tian, 2009; Mante *et al.*, 1989), hipocotilos (Mante *et al.*, 1991; Tian *et al.*, 2007), embriones (Schneider *et al.*, 1992) e incluso protoplastos (Ochatt y Power, 1988a; Ochatt y Power, 1988b; Ochatt y Power, 1988c; Patat-Ochatt *et al.*, 1988).

3.2. Estado fisiológico

El estado fisiológico del explanto también suele ser crítico. Normalmente se utilizan explantos que provienen de material micropropagado en fase de proliferación y, en general, se ha observado que las condiciones a las que está sometido el material durante el último subcultivo son muy importantes, ejerciendo una fuerte influencia en la formación de brotes adventicios (Pérez-Tornero *et al.*, 2000a). Algunos autores destacan que la regeneración puede mejorarse utilizando explantos que provienen de brotes proliferados en ausencia o en una baja concentración de citoquininas durante el último subcultivo (Escalalettes 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.

3.3. Edad

La edad del explanto también puede influir en la tasa de regeneración. En general, cuando se utilizan hojas jóvenes como explanto inicial se obtienen mejores resultados (Druart, 1990; Pérez-Tornero y Burgos, 2000a) por lo que se suelen utilizar las 4 primeras hojas apicales. En almendro se observó que los explantos que provenían de material juvenil de semilla producían un mayor porcentaje de regeneración que los explantos de origen adulto, aunque requerían una mayor concentración de citoquinina (tidiazuron) en la inducción. Mante *et al.* (1989) observaron una gran diferencia en la capacidad regenerativa de cotiledones inmaduros de melocotonero dependiendo de la edad de los mismos.

3.4. Reguladores

Los reguladores del crecimiento, tanto el tipo de auxina y citoquinina utilizada como sus concentraciones, modifican significativamente los resultados (Antonelli y Druart, 1990; Goffreda *et al.*, 1995; Hammatt y Grant, 1998; Mante *et al.*, 1989). Diferentes autores han establecido una determinada combinación de los distintos reguladores de crecimiento en su protocolo de regeneración, con los que se obtienen valores óptimos.

3.5. Agente solidificante

El agente solidificante más extendido es el agar, pero este factor también puede influir en la regeneración. Pérez-Tornero *et al.* (2000a) mostraron los efectos de la utilización de distintos agentes observando un claro descenso en la regeneración con la utilización de gelrita como solidificante, mientras que el agar gel produjo resultados similares al agar y un medio más transparente que ayudó a la observación de los explantos.

3.6. Otros compuestos

Los inhibidores del etileno y poliaminas añadidos al medio, han mejorado los resultados de regeneración (Burgos y Alburquerque, 2003; Escalettes y Dosba, 1993; Petri *et al.*, 2005b), aunque en otros casos no se han detectado diferencias significativas con el uso de estos compuestos (Rugini, 1992). Otros factores que pueden afectar la regeneración son la fuente de carbono, que 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).

3.7. 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 $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ producía porcentajes de regeneración mayores que con la utilización de $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. 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.*, 2000a), almendro (Miguel *et al.*, 1996), ciruelo japonés (Canli y Tian, 2009) y cerezo (Canli y Tian, 2008) descendieron drásticamente o fueron nulos en ausencia de un periodo inicial de oscuridad.

3.8. Genotipo

Todos los factores anteriormente citados están influidos, en gran medida, por el genotipo. Los autores que han trabajado con distintas variedades de cualquiera de las especies del genero *Prunus* han observado que el genotipo influye significativamente en la tasa de regeneración. Esto ha sido descrito en albaricoquero (Escalettes *et al.*, 1994; Pérez-Tornero *et al.*, 2000a), almendro (Ainsley *et al.*, 2000), melocotonero (Pooler y Scorza, 1995) y en ciruelo (Escalettes y Dosba, 1993). Protocolos desarrollados para una determinada variedad, funcionan mal o no funcionan en absoluto con otras variedades de la misma especie (Petri y Burgos, 2005).

4. FACTORES CRÍTICOS EN LA TRANSFORMACIÓN DE FRUTALES LEÑOSOS

4.1. El tipo de explanto, estado fisiológico y genotipo

El tipo de explanto utilizado es muy variable. Así, se han utilizado hojas (Ye *et al.*, 1994), cotiledones hipocotilos (Scorza *et al.*, 1995), meristemos (Druart *et al.*, 1998), embriones (Ye *et al.*, 1994) y callos embriogénicos (Scorza *et al.*, 1990).

El estado fisiológico del explanto influye en gran medida en la tasa de transformación. 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).

Al igual que en regeneración, el genotipo, es determinante. Con un protocolo establecido para una determinada variedad no se obtienen los mismos resultados que para otra.

4.2. La técnica

Indudablemente la técnica elegida por el investigador es un factor muy importante. En *Prunus* se ha trabajado principalmente con *A. tumefaciens*, aunque puntualmente también se ha utilizado *A. rhizogenes* y biolística. 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.

La virulencia de las distintas cepas de *Agrobacterium* es diferente en cada especie, e incluso en distintas variedades. Se deberían realizar experimentos de inoculación preliminares para comprobar la compatibilidad entre la especie hospedadora y la estirpe de *Agrobacterium* antes de llevar a cabo la transformación (Cervera *et al.*, 1998). Dolgov *et al.* (1999) describen resultados muy diferentes con hojas del híbrido 'Black Eagle' (*Prunus fruticosa* x *Prunus avium*) según la cepa utilizada. Ainsley *et al.* (2002) y Miguel & Oliveira *et al.* (1999), en almendro, y Yancheva *et al.* (2002) en ciruelo, encontraron diferencias significativas según el genotipo y la cepa de *Agrobacterium* utilizada. Además, se encontraron 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 *A. 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.*, 2001). 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.*, 1992b) 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 co-cultivo con la bacteria es variable según los autores, aunque el más usual es un periodo de 48 horas. Tiempos superiores a 3-4 días suelen originar problemas para controlar el crecimiento posterior de *Agrobacterium*.

4.3. Selección de transformantes

No todas las células del tejido vegetal diana son transformadas y por lo tanto no todas las plantas regeneradas, ya sea por embriogénesis o por organogénesis, estarán transformadas. 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.* (1992b) 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 co-cultivo). Este tiempo suele ser de 48 horas en la mayoría de las referencias. En almendro Miguel y Oliveira (1999) aplicaron una dosis baja de kanamicina (10-15 mg/L) inmediatamente después del co-cultivo y tras 20 días, cuando ya se han desarrollado algunas yemas, aplicaron 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 en ciruelo, incluso de plantas transformadas con el gen *nptII*, mientras que 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 un protocolo eficiente de selección de plántulas transformadas a partir de hipocotilos (Gonzalez-Padilla *et al.*, 2003).

Aplicando el agente selectivo en una etapa temprana obtuvieron igual número de plantas transformadas que retrasando la selección. Sin embargo, esta selección temprana mejoró la eficiencia de selección (número de plantas transformadas frente al número total de plántulas regeneradas) debido a la disminución del número de escapes.

En albaricoquero, Petri *et al.* (2005a) probaron el efecto de los antibióticos aminoglicósidos estreptomina, geneticina (G418), kanamicina y paromomicina sobre la transformación utilizando hojas de la variedad 'Helena'. Cuando las hojas de albaricoquero fueron transformadas con el gen de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*), 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. Paromomicina y kanamicina permitieron una mayor supervivencia de las células transformadas y con estos antibióticos se observó el mayor número de puntos GFP. 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 produjo una selección ineficiente y la aparición de gran cantidad de escapes después del co-cultivo de hojas de albaricoquero con *Agrobacterium*. Las dos concentraciones probadas de kanamicina (25,7 y 40 μM), permitieron un crecimiento significativamente menor de los tejidos transformados que cuando se aplicó paromomicina a 40 μM . En albaricoquero la mayoría de la regeneración se da a partir de callos (Pérez-Tornero y Burgos, 2000a) por lo que 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 en esta especie.

5. PRINCIPALES APLICACIONES DE LOS FRUTALES LEÑOSOS TRANSGÉNICOS. “ESTADO DEL ARTE”

En los frutales leñosos, con largos periodos de juvenilidad y heterocigosidad, que se propagan vegetativamente, sería deseable transformar los genotipos que ya son aceptados comercialmente y que reúnen características agronómicas de interés.

La mayoría de los protocolos de transformación mediante *Agrobacterium* en frutales, se han desarrollado utilizando semillas. Un protocolo de transformación con explantos procedentes de semillas no es efectivo para introducir una determinada característica a una variedad, pues la planta resultante tiene características agronómicas desconocidas.

Sin embargo, puede ser interesante disponer de un protocolo eficiente de transformación

de material juvenil (procedente de semilla) para distintas aplicaciones como, por ejemplo, la evaluación de construcciones o estudios de genómica funcional.

5.1. Manzano (*Malus × domestica* Borkh.)

Utilizando hojas como explantos, la primera variedad de manzano transformada fue 'Greensleeves' (James *et al.*, 1989), con una eficiencia de transformación entre 0,1-0,5%. En la actualidad, con modificaciones de este método se han conseguido transformar más de 30 variedades y 7 patrones de *Malus × domestica*, 2 de *Malus prunifolia* y una de *Malus robusta*, con eficiencias generalmente en el rango de 0,02% a 9%.

Se han producido plantas de manzano resistentes a enfermedades bacterianas como la agalla de corona causada por *Agrobacterium* (Viss *et al.*, 2003) o al fuego bacteriano causado por *Erwinia amylovora* (Ko *et al.*, 2000), resistentes a insectos y tolerantes a hongos como *Ventura inaequalis* causante del moteado del manzano (Faize *et al.*, 2004).

Se han conseguido, asimismo, manzanos con mejor tolerancia a altas y bajas temperaturas, a deficiencias de hierro, con un tamaño reducido, autofértiles o con frutos de mayor calidad. Igualmente, se han evaluado en manzanos diferentes promotores inducibles y/o específicos de determinados tejidos y distintos sistemas de selección (antibióticos, herbicidas, manosa), producción de plantas transgénicas sin marcadores de selección y eliminación de los marcadores (Malnoy *et al.*, 2008b).

5.2. Uva (*Vitis vinifera* L.)

En los años 80 se realizaron los primeros experimentos de transformación genética de vid mediante el co-cultivo con *A. tumefaciens* de explantos de hojas y pecíolo, dando células transformadas en algunos casos, pero no se logró la obtención de plantas transgénicas. Hacia la mitad de los años 90, varios grupos de investigación regeneraron plantas transgénicas vía embriogénesis somática. En los últimos años, el rango de genotipos en los que se ha tenido éxito en la inducción de embriogénesis ha aumentado mucho.

En la actualidad, el sistema más ampliamente utilizado para obtener plantas de vid transgénicas consiste en el co-cultivo de cepas desarmadas de *A. tumefaciens*, que portan plásmidos binarios, con callos embriogénicos o suspensiones celulares (Wang *et al.*, 2005). Los explantos más utilizados para inducir la embriogénesis han sido los embriones zigóticos, hojas, ovarios, estambres, anteras (Bouquet *et al.*, 2008) y

meristemas (Araya *et al.*, 2008). Los zarcillos también se han propuesto como material alternativo para el inicio del cultivo embriogénico (Salunkhe *et al.*, 1997).

Ocasionalmente se han propuesto otras metodologías basadas en la transformación de agregados meristemáticos (Mezzetti *et al.*, 2002) o de brotes completos (Gago, comunicación personal).

Además de producir plantas de vid transformadas con genes marcadores (Iocco *et al.*, 2001), se han obtenido plantas de vid resistentes a enfermedades fúngicas (Yamamoto *et al.*, 2000) y bacterianas (Vidal *et al.*, 2003) mediante la introducción de diferentes genes. Asimismo, se han conseguido plantas de vid con uvas que contienen sólo rudimentos seminales más blandos que las semillas aunque no completamente apirenas (Bouquet *et al.*, 2008). Mediante la inducción de silenciamiento se han obtenido plantas de vid con “resistencia derivada del patógeno” para diferentes virus (Bouquet *et al.*, 2008).

5.3. Peral (*Pyrus communis* L.)

5.3.1. Explantos con características genéticas desconocidas

En esta especie, para obtener planta transformada con hojas como explantos, normalmente, se necesitan 6 meses. Sin embargo, Gao *et al.* (2002) obtuvieron planta transformada en 1,5 meses utilizando cotiledones como explantos. Dos cotiledones de la misma semilla fueron tratados individualmente, uno para tener plantas transformadas, y otro para tener plantas sin transformar, con el motivo de evitar el inconveniente de que el transformante y el control no tuvieran el mismo genotipo. Otra variedad transformada de *Pyrus betulaefolia* fue obtenida por Kaneyoshi *et al.* (2001) utilizando cotiledones como explantos.

5.3.2. Explantos con características genéticas conocidas

La primera variedad transgénica de peral fue obtenida por Mourgues *et al.* (1996), utilizando hojas como explantos. En la actualidad, se han transformado más de 10 variedades de *Pyrus communis*, 3 patrones y una variedad de *Pyrus pyraster*. Las eficiencias de transformación se encuentran entre 1-4% a excepción de las variedades ‘Conference’ y ‘Burakovka’, con las que se consiguieron unas eficiencias de 42% y 59%, respectivamente (Malnoy *et al.*, 2008a).

Se han obtenido plantas de peral resistentes al fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) (Reynoird *et al.*, 1999) o con resistencia a insectos (Puterka *et al.*, 2002). También se

han obtenido plantas con enanismo (Bell *et al.*, 1999) o para probar diferentes promotores inducibles por estrés biótico y abiótico (Gao *et al.*, 2007).

5.4. Melocotonero (*Prunus persica* L.)

Varios autores han publicado protocolos de regeneración utilizando material de semillas (Hammerschlag *et al.*, 1985; Mante *et al.*, 1989; Pooler y Scorza, 1995) u hojas (Zhou *et al.*, 2010) como explantos. Debido a las dificultades con el sistema de regeneración, las pocas publicaciones sobre transformación han utilizado principalmente material de semillas como explantos.

5.4.1. Explantos con características genéticas desconocidas

Una línea de estudio muy interesante se desarrolló utilizando cepas de *A. tumefaciens* sin desarmar conocidas como “shooty mutants”, que tienen una mutación producida por la interrupción con el transposón tn5 del 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.

Mediante la transformación de embriones inmaduros de la variedad ‘Redhaven’, se consiguieron varias líneas transgénicas caracterizadas por una elevada expresión de citoquininas (Smigocki y Hammerschlag, 1991). La estrategia de selección de las células transformadas consistió en un medio pobre en reguladores del crecimiento. En estas condiciones se desarrollaron yemas diferenciadas a partir de callos embriogénicos. La integración del transgén se comprobó 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 mostró 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).

Más tarde, se ha descrito la obtención de plantas transgénicas de melocotonero utilizando secciones longitudinales de embriones procedentes de semillas maduras de la variedad ‘Miraflores’ (Pérez-Clemente *et al.*, 2004). Los brotes que regeneraron en presencia del agente selectivo mostraron elevados niveles de GFP, sobre todo en las

hojas jóvenes apicales. Los análisis PCR y Southern blot confirmaron la integración en el genoma del gen *sgfp*. Estos niveles de expresión de GFP se mantuvieron también en la segunda generación de plantas transgénicas (Pérez-Clemente *et al.*, 2004).

5.4.2. Explantos con características genéticas conocidas

En trabajos iniciales se intentó transformar tallos de brotes de material adulto propagados *in vitro*, aunque sólo se obtuvieron callos transgénicos (Hammerschlag *et al.*, 1989). Casi una década después se publicó la producción de plantas transformadas (Hammerschlag y Smigocki, 1998).

5.5. Ciruelo (*Prunus domestica* L. y *Prunus salicina* L.)

5.5.1. Explantos con características genéticas desconocidas

La transformación genética de ciruelo ha sido estudiada extensamente por el equipo del Dr. Scorza en Virginia Occidental a lo largo de los últimos años, desarrollándose un sistema de transformación genética de hipocotilos de semillas de ciruelo altamente eficaz. Con este sistema y utilizando una construcción que contenía el gen que codifica para la proteína de la cubierta del virus de la sharka (CP-PPV), se obtuvieron plantas transformadas (Scorza *et al.*, 1994). De estos ensayos se ha seleccionado un clon, conocido como C-5, que resultó ser altamente resistente a la infección por el virus (Ravelonandro *et al.*, 1997). 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). El protocolo de transformación utilizado para obtener esta línea C-5 fue mejorado posteriormente mediante la selección temprana de los explantos. La mejora en el enraizamiento y en la aclimatación permitieron obtener plantas transgénicas de forma rutinaria en sólo seis meses (Gonzalez-Padilla *et al.*, 2003). Recientemente, se ha publicado una nueva mejora en este protocolo de transformación. La adición de 2,4-D al medio de co-cultivo incrementó la eficiencia de transformación, basada en Southern blot, hasta un 42%. Las altas eficiencias obtenidas y la rapidez del proceso permitirían utilizar el ciruelo como planta modelo en ensayos de genómica funcional (Petri *et al.*, 2008c).

Posteriormente, el método puesto a punto para la transformación de *Prunus domestica* (Gonzalez-Padilla *et al.*, 2003) ha sido adaptado a *Prunus salicina*, obteniéndose plantas transgénicas con semillas de la variedad ‘Angeleno’ y ‘Larry Anne’ con eficiencias de

0,8 y 0,3%, respectivamente (Urtubia *et al.*, 2008).

5.5.2. Explantos con características genéticas conocidas

Varios investigadores han trabajado con material adulto de ciruelo, transformando hojas de la variedad ‘Marianna GF8-1’ con *A. tumefaciens* y brotes de la variedad ‘Damas de Toulouse’ con *A. rhizogenes*. En ninguno de los dos casos se obtuvo planta transgénica, poniendo de manifiesto una fuerte influencia del genotipo y una reducción drástica en la tasa de regeneración al aplicar el antibiótico de selección (Escalettes *et al.*, 1994). Un incremento paulatino de la presión de selección en cada subcultivo permitió conseguir planta transformada de las variedades ‘Altesse simple’ y ‘Kyustendilska sinyá’ (Yancheva *et al.*, 2002).

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

5.6.1. Explantos con características genéticas desconocidas

En el primer trabajo donde se comunicó la obtención de planta transformada de almendro expresando genes marcadores (Miguel y Oliveira, 1999) se infectaron hojas procedentes de brotes de semillas germinadas *in vitro* de la variedad ‘Boa Casta’. Por lo tanto, se trata de material juvenil de características agronómicas desconocidas. Una mejora en el sistema de transformación a partir del clon VII de ‘Boa Casta’ (Costa *et al.*, 2006) se ha desarrollado obteniendo incrementos en eficiencia de hasta 100 veces superior (12,3%) comparada con el método inicial de transformación para este clon donde resultaban muy bajas (0,1%) debido en gran medida a la baja capacidad de regeneración de los explantos utilizados. Las principales modificaciones se introdujeron con la utilización durante 21 días de 150 μ M de acetosiringona (AS) y en la estrategia de selección, basada en un incremento progresivo de la presión selectiva con kanamicina. La transformación fue confirmada mediante análisis molecular de las plantas por PCR para los genes *nptII* y *gus* y por hibridación Southern para el gen *gus*.

5.6.2. Explantos con características genéticas conocidas

Se han desarrollado protocolos de transformación de almendro utilizando hojas de variedades comerciales (Ainsley *et al.*, 2002; Archilletti *et al.*, 1995). En estos protocolos ha sido importante la utilización de varios días de co-cultivo, así como la selección tardía utilizando kanamicina como antibiótico. Además, se han observado diferencias en función no sólo del genotipo, sino también de la cepa de *A. tumefaciens* utilizada y la importancia de la acetosiringona en el medio de crecimiento de la bacteria

(Ainsley *et al.*, 2002).

Posteriormente, se ha descrito la transformación de material clonal adulto de la variedad ‘Ne Plus Ultra’ utilizando como selección tanto la manosa (gen *pmi*) como la kanamicina (gen *nptII*), con eficiencias del 6,8% y del 5,6%, respectivamente (Ramesh *et al.*, 2006).

5.7. Albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.)

5.7.1. Explantos con características genéticas desconocidas

La primera publicación sobre transformación de *Prunus armeniaca* L. apareció en el año 1992 cuando se consiguieron regenerar plantas transformadas a partir de cotiledones de semillas inmaduras en presencia de kanamicina (Laimer da Câmara Machado *et al.*, 1992a).

Aunque estas plantas se transformaron con el gen que codifica la proteína de cubierta del virus de la sharka, no ha habido publicaciones posteriores que describieran la evaluación de la resistencia a sharka en estas plantas.

5.7.2. Explantos con características genéticas conocidas

Se ha descrito la regeneración y recuperación de plantas transgénicas a partir de hojas de albaricoquero de la variedad ‘Helena’ empleando diferentes estrategias de selección con paromomicina y kanamicina (Petri *et al.*, 2008a; Petri *et al.*, 2008b). La selección con paromomicina resultó ser mucho más eficiente que con kanamicina y los mejores resultados se obtuvieron retrasando la aplicación de las concentraciones inhibitorias de la regeneración al igual que ocurría en almendro (Costa *et al.*, 2006), obteniendo una eficiencia media del 0,9% basadas en amplificación por PCR (Petri *et al.*, 2008a). Posteriormente, se ha utilizado el sistema MAT (multi-auto-transformación) para la transformación de hojas de la variedad ‘Helena’. La construcción pEXMGFP1 combina el gen *ipt* para la selección del material transgénico con un sistema de recombinación *R/RS* que permite la eliminación de los genes marcadores de las plantas transformadas. Las eficiencias de transformación fueron del 3,8 al 8,6% basadas en amplificación por PCR (López-Noguera *et al.*, 2009).

6. BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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.
- Araya S., Prieto H. y Hinrichsen P.** (2008) An efficient buds culture method for the regeneration via somatic embryogenesis of table grapes 'Red Globe' and 'Flame Seedless'. *Vitis*, **47**: 251-252.
- Archilletti T., Lauri P. y Damiano C.** (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation of almond leaf pieces. *Plant Cell Reports*, **14**: 267-272.
- 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.
- 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.
- Bouquet A., Torregrosa L., Iocco P. y Thomas M.R.** (2008) Grapes, En: Transgenic temperate fruits and nuts. (Kole, C. y Hall, T.C., Eds.) Wiley-Blackwell, pp.: 189-231.
- Burgos L. y Albuquerque N.** (2003) Low kanamycin concentration and ethylene inhibitors improve adventitious regeneration from apricot leaves. *Plant Cell Reports*, **21**: 1167-1174.

- Burgos L. y Ledbetter C.A.** (1993) Improved efficiency in apricot breeding: Effects of embryo development and nutrient media on *in vitro* germination and seedling establishment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **35**: 217-222.
- Canli F.A. y Tian L.** (2008) In vitro shoot regeneration from stored mature cotyledons of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, **116**: 34-40.
- Canli F.A. y Tian L.** (2009) Regeneration of adventitious shoots from mature stored cotyledons of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl). *Scientia Horticulturae*, **120**: 64-69.
- Cervera M., Pina J.A., Juárez J.A., Navarro L. y Peña L.** (1998) *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Reports*, **18**: 271-278.
- 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.
- Costa M.S., Miguel C.M. y Oliveira M.M.** (2006) An improved selection strategy and the use of acetosyringone in shoot induction medium increase almond transformation efficiency by 100-fold. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **85**: 205-209.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.** (1992) In vitro culture and micropropagation of plum (*Prunus* spp.), En: Biotechnology in agriculture and forestry. (Bajaj, Y.P.S., Ed.) Springer-Verlag Berlin, Berlin, pp.: 279-303.

- Druart P.** (1999) Somatic embryogenesis in *Prunus* species, En: Somatic embryogenesis in woody plants. (Jain, S.M., Gupta, P., y Newton, R., Eds.) Kluwer Academic Publishers, Great Britain, pp.: 215-235.
- 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.
- Emershad R.L. y Ramming D.W.** (1994) Effects of media on embryo enlargement, germination and plant development in early-ripening genotypes of *Prunus* grown in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **37**: 55-59.
- 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.
- Faize M., Faize L. y Burgos L.** (2010) Using quantitative Real-Time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation. *BMC Biotechnology*, **10**: 53
- 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.
- Gao M., Matsuta N., Murayama H., Toyomasu T., Mitsuhashi W., Dandekar A.M., Tao R. y Nishimura K.** (2007) Gene expression and ethylene production in transgenic pear (*Pyrus communis* cv. 'La France') with sense or antisense cDNA encoding ACC oxidase. *Plant Science*, **173**: 32-42.
- Gao M., Murayana H., Matsuda N., Isuzugawak K. y Dandekar A.M.** (2002) Development of *Agrobacterium*-mediated transformation of pear (*Pyrus communis* L.) with cotyledon explants and production of transgenic pears using ACC oxidase cDNA. *Plant Biotechnology*, **19**: 319-327.
- Gelvin S.B.** (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **51**: 223-256.

- Gelvin S.B.** (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**: 16-37.
- Ghorbel, R., La-Malfa, S., López, M. M., Petit, A., Navarro, L., and Peña, L.** (2001) Additional copies of *virG* from pTiBo542 provide a super-transformation ability to *Agrobacterium tumefaciens* in citrus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **58**: 103-110
- 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.
- Hammatt N. y Grant N.J.** (1993) Apparent rejuvenation of mature wild cherry (*Prunus avium* L) during micropropagation. *Journal of Plant Physiology*, **141**: 341-346.
- 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.** (1982) Factor affecting establishment and growth of peach shoots *in vitro*. *HortScience*, **17**: 85-86.
- Hammerschlag F.A.** (1986) Peach, En: Biotechnology in agriculture and forestry. (Bajaj, Y.P.S., Ed.) Springer-Verlag Berlin, Berlin, pp.: 170-193.
- Hammerschlag F.A., Bauchan G.R. y Scorza R.** (1985) Regeneration of peach plants from callus derived from immature embryos. *Theoretical and Applied Genetics*, **70**: 248-251.
- Hammerschlag F.A., Bauchan G.R. y Scorza R.** (1987) Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of peach cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **8**: 235-242.
- 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.
- 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 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.
- 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.
- Kaneyoshi J., Wabiko H., Kobayashi S. y Tsuchiya T.** (2001) *Agrobacterium tumefaciens* AKE10-mediated transformation of an Asian pea pear, *Pyrus betulaefolia* Bunge: host specificity of bacterial strains. *Plant Cell Reports*, **20**: 628
- Kartha K.K.** (1984) Elimination of viruses, En: Cell culture and somatics cell genetics of plants. (Vasil, I.K., Ed.) Academic Press, Inc., pp.: 577-585.
- Ko K., Norelli J.L., Reynoird J.P., Boresjza-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.
- 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.** (1992a) Regeneration of transgenic plants of *Prunus armeniaca* containing the coat protein gene of Plum Pox Virus. *Plant Cell Reports*, **11**: 25-29.
- Laimer da Câmara Machado M., da Câmara Machado A., Mattanovich D., Regner F., Steinkellner H., Hanzer V., Weiss H., Knapp E. y Katinger H.W.D.** (1992b) Transformation and regeneration of plants of *Prunus armeniaca* with the coat protein gene of Plum Pox virus. *Acta Horticulturae*, 183-189.
- López-Noguera S., Petri C. y Burgos L.** (2009) Combining a regeneration-promoting gene and site-specific recombination allows a more efficient apricot

- transformation and the elimination of marker genes. *Plant Cell Reports*, **28**: 1781-1790.
- Malnoy M., Chevreau E., Bell R.L., Dolgov S.V. y Aldwinckle H.** (2008a) Pears, En: Transgenic temperate fruits and nuts. (Kole, C. y Hall, T.C., Eds.) Wiley-Blackwell, pp.: 53-77.
- Malnoy M., Korban S., Boresjza-Wysocka E. y Aldwinckle H.** (2008b) Apple, En: Transgenic temperate fruits and nuts. (Kole, C. y Hall, T.C., Eds.) Wiley-Blackwell, pp.: 1-52.
- 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.
- Marino G. y Ventura M.** (1997) The influence of ethylene on *in vitro* rooting of GF677 (*Prunus persica* x *Prunus amygdalus*) hybrid peach rootstock. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, **33**: 26-29.
- 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.
- Mourgues F., Chevreau E., Lambert C. y De Bondt A.** (1996) Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L). *Plant Cell Reports*, **16**: 245-249.
- Murai Y., Harada H. y Yamashita H.** (1997) In vitro propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. 'Bakuoh junkyou'. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **66**: 475-480.

- 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. y Power J.B.** (1988a) An alternative approach to plant regeneration from protoplasts of sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Plant Science*, **56**: 75-79.
- Ochatt S.J. y Power J.B.** (1988b) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of Williams' Bon Chretien (syn. Bartlett) pear (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell Reports*, **7**: 587-589.
- Ochatt S.J. y Power J.B.** (1988c) Rhizogenesis in callus from Conference pear (*Pyrus communis* L.) protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **13**: 159-164.
- Patat-Ochatt E.M., Ochatt S.J. y Power J.B.** (1988) Plant regeneration from protoplasts of apple rootstocks and scion varieties (*Malus x domestica* Borkh.). *Journal of Plant Physiology*, **133**: 460-465.
- 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-Tornero O. y Burgos L.** (2000a) Adventitious regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. *Acta Horticulturae*, **538**: 659-662.
- Pérez-Tornero O. y Burgos L.** (2000b) 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.** (2000a) Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. *Plant Science*, **158**: 61-70.
- Pérez-Tornero O., López J.M., Egea J. y Burgos L.** (2000b) Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of the apricot (*Prunus*

- armeniaca*) cv. 'Canino'. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, **75**: 283-286.
- Petri C., Albuquerque N. y Burgos L.** (2005a) The effect of aminoglycoside antibiotics on the adventitious regeneration from apricot leaves and selection of *nptII*-transformed leaf tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **80**: 271-276.
- Petri C., Albuquerque N., Pérez-Tornero O. y Burgos L.** (2005b) Auxin pulses and a synergistic interaction between polyamines and ethylene inhibitors improve adventitious regeneration from apricot leaves and *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **82**: 105-111.
- Petri C. y Burgos L.** (2005) Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect? *Transgenic Research*, **14**: 15-26.
- Petri C., López-Noguera S., Albuquerque N., Egea J. y Burgos L.** (2008a) An antibiotic-based selection strategy to regenerate transformed plants from apricot leaves with high efficiency. *Plant Science*, **175**: 777-783.
- Petri C., Wang H., Albuquerque N., Faize M. y Burgos L.** (2008b) *Agrobacterium*-mediated transformation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) leaf explants. *Plant Cell Reports*, **27**: 1317-1324.
- Petri C., Webb K., Hily J.M., Dardick C. y Scorza R.** (2008c) High transformation efficiency in plum (*Prunus domestica* L.): a new tool for functional genomics studies in *Prunus* spp. *Molecular Breeding*, **22**: 581-591.
- Poethig S.** (1989) Genetic mosaics and cell lineage analysis in plants. *Trends in Genetics*, **5**: 273-277.
- 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.
- Puterka G.J., Bocchetti C., Dang P., Bell R.L. y Scorza R.** (2002) Pear transformed with a lytic peptide gene for disease control affects nontarget organism, *Pear Psylla* (Homoptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology*, **95**: 797-802.
- Ramesh S.A., Kaiser B.N., Franks T., Collins G. y Sedgley M.** (2006) Improved methods in *Agrobacterium*-mediated transformation of almond using positive (mannose/*pmi*) or negative (kanamycin resistance) selection-based protocols. *Plant Cell Reports*, **25**: 821-828.

- Ramming D.W.** (1985) In ovulo embryo culture of early-maturing *Prunus*. *HortScience*, **20**: 419-420.
- Ramming D.W., Emershad R.L. y Foster C.** (2003) *In vitro* factors during ovule culture affect development and conversion of immature peach and nectarine embryos. *HortScience*, **38**: 424-428.
- 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.
- Reynoird 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.
- 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 Verma D.C.** (1982) Micropropagation of difficult-to-propagate almond (*Prunus amygdalus*, Batsch) cultivar. *Plant Science Letters*, **28**: 273-281.
- Salunkhe C.K., Rao P.S. y Mhatre M.** (1997) Induction of somatic embryogenesis and plantlets in tendrils of *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Reports*, **17**: 65-67.
- 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., Levy L., Damsteegt V.D., Yepes L.M., Cordts J.M., Hadidi A., Slightom J. y Gonsalves D.** (1995) 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.
- 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.
- Snir I.** (1982) In vitro propagation of sweet cherry cultivars. *HortScience*, **17**: 192-193.
- Snir I.** (1984) In vitro propagation of 'Canino' apricot. *HortScience*, **19**: 229-230.
- Southern E.M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, **98**: 503-517.
- 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.
- Tabachnik L. y Kester D.E.** (1977) Shoot culture for almond and almond-peach hybrid clones in vitro. *HortScience*, **12**: 545-547.
- Tepfer D.** (1990) Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiologia Plantarum*, **79**: 140-146.
- Tian L., Wen Y., Jayasankar S. y Sibbald S.** (2007) Regeneration of *Prunus salicina* Lindl (Japanese plum) from hypocotyls of mature seeds. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, **43**: 343-3.
- Urtubia C., Devia J., Castro A., Zamora P., Aguirre C., Tapia E., Barba P., Dell'Orto P., Moynihan M.R., Petri C., Scorza R. y Prieto H.** (2008)

- Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Prunus salicina*. *Plant Cell Reports*, **27**: 1333-1340.
- 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.
- 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.
- Viss W.J., Pitrak J., Humann J., Cook M., Driver J. y Ream W.** (2003) Crown-gall-resistant transgenic apple trees that silence *Agrobacterium tumefaciens* oncogenes. *Molecular Breeding*, **12**: 283-295.
- 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.
- 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.
- 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.
- Zhou H.C., Li M., Zhao X., Fan X.C. y Guo A.G.** (2010) Plant regeneration from in vitro leaves of the peach rootstock 'Nemaguard' (*Prunus persica x davidiana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **101**: 79-87.
- Zhu X.Y., Zhao M., Ma S., Ge Y.M., Zhang M.F. y Chen L.P.** (2007) Induction and origin of adventitious shoots from chimeras of *Brassica juncea* and *Brassica oleracea*. *Plant Cell Reports*, **26**: 1727-1732.

CAPÍTULO II

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN DE MATERIAL JUVENIL DE ALBARICOQUERO

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 49 |
| 2. MATERIAL Y MÉTODOS | 51 |
| 2.1. Cotiledón | 51 |
| 2.1.1. Preparación de explantos | 51 |
| 2.1.2. Ensayos de regeneración..... | 51 |
| 2.1.2.1. Estrategia general de regeneración | 51 |
| 2.1.2.2. Efecto de los reguladores de crecimiento | 52 |
| 2.1.2.3. Efecto del medio basal | 52 |
| 2.1.2.4. Efecto del tiempo en oscuridad | 52 |
| 2.1.3. Estudio de la sensibilidad a antibióticos aminoglicósidos | 52 |
| 2.1.4. Ensayos de transformación | 52 |
| 2.1.4.1. Efecto de la sonicación..... | 53 |
| 2.1.4.2. Efecto del medio QL21 | 54 |
| 2.1.5. Evaluación de la expresión de los genes marcadores..... | 54 |
| 2.1.5.1. Evaluación de GUS | 54 |
| 2.1.5.2. Evaluación de GFP..... | 54 |
| 2.2. Hipocotilo..... | 55 |
| 2.2.1. Preparación de explantos | 55 |
| 2.2.2. Ensayos de regeneración..... | 55 |
| 2.2.2.1. Efecto del medio basal | 55 |
| 2.2.2.2. Efecto de los reguladores del crecimiento | 56 |
| 2.2.2.3. Efecto del 2,4-D | 56 |
| 2.2.2.4. Efecto del tiempo de oscuridad | 56 |
| 2.2.2.5. Efecto del tiosulfato de plata (STS)..... | 56 |
| 2.2.3. Estudio de la sensibilidad a los antibióticos aminoglicósidos..... | 56 |
| 2.2.4. Ensayos de transformación | 56 |
| 2.2.5. Recuperación, proliferación, elongación y enraizamiento | 57 |
| 2.2.6. Evaluación de plantas transformadas | 58 |
| 2.2.6.1. GUS..... | 58 |
| 2.2.6.2. PCR | 58 |
| 2.2.6.3. Southern blot | 59 |
| 2.3. Toma de datos y tratamientos estadísticos | 59 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 60 |
| 3.1. Cotiledón | 60 |
| 3.1.1. Regeneración | 60 |
| 3.1.1.1. Efecto de los reguladores del crecimiento | 60 |
| 3.1.1.2. Efecto del medio basal | 62 |
| 3.1.1.3. Efecto del tiempo de incubación en oscuridad | 63 |
| 3.1.2. Sensibilidad al antibiótico kanamicina | 64 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1.3. Transformación | 65 |
| 3.1.3.1. Efecto de la sonicación | 65 |
| 3.1.3.2. Efecto del medio sobre la transformación | 66 |
| 3.2. Hipocotilo | 68 |
| 3.2.1. Regeneración..... | 68 |
| 3.2.2. Sensibilidad a la kanamicina y paromomicina | 73 |
| 3.2.3. Transformación y evaluación de plantas transgénicas | 74 |
| 3.2.4. Recuperación, proliferación, elongación y enraizamiento | 77 |
| 4. CONCLUSIÓN | 79 |
| 5. BIBLIOGRAFÍA..... | 81 |

1. INTRODUCCIÓN

Los métodos de transformación genética mediante *Agrobacterium* requieren de la disponibilidad de sistemas de regeneración vía organogénesis o embriogénesis somática. En frutales, la eficiencia de regeneración adventicia en la mayoría de las especies es generalmente baja y/o muy dependiente del genotipo, especialmente con materiales adultos.

Se han desarrollado distintos protocolos para el género *Prunus* (Laimer da Câmara Machado *et al.*, 1992; Miguel y Oliveira, 1999; Scorza *et al.*, 1995a; Scorza *et al.*, 1995b; Scorza *et al.*, 1994; Smigocki y Hammerschlag, 1991) y otras especies (Dandekar *et al.*, 1998; Fitch *et al.*, 1992) que utilizan material juvenil (procedente de semillas) como explantos, obteniendo eficiencias de transformación más elevadas que las obtenidas cuando se ha utilizado material adulto (Scorza *et al.*, 1995b, Mikhailov *et al.*, 2004).

Recientemente, el Dr. César Petri en colaboración con el grupo del Dr. Ralph Scorza (ARS-USDA) optimizó un protocolo de transformación de ciruelo (*Prunus domestica* L.) (Petri *et al.*, 2008c). Este protocolo utiliza segmentos de hipocotilo de la variedad 'Bluebyrd' llegando a producir una eficiencia de transformación del 42% (porcentaje de brotes transgénicos respecto al total de explantos infectados) (Petri *et al.*, 2008c).

Sería muy interesante disponer en albaricoquero de un protocolo sencillo y eficiente de transformación similar al desarrollado para ciruelo, puesto que sería muy útil para abordar diferentes objetivos. Por ejemplo, cuando queremos realizar una prueba de concepto y no estamos interesados en obtener plantas mejoradas (comprobación de construcciones, desarrollar protocolos para eliminar marcadores, etc.) o para poder realizar estudios de genómica funcional y evaluar la actividad de determinados genes en esta especie. Asimismo, resultaría de gran interés para la obtención de patrones de albaricoquero transgénicos. En esta especie no existen patrones clonales comercializados ya que la única forma de propagarlos sería mediante micropropagación puesto que el estaquillado es muy poco eficiente. La micropropagación de albaricoquero no resulta sencilla y, hasta los primeros trabajos de nuestro grupo (Pérez-Tornero y Burgos, 2000; Pérez-Tornero *et al.*, 1999; Pérez-Tornero *et al.*, 2001; Pérez-Tornero *et al.*, 2000b), prácticamente no existía información sobre los requerimientos de la especie. Actualmente, la mayoría de las plantaciones de albaricoquero se realizan sobre patrón franco, es decir sobre patrones producidos a partir de semillas de algunas variedades

(entre ellas frecuentemente, ‘Canino’), dado que sus semillas germinan muy bien y que, al tratarse de una variedad autocompatible, las semillas suelen ser producto de autofecundación y las plantas resultantes son relativamente homogéneas (Orero *et al.*, 2004).

En albaricoquero, Pieterse (1989) obtuvo regeneración a partir de cotiledones inmaduros de la variedad ‘Royal’ y, posteriormente, Goffreda *et al.* (1995) obtuvieron un resultado similar con semillas de otras 2 variedades, ‘Zard’ y ‘NJA82’.

La primera publicación que describió la transformación de albaricoquero utilizó cotiledones de semillas inmaduras (da Câmara Machado y Laimer da Câmara Machado, 1995), pero el protocolo no resultó muy eficiente a pesar de tratarse de explantos de origen juvenil.

En este trabajo se exploró la posibilidad de desarrollar un método de regeneración y transformación para producir plantas transgénicas de albaricoquero con secciones de hipocotilo y cotiledones a partir de semillas maduras de las variedades de albaricoquero ‘Canino’, ‘Moniquí’ y ‘Dorada’ y de la subespecie de albaricoquero, *Prunus armeniaca* L. *var. ansu* Maxim, cuyas semillas se utilizan para producir patrones para albaricoquero y otros frutales en China, que denominaremos en adelante “el patrón”.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cotiledón

2.1.1. Preparación de explantos

Se utilizaron semillas maduras de la variedad ‘Canino’ y del patrón (*Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim).

Las semillas de albaricoquero se extrajeron de la cáscara y se desinfectaron superficialmente mediante inmersión en una solución al 1% de hipoclorito sódico durante 20 minutos. Tras tres lavados con agua destilada estéril, las semillas se mantuvieron en agua durante la noche y al día siguiente se eliminó la testa y se realizaron cortes superficiales con un bisturí en la parte adaxial del cotiledón. Los explantos se prepararon como se muestra en Figura II. 1A.

2.1.2. Ensayos de regeneración

2.1.2.1. Estrategia general de regeneración

Los explantos de cotiledones se dispusieron con la parte adaxial en contacto con el medio de regeneración que consiste en los macronutrientes, los micronutrientes, vitaminas y componentes orgánicos de QL (Quoirin y Lepoivre, 1977), 3% de sacarosa y 0,7% de agar purificado (Laboratorios Conda, Torrejón de Ardoz, Spain). Como reguladores del crecimiento se añadieron 8,0 μM de tiazurón (TDZ) y 0,25 μM de ácido indol-3-butírico (IBA). El pH se ajustó a 5,8 antes de esterilizar en el autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Los explantos son incubados en oscuridad 14 días, a $23\pm 1^\circ\text{C}$ desde el inicio del ensayo y posteriormente se sometieron a un fotoperiodo de 16/8 horas, una intensidad lumínica de $55 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $23\pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura (las condiciones estándar de cultivo). Se mantuvieron en el mismo medio hasta la evaluación o la recuperación de las yemas regeneradas.

Este protocolo fue utilizado para todos los experimentos realizando las modificaciones indicadas en los siguientes ensayos para probar el efecto de varios factores sobre la regeneración.

2.1.2.2. Efecto de los reguladores del crecimiento

Se pusieron los explantos de ‘Canino’ y del patrón en medio de regeneración con distintas combinaciones de TDZ e IBA. Las combinaciones utilizadas fueron 8,0 y 4,0 μM de TDZ con 0,5 ó 0,25 μM de IBA.

2.1.2.3. Efecto del medio basal

Se utilizaron cotiledones procedentes de semillas del patrón para estudiar el efecto de los medios basales sobre la regeneración. Los medios utilizados fueron: (1) $\frac{3}{4}$ sales de MS (Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands), vitaminas y componentes orgánicos de MS (Murashige y Skoog, 1962). (2) Macronutrientes, micronutrientes y vitaminas de QL (Quoirin y Lepoivre, 1977). Como reguladores del crecimiento, se utilizaron 8,0 μM de TDZ con 0,5 ó 0,25 μM de IBA.

2.1.2.4. Efecto del tiempo en oscuridad

Se estudió el efecto del tiempo en oscuridad sobre la regeneración de los cotiledones. Se probó el efecto de incubar los cotiledones del patrón durante 0, 1, 2 ó 3 semanas y de ‘Canino’ durante 0 ó 2 semanas. Posteriormente se continuó el experimento en las condiciones estándar de cultivo.

2.1.3. Estudio de la sensibilidad a antibióticos aminoglicósidos

Se adicionó al medio de regeneración un antibiótico aminoglicósido (kanamicina) a diferentes concentraciones para determinar cuando se inhibiría total o parcialmente la regeneración en material sin transformar. Para ello se dispusieron cotiledones del patrón en medio de regeneración añadiendo 0, 16, 32 ó 64 μM de kanamicina (Duchefa, Haarlem, The Netherlands). Los antibióticos siempre se esterilizaron por filtración y se añadieron al medio después de la esterilización en el autoclave.

2.1.4. Ensayos de transformación

Para los ensayos de transformación, se utilizó la cepa LBA4404 conteniendo el plásmido binario p35SGUSINT (Vancanneyt *et al.*, 1990) o la cepa EHA105 conteniendo el plásmido binario pBin19sgfp. En el ADN-T de ambos plásmidos se encuentra el gen *nptII* como marcador de selección que confiere resistencia a antibióticos aminoglicósidos. Además, el pBin19-sgfp tiene como gen “chivato”, el gen de la *gfp*. En el plásmido p35SGUSINT está el gen *gus* como gen “chivato”, el cual 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).

La bacteria se incubó hasta la fase estacionaria durante una noche en un agitador orbital, a 28°C y 0,1g, en medio LB líquido con la adición de los antibióticos adecuados. Para la cepa LBA4404, 82,4 µM de kanamicina y 137,2 µM de estreptomina y para la cepa EHA105, ácido nalidíxico (98,3 µM) y kanamicina (82,4 µM). Al día siguiente se centrifugó a 1.000g (4.000 rpm, Sigma, 2-16K) y se resuspendió en medio líquido que consiste en los macronutrientes y micronutrientes de MS, adicionando 2% de sacarosa y 100 µM de acetosiringona (AS), el pH se ajusta a 5,8 antes de esterilizar en el autoclave. El cultivo bacteriano se diluyó hasta una D.O.₆₀₀=0,2 y se mantuvo a 25°C, 0,1g de agitación durante un mínimo de 5 horas y transcurrido este tiempo se utilizó para infectar los explantos mediante inmersión durante 20 minutos. Los explantos infectados se dispusieron en medio de co-cultivo durante 3 días en oscuridad. El medio de co-cultivo consiste en medio de regeneración con la adición de 100 µM de AS.

Después de 3 días de co-cultivo, tras 2 lavados con medio líquido (contiene ½ macronutrientes y micronutrientes de MS, pH 5,8), los explantos fueron transferidos a medio de regeneración al que se adiciona 0,63 mM de cefotaxima y 0,13 mM de vancomicina, para controlar el crecimiento de *Agrobacterium*, y como agente selectivo, se añade 16 µM kanamicina.

Los explantos fueron incubados en oscuridad durante 14 días desde el inicio del ensayo y posteriormente se transfirieron a las condiciones estándar de cultivo, hasta la evaluación o la recuperación de las yemas regeneradas.

2.1.4.1. Efecto de la sonicación

Se evaluó el efecto de la sonicación (0 ó 1 minuto) sobre la transformación de los explantos infectados por la cepa LBA4404 conteniendo el plásmido binario p35SGUSINT. La expresión de GUS transitoria fue evaluada 10 días después del inicio del ensayo. La regeneración fue evaluada en la quinta semana.

Para infectar los explantos mediante el sistema SAAT (Sonication-Assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation), se sumergen los explantos en una suspensión de *Agrobacterium* de D.O.₆₀₀=0,2 y se aplican ultrasonidos (sonicador SELECTA, 3000514, frecuencia 40 KHz, potencia 200 W). Posteriormente los explantos se someten a 20 minutos de vacío (-600 mm Hg).

2.1.4.2. Efecto del medio QL21

QL21 es un medio que se está utilizando en nuestro laboratorio para la regeneración a partir de hojas de albaricoquero (Burgos y Albuquerque, 2003; Pérez-Tornero *et al.*, 2000a), que consiste en macronutrientes de QL, micronutrientes y vitaminas de DKW (Driver y Kuniyuki, 1984), añadiendo 9,0 μM de TDZ, 4 μM de ácido naftalenacético (NAA) como reguladores de crecimiento y 60 μM de tiosulfato de plata (STS).

Se probó el efecto del medio QL21 sobre la regeneración utilizando los cotiledones del patrón. Utilizando la cepa EHA105 conteniendo el plásmido binario pBin19sgfp, se estudió el efecto del medio QL21 sobre la transformación añadiéndole 16 μM de kanamicina. Se aplicó 30 segundos de sonicación utilizando el método que se ha descrito anteriormente. La expresión de GFP estable y la regeneración fueron evaluadas 5 semanas después del inicio del ensayo.

2.1.5. Evaluación de la expresión de los genes marcadores

2.1.5.1. Evaluación de GUS

El sustrato utilizado fue el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronato sódico trihidratado (X-GlcA), que al ser hidrolizado por la enzima β -glucuronidasa, producto del gen *gus*, produce un precipitado de color azul. El tampón para la reacción consistió en una disolución con las siguientes concentraciones finales: 2 mM de X-GlcA, 50 mM de tampón fosfato (pH 8), 5 mM de EDTA disódico (pH 8), 2 mM de ferricianida de potasio y 2 mM de ferrocianida de potasio, 0.01% de Tritón X-100. La solución fue preparada en el momento de su utilización. Las muestras fueron incubadas durante 24 horas a 37°C.

2.1.5.2. Evaluación de GFP

Para detectar la expresión de GFP por estereomicroscopía de fluorescencia 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).

2.2. Hipocotilo

2.2.1. Preparación de explantos

Se utilizaron semillas maduras de las variedades ‘Canino’, ‘Moniquí’ y ‘Dorada’. La desinfección de las semillas se ha descrito en el apartado 2.1.1. Los explantos se obtienen eliminando la testa y cortando los hipocotilos en secciones (0,5-1 mm) que son colocadas en medio de regeneración (Figura II. 6).

2.2.2. Ensayos de regeneración

Por regla general, las secciones de hipocotilo se dispusieron en medio de regeneración que consiste en $\frac{3}{4}$ sales de MS, vitaminas de MS, 2% de sacarosa, 0,7% de agar purificado. Como reguladores del crecimiento se añaden 7,0 μM de TDZ y 0,25 μM de IBA. El pH se ajusta a 5,8 antes de esterilizar en el autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Los explantos se incuban en oscuridad 7 días, a $23\pm 1^\circ\text{C}$ desde el inicio del ensayo y posteriormente se someten a un fotoperiodo de 16/8 horas de luz/oscuridad con una intensidad lumínica de 20-25 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a la misma temperatura, manteniéndolos en el mismo medio hasta la evaluación o la recuperación de las yemas regeneradas.

Este protocolo fue utilizado para todos los experimentos realizando las modificaciones indicadas en los siguientes ensayos para probar el efecto de varios factores sobre la regeneración.

2.2.2.1. Efecto del medio basal

Se utilizaron hipocotilos de la variedad ‘Canino’ para observar el efecto de los medios basales sobre la regeneración. Los tres medios utilizados fueron: (1) $\frac{3}{4}$ sales de MS, vitaminas componentes orgánicos de MS. (2) Macronutrientes y micronutrientes de QL, vitaminas y componentes orgánicos de DKW (Driver y Kuniyuki, 1984). (3) Macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y componentes orgánicos de WPM (Lloyd y McCown, 1980).

2.2.2.2. Efecto de los reguladores del crecimiento

Se colocaron secciones de hipocotilos de ‘Canino’, ‘Moniquí’ y ‘Dorada’ en medio de regeneración con distintas combinaciones de TDZ (7,0 y 5,0 μM) e IBA (1,0 y 0,25 μM).

2.2.2.3. Efecto del 2,4-D

Se aplicaron diferentes concentraciones de 2,4-D (0; 1,12; 2,25; 4,50 μM) durante los primeros 3 días del ensayo. Posteriormente, los explantos fueron transferidos a medio de regeneración.

2.2.2.4. Efecto del tiempo de oscuridad

Se utilizaron hipocotilos de ‘Canino’ para evaluar el efecto del tiempo de oscuridad (0, 1, 2 ó 3 semanas) sobre la regeneración antes de pasar a las condiciones de fotoperiodo descritas al principio de este apartado.

2.2.2.5. Efecto del tiosulfato de plata (STS)

Se estudió el efecto de este inhibidor del etileno (Burgos y Alburquerque, 2003) sobre la regeneración de hipocotilos de ‘Canino’ añadiendo al medio de regeneración 0, 30, 60, 90 ó 120 μM de STS antes de esterilizar los medios en el autoclave.

2.2.3. Estudio de la sensibilidad a los antibióticos aminoglicósidos

Se adicionaron al medio de regeneración distintos antibióticos aminoglicósidos a diferentes concentraciones con el fin de conocer cuales inhibirían 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 hipocotilos de ‘Canino’ en medio de regeneración añadiendo 0, 10, 20 ó 40 μM de kanamicina o paromomicina (Duchefa, Haarlem, The Netherlands). Para las variedades ‘Moniquí’ y ‘Dorada’, sólo se estudió el efecto de la paromomicina y las concentraciones fueron 0, 20, 30 ó 40 μM .

2.2.4. Ensayos de transformación

En los ensayos de transformación se utilizó la cepa AGL1 conteniendo el plásmido binario p35SGUSINT (Vancanneyt *et al.*, 1990) o pX6-GFP (Zuo *et al.*, 2001). En el ADN-T de ambos plásmidos se encuentra el gen *nptII* como marcador de selección que confiere resistencia a antibióticos aminoglicósidos.

La bacteria se incubó durante una noche en un agitador orbital, a 28°C y 0,1g en medio

LB líquido con la adición de 82,4 μM de kanamicina y 269,3 μM de ampicilina, hasta que alcanza la fase estacionaria y se continuó su preparación como se describe en el apartado 2.1.4. Los explantos de ‘Canino’, ‘Dorada’ y ‘Moniquí’ se infectaron, co-cultivaron y dispusieron en medio de regeneración como se describió en el apartado 2.1.4. Los explantos se incuban en la oscuridad 7 días desde el inicio del ensayo y posteriormente a la luz con un fotoperiodo de 16/8 horas y una intensidad lumínica de 20-25 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, hasta la evaluación de expresión de GUS estable o la recuperación de las yemas regeneradas.

2.2.5. Recuperación, proliferación, elongación y enraizamiento

Las yemas regeneradas fueron aisladas y transferidas al medio de meristemos de albaricoquero (Pérez-Tornero *et al.*, 1999) 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 al medio de proliferación para obtener brotes que posteriormente fueron enraizados en el medio de enraizamiento.

Durante estos pasos, los explantos fueron cultivados en las condiciones estándar de cultivo.

El medio de meristemos consiste en los macronutrientes, los micronutrientes, vitaminas y componentes orgánicos de QL, 3% de sacarosa y 0,7% de agar. Como reguladores del crecimiento se añaden 6,67 μM de N^6 -bencilaminopurina (BAP) y 0,05 μM ácido indol-3-butírico (IBA).

El medio de proliferación consiste en los macronutrientes de QL y los micronutrientes, vitaminas y componentes orgánicos de DKW, 3% de sacarosa y 0,7% de agar. Como reguladores del crecimiento se añaden 1,12 μM de N^6 -bencilaminopurina ribósido (BAPr) y 0,05 μM de ácido indol-3-butírico (IBA), 3 mM de CaCl_2 , 2,1 μM de 6-(3hidroxibencilamino) purina (Meta-Topolina), 29,6 μM de adenina y 0,8 mM de floriglucinol.

El medio de enraizamiento (Petri *et al.*, 2008a) consiste en los macronutrientes de QL y los micronutrientes, vitaminas y componentes orgánicos de DKW, 2% de sacarosa y 0,7% de agar. Además, se adicionó 1,5 mM de CaCl_2 , 0,8 mM de floriglucinol, 2,95 μM de IBA y 29,6 μM de adenina.

El pH se ajustó a 5,7 antes de esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Para las yemas transformadas, se añaden 0,63 mM de cefotaxima y 0,13 mM de vancomicina

para controlar el crecimiento de *Agrobacterium* y paromomicina como agente selectivo a todos los medios.

2.2.6. Evaluación de plantas transformadas

2.2.6.1. GUS

Tras una ó cuatro semanas desde la infección, una parte de los explantos se procesaron para comprobar la expresión transitoria o estable del gen marcador.

2.2.6.2. PCR

La evaluación molecular de las plántulas se llevó a cabo mediante PCR. El ADN genómico fue extraído de hojas de brotes *in vitro* utilizando una modificación de métodos publicados (Doyle y Doyle, 1987). La modificación principal fue aumentar aproximadamente al doble el volumen de tampón de extracción empleado en cada muestra.

El ADN se extrajo de 50 mg de peso fresco de hojas, trituradas junto con el tampón de extracción con Tissue-lyser® (Qiagen), incubando 1 hora a 65°C. Tras la incubación se añadió cloroformo-isoamílico (24:1), se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos para recuperar la fase acuosa. Se añadió isopropanol frío y de nuevo se centrifugó a la misma velocidad y tiempo que la vez anterior. En este punto se eliminó el sobrenadante, se añadió etanol frío al 70% centrifugando durante 5 minutos a 10.000 rpm. Se dejó secar el pellet a temperatura ambiente, resuspendiendo en 40 µL de agua bidestilada y por último se trató con ARNasa a 37°C durante 30 minutos.

La presencia del transgén *nptII* se detectó mediante PCR. Los cebadores específicos utilizados fueron 5'-gattgaacaagatggattgc-3' y 5'-ccaagctcttcagcaatc-3' que amplifican un fragmento de 696 pares de bases. Las muestras que dieron *nptII* positivo, se evaluaron posteriormente para descartar contaminaciones por *Agrobacterium* utilizando cebadores específicos del gen *virG* de la bacteria (5'- ccggtgaaacacggttctt-3' y 5'- ccggtgaaacacggttctt-3').

Las reacciones se ajustaron a un volumen final de 25 µL, conteniendo 400 ng de ADN, 400 µM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada cebador y 1 unidad de polimerasa de ADN (FlexiTaq de Promega®). Las condiciones de reacción fueron 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 52°C para el gen *nptII* y 58°C para el gen *virG*, por último, una extensión de 5 minutos a 72°C. Los productos de la reacción fueron detectados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%

(p/v) y después de teñir con bromuro de etidio se detectó el ADN bajo luz ultravioleta.

2.2.6.3. Southern blot

Se utilizó la enzima de restricción *ApaI* para la digestión de las muestras. Las condiciones de digestión fueron 30 µg de ADN genómico con 50 unidades de enzima en un volumen final de 80 µL. Se digirió a 37°C durante 8 horas, tras las cuales se inactivó la reacción mediante choque térmico, 65°C durante 20 minutos. 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 (Roche Diagnostics GmbH). Se diseñaron sondas marcadas con digoxigenina (DIG) (Boehringer Mannheim) mediante PCR para la región *nptII* utilizando los cebadores apropiados. La hibridación, lavados y detección se llevaron a cabo utilizando DIG Easy Hyb (solución de hibridación) y DIG Wash y Block Buffer Set siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics GmbH).

2.3. Toma de datos y tratamientos estadísticos

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 específicos de máxima verosimilitud. 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. = $(P1 \times P2 / n)^{1/2}$.

Donde: P1 : Probabilidad de que ocurra un suceso.

P2 : 1 – P1

n : Tamaño de la muestra.

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.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Cotiledón

3.1.1. Regeneración

3.1.1.1. Efecto de los reguladores del crecimiento

En presencia de TDZ e IBA, los cotiledones aumentaron aproximadamente al doble de su tamaño inicial al final del periodo de incubación en oscuridad. Cuando se transfirieron a la luz, los cotiledones adquirieron un color verde, pero no aumentaron su tamaño tanto como lo hicieron en la oscuridad. Las yemas comenzaron a aparecer a los 14 días después del inicio de los experimentos. Los brotes adventicios se formaron más comúnmente en la superficie adaxial y en general aparecieron como un “cluster” en la zona más próxima al embrión (Figura II. 1C).

Cuando se estudiaron los efectos de los niveles de TDZ e IBA, el porcentaje de regeneración más alto para el patrón fue 66,7% utilizando la combinación de 8 μM de TDZ y 0,25 μM de IBA (Tabla II. 1). Al reducir el TDZ a 4 μM disminuyó significativamente la regeneración del patrón y se observó el mismo efecto cuando se utilizó 0,5 μM de IBA en combinación con ambas concentraciones (4 ó 8 μM) de TDZ. Sin embargo, para la variedad ‘Canino’, el mejor resultado (72,2% de regeneración) fue obtenido cuando se añadió 4 μM de TDZ al medio de regeneración y no hubo diferencias significativas cuando se comparó con 8 μM de TDZ en combinación con 0,25 μM de IBA. En condiciones óptimas, la capacidad de regeneración del patrón (66,7%) fue ligeramente inferior a la de la variedad ‘Canino’ (72,2%), pero no hubo diferencias significativas (Tabla II. 1).

El TDZ se ha utilizado anteriormente como un inductor de la regeneración de tejidos derivados de semillas de albaricoquero (Laimer da Câmara Machado *et al.*, 1992) y otras especies de *Prunus*, como *P. avium* (Canli y Tian, 2008), *P. cerasus* (Mante *et al.*, 1989), *P. domestica* (Mante *et al.*, 1991; Mante *et al.*, 1989; Tian *et al.*, 2007a), *P. microcarpa* (Nas *et al.*, 2010), *P. mume* (Ning *et al.*, 2007), *P. persica* (Mante *et al.*, 1989) y *P. salicina* (Canli y Tian, 2009; Tian *et al.*, 2007b).

Cuando se utilizaron los cotiledones maduros de *P. avium* (Canli y Tian, 2008) y *P. salicina* (Canli y Tian, 2009) como explantos, se obtuvieron porcentajes de regeneración en un rango amplio de 23,3%-70% y 6,7%-66,7% para ambas especies, respectivamente, indicando la influencia del genotipo sobre la regeneración. Sin

embargo, en albaricoquero, sería necesario realizar más experimentos de regeneración utilizando cotiledones de otras variedades para determinar si el genotipo influye críticamente la regeneración cuando se utilizan estos explantos.

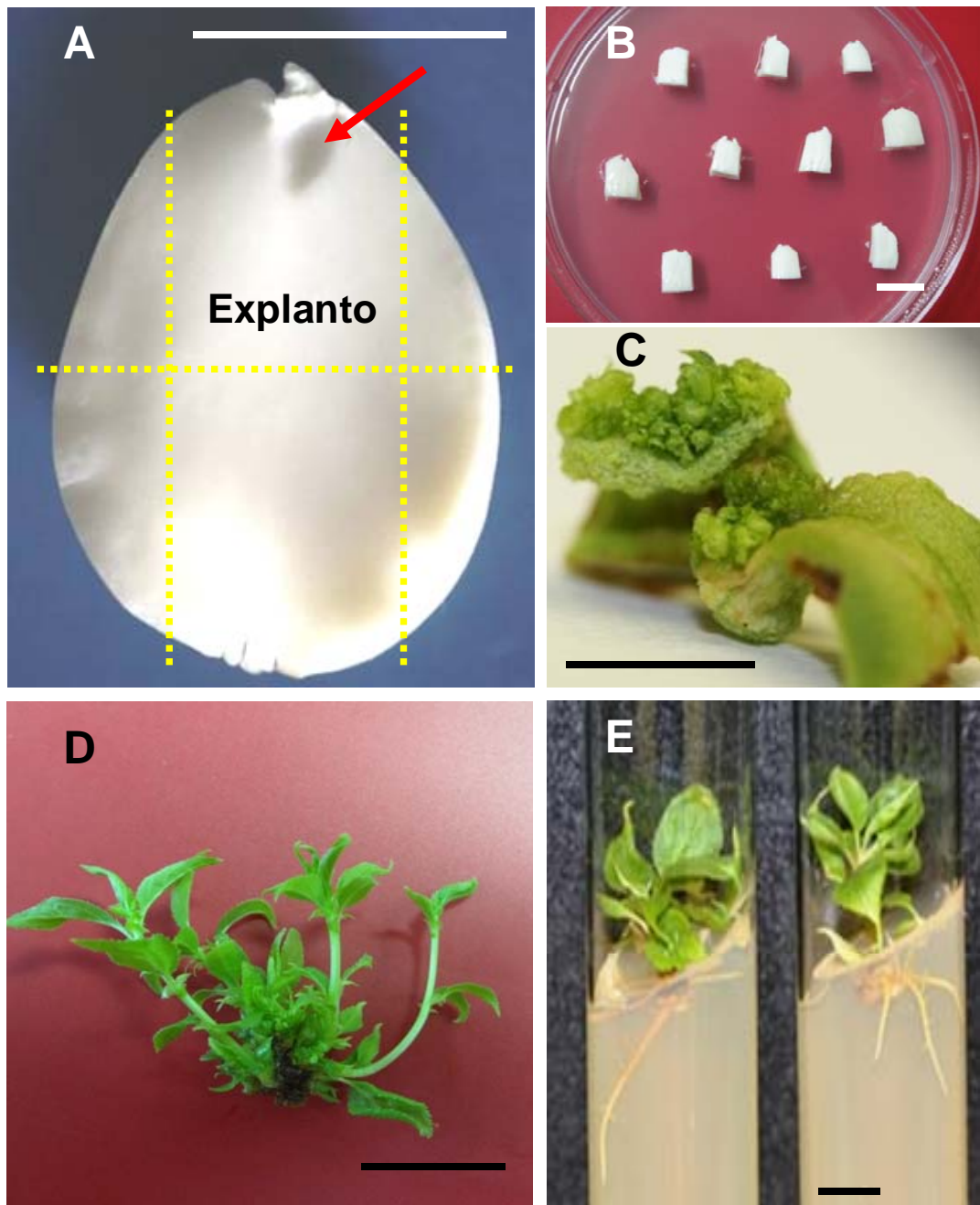


Figura II. 1. Proceso de regeneración en cotiledones de albaricoquero. A: Estructura del cotiledón. La flecha indica la zona donde regeneran las yemas. Las líneas discontinuas indican por donde se corta el cotiledón para preparar los explantos. B: Cotiledones en medio de regeneración. C: Yemas regeneradas 4 semanas después del inicio del ensayo. D: Proliferación. E: Enraizamiento. Las barras indican 1 cm.

Tabla II. 1. Efecto de los reguladores del crecimiento sobre la regeneración de cotiledones de semillas del patrón (*Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim) y 'Canino'

| Tratamiento | Medio | Reguladores del crecimiento (μM) | | Nº de explantos | Regeneración (% \pm E.S.) |
|--|-------|---|------|-----------------|--------------------------------|
| | | TDZ | IBA | | |
| Patrón | | | | | |
| 1 | MS | 8 | 0,25 | 30 | 43,3 \pm 9,0 |
| 2 | MS | 8 | 0,5 | 40 | 30,0 \pm 7,2 |
| 3 | QL | 8 | 0,25 | 87 | 66,7 \pm 5,1 |
| 4 | QL | 8 | 0,5 | 125 | 32,8 \pm 4,2 |
| 5 | QL | 4 | 0,25 | 38 | 39,5 \pm 7,9 |
| 6 | QL | 4 | 0,5 | 22 | 18,2 \pm 8,2 |
| Canino | | | | | |
| 7 | QL | 8 | 0,25 | 40 | 57,5 \pm 7,8 |
| 8 | QL | 4 | 0,25 | 54 | 72,2 \pm 6,1 |
| | | | | | χ^2 ^a |
| MS vs QL (1+2 vs 3+4) | | | | | 3,04 ^{n.s.} |
| TDZ 8 μM vs 4 μM (3+4 vs 5+6) | | | | | 6,7** |
| IBA 0,25 μM vs 0,5 μM (1+3+5 vs 2+4+6) | | | | | 24,7*** |
| Patrón vs Canino (3+5 vs 7+8) | | | | | 2,8 ^{n.s.} |

^a Valores χ^2 significativos a los niveles de probabilidad de 99,9% (***) ó 99% (**). Los valores no significativos están indicados como ^{n.s.}

3.1.1.2. Efecto del medio basal

En este trabajo, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de regeneración entre dos tipos de medio basal utilizando los cotiledones del patrón (Tabla II. 1). Sin embargo, las yemas regeneradas en el medio QL tenían mejor aspecto (color, tamaño). Los macros de QL contienen más Ca^{2+} y menos NH_4^+ . El Ca^{2+} es esencial para la síntesis de las paredes celulares y su función. Además, una concentración de NH_4^+ elevada podría ser tóxica para el cultivo de tejidos (Brand, 1993) dependiendo del material vegetal con el que se trabaje. Por lo tanto, el efecto del medio QL sobre el aspecto de las yemas regeneradas podría estar asociado con el bajo contenido de nitrógeno y sales basales.

3.1.1.3. Efecto del tiempo de incubación en oscuridad

La regeneración de los cotiledones fue afectada significativamente por la incubación en oscuridad. Todos los periodos de incubación probados (1, 2 ó 3 semanas) provocaron un aumento significativo en la regeneración adventicia a partir de cotiledones del patrón comparado con explantos cultivados directamente bajo un fotoperiodo de 16 horas. El mismo efecto se observó para los explantos de 'Canino' que estuvieron dos semanas en oscuridad utilizando 4 μM de TDZ y 0,25 μM de IBA (Figura II. 2A).

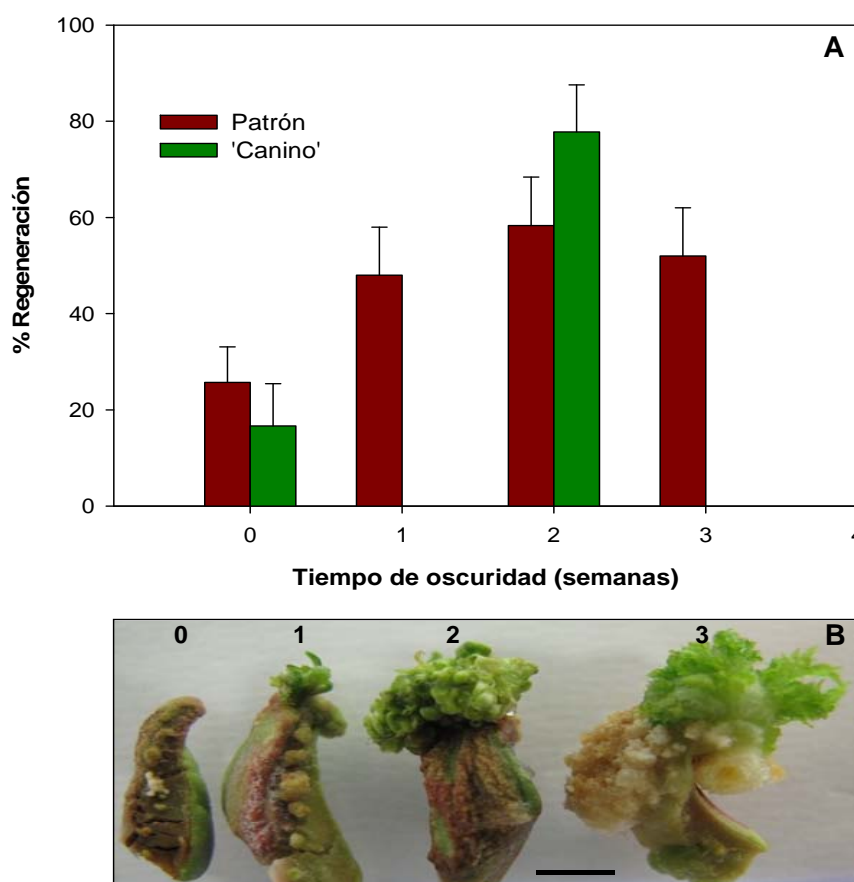


Figura II. 2. **A**, Efecto del tiempo de oscuridad sobre la regeneración en cotiledones de albaricoquero. Las barras verticales indican los errores estándar. **B**, Aspecto de los cotiledones incubados 0, 1, 2 ó 3 semanas en oscuridad, fotos tomadas tras 4 semanas desde el inicio del experimento. La barra indica 1 cm.

No hubo diferencias significativas en el porcentaje de regeneración de cotiledones del patrón debido a la duración del periodo de oscuridad (Figura II. 2A). Sin embargo, a mayor tiempo de incubación en oscuridad, los cotiledones regeneran un número más elevado de yemas por explanto regenerado (Figura II. 2B). Por otro lado, las yemas obtenidas con el tratamiento de tres semanas de oscuridad presentaron mayores

síntomas de vitrificación que las yemas obtenidas en los demás tratamientos.

Una explicación de este efecto podría ser un aumento de los niveles de reguladores del crecimiento endógenos, como el ácido indol-3-acético, debido a la incubación en oscuridad y que su interacción con los reguladores exógenos aplicados causará un aumento en la regeneración adventicia (Gentile *et al.*, 2002). Resultados similares de que la incubación en oscuridad aumenta el porcentaje de regeneración de cotiledones, se han obtenido en *P. dulcis* (Ainsley *et al.*, 2001), *P. avium* (Canli y Tian, 2008) y *P. salicina* (Canli y Tian, 2009).

3.1.2. Sensibilidad al antibiótico kanamicina

Debido a que se puede encontrar un amplio rango de concentraciones inhibitorias de la organogénesis para este antibiótico en distintas especies, desde muy sensibles como el almendro hasta especies altamente tolerantes como los cítricos (Domínguez *et al.*, 2000), se estudió el efecto de la kanamicina sobre la regeneración de los cotiledones de la variedad 'Canino' y del patrón añadiendo 0, 16, 24, 32 ó 64 μM de kanamicina al medio de regeneración. Así se determinó la concentración adecuada para su utilización como agente de selección. En este estudio, resultó ser 24 μM la concentración inhibitoria para el patrón y redujo drásticamente la regeneración (6,7%) de los explantos de 'Canino'. En los explantos de 'Canino' se obtuvieron algunas yemas regeneradas hasta en 64 μM de kanamicina (Figura II. 3).

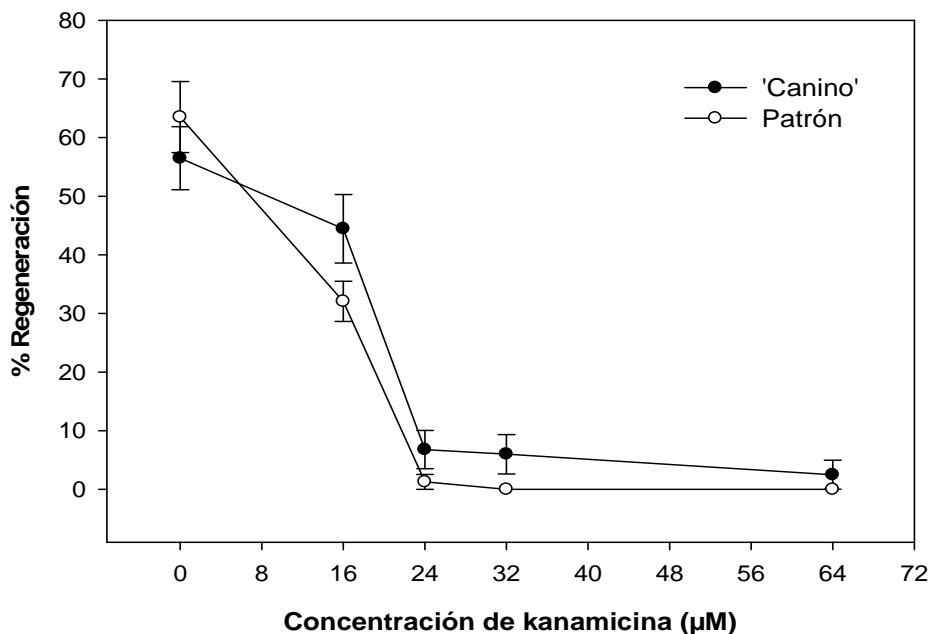


Figura II. 3. Efecto del antibiótico kanamicina sobre la regeneración de los cotiledones de albaricoquero. Las barras verticales indican los errores estándar.

3.1.3. Transformación

3.1.3.1. Efecto de la sonicación

La formación de heridas es un prerrequisito para el proceso de transformación mediante *Agrobacterium*. Existen varios métodos para producir heridas como cortar el tejido, sonicación, dañar los explantos con carborundo, el bombardeo de partículas y en definitiva tratamientos que produzcan daños mecánicos sobre la estructura del explanto. Dutt *et al.* (2007) transformaron ápices enteros de uva mediante *Agrobacterium* y sólo consiguieron una expresión transitoria de GFP muy escasa en las células epidérmicas y en células de los primordios foliares. Sin embargo, mediante daños mecánicos, se obtuvieron plantas transgénicas después de demostrar que el corte de ápices con un bisturí y otros métodos probados exponen el meristemo apical y las células de la túnica a la acción de la bacteria.

Los explantos de cotiledón utilizados en este trabajo normalmente son duros y no hay heridas en la zona donde se produce la regeneración (Figura II. 1, flecha), por lo tanto, el acceso de *Agrobacterium* a esta zona regenerante es difícil. Por lo tanto, es necesario provocar daños superficiales tal y como se ha descrito en Material y Métodos. Sin embargo, en ensayos previos cuando se utilizaron cotiledones cortados superficialmente, se obtuvo poca expresión de GUS (Figura II. 4A), indicando que sólo con el tratamiento de los cortes superficiales no era suficiente para la acción de *Agrobacterium*.

El sistema SAAT consiste en sumergir el explanto en una solución de *Agrobacterium* y aplicar ultrasonidos durante un corto periodo. La fortaleza de este método está en que la cavitación producida por la sonicación produce miles de micro heridas en y debajo de la superficie de los tejidos de la planta (de Oliveira *et al.*, 2009). Esto permite superar ciertos obstáculos como la incapacidad de *Agrobacterium* de llegar a las células adecuadas en los explantos, etc. Este sistema SAAT ha sido utilizado por varios autores en diversas especies que son difíciles de transformar para aumentar la eficiencia de transformación (Trick y Finer, 1997; Beranová *et al.*, 2008; de Oliveira *et al.*, 2009).

En este trabajo, probamos la sonicación para mejorar la transformación. Mediante la detección de GUS transitoria se demostró que con un minuto de sonicación, los explantos expresaban más GUS en las zonas cortadas (Figura II. 4B) que los explantos sin sonicar. Sin embargo, un minuto de sonicación disminuyó la regeneración drásticamente comparando con el tratamiento sin sonicación. Esto podría deberse a un efecto negativo que tiempos largos de sonicación pueden ejercer sobre la estructura del

explanto, provocando un daño excesivo en los tejidos, desnaturalización de proteínas, etc. Después de probar 20 y 30 segundos de sonicación, se observó que el efecto sobre la expresión de GUS era parecido con 30 segundos que el observado con un minuto y el efecto sobre la regeneración era menos perjudicial, por lo tanto, se decidió aplicar 30 segundos para los siguientes ensayos.

Un problema que observamos fue que la zona donde se detectó la expresión de GUS no coincidía con la zona donde generalmente aparece la regeneración (comparar Figura II. 1A y Figura II. 4B), que normalmente en la zona más próxima al embrión. Por lo tanto, podría ser interesante explorar métodos que permitan regenerar yemas en la zona donde *Agrobacterium* infecta fácilmente.

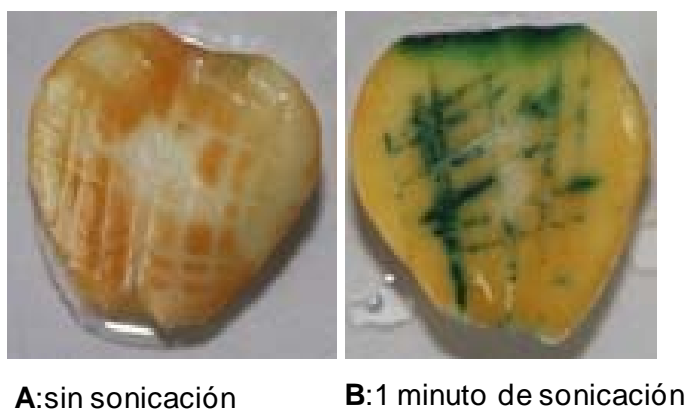


Figura II. 4. Efecto de la sonicación sobre la expresión de GUS transitoria en cotiledones. Los cotiledones A y B son de la misma semilla.

3.1.3.2. Efecto del medio sobre la transformación

El medio QL21 es un medio para la regeneración en hojas de albaricoquero que fue establecido en nuestro laboratorio. Se obtuvo una regeneración (45,7%), inferior a la que se obtuvo en el medio QL añadiendo 8 μM de TDZ y 0,25 μM de IBA (Tabla II. 2). No obstante, en el medio QL21, se producían más cantidad de yemas por explanto, no sólo en la zona próxima al embrión (Figura II. 1C), sino también en las zonas de corte (Figura II. 5). Considerando el problema que hemos comentado en el apartado anterior, esta mayor superficie de regeneración podría ser interesante para incrementar la probabilidad de coincidencia con las zonas transformadas.



Figura II. 5. Aspecto de la regeneración en cotiledones del patrón en el medio QL21 + 9 μ M de TDZ + 4 μ M de NAA, 4 semanas después del inicio del ensayo.

Tabla II. 2. Efecto del medio sobre la regeneración y la expresión GFP estable (5 semanas) en los cotiledones del patrón.

| Medio | Regeneración (% \pm E.S.) | | | Explantos que expresan GFP % \pm E.S. | Nº eventos de GFP por explanto |
|-------|---|---|-----------------------------|--|--------------------------------|
| | Control de ¹ regeneración | Control de ² transformación | Transformación ³ | | |
| QL | 66,7 \pm 5,1 | 0% | 35,3 \pm 5,2 | 44,7 \pm 5,4% | 2,68 \pm 0,44 |
| QL21 | 45,7 \pm 8,4 | 0% | 19,0 \pm 4,9 | 36,5 \pm 6,1% | 2,17 \pm 0,47 |

¹ Regeneración de explantos sin infectar, medio sin selección

² Regeneración de explantos sin infectar, sonicados, infiltrados y en medio selectivo.

³ Regeneración de explantos infectados, sonicados, infiltrados y en medio selectivo.

Por lo tanto, realizamos ensayos de transformación con *Agrobacterium* utilizando el medio QL21 como medio de regeneración y se tomaron datos de regeneración y de la expresión estable de la GFP. No hubo diferencia en el porcentaje de regeneración entre los dos medios con los explantos sin infectar con *Agrobacterium* (Tabla II. 2), sin embargo, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos medios añadiendo 16 μ M de kanamicina cuando los explantos fueron infectados (Tabla II. 2). En el medio QL21 sólo se obtuvo un 19% de regeneración, lo que supone una reducción del 46% respecto a la que se obtuvo en el medio estándar (35%). Además, el porcentaje de explantos con algún evento de GFP y el número de eventos por explanto obtenidos

en el medio QL21, fueron menores que en el otro medio. Por tanto, la utilización del medio QL21 no mejoró los resultados. Podría ser que los explantos son más sensibles a la kanamicina debido a la vitrificación (Figura II. 5) de las yemas regeneradas en el medio QL21. Sin embargo, en ambos controles de transformación, no se obtuvo ninguna regeneración. Esto indica que los explantos infectados tuvieron una cierta cantidad de células transformadas que podrían detoxificar el medio de cultivo.

En este trabajo, de un total de 320 explantos infectados regeneraron 69 en presencia de 16 μM de kanamicina. Cuando se aislaron los “clusters” a medio de proliferación, con 60 μM de paromomicina, todas las yemas regeneradas murieron después de 4 ciclos (8 semanas) de subcultivo. Por lo tanto, no fue posible obtener plantas transformadas utilizando este protocolo.

Los cotiledones de semillas maduras de albaricoquero obtuvieron porcentajes de regeneración muy elevados (66,7%) y lo más interesante es el gran número de yemas regeneradas por explanto. Este hecho aumenta la posibilidad de obtener plantas transformadas. La falta de coincidencia de las células regenerantes con las células que son transformadas por *Agrobacterium* no hizo posible la regeneración de plantas transgénicas. Nuevos experimentos serían necesarios para optimizar las condiciones de regeneración y transformación de este tipo de explanto.

3.2. Hipocotilo

3.2.1. Regeneración

Los explantos de las tres variedades estudiadas mostraron un comportamiento similar cuando se dispusieron en el medio de regeneración, aumentando aproximadamente tres veces su tamaño inicial tras ser sometidos a una semana de oscuridad.

La regeneración comenzó a aparecer a las 2 ó 3 semanas tras el inicio del ensayo y a la cuarta semana las yemas regeneradas se podían observar claramente. Generalmente la regeneración apareció en “clusters” de yemas, a veces en todo el borde de la sección de hipocotilo, como una “corona” y esporádicamente, regeneran yemas individuales (Figura II. 6).

En las tres variedades se produjo regeneración (Tabla II. 3). No se observaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones de reguladores del crecimiento utilizadas con las tres variedades, pero si hubo diferencias entre variedades en cuanto a los porcentajes de regeneración obtenidos ($p < 0,05$).

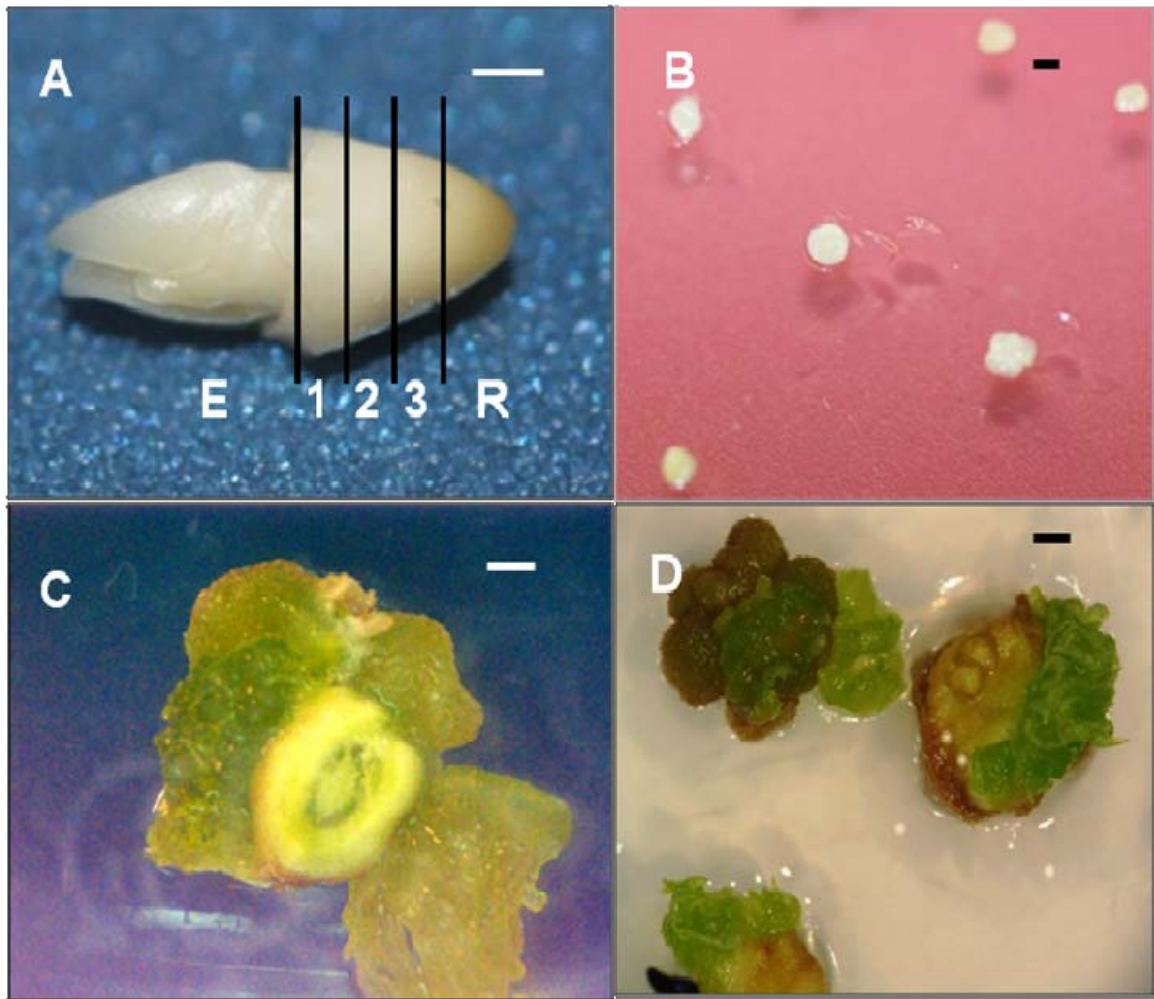


Figura II. 6. Proceso de regeneración en hypocotilos de albaricoquero. A: Estructura del embrión, donde 1, 2 y 3 representan los explantos utilizados en este trabajo. Se eliminan la parte del epicotilo (E) y la radícula (R). B: Explantos de hypocotilo en el medio de regeneración a día 0. C: Yemas que regeneran alrededor de la sección de hypocotilo de la variedad 'Moniquí', 7 semanas después del inicio del ensayo. D: Regeneración adventicia en hypocotilos de la variedad 'Dorada' 6 semanas tras el inicio del ensayo. Las barras indican 1 mm.

Análisis estadísticos adicionales revelaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre variedades en los porcentajes de regeneración para ciertas combinaciones de reguladores del crecimiento (Tabla II. 3). En termino medio, los explantos de 'Canino' regeneraron significativamente menos ($p < 0,05$) que 'Moniquí' y 'Dorada' (26,7% vs 37,8 ó 36%, respectivamente). No hubo diferencias significativas entre variedades en el número de "clusters" por explanto regenerante (Tabla II. 3).

Tabla II. 3. Efecto de los reguladores del crecimiento sobre la regeneración a partir de hipocotilos de distintas variedades de albaricoquero

| Tratamiento | | Regeneración (% ± E.S.) | | | Número de clusters por número de explanto regenerado (media ± E.S.) | | |
|-------------------|-------------------|----------------------------|-------------|--------------|--|-------------|-------------|
| TDZ (μ M) | IBA (μ M) | 'Canino' | 'Dorada' | 'Moniquí' | 'Canino' | 'Dorada' | 'Moniquí' |
| 7,0 | 1,0 | 21,4 ± 5,5a | 36,0 ± 6,8b | 46,9 ± 7,1b | 1,25 ± 0,13 | 1,77 ± 0,23 | 1,74 ± 0,18 |
| 7,0 ^a | 0,25 ^a | 31,7 ± 5,9a | 37,7 ± 6,2a | 34,4 ± 4,9a | 1,85 ± 0,33 | 1,87 ± 0,04 | 1,72 ± 0,14 |
| 5,0 | 1,0 | 29,7 ± 7,5a | 23,9 ± 6,3a | 36,2 ± 6,3a | 1,27 ± 0,19 | 1,54 ± 0,25 | 1,76 ± 0,24 |
| 5,0 | 0,25 | 24,1 ± 5,8a | 44,4 ± 6,8b | 36,6 ± 7,5ab | 1,77 ± 0,32 | 1,66 ± 0,20 | 1,80 ± 0,26 |

^a Regeneración en condiciones estándar descritas en Material y Métodos.

Letras diferentes en cada fila indican diferencias al nivel $p < 0,05$.

Para este estudio, se utilizaron 210 explantos de 'Canino', 241 explantos de 'Moniquí' y 211 explantos de 'Dorada'.

No se ha observado una influencia positiva de ninguno de los factores estudiados (incubación en oscuridad, pre-tratamiento con 2,4-D, composición salina del medio de cultivo o adición de STS) sobre los porcentajes de regeneración en hipocotilos de 'Canino' (Figura II. 7). Se observó una mayor producción de callo cuando se mantuvieron los explantos en oscuridad y cuando se trataron los hipocotilos con 2,4-D durante tres días, aunque también se observó una leve disminución de la regeneración (Figura II. 7A,B). Las yemas comenzaron a aparecer aproximadamente una semana antes en los explantos que se sometieron directamente a condiciones de fotoperiodo que en los explantos incubados durante 1, 2 ó 3 semanas en oscuridad antes de pasarlos a fotoperiodo.

No hubo diferencias entre los distintos medios de cultivo ensayados sobre la regeneración (Figura II. 7C). La adición del inhibidor del etileno STS no mejoró los porcentajes de regeneración. La tasa de regeneración disminuyó con el aumento de la concentración de STS (Figura II. 7D).

La mayoría de las yemas de 'Canino' que fueron aisladas tras la regeneración se desarrollaron y elongaron adecuadamente (85,7%) (Figura II. 11A). Tras su elongación, los brotes se cultivaron en medio de enraizamiento y, tras dos semanas, aparecieron algunas raíces. Tres semanas más tarde se pudo observar un sistema radicular bien desarrollado en el 77,4% de los brotes (Figura II. 11B). La etapa de aclimatación

(Figura II. 11C) se completó satisfactoriamente siguiendo nuestro protocolo establecido (Pérez-Tornero y Burgos, 2000), prácticamente sin pérdidas.

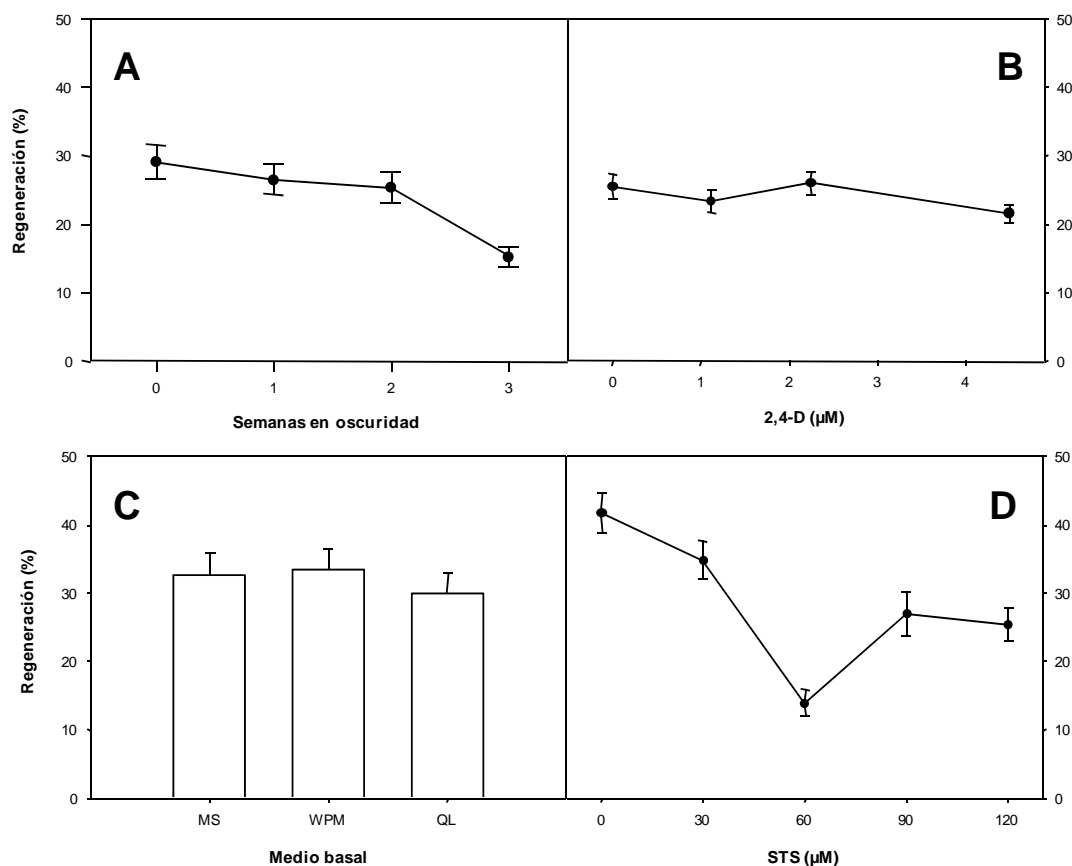


Figura II. 7. Estudio del efecto de diferentes factores sobre la regeneración adventicia de la variedad 'Canino' a partir de hipocotilo. (A) Efecto del tiempo de oscuridad. Se utilizaron un total de 290 explantos. (B) Efecto del 2,4-D en distintas concentraciones durante 3 días. Se utilizaron un total de 493 explantos. (C) Efecto del medio. En total, se utilizaron 144 explantos. (D) Efecto del STS. En total, se utilizaron 269 explantos.

En este trabajo, con cualquiera de las combinaciones ensayadas de TDZ e IBA se han conseguido yemas regeneradas de todas las variedades estudiadas. Como se ha descrito anteriormente, en el apartado referente al cotiledón, el TDZ se ha utilizado como un inductor de la regeneración de tejidos derivados de semillas de varias especies de *Prunus*.

Cuando se estudió un amplio rango de concentraciones de TDZ (de 0,5 a 25,0 μM con 2,5 μM de IBA) para la inducción de regeneración en hipocotilos de *P. salicina*, no se observaron diferencias en el porcentaje de regeneración (de 9,3% a 10,6%,

respectivamente), alcanzando el mejor resultado, 14,6%, cuando se añadió 7,5 μM de TDZ al medio (Tian *et al.*, 2007b). Por otra parte, estos autores observaron diferencias en el porcentaje de regeneración entre variedades cuando utilizaron la combinación 7,5 μM de TDZ y 2,5 μM de IBA, con valores que fueron desde 28,3% para 'Early Golden' a la ausencia de regeneración en el caso de 'Redheart'. Esto coincide con nuestros resultados, ya que no encontramos diferencias en los porcentajes de regeneración debidas a los niveles de reguladores del crecimiento, y si entre distintos genotipos ($p < 0,05$).

Cuando los hipocotilos de trece variedades de ciruelo (*P. domestica*) fueron colocados en medio de regeneración que contenía 7,5 μM de TDZ y 2,5 μM de IBA, la mayoría de ellas tuvieron porcentajes de regeneración entre el 20% y el 30%. Sin embargo, dos de ellas mostraron un mayor porcentaje de regeneración (el 58% y 57% para 'Italiano' y 'Stanley', respectivamente), mientras que una mostró sólo un 10% de regeneración, lo que indica, una vez más, la influencia del genotipo durante el proceso de regeneración (Tian *et al.*, 2007a).

Aunque el efecto del genotipo es ampliamente admitido, este disminuye cuando se utiliza un protocolo muy eficiente. Por ejemplo, el protocolo desarrollado para ciruelo europeo (Petri *et al.*, 2008c) ha sido probado en nuestro laboratorio y ha funcionado muy bien para todos los genotipos probados con porcentajes de regeneración entre el 50% y el 97%. Además, el protocolo está siendo utilizado con éxito en diferentes laboratorios.

En este trabajo, los mejores resultados obtenidos para cada variedad son comparables a los descritos para la variedad de ciruelo europeo 'Stanley' (37,5%) y son superiores a las variedades japonesas 'Angeleno' y 'Larry Anne' (11,4 y 19,4%, respectivamente), que se han transformado con éxito (Scorza *et al.*, 1995b; Scorza *et al.*, 1994; Urtubia *et al.*, 2008).

La forma en que se presenta la regeneración, como un cluster y/o como una "corona" (Figura II. 6C,D), es similar a lo que se observa en los hipocotilos maduros de ciruelo (Petri *et al.*, 2008c). Esto puede aumentar la probabilidad de coincidencia de que ocurran eventos de regeneración y transformación en la misma célula, especialmente, si la transformación se produce de forma masiva en la zona periférica (Figura II. 6C,D), donde generalmente regeneran los brotes.

Sorprendentemente, ninguno de los factores que afectan la regeneración adventicia de hoja de albaricoquero (Burgos y Alburquerque, 2003; Pérez-Tornero *et al.*, 2000a; Petri

et al., 2005b) mejoró la regeneración de las secciones de hipocotilo de semillas de ‘Canino’. Nuestros resultados sugieren que los factores estudiados dependen del tipo de explanto utilizados, además del genotipo. Otros autores también indicaron que el tipo de explanto es un factor importante en la regeneración adventicia de *Prunus* (Nas *et al.*, 2010; Pérez-Clemente *et al.*, 2004). Por ejemplo, las secciones de hipocotilo de melocotonero no mostraron capacidad de regeneración mientras que con los embriones cortados longitudinalmente se consiguió un 49,3% de regeneración en las mismas condiciones (Pérez-Clemente *et al.*, 2004). La mayoría de estos factores no han sido estudiados previamente en albaricoquero ni en otras especies de *Prunus* con este tipo de explanto. Solamente se ha descrito que pulsos con 2,4-D estimularon la regeneración y transformación en ciruelo europeo (Petri *et al.*, 2008c).

El tiempo de oscuridad afectó significativamente la regeneración adventicia a partir de hojas de albaricoquero. Ésta fue nula o escasa con un período de oscuridad de 1 ó 4 semanas y los mejores resultados se obtuvieron con 2 ó 3 semanas (Pérez-Tornero *et al.*, 2000a). En nuestro caso, no fue necesario someter los explantos a oscuridad para mejorar la regeneración, lo que coincide con trabajos anteriores donde utilizan secciones de hipocotilos maduros en *P. domestica* (Gonzalez-Padilla *et al.*, 2003; Petri *et al.*, 2008c) y *P. salicina* (Tian *et al.*, 2007b; Urtubia *et al.*, 2008). Se ha descrito que el tiempo de oscuridad puede influir en los niveles de reguladores de crecimiento endógenos como el ácido indol-3-acético (IAA) (Lopez-Carbonell *et al.*, 1992). El aumento de los niveles de auxinas endógenas durante el periodo de oscuridad podría tener un efecto perjudicial sobre la regeneración de hipocotilos de ‘Canino’, ya que los explantos podrían verse sometidos a una situación donde la proporción citoquinina/auxina sea baja. Además esto podría explicar el aumento de callogénesis observado cuando se han incubado los explantos en la oscuridad durante periodos largos y cuando se vieron sometidos a concentraciones elevadas de 2,4-D.

3.2.2. Sensibilidad a la kanamicina y paromomicina

La regeneración de hipocotilos de ‘Canino’ se vio afectada de manera diferente por los dos antibióticos ensayados. Cuando las secciones de hipocotilo se cultivaron en presencia de kanamicina a una concentración de 20 μM o mayor, los explantos permanecieron blancos o adquirieron un color marrón y no regeneraron. Sin embargo, para conseguir el mismo efecto se necesitó aplicar 40 μM de paromomicina (Figura II. 8A).

El efecto de la paromomicina fue dependiente del genotipo. Mientras que 20 μM de paromomicina no redujo el porcentaje de regeneración en hipocotilos de la variedad ‘Dorada’, disminuyó drásticamente la regeneración en las variedades ‘Canino’ y ‘Moniquí’ (Figura II. 8A,B). La concentración inhibitoria para ‘Canino’, 40 μM de paromomicina, no fue suficiente para inhibir totalmente la regeneración en ‘Dorada’ y ‘Moniquí’, aunque el porcentaje de regeneración fue muy bajo.

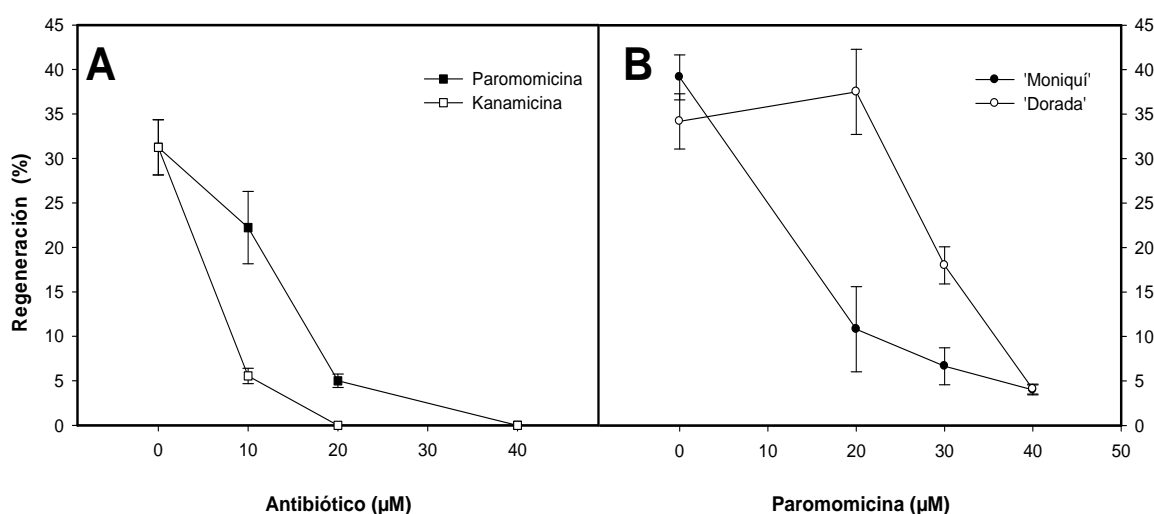


Figura II. 8. Efecto de distintas concentraciones de kanamicina y paromomicina sobre la regeneración de hipocotilos de la variedad de albaricoquero ‘Canino’ (A). Efecto de kanamicina y paromomicina sobre la regeneración de hipocotilos de la variedad ‘Canino’. (B) Efecto de distintas concentraciones de paromomicina sobre la regeneración de hipocotilos de las variedades ‘Dorada’ y ‘Moniquí’. En total, se utilizaron 197, 115 y 202 explantos de ‘Canino’, ‘Moniquí’ y ‘Dorada’, respectivamente.

En este trabajo se expusieron los explantos a los antibióticos 3 días después de que se dispusieron en el medio de regeneración, simulando la situación real de un experimento de transformación, en el que los explantos son co-cultivados con la bacteria durante 3 días en ausencia de cualquier antibiótico antes de que se aplique la selección. La concentración inhibitoria que se determina suplementando el medio de regeneración con antibiótico desde el inicio, podría conducir a una estrategia de selección equivocada, como ha sido sugerido por Padilla y Burgos (2010).

3.2.3. Transformación y evaluación de plantas transgénicas

En nuestro estudio, cuatro semanas después de la infección, los explantos de la variedad

'Canino' fueron evaluados para la expresión estable de GUS. Los eventos GUS aparecieron como puntos discretos (Figura II. 9A) o como grandes zonas o callos (Figura II. 9B) azules. En algunos explantos la expresión del gen *gus* se detectó por toda la superficie (Figura II. 9C).

La eficiencia de transformación de los hipocotilos de 'Canino', basada en la detección de GUS, fue significativamente ($p < 0,05$) afectada por el antibiótico aminoglicósido (Tabla II. 4). Cuando la paromomicina se utilizó como agente selectivo, el porcentaje de explantos que expresan GUS fue más elevado que cuando se utilizó kanamicina. Aunque el número de eventos de transformación por explanto transformado fue ligeramente superior (sin diferencia estadística) cuando se utilizó kanamicina, el número de zonas grandes o callos transgénicos fue significativamente mayor ($p < 0,001$) cuando se utilizó paromomicina (Tabla II. 4). Además, se observaron explantos completamente azules (Figura II. 9C), así como la regeneración de una yema quimérica (Figura II. 9D) cuando se utilizó paromomicina como agente selectivo.

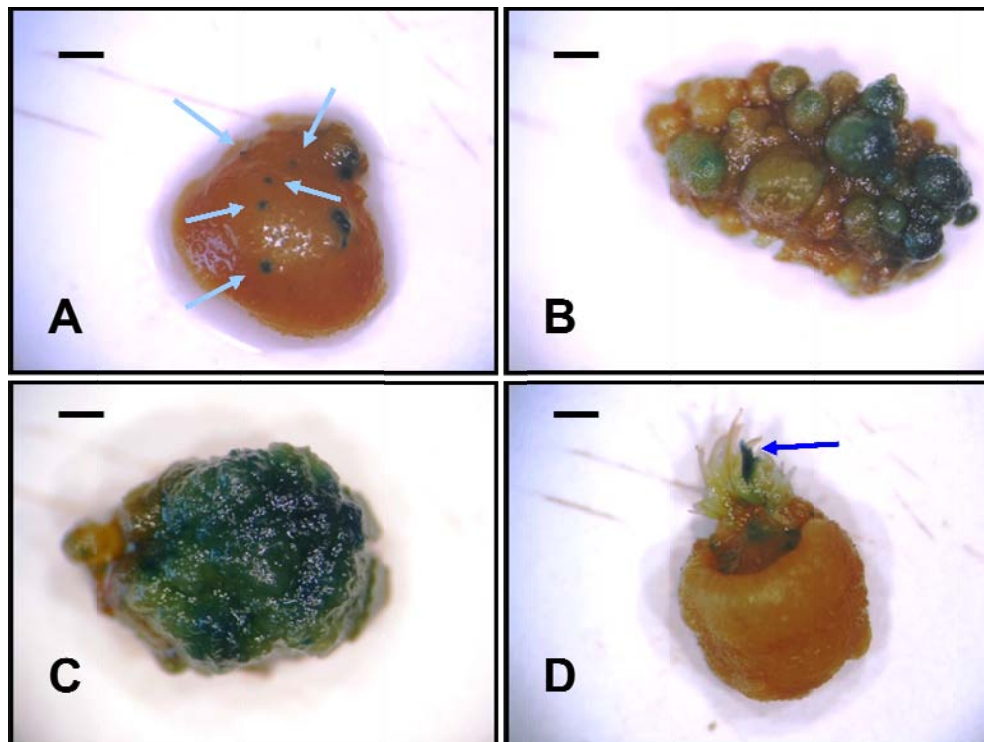


Figura II. 9. Expresión de GUS estable en hipocotilos de 'Canino' 4 semanas después de la infección con *Agrobacterium tumefaciens* AGL1/p35SGUSINT. (A) Las zonas discretas expresando GUS se indican con flechas. (B) Explantos con varios callos transgénicos. (C) Expresión de GUS en toda la superficie de un explanto. (D) Yema quimérica que muestra la actividad de GUS en unas hojas (flecha). Barra horizontal indica 1 mm.

La sensibilidad a los antibióticos varía mucho entre especies, genotipos y tejidos de la planta (Padilla y Burgos, 2010). Aunque ambos antibióticos probados son aminoglicósidos, se esperaban efectos diferentes debido a sus diferentes estructuras químicas y a publicaciones anteriores en las que la regeneración de hojas de albaricoquero fue afectada de manera diferente cuando la kanamicina o paromomicina se añadieron al medio de regeneración (Burgos y Albuquerque, 2003; Petri *et al.*, 2005a), siendo las hojas más sensibles a la kanamicina que a la paromomicina. Mientras que 40 μM de kanamicina inhibía la regeneración totalmente, 40 μM de paromomicina todavía permitía la regeneración de algunas yemas (Burgos y Albuquerque, 2003; Petri *et al.*, 2005a).

Nuestros resultados coinciden con resultados anteriores en albaricoquero donde la paromomicina resultó ser más ventajosa para células transformadas con el gen *nptII* que otros antibióticos aminoglicósidos (kanamicina, estreptomycin o geneticina) (Petri *et al.*, 2005a). Además, el uso de paromomicina permitió un mayor incremento de peso fresco de los explantos de albaricoquero transformados (Petri *et al.*, 2005a) y la regeneración de plantas transgénicas de albaricoque a partir de hojas de ‘Helena’, mientras que la kanamicina resultó ineficiente (Petri *et al.*, 2008a; Petri *et al.*, 2008b). La aparición de la quimera, posiblemente se deba a que la selección (10 μM) no ha sido suficiente. Una concentración más alta de antibiótico o una estrategia de selección gradual podría permitir la regeneración de yemas uniformemente transformadas.

Tabla II. 4. Eficiencia de transformación de hipocotilos de la variedad ‘Canino’ con AGL1/p35SGUSINT, basada en la evaluación de la expresión de GUS.

| Antibiótico (10 μM) | Eficiencia de transformación (%) | Nº eventos /nº explantos transformados | Nº zonas o callos transformados / nº explantos transformados |
|------------------------------------|-------------------------------------|---|---|
| Paromomicina | 97,8 \pm 2,2 | 10,1 \pm 1,7 | 3,5 \pm 0,4 |
| Kanamicina | 70,3 \pm 7,5 | 13,2 \pm 2,2 | 0,8 \pm 0,2 |

Se utilizaron 83 explantos en total.

En los ensayos de transformación con el plásmido pX6-GFP, se aplicaron distintas concentraciones de paromomicina para cada variedad basándonos en el resultado obtenido anteriormente (Figura II. 8). Se utilizó 20 μM para ‘Moniquí’ y 30 μM para

‘Dorada’.

Una vez que los explantos regeneraron en presencia de paromomicina, después de 4 semanas desde el inicio del ensayo, se transfirieron las yemas regeneradas a medio de proliferación, añadiendo 60 μ M de paromomicina. Muchas yemas murieron en este medio de proliferación por tratarse, posiblemente, de escapes.

Tabla II. 5. Transformación de hipocotilos de semillas maduras de albaricoquero con AGL1/ pX6-GFP.

| Variedad | Número de explantos | Yemas regeneradas. | Yemas supervivientes | Yemas PCR + | Yemas Southern + | E.T ^a | E.S ^b |
|----------|---------------------|--------------------|----------------------|-------------|------------------|------------------|------------------|
| Moniquí | 41 | 14 | 3 | 3 | 2 | 7,3 | 21,4 |
| Dorada | 79 | 25 | 4 | 1 | 0 | 1,3 | 4 |

^a Eficiencia de transformación: (Número de líneas PCR+ x 100)/Número de explantos

^b Eficiencia de selección: (Número de líneas PCR+ x 100)/Yemas regeneradas

Cuando los brotes supervivientes se desarrollaron lo suficiente para obtener material y poder realizar extracciones de ADN, se realizó la PCR con los cebadores para el gen *nptII* obteniendo el producto de amplificación esperado de 696 pb (Figura II. 10A).

Se comprobó la integración del gen *nptII* mediante hibridación Southern. Al hibridar con la sonda para el *nptII*, se observó que el transgén estaba insertado en el genoma de algunas de las líneas analizadas (Figura II. 10B).

3.2.4. Recuperación, proliferación, elongación y enraizamiento

En este trabajo, un total de 39 yemas fueron aisladas en varios ensayos de transformación, 7 de ellas sobrevivieron en presencia de 60 μ M de paromomicina durante la fase de proliferación (Figura II. 11A) y elongación (8 semanas). Posteriormente, brotes de 1-2 cm fueron colocados en el medio de enraizamiento y, después de cinco semanas, la mayoría de los brotes transgénicos mostraron un sistema radicular bien desarrollado (Figura II. 11B). La etapa de aclimatación se llevó a cabo siguiendo nuestros procedimientos habituales (Pérez-Tornero y Burgos, 2000), prácticamente sin perder ninguna planta en este paso (Figura II. 11C).

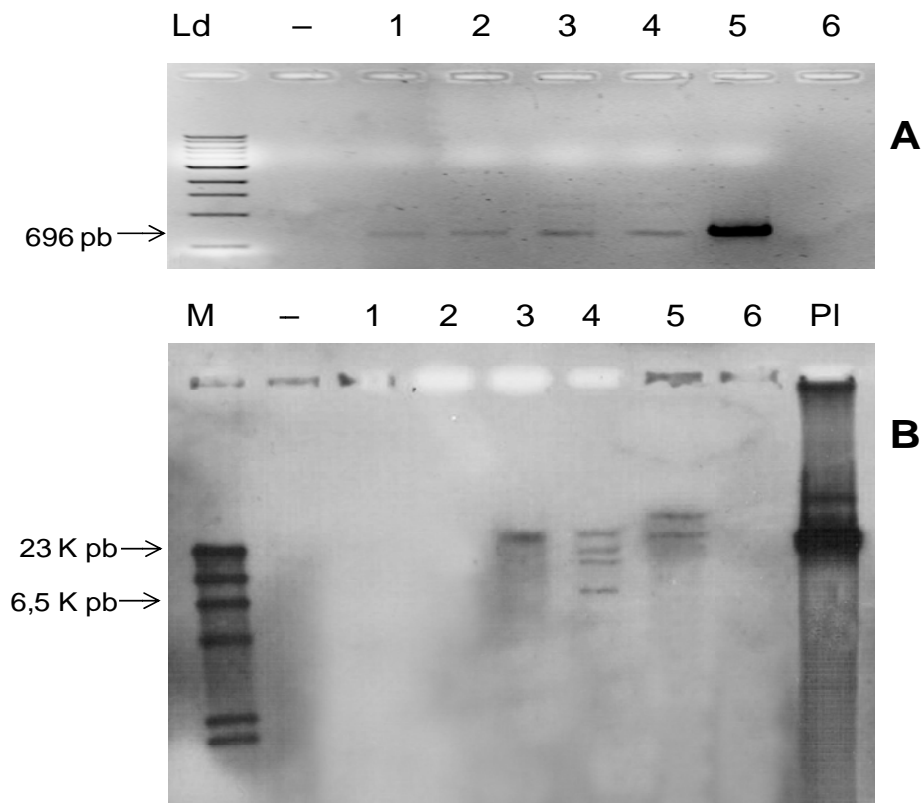


Figura II. 10. **A:** Análisis electroforético de los productos de PCR con los cebadores para el gen *nptII*. Calles Ld: Marcador de ADN 1000 pb. -: Control negativo, ADN de 'Dorada' sin transformar. Calle 1-4: Extracción de hojas de líneas transformadas (D1, M1, M2, M4) a partir de hipocotilo de albaricoquero. Calle 5: Control positivo del plásmido pX6-GFP. Calle 6: Vacía. **B:** Análisis Southern para el transgén *nptII*. M: Marcador de lambda digerido con *HindIII* marcado con digoxigenina. -: Control negativo de 'Dorada' sin transformar. Calle 1-4: Líneas transformadas (D1, M1, M2, M4). Calle 5: Control positivo de tabaco transformado con el plásmido pX6-GFP. Calle 6: Vacía. PI: control positivo del plásmido pX6-GFP.



Figura II. 11. Proliferación (A), enraizamiento (B) y aclimatación (C) de las plantas transgénicas de albaricoquero obtenidas a partir de hipocotilos de la variedad 'Moniquí'.

4. CONCLUSIÓN

Este es el primer trabajo de regeneración y transformación utilizando semillas maduras de albaricoquero. Los árboles son considerados como recalcitrantes para la transformación genética. Se ha avanzado en varias especies de *Prunus*, utilizando tejidos de semillas inmaduras y maduras. Aunque en trabajos anteriores se ha conseguido la regeneración e incluso la transformación de semillas del albaricoquero, los explantos utilizados fueron cotiledones inmaduros (Laimer da Câmara Machado *et al.*, 1992). La ventaja del método descrito aquí es que los embriones maduros están disponibles todo el año ya que las semillas maduras se pueden almacenar en la nevera mientras que los embriones inmaduros están disponibles sólo durante un tiempo limitado cada año. Además, identificar la fase óptima de desarrollo de la semilla para maximizar la regeneración no es fácil, ya que las condiciones medioambientales influyen el desarrollo de la semilla, lo que conlleva una variabilidad anual que hay que determinar empíricamente cada año.

Con los cotiledones de semillas maduras de la variedad ‘Canino’ y el patrón, *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim se obtuvieron porcentajes de regeneración muy elevados (66%) que no se vieron afectados por el genotipo. Lo más interesante es la enorme cantidad de yemas regeneradas por explanto/zona. Para la transformación genética, este hecho aumenta la posibilidad de tener plantas transformadas. Sin embargo, la aplicación de este sistema no ha dado lugar a plantas transformadas hasta el momento. La dificultad podría estar en la falta de coincidencia de las células regenerantes con las células que son transformadas por *Agrobacterium*.

Utilizando los explantos de secciones de hipocotilos de semillas maduras de tres variedades de albaricoquero, ‘Dorada’, ‘Moniquí’ y ‘Canino’, se ha establecido un protocolo fiable para obtener plantas regeneradas con un mínimo de un 32% de regeneración. Además, se ha conseguido un 7,3% de eficiencia de transformación para la variedad ‘Moniquí’ y dos de las tres líneas que resultaron positivas por PCR han sido confirmadas por Southern blot.

Transformando hipocotilos o cotiledones las plantas resultantes tienen características agronómicas desconocidas, por lo que no es un método útil para introducir una determinada característica en una variedad. Sin embargo, el protocolo de hipocotilos es sencillo y útil cuando queramos realizar una prueba de concepto y no estemos interesados en obtener variedades comerciales mejoradas (comprobación de

construcciones, desarrollar protocolos para eliminar marcadores, etc.) o para estudios de genómica funcional en esta especie. Asimismo, resultaría de gran interés para la obtención de patrones de albaricoquero transgénicos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Beranová M., Rakousky S., Vávrová Z. y Skalicky T.** (2008) Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation enhances the transformation efficiency in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **94**: 253-259.
- Brand M.H.** (1993) Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **35**: 203-209.
- Burgos L. y Albuquerque N.** (2003) Low kanamycin concentration and ethylene inhibitors improve adventitious regeneration from apricot leaves. *Plant Cell Reports*, **21**: 1167-1174.
- Canli F.A. y Tian L.** (2008) In vitro shoot regeneration from stored mature cotyledons of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, **116**: 34-40.
- Canli F.A. y Tian L.** (2009) Regeneration of adventitious shoots from mature stored cotyledons of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl). *Scientia Horticulturae*, **120**: 64-69.
- 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.
- 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.
- Colby S.M. y Meredith C.P.** (1990) Kanamycin sensitivity of cultured tissues of *Vitis*. *Plant Cell Reports*, **9**: 237-240.
- da Câmara Machado A. y Laimer da Câmara Machado M.** (1995) Genetic transformation in *Prunus armeniaca* L. (apricot), En: Plant protoplasts and genetic engineering VI. (Bajaj, Y.P.S., Ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp.: 240-254.

- 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.
- de Oliveira M., Febres V., Costa M., Moore G. y Otoni W.** (2009) High-efficiency *Agrobacterium* -mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports*, **28**: 387-395.
- 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.
- Doyle J.F. y Doyle J.L.** (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11-15.
- Driver J.A. y Kuniyuki A.H.** (1984) *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, **19**: 507-509.
- Dutt M., Li Z., Dhekney S. y Gray D.** (2007) Transgenic plants from shoot apical meristems of *Vitis vinifera* L. 'Thompson Seedless' via *Agrobacterium* -mediated transformation. *Plant Cell Reports*, **26**: 2101-2110.
- 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.
- Gamborg O.L., Miller R.A. y Ojima K.** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*, **50**: 151-158.
- Gentile A., Monticelli S. y Damiano C.** (2002) Adventitious shoot regeneration in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Plant Cell Reports*, **20**: 1011-1016.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- Lloyd G. y McCown B.** (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc Intl Plant Prop Soc*, **30**: 421-427.
- Lopez-Carbonell M., Alegre L., Prinsen E. y van Onckelen H.** (1992) Diurnal fluctuations of endogenous IAA content in aralia leaves. *Biologia Plantarum*, **34**: 223-227.
- 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.
- 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.
- 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.
- Mikhailov R.V., Muratova S.A. y Dolgov S.V.** (2004) Production of transgenic plum plants from vegetative tissues by means of positive selection. ISHS. pp. 129-138.

- Murashige T. y Skoog F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**: 473-497.
- Nas M.N., Bolek Y. y Sevgin N.** (2010) The effects of explant and cytokinin type on regeneration of *Prunus microcarpa*. *Scientia Horticulturae*, **126**: 88-94.
- Ning G.G., Bai S.P., Bao M.Z. y Liu L.** (2007) Factors affecting plantlet regeneration from in vitro cultured immature embryos and cotyledons of *Prunus mume* "Xue mei". *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **43**: 225-230.
- 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.
- Orero G., Cuenca J., Romero C., Martínez-Calvo J., Badenes M.L. y Llácer G.** (2004) Selection of seedling rootstocks for apricot and almond. *Acta Horticulturae*, **658**: 529-533.
- Padilla I. y Burgos L.** (2010) Aminoglycoside antibiotics: structure, functions and effects on *in vitro* plant culture and genetic transformation protocols. *Plant Cell Reports*, **29**: 1203-1213.
- 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-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., Olmos E. y Burgos L.** (2001) Control of hyperhydricity in micropropagated apricot cultivars. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, **37**: 250-254.
- Pérez-Tornero O., Egea J., Vanoostende A. y Burgos L.** (2000a) Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. *Plant Science*, **158**: 61-70.

- Pérez-Tornero O., López J.M., Egea J. y Burgos L.** (2000b) Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of the apricot (*Prunus armeniaca*) cv. 'Canino'. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, **75**: 283-286.
- Petri C., Albuquerque N. y Burgos L.** (2005a) The effect of aminoglycoside antibiotics on the adventitious regeneration from apricot leaves and selection of *nptII*-transformed leaf tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **80**: 271-276.
- Petri C., Albuquerque N., García-Castillo S., Egea J. y Burgos L.** (2004) Factors affecting gene transfer efficiency to apricot leaves during early *Agrobacterium*-mediated transformation steps. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, **79**: 704-712.
- Petri C., Albuquerque N., Pérez-Tornero O. y Burgos L.** (2005b) Auxin pulses and a synergistic interaction between polyamines and ethylene inhibitors improve adventitious regeneration from apricot leaves and *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **82**: 105-111.
- Petri C., López-Noguera S., Albuquerque N., Egea J. y Burgos L.** (2008a) An antibiotic-based selection strategy to regenerate transformed plants from apricot leaves with high efficiency. *Plant Science*, **175**: 777-783.
- Petri C., Wang H., Albuquerque N., Faize M. y Burgos L.** (2008b) *Agrobacterium*-mediated transformation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) leaf explants. *Plant Cell Reports*, **27**: 1317-1324.
- Petri C., Webb K., Hily J.M., Dardick C. y Scorza R.** (2008c) High transformation efficiency in plum (*Prunus domestica* L.): a new tool for functional genomics studies in *Prunus* spp. *Molecular Breeding*, **22**: 581-591.
- Pieterse R.E.** (1989) Regeneration of plants from callus and embryos of 'Royal' apricot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **19**: 175-179.
- Quoirin M. y Lepoivre P.** (1977) Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Horticulturae*, **78**: 437-442.
- 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., 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 Rep*, **14**: 18-22.
- 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.
- Tian L., Sibbald S., Subramanian J. y Svircev A.** (2007a) Characterization of *Prunus domestica* L. in vitro regeneration via hypocotyls. *Scientia Horticulturae*, **112**: 462-466.
- Tian L., Wen Y., Jayasankar S. y Sibbald S.** (2007b) Regeneration of *Prunus salicina* Lindl (Japanese plum) from hypocotyls of mature seeds. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, **43**: 343-3.
- Trick H.N. y Finer J.J.** (1997) SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Res*, **6**: 329-633.
- Urtubia C., Devia J., Castro A., Zamora P., Aguirre C., Tapia E., Barba P., Dell'Orto P., Moynihan M.R., Petri C., Scorza R. y Prieto H.** (2008) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Prunus salicina*. *Plant Cell Reports*, **27**: 1333-1340.
- 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. *Mol Gen Genet*, **220**: 245-250.
- Zuo J., Niu Q.W., Moller S.G. y Chua N.H.** (2001) Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nature Biotechnology*, **19**: 157-161.

CAPÍTULO III

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN DE MATERIAL ADULTO DE ALBARICOQUERO

ÍNDICE

| | |
|---|------------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 91 |
| 2. MATERIAL Y MÉTODOS | 95 |
| 2.1. Material vegetal..... | 95 |
| 2.2. Preparación del explanto | 95 |
| 2.3. Experimentos de regeneración | 95 |
| 2.3.1. Efecto del medio de regeneración..... | 95 |
| 2.3.2. Efecto del genotipo | 96 |
| 2.3.3. Efecto del modo de eliminación de la yema axilar | 96 |
| 2.3.4. Efecto de la edad..... | 96 |
| 2.4. Efecto de la concentración de antibióticos sobre la regeneración de ‘Helena’ sin transformar.... | 96 |
| 2.5. Transformación de cuatro variedades de albaricoquero | 96 |
| 2.5.1. Condiciones general de transformación | 96 |
| 2.5.2. Efecto de AS | 97 |
| 2.5.3. Efecto de la concentración de antibióticos sobre la eficiencia de transformación | 97 |
| 2.6. Recuperación, proliferación, elongación y enraizamiento..... | 98 |
| 2.7. Evaluación de plantas transgénicas | 98 |
| 2.8. Toma de datos y tratamientos estadísticos | 98 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 100 |
| 3.1. Regeneración..... | 100 |
| 3.1.1. El desarrollo de nuevos meristemas..... | 100 |
| 3.1.2. Efecto del medio | 101 |
| 3.1.3. Efecto del genotipo | 101 |
| 3.1.4. Efecto de la edad..... | 103 |
| 3.2. Efecto de los antibióticos sobre la regeneración de ‘Helena’ | 103 |
| 3.3. Transformación | 104 |
| 3.3.1. Efecto de la AS | 104 |
| 3.3.2. Transformación de cuatro variedades de albaricoquero..... | 105 |
| 3.4. Producción de quimeras | 109 |
| 4. CONCLUSIÓN | 110 |

1. INTRODUCCIÓN

La transformación genética permite una alteración discreta de uno o más caracteres en variedades existentes si se dispone de un sistema de cultivo de tejidos eficiente. La regeneración adventicia es muy dependiente de numerosos factores, tales como el explanto utilizado, su estado fisiológico, su edad, el medio donde los explantos se mantienen antes de la transformación y por supuesto numerosos componentes del medio de regeneración (Burgos *et al.*, 2007). La regeneración es también enormemente dependiente del genotipo utilizado y protocolos desarrollados para una determinada variedad, funcionan mal o no funcionan en absoluto con otras variedades de la misma especie (Petri y Burgos, 2005). Para que la ingeniería genética se convierta en una herramienta para la mejora de *Prunus*, es imperativo desarrollar sistemas de regeneración y transformación independientes del genotipo, basados en células meristemáticas con un elevado potencial de regeneración.

El término meristemo fue utilizado por primera vez por Nägeli en 1858 para distinguir aquellas células capaces de dar lugar a un ‘órgano completo’, germanizando una palabra del griego antiguo que significa ‘dividido’, haciendo referencia a la característica inherente a las células meristemáticas. En la definición del término, Nägeli reconocía la habilidad única del meristemo para producir células que, en última instancia, darían lugar a todos los órganos de la planta, en esencia que el meristemo contiene ‘células madre’ (Sofield y Murray, 2006).

El estudio del desarrollo de los meristemas ha despertado gran interés y últimamente estos estudios se están centrando en la genética de los procesos que regulan este desarrollo (Carraro *et al.*, 2006; Heisler y Jönsson, 2007).

El meristemo tiene una estructura en capas, una superficial denominada túnica, que cubre los tejidos internos en las angiospermas. Generalmente esta capa está subdividida longitudinalmente en subcapas llamadas L1, L2 y L3 (Figura III. 1). Dentro de las capas L1 y L2, las células se dividen generalmente en orientación anticlinal, por lo que las células resultantes permanecen preferentemente en la misma capa.

Después de la división, las células hijas se desplazan del centro a la zona periférica, para formar un órgano nuevo. Las células de la capa L1 forman la epidermis y las de L2 forman el tejido mesófilo de un órgano. La multicapa L3 se divide en forma anti- y periclinal y forma el cuerpo de una planta. Las células meristemáticas están situadas en

las primeras 4-5 capas superiores de la zona central, por lo tanto, incluyen células de las tres capas. Debajo de las células meristemáticas, hay un grupo de células que se dividen lentamente y forman el centro organizador. Las células del centro organizador tienen función de “células madre” y son esenciales para el mantenimiento del meristemo (Carraro *et al.*, 2006). Este grupo de células ha sido denominado por Ivanov (2004) ‘Centro Quiescente’ (QC) y un análisis detenido de las características de las células que lo componen (ausencia de diferenciación, capacidad de proliferación, capacidad de auto-mantenimiento de la población, capacidad para producir descendencia diferenciada para distintas funciones, capacidad para regenerar el tejido después de una herida y flexibilidad para utilizar estas propiedades) hacen pensar que, efectivamente, estas células constituyen lo más parecido a las células madre en los animales (Ivanov, 2004).

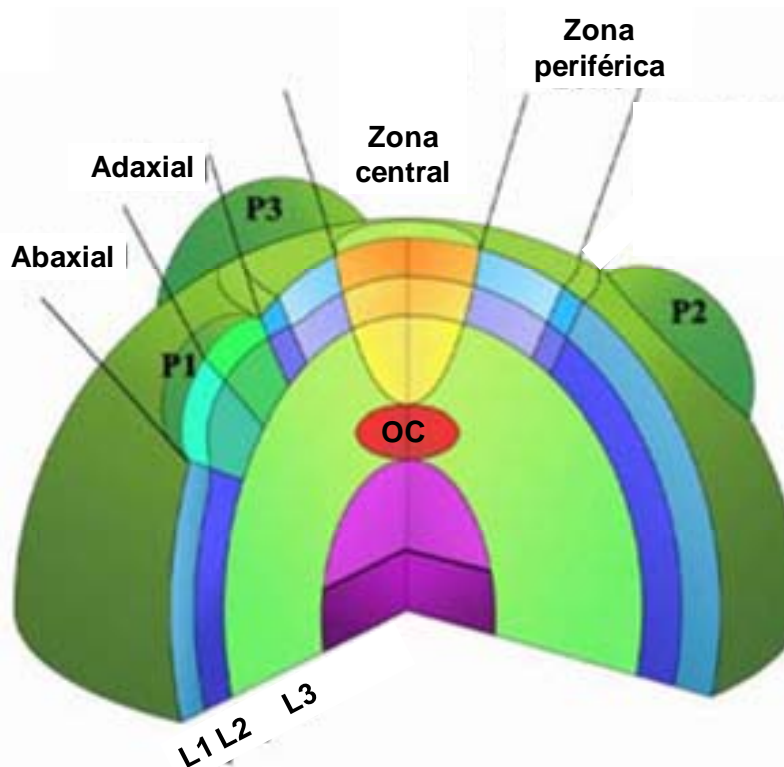


Figura III. 1. Estructura de la zona meristemática. Adaptado de Bleckmann y Simon (2009). OC, centro organizador. L1, L2 y L3, tres capas. P1, P2 y P3, primordias.

A pesar del parecido que puede haber en muchas de sus características entre las células madre en animales y las células del QC en plantas, hay una diferencia fundamental y es que estas últimas no proceden de células embrionarias. Diferentes evidencias muestran que en las plantas las “células madre” son producidas por los meristemos. Estas células están en división activa en los meristemos de la raíz (Feldman, 1976) y del tallo

(Reinhardt *et al.*, 2003), tanto en el curso de la morfogénesis normal como después de la eliminación del QC, que ocupa una posición apical (Weigel y Jürgens, 2002), siempre que el tamaño de la parte escindida no sea demasiado grande (Feldman, 1976). Por tanto, la formación del QC se puede considerar como una manifestación de la organización del meristemo y no como una población de células formadas en el curso de la embriogénesis y mantenida indefinidamente (Ivanov, 2004).

Esta es una característica muy importante de los meristemos de plantas, en los que células funcionalmente idénticas a las células madre en animales son producidas a partir de células que normalmente son capaces de comenzar la elongación y diferenciación después de varias mitosis. Es más, después de que la elongación termina, las células pueden volver a dividirse activamente y, células próximas al ápice en división activa, pueden dar lugar a células similares a las células madre. Esta es la característica más relevante de la morfogénesis en plantas, que no se encuentra en animales, y constituye la diferencia más significativa en la organización de la proliferación entre animales y plantas (Ivanov, 2004).

Gould y Magallanes-Cedeno (1998) y Zapata *et al.* (1999) desarrollaron un método para la transformación de algodón utilizando los ápices como explantos. Esta metodología basada en células meristemáticas, también, se ha aplicado en varias especies como maíz (Gould *et al.*, 1991) y arroz (Park *et al.*, 1996).

En especies hortícolas se han utilizado aproximaciones consistentes en transformar meristemos (Bean *et al.*, 1997; Gambley *et al.*, 1993; Lowe *et al.*, 1995; Sankara Rao y Rohini, 1999; Sautter *et al.*, 1995; Ulian *et al.*, 1988; Yookongkaew *et al.*, 2007), pero estas aproximaciones presentan dificultades para obtener plantas uniformemente transformadas. Sin embargo, la posibilidad de transferir el transgén a la descendencia de quimeras, obtenidas como primeros transformantes, hace que esta metodología sea interesante para estas especies pero de escaso o nulo interés en el caso de frutales leñosos, dados los prolongados periodos entre generaciones y la imposibilidad de mantener la identidad genética de la variedad transformada.

Sin embargo, la transformación de meristemos también se ha utilizado en leñosas como plátano (May *et al.*, 1995), pino (Gould *et al.*, 2010) o vid (Dutt *et al.*, 2007). En peral, mediante técnicas de cultivo *in vitro*, utilizando un medio adecuado, se consiguió producir la inducción de meristemos secundarios con la consiguiente regeneración de numerosos brotes, estos brotes pueden ser transformados (Matsuda *et al.*, 2005) y la

inducción de meristemas secundarios permitiría resolver el problema de la utilización de meristemas completos. No obstante, aunque los autores describen un cierto éxito en la obtención de plantas transformadas no quiméricas, las bajas eficiencias de transformación obtenidas, similares a las de otras variedades en las que utilizaron hojas como explantos, hacen sospechar que la metodología no sea fácilmente transferible. Además, aunque los autores aseguran no haber detectado ningún transformante quimérico, el riesgo es elevado al utilizar estructuras tan organizadas como un meristemo. Otros autores han intentado transformar meristemas obtenidos de plantas micropropagadas de cerezo y melocotonero (Druart *et al.*, 1998; Ye *et al.*, 1994). Sin embargo, una elevada mortalidad de los explantos y dificultades en el control del crecimiento de *Agrobacterium* han limitado el desarrollo de esta metodología en *Prunus* (Scorza *et al.*, 1995).

Hasta el momento, no se ha conseguido que estas tecnologías sean herramientas de uso común en los programas de mejora de frutales leñosos. Para ello se requiere que estos procedimientos sean reproducibles, de elevada eficiencia e independientes del genotipo. Además, es necesario que permitan la utilización de material adulto que garantice la identidad genética del material vegetal y que evite los problemas de juvenilidad en aquellas especies en las que estos periodos sean muy largos.

Con el fin de explorar la posibilidad de desarrollar un protocolo de transformación independiente del genotipo, en este capítulo hemos estudiado el desarrollo de una nueva metodología basada en la transformación de células con capacidad meristemática que permanecen en los tallos tras eliminar las yemas axilares.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

En este trabajo se han utilizado 5 variedades de albaricoquero: las variedades americanas ‘Helena’ y ‘Lorna’, cedidas por el Dr. Craig A. Ledbetter del Agricultural Research Service (U.S.D.A.) en Fresno (California) y las variedades españolas ‘Canino’, ‘Rojo Pasión’ y ‘Murciana’ que fueron introducidas *in vitro* y multiplicadas en el marco de proyectos realizados en nuestro Departamento. Los brotes se subcultivan en medio de proliferación (ver Capítulo II) cada tres semanas, y se mantienen a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, con luz fluorescente blanca ($55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y un fotoperiodo de 16 horas.

2.2. Preparación del explanto

Se utilizaron tallos de brotes micropropagados en medio de proliferación durante 21 días (final del ciclo de subcultivo). Se les eliminó el ápice y el callo, las yemas axilares se separaron del tallo realizando un corte preciso, paralelo al tallo, mediante un bisturí. Se trocearon los brotes en porciones de aproximadamente 1 cm de longitud dejando al menos un nudo en el extremo. Los explantos preparados de esta forma (explantos nodales) se colocaron directamente en medio de regeneración líquido para evitar su desecación hasta que se realizaron los ensayos de regeneración o de transformación.

2.3. Experimentos de regeneración

Todos los ensayos de regeneración, se mantuvieron a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, con luz fluorescente blanca ($55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y un fotoperiodo de 16 horas, hasta la evaluación de la regeneración.

2.3.1. Efecto del medio de regeneración

Se estudió el efecto de tres medios sobre la regeneración de ‘Helena’. Dos de ellos (R18 y R21) fueron desarrollados en nuestro laboratorio para conseguir regeneración a partir de hojas de brotes micropropagados de albaricoquero (Pérez-Tornero *et al.*, 2000b) y tienen un elevado contenido de la citoquinina tidiazurón ($9 \mu\text{M}$ de TDZ), diferenciándose en la concentración de auxina ($2,7 \mu\text{M}$ de ácido naftalenacético en RM18 y $4,0 \mu\text{M}$ en RM21). El otro (medio de meristemas) se desarrolló también en nuestro laboratorio con el fin de conseguir la introducción de meristemas de albaricoquero *in vitro* (Pérez-Tornero *et al.*, 1999) que consiste en los macronutrientes, los micronutrientes, vitaminas y componentes orgánicos de QL, 3% de sacarosa y 0,7%

de agar. Como reguladores del crecimiento se añaden 6,67 μM de N^6 -bencilaminopurina (BAP) y 0,05 μM de ácido indol-3-butírico (IBA). La citoquinina utilizada es BAP a niveles que indujeron muy escasa o nula regeneración a partir de hojas (Pérez-Tornero *et al.*, 2000b).

2.3.2. Efecto del genotipo

Se dispusieron explantos nodales de ‘Helena’, ‘Lorna’, ‘Canino’, ‘Murciana’ y ‘Rojo Pasión’ en el medio de regeneración (medio de meristemos).

2.3.3. Efecto del modo de eliminación de la yema axilar

Se eliminaron las yemas axilares de la variedad ‘Helena’ con o sin la ayuda de una lupa binocular y se colocaron los explantos en el medio de meristemos.

2.3.4. Efecto de la edad

Se dividieron los brotes de la variedad ‘Helena’ en dos partes, la zona más joven (próxima al ápice) y la base y se colocaron los explantos en el medio de meristemos.

2.4. Efecto de la concentración de antibióticos sobre la regeneración de ‘Helena’ sin transformar

Se adicionaron al medio de meristemos dos tipos de antibióticos aminoglicósidos a diferentes concentraciones con el fin de conocer la concentración inhibitoria de la regeneración en material sin transformar. Para ello se dispusieron explantos nodales de ‘Helena’ en medio al que se añadieron 30, 40, 50, 60, 70, 85, 130 ó 165 μM de kanamicina, o 40, 70, 80 ó 100 μM de paromomicina y se compararon con un control sin la adición de antibióticos

2.5. Transformación de cuatro variedades de albaricoquero

Basándonos en un protocolo de transformación de albaricoquero desarrollado en nuestro laboratorio a partir de explantos de hoja (Petri *et al.*, 2008), se establecieron previamente diferentes parámetros como el modo de infección, la concentración de la bacteria y el tiempo de co-cultivo para transformar explantos nodales.

2.5.1. Condiciones generales de transformación

La cepa de *A. tumefaciens* utilizada en los experimentos de transformación fue la cepa desarmada EHA105, derivada de la cepa oncogénica A281, amablemente cedidas por el Dr. Leandro Peña (Departamento de Biotecnología Vegetal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias). Dicha cepa contenía el plásmido binario p35SGUSINT

(Vancanneyt *et al.*, 1990) con el gen de resistencia a antibióticos aminoglicósidos *nptII* y el gen *uidA*.

La bacteria se incubó como se describe en el apartado 2.1.4. del Capítulo II, pero, tras centrifugar a 1000g, se diluye hasta una $D.O_{600}=0,2$ en medio SIM (Alt-Mörbe *et al.*, 1989) adicionando los antibióticos correspondientes y 500 μM de acetosiringona (AS) durante un mínimo de 5 horas, a 25°C y 0,1 g de agitación. Posteriormente se centrifuga de nuevo y se resuspende en medio líquido de regeneración a la densidad óptica utilizada para la infección.

Los explantos son infectados mediante inmersión en una suspensión bacteriana de $D.O_{600}=0,05$ durante 20 minutos en vacío (-600 mm de Hg).

Los explantos infectados se disponen en medio de co-cultivo durante 2 días en oscuridad. El medio de co-cultivo consiste en medio de regeneración (medio de meristemas) con la adición de 100 μM de AS.

Después del co-cultivo los explantos son transferidos al medio de regeneración al que se adiciona 0,63 mM de cefotaxima y 0,13 mM de vancomicina, para controlar el crecimiento de *Agrobacterium* y 40 μM de paromomicina. Los explantos son incubados en la oscuridad 12 días y posteriormente a la luz con un fotoperiodo de 16/8 horas y 23°C de temperatura, hasta la evaluación o la recuperación de las yemas regeneradas después de 4 semanas.

2.5.2. Efecto de AS

Utilizando explantos nodales y partiéndolos longitudinalmente, se dispusieron en el medio de co-cultivo al que se añadió 0 ó 100 μM de AS, para observar el efecto sobre la transformación mediante la detección de GUS.

2.5.3. Efecto de la concentración de antibióticos sobre la eficiencia de transformación

Con el fin de conocer la concentración óptima para tener máxima eficiencia de transformación, se dispusieron explantos nodales infectados de 'Helena', 'Canino', 'Lorna' y 'Rojo Pasión' en medio de regeneración al que se añadieron distintas concentraciones de paromomicina (Tabla III. 3).

2.6. Recuperación, proliferación, elongación

Las yemas regeneradas en los distintos experimentos fueron aisladas y transferidas al mismo medio y en esta fase de proliferación, se subcultivaron con una frecuencia de dos semanas. A las dos o cuatro semanas desde su aislamiento, dependiendo de su crecimiento, las yemas fueron transferidas al medio de proliferación.

Durante todo el proceso de recuperación de las yemas, se añaden 0,63 mM de cefotaxima y 0,13 mM de vancomicina para controlar el crecimiento de *Agrobacterium*, y 40 μ M de paromomicina como agente selectivo.

2.7. Evaluación de plantas transgénicas

Algunas yemas supervivientes se evaluaron al azar mediante GUS siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Capítulo II y 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.

El resto de las yemas fueron aisladas y multiplicadas en presencia de 40 μ M de paromomicina hasta disponer de suficiente material para realizar las extracciones de ADN y llevar a cabo la evaluación a nivel molecular.

La evaluación molecular (PCR, Southern blot) se realizó tal y como se ha descrito en el Capítulo II.

2.8. Toma de datos y tratamientos estadísticos

En los ensayos de regeneración, para cada tratamiento se prepararon al menos 4 placas de Petri con un mínimo de 12 explantos en cada placa. Los tratamientos fueron repetidos al menos 2 veces.

En todos los tratamientos se determinó el porcentaje de regeneración (número de explantos que regeneran \times 100 / número total de explantos) al final de la cuarta semana.

Todos los tratamientos de transformación se compararon con un control sin infectar en las mismas condiciones con el fin de observar el efecto del tratamiento sobre la regeneración.

Para evaluar la eficiencia de transformación se determinó el porcentaje de explantos con expresión GUS (número de explantos con GUS \times 100 / número de explantos totales), eventos de GUS por explanto (número de eventos de GUS / número de explantos totales),

la eficiencia de transformación (E.T.= números de líneas transformadas×100/ número de explantos infectados), y la eficiencia de selección (E.S.= número de líneas transformadas×100/ número de yemas regeneradas).

Los tratamientos estadísticos aplicados a los datos fueron los mismos que los descritos en el Capítulo II.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las especiales características de los meristemas vegetales hacen posible que tras la eliminación del meristemo presente en las yemas axilares, un nuevo meristemo se organice a partir de células meristemáticas que no son eliminadas. La utilización de este tipo de células permite el uso de material adulto, evita la necesidad de diferenciación inicial asociada a la regeneración adventicia, lo que les capacita para desarrollarse y dar lugar a un nuevo brote con elevada eficiencia. Por otra parte, la producción de una herida y la eliminación del meristemo axilar hacen que estas células sean accesibles a *Agrobacterium*, permitiendo, en las condiciones de selección apropiadas, que un nuevo meristemo se organice a partir de estas células transformadas.

3.1. Regeneración

3.1.1. El desarrollo de nuevos meristemas

La eliminación de las yemas se realiza deslizando un bisturí bien afilado paralelo al tallo. La yema se debe eliminar completamente para evitar la presencia de meristemas organizados. Esta parte del protocolo es muy importante y si la eliminación de las yemas no se realiza correctamente hay yemas axilares secundarias, que no se distinguen a simple vista, que se desarrollan muy rápido apareciendo normalmente dentro de la primera semana del experimento. Estas compiten con el desarrollo de nuevos meristemas y por lo tanto es necesario eliminarlas mediante un corte lo suficientemente estricto. Por otra parte, si el corte es excesivo y se profundiza mucho en el tejido del tallo se eliminan completamente las células con capacidad meristemática y la regeneración no ocurre. Es un aspecto que se debe evaluar experimentalmente para cada especie e, incluso, para cada variedad.

Un estudio histológico (Figura III. 2) de la regeneración a partir de explantos nodales de 'Helena' demostró que, desde el día en que se inició el experimento, un cierto porcentaje de los explantos contenían yemas microscópicas perfectamente formadas (Figura III. 2A) que no eran eliminadas al cortar la yema axilar. Se estimó que estas yemas axilares secundarias podían suponer hasta un 30% de la regeneración observada. Dado que estos meristemas organizados no pueden ser transformados por *Agrobacterium* en todas sus células, en caso de sobrevivir a la selección darían lugar a quimeras y por lo tanto son indeseables. Por esta razón, se estudió el efecto de eliminar las yemas axilares con la ayuda de una lupa binocular, observándose que la utilización de la lupa redujo en aproximadamente un 30% la regeneración obtenida (Tabla III. 1).

Por otro lado, se pudo constatar que existía regeneración de nuevos meristemas originados a partir de células que permanecían tras la eliminación de las yemas axilares (Figura III. 2B, C).

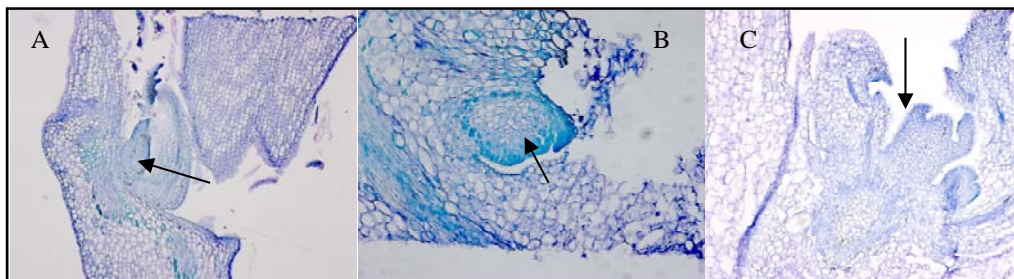


Figura III. 2. Examen histológico de la regeneración de explantos nodales de la variedad Helena. A) Yema microscópica a día 0 del experimento (flecha). B y C) Desarrollo de los nuevos meristemas 5 y 10 días después del inicio del experimento (flechas).

3.1.2. Efecto del medio

Un aspecto absolutamente crítico cuando se optimiza un proceso de regeneración adventicia es el medio de cultivo, por ello se comparó el efecto de medios relativamente diferentes, especialmente en lo que se refiere al contenido en citoquininas.

Entre los distintos medios comparados no aparecieron diferencias significativas aunque la regeneración obtenida en el medio de meristemas fue ligeramente superior pero, sobre todo, las yemas regeneradas tuvieron un mejor aspecto y no presentaron problemas de hiperhidratación, que sí fueron observados en el medio con altas concentraciones de TDZ como el RM18 y RM21.

3.1.3. Efecto del genotipo

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 *et al.*, 1994; Pérez-Tornero *et al.*, 2000a), almendro (Ainsley *et al.*, 2000), melocotonero (Pooler y Scorza, 1995) y en ciruelo (Escalettes y Dosba, 1993). Protocolos desarrollados para una determinada variedad, funcionan mal o no funcionan en absoluto con otras variedades de la misma especie (Petri y Burgos, 2005).

Tabla III. 1. Efecto de distintos factores sobre la regeneración de albaricoquero.

| Factor | Tratamiento | Número total de explantos | Porcentaje de regeneración (%±E.S.) |
|--|------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| Medio de regeneración: | | | |
| | RM21 | 86 | 68,6 ± 5,0 |
| | RM18 | 59 | 69,5 ± 5,9 |
| | Medio meristemo | 69 | 81,1 ± 4,7 |
| Edad: | | | |
| | Ápices | 110 | 89,1 ± 3,0 |
| | Bases | 110 | 70,9 ± 4,3 |
| Modo de la eliminación de yema axilar: | | | |
| | Sin ayuda de binocular | 40 | 85,0 ± 5,6 |
| | Con ayuda de binocular | 40 | 52,5 ± 7,9 |
| Genotipo: | | | |
| | ‘Helena’ | 96 | 88,5 ± 3,2 |
| | ‘Rojo Pasión’ | 154 | 54,5 ± 4,0 |
| | ‘Lorna’ | 158 | 54,4 ± 4,0 |
| | ‘Canino’ | 136 | 71,3 ± 3,9 |
| | ‘Murciana’ | 108 | 68,5 ± 4,5 |

En este trabajo se utilizaron cinco variedades en los ensayos de regeneración y el rango de los porcentajes de regeneración fue 54,4%-88,5% (Tabla III. 1), encontrándose diferencias entre genotipos ($p < 0,05$). Las variedades como ‘Lorna’ y ‘Rojo Pasión’ presentaron un 54,4% de regeneración y, aunque este porcentaje fue el más bajo encontrado en las cinco variedades, era suficiente para intentar su transformación. Los resultados de regeneración obtenidos demuestran que el método es robusto y los resultados son consistentes. Ésta es la principal ventaja de la utilización de células meristemáticas en comparación con la organogénesis o la embriogénesis somática adventicias.

3.1.4. Efecto de la edad

La edad del explanto también puede influir en la eficiencia de regeneración. Se observó una mayor regeneración a partir de los explantos más jóvenes, aquellos que provenían de la parte superior de los brotes, apareciendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) (Tabla III. 1). Este efecto ha sido observado cuando se han utilizado otros tipos de explantos. Por ejemplo, en albaricoquero, en general, cuando se utilizaron hojas jóvenes como explanto inicial se obtuvieron mejores resultados (Pérez-Tornero y Burgos, 2000a) por lo que se solían utilizar las 4 primeras hojas de los ápices. También Mante *et al.* (1989) observaron una gran diferencia en la capacidad regenerativa de cotiledones inmaduros de melocotonero dependiendo de la edad de los mismos.

3.2. Efecto de los antibióticos sobre la regeneración de ‘Helena’

El agente de selección (antibiótico, herbicida u otros) permitirá, una vez optimizado, el crecimiento de la mayoría de las yemas transformadas mientras que impedirá, en la mayoría de los casos, el crecimiento de escapes. Este es, junto con la eliminación de las yemas axilares, el otro aspecto crítico del proceso. La concentración se debería estimar de tal manera que inhibiera la regeneración de yemas viables en los controles sin transformar y permitiera alguna regeneración de yemas verdes y saludables en los explantos infectados. Concentraciones subóptimas conducen a la producción de escapes, que compiten con las células transformadas, así como de quimeras.

Para determinar el efecto de los antibióticos sobre la regeneración, se llevó a cabo un experimento en el que se dispusieron los explantos de ‘Helena’ en el medio de regeneración añadiendo diferentes concentraciones de kanamicina o paromomicina. La regeneración disminuyó gradualmente con concentraciones crecientes del antibiótico, pero concentraciones relativamente elevadas fueron necesarias (en ambos casos más de 100 μM) para inhibir la regeneración completamente (Figura III. 3).

En albaricoquero, la regeneración a partir de hojas disminuyó drásticamente con 25,7 μM de kanamicina, los explantos se volvieron cloróticos y murieron (Burgos y Albuquerque, 2003). Dicha concentración podría ser la adecuada para utilizar este antibiótico como agente de selección, sin embargo no fue posible obtener plantas transformadas a partir de hojas utilizando kanamicina como agente selectivo (Petri *et al.*, 2008).

Basándonos en que la paromomicina y la kanamicina produjeron el mismo efecto sobre la regeneración (Figura III. 3), ya que la paromomicina parece que confiere una mayor ventaja a las células transformadas que otros antibióticos aminoglicósidos probados en albaricoquero (Petri *et al.*, 2005), y puesto que con este antibiótico sí que se obtuvieron plantas transformadas a partir de hojas (Petri *et al.*, 2008), se decidió emplear la paromomicina como agente de selección en este trabajo.

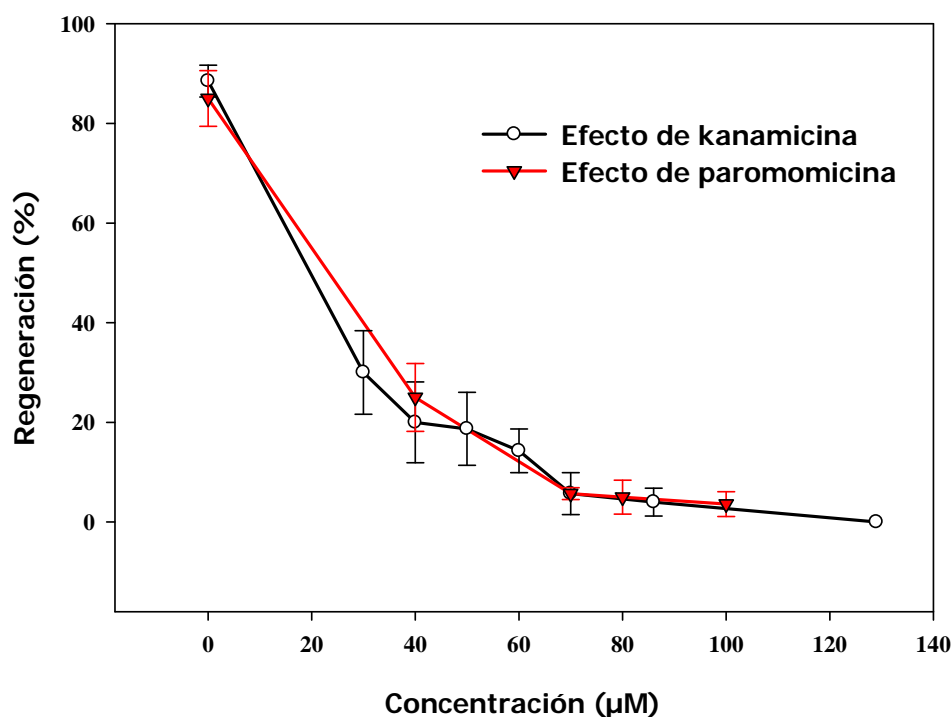


Figura III. 3. Efecto de kanamicina y paromomicina sobre la regeneración de albaricoquero cv. 'Helena' utilizando explantos nodales. Las barras verticales indican los errores estándar.

3.3. Transformación

3.3.1. Efecto de la AS

La AS 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 AS aumentó claramente el porcentaje de explantos transformados, comparado con un control sin AS. En los explantos nodales cortados longitudinalmente, se observó la mayoría de la expresión de GUS en la zona del cambium cuando se añadió AS, sin embargo, sólo se observó un 2,2% de explantos con expresión de GUS cuando se utilizó medio de co-cultivo sin AS (Tabla III. 2).

Tabla III. 2. Efecto de la acetosiringona sobre la transformación de explantos nodales cortados longitudinalmente de la variedad de albaricoquero 'Helena' utilizando la cepa EHA105 de *Agrobacterium*.

| AS (μM) | Nº de explantos | Porcentaje de explantos con GUS | Eventos de GUS por explanto |
|----------------------|-----------------|---------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 91 | 2,2 \pm 1,54 | 0,1 |
| 100 | 129 | 79,1 \pm 3,58 | 13,5 \pm 2,70 |

Se ha demostrado el papel beneficioso de la AS induciendo los genes *vir* e incrementando la transformación genética de diferentes especies desde *Arabidopsis* (Sheikholeslam y Weeks, 1987) hasta cítricos (Cervera *et al.*, 1998) o manzano (James *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1999). También en albaricoquero la adición de AS mejoró la transformación de tejidos del mesófilo (Petri *et al.*, 2004), aunque, por otro lado, la AS no mejoró la transformación en almendro (Ainsley *et al.*, 2002). Dada la facilidad de transformación de los explantos nodales cortados longitudinalmente, se pueden utilizar para evaluar algunos factores de transformación. Sin embargo, estos explantos regeneran en bajos porcentajes probablemente debido a varias razones. Por una parte, el corte longitudinal dañó en exceso a los explantos. Además, el antibiótico pudo entrar con más facilidad en estos explantos incrementando el efecto de la selección para una misma concentración de antibiótico. Por tanto, se descartó su utilización para la obtención de plantas transgénicas.

3.3.2. Transformación de cuatro variedades de albaricoquero

Se obtuvieron yemas que expresaban GUS en todas las concentraciones del antibiótico evaluadas en la variedad 'Helena' (Figura III. 4).

Sólo 43 de las yemas aisladas consiguieron sobrevivir a la selección con 40 μM de paromomicina, y de estas, 39 dieron positivo cuando fueron evaluadas por PCR, amplificando la banda esperada de 696 pb (Figura III. 5) con los cebadores para el gen *nptII* (ver apartado 2.2.6.2. del Capítulo II). De hecho, la máxima eficiencia de transformación de la variedad 'Helena', estimada en base a los brotes que dieron positivo en la evaluación por PCR, fue del 6,67% cuando se añadió 40 μM de paromomicina al medio selectivo.

Tabla III. 3. Efecto de la selección sobre la eficiencia de transformación de 4 variedades de albaricoquero.

| Variedad | Paromomicina (μM) | Número de explantos | Yemas supervivientes | Yema PCR + | E.T. |
|---------------|--------------------------------|---------------------|----------------------|------------|------|
| 'Helena' | 20 | 60 | 1 | 1 | 1,67 |
| | 40 | 120 | 9 | 8 | 6,67 |
| | 60 | 60 | 2 | 2 | 3,33 |
| | 70 | 984 | 18 | 16 | 1,63 |
| | 80 | 118 | 2 | 2 | 1,69 |
| 'Canino' | 40 | 36 | 0 | 0 | 0 |
| | 60 | 94 | 4 | 3 | 3,19 |
| | 75 | 50 | 1 | 1 | 2,00 |
| 'Rojo Pasión' | 40 | 66 | 1 | 1 | 1,51 |
| | 50 | 60 | 2 | 2 | 3,33 |
| | 60 | 100 | 1 | 1 | 1,00 |
| | 70 | 85 | 1 | 1 | 1,18 |
| 'Lorna' | 50 | 80 | 0 | 0 | 0 |
| | 60 | 60 | 1 | 1 | 1,67 |
| | 70 | 80 | 0 | 0 | 0 |
| 'Total' | | 2053 | 43 | 39 | 1,90 |

Otras variedades 'Canino', 'Rojo Pasión' y 'Lorna' obtuvieron un máximo de 3,19%, 3,33% y 1,67% (Tabla III. 3) de eficiencia de transformación, utilizando sus selecciones óptimas de 60, 50, y 60 μM de paromomicina, respectivamente. Al comparar las eficiencias de transformación entre las distintas concentraciones de antibiótico para cada variedad, se observó que el rango adecuado para la selección de los transformantes está entre 40 a 60 μM de paromomicina.

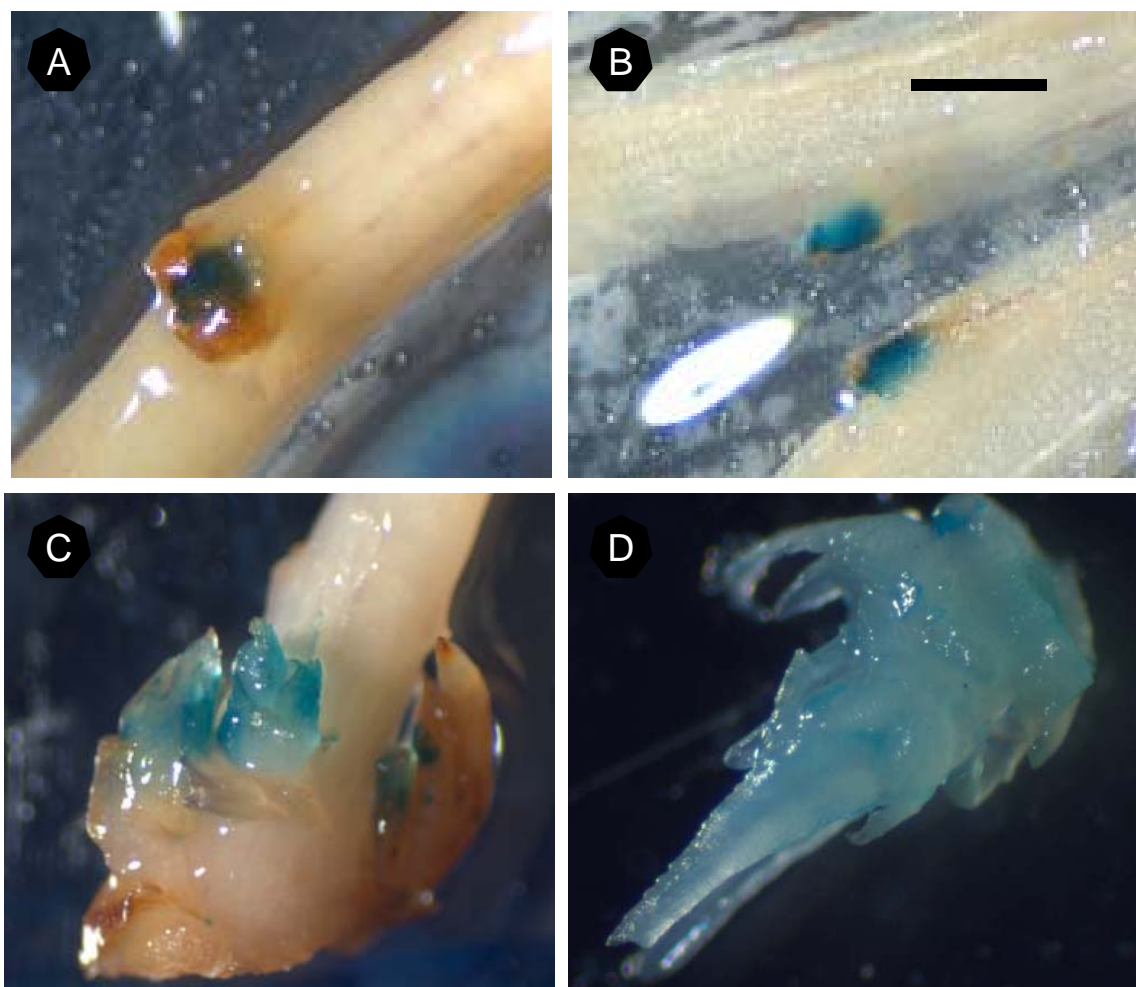


Figura III. 4. Examen histoquímico de las yemas regeneradas, cuatro semanas después de la infección con EHA105/pBin19GUSINT. A y B: explantos con áreas expresando GUS que coinciden con las zonas en las que se eliminaron las yemas axilares y en las que está ocurriendo una activa división celular. C y D: yemas transformadas expresan GUS positivo. La barra indica 1mm.

En las líneas transgénicas la integración del gen *nptII* se comprobó mediante hibridación Southern. Se eligieron ocho líneas al azar entre las 39 que dieron positivo para la amplificación del gen *nptII* por PCR. Tras la extracción de ADN se digirieron las muestras con *EcoRI*. Al hibridar con la sonda para el *nptII* se observó que dos líneas habían insertado el transgén (Figura III. 6), confirmando de esta forma la integración de ADN-T en el genoma del albaricoquero.

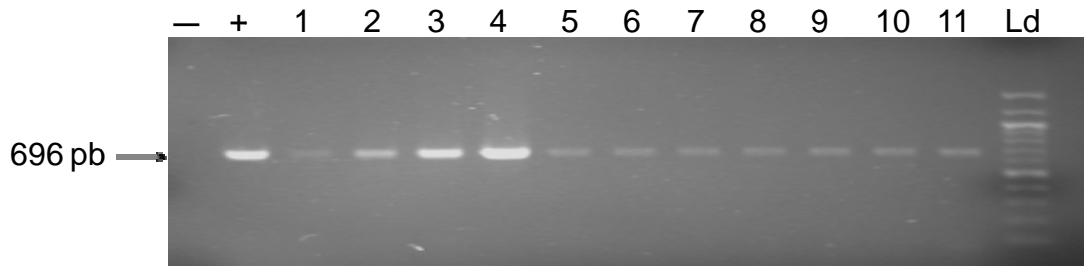


Figura III. 5. Análisis electroforético de los productos de PCR de líneas transformadas con pBin19GUSINT producidas a partir de explantos nodales de albaricoquero con los cebadores para el gen *npfl*. — : Control negativo, extracción de hojas de albaricoquero variedad 'Helena' sin transformar. Ld: Marcador de ADN 100 pb. +: Control positivo, plásmido. 1-11: Líneas supervivientes en experimentos de transformación.

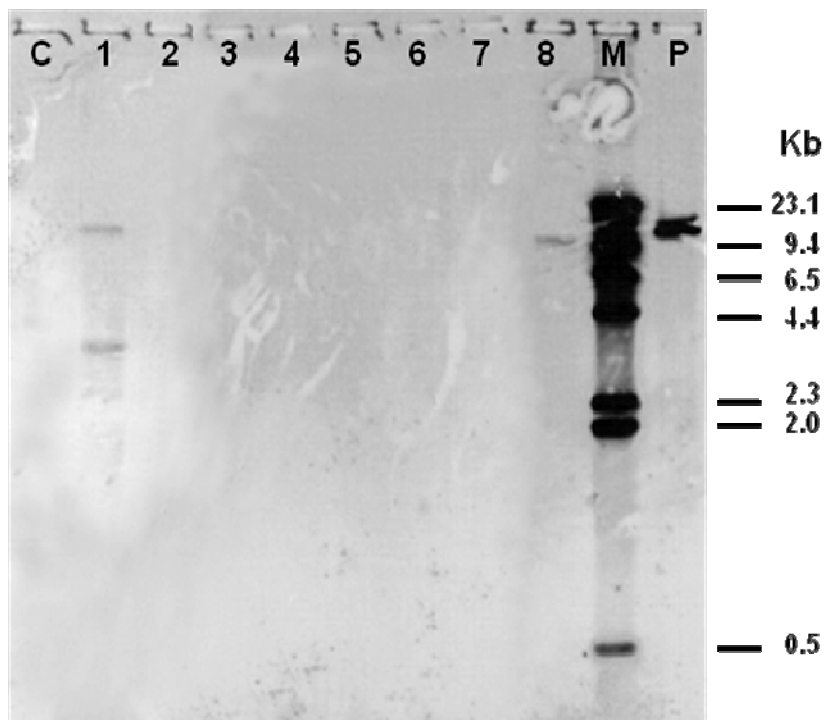


Figura III. 6. Análisis Southern blot de líneas transformadas con pBin19GUSINT producidas a partir de hojas de albaricoquero variedad 'Helena'. Digestión realizada con *EcoRI* e hibridación con sonda para el gen *npfl*. Calle Ld: Marcador de Lambda *HindIII* marcado con digoxigenina (Roche Cat. n.º. 11218590910). Calle C= Helena sin transformar, P= plásmido, M= Marcador molecular, 1-8, líneas PCR positivas, las dos líneas en las que hubo hibridación son de la variedad 'Helena'.

3.4. Producción de quimeras

Durante este trabajo, aunque se produjeron varias líneas transformadas, se observaron resultados contradictorios como amplificaciones aleatorias por PCR de los transgenes introducidos, el 75% de las líneas elegidas con bandas de PCR claras no dieron resultados positivos en las hibridaciones Southern, etc. Todo esto llevó a la conclusión de que en muchos casos se producían quimeras. Su origen parece estar en el hecho de que la organogénesis no se produce a partir de una sola célula sino de un conjunto de células (Zhu *et al.*, 2007).

Para poder obtener plantas uniformemente transformadas a partir de quimeras, se han descrito varias estrategias, una de estas se basa en técnicas de cultivo *in vitro*. Asumiendo que las quimeras no sean estables, podrían ser disociadas mediante ciclos de cultivo (Roux *et al.*, 2001). En el caso de plantas transformadas se han propuesto ciclos recurrentes de regeneración en presencia del agente selectivo a partir de explantos obtenidos de los transformantes primarios quiméricos (McHughen y Jordan, 1989) o bien la utilización de protocolos iterativos de selección y regeneración, de modo que los primeros transformantes quiméricos obtenidos son sometidos a ciclos sucesivos de regeneración en presencia de concentraciones crecientes del agente selectivo y los brotes regenerados en cada ciclo son mantenidos en medio con concentraciones crecientes de antibióticos (Mathews *et al.*, 1998).

En nuestro laboratorio, se ha desarrollado un método de detección de quimeras mediante PCR en tiempo real (Faize *et al.*, 2010), cuantificando la cantidad de ADN transgénico presente en brotes diferentes de la misma línea o, incluso, en partes diferentes de un mismo brote. Utilizando este método, se comprobó que la disociación de quimeras de albaricoquero fue imposible de conseguir mediante la micropropagación *in vitro* (Faize *et al.*, 2010).

Por lo tanto, para obtener plantas uniformemente transformadas parece necesaria la optimización de las condiciones del protocolo de transformación.

4. CONCLUSIÓN

Los procesos de organogénesis y de embriogénesis somática son dependientes de numerosos factores y son muy sensibles a pequeños cambios. Diferentes autores han planteado la posibilidad de transformar meristemas ya que la capacidad de las células meristemáticas para dar lugar a un brote sin necesidad de un proceso de desdiferenciación previo hace que el proceso sea menos sensible a los posibles factores que lo pudieran afectar (Druart *et al.*, 1998). Sin embargo, los intentos de transformar estas estructuras tan organizadas han fracasado debido a problemas de viabilidad de los explantos y de contaminación por *Agrobacterium* (Scorza *et al.*, 1995).

Cuando las yemas axilares de un brote micropropagado son eliminadas cuidadosamente con la ayuda de un bisturí, parte de las células que quedan en la base de estas yemas son células meristemáticas que pueden ser transformadas por cualquier procedimiento de transformación. La regeneración de nuevos brotes ocurre de forma muy rápida, en tan solo un par de semanas, ya que éste se forma *de novo* a partir de dichas células. El proceso es prácticamente independiente de la variedad utilizada, y no se ve afectado sensiblemente por cambios relativamente importantes. Ha sido reproducido utilizando medios de cultivo muy diferentes, brotes micropropagados en condiciones muy diferentes y dentro de un rango muy amplio de concentraciones del antibiótico de selección.

Aunque la transformación mediada por *Agrobacterium* se ha convertido en el método preferido para la ingeniería genética de plantas, muchas especies de plantas de importancia económica, y cultivares de élite de determinadas especies son todavía muy recalcitrantes, por ejemplo, el albaricoquero. Se han publicado aproximaciones para aumentar la eficiencia de transformación de plantas mediante la identificación de cepas virulentas de *Agrobacterium* o manipulando virulencia mediante la optimización de las condiciones del cultivo bacteriano. La transformación mediada por *Agrobacterium* es un proceso complejo en el que interaccionan diferentes factores de forma compleja. Para lograr la máxima expresión de los genes *vir* para la transferencia del ADN-T es necesaria más investigación para lograr una transformación más eficiente.

Hemos intentado optimizar el protocolo de transformación utilizando distintas cepas de *Agrobacterium*, utilizando la sonicación, modificando el tamaño del explanto, la concentración de agrobacteria y el tiempo de co-cultivo e incluso condiciones de cultivo (datos no mostrados). Aunque se aumentó el número de eventos de transformación por

explanto, basado en expresión GUS, todavía no se ha conseguido regenerar plantas uniformemente transformadas de forma eficiente. Debido a que todo el proceso (desde la transformación de explantos nodales hasta tener brotes transgénicos confirmados) es largo (6-8 meses), y son muchos los factores involucrados, es difícil determinar cuál de los factores (cepa, tipo de tejidos, medio, inducción, inoculación, co-cultivo, selección, etc) es el que más contribuyó a la eficiencia de la transformación. Sería necesario continuar con una evaluación detallada de estos factores en futuros experimentos.

Las eficiencias de transformación, basadas en la evaluación por PCR de los brotes que sobrevivieron a la selección y multiplicaron en presencia del antibiótico, se encuentran entre las más elevadas descritas en especies de *Prunus*. Sin embargo, no es ésta la característica más interesante de la metodología desarrollada, sino la sencillez del protocolo utilizado, su consistencia con resultados enormemente reproducibles (a diferencia de lo habitual cuando se trata de regeneración adventicia) y la rapidez, ya que desde la infección con la bacteria hasta la recuperación de las yemas regeneradas transcurren unas cinco semanas solamente. Nuestro protocolo con hojas de esta variedad requería entre 12 y 16 semanas con la necesidad de subcultivo a medio fresco cada tres o cuatro semanas, para evitar contaminación por un crecimiento excesivo de la bacteria y mantener la presión de selección. Además, las yemas adventicias son mucho más débiles que las obtenidas a partir de células meristemáticas y su supervivencia suele ser mucho menor (Petri *et al.*, 2008).

Por último la posibilidad de transferir esta metodología a otras variedades e incluso especies se ha evaluado en nuestro laboratorio con buenos resultados lo que ha conducido a patentar la metodología (Albuquerque *et al.*, 2007).

Este trabajo debería continuar con el fin de desarrollar un método que permitiera la obtención de plantas de albaricoquero uniformemente transformadas. También, los factores que afectan los pasos iniciales de la transformación y la estrategia de selección deberían ser optimizados para evitar la producción de quimeras.

5. BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Alburquerque N., Wang H., Nortes M. D., López-Noguera S., Petri C., Pérez-Tornero O., Piqueras A., y Burgos L.** (2007) Procedimiento para modificar genéticamente plantas leñosas mediante la utilización de células con capacidad meristemática. Patente número PCT/ES2008/070139
- 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.
- Bean S.J., Gooding P.S., Mullineaux P.M. y Davies D.R.** (1997) A simple system for pea transformation. *Plant Cell Reports*, **16**: 513-519.
- Bleckmann A. y Simon R.** (2009) Interdomain signaling in stem cell maintenance of plant shoot meristems. *Molecules and Cells*, **27**: 615-620.
- Burgos L. y Alburquerque N.** (2003) Low kanamycin concentration and ethylene inhibitors improve adventitious regeneration from apricot leaves. *Plant Cell Reports*, **21**: 1167-1174.
- Burgos L., Petri C. y Badenes M.L.** (2007) *Prunus* spp., En: Transgenic Crops V. (Pua, E.C. y Davey, M.R., Eds.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp.: 283-307.
- Carraro N., Peaucelle A., Laufs P. y Traas J.** (2006) Cell differentiation and organ initiation at the shoot apical meristem. *Plant Molecular Biology*, **60**: 811-826.
- Cervera M., Pina J.A., Juárez J.A., Navarro L. y Peña L.** (1998) *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Reports*, **18**: 271-278.

- 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.
- Dutt M., Li Z., Dhekney S. y Gray D.** (2007) Transgenic plants from shoot apical meristems of *Vitis vinifera* L. 'Thompson Seedless' via *Agrobacterium* -mediated transformation. *Plant Cell Reports*, **26**: 2101-2110.
- 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 capsida 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.
- Faize M., Faize L. y Burgos L.** (2010) Using quantitative Real-Time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation. *BMC Biotechnology*, **10**: 53
- Feldman L.J.** (1976) The *de novo* origin of the quiescent center regeneration root apices of *Zea mays*. *Planta*, **128**: 207-212.
- Gambley R.L., Ford R. y Smith G.R.** (1993) Microprojectile transformation of sugarcane meristems and regeneration of shoots expressing β -Glucuronidase. *Plant Cell Reports*, **12**: 343-346.
- Gould J., Devey M., Hasegawa O., Ulian E.C., Peterson G. y Smith R.H.** (1991) Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiology*, **95**: 426
- Gould J.H. y Magallanes-Cedeno M.** (1998) Adaptation of cotton shoot apex culture to *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Molecular Biology Reporter*, **16**: 283
- Gould J.H., Zhou Y., Padmanabham V., Magallanes-Cedeno M.E. y Newton R.J.** (2010) Transformation and regeneration of loblolly pine: shoot apex inoculation with *Agrobacterium*. *Molecular Breeding*, **10**: 131-141.
- Heisler M.G. y Jönsson H.** (2007) Modelling meristem development in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**: 92-97.

- Ivanov V.B.** (2004) Meristems as a self-renewing system: maintenance and cessation of cell proliferation (a review). *Russian Journal of Plant Physiology*, **51**: 834-847.
- 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.
- Jones L., Hamilton A.J., Voinnet O., Thomas C.L., Maule A.J. y Baulcombe D.C.** (1999) RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *The Plant Cell*, **11**: 2291-2301.
- Lowe K., Bowen B., Hoerster G., Ross M., Bond D., Pierce D. y Gordon-Kamm B.** (1995) Germline transformation of maize following manipulation of chimeric shoot meristems. *Bio-Technology*, **13**: 677-682.
- 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.
- Mathews H., Dewey V., Wagoner W. y Bestwick R.K.** (1998) Molecular and cellular evidence of chimaeric tissues in primary transgenics and elimination of chimaerism through improved selection protocols. *Transgenic Research*, **7**: 123-129.
- Matsuda N., Gao M., Isuzugawa K., Takashina T. y Nishimura K.** (2005) Development of an *Agrobacterium*-mediated transformation method for pear (*Pyrus communis* L.) with leaf-section and axillary shoot-meristem explants. *Plant Cell Reports*, **24**: 45-51.
- May G.D., Afza R., Mason H.S., Wiecko A., Novak F.J. y Arntzen C.J.** (1995) Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Nature Biotechnology*, **13**: 486-492.
- McHughen A. y Jordan M.C.** (1989) Recovery of transgenic plants from "escape" shoots. *Plant Cell Reports*, **7**: 611-614.
- Park S.H., Pinson S.R.M. y Smith R.H.** (1996) T-DNA integration into genomic DNA of rice following *Agrobacterium* inoculation of isolated shoot apices. *Plant Molecular Biology*, **32**: 1135-1148.

- Pérez-Tornero O. y Burgos L.** (2000a) Adventitious regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. *Acta Horticulturae*, **538**: 659-662.
- Pérez-Tornero O. y Burgos L.** (2000b) 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.** (2000a) Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. *Plant Science*, **158**: 61-70.
- Pérez-Tornero O., López J.M., Egea J. y Burgos L.** (2000b) Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of the apricot (*Prunus armeniaca*) cv. 'Canino'. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, **75**: 283-286.
- Petri C., Albuquerque N. y Burgos L.** (2005) The effect of aminoglycoside antibiotics on the adventitious regeneration from apricot leaves and selection of *nptII*-transformed leaf tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **80**: 271-276.
- Petri C., Albuquerque N., García-Castillo S., Egea J. y Burgos L.** (2004) Factors affecting gene transfer efficiency to apricot leaves during early *Agrobacterium*-mediated transformation steps. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, **79**: 704-712.
- Petri C. y Burgos L.** (2005) Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect? *Transgenic Research*, **14**: 15-26.
- Petri C., Wang H., Albuquerque N., Faize M. y Burgos L.** (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) leaf explants. *Plant Cell Reports*, **27**: 1317-1324.
- 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.

- Reinhardt D., Frenz M., Mandel T. y Kuhlemeier C.** (2003) Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem. *Development*, **130**: 4073-4083.
- Roux N., Dolezel J., Swennen R. y Zapata-Arias F.J.** (2001) Effectiveness of three micropropagation techniques to dissociate cytochimeras in *Musa* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **66**: 189-197.
- Sankara Rao K. y Rohini V.K.** (1999) *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): A simple protocol. *Annals of Botany*, **83**: 347-354.
- Sautter C., Leduc N., Bilanz R., Iglesias V.A., Gisel A., Wen X. y Potrykus I.** (1995) Shoot apical meristems as a target for gene-transfer by microballistics. *Euphytica*, **85**: 45-51.
- Scorza R., Hammerschlag F.A., Zimmerman T.W. y Cordts J.M.** (1995) 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.
- 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.
- Sofield S. y Murray J.A.H.** (2006) The evolving concept of the meristem. *Plant Molecular Biology*, **60**: v-vii
- 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.
- Ulian E.C., Smith R.H., Gould J.H. y McKnight T.D.** (1988) Transformation of plants via the shoot apex. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, **24**: 951-954.
- 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. *Mol Gen Genet*, **220**: 245-250.
- Weigel D. y Jürgens G.** (2002) Stem cells that make stems. *Nature*, **415**: 751-754.

- 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.
- Yookongkaew N., Srivatanakul M. y Narangajavana J.** (2007) Development of genotype-independent regeneration system for transformation of rice (*Oryza sativa* ssp. *indica*). *Journal of Plant Research*, **120**: 237-245.
- Zapata C., Park S.H., El-Zik K.M. y Smith R.H.** (1999) Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **98**: 252-256.
- Zhu X.Y., Zhao M., Ma S., Ge Y.M., Zhang M.F. y Chen L.P.** (2007) Induction and origin of adventitious shoots from chimeras of *Brassica juncea* and *Brassica oleracea*. *Plant Cell Reports*, **26**: 1727-1732.

CAPÍTULO IV

TRANSFORMACIÓN DE
ALBARICOQUERO CON EL GEN
FOSFOMANOSA ISOMERASA (*PMI*)
COMO MARCADOR DE SELECCIÓN

ÍNDICE

| | |
|---|------------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 123 |
| 1.1. Selección de plantas transgénicas utilizando genes de resistencia a agentes tóxicos | 123 |
| 1.2. Marcadores alternativos a los de resistencia a antibióticos o herbicidas | 124 |
| 1.3. El sistema <i>pmi</i> /manosa | 124 |
| 1.3.1. Factores que afectan la eficiencia de transformación en el sistema de <i>pmi</i> /manosa | 126 |
| 1.3.1.1. La combinación de azúcares..... | 126 |
| 1.3.1.2. La concentración de fosfato..... | 126 |
| 1.3.2. La aplicación del sistema <i>pmi</i> /manosa para obtener plantas transgénicas | 126 |
| 1.3.3. Seguridad del sistema <i>pmi</i> /manosa | 127 |
| 2. MATERIAL Y MÉTODOS | 128 |
| 2.1. Material vegetal y cultivo <i>in vitro</i> | 128 |
| 2.2. Efecto de la manosa sobre el material no transformado | 128 |
| 2.3. Transformación | 129 |
| 2.3.1. Plásmido y cepa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 129 |
| 2.3.2. Transformación de albaricoquero por infección con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 129 |
| 2.4. Recuperación de yemas regeneradas y estrategia de selección | 130 |
| 2.5. Evaluación de las plantas transformadas | 131 |
| 2.5.1. Análisis molecular | 131 |
| 2.5.2. Evaluación de la expresión del gen <i>pmi</i> mediante el rojo de clorofenol..... | 131 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 132 |
| 3.1. Curvas dosis-respuesta a manosa para la regeneración de ‘Helena’ sin transformar | 132 |
| 3.2. Efecto de la manosa sobre la micropropagación del material no transformado | 132 |
| 3.3. Regeneración y selección de plantas transgénicas..... | 136 |
| 3.4. Evaluación de las plantas transgénicas..... | 137 |
| 4. CONCLUSIÓN | 141 |
| 5. BIBLIOGRAFÍA | 142 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Selección de plantas transgénicas utilizando genes de resistencia a agentes tóxicos

Los genes marcadores de selección han sido necesarios para el desarrollo de las tecnologías de transformación de plantas porque sólo una proporción muy pequeña de células son transformadas en la mayoría de los experimentos y la probabilidad de recuperación de las células transgénicas sin selección es, normalmente, muy baja.

Se han descrito más de 50 sistemas de selección aunque sólo unos pocos han tenido una aplicación práctica (Miki y McHugh, 2004). El agente selectivo suele ser un antibiótico o un herbicida, es decir un sustrato tóxico. 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 la concentración de dicha sustancia que inhibe la regeneración para cada una de las especies, variedades y tipos de explanto correspondientes.

Sin embargo, los genes marcadores permanecen en las células tras su utilización, lo que genera preocupación sobre el riesgo que puedan suponer para la salud humana y el medio ambiente.

En lo relativo a la salud y la seguridad, una de las mayores preocupaciones que genera la comercialización de las plantas transgénicas es que los productos de los genes marcadores podrían ser tóxicos o alergénicos para el consumidor. Además, la preocupación aumenta cuando se utilizan genes que confieren resistencia a antibióticos utilizados en clínica o veterinaria, ya que podrían transferirse a microorganismos y aumentar el número de patógenos resistentes a antibióticos en la flora intestinal humana o animal, pudiendo disminuir la eficacia del antibiótico. En el área de la seguridad ambiental el riesgo reside en que los genes de resistencia a herbicidas podrían ser transferidos horizontalmente a especies silvestres pudiendo transformarlas en malas hierbas. Esta propagación de marcadores a otros organismos puede alterar el equilibrio

de los ecosistemas.

1.2. Marcadores alternativos a los de resistencia a antibióticos o herbicidas

Se han desarrollado diferentes sistemas que pueden constituir alternativas a los genes marcadores de selección que inducen resistencia a antibióticos o herbicidas.

Los genes marcadores de información dan a la célula que ha incorporado el gen una característica que la hace distinguible de las demás. Por ejemplo, el marcador de la proteína verde fluorescente, *gfp* (Chiu *et al.*, 1996). Este sistema permite detectar las células transformadas de una manera no destructiva y sin necesidad de añadir ningún sustrato al medio.

Otros marcadores de selección son aquellos que promueven el crecimiento y diferenciación selectiva del material transformado. Un ejemplo es el gen *ipt* que mejora el crecimiento de las células transformadas por modificación endógena de los niveles de hormonas. Estos genes estimulan la división y diferenciación de las células produciéndose una alteración en la morfología, desarrollo y fisiología de las plantas transgénicas (Ebinuma *et al.*, 1997; Endo *et al.*, 2001; López-Noguera *et al.*, 2009; Zuo *et al.*, 2002).

Se han desarrollado diferentes marcadores de selección que se basan en conferir una ventaja metabólica a las células transformadas que les permite crecer en determinados sustratos. Las células no transformadas son incapaces de crecer y dividirse en esas condiciones, pero no son destruidas, como ocurre cuando se utilizan agentes tóxicos como los antibióticos o los herbicidas. Algunos de los más ampliamente utilizados son: el sistema *AtTPS1*/glucosa (Leyman *et al.*, 2006), *galT*/galactosa (Joersbo *et al.*, 2003), *xylA*/D-xilosa (Haldrup *et al.*, 1998), algunos D-aminoácidos/*daoI* (Alonso *et al.*, 1998), el sistema 5-metilriptofano/*AtTSBI* (Hsiao *et al.*, 2007) y el sistema *pml*/manosa.

1.3. El sistema *pml*/manosa

Entre los marcadores alternativos, el sistema *pml*/manosa ha sido uno de los más utilizados obteniéndose altas eficiencias de transformación en muchas especies.

El gen *pml* que codifica la enzima fosfomanosa isomerasa PMI (EC 5.3.1.8) es muy común en la naturaleza. La enzima ha sido purificada y caracterizada de la levadura, la bacteria *E. coli*, el cerdo y el hombre (Collins y Hackett, 1991; Darzins *et al.*, 1986; Miles y Guest, 1984; Proudfoot *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1992). Sin embargo, en las plantas no se encuentra presente, con la excepción de la soja (Goldsworthy y Street,

1965) y la canela china (Lee y Matheson, 1984).

En el año 1996, se introdujo el plásmido pZY507/*pmi* (Weisser *et al.*, 1996) en *Zymomonas mobilis* y se expresó la enzima fosfomanosa isomerasa por primera vez. Desde entonces, los genes *pmi* que se han utilizado para las transformaciones de plantas, casi todos son aislados de *E. coli*.

Las células de las plantas viven y crecen de manera totalmente dependiente de los distintos azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa, etc.). La glucólisis, es la vía metabólica encargada de oxidar o fermentar la glucosa y así obtener energía para la célula. Ésta consiste en diez reacciones enzimáticas que convierten a la glucosa en dos moléculas de piruvato, el cual es capaz de seguir otras vías metabólicas como el Ciclo de Krebs y así continúa suministrando energía al organismo.

La manosa es un azúcar simple (monosacárido) que se encuentra formando parte de algunos polisacáridos de las plantas o en algunas glucoproteínas animales. En un medio selectivo utilizando manosa como fuente de carbono, la hexoquinasa puede convertir la manosa en manosa-6-fosfato y la acumulación de esta inhibe la glucólisis (Reed *et al.*, 2001), obstaculiza la producción de ATP y además se consume una gran cantidad de fosfato (Joersbo *et al.*, 1999). Como resultado se inhibe el crecimiento de las células que no tienen el gen *pmi*, el cual codifica la fosfomanosa isomerasa (He *et al.*, 2004; Joersbo *et al.*, 1998). Las células transformadas con este gen pueden transformar la manosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato (Figura IV. 1), y este azúcar entra en el ciclo de la glucólisis para producir energía. Por lo tanto, la incorporación del gen *pmi* supone una ventaja para estas células, ya que serán capaces de crecer en un medio selectivo con manosa, utilizando este azúcar como fuente de hidratos de carbono.

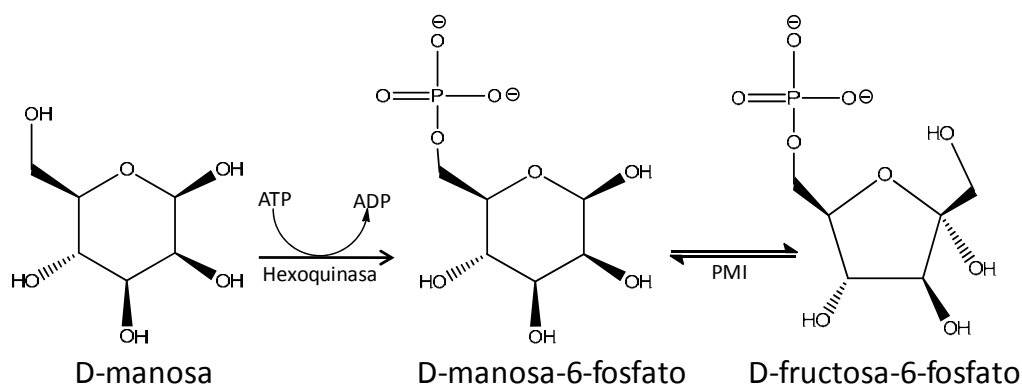


Figura IV. 1. Conversión de la D-manosa en D-fructosa-6-fosfato bajo la actividad de las enzimas hexoquinasa y fosfomanosa isomerasa (PMI).

1.3.1. Factores que afectan la eficiencia de transformación en el sistema de *pmi/manosa*

1.3.1.1. La combinación de azúcares

En este sistema, una alta concentración de glucosa (15-20 veces más que manosa) es suficiente para contrarrestar el efecto tóxico de la manosa sobre el crecimiento de las células de remolacha (Joersbo *et al.*, 1999). La sacarosa, maltosa y fructosa también tienen la capacidad de contrarrestar el efecto de la manosa, pero menos que la glucosa. Se obtuvo una alta eficiencia de transformación (0.8-1.1%) combinando sacarosa en lugar de glucosa y fructosa en el medio de selección con manosa (Joersbo *et al.*, 1999).

En cambio, en *Citrus sinensis* L. Osbeck el mejor resultado fue obtenido en presencia de una alta concentración de manosa (13 g/L) como única fuente de carbono (Boscariol *et al.*, 2003). En este caso, con menos manosa o combinando ésta con sacarosa se redujo la eficiencia de transformación y se obtuvo un mayor número de escapes. Resultados similares se observaron en maíz (Negrotto *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2001).

1.3.1.2. La concentración de fosfato

Se considera que la toxicidad de la manosa no se debe al compuesto en sí, sino que es una consecuencia de su fosforilación a manosa-6-fosfato mediante una hexoquinasa. Células de espinaca que no contenían el gen *pmi* se vieron afectadas por la falta de fosfato y ATP (Sheu-Hwa *et al.*, 1975), debido a una acumulación de manosa-6-fosfato en presencia de manosa. Por lo tanto, la interacción de la manosa y el metabolismo del fosfato se considera una de las razones esenciales de la toxicidad de la manosa.

1.3.2. La aplicación del sistema *pmi/manosa* para obtener plantas transgénicas

Desde que se obtuvo la primera planta transgénica de remolacha con el gen *pmi* (Joersbo *et al.*, 1998), el sistema *pmi/manosa* se ha aplicado en muchas especies herbáceas como maíz (Negrotto *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2001), arroz (He *et al.*, 2004), tomate (Briza *et al.*, 2008; Sigareva *et al.*, 2004), mijo (O'Kennedy *et al.*, 2004), sorgo (Gao *et al.*, 2005), lino (Lamblin *et al.*, 2007), pepino (He *et al.*, 2006), cebolla (Aswath *et al.*, 2006), col china (Ku *et al.*, 2006; Min *et al.*, 2007), caña de azúcar (Jain *et al.*, 2007), patata (Briza *et al.*, 2008), colza (Wallbraun *et al.*, 2009) y garbanzo (Patil *et al.*, 2009).

También se ha utilizado el sistema *pmi/manosa* para obtener plantas transgénicas de distintas especies leñosas como la yuca (Zhang y Puonti-Kaerlas, 2000), naranjo y citrange (Ballester *et al.*, 2008; Boscariol *et al.*, 2003), papaya (Zhu *et al.*, 2005),

almendro (Ramesh *et al.*, 2006) o manzano (Degenhardt *et al.*, 2006).

1.3.3. Seguridad del sistema *pmi/manosa*

El sistema *pmi/manosa* tiene la seguridad inherente ya que el gen *pmi* es común en la naturaleza y no confiere ninguna resistencia a antibióticos o herbicidas. Por lo tanto, no existe ninguno de los riesgos potenciales asociados a la presencia de estos genes de resistencia cuando se transforma con el gen *pmi*.

En un ensayo para determinar el posible riesgo de la enzima fosfomanosa isomerasa se demostró que la proteína purificada no tiene efectos adversos en la prueba de toxicidad aguda oral en ratones, no produce ninguna toxina o producto alergénico, y además los mamíferos pueden digerirla (Reed *et al.*, 2001). Entre las plantas de maíz transformadas con el gen *pmi* y sus controles sin transformar no se detectó ningún cambio en las características agronómicas o composición nutritiva del grano (Reed *et al.*, 2001).

La comprobada inocuidad de la enzima fosfomanosa isomerasa para los humanos y el medio ambiente hacen que este sistema sea ideal para producir plantas transgénicas seguras y respetuosas con el medio ambiente.

La Comunidad Europea ha decidido no permitir la liberación voluntaria (es decir ensayos en campo) de plantas que hayan sido transformadas con genes de resistencia a antibióticos utilizados en tratamientos médicos o veterinarios después de 2004 ni su comercialización después de 2008 (Directiva 2001/18/EEC). La producción de plantas transgénicas libres de genes marcadores de resistencia a antibióticos o herbicidas, podría resultar imprescindible para el desarrollo y expansión comercial de las plantas transformadas. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de un protocolo de transformación genética de albaricoquero que utilice el sistema *pmi/manosa* para seleccionar las plantas transformadas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal y cultivo *in vitro*

En este trabajo se han utilizado la variedad de albaricoquero americana ‘Helena’ y la variedad española ‘Canino’.

Los medios de desarrollo de meristemos, proliferación y elongación así como el de enraizamiento son los mismos que los del Capítulo II, y el medio de regeneración el mismo que el de proliferación. Como agente de selección, en lugar de usar antibióticos, se aplicaron combinaciones de distintas concentraciones de sacarosa y manosa.

Los explantos se prepararon tal y como se describe en el capítulo III.

2.2. Efecto de la manosa sobre el material no transformado

Se adicionaron al medio de regeneración distintas combinaciones de manosa y sacarosa con el fin de conocer a que concentraciones inhibían total o parcialmente la regeneración en material sin transformar. De esta manera se pretendía establecer la combinación inhibitoria óptima para seleccionar plántulas transgénicas y eliminar o reducir el número de escapes. La información obtenida en los experimentos previos ha permitido reducir la evaluación de la regeneración a un rango de concentraciones de manosa inferiores a 2 g/L en combinación con distintas concentraciones de sacarosa. Se realizaron ensayos de regeneración en distintos medios de regeneración conteniendo combinaciones de 10, 15, 20 ó 30 g/L de sacarosa con 0; 1; 1,25; 1,5 ó 1,75 g/L de manosa y se determinó el porcentaje de regeneración (número de explantos que regeneran/número total de explantos) y el número de yemas regeneradas para cada combinación de azúcares.

Para establecer el efecto de la manosa sobre el crecimiento y desarrollo de las yemas regeneradas, se obtuvieron estas yemas mediante regeneración a partir de explantos nodales. A las cuatro semanas las yemas regeneradas se dispusieron en el medio de desarrollo de meristemos con 20 g/L de sacarosa y manosa en distintas concentraciones (0; 1; 1,5; 2 ó 2,5 g/L). El efecto de la selección se evaluó a las 4 semanas desde el inicio del ensayo, observando diferencias en el aspecto y tamaño de las yemas.

Para establecer el efecto de la manosa sobre la proliferación y la elongación, yemas establecidas tras crecer cuatro semanas en medio de meristemos se dispusieron en medio de proliferación con 20 g/L de sacarosa al que se añadió 0; 2,5; 5 ó 7,5 g/L de manosa. Se midieron los incrementos del peso y la supervivencia de las yemas durante 6

semanas, a intervalos de dos semanas.

Se dispusieron brotes de 'Helena' provenientes del medio de proliferación sin selección en medio de enraizamiento adicionando 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 ó 1,2 g/L de manosa combinando con 20 g/L de sacarosa. Se determinó el porcentaje de enraizamiento como número de brotes enraizados por número de brotes total y el número de raíces por número de brotes total para cada concentración de manosa después de 24 días desde el inicio del ensayo.

2.3. Transformación

2.3.1. Plásmido y cepa de Agrobacterium tumefaciens

El plásmido utilizado en los experimentos de transformación fue pNOV2819 (Figura IV. 2), amablemente cedido por Singenta. Dicho vector posee el gen *pmi* (fosfomanosa isomerasa) bajo el control del promotor CMPS (cestrium yellow leaf curling virus promoter) y el terminador NOS. Se ha introducido en células de la cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 mediante electroporación, tras la correspondiente preparación de células competentes.

2.3.2. Transformación de albaricoquero por infección con Agrobacterium tumefaciens

Se aplicó el protocolo de transformación descrito en el Capítulo III, apartado 2.5.1.

La preparación de la bacteria fue como se describió en el Capítulo II, apartado 2.1.4., con los antibióticos adecuados (98,3 μ M de nalidíxico y 100 μ M de espectinomicina). Antes de infectar, se resuspendió en medio líquido de regeneración con sacarosa 30 g/L sin manosa y se ajustó a una D.O.₆₀₀ de 0,05.

Los explantos fueron infectados mediante inmersión en esta suspensión bacteriana durante 20 minutos en vacío (-600 mm de Hg). Posteriormente, se dispusieron en medio de co-cultivo durante 2 días en oscuridad. El medio de co-cultivo consiste en medio de regeneración con la adición de 100 μ M de AS.

Después del co-cultivo los explantos fueron transferidos al medio de regeneración al que se añadieron 1,25 g/L de manosa y 20 g/L de sacarosa, y se adicionaron 0,63 mM de cefotaxima y 0,13 mM de vancomicina, para controlar el crecimiento de *Agrobacterium*. Los explantos son incubados en la oscuridad 12 días y posteriormente a la luz con un fotoperiodo de 16/8 horas, 23°C, hasta la recuperación de las yemas regeneradas después de cuatro semanas.

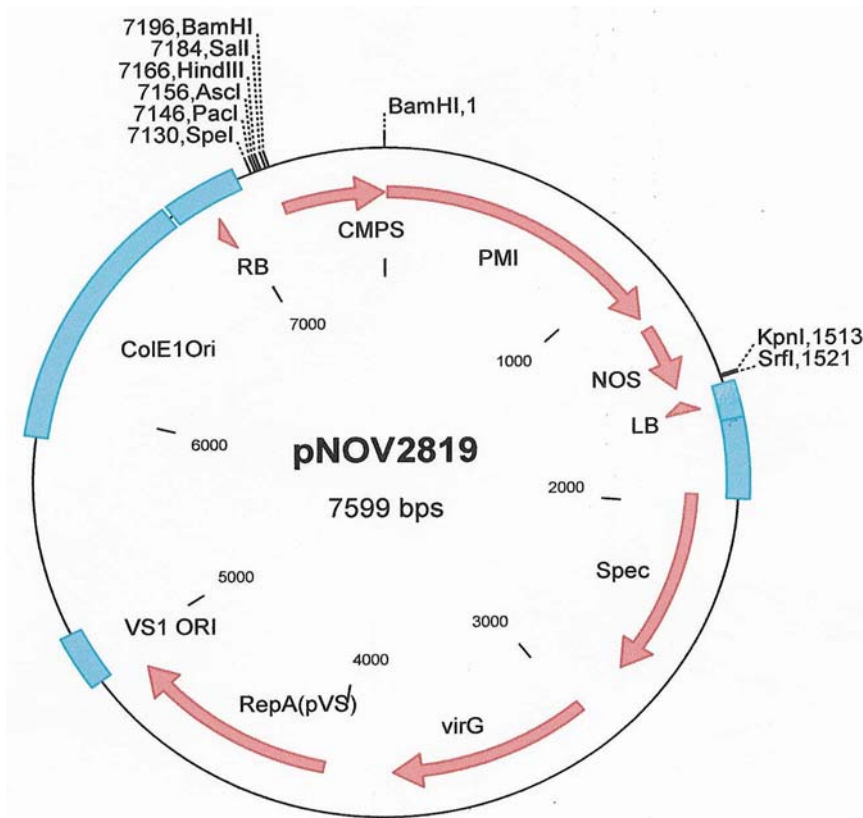


Figura IV. 2. Representación del plásmido pNOV2819. El plásmido está constituido por el promotor constitutivo CMPS, el gen *pmi*, que codifica para la enzima fosfomanosa isomerasa, que cataliza la reacción de conversión de manosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato y el terminador NOS.

Para cada tratamiento se prepararon al menos 4 placas de Petri, cada una de ellas con 12 explantos. Todos estos tratamientos se compararon con un control sin transformar en las mismas condiciones con el fin de observar el efecto de estos tratamientos en la regeneración y crecimiento.

2.4. Recuperación de yemas regeneradas y estrategia de selección

Las yemas regeneradas en los distintos experimentos fueron aisladas y transferidas a un medio selectivo consistente en el medio de proliferación al que se añadió 2,5 g/L de manosa y 20 g/L de sacarosa. A las 4 semanas desde su aislamiento, las yemas que fueron capaces de crecer, se transfirieron al medio de elongación con 5,0 g/L de manosa y 20 g/L de sacarosa y tras 2 - 4 semanas las que sobrevivieron se transfirieron al mismo medio con 7,5 g/L de manosa y 20 g/L de sacarosa, hasta que se desarrollaron lo suficiente para poder realizar las pruebas moleculares y comprobar la integración del transgén *pmi*.

2.5. Evaluación de las plantas transformadas

2.5.1. Análisis molecular

Se realizó la extracción de ADN de hojas de las líneas que procedían de explantos infectados y que fueron capaces de crecer en medio selectivo y fueron examinadas mediante PCR. Los cebadores necesarios para detectar el gen *pmi* son el PMI-1 (5'-ACAGCCACTCTCCATTCA-3') y PMI-2 (5'-GTTTGCCATCACTTCCAG-3') que amplifican un fragmento de 532 pares de bases. Las reacciones se ajustaron a un volumen final de 25 μ L, conteniendo tampón, 400 ng/ μ L de ADN, 200 μ M de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 1,25 μ M de cada cebador, 0,625 unidades de polimerasa. Las condiciones de reacción fueron 1 ciclo de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 45 segundos a 72°C y, por último, una extensión de 5 minutos a 72°C.

También se realizó otra PCR con cebadores específicos para *virG*, para descartar la contaminación por la bacteria (ver apartado 2.2.6.2. del Capítulo II).

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (p/v) y después de teñir con bromuro de etidio se detectó el ADN bajo luz ultravioleta.

En algunas plantas positivas para PCR se realizaron estudios por Southern. Se procedió a la digestión de 20 μ g de ADN con el enzima de restricción *HindIII*. Los fragmentos se separaron en un gel de agarosa al 0,8% (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 un fragmento de la región codificante del gen *pmi* marcada con digoxigenina (DIG) (Boehringer Mannheim) y se hibridó con la membrana.

2.5.2. Evaluación de la expresión del gen *pmi* mediante el rojo de clorofenol

Se realizó la evaluación de la expresión del gen *pmi* mediante la reacción con rojo de clorofenol. Para ello se incubaron hojas de brotes que han sido capaces de crecer en presencia de manosa, en oscuridad a 25°C en medio líquido para inducir callogénesis (Petri, 2005) al que se añadió 3,5 g/L de manosa, 30 g/L de sacarosa y 50 mg/L de rojo de clorofenol. El pH se ajustó a 6,2 antes de esterilizar en el autoclave y la evaluación se realizó tras 14 días basándose en el color de la reacción y la producción de callo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Curvas dosis-respuesta a manosa para la regeneración de ‘Helena’ sin transformar

La utilización de construcciones que contienen el gen *pmi* permite la selección de las plantas transformadas mediante la adición de manosa a los medios de regeneración. Es necesario añadir sacarosa y manosa, en la combinación adecuada, a los medios de proliferación, elongación y enraizamiento con el fin de optimizar la selección. Para diseñar los medios con las concentraciones adecuadas de manosa y sacarosa que permitan seleccionar las plantas transformadas, es necesario estudiar previamente su efecto sobre el material vegetal no transformado.

En ensayos previos se ha comprobado que el albaricoquero es capaz de regenerar en presencia de fructosa, primer azúcar resultado de la acción del *pmi* sobre la manosa, mientras que no puede crecer en presencia de manosa como única fuente de carbono. Esto está de acuerdo con los resultados descritos por otros autores en distintas especies (Ku *et al.*, 2006; Min *et al.*, 2007; Sigareva *et al.*, 2004). En este trabajo, se han utilizado más de 15 combinaciones de manosa/sacarosa (Tabla IV. 1) para determinar el efecto sobre la regeneración.

En la variedad ‘Helena’ de albaricoquero, la combinación de manosa/sacarosa resultó crítica para la regeneración, siendo el umbral de tolerancia a la manosa de 1,5 g/L. Este resultado indica que el albaricoquero es muy sensible a la manosa, comparando con otras especies leñosas en las que, normalmente, se utilizan concentraciones más altas. Así ocurre en papaya (30 g/L de manosa sin la adición de otros azúcares) (Zhu *et al.*, 2005), en manzano (1-10 g/L de manosa más 5-30 g/L de sacarosa) (Degenhardt *et al.*, 2006), en cítricos (12 g/L de manosa más 5 g/L de sacarosa) (Ballester *et al.*, 2008) o en almendro (2,5 g/L de manosa más 5 g/L de sacarosa) (Ramesh *et al.*, 2006).

3.2. Efecto de la manosa sobre la micropropagación del material no transformado

Las yemas regeneradas en el medio de regeneración con 30 g/L de sacarosa sin manosa se dispusieron en el mismo medio con distintas concentraciones de manosa combinando con 20 g/L de sacarosa. Después de cuatro semanas se observaron diferencias importantes en el aspecto y el tamaño entre las yemas en medio con 2,5 g/L de manosa y sin manosa (Figura IV. 3). Por lo tanto, se decidió utilizar la combinación 2,5 g/L de manosa con 20 g/L de sacarosa como el primer paso de selección en el medio de desarrollo de las yemas

Tabla IV. 1. Efecto de la combinación de manosa y sacarosa sobre la regeneración de los explantos nodales de albaricoquero

| Manosa (g/L) | Sacarosa (g/L) | Nº de explantos | Nº de yemas (% Regeneración) |
|-----------------|-------------------|--------------------|---------------------------------|
| 1,75 | 15 | 24 | 0 (0) |
| | 30 | 24 | 0 (0) |
| 1,50 | 15 | 66 | 0 (0) |
| | 20 | 44 | 1 (2,3) |
| | 30 | 76 | 6 (7,9) |
| 1,25 | 10 | 52 | 0 (0) |
| | 15 | 92 | 1 (1,1) |
| | 20 | 45 | 7 (13,3) |
| | 30 | 24 | 4 (16,7) |
| 1,00 | 10 | 40 | 0 (0) |
| | 15 | 40 | 2 (3,1) |
| | 20 | 40 | 8 (20) |
| | 30 | 24 | 10 (41,7) |
| 0 | 15 | 24 | 10 (41,7) |
| | 30 | 75 | 40 (53,3) |

Además, la concentración de manosa tuvo influencia sobre el crecimiento de las yemas dispuestas en el medio de proliferación (Figura IV. 4). No se observaron diferencias significativas en el peso de aquellas que crecían en medio con 2,5 g/L de manosa y las que crecían en el medio control sin manosa.

Sin embargo, a partir de las dos semanas se observaron diferencias entre el control y las concentraciones 5 y 7,5 g/L de manosa, siendo estas diferencias mucho mayores en el peso final de las yemas tras seis semanas. Mientras las yemas cultivadas en presencia de 5 g/L de manosa alcanzaron un peso menor que los controles, en las cultivadas en medio con 7,5 g/L de manosa no hubo aumento de peso (Figura IV. 4).

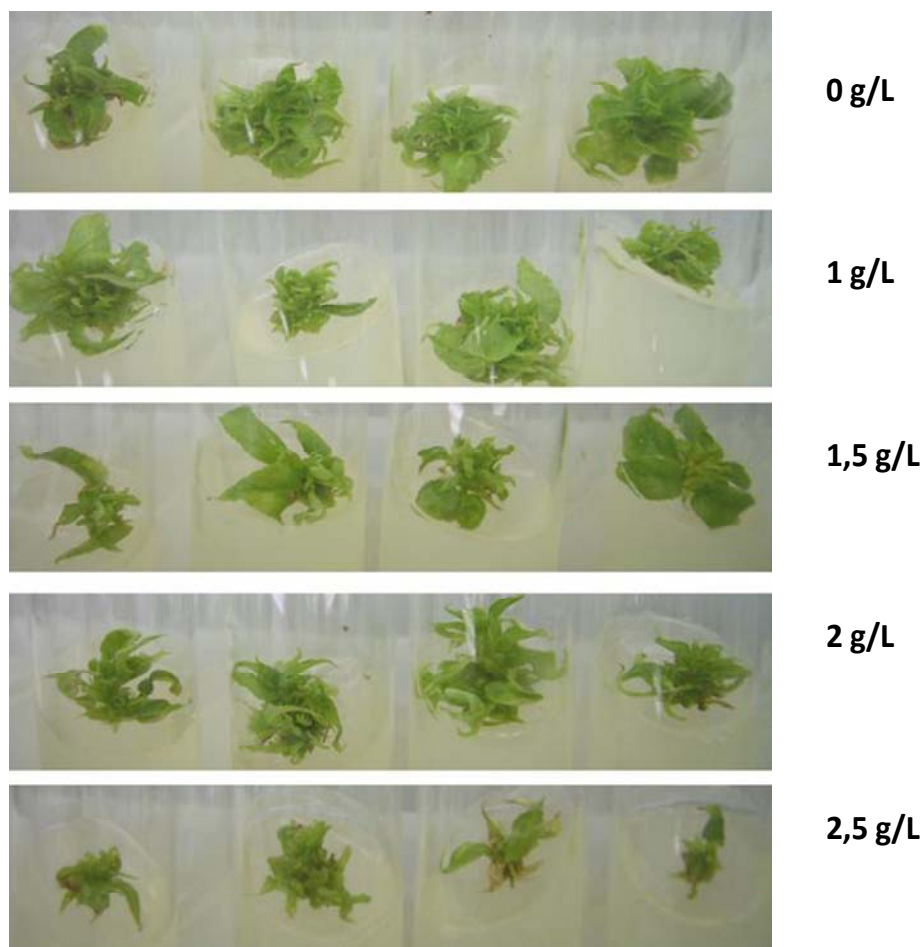


Figura IV. 3. Efecto de la concentración de manosa sobre el crecimiento de las yemas en medio de meristemas con 20 g/L de sacarosa después de cuatro semanas.

La concentración de manosa en el medio de proliferación también influyó en la supervivencia de las yemas. El porcentaje de yemas que sobrevivió tras dos semanas de cultivo fue menor en 7,5 g/L de manosa que en el resto de las concentraciones. Tanto a las cuatro como a las seis semanas la supervivencia de las yemas disminuyó en todas las concentraciones de manosa, aunque solamente se observaron diferencias significativas respecto del control en la concentración más elevada. Después de seis semanas ninguna de las yemas cultivadas en medio con 7,5 g/L de manosa fue capaz de sobrevivir. Por todo ello, se decidió añadir 5 g/L de manosa al medio de elongación durante dos o cuatro semanas, dependiendo del crecimiento, y luego subir a 7,5 g/L para obtener plantas transformadas.

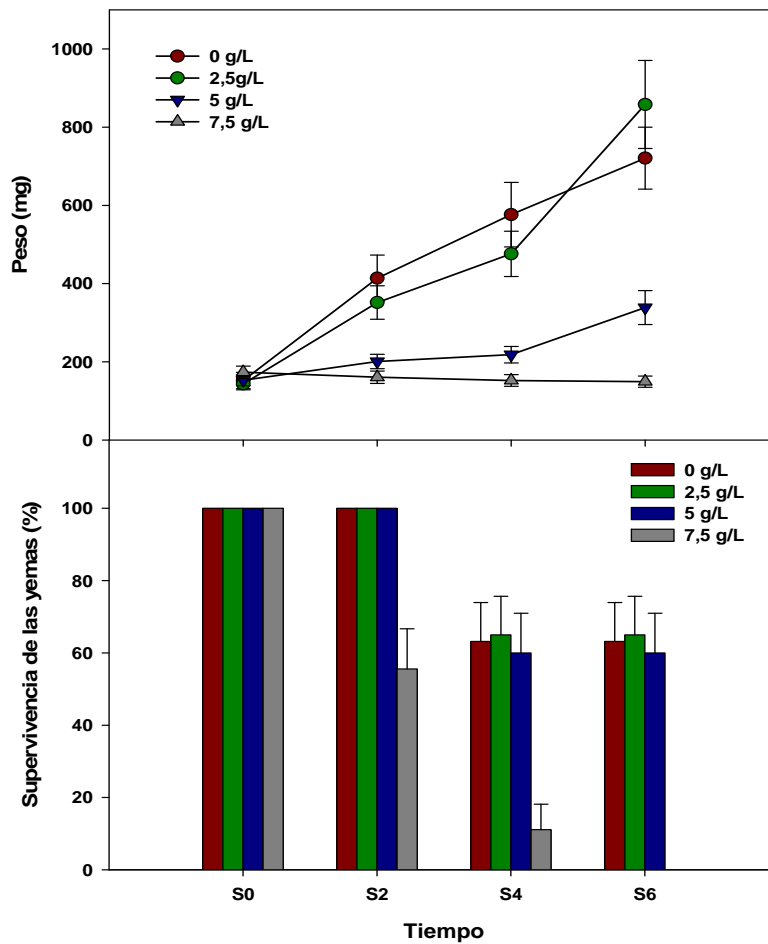


Figura IV. 4. Efecto de distintas concentraciones de manosa combinadas con 20 g/L de sacarosa en el medio de elongación sobre el crecimiento y la supervivencia de yemas de la variedad de albaricoquero 'Helena' después de 6 semanas de cultivo. Las barras verticales indican los errores estándar.

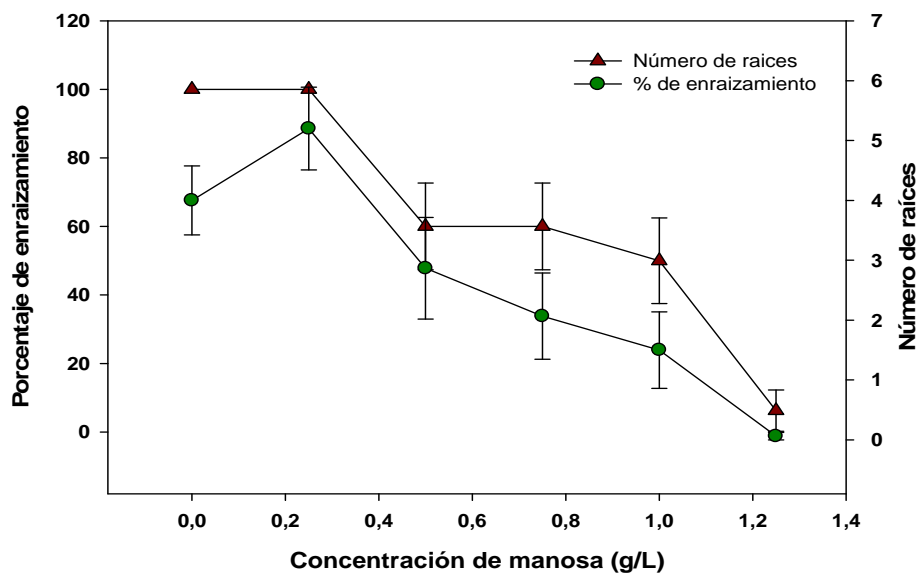


Figura IV. 5. Efecto de la concentración de manosa combinada con 20 mg/L de sacarosa sobre el enraizamiento de la variedad 'Helena'. Las barras verticales indican los errores estándar.

Se comprobó que la concentración inhibitoria para 'Helena' fue de 1,25 g/L de manosa combinada con 20 g/L de sacarosa (Figura IV. 5).

3.3. Regeneración y selección de plantas transgénicas

Células competentes de *Agrobacterium* fueron transformadas con el plásmido pNOV2829. De esta forma se obtuvo la estirpe EHA105/pNOV2829 mediante selección de las células transformadas con el antibiótico espectinomicina. Esta estirpe de la bacteria es la que utilizamos en todos los experimentos de transformación que se han realizado.

Varios autores han descrito que con este sistema de selección es conveniente utilizar las combinaciones de manosa y sacarosa que permitan ciertos porcentajes de regeneración (20-30%), para obtener plantas transgénicas (Degenhardt *et al.*, 2006; Joersbo *et al.*, 1998). Basándonos en la evaluación del efecto de distintas combinaciones de manosa y sacarosa sobre la regeneración, se dispusieron explantos de albaricoquero infectados con *Agrobacterium tumefaciens* en medio selectivo conteniendo 1; 1,25 ó 1,5 g/L de manosa combinados con 10, 15, 20 ó 30 g/L de sacarosa. Los porcentajes de regeneración de los explantos infectados con *Agrobacterium* fueron más elevados que los observados en los controles sin transformar para cada combinación de manosa y sacarosa (Tabla IV. 1 y Tabla IV. 2).

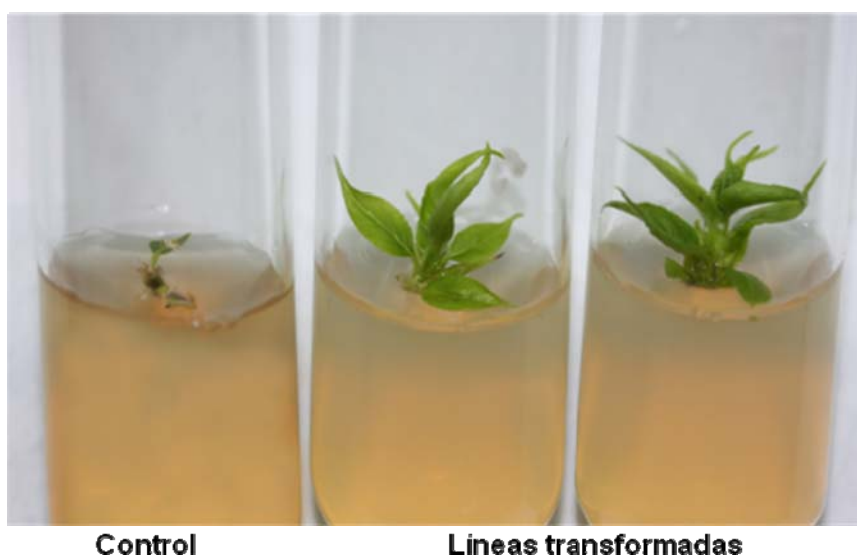


Figura IV. 6. Brotes de líneas transformadas y control no transformado después de 12 semanas en medio selectivo con manosa.

Las yemas regeneradas en los distintos experimentos fueron aisladas a partir de la cuarta semana desde el inicio del ensayo. Siguiendo la estrategia de selección, se incrementó la concentración de manosa cada 2 ciclos de subcultivo (apartado 2.4.), las yemas que sobrevivieron en el medio con 7,5 g/L de manosa (Figura IV. 6), fueron evaluadas por PCR.

3.4. Evaluación de las plantas transgénicas

Se realizaron extracciones de ADN de todas las líneas establecidas que fueron capaces de crecer en medio selectivo, siendo examinadas mediante PCR con cebadores específicos para el gen *pmi*. Se observó una banda de 532 pb en 13 de ellas (Figura IV. 7), de las cuales 10 corresponden a la estrategia de selección con 1,25 g/L de manosa y 20 g/L de sacarosa.

Tabla IV. 2. Transformación y selección de las plantas transgénicas en medio con distintas combinaciones de manosa/sacarosa.

| Manosa (g/L) | Sacarosa (g/L) | Nº explantos | Reg. (%) | Nº yemas | Yemas supervivientes | Nº PCR+ | T.E. ^a | S.E. ^b |
|-----------------|----------------|--------------|----------|----------|----------------------|---------|-------------------|-------------------|
| 'Helena' | | | | | | | | |
| 1,00 | 30 | 54 | 59,3 | 43 | 5 | 1 | 1,9 | 2,3 |
| | 20 | 51 | 52,9 | 38 | 3 | 0 | - | - |
| | 15 | 50 | 6,0 | 3 | 3 | 0 | - | - |
| | 10 | 50 | 4,0 | 2 | 2 | 0 | - | - |
| 1,25 | 30 | 25 | 16,0 | 4 | 1 | 0 | - | - |
| | 20 | 134 | 27,6 | 49 | 12 | 10 | 7,5 | 20,4 |
| | 15 | 129 | 9,3 | 15 | 1 | 0 | - | - |
| | 10 | 52 | 1,9 | 1 | 0 | 0 | - | - |
| 1,50 | 30 | 52 | 13,5 | 10 | 4 | 1 | 1,9 | 10 |
| | 20 | 50 | 8,0 | 4 | 1 | 0 | - | - |
| | 15 | 48 | 2,1 | 1 | 1 | 1 | 2,1 | 100 |
| 'Canino' | | | | | | | | |
| 1,25 | 10 | 465 | 22,6 | 73 | 1 | 0 | - | - |

^a Eficiencia de transformación = (número de las plantas transgénicas/número de explantos) x 100

^b Eficiencia de selección = (número de plantas transgénicas/número de yemas regeneradas) x 100

La eficiencia de transformación, basándonos en este análisis mediante PCR es de 7,5% para la variedad ‘Helena’ (Tabla IV. 2). Sin embargo, para la variedad ‘Canino’, utilizando la misma estrategia, no se obtuvo ninguna yema transformada.

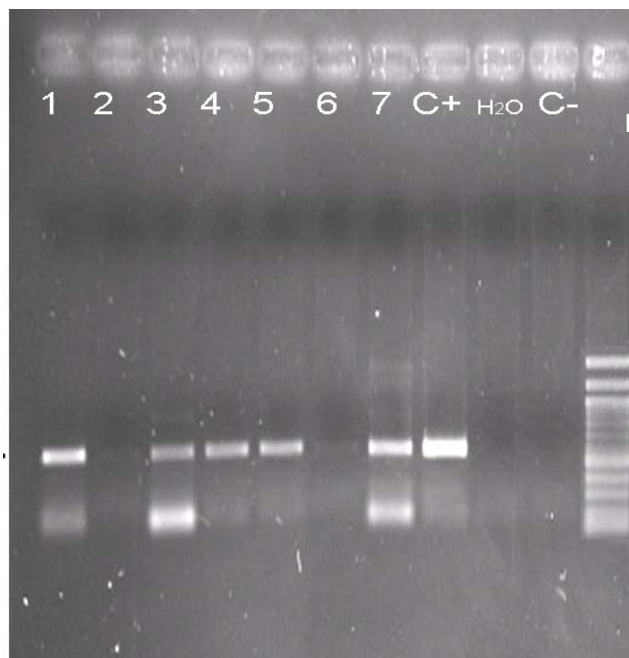


Figura IV. 7. Detección del producto de PCR (532 pb) del gen *pmi* en líneas obtenidas tras la transformación con EHA105/pNOV2819 y cultivo en medio con manosa. Planta no transformada como control negativo (C-), plásmido como control positivo (C+), marcador (M).

Se ha descrito que las eficiencias de transformación en distintas especies como maíz, trigo o cebada fueron más elevadas cuando se utilizó el sistema *pmi*/manosa que con sistemas en los que se utilizan genes de resistencia a herbicidas o antibióticos (Reed *et al.*, 2001). Los mismos resultados han sido confirmados por varios autores en manzano (Degenhardt *et al.*, 2006), remolacha (Joersbo *et al.*, 1998), arroz (Lucca *et al.*, 2001), almendro (Ramesh *et al.*, 2006), papaya (Zhu *et al.*, 2005) o en citrange y naranjo (Ballester *et al.*, 2008). En alguna especie, la utilización de este sistema aumentó la eficiencia de transformación diez veces más que la obtenida seleccionando con kanamicina (Joersbo *et al.*, 1998). Sin embargo, en yuca la eficiencia de transformación fue dos veces más alta cuando se utilizó higromicina en lugar de manosa como agente selectivo (Zhang y Puonti-Kaerlas, 2000). Esto indica que la eficiencia de transformación cuando se utiliza el sistema *pmi*/manosa puede variar dependiendo de la especie o la variedad. Para albaricoquero, la eficiencia de transformación máxima obtenida fue 7,5% tras la evaluación por PCR que es muy parecida a la que se obtuvo

utilizando paromomicina (6,67%) como agente selectivo (Capítulo III).

La concentración adecuada para obtener la máxima eficiencia de transformación fue la combinación de 1,25 g/L de manosa con 20 g/L de sacarosa. Esta es la menor en todas especies en que se ha utilizado este sistema de selección, que varía entre 2,5-20 g/L de manosa (Aswath *et al.*, 2006; Lucca *et al.*, 2001; Min *et al.*, 2007; Stoykova y Stoeva-Popova, 2010). En este trabajo, no se obtuvieron yemas transformadas a partir de explantos de la variedad ‘Canino’, quizás debido a su mayor sensibilidad a la manosa.

El rojo de clorofenol es un indicador de cambio de pH. Cuando este se añade al medio, la actividad enzimática de la enzima PMI sobre la manosa, provoca una disminución del pH, lo que produce un cambio en el color del indicador, pasando de rojo a naranja o amarillo.

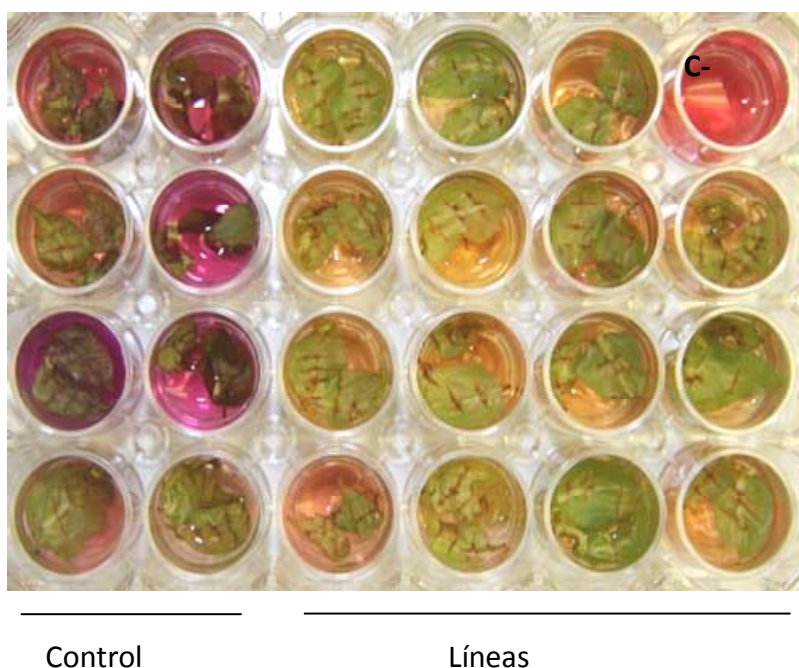


Figura IV. 8. Ensayo con rojo de clorofenol. Hojas de albaricoquero control correspondientes a material no transformado en comparación con hojas de líneas transformadas con el gen *pmi*. C-: pocillo sin material vegetal.

Cuando se han analizado las líneas transformadas, que dieron positivo en el análisis por PCR, mediante la reacción con rojo de clorofenol, se observó un cambio de color a naranja o amarillo, indicando que el pH ha descendido debido a la actividad del enzima PMI sobre la manosa (Figura IV. 8). En los controles el color permaneció rojo o violeta.

Aquellas hojas de las líneas transformadas que han consumido manosa han conseguido formar pequeños callos, mientras que en los controles no hubo variaciones de pH, ni formación de callo en las hojas. Este método se ha utilizado en manzano (Degenhardt *et al.*, 2006), naranjo y citrange (Ballester *et al.*, 2008; Boscariol *et al.*, 2003), maíz (Wright *et al.*, 2001), arroz (He *et al.*, 2004).

Con algunas de las líneas positivas en el ensayo del CPR y PCR, se realizó un Southern blot. Sin embargo, ninguna muestra dio positivo. Aunque intentamos multiplicar las líneas que dieron positivo por PCR para el gen *pmi* y así poder realizar el resto de las pruebas moleculares, así como enraizarlas, los brotes mantenidos en medio selectivo con 7,5 g/L de manosa acabaron muriendo después de dos o tres ciclos de subcultivo, lo que indica que eran quimeras. La selección con manosa en albaricoquero tiene la desventaja de que los brotes que están transformados pero son quiméricos son capaces de vivir en presencia de manosa durante largos periodos de tiempo, aunque no proliferan.

4. CONCLUSIÓN

El uso del gen *pmi* como marcador de selección podría reducir el rechazo de la opinión pública y facilitar los tramites legales para la comercialización de plantas transgénicas, ya que la proteína codificada por este gen no representa un riesgo para la salud humana ni para el medio ambiente. Con este sistema, se consiguió producir plantas transgénicas de albaricoquero con una eficiencia de 7.5%, similar a la obtenida con genes marcadores de selección que confieren resistencia a antibióticos, pero los regenerantes resultaron ser quimeras.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso J., Barredo J.L., Díez B., Mellado E., Salto F., García J.L. y Cortés E.** (1998) D-Amino-acid oxidase gene from *Rhodotorula gracilis* (*Rhodospiridium toruloides*) ATCC 26217. *Microbiology*, **144**: 1095-1101.
- Aswath C.R., Mo S.Y., Kim D.H. y Park S.W.** (2006) *Agrobacterium* and biolistic transformation of onion using non-antibiotic selection marker phosphomannose isomerase. *Plant Cell Reports*, **25**: 92-99.
- Ballester A., Cervera M. y Peña L.** (2008) Evaluation of selection strategies alternative to *nptII* in genetic transformation of citrus. *Plant Cell Reports*, **27**: 1005-1015.
- Boscariol R.L., Almeida W.A.B., Derbyshire M.T.V.C., Mourão-Filho F.A.A. y Mendes B.M.J.** (2003) The use of the PMI/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Plant Cell Rep*, **22**: 122-128.
- Briza J., Pavingerova D., Prikrylova P., Gazdova J., Vlasak J. y Niedermeierova H.** (2008) Use of phosphomannose isomerase-based selection system for *Agrobacterium* -mediated transformation of tomato and potato. *Biologia Plantarum*, **52**: 453-461.
- 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.
- Collins L.V. y Hackett J.** (1991) Sequence of the phosphomannose isomerase-encoding gene of *Salmonella typhimurium*. *Gene*, **103**: 135-136.
- Darzins A., Frantz B., Vanags R.I. y Chakrabarty A.M.** (1986) Nucleotide sequence analysis of the phosphomannose isomerase gene (*pmi*) of *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with the corresponding *Escherichia coli* gene *manA*. *Gene*, **42**: 293-302.
- Degenhardt J., Poppe A., Montag J. y Szankowski I.** (2006) The use of the phosphomannose-isomerase/mannose selection system to recover transgenic apple plants. *Plant Cell Reports*, **25**: 1149-1156.
- Dolgov S.V. y Firsov A.P.** (1999) Regeneration and *Agrobacterium* transformation of sour cherry leaf discs. *Acta Horticulturae*, **484**: 577-579.

- 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.
- Ebinuma H., Sugita K., Matsunaga E. y Yamakado M.** (1997) Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **94**: 2117-2121.
- Endo S., Kasahura T., Sugita K., Matsunaga E. y Ebinuma H.** (2001) The isopentenyl transferase gene is effective as a selectable marker gene for plant transformation in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SRI). *Plant Cell Reports*, **20**: 60-66.
- Gadaleta A., Giancaspro A., Blechl A. y Blanco A.** (2006) Phosphomannose isomerase, *pmi*, as a selectable marker gene for durum wheat transformation. *Journal of Cereal Science*, **43**: 31-37.
- Gao Z., Xie X., Ling Y., Muthukrishnan S. y Liang G.H.** (2005) *Agrobacterium tumefaciens* mediated sorghum transformation using a mannose selection system. *Plant Biotechnology Journal*, **3**: 591-599.
- Goldsworthy A. y Street H.E.** (1965) The carbohydrate nutrition of tomato roots VIII. The mechanism of the inhibition by D-mannose of the respiration of excised roots. *Ann Bot*, **29**: 45-58.
- Haldrup A., Petersen S.G. y Okkels F.T.** (1998) The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent. *Plant Molecular Biology*, **37**: 287-296.
- He Z., Duan Z.Z., Liang W., Chen F., Yao W., Liang H., Yue C., Sun Z., Chen F. y Dai J.** (2006) Mannose selection system used for cucumber transformation. *Plant Cell Reports*, **25**: 953-958.
- He Z., Fu Y., Si H., Hu G., Zhang S., Yu Y. y Sun Z.** (2004) Phosphomannose-isomerase (*pmi*) gene as a selectable marker for rice transformation via *Agrobacterium*. *Plant Science*, **166**: 17-22.
- Hsiao P., Sanjaya, Su R.C., Teixeira da Silva J.A. y Chan M.T.** (2007) Plant native tryptophan synthase beta 1 gene is a non-antibiotic selection marker for plant transformation. *Planta*, **225**: 897-906.

- Jain M., Chengalrayan K., Abouزيد A. y Gallo M.** (2007) Prospecting the utility of a PMI/mannose selection system for the recovery of transgenic sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) plants. *Plant Cell Reports*, **26**: 581-590.
- 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.
- Joersbo M., Jorgensen K. y Brunstedt J.** (2003) A selection system for transgenic plants based on galactose as selective agent and a UDP-glucose:galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene as selective gene. *Molecular Breeding*, **11**: 315-323.
- Joersbo M., Petersen S.G. y Okkels F.T.** (1999) Parameters interacting with mannose selection employed for the production of transgenic sugar beet. *Physiologia Plantarum*, **105**: 109-115.
- Ku J.J., Park Y.H. y Park Y.D.** (2006) A non-antibiotic selection system uses the phosphomannose-isomerase (PMI) gene for *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese cabbage. *Journal of Plant Biology*, **49**: 115-122.
- Lamblin F., Aimé A., Hano C., Roussy I., Domon J.M., Van Droogenbroeck B. y Lainé E.** (2007) The use of the phosphomannose isomerase gene as alternative selectable marker for *Agrobacterium* -mediated transformation of flax (*Linum usitatissimum*). *Plant Cell Reports*, **26**: 765-772.
- Lee B.T. y Matheson N.K.** (1984) Phosphomannoisomerase and phosphoglucoisomerase in seeds of *Cassia coluteoides* and some other legumes that synthesize galactomannan. *Phytochemistry*, **23**: 983-987.
- Leyman B., Avonce N., Ramon M., Van Dijck P., Iturriaga G. y Thevelein J.M.** (2006) Threhalose-6-phosphate synthase as an intrinsic selection marker for plant transformation. *Journal of Biotechnology*, **121**: 309-317.
- López-Noguera S., Petri C. y Burgos L.** (2009) Combining a regeneration-promoting gene and site-specific recombination allows a more efficient apricot transformation and the elimination of marker genes. *Plant Cell Reports*, **28**: 1781-1790.
- Lucca P., Ye X. y Potrykus I.** (2001) Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent. *Molecular Breeding*, **7**: 43-49.

- Miki B. y McHugh S.** (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology*, **107**: 193-232.
- Miles J.S. y Guest J.R.** (1984) Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli*. *Gene*, **32**: 41-48.
- Min B.W., Cho Y.N., Song M.J., Noh T.K., Kim B.K., Chae W.K., Park Y.S., Choi Y.D. y Harn C.H.** (2007) Successful genetic transformation of Chinese cabbage using phosphomannose isomerase as a selection marker. *Plant Cell Reports*, **26**: 337-344.
- Negrotto D., Jolley M., Beer S., Wenck A.R. y Hansen G.** (2000) The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Reports*, **19**: 789-803.
- O'Kennedy M.M., Burger J.T. y Botha F.C.** (2004) Pearl millet transformation system using the positive selectable marker gene phosphomannose isomerase. *Plant Cell Reports*, **22**: 684-690.
- Patil G., Deokar A., Jain P., Thengane R. y Srinivasan R.** (2009) Development of a phosphomannose isomerase-based *Agrobacterium*-mediated transformation system for chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Cell Reports*, **28**: 1669-1676.
- Petri C.** (2005) Transformación genética del albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.), mediada por *Agrobacterium* y regeneración de plantas transformadas. (Tesis), p. 194.
- Proudfoot A.E.I., Payton M.A. y Wells T.N.C.** (1994) Purification and characterization of fungal and mammalian phosphomannose isomerases. *Journal of protein chemistry*, **13**: 619-627.
- Ramesh S.A., Kaiser B.N., Franks T., Collins G. y Sedgley M.** (2006) Improved methods in *Agrobacterium*-mediated transformation of almond using positive (mannose/*pmi*) or negative (kanamycin resistance) selection-based protocols. *Plant Cell Reports*, **25**: 821-828.
- Ramessar K., Peremarti A., Gómez-Galera S., Naqvi S., Moralejo M., Muñoz P., Capell T. y Christou P.** (2007) Biosafety and risk assessment framework for

- selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of science not supporting the poitics. *Transgenic Research*, **16**: 261-280.
- Reed J., Privalle L., Powell M.L., Meghji M., Dawson J., Dunder E., Suttle J., Wenck A., Launis K. y Kramer C.** (2001) Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **37**: 127-132.
- Schmidt M., Arnold W., Niemann A., Kleickmann A. y Pühler A.** (1992) The *Rhizobium meliloti pmi* gene encodes a new type of phosphomannose isomerase. *Gene*, **122**: 35-43.
- Sheu-Hwa C.S., Lewis D.H. y Walker D.A.** (1975) Stimulation of photosynthetic starch formation by sequestration of cytoplasmic orthophosphate. *New Phytologist*, **74**: 383-392.
- Sigareva M., Spivey R., Willits M.G., Kramer C.M. y Chang Y.F.** (2004) An efficient mannose selection protocol for tomato that has no adverse effect on the ploidy level of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, **23**: 236-245.
- Stoykova P. y Stoeva-Popova P.** (2010) PMI (*manA*) as a nonantibiotic selectable marker gene in plant biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1-8.
- Wallbraun M., Sonntag K., Eisenhauer C., Krzcal G. y Wang Y.P.** (2009) Phosphomannose-isomerase (*pmi*) gene as a selectable marker for *Agrobacterium*-mediated transformation of rapeseed. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **99**: 345-351.
- Wang A.S., Evans R.A., Altendorf P.R., Hanten J.A., Doyle M.C. y Rosichan J.L.** (2000) A mannose selection system for production of fertile transgenic maize plants from protoplasts. *Plant Cell Reports*, **19**: 654-660.
- Weisser P., Kramer R. y Sprenger G.A.** (1996) Expression of the *Escherichia coli pmi* gene, encoding phosphomannose-isomerase in *Zymomonas mobilis*, leads to utilization of mannose as a novel growth substrate, which can be used as a selective marker. *Applied and environmental microbiology*, **62**: 4155
- Wright M., Dawson J., Dunder E., Suttle J., Reed J., Kramer C., Chang Y., Novitzky R., Wang H. y Artim-Moore L.** (2001) Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the

phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. *Plant Cell Reports*, **20**: 429-436.

Yoder I. y Goldsbrough A.P. (1994) Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. *Bio-Technology*, **12**: 263-267.

Zhang P. y Puonti-Kaerlas J. (2000) PIG-mediated cassava transformation using positive and negative selection. *Plant Cell Reports*, **19**: 1041-1048.

Zhu Y.J., Agbayani R., McCafferty H., Albert H.H. y Moore P.H. (2005) Effective selection of transgenic papaya plants with the PMI/Man selection system. *Plant Cell Reports*, **24**: 426-432.

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.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

1. DISCUSIÓN GENERAL

Como se ha indicado en varias ocasiones a lo largo de este trabajo, la transformación genética de frutales está aún lejos de ser una herramienta que se pueda utilizar de forma sistemática en los programas de mejora de estas especies. Sin embargo, tiene un indudable interés para resolver ciertos problemas que son difícilmente abordables mediante técnicas de mejora clásica. Además, al ser propagadas vegetativamente, la transformación de genotipos élite proporcionaría una cantidad ilimitada de la variedad transformada y podría tener un gran impacto económico por tratarse en general de especies basadas en el cultivo de un número limitado de variedades (Petri y Burgos, 2005).

Una de las principales limitaciones para el desarrollo de los protocolos de transformación está en la regeneración de yemas o embriones adventicios. Este suele ser el cuello de botella de la mayoría de los protocolos de transformación, especialmente en el caso de los frutales (Petri y Burgos, 2005). Como se ha indicado repetidamente, la regeneración es muy dependiente de numerosos factores y entre estos el más importante es el genotipo. Desde el punto de vista de la mejora de estas especies, sería necesario disponer de una herramienta que permitiera transformar la variedad más interesante en cada caso, en función del objetivo que perseguimos. No basta con disponer de un protocolo para transformar una sola variedad, ya que esta puede no resultar de interés en general o, para un objetivo particular, no ser la más adecuada.

En nuestro grupo de investigación hemos desarrollado un protocolo de transformación basado en la regeneración adventicia a partir de hojas de brotes micropropagados de albaricoquero de la variedad 'Helena'. Se trata de una selección de un programa de mejora norteamericano que posee características muy interesantes, pero que prácticamente no se cultiva en Europa. Sin embargo, nuestro Departamento ha desarrollado, mediante mejora clásica, nuevas variedades que están siendo ampliamente aceptadas y cultivadas (Egea *et al.*, 2009; Egea *et al.*, 2004a; Egea *et al.*, 2004b; Egea *et al.*, 2005a; Egea *et al.*, 2005b). Puesto que estas variedades suponen el material genético más avanzado del que se dispone en estos momentos, parece que lo más interesante sería ser capaces de transformarlas para que los avances que se pudieran conseguir fueran partiendo de un material que ya se encuentra entre lo mejor de la oferta varietal de albaricoquero que existe en nuestro país.

Muchos grupos de investigación que trabajan con especies leñosas han optado por la

posibilidad de transformar material juvenil utilizando explantos procedentes de semillas. Aunque el interés de esta estrategia es limitado ya que las plantas producidas tendrán características agronómicas desconocidas, puede resultar de interés para determinados objetivos. Por ejemplo, la evaluación de construcciones, estudios de genómica funcional o, en el caso del albaricoquero, incluso la producción de patrones. Sin embargo, esto requiere desarrollar protocolos que sean altamente eficientes y que no dependan de la variedad de la que se cogen las semillas (independencia del genotipo).

Todo lo anterior nos ha llevado a explorar diferentes posibilidades que nos permitieran desarrollar un protocolo de transformación que no fuera dependiente del genotipo. No existe en la actualidad ningún protocolo con estas características para material adulto de especies leñosas. Si existen dos protocolos que utilizan material juvenil, uno de ellos en cítricos donde, aprovechando el carácter apomítico de sus semillas, se puede transformar material juvenil de muchas variedades con elevadas eficiencias, en casi todos los casos. Este material, a pesar de proceder de semillas, mantiene las características de la planta madre al tratarse de embriones somáticos que se generan en la nucela de las semillas (Petri y Burgos, 2005). Tiene, no obstante, el inconveniente de que las plantas producidas tienen que adquirir caracteres adultos y esto puede llevar bastantes años. El otro protocolo se desarrolló para hipocotilos de *Prunus domestica* (Mante *et al.*, 1991) y se ha ido optimizando mediante un incremento en la selección (hasta 80 mg/L de kanamicina) aplicándola justo después del co-cultivo y una mejora en las fases de enraizamiento y aclimatación de las plantas transgénicas, alcanzando hasta un 4,2% de eficiencia de transformación (Gonzalez-Padilla *et al.*, 2003). Por último, recientemente, mediante la adición de 2,4-D al medio de co-cultivo y la optimización de cada una de las fases del protocolo se han alcanzado eficiencias de transformación de hasta el 42% y se han producido plantas transgénicas en tan solo 6 meses (Petri *et al.*, 2008c). Este es el protocolo más exitoso desarrollado en especies de *Prunus* y aunque fue puesto a punto con semillas de la variedad ‘Bluebyrd’ en nuestro laboratorio hemos comprobado que se puede utilizar con eficiencias parecidas, e incluso mejores, con semillas de otras variedades como ‘Stanley’, ‘Claudia verde’ o ‘Claudia tolosa’ (datos no publicados). Además, alguna de las versiones del protocolo ha sido utilizada con éxito en otros laboratorios y con diferentes variedades, lo que ha sido publicado en artículos científicos (Tian *et al.*, 2007) o comunicado en congresos (comunicación S050221 del libro de resúmenes del International Horticultural Congress celebrado en Lisboa en 2010), lo que demuestra la eficacia de la metodología.

Disponer para albaricoquero de un protocolo como el que se ha desarrollado con hipocotilos de semillas de ciruelo europeo sería de gran interés. Aun tratándose de material juvenil, con características agronómicas desconocidas, un protocolo tan eficiente permite llevar a cabo estudios que habitualmente realizamos con plantas modelo, como tabaco o *Arabidopsis*, con eficientes protocolos de transformación. La información obtenida en estos estudios y las conclusiones alcanzadas serían mucho más aplicables a los *Prunus* en general que las alcanzadas con las especies modelo clásicas. En nuestro laboratorio ya estamos sustituyendo los trabajos con tabaco o *Arabidopsis* por el protocolo con ciruelo dado que la eficiencia es similar.

Por todo lo anterior se intentó desarrollar un protocolo de transformación con dos tipos de explantos procedentes de semillas de albaricoquero. Las primeras publicaciones en albaricoquero describían la obtención de regeneración (Goffreda *et al.*, 1995; Pieterse, 1989), e incluso transformación a partir de cotiledones inmaduros (Laimer da Câmara Machado *et al.*, 1992), por lo que decidimos probar este tipo de explanto pero de semillas maduras con el fin de poder disponer de semillas durante todo el año. También estudiamos los hipocotilos con la intención de desarrollar un protocolo parecido al de ciruelo. Aunque con los dos tipos de explantos se obtuvo abundante regeneración, los porcentajes fueron mucho más elevados en los cotiledones de las dos variedades estudiadas que en los hipocotilos de las tres variedades probadas. Sin embargo, no fue posible obtener plantas transformadas a partir de cotiledones y si se produjeron en el caso de los hipocotilos. Esto fue debido, fundamentalmente, a la falta de coincidencia entre las zonas del cotiledón donde se produjo la regeneración y aquellas en las que *Agrobacterium* fue capaz de transferir el T-DNA. El trabajo desarrollado en esta tesis debería constituir la base de futuras optimizaciones con ambos tipos de explantos ya que los resultados obtenidos aun no son suficientemente satisfactorios.

Dado que la limitación más importante para desarrollar protocolos con material adulto parece encontrarse en la regeneración adventicia, es razonable pensar que un protocolo que pudiera evitarla sería más flexible y fácil de manejar. Una forma de evitar el proceso de des-diferenciación inherente a los protocolos basados en organogénesis o embriogénesis, sería la utilización de meristemas (Petri y Burgos, 2005; Scorza *et al.*, 1995). Sin embargo, tal y como se ha descrito en esta tesis, la utilización de meristemas implica un elevado riesgo de producción de quimeras al tratarse de un tejido muy organizado. Algunos autores han conseguido, no obstante, resultados interesantes forzando la brotación múltiple a partir de meristemas de peral (Matsuda *et al.*, 2005) y

vid (Dutt *et al.*, 2007). En ambos artículos el método fue utilizado para transformar solo una variedad y, en el caso concreto de vid, los autores indican que no fue posible reproducirlo con diferentes variedades.

Otra aproximación consiste en la generación de agregados meristemáticos (Mezzetti *et al.*, 2002). Este tejido sin duda ofrece un material con elevada capacidad regenerativa y muy susceptible de ser transformado mediante *Agrobacterium*, al estar sus células en un proceso de división activa. Esta metodología fue evaluada en nuestro laboratorio resultando imposible recuperar las yemas que expresaban los genes marcadores *gfp* o *gus* (López-Noguera, 2009). Posiblemente esto fue debido a un efecto negativo de las elevadas concentraciones de citoquinina, así como de los largos periodos de exposición a las mismas, que fueron necesarios para generar el agregado y durante el proceso de transformación y regeneración, lo que pudo generar apoptosis celular (Carimi *et al.*, 2003).

En nuestro grupo se ideó la posibilidad de transformar células con capacidad meristemática, que se ha descrito detalladamente en el capítulo III, y consiste en la transformación de explantos nodales a los que se les ha eliminado la yema axilar o apical. La capacidad de las células remanentes, aún escasamente diferenciadas, para desarrollar un nuevo meristemo es la base de esta estrategia (Albuquerque *et al.*, 2007). La eliminación de la yema axilar tiene dos efectos importantes, por una parte elimina un meristemo ya organizado dejando solamente tejido que es fácilmente accesible a *Agrobacterium*. Además, al haberse producido una herida con el bisturí, esta zona tiene células dañadas que atraen a la bacteria e inducen su virulencia.

Hemos mostrado, dentro de este trabajo, que la metodología ha resultado útil para producir plantas transformadas de cuatro variedades diferentes de albaricoquero. Esto es ya en sí mismo muy inusual pues solo hemos modificado la selección en las condiciones utilizadas con todas las variedades. Además, en otros trabajos del grupo de investigación se ha comprobado que podemos transformar otras especies.

El principal problema que hemos detectado con esta metodología es que la mayoría de las líneas transgénicas producidas son quiméricas. Aunque hemos podido constatar que con nuestro protocolo de organogénesis a partir de hojas también se producen quimeras (Petri *et al.*, 2008b), estas parecen ser mucho más frecuentes cuando se han utilizado explantos nodales.

Las quimeras complican enormemente la evaluación de las plantas transformadas y han

retrasado notablemente el desarrollo de este trabajo, suponiendo una limitación adicional a las pequeñas eficiencias de transformación obtenidas habitualmente.

La producción de quimeras parece estar relacionada con el origen multicelular de la regeneración adventicia (Poethig, 1989; Zhu *et al.*, 2007). Otra posibilidad es que las quimeras y los escapes aparecerían como resultado de la expresión transitoria de los genes marcadores durante las etapas tempranas del proceso de regeneración o también debido a la presencia de *Agrobacterium* en los tejidos infectados. Las quimeras podrían ser una consecuencia de la protección que las células transformadas ejercen sobre el microambiente cercano, detoxificando el medio de cultivo (Domínguez *et al.*, 2004; Park *et al.*, 1998). Otra posible explicación para la aparición de quimeras podría estar en la inefectividad del agente selectivo en especies con una tolerancia endógena (Rakosy-Tican *et al.*, 2007) o con una elevada sensibilidad como es el caso del albaricoquero (Petri *et al.*, 2008a).

Aunque todas las explicaciones anteriores han sido sugeridas por diferentes autores, se ha demostrado que la primera propuesta es la más probable (Zhu *et al.*, 2007). Estos autores mediante la utilización de quimeras entre *Brassica juncea* y *Brassica oleracea*, consistentes en una capa L1 procedente de la primera especie y capas L2 y L3 procedentes de la segunda, pudieron demostrar que los brotes adventicios obtenidos derivaban de una capa celular o de múltiples capas y que en general los brotes adventicios eran de origen multicelular o incluso multihistogénico.

La consecuencia inmediata de este hecho es que con toda probabilidad vamos a obtener plantas quiméricas si solo alguna de las células que da origen al brote adventicio ha sido transformada. Una selección adecuada podría conferir una ventaja a las células transformadas dentro de las que constituyen el brote adventicio de manera que finalmente estas se impusieran y dieran lugar a la mayor parte o todos los tejidos de la planta que se origine. Sin embargo, en especies como el albaricoquero, con una elevada sensibilidad a los antibióticos, es necesario desarrollar estrategias de selección que habitualmente implican un incremento gradual en la misma (Petri *et al.*, 2008a), lo que inevitablemente va a favorecer el desarrollo de las quimeras.

Como se indicaba anteriormente, durante el desarrollo de este trabajo de tesis observamos toda una serie de resultados anómalos, consistentes en variabilidad en los resultados de PCR, dificultad para obtener una señal positiva en los análisis Southern, una extremada sensibilidad de algunas líneas a los antibióticos en el medio de

propagación, etc. Finalmente, diferentes resultados nos indicaron que el origen del problema era que esas líneas eran quiméricas. Se ha llevado a cabo un ingente trabajo para intentar disociar estas quimeras mediante diferentes métodos, basados en técnicas de cultivo *in vitro* (Roux *et al.*, 2001) y en protocolos iterativos de regeneración-selección en concentraciones crecientes de antibiótico (Mathews *et al.*, 1998). Todo este trabajo ha producido resultados positivos sólo parcialmente, tal y como se discutirá más adelante, por lo que no se han detallado en esta memoria. Asimismo, se ha examinando minuciosamente el protocolo de transformación de explantos nodales y la selección de las yemas regeneradas con el fin de introducir mejoras, en la medida de lo posible, e intentar evitar la producción de las quimeras, sin conseguir mejoras significativas por lo que no se han detallado estos estudios en esta memoria.

Ha resultado, no obstante, de gran ayuda el disponer de una metodología basada en la cuantificación del contenido en transgén, mediante PCR cuantitativa, para decidir de una forma relativamente rápida si una planta es quimérica o no, que fue desarrollada por miembros del Grupo (Faize *et al.*, 2010). Este trabajo demuestra que la toma de decisiones basada en la utilización de genes marcadores visuales no es totalmente satisfactoria. Por otra parte, la supuesta relación entre la uniformidad en la transformación y la obtención consistente de un Southern positivo también se ha demostrado que no es correcta, ya que en realidad depende de que la cantidad de transgén en nuestra extracción de ADN supere el umbral de detección de la técnica de hibridación.

La producción de quimeras en albaricoquero parece estar favorecida por una selección ineficiente. Generalmente, los antibióticos aminoglicósidos probados tienen un efecto bastante contundente afectando también a los tejidos infectados. Esto obliga a retrasar la selección o ha incrementarla de forma gradual lo que favorece la producción de escapes y quimeras. Por ello parece razonable el probar otras estrategias de selección. Con este objetivo y tratando, al mismo tiempo, de utilizar un agente selectivo que no produjera tanto rechazo como los antibióticos decidimos evaluar la posibilidad de seleccionar con manosa plantas transformadas con el gen *pmi*, como se describe en el Capítulo IV de esta memoria.

Existe el sentimiento en la opinión pública de que la utilización de genes de resistencia a antibióticos como marcadores de selección en plantas modificadas genéticamente podría suponer algún riesgo para la salud humana, animal o el medio ambiente y persiste la preocupación sobre la liberación de plantas transgénicas que contienen genes

de resistencia a los antibióticos. Podría ser que la producción de plantas transgénicas libre de genes de resistencia a los antibióticos resultara imprescindible para el desarrollo de plantas transgénicas. Se están desarrollando sistemas que permitan la eliminación de estos genes o la utilización de otros alternativos. Este es el caso del sistema de selección *pmi*/manosa. Los resultados de manzano, papaya, cítricos revelan que el *pmi*/mañosa da una mejor eficiencia de transformación.

Durante este trabajo, utilizando los explantos nodales de albaricoquero, no se observaron diferencias en las eficiencias de transformación máximas encontradas en este trabajo entre el sistema *pmi*/manosa (7,5%) y la selección con antibióticos (6,7%). Sin embargo, como el gen *pmi* está muy extendido en la naturaleza y no representa ningún riesgo para la salud humana o animal, se podría aplicar el sistema *pmi*/manosa como una alternativa a la selección con antibióticos en albaricoquero.

Desafortunadamente, el sistema de selección con manosa no resolvió el problema de las quimeras sino que incluso lo agravó dando lugar a que ninguna de las plantas obtenidas que dieron positivo para el gen *pmi* en la PCR generaron una señal en el Southern. Además, todas ellas terminaron muriendo en el medio selectivo aunque tardaron mucho tiempo, lo que complicó también bastante este trabajo.

2. CONCLUSIONES

(1) Se ha demostrado que es posible obtener porcentajes de regeneración muy elevados (al menos el 66%) e independiente del genotipo utilizando los cotiledones de semillas maduras de la variedad ‘Canino’ y del patrón, *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. Desafortunadamente, hasta el momento no ha sido posible producir plantas transgénicas debido a la falta de coincidencia entre las zonas del cotiledón que regeneran y las que son transformadas por *Agrobacterium*. Sin embargo, el sistema parece suficientemente prometedor y se continuará estudiando.

(2) Utilizando los explantos de secciones de hipocotilos de semillas maduras de tres variedades de albaricoquero, ‘Dorada’, ‘Moniquí’ y ‘Canino’, se ha establecido un protocolo fiable e independiente del genotipo para obtener plantas transgénicas con la ventaja de poder mantener las semillas almacenadas durante todo al año en comparación con el uso de semillas inmaduras. Se obtuvo una regeneración mínima del 32% en las tres variedades y se consiguieron plantas transgénicas de dos de ellas con eficiencias, basadas en evaluación por PCR, de entre el 1,3% y el 7,3%.

(3) Utilizando los explantos nodales se han conseguido transformar cuatro variedades diferentes de albaricoquero, ‘Helena’, ‘Canino’, ‘Lorna’ y ‘Rojo Pasión’. Bajo las mismas condiciones, los porcentajes de regeneración variaron entre el 54% y el 88%. Fue posible transformar las cuatro variedades y las eficiencias de transformación, basadas en evaluación por PCR, variaron entre el 1,7% y el 6,7%.

(4) El sistema de *pmi/manosa* aplicado a los explantos nodales presentó similares eficiencias de transformación que la selección con antibióticos. El bajo coste, la seguridad para la salud humana y el medio ambiente son las ventajas principales que apoyan la aplicación del sistema *pmi/manosa* en la ingeniería genética de albaricoquero mientras que sus desventajas son los largos tiempos de selección necesarios para eliminar los escapes y las quimeras.

(5) Aunque los protocolos desarrollados han sido mucho menos dependientes del genotipo que los descritos hasta el momento para albaricoquero, todos tienen en común la generación de plantas quiméricas. Resolver este problema se convierte pues en un paso necesario para que la metodología desarrollada pueda ser utilizada sistemáticamente en la introducción de genes de interés.

3. BIBLIOGRAFÍA

- Alburquerque N., Wang H., Nortés M. D., López-Noguera S., Petri C., Pérez-Tornero O., Piqueras A., y Burgos L.** (2007) Procedimiento para modificar genéticamente plantas leñosas mediante la utilización de células con capacidad meristemática. Patente número PCT/ES2008/070139
- Carimi F., Zottini M., Formentin E., Terzi M. y Lo Schiavo F.** (2003) Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta*, **216**: 413-421.
- 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.
- Dutt M., Li Z., Dhekney S. y Gray D.** (2007) Transgenic plants from shoot apical meristems of *Vitis vinifera* L. 'Thompson Seedless' via *Agrobacterium* -mediated transformation. *Plant Cell Reports*, **26**: 2101-2110.
- Egea J., Campoy J.A., Dicenta F., Burgos L., Patiño J.L. y Ruiz D.** (2009) 'Estrella' and 'Sublime' apricot cultivars. *HortScience*, **44**: 469-470.
- Egea J., Dicenta F. y Burgos L.** (2004a) 'Rojo Pasión' apricot. *HortScience*, **39**: 1490-1491.
- Egea J., Dicenta F., Martínez-Gómez P. y Burgos L.** (2004b) 'Selene' apricot. *HortScience*, **39**: 1492-1493.
- Egea J., Ruiz D. y Burgos L.** (2005a) 'Dorada' apricot. *HortScience*, **40**: 1919-1920.
- Egea J., Ruiz D., Dicenta F. y Burgos L.** (2005b) 'Murciana' apricot. *HortScience*, **40**: 254-255.
- Faize M., Faize L. y Burgos L.** (2010) Using quantitative Real-Time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation. *BMC Biotechnology*, **10**: 53
- 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.
- 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.
- López-Noguera S.** (2009) Obtención de plantas transformadas de albaricoquero libres de marcadores. (Tesis), p. 156.
- 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.
- Mathews H., Dewey V., Wagoner W. y Bestwick R.K.** (1998) Molecular and cellular evidence of chimaeric tissues in primary transgenics and elimination of chimaerism through improved selection protocols. *Transgenic Research*, **7**: 123-129.
- Matsuda N., Gao M., Isuzugawa K., Takashina T. y Nishimura K.** (2005) Development of an *Agrobacterium*-mediated transformation method for pear (*Pyrus communis* L.) with leaf-section and axillary shoot-meristem explants. *Plant Cell Reports*, **24**: 45-51.
- Mezzetti B., Pandolfini T., Navacchi O. y Landi L.** (2002) Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis. *BMC Biotechnology*, **2**: 18
- Park S.H., Rose S.C., Zapata C., Srivatanakul M. y Smith R.H.** (1998) Cross-protection and selectable marker genes in plant transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, **34**: 117-121.
- Petri C. y Burgos L.** (2005) Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect? *Transgenic Research*, **14**: 15-26.
- Petri C., López-Noguera S., Alburquerque N., Egea J. y Burgos L.** (2008a) An antibiotic-based selection strategy to regenerate transformed plants from apricot leaves with high efficiency. *Plant Science*, **175**: 777-783.

- Petri C., Wang H., Albuquerque N., Faize M. y Burgos L.** (2008b) *Agrobacterium*-mediated transformation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) leaf explants. *Plant Cell Reports*, **27**: 1317-1324.
- Petri C., Webb K., Hily J.M., Dardick C. y Scorza R.** (2008c) High transformation efficiency in plum (*Prunus domestica* L.): a new tool for functional genomics studies in *Prunus* spp. *Molecular Breeding*, **22**: 581-591.
- Pieterse R.E.** (1989) Regeneration of plants from callus and embryos of 'Royal' apricot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **19**: 175-179.
- Poethig S.** (1989) Genetic mosaics and cell lineage analysis in plants. *Trends in Genetics*, **5**: 273-277.
- Rakosy-Tican E., Aurori C.M., Dijkstra C., Thieme R., Aurori A. y Davey M.R.** (2007) The usefulness of the *gfp* reporter gene for monitoring *Agrobacterium*-mediated transformation of potato dihaploid and tetraploid genotypes. *Plant Cell Reports*, **26**: 661-671.
- Roux N., Dolezel J., Swennen R. y Zapata-Arias F.J.** (2001) Effectiveness of three micropropagation techniques to dissociate cytochimeras in *Musa* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **66**: 189-197.
- Scorza R., Hammerschlag F.A., Zimmerman T.W. y Cordts J.M.** (1995) 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.
- Tian L., Sibbald S., Subramanian J. y Svircev A.** (2007) Characterization of *Prunus domestica* L. in vitro regeneration via hypocotyls. *Scientia Horticulturae*, **112**: 462-466.
- Zhu X.Y., Zhao M., Ma S., Ge Y.M., Zhang M.F. y Chen L.P.** (2007) Induction and origin of adventitious shoots from chimeras of *Brassica juncea* and *Brassica oleracea*. *Plant Cell Reports*, **26**: 1727-1732.

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla II. 1. Efecto de los reguladores del crecimiento sobre la regeneración de cotiledones de semillas del patrón (<i>Prunus armeniaca</i> L. var. <i>ansu</i> Maxim) y ‘Canino’ | 62 |
| Tabla II. 2. Efecto del medio sobre la regeneración y la expresión GFP estable (5 semanas) en los cotiledones del patrón. | 67 |
| Tabla II. 3. Efecto de los reguladores del crecimiento sobre la regeneración a partir de hipocotilos de distintas variedades de albaricoquero | 70 |
| Tabla II. 4. Eficiencia de transformación de hipocotilos de la variedad ‘Canino’ con AGL1/p35SGUSINT, basada en la evaluación de la expresión de GUS. | 76 |
| Tabla II. 5. Transformación de hipocotilos de semillas maduras de albaricoquero con AGL1/ pX6-GFP. | 77 |
| | |
| Tabla III. 1. Efecto de distintos factores sobre la regeneración de albaricoquero. ... | 102 |
| Tabla III. 2. Efecto de la acetosiringona sobre la transformación de explantos nodales cortados longitudinalmente de la variedad de albaricoquero ‘Helena’ utilizando la cepa EHA105 de <i>Agrobacterium</i> | 105 |
| Tabla III. 3. Efecto de la selección sobre la eficiencia de transformación de 4 variedades de albaricoquero..... | 106 |
| | |
| Tabla IV. 1. Efecto de la combinación de manosa y sacarosa sobre la regeneración de los explantos nodales de albaricoquero..... | 133 |
| Tabla IV. 2. Transformación y selección de las plantas transgénicas en medio con distintas combinaciones de manosa/sacarosa. | 137 |

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura II. 1. Proceso de regeneración en cotiledones de albaricoquero. A: Estructura del cotiledón. La flecha indica la zona donde regeneran las yemas. Las líneas discontinuas indican por donde se corta el cotiledón para preparar los explantos. B: Cotiledones en medio de regeneración. C: Yemas regeneradas 4 semanas después del inicio del ensayo. D: Proliferación. E: Enraizamiento. Las barras indican 1 cm. 61
- Figura II. 2. **A**, Efecto del tiempo de oscuridad sobre la regeneración en cotiledones de albaricoquero. Las barras verticales indican los errores estándar. **B**, Aspecto de los cotiledones incubados 0, 1, 2 ó 3 semanas en oscuridad, fotos tomadas tras 4 semanas desde el inicio del experimento. La barra indica 1 cm. 63
- Figura II. 3. Efecto del antibiótico kanamicina sobre la regeneración de los cotiledones de albaricoquero. Las barras verticales indican los errores estándar. 64
- Figura II. 4. Efecto de la sonicación sobre la expresión de GUS transitoria en cotiledones. Los cotiledones A y B son de la misma semilla. 66
- Figura II. 5. Aspecto de la regeneración en cotiledones del patrón en el medio QL21 + 9 μ M de TDZ + 4 μ M de NAA, 4 semanas después del inicio del ensayo. 67
- Figura II. 6. Proceso de regeneración en hipocotilos de albaricoquero. A: Estructura del embrión, donde 1, 2 y 3 representan los explantos utilizados en este trabajo. Se eliminan la parte del epicotilo (E) y la radícula (R). B: Explantos de hipocotilo en el medio de regeneración a día 0. C: Yemas que regeneran alrededor de la sección de hipocotilo de la variedad 'Moniquí', 7 semanas después del inicio del ensayo. D: Regeneración adventicia en hipocotilos de la variedad 'Dorada' 6 semanas tras el inicio del ensayo. Las barras indican 1 mm. 69
- Figura II. 7. Estudio del efecto de diferentes factores sobre la regeneración adventicia de la variedad 'Canino' a partir de hipocotilo. (A) Efecto del tiempo de oscuridad. Se utilizaron un total de 290 explantos. (B) Efecto del 2,4-D en distintas concentraciones durante 3 días. Se utilizaron un total de 493 explantos. (C) Efecto del medio. En total, se utilizaron 144 explantos. (D) Efecto del STS. En total, se utilizaron 269 explantos. 71
- Figura II. 8. Efecto de distintas concentraciones de kanamicina y paromomicina sobre la regeneración de hipocotilos de la variedad de albaricoquero 'Canino' (A). Efecto de kanamicina y paromomicina sobre la regeneración de hipocotilos de la variedad 'Canino'. (B) Efecto de distintas concentraciones de paromomicina sobre la regeneración de hipocotilos de las variedades 'Dorada' y 'Moniquí'. En total, se utilizaron 197, 115 y 202 explantos de 'Canino', 'Moniquí' y 'Dorada', respectivamente. 74

| | |
|---|-----|
| Figura II. 9. Expresión de GUS estable en hipocotilos de ‘Canino’ 4 semanas después de la infección con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1/p35SGUSINT. (A) Las zonas discretas expresando GUS se indican con flechas. (B) Explantos con varios callos transgénicos. (C) Expresión de GUS en toda la superficie de un explanto. (D) Yema quimérica que muestra la actividad de GUS en unas hojas (flecha). Barra horizontal indica 1 mm. | 75 |
| Figura II. 10. A: Análisis electroforético de los productos de PCR con los cebadores para el gen <i>nptII</i> . Calles Ld: Marcador de ADN 1000 pb. —: Control negativo, ADN de ‘Dorada’ sin transformar. Calle 1-4: Extracción de hojas de líneas transformadas (D1, M1, M2, M4) a partir de hipocotilo de albaricoquero. Calle 5: Control positivo del plásmido pX6-GFP. Calle 6: Vacía. B: Análisis Southern para el transgén <i>nptII</i> . M: Marcador de lambda digerido con <i>HindIII</i> marcado con digoxigenina. —: Control negativo de ‘Dorada’ sin transformar. Calle 1-4: Líneas transformadas (D1, M1, M2, M4). Calle 5: Control positivo de tabaco transformado con el plásmido pX6-GFP. Calle 6: Vacía. Pl: control positivo del plásmido pX6-GFP..... | 78 |
| Figura II. 11. Proliferación (A), enraizamiento (B) y aclimatación (C) de las plantas transgénicas de albaricoquero obtenidas a partir de hipocotilos de la variedad ‘Moniquí’. | 78 |
| Figura III. 1. Estructura de la zona meristemática. Adaptado de Bleckmann y Simon (2009). OC, centro organizador. L1, L2 y L3, tres capas. P1, P2 y P3, primordias. | 92 |
| Figura III. 2. Examen histológico de la regeneración de explantos nodales de la variedad Helena. A) Yema microscópica a día 0 del experimento (flecha). B y C) Desarrollo de los nuevos meristemos 5 y 10 días después del inicio del experimento (flechas)..... | 101 |
| Figura III. 3. Efecto de kanamicina y paromomicina sobre la regeneración de albaricoquero cv. ‘Helena’ utilizando explantos nodales. Las barras verticales indican los errores estándar. | 104 |
| Figura III. 4. Examen histoquímico de las yemas regeneradas, cuatro semanas después de la infección con EHA105/pBin19GUSINT. A y B: explantos con áreas expresando GUS que coinciden con las zonas en las que se eliminaron las yemas axilares y en las que está ocurriendo una activa división celular. C y D: yemas transformadas expresan GUS positivo. La barra indica 1mm..... | 107 |
| Figura III. 5. Análisis electroforético de los productos de PCR de líneas transformadas con pBin19GUSINT producidas a partir de explantos nodales de albaricoquero con los cebadores para el gen <i>nptII</i> . — : Control negativo, extracción de hojas de albaricoquero variedad ‘Helena’ sin transformar. Ld: Marcador de ADN 100 pb. +: Control positivo, plásmido. 1-11: Líneas supervivientes en experimentos de transformación..... | 108 |

| | |
|--|-----|
| Figura III. 6. Análisis Southern blot de líneas transformadas con pBin19GUSINT producidas a partir de hojas de albaricoquero variedad 'Helena'. Digestión realizada con <i>EcoRI</i> e hibridación con sonda para el gen <i>nptII</i> . Calle Ld: Marcador de Lambda <i>HindIII</i> marcado con digoxigenina (Roche Cat. nº. 11218590910). Calle C= Helena sin transformar, P= plásmido, M= Marcador molecular, 1-8, líneas PCR positivas, las dos líneas en las que hubo hibridación son de la variedad 'Helena'. | 108 |
| Figura IV. 1. Conversión de la D-manosa en D-fructosa-6-fosfato bajo la actividad de las enzimas hexoquinasa y fosfomanosa isomerasa (PMI). | 125 |
| Figura IV. 2. Representación del plásmido pNOV2819. El plásmido está constituido por el promotor constitutivo CMPS, el gen <i>pmi</i> , que codifica para la enzima fosfomanosa isomerasa, que cataliza la reacción de conversión de manosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato y el terminador NOS. | 130 |
| Figura IV. 3. Efecto de la concentración de manosa sobre el crecimiento de las yemas en medio de meristemas con 20 g/L de sacarosa después de cuatro semanas. | 134 |
| Figura IV. 4. Efecto de distintas concentraciones de manosa combinadas con 20 g/L de sacarosa en el medio de elongación sobre el crecimiento y la supervivencia de yemas de la variedad de albaricoquero 'Helena' después de 6 semanas de cultivo. Las barras verticales indican los errores estándar. | 135 |
| Figura IV. 5. Efecto de la concentración de manosa combinada con 20 mg/L de sacarosa sobre el enraizamiento de la variedad 'Helena'. Las barras verticales indican los errores estándar. | 135 |
| Figura IV. 6. Brotes de líneas transformadas y control no transformado después de 12 semanas en medio selectivo con manosa. | 136 |
| Figura IV. 7. Detección del producto de PCR (532 pb) del gen <i>pmi</i> en líneas obtenidas tras la transformación con EHA105/pNOV2819 y cultivo en medio con manosa. Planta no transformada como control negativo (C-), plásmido como control positivo (C+), marcador (M). | 138 |
| Figura IV. 8. Ensayo con rojo de clorofenol. Hojas de albaricoquero control correspondientes a material no transformado en comparación con hojas de líneas transformadas con el gen <i>pmi</i> . C-: pocillo sin material vegetal. | 139 |

