



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i Medi Natural**

**Respuesta cultural y morfogénica de  
diferentes cultivares de melón “piel de sapo”  
y primeros resultados en torno a su  
transformación genética**

**Josep Garcia Llorens**

València, Junio 2018

**Tutores:**

Dr. Vicente Moreno Ferrero  
Dr. Benito José Pineda Chaza

**Director experimental:**

Carlos Ribelles Alfonso

# RESUMEN

---

El melón es una de las especies hortícolas de mayor relevancia económica. Los cultivares Piel de Sapo, oriundos de la península, son de los más solicitados y apreciados por los consumidores a nivel estatal. El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales proporciona una amplia gama de aplicaciones en la producción y mejora genética de muchas especies cultivadas. No obstante, las diferentes aplicaciones que se derivan del cultivo *in vitro* requieren del desarrollo de métodos que permitan la regeneración de plantas a partir de explantes o de protoplastos. En melón, la mayor parte de los estudios de cultivo *in vitro* se han realizado con la variedad *Cantaloup*, y son muy escasos los que se han llevado a cabo con cultivares Piel de Sapo. En este trabajo de investigación se ha querido avanzar en el conocimiento de los requerimientos culturales y morfogenéticos de diferentes cultivares de melón Piel de Sapo. Los experimentos realizados han permitido identificar el tipo de explante más adecuado para obtener una buena calidad de la respuesta morfogenética. Asimismo, los estudios con diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento y métodos de cultivo han posibilitado determinar qué condiciones pueden ser las más adecuadas para la regeneración de plantas. En conjunto, los resultados nos han permitido categorizar los cultivares sobre la base de su respuesta morfogenética *in vitro*. Por último, se ha podido comprobar que las mejores condiciones de cultivo aplicadas a un método de transformación genética hacen factible la obtención de plantas transgénicas con una elevada eficacia.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*; melón Piel de Sapo; morfogénesis; regeneración; transformación genética.

# RESUM

---

El meló és una de las espècies hortícoles de major rellevància econòmica. Els cultivars de *Meló de tot l'any*, oriünds de la península, són dels més sol·licitats i apreciats pels consumidors a nivell estatal. El cultiu *in vitro* de teixits vegetals proporciona una ampla gama d'aplicacions en la producció i millora genètica de moltes espècies cultivades. No obstant, les diferents aplicacions que deriven del cultiu *in vitro* requereixen del desenvolupament de mètodes que permeten la regeneració de plantes a partir d'explants o de protoplasts. En meló, la major part dels estudis de cultiu *in vitro* s'han realitzat en la varietat *Cantaloup*, i són molt escassos els que s'han portat a terme amb cultivars *de tot l'any*. En aquest treball d'investigació, s'ha volgut avançar en el coneixement dels requeriments culturals i morfogenètics de diferents cultivars de *meló de tot l'any*. Els experiments realitzats han permés identificar el tipus d'explants més adequat per a obtindre una bona qualitat de la resposta morfogenètica. Així mateix, els estudis amb diferents combinacions de reguladors del creixement i mètodes de cultiu han possibilitat determinar quines condicions poden ser les més adequades per a la regeneració de plantes. En conjunt, els resultats ens han permés categoritzar els cultivars sobre la base de la seua resposta morfogenètica *in vitro*. Per últim, s'ha pogut comprovar que les millors condicions de cultiu aplicades a un mètode de transformació genètica fan factible l'obtenció de plantes transgèniques amb una elevada eficàcia.

Paraules clau: Cultiu in vitro; meló de tot l'any; morfogènesi; regeneració; transformació genètica.

# ABSTRACT

---

Melon is one of the horticultural species of most economic relevance. Christmas melon cultivars, native to the Iberian peninsula, are among the most requested and appreciated by consumers at the Spanish state level. The *in vitro* culture of plant tissues provides a wide range of applications in the production and genetic improvement of many cultivated species. However, the different applications that are derived from the *in vitro* culture require the development of methods that allow the regeneration of plants from explants or protoplasts. In melon, most of the *in vitro* culture studies have been carried out with the *Cantaloup* variety, and very few have been carried out with Christmas melon cultivars. In this research work it has been wanted to advance in the knowledge of the cultural and morphogenetic requirements of different Christmas melon cultivars. The experiments carried out have made it possible to identify the type of explants most suitable for obtaining a good quality of the morphogenetic response. Also, studies with different combinations of growth regulators and culture methods have made it possible to determine which conditions may be the most suitable for plant regeneration. Overall, the results allowed us to categorize the cultivars based on their *in vitro* morphogenetic response. Finally, it has been proven that the best growing conditions applied to a genetic transformation method make it possible to obtain transgenic plants with high efficiency.

Keywords: *In vitro* Culture; Christmas melon cultivars; morphogenesis; regeneration; Genetic transformation.

# AGRAÏMENTS

---

M'agradaria donar les gràcies a totes les persones que han contribuït d'una manera o altra a fer d'aquest anys d'universitat, uns anys plens de vivències i bons moments. Als amics fets i per fer, tant de Castelló com de València i a la meua família per ajudar i cobrir totes les necessitats. Aquest treball no haguera sigut possible tampoc sense la ajuda de tot l'equip del laboratori en especial menció a Begoña i Carlos per fer-se càrrec de la supervisió durant la part experimental i a Benito per la seua dedicació en la posta a punt d'aquesta memòria. També mencionar a Vicente per obrir-me les portes del laboratori i poder descobrir així aquest apassionant món. Finalment, m'agradaria agrair l'ajuda i el suport a Rocío per estar aguantant i animant durant la realització del projecte i a Teresa per ser la companya de laboratori i compartir les tasques i vivències d'aquest tfg.

*M'agradaria escriure en una andana,  
entre els canyissos on estan les cebes,  
entre els fesols i les panolles, entre  
l'olor calent de les garrofes. Pense  
les carabasses al balcó, com pengen  
els tomàquets i els alls i les pebreres;  
pense els melons per a cap d'any penjats  
amb un cordell en un biga. Veig  
la teranyina desenvolupant  
un tema únic de cristall i música,  
i resulte llavors l'home feliç,  
encara que m'estiga lleig de dir-ho.*

*-Vicent Andrés Estellés, Jocs prohibits-*

# Índice general

---

Índice.....	I
Índice de figuras.....	V
Índice de tablas.....	VII

## Índice

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1. Melón: origen, taxonomía y descripción morfológica .....	1
1.2. Importancia económica .....	2
1.3. Cultivo <i>in vitro</i> y regeneración de plantas de melón .....	3
1.4. Obtención de plantas transgénicas de melón .....	5
<b>2. Antecedentes y objetivos.....</b>	<b>7</b>
<b>3. Materiales y Métodos.....</b>	<b>9</b>
3.1. Material vegetal .....	9
3.2. Técnicas básicas de cultivo <i>in vitro</i> .....	9

3.2.1. Esterilización .....	9
3.2.2. Germinación y obtención de plántulas axénicas .....	9
3.2.3. Extracción y cultivo de explantes primarios .....	10
3.2.4. Regeneración de plantas a partir de explantes primarios .....	10
3.2.5. Determinación del nivel de ploidía de las plantas regeneradas mediante citometría de flujo .....	10
3.3. Nomenclatura y composición de los medios de cultivo .....	11
3.3.1. Nomenclatura de los medios de cultivo .....	11
3.3.2. Composición de los medios de cultivo .....	11
3.4. Variables evaluadas en los experimentos de morfogénesis .....	11
3.5. Tratamiento estadístico .....	12
3.6. Transformación genética.....	12
3.6.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> : cepa bacteriana, plásmido y genes incluidos en el T-DNA .....	12
3.6.2. Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	12
3.6.3. Método de transformación: selección y regeneración de plantas transgénicas .....	13
3.6.4. Enraizamiento de los brotes transgénicos .....	13
<b>4. Resultados.....</b>	
4.1. Efecto del tipo de explante de la combinación de reguladores de crecimiento sobre la respuesta morfogénica y la regeneración de plantas en distintas líneas de melón piel de sapo .....	15
4.1.1. Efecto del tipo de explante y de la combinación de reguladores de crecimiento sobre la inducción del callo organogénico .....	16
4.1.2. Efecto del tipo de explante y de la combinación de reguladores de crecimiento sobre el desarrollo de las estructuras organogénicas.....	17
4.1.3. Efecto del tipo de explante y de la combinación de reguladores de crecimiento sobre la regeneración de plantas .....	18
4.2. Efecto del tipo de explante y del método de cultivo sobre la respuesta morfogénica y la regeneración de plantas en distintas líneas de melón piel de sapo.....	21
4.2.1. Efecto del tipo de explante y del método de cultivo sobre la inducción del callo organogénico .....	22
4.2.2. Efecto del tipo de explante y del método de cultivo sobre el desarrollo de las estructuras organogénicas .....	24

4.2.3. Efecto del tipo de explante y del método de cultivo sobre la regeneración de plantas .....	25
4.3. Transformación genética en la variedad de melón piel de sapo “ <i>Pipa de Oro</i> ”.	26
<b>5. Discusión .....</b>	<b>29</b>
5.1. Efecto del tipo de explante a la hora de obtener respuesta morfogénica ....	
5.2. Efecto de la composición del medio de cultivo a la hora de obtener respuesta morfogénica .....	29
5.3. Efecto del método de cultivo a la hora de obtener respuesta morfogénica..	31
5.4. Efecto de los diferentes requerimientos culturales y morfogénicos a la hora de obtener plantas transgénicas .....	32
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>35</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>37</b>



## Índice de figuras

Figura 1	Algunos detalles morfológicos de la planta de melón. a) Porte rastrero de una planta de melón joven. b) Zarcillos. c) Flor masculina. d) flor femenina. e) fruto.....	2
Figura 2	Índices CD y CO utilizados para estimar el crecimiento desorganizado y organizado de los callos.....	12
Figura 3	Detalle de los explantes que se utilizaron en los experimentos de morfogénesis. De cada cotiledón (2 cotiledones por plántula) se extraen 2 explantes distales y dos proximales.....	15
Figura 4	Estadios ontogénicos de las plántulas de melón piel de sapo. De izquierda a derecha: estadio ontogénico 0 (i.e. embrión previo a la germinación), 2-3 (cotiledones de color crema-verdoso), 3-4 (cotiledones de color verdoso) y 4-5 (cotiledones verde claro).....	16
Figura 5	Regeneración de plantas de melón a partir de explantes de cotiledón. Fase 1: inducción del callo organogénico (se transfiere sólo la zona que exhibe respuesta organogénica, desechando el resto del explante). Fase 2: desarrollo del callo organogénico. Fase 3: regeneración de plantas. Los brotes individualizables se transfieren a medio de clonación para su enraizamiento y desarrollo.....	16
Figura 6	Presunta planta transgénica y verificación de la naturaleza transgénica mediante la visualización de la expresión GFP en raíces ...	27



## Índice de tablas

Tabla 1	Eficacias de transformación genética en diferentes cultivares de melón.....	5
Tabla 2	Inducción de morfogénesis a partir de explantes de cotiledón proximal de diferentes líneas de melón piel de sapo.....	17
Tabla 3	Inducción de morfogénesis a partir de explantes de cotiledón distal de diferentes líneas de melón piel de sapo .....	17
Tabla 4	Morfogénesis en callos procedentes de explantes de cotiledón proximal de diferentes líneas de melón piel de sapo.....	18
Tabla 5	Morfogénesis en callos procedentes de explantes de cotiledón distal de diferentes líneas de melón piel de sapo .....	19
Tabla 6	Regeneración de planta a partir de callos procedentes de cotiledón proximal de diferentes líneas de melón piel de sapo. Porcentaje callos que desarrollan brotes, número de brotes que se pueden individualizar a partir de un callo y porcentaje de plantas diploides.....	20
Tabla 7	Regeneración de planta a partir de callos procedentes de cotiledón distal de diferentes líneas de melón piel de sapo. Porcentaje callos que desarrollan brotes, número de brotes que se pueden individualizar a partir de un callo y porcentaje de plantas diploides...	21
Tabla 8	Inducción de morfogénesis a partir de explantes de cotiledón proximal de diferentes líneas de melón piel de sapo .....	22
Tabla 9	Inducción de morfogénesis a partir de explantes de cotiledón distal de diferentes líneas de melón piel de sapo .....	22
Tabla 10	Morfogénesis en callos procedentes de explantes de cotiledón proximal de diferentes líneas de melón piel de sapo .....	23
Tabla 11	Morfogénesis en callos procedentes de explantes de cotiledón distal de diferentes líneas de melón piel de sapo .....	24
Tabla 12	Regeneración de planta a partir de callos procedentes de cotiledón proximal de diferentes líneas de melón piel de sapo. Porcentaje callos que desarrollan brotes, número de brotes que se pueden individualizar a partir de un callo y porcentaje de plantas diploides.....	24

Tabla 13	Regeneración de planta a partir de callos procedentes de cotiledón distal de diferentes líneas de melón piel de sapo. Porcentaje callos que desarrollan brotes, número de brotes que se pueden individualizar a partir de un callo y porcentaje de plantas diploides.....	25
Tabla 14	Eficacia de transformación en melón piel de sapo ( <i>"Pipa de Oro"</i> ) utilizando explantes de cotiledón como material de partida.....	26



# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. Melón: origen, taxonomía y descripción morfológica

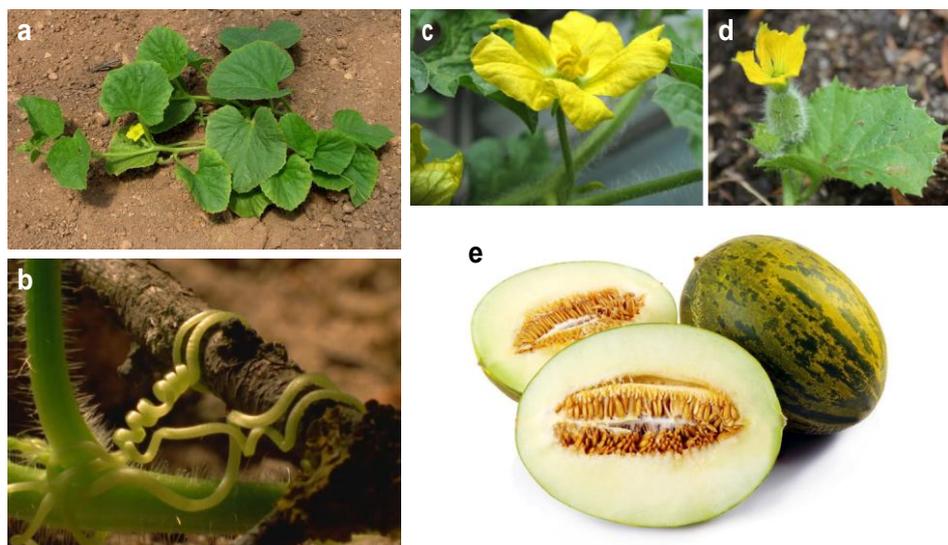
La procedencia del melón se encuentra envuelta en un misterio. Pese a que no se conoce con certeza, parece ser que el cultivo se inició en el este y sudeste del continente asiático extendiéndose seguidamente a países cálidos. No obstante, otras hipótesis lo sitúan en África (Harlan *et al*, 1997; Trentini, 1998; Silberstein *et al*, 1999), donde existen especies similares. La expansión de esta especie por Europa tuvo lugar a través del Imperio Romano, aunque no se introdujo en la península ibérica hasta la conquista musulmana (Mármol, 2008).

La primera descripción del melón la realizó Linneo en *Species Plantarum* (1753) donde describió cinco especies de melones cultivados (Kirkbride, 1993; Kerje, 2003). Por lo que respecta a su taxonomía, la familia de las Cucurbitáceas comprende 118 géneros y 825 especies (Jeffrey, 1990). Entre estas especies cabe destacar la calabaza (*Cucúrbita Pepo*), la sandía (*Citrullus lanatus Thunb.*), el pepino (*Cucumis sativus L.*) y el melón (*Cucumis melo L.*), que son las de mayor relevancia económica (Esquinas-Alcázar y Gulick, 1983).

El melón es una planta anual herbácea que exhibe un porte rastrero o trepador merced a los zarcillos caulinares sencillos (figuras 1a y 1b) que emite a través de las axilas de las hojas (Mármol, 2007). La parte aérea de la planta consta de un tallo principal sarmentoso de color verde, flexible y ramificado recubierto de formaciones pilosas. Es de sección variable pentagonal, rectangular o circular en plantas jóvenes (Mármol, 2008). Puede medir de 3-4 metros de longitud y ramifica a corta distancia del suelo produciendo ramas laterales (Zapata *et al*, 1989). Las hojas son simples y lobuladas, alternas con pecíolo largo de 10-15 cm y con los bordes dentados de forma y tamaño variables (figura 1a). Al igual que el tallo, las hojas también desarrollan formaciones pilosas especialmente en el envés. A partir de la axila de cada hoja pueden brotar nuevos tallos, lo que promueve la ramificación de la planta.

El sistema radicular, de rápido desarrollo, es abundante y ramificado, y exhibe su mayor densidad a una profundidad de 30-40 cm del suelo (Zapata *et al*, 1989). En algunas especies puede llegar a ser muy profuso pudiendo superar en muchos casos el metro de profundidad. Las flores son solitarias, pedunculadas y axilares con pétalos de color amarillento. Las plantas de melón pueden desarrollar tres tipos de flores: masculinas, femeninas y hermafroditas (figuras 1c y 1d). Las primeras flores que se desarrollan suelen ser masculinas y se encuentran generalmente en los nudos más bajos del tallo. Las femeninas y hermafroditas aparecen más tarde, en los nudos de las ramificaciones secundarias o terciarias, y en ocasiones suelen ir acompañadas de flores masculinas.

La proporción de flores masculinas depende en gran medida de factores climáticos, siendo la luz y la temperatura los más determinantes (Zapata *et al*, 1989).



**Figura 1.** Algunos detalles morfológicos de la planta de melón. a) Porte rastrero de una planta de meón joven. b) Zarcillos. c) Flor masculina. d) flor femenina. e) fruto.

El fruto es una baya pepónide (Chaux y Foury, 1992). Su placenta es carnosa, unilocular y de color variable, y se encuentra recubierta por una corteza o epicarpio quebradizo que presenta morfologías diversas: ovalada, elíptica, redonda, ovoide... (Mármol, 2007). La pulpa puede ser blanquecina, verdosa, asalmonada o anaranjada, y en su interior se encuentra la cavidad placentaria en la que ubican las semillas (Baixauli *et al*, 2008) (figura 1e). Las semillas de melón son fusiformes, aplastadas, lisas y de color amarillento o blanquecino, y se pueden encontrar entre 200 y 600 semillas por fruto (Japón, 1981). La facultad germinativa dura entre 4-6 años y el porcentaje de germinación oscila entre el 70-80 % (Tamaro, 1981).

## 1.2. Importancia económica

En la actualidad, el melón es la cuarta especie hortícola más cultivada en España por detrás del tomate, la cebolla y el pimiento. Las comunidades autónomas en las que se concentra su producción son Castilla la Mancha, Murcia, Andalucía, Extremadura y la Comunidad Valenciana. Teniendo en cuenta que las condiciones requeridas para su cultivo se cumplen en numerosos países, el melón es una especie ampliamente distribuida. A lo largo de los últimos años, más de la mitad de la producción mundial se genera en Asia, y más concretamente en China, con una producción unos 14 millones de toneladas (<http://faostat.fao.org>). Los últimos datos disponibles (2014) sitúan a España en el octavo puesto con una producción de 750.151 toneladas, siendo el país más importante de la Unión Europea. Además, y por lo que respecta a las exportaciones, España fue en 2012 el líder en el ranking mundial con 376.103 toneladas, siendo Francia, Alemania, Países Bajos y Portugal los países receptores de mayor relevancia. Este dato refleja la importancia económica de esta especie para nuestro país y la enorme demanda por parte del consumidor, tanto nacional como del exterior.

### 1.3. Cultivo *in vitro* y regeneración de plantas de melón

La morfogénesis es el proceso que conduce a la regeneración de plantas a partir de células cultivadas *in vitro*. Este proceso es el resultado de la división y diferenciación de células organizadas, con patrones definidos, y, básicamente, depende de la actividad y expresión de determinados genes (Handro & Floch, 1990). La regeneración de plantas *in vitro* se puede verificar a través de dos vías: la embriogénesis somática, mediante la formación de estructuras de crecimiento bipolar (Mathews et al, 1993) y la organogénesis, mediante la formación de estructuras de crecimiento unipolar como yemas y brotes (Hossain et al, 1993).

Descrita por primera vez en 1958 en tejidos de zanahoria, la embriogénesis somática puede ser definida como el proceso de desarrollo a partir de células somáticas que conduce a la formación de estructuras de crecimiento bipolar semejantes a los embriones zigóticos. Dependiendo de la especie, se han empleado diversos tipos de explantes para la obtención de embriones somáticos. Así, por ejemplo en melón se han obtenido embriones somáticos a partir de explantes de cotiledón (Moreno et al, 1985; Tabei et al, 1991; Gray et al., 1993; Nuñez-Palenius et al., 2008; Melara & Gatica Arias, 2009), hipocótilo (Moreno et al, 1985; Tabei et al, 1991), hoja (Tabei et al., 1991) y pecíolo (Tabei et al, 1991), así como a partir de embriones zigóticos (Ezura & Ooswa, 1994) y diversos tipos de protoplastos (García-Sogo, 1990; Li et al, 1990; Debejaujon & Branchard, 1992).

Por lo que respecta a la organogénesis, consiste en el desarrollo de estructuras de crecimiento unipolar, es decir yemas o meristemos radicales a partir de explantes o, alternativamente, a partir de callos procedentes de explantes o protoplastos (Litz & Jarret, 1991). La separación de un fragmento de tejido de una planta y su incubación en un medio de cultivo en el que existen diversos nutrientes y reguladores del crecimiento, trae como consecuencia la pérdida del control que unas células generan sobre otras en el organismo completo. Esta pérdida de los controles que reprimen la división en células especializadas permite que las células retomen la capacidad de división y se produzca una división parcial. En este nuevo estado, las células pueden expresar nuevos patrones de diferenciación conduciendo a la regeneración de plantas enteras (Handro & Floh, 1990). Según Fakhrai & Fakhrai (1991), la organogénesis *in vitro* es altamente dependiente de la interacción entre los reguladores de crecimiento endógenos y los que se añaden de forma exógena al medio de cultivo. Generalmente, para lograr la respuesta organogénica en un genotipo dado de una especie concreta hay que ir modificando, por ensayo y error, el tipo y concentración de los reguladores de crecimiento, así como otros componentes del medio, hasta encontrar una combinación equilibrada. Las interacciones que se producen entre todos estos componentes son frecuentemente complejas, y habitualmente se pueden conseguir resultados óptimos empleando diferentes combinaciones (Da Silva, 1999).

En melón, se ha descrito la regeneración de plantas a través de la vía organogénesis a partir de segmentos de cotiledón de melón (Moreno et al, 1985; Orts et al, 1986, 1987; Trulson & Shahin, 1986; Mackay et al, 1989; Niedz et al, 1989; García-Sogo, 1990; Grisvard et al, 1990; Bordas et al, 1991; Chee, 1991a; Tabei et al, 1991; Fassuliotis & Nelson, 1992; Jain & More, 1992; Gray et al, 1993; Adelberg et al, 1994; Ficcadenti & Rotino, 1995; Molina & Nuez, 1995b; Nora et al, 2001; Mohiuddin et al, 2005; Núñez-Palenius et al, 2006; Núñez-Palenius et al, 2007; Rhimi et al, 2007; Melara & Gatica, 2009), segmentos de hipocotilo (Moreno et al, 1985; García-Sogo, 1990; Tabei et al, 1991), segmentos de hoja (Orts et al, 1986; García-Sogo, 1990; Punja et al, 1990a; Tabei et al, 1991; Bordas et al, 1991; Molina & Nuez, 1996; Yadav et al, 1996), segmentos de raíz (Katha et al,

1994), segmentos de peciolo (Punja et al, 1990a; Tabei et al, 1991), segmentos de tallo (García-Sogo, 1990; Jain & More, 1992); e incluso a partir de ápices caulinares (Adelberg et al, 1994). Además, en esta especie se ha conseguido la regeneración de plantas vía organogénesis a partir de protoplastos (Moreno et al, 1985; García-Sogo, 1990; Li et al, 1990; Debeaujon & Branchard, 1992).

Como en otras muchas especies, la regeneración de plantas vía organogénesis en las cucurbitáceas depende de muchos factores. En general, los factores más estudiados han sido el origen del material vegetal, y el tipo y concentración de los reguladores del crecimiento. Sin embargo, los resultados obtenidos en algunos trabajos indican que, aparte de estos factores, quizá convendría estudiar otros que habitualmente no se consideran. Así por ejemplo, García-Sogo (1990) observó que la adición de concentraciones relativamente altas de sulfato de cobre (1 mg/l) al medio de cultivo conducía a un notable aumento de la respuesta organogénica en callos procedentes tanto de explantes como de protoplastos de melón. Se ha comprobado que el sulfato de cobre induce un aumento en la actividad enzimática de la ascorbato oxidasa en callos derivados de tejidos de frutos de pepino (Sekiya et al, 1990) pero no resulta fácil entender la posible relación entre el aumento de esta actividad y la respuesta organogénica. Estos resultados indican que estamos lejos de entender los mecanismos que determinan la respuesta organogénica *in vitro*.

Por lo que respecta al tipo de explante, casi todos los autores están de acuerdo en que los segmentos de cotiledón son los explantes con mayor respuesta organogénica. Según Gambley & Dodd (1991), los cotiledones de plántulas jóvenes juegan un importante papel en el crecimiento de la planta ya que, en las primeras fases del desarrollo, actúan como fuente de sustratos orgánicos y/o fotoasimilados. Aparte de su papel en la nutrición, los cotiledones parecen tener también un papel regulador en la morfogénesis, con una posible función en la detección de la luz. En contraste con la anterior afirmación, Yadav et al (1996) describen que la producción de brotes a partir de hojas de melón es considerablemente mayor que cuando se emplean segmentos de cotiledón. El uso de hojas en vez de cotiledones puede ser ventajoso cuando la cantidad de semillas es limitada. Además, la tasa de variantes con cambios cromosómicos (concretamente de tipo poliploide) es menor cuando se emplean hojas que cuando se parte de segmentos de cotiledón (Moreno y Roig, 1990).

Aparte del tipo de material seleccionado, hay otros factores que pueden ser decisivos, o al menos relevantes, a la hora de lograr la respuesta organogénica. Entre ellos, cabría citar el genotipo (Orts et al, 1987; Niedz et al, 1989; Yadav et al, 1996), la edad del material de partida (Niedz et al, 1989; Compton & Gray, 1994; Yadav et al, 1996), el tipo y concentración de carbohidratos (Kim & Janick, 1989; Lou et al, 1996), la intensidad luminosa (Niedz et al, 1989; Gambley & Dodd, 1991) o la temperatura, (Niedz et al, 1989).

El desarrollo de protocolos para la regeneración de plantas a partir de explantes es una condición necesaria para poder aplicar diferentes técnicas de cultivo *in vitro*. Así, la disponibilidad de protocolos de regeneración de plantas en cucurbitáceas ha permitido realizar experimentos de transformación genética (Niedz et al, 1989; Fang & Grumet, 1990; Gambley & Dodd, 1990; Punja et al, 1990a; Bordas et al, 1991; Gaba & Antignus, 1992; Gonsalves et al, 1994; Zhang et al, 1994; Arce-Ochoa et al, 1995; Yadav et al, 1996; Nora et al, 2001; Vasudevan et al, 2002; Yin et al, 2004; Burza et al, 2006; Nuñez-Paleniús et al, 2006; Vasudevan et al, 2007; Nuñez-Paleniús et al, 2007; Rhimi et al, 2007; Nanasato et al, 2012) y obtener diversos tipos de variantes somaclonales (Moreno & Roig, 1990).

#### 1.4. Obtención de plantas transgénicas de melón

La transformación genética es una tecnología que proporciona variabilidad genética sin que se produzca la alteración del fondo genético de la planta en cuestión. Mediante esta tecnología se pueden transferir genes procedentes de cualquier organismo, o modificar los patrones de expresión de genes endógenos. Además, es una herramienta muy útil en estudios básicos encaminados a conocer y/o profundizar en la función génica. Por lo que respecta a aplicaciones, la transformación genética se ha empleado para introducir resistencia a virus, insectos, hongos y bacterias; transferir tolerancia a estreses abióticos o resistencia a herbicidas, y también para llevar a cabo modificaciones genéticas relacionadas con la calidad organoléptica y nutritiva.

En melón, el método de transformación genética más empleado ha sido el co-cultivo de explantes primarios con *Agrobacterium tumefaciens*. Esto se debe a que se trata de una estrategia de transformación metodológicamente simple, eficiente y poco costosa. Además, a diferencia de lo que ocurre con otras estrategias de transformación genética (i.e. biobalística), las plantas transgénicas obtenidas vía *Agrobacterium* suelen integrar en su genoma un escaso número de copias perfectas del transgén. El procedimiento que se utiliza es el cocultivo de explantes (i.e. un fragmento de tejido vegetal) con cepas desarmadas que portan un T-DNA modificado. Una vez se ha producido la transferencia e integración del T-DNA en el genoma de la planta, se lleva a cabo la selección de las células transformadas en medios de cultivo suplementados con un agente selectivo. En este contexto, aunque la transformación genética se ha convertido en una técnica habitual para algunos laboratorios, su aplicación a genotipos concretos (i.e. relevantes desde un punto de vista agronómico o de mejora) dista de ser rutinaria debido a que la respuesta morfogénica *in vitro* es enormemente dependiente del genotipo.

El primer trabajo de transformación genética de melón mediante cocultivo de explantes con *Agrobacterium tumefaciens* fue realizado por Ben Tahar y De Both (1988). En este trabajo, al igual que en otros trabajos realizados posteriormente (Fan y Grumet, 1990; Dong et al, 1991; Toyoda et al, 1991; Bordas et al, 1993; Vallés y Lasa, 1994), se pretendía poner a punto un protocolo de transformación genética. Fan y Grumet (1993) fueron los primeros en transferir un gen de interés agronómico en melón, el gen de la proteína de cubierta del virus del mosaico amarillo de la calabaza (ZYMV). Los autores del trabajo obtuvieron plantas transgénicas inmunes a la infección de este patógeno.

Las frecuencias de transformación genética de melón varían mucho dependiendo del cultivar, pero en general suelen ser bastante bajas si se comparan con las de otras especies (tabla 1). Según García-Almodóvar et al (2017), melón está considerada como una especie recalcitrante para la transformación genética. Las bajas eficacias de transformación genética obtenidas hasta la fecha podrían estar relacionadas con la escasa competencia para la transformación genética, como afirmaron García-Almodóvar et al (2017), o con el elevado porcentaje de escapes, es decir, de falsos transgénicos (plantas capaces de crecer en el medio con agente selectivo pero que no han integrado el T-DNA), un problema muy común en melón. Sin embargo y en nuestra opinión, los problemas a la hora de conseguir plantas transgénicas de melón estriban en la ausencia de protocolos eficientes y reproducibles de morfogénesis, y en su adecuación para llevar a cabo los experimentos de transformación genética. Sobre la base de la problemática existente, el principal objetivo del presente trabajo de investigación ha sido la evaluación de la respuesta morfogénica

en explantes de cotiledón de melón y el desarrollo de métodos de regeneración potencialmente útiles en experimentos de transformación.

**Tabla 1.** Eficacias de transformación genética en diferentes cultivares de melón.

<b>Cultivar</b>	<b>E.T.</b>	<b>Autores (año)</b>
Védratais	2,4%	Guis et al (2000)
Gaúcho	3,0%	Nora et al (2001)
Kirkalagç	1,6%	Yalcin-Mendi et al (2004)
Noi Yarok	1,0%	Curuk et al (2005)
Hetao	4,3%	Hao et al (2011)
Védratais	3,0%	Chovelon et al (2011)
Cantaloupe	0,3%	Ren et al (2012)
Silver Light	0,8%	Bezirganoglu et al (2014)
Charentais	0,2-1,3%	García-Almodóvar et al (2017)
Galia	1,6%	García-Almodóvar et al (2017)

Nota: Trabajos científicos publicados entre 2000 y 2017.

## **2. Antecedentes y Objetivos**

Para abordar con éxito las técnicas de cultivo *in vitro* aplicadas a la mejora vegetal es necesario disponer de métodos que permitan la regeneración eficiente y reproducible de plantas a partir del material de partida. Como resultado de los exhaustivos estudios sobre morfogénesis en melón, nuestro grupo había desarrollado métodos reproducibles que posibilitaban la regeneración de plantas a partir de callos procedentes de explantes primarios en diferentes cultivares de melón (García-Sogo, 1990; Bordas et al, 1997; Da Silva, 1999; Albalat, 2016). En esos estudios se había podido constatar que la adición de sulfato de cobre a concentraciones muy superiores a las habitualmente utilizadas (e.g. 1 mg/l) tiene un efecto muy favorable sobre la respuesta morfogenética. En este trabajo hemos querido avanzar en el conocimiento de los requerimientos culturales y morfogenéticos de diferentes cultivares “Piel de Sapo” en aras de seleccionar los que puedan resultar más adecuados para abordar algunas de las aplicaciones que ofrece el Cultivo in Vitro de Células y Tejidos Vegetales, como por ejemplo, la transformación genética.

En este marco general, los objetivos concretos planteados para este Trabajo Final de Grado han sido los siguientes:

1. Evaluar el efecto del tipo de explante y de la combinación de reguladores de crecimiento sobre la respuesta morfogenética y la regeneración de plantas en distintas líneas de melón piel de sapo
2. Evaluar el efecto del tipo de explante y del método de cultivo sobre la respuesta morfogenética y la regeneración de plantas en distintas líneas de melón piel de sapo.
3. Evaluar la eficacia de transformación genética en uno de los cultivares de melón piel de sapo.



## **3. Materiales y Métodos**

---

### **3.1. Material vegetal**

Como material vegetal de partida se han utilizado semillas de diferentes cultivares de melón piel de sapo. En concreto, los cultivares J310-0 (PS1), A438-0 (PS2), C61'(PS3), CH-C20 (PS4), J730-0 (PS6), SAA15 LO982-0 (PS7), proporcionadas por el COMAV (Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana). Los frutos de estos cultivares suelen ser de morfología ovalada, tamaño medio grande, piel verde tenue moteada y pulpa crujiente de color blanquecino y con un alto contenido en azúcares.

### **3.2. Técnicas básicas de cultivo *in vitro***

#### **3.2.1. Esterilización**

Las plántulas axénicas se obtienen a partir de semillas que, previamente, han pasado por un proceso de esterilización. Las semillas se introducen en una solución diluida al 10% de ácido clorhídrico para facilitar la eliminación de la testa con la ayuda de unas pinzas. Las semillas desprovistas de testa se esterilizan superficialmente por inmersión, durante 30 minutos, en una solución de lejía comercial diluida al 50% (5% de hipoclorito de sodio) equivalente a 50 g de cloro activo por litro, a la cual se añaden 2 gotas de detergente 7X-0-matic (Flow Laboratories) que ayuda a romper la tensión superficial de los tejidos, mejorando el contacto entre el tejido y el esterilizante. A continuación, se elimina la solución desinfectante mediante tres lavados sucesivos (5, 10 y 15 minutos, respectivamente) con agua destilada estéril.

#### **3.2.2. Germinación y obtención de plántulas axénicas**

Las semillas esterilizadas (apartado 3.2.1) se transfieren a placas petri con dos capas de papel filtro saturado de agua destilada estéril. Las placas, selladas con parafilm, se mantienen en oscuridad a 28°C hasta la germinación de las semillas, periodo que oscila entre las 24 y 72 horas. Después de la nascencia, es decir, el momento en el que emerge la radícula, las semillas se transfieren directamente a recipientes de vidrio de 105 mm de altura x 95 mm de diámetro que contienen 50 ml de medio de cultivo MG. Este medio está compuesto por solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 20 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar bacteriológico europeo (Sumilab, s.l.). El pH del medio se ajusta a 5.7 con KOH y HCl antes de añadir el agente gelificante. Los medios de cultivo se esterilizan por calor húmedo en autoclave, a 115° C durante 30 minutos. El cultivo de las plántulas tiene lugar en una cámara de cultivo en condiciones de luz, temperatura y humedad controladas: fotoperiodo de 16 horas luz con una intensidad luminosa de 2000 luxes - equivalente a

$34 \pm E/m^2/s$  - suministrada por una fuente de luz fría y una temperatura/humedad relativa de  $26 \pm 2^\circ C / 40\%$  durante el periodo luminoso y  $22 \pm 2^\circ C / 70\%$  durante el periodo oscuro.

### **3.2.3. Extracción y cultivo de explantes primarios**

Entre los 2 y 3 días del inicio de la germinación se procede a la extracción de los explantes de cotiledón o hipocotilo. Típicamente, una vez separados los dos cotiledones de la plántula se eliminan los extremos y se divide en dos partes, la proximal (más cercana al ápice) y la distal (más alejada del ápice). Posteriormente, cada una de estas partes se divide en dos obteniéndose 4 explantes por cotiledón (i.e. 2 proximales y 2 distales), es decir, 8 explantes por genotipo individual. Una vez cortados, los explantes se cultivan con el envés en contacto con el medio de cultivo. Para el cultivo de estos explantes se utilizan placas petri (90 mm de diámetro x 30 mm de altura) con 30 ml de medio de cultivo que se sellan con parafilm. Las condiciones de incubación son las descritas en el apartado 3.2.2.

### **3.2.4. Regeneración de plantas a partir de explantes primarios**

#### *a) Inducción de organogénesis*

El medio de cultivo empleado para la inducción de organogénesis está compuesto por una solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 30 g/L de sacarosa, 10 m/L vitaminas SH (Shahin, 1985), 0,1 g/L de inositol y una combinación de reguladores de crecimiento (auxinas y citoquininas). En estos medios, las zonas de corte de los explantes dan lugar a la formación de callos que presentan zonas de color crema friables y/o compactas de color verde en las que se desarrollan yemas, yemas-ápice y brotes. En función del experimento se han empleado diferentes combinaciones de reguladores que serán descritas en el apartado 3.3.2.

#### *b) Enraizamiento de los brotes*

Los brotes elongados se separan del callo organogénico y se siembran en un medio de enraizamiento. Este medio está compuesto por solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 20 g/L de sacarosa, 0,1 g/L de inositol, 0,001 g/L de T-CIH y 1,0 mg/L de ácido indolbutírico para favorecer la emisión de raíces. El pH del medio se ajusta a 5.7 con KOH y HCl antes de añadir el agente gelificante. El medio de cultivo se esteriliza por calor húmedo en autoclave, a  $115^\circ C$  durante 30 minutos. Las primeras raíces suelen aparecer aproximadamente a los 7 días de la siembra. A los 30 días la planta suele tener un sistema radicular bien desarrollado, y la parte aérea presenta una yema caulinar y varias yemas axilares, a partir de las cuales se pueden obtener nuevas plantas mediante propagación por vía axilar. El tipo de recipiente que utilizamos (150 mm de altura x 60 mm de diámetro) favorece la elongación de entrenudos, lo que facilita la propagación clonal. Ésta se realiza a través del cultivo del brote terminal y las yemas axilares en el medio de clonación descrito anteriormente.

### **3.2.5. Determinación del nivel de ploidía de las plantas regeneradas mediante citometría de flujo**

El nivel de ploidía de las plantas se determina en fragmentos de hoja joven. El análisis se realiza mediante la cuantificación del contenido de ADN nuclear de las células según el método de Smulders et al. (1994). El tejido vegetal (un fragmento de cotiledón u hoja de aproximadamente  $1 \text{ cm}^2$ ) se trocea finamente con una cuchilla en una placa petri de 50 mm de diámetro. Se añaden 2 gotas de tampón de extracción de núcleos (Partec, Münster, Germany) y 800  $\mu\text{L}$  de una solución que contiene 1 mg/L de fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2-phenyl-indole) (DAPI staining solution,

Partec) cuya función es teñir el ADN. Tras resuspender la mezcla, se filtra a través de una malla de nylon de 50 µm. La suspensión de núcleos se hace circular por el circuito de microtubos de un analizador de ploidía (Partec PA-II Ploidy Analyser), equipado con una lámpara de mercurio que emite luz ultravioleta de 366nm. La corriente de núcleos en suspensión pasa por una cámara de cuarzo (conducto de 10 µm que no permite el paso simultáneo de dos unidades), donde es iluminada por una fuente de luz ultravioleta. Como consecuencia, el fluorocromo DAPI fijado al ADN emite una fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN del núcleo, que es reconocida y captada por un fotorreceptor. El sistema informático que lleva incorporado el citómetro convierte cada señal fluorescente en un punto sobre la pantalla que se sitúa en distintas posiciones de acuerdo con su intensidad. El gráfico resultante ordena los datos según el contenido nuclear de ADN en el eje de abscisas y contabiliza el número de núcleos de cada tipo en el eje de ordenadas.

### **3.3. Nomenclatura y composición de los medios de cultivo**

#### **3.3.1. Nomenclatura de los medios de cultivo**

En esta memoria se ha empleado la nomenclatura utilizada en publicaciones del grupo (i.e. Moreno et al., 1985 y publicaciones posteriores). La nomenclatura alude al tipo y concentración de reguladores de crecimiento del medio. Las primeras letras del medio refieren los reguladores empleados, en general una auxina y una citoquinina: (I) = ácido indolacético (IAA), (B) = 6-benciladenina (6 BA) y (Z) = Zeatina (Z). A las letras le siguen una serie de dígitos separados por una barra que indican la concentración del regulador en mg/L.

#### **3.3.2. Composición de los medios de cultivo**

Como se indica en el apartado 3.2.4., todos los medios de cultivo encaminados a inducir morfogénesis están compuestos por una solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 30 g/L de sacarosa, 10 mg/L vitaminas SH (Shahin, 1985), 0,1 g/L de inositol y 1 mg/L de sulfato de cobre. Para no ser repetitivos, denominaremos MB3 a esta composición que comparten todos los medios empleados en el trabajo. La composición de los reguladores de crecimiento en cada uno de los experimentos se describe a continuación.

Para evaluar el efecto del tipo de explante y la combinación de reguladores de crecimiento se emplearon los medios IB 0.2/2.5 e IBZ 0.2/1.0/1.0, es decir, medios que contienen MB3 y como reguladores 0,2 mg/L de ácido indolacético y 2,5 mg/L de 6-benciladenina, o 0,2 mg/L de ácido indolacético, 1 mg/L de 6-benciladenina y 1 mg/L de zeatina respectivamente.

Para evaluar el efecto del tipo de explante y el método de cultivo sólo se empleó el medio IB 0.2/2.5, es decir, MB3 suplementado con 0,2 mg/L de ácido indolacético y 2,5 mg/L de 6-benciladenina.

### **3.4. Variables evaluadas en los experimentos de morfogénesis**

En los experimentos se ha evaluado el número de explantes que desarrollan callos con yema, o callos en los que, en el momento de la lectura, habían desarrollado brotes. Para la exposición de los resultados se ha utilizado las fórmulas:  $[(n^{\circ} \text{ de explantes con yema} / n^{\circ} \text{ explantes totales}) \times 100]$  y  $[(n^{\circ} \text{ de callos con brote} / n^{\circ} \text{ callos con yema}) \times 100]$ . Además, se ha estimado el número medio de brotes que se pueden extraer de un callo y, a partir de un número significativo de plantas, se ha determinado el nivel de ploidía de los regenerantes:  $[(n^{\circ} \text{ de plantas diploides} / n^{\circ} \text{ plantas totales}) \times 100]$ . También se han utilizado dos índices: el índice de crecimiento desorganizado (ICD) que trata

de reflejar mediante un valor numérico el grado de crecimiento de callo desorganizado y el índice de crecimiento organogénico (ICO), que también mediante un valor numérico refleja el crecimiento de estructuras organogénicas. La estimación cualitativa de los índices CD y CO a cada uno de los explantes se resume en la figura 2. Para la exposición de los resultados se ha calculado la media  $\pm$  error estándar.



**Figura 2.** Índices CD y CO utilizados para estimar el crecimiento desorganizado y organizado de los callos.

### 3.5. Tratamiento estadístico

El tratamiento estadístico de las variables evaluadas se llevó a cabo comparando los valores medios mediante el test de Fisher (diferencia mínima significativa) con un nivel de probabilidad del 5%.

### 3.6. Transformación genética

Se ha empleado el protocolo descrito en Atarés et al (2011), utilizando como material de partida explantes de cotiledón en estadios ontogénicos 2 y 3.

#### 3.6.1. *Agrobacterium tumefaciens*: cepa bacteriana, plásmido y genes incluidos en el T-DNA

Se ha utilizado la cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 y el plásmido pBIN19. El T-DNA contiene el gen marcador *nptII* bajo el control del promotor nos con el terminador nos, y el gen GFP bajo el control del promotor 35S con el terminador nos.

#### 3.6.2. Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens* se cultiva a partir de un inóculo glicerinado (mantenido en congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) en medio sólido selectivo LB (Maniatis et al., 1982) suplementado con 100 mg/L de kanamicina y 40 mg/L de rifampicina. Las colonias que crecen en este medio se utilizan de inóculo para el cultivo en medio LB líquido que se realiza en matraces adecuados para el cultivo de bacterias. Los matraces se tapan con algodón grasoso (o hidrofóbico) para favorecer la aireación y se incuban en oscuridad a  $28^{\circ}\text{C}$  en agitador orbital a 230 r.p.m. El 'caldo nutritivo' utilizado para el crecimiento bacteriano está suplementado con 100 mg/L de kanamicina y 40 mg/L de rifampicina. El medio líquido para la inoculación de los explantes se suplementa con 200  $\mu\text{M}$  de acetosyringona (3'5'-dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone) esterilizada por microfiltración (Millipore 0,45  $\mu\text{m}$ ). La

acetosyringona es una sustancia inductora de los genes *vir* en cepas productoras de octopina de *Agrobacterium tumefaciens* (Stachel et al, 1985).

### 3.6.3. Método de transformación: selección y regeneración de plantas transgénicas

Los explantes de cotiledón de plántulas en estadios ontogénicos 2 y 3 se sumergen durante 10 minutos en el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*. Tras la inoculación, los explantes se secan sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de bacterias y, a continuación, se colocan sobre un medio de cocultivo con el envés en contacto con el medio. El medio de cocultivo es el IB 0.2/2.5 (apartado 3.3.2) al que se le añade 200 µM acetosyringona. Las bacterias se incuban con el tejido durante 24-48 horas en oscuridad a 28°C, periodo durante el cual se va a producir la transferencia del T-DNA. Para la eliminación de la bacteria, los explantes se tratan durante 10-12 minutos con una solución líquida ajustada a un pH de 5,7 que contiene solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 20 g/L de sacarosa, 0,1 g/L de inositol, 0,001 g/L de T-CIH y 500 mg/L de cefotaxima (antibiótico utilizado para detener el crecimiento bacteriano). Tras el lavado, los explantes se secan sobre papel de filtro y se colocan sobre el medio IB 0.2/2.5 que contiene, además de los componentes descritos para el medio (apartado 3.3.2), 100 mg/L de kanamicina (antibiótico utilizado para la selección de células transgénicas) y 300 mg/L de cefotaxima (antibiótico utilizado para detener el crecimiento bacteriano). Los medios de cultivo se esterilizan por calor húmedo en autoclave, a 115°C durante 30 minutos. La kanamicina y cefotaxima se esterilizan por microfiltración (Millipore 0.45 µm) y se añaden al medio de cultivo en la cabina de flujo (condiciones de asepsia). Los explantes se cultivan en la cámara de cultivo bajo las condiciones de incubación descritas en el apartado 3.2.2. La combinación de reguladores del medio IB 0.2/2.5 da lugar a la formación de callos que presentan zonas compactas de color verde en las que se desarrollan yemas, yemas-ápice y brotes. Se precisan varias transferencias al mismo medio selectivo para conseguir el desarrollo de ápices individualizables. Estas transferencias se realizan cada 2-3 semanas.

### 3.6.4. Enraizamiento de los brotes transgénicos

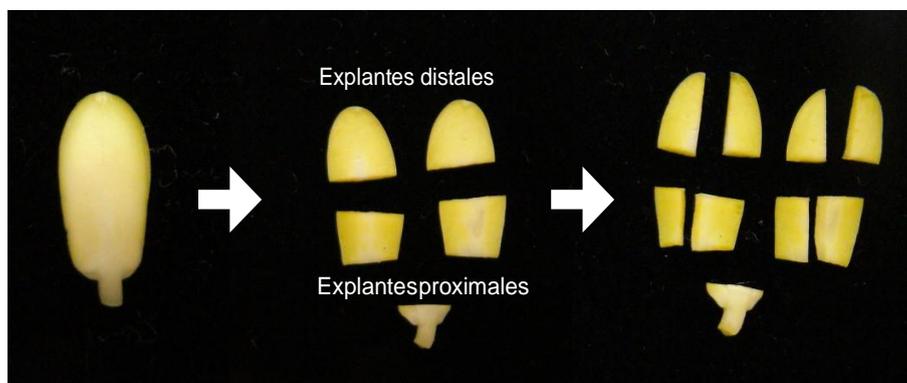
Los brotes elongados se separan del callo organogénico y se cultivan como se describe en el apartado 3.2.4.b. Durante la etapa de propagación clonal, una de las copias se utiliza para realizar el test de enraizamiento en medio selectivo (medio con 100 mg/L de kanamicina), lo que nos aporta una información muy fiable sobre el carácter transgénico de la planta en cuestión sobre la base de la expresión del gen marcador seleccionable *nptII*. Las condiciones de incubación para el enraizamiento de los brotes son las descritas en el apartado 3.2.2. El nivel de ploidía de las plantas transgénicas se analiza tal y como se describe en el apartado 3.2.5.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efecto del tipo de explante de la combinación de reguladores de crecimiento sobre la respuesta morfogénica y la regeneración de plantas en distintas líneas de melón piel de sapo

El objetivo del primer experimento fue evaluar el efecto del tipo de explante y de diferentes combinaciones de reguladores de desarrollo sobre la morfogénesis y la regeneración de plantas en distintas líneas de melón piel de sapo, a saber, J310-0 (PS1), A438-0 (PS2), C61'(PS3), CH-C20 (PS4), J730-0 (PS6), SAA15 LO982-0 (PS7), proporcionadas por el COMAV (Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana). Por lo que respecta al explante, se evaluó la respuesta en la región proximal y distal del cotiledón, empleando 4 explantes por cotiledón, 2 explantes proximales y dos distales (figura 3).



**Figura 3.** Detalle de los explantes que se utilizaron en los experimentos de morfogénesis. De cada cotiledón (2 cotiledones por plántula) se extraen 2 explantes distales y dos proximales.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio con cultivares de melón cantalupo indicaron que los estados ontogénicos 2 y 3 eran los de mejor respuesta morfogénica (Albalat, 2016). En el estadio ontogénico 2 los cotiledones son de color crema y en el estadio 3 comienzan a adquirir tonalidades verdosas (figura 4). Nosotros decidimos utilizar cotiledones en estos estadios ontogénicos para llevar a cabo nuestros experimentos.



**Figura 4.** Estadios ontogénicos de las plántulas de melón piel de sapo. De izquierda a derecha: estadio ontogénico 0 (i.e. embrión previo a la germinación), 2-3 (cotiledones de color crema-verdoso), 3-4 (cotiledones de color verdoso) y 4-5 (cotiledones verde claro).

Por otro lado, Albalat (2016) observó que, en melón cantalupo, los mejores resultados se obtenían en medios que contenían ácido indolacético y 6-benciladenina, o ácido indolacético y una combinación de 6-benciladenina y zeatina. Nosotros también decidimos emplear estas combinaciones de reguladores para evaluar la respuesta morfogénica en las líneas piel de sapo.

Los resultados se evaluaron en tres fases diferentes (figura 5): 1) *Fase de inducción del callo organogénico* a los 25 días del cultivo de los explante (apartado 4.1.1). Transcurrido ese periodo, se evaluó el crecimiento desorganizado y organizado del callo así como el porcentaje de explantes que habían dado respuesta morfogénica. Sólo los explantes que habían desarrollado estructuras organogénicas se transfirieron a medio fresco. 2) *Fase de desarrollo del callo organogénico* a los 25 días de haber subcultivado las estructuras organogénicas (apartado 4.1.2). Transcurrido ese periodo, se evaluó el crecimiento desorganizado y el desarrollo organogénico del callo, y los callos organogénicos se transfirieron a un medio de desarrollo y elongación de los brotes. 3) *Fase de regeneración de plantas* a los 25 días de haber transferido los callos organogénicos al medio de elongación (apartado 4.1.3). Transcurrido ese periodo, se evaluó el porcentaje de callos que habían desarrollado brotes individualizables y el número de brotes que se podían individualizar. Además, se analizó el nivel de ploidía de un número representativo de brotes, después de transferirlos a medio de clonación para su enraizamiento y desarrollo.



**Figura 5.** Regeneración de plantas de melón a partir de explantes de cotiledón. Fase 1: inducción del callo organogénico (se transfiere sólo la zona que exhibe respuesta organogénica, desechando el resto del explante). Fase 2: desarrollo del callo organogénico. Fase 3: regeneración de plantas. Los brotes individualizables se transfieren a medio de clonación para su enraizamiento y desarrollo.

#### 4.1.1. Efecto del tipo de explante y de la combinación de reguladores de crecimiento sobre la inducción del callo organogénico.

En cotiledón proximal, los mejores resultados se obtienen en las líneas PS2 y PS6, mientras que las líneas PS1 y PS7 son las que exhiben menor inducción de morfogénesis (tabla 2). Por lo que respecta al medio de cultivo y atendiendo a las dos líneas más morfogénicas (i.e. S2 y PS6), el medio con indolacético (I), benciladenina (B) y zeatina (Z) indujo mayor tasa de morfogénesis. En este sentido, el índice de crecimiento organogénico fue significativamente mayor en estas dos líneas. Conviene indicar que los explantes proximales de la línea PS6 cultivados en medio IBZ dieron lugar a un crecimiento desorganizado significativamente mayor (mayor ICD). Este crecimiento desorganizado podría repercutir negativamente sobre el desarrollo de las estructuras organizadas en los siguientes subcultivos (tabla 2). En el medio IB, el índice de crecimiento organizado en las líneas PS2 y PS6 fue menor aunque los resultados indicaban que en este medio de cultivo se obtenía una buena inducción (i.e. entorno a la mitad del explante exhibía respuesta). Además, el crecimiento desorganizado de la línea PS6 es significativamente menor en el medio IB, lo que podía favorecer el desarrollo de las estructuras organogénicas en los siguientes subcultivos (tabla 2). Considerando todas las líneas, y por lo que respecta a la inducción de crecimiento (tanto organizado como desorganizado), los resultados indican que el medio IBZ es mejor que el medio IB. Sin embargo, atendiendo al porcentaje de explantes que exhiben respuesta morfogénica, el medio IB sería más adecuado (tabla 2).

**Tabla 2.** Inducción de morfogénesis a partir de explantes de cotiledón proximal de diferentes líneas de melón piel de sapo

Línea	Índice de Crecimiento Desorganizado (ICD)		Índice de Crecimiento Organizado (ICO)		Porcentaje de explantes con respuesta organogénica	
	IB 0.2/2.5	IBZ 0.2/1.0/1.0	IB 0.2/2.5	IBZ 0.2/1.0/1.0	IB 0.2/2.5	IBZ 0.2/1.0/1.0
PS1	<b>1.67 ± 0.13*</b> (a)	1.13 ± 0.11 (b)	0.67 ± 0.09 (d)	0.50 ± 0.10 (c)	66.67 ± 9.83 (b)	50.00 ± 10.43 (b)
PS2	0.75 ± 0.09 (b)	0.75 ± 0.12 (c)	1.63 ± 0.10 (b)	<b>2.33 ± 0.12*</b> (a)	100.00 ± 0.00 (a)	100.00 ± 0.00 (a)
PS3	0.83 ± 0.17 (b)	1.33 ± 0.18* (b)	1.13 ± 0.07 (c)	1.29 ± 0.09 (b)	100.00 ± 0.00 (a)	95.83 ± 4.17 (a)
PS4	0.50 ± 0.17 (bc)	1.08 ± 0.12* (bc)	1.08 ± 0.06* (c)	1.54 ± 0.10 (b)	100.00 ± 0.00 (a)	100.00 ± 0.00 (a)
PS6	0.29 ± 0.11 (c)	<b>1.83 ± 0.09*</b> (a)	<b>1.92 ± 0.06</b> (a)	<b>2.04 ± 0.13*</b> (a)	100.00 ± 0.00 (a)	100.00 ± 0.00 (a)
PS7	0.67 ± 0.17 (bc)	<b>1.91 ± 0.15*</b> (a)	1.21 ± 0.08* (c)	0.63 ± 0.12 (c)	<b>100.00 ± 0.00*</b> (a)	58.33 ± 10.28 (b)

Nota: Para cada parámetro evaluado (i.e. ICD, ICO o % de explantes con respuesta organogénica), \* indica diferencias significativas en una línea en función del medio de cultivo empleado; y letras distintas indican diferencias significativas entre las líneas cultivadas en un mismo medio.

Los resultados obtenidos utilizando la región distal del cotiledón fueron muy similares a los obtenidos con explantes proximales. En este sentido, las líneas PS2 y PS6 fueron las de mejor inducción de respuesta organogénica mientras que las líneas PS1 y PS7 las que exhibían menor inducción (tabla 3). De nuevo, el medio IBZ indujo mayor tasa de morfogénesis aunque en este caso los resultados no fueron significativos desde un punto de vista estadístico. Además, al igual que ocurría con explantes proximales, el medio IBZ indujo un elevado crecimiento desorganizado en la línea PS6 respecto al crecimiento en el medio IB. Asimismo, en general, el medio IBZ fue

mejor que el medio IB para inducir crecimiento pero el medio IB parecía más adecuado si tenemos en cuenta el porcentaje de explantes que exhiben respuesta morfogenética (tabla 3).

**Tabla 3.** Inducción de morfogénesis a partir de explantes de cotiledón distal de diferentes líneas de melón piel de sapo

Línea	Índice de Crecimiento Desorganizado (ICD)		Índice de Crecimiento Organizado (ICO)		Porcentaje de explantes con respuesta organogénica	
	IB 0.2/2.5	IBZ 0.2/1.0/1.0	IB 0.2/2.5	IBZ 0.2/1.0/1.0	IB 0.2/2.5	IBZ 0.2/1.0/1.0
PS1	<b>1.42 ± 0.15</b> (a)	1.13 ± 0.09 (a)	0.79 ± 0.12* (c)	0.46 ± 0.10 (c)	70.83 ± 9.48 (b)	50.00 ± 10.42 (b)
PS2	0.75 ± 0.09 (b)	0.58 ± 0.12 (b)	<b>1.45 ± 0.12</b> (a)	<b>1.63 ± 0.10</b> (a)	100.00 ± 0.00 (a)	100.00 ± 0.00 (a)
PS3	0.79 ± 0.17 (b)	0.54 ± 0.10 (b)	1.08 ± 0.06 (b)	1.20 ± 0.10 (b)	100.00 ± 0.00 (a)	95.83 ± 4.17 (a)
PS4	0.79 ± 0.17 (b)	0.79 ± 0.12 (ab)	1.00 ± 0.00 (bc)	1.17 ± 0.10 (b)	100.00 ± 0.00 (a)	100.00 ± 0.00 (a)
PS6	0.29 ± 0.13 (c)	<b>0.95 ± 0.12*</b> (a)	<b>1.63 ± 0.10</b> (a)	<b>1.91 ± 0.12</b> (a)	100.00 ± 0.00 (a)	100.00 ± 0.00 (a)
PS7	0.75 ± 0.14 (b)	<b>1.08 ± 0.14</b> (a)	0.92 ± 0.06* (bc)	0.46 ± 0.10 (c)	<b>91.67 ± 5.76*</b> (a)	45.83 ± 10.39 (b)

Nota: Para cada parámetro evaluado (i.e. ICD, ICO o % de explantes con respuesta organogénica), \* indica diferencias significativas en una línea en función del medio de cultivo empleado; y letras distintas indican diferencias significativas entre las líneas cultivadas en un mismo medio.

Comparando ambos tipos de explante, la región proximal generó mayor cantidad de estructuras organogénicas que la región distal del cotiledón. Respecto a la primera fase del cultivo concluimos que las líneas PS2 y PS6 son las que proporcionan mejor calidad morfogenética. En estas líneas, ambos tipos de explante y cualquiera de los dos medios evaluados son adecuados a la hora de obtener estructuras organogénicas.

#### 4.1.2. Efecto del tipo de explante y de la combinación de reguladores de crecimiento sobre el desarrollo de las estructuras organogénicas.

La evaluación de la fase de desarrollo de las estructuras organogénicas generadas parecía indicar que el medio IB era, en general, más adecuado que el medio IBZ. Como se puede ver en la tabla 4 en relación con los resultados obtenidos con las estructuras organogénicas generadas en explantes proximales, en el medio IB se obtenía mayor índice de crecimiento organizado en las líneas más morfogenéticas (i.e. PS2 y PS6). Estos resultados indicaban que el medio IB era más adecuado que el medio IBZ a la hora de promover el desarrollo de las estructuras organogénicas inducidas, a pesar de que en el medio IBZ se había obtenido mayor índice de crecimiento organizado durante la etapa de inducción (ver tabla 2). Lo mismo ocurría con otras líneas, como PS3 y PS4, en las que se obtuvo un mejor índice organogénico en el medio IBZ durante la etapa de inducción, pero que sin embargo fueron capaces de dar lugar a un índice organogénico mayor en el medio IB durante la etapa de desarrollo de las estructuras organogénicas (ver tablas 2 y 4).

**Tabla 4.** Morfogénesis en callos procedentes de explantes de cotiledón proximal de diferentes líneas de melón piel de sapo.

Línea	Índice de Crecimiento Desorganizado (ICD)		Índice de Crecimiento Organizado (ICO)	
	IB 0.2/2.5	IBZ 0.2/1.0/1.0	IB 0.2/2.5	IBZ 0.2/1.0/1.0
PS2	<b>2.13 ± 0.07*</b> (ab)	1.20 ± 0.11 (c)	<b>2.87 ± 0.07*</b> (a)	<b>2.07 ± 0.12</b> (a)
PS3	1.67 ± 0.13 (c)	1.73 ± 0.12 (b)	2.00 ± 0.13* (c)	1.67 ± 0.13 (b)
PS4	2.20 ± 0.08 (ab)	2.00 ± 0.08 (ab)	2.07 ± 0.12 (bc)	1.87 ± 0.11 (ab)
PS6	2.00 ± 0.00 (b)	<b>2.26 ± 0.09</b> (a)	<b>2.40 ± 0.10</b> (b)	<b>2.07 ± 0.05</b> (a)
PS7	2.40 ± 0.10 (a)	-	1.27 ± 0.09 (d)	-

Nota: Para cada parámetro evaluado (i.e. ICD o ICO), \* indica diferencias significativas en una línea en función del medio de cultivo empleado; y letras distintas indican diferencias significativas entre las líneas cultivadas en un mismo medio.

**Tabla 5.** Morfogénesis en callos procedentes de explantes de cotiledón distal de diferentes líneas de melón piel de sapo

Línea	Índice de Crecimiento Desorganizado (ICD)		Índice de Crecimiento Organizado (ICO)	
	IB 0.2/2.5	IBZ 0.2/1.0/1.0	IB 0.2/2.5	IBZ 0.2/1.0/1.0
PS2	<b>2.60 ± 0.10*</b> (a)	1.53 ± 0.11 (c)	<b>2.53 ± 0.11*</b> (a)	<b>2.00 ± 0.13</b> (a)
PS3	<b>2.67 ± 0.10*</b> (a)	1.80 ± 0.11 (b)	1.27 ± 0.09 (c)	1.60 ± 0.15 (ab)
PS4	2.20 ± 0.14 (b)	1.93 ± 0.05 (b)	1.87 ± 0.11 (b)	1.40 ± 0.10 (b)
PS6	2.20 ± 0.08 (b)	<b>2.47 ± 0.11</b> (a)	<b>2.47 ± 0.10*</b> (a)	1.40 ± 0.10 (b)
PS7	2.13 ± 0.07 (b)	-	1.27 ± 0.09 (c)	-

Nota: Para cada parámetro evaluado (i.e. ICD o ICO), \* indica diferencias significativas en una línea en función del medio de cultivo empleado; y letras distintas indican diferencias significativas entre las líneas cultivadas en un mismo medio.

Los resultados obtenidos con las estructuras generadas a partir de los cotiledones distales indicaron, de nuevo, que el medio IB era más adecuado que el medio IBZ para el desarrollo de las estructuras organogénicas. Como se puede ver en la tabla 5, el índice de crecimiento organizado de las estructuras cultivadas en el medio IB fue significativamente mayor que el obtenido en el medio IBZ, especialmente en las líneas más morfogénicas (i.e. PS2 y PS6). En términos generales, en estas dos líneas se obtienen muy buenos resultados de morfogénesis con independencia de la procedencia del explante de cotiledón (proximal o distal).

Con respecto a la fase de desarrollo de estructuras organogénicas concluimos que el medio IB es más adecuado que el medio IBZ, y en las líneas seleccionadas, es decir, las líneas más morfogénicas (i.e. PS2 y PS6), ambos tipos de explante generan estructuras organogénicas de calidad.

#### 4.1.3. Efecto del tipo de explante y de la combinación de reguladores de crecimiento sobre la regeneración de plantas

Por lo que respecta a la fase de regeneración de plantas tras la transferencia los callos organogénicos al medio de elongación, los resultados indicaron que todos los callos las líneas de mayor potencial morfogénico (i.e. PS2 y PS6) generaban plantas tanto en medio IB como en medio IBZ. En efecto, el 100% de los callos organogénicos procedentes de la región proximal que se transfirieron a medio de elongación habían desarrollado brotes, aunque no todos con el desarrollo suficiente como para poder ser individualizados como refleja el apartado “número de brotes que pueden ser individualizados a partir de cada callo”. En este sentido, de los callos que se habían cultivado en medio IB de la línea PS2 se podía individualizar de media 1 brote por cada callo (tabla 6). Sin embargo, los que procedían del medio IBZ se encontraban en una etapa de desarrollo menos avanzado y, de media, sólo se podía individualizar aproximadamente 1 brote de cada dos callos. En la línea PS6 no se observaron diferencias con relación a este parámetro y de todos los callos se podían individualizar al menos 1 brote por callo independientemente del medio en el que se habían generado las estructuras organogénicas (tabla 6).

**Tabla 6.** Regeneración de planta a partir de callos procedentes de cotiledón proximal de diferentes líneas de melón piel de sapo. Porcentaje callos que desarrollan brotes, número de brotes que se pueden individualizar a partir de un callo y porcentaje de plantas diploides.

Línea	Porcentaje de callos con brote		Nº brotes/callos		Porcentaje de plantas diploides	
	IB 0.2/2.5	IBZ 0.2/1.0/1.0	IB 0.2/2.5	IBZ 0.2/1.0/1.0	IB 0.2/2.5	IBZ 0.2/1.0/1.0
PS2	100.00±0.00 (a)	100.00±0.00 (a)	1.07±0.40 (ab)	0.64±0.13 (b)	54.54	55.56
PS3	80.00±8.45 (ab)	60.00±10.35 (b)	0.64±0.13 (b)	0.64±0.23 (b)	33.33	25.00
PS4	73.33±9.34 (b)	<b>100.00 ± 0.00*</b> (a)	0.93±0.07 (ab)	1.07±0.19 (ab)	38.89	50.00
PS6	100.00±0.00 (a)	100.00 ± 0.00 (a)	1.36±0.13 (a)	1.36±0.13 (a)	38.89	25.00
PS7	26.67±9.34 (c)	-	0.57±0.14 (b)	-	42.86	-

Nota: Para cada parámetro evaluado (i.e. porcentaje de callos con brote o nº de brotes por callo), \* indica diferencias significativas en una línea en función del medio de cultivo empleado; y letras distintas indican diferencias significativas entre las líneas cultivadas en un mismo medio.

Los brotes individualizables se transfirieron a medio de enraizamiento. Una vez se desarrollaron plantas axénicas se tomaron muestras de hoja y se analizó el nivel de ploidía de las plantas regeneradas. Comparando las dos líneas de mayor potencial morfogénico (i.e. PS2 y PS6), pudimos observar diferencias en relación con el porcentaje de plantas diploides regeneradas. En este sentido, aproximadamente el 50% de las plantas regeneradas de la línea PS2 eran diploides mientras que el resto había duplicado su dotación cromosómica. Estos resultados fueron similares con independencia del medio en el que se había obtenido los callos organogénicos (i.e. IB o IBZ). Por lo que respecta a la línea PS6, el porcentaje de plantas diploides era menor que en la línea PS2 y se observaron diferencias en función de medio de cultivo en el que se había generado los callos (tabla 6). Así, el porcentaje de plantas diploides que se regeneraron a partir de los callos generados en medio IB fue mayor respecto a las que se regeneraron a partir de los callos generados en medio IBZ.

En relación con los callos generados a partir de la región distal, las líneas con mayor potencial morfogénico (i.e. PS2 y PS6) fueron capaces de generar plantas tanto en medio IB como en medio IBZ. En la línea PS2, el 100% de los callos habían desarrollado brotes aunque no todos se encontraban en el estadio de desarrollo adecuado como para que pudieran ser individualizados (tabla 7). En la línea PS6, el 80% de los callos habían desarrollado brotes en estadios de desarrollo más avanzados que los de la línea PS2. Por lo que respecta a los niveles de polidía de las plantas regeneradas, los resultados fueron comparables a los obtenidos a partir de los callos generados de la región proximal del explante. En este sentido, el porcentaje de plantas diploides de la línea PS2 rondaba el 50% mientras que el de la línea PS3 se encontraba en torno al 30% (tabla 7). En ambos casos no se observaron diferencias respecto al medio empleado para generar los callos organogénicos (i.e. IB o IBZ).

**Tabla 7.** Regeneración de planta a partir de callos procedentes de cotiledón distal de diferentes líneas de melón piel de sapo. Porcentaje callos que desarrollan brotes, número de brotes que se pueden individualizar a partir de un callo y porcentaje de plantas diploides.

Línea	Porcentaje de callos con brote		Nº brotes/callos		Porcentaje de plantas diploides	
	IB 0.2/2.5	IBZ 0.2/1.0/1.0	IB 0.2/2.5	IBZ 0.2/1.0/1.0	IB 0.2/2.5	IBZ 0.2/1.0/1.0
PS2	100.00 ± 0.00 (a)	100.00 ± 0.00 (a)	0.64 ± 0.20 (ab)	0.50 ± 0.14 (a)	50	42.86
PS3	20.00 ± 8.45 (d)	40.00 ± 10.35 (c)	0.29 ± 0.13 (b)	0.43 ± 0.14 (a)	25.00	16.67
PS4	60.00 ± 10.35 (bc)	53.33 ± 10.54 (bc)	0.43 ± 0.14 (ab)	0.71 ± 0.22 (a)	33.33	50.00
PS6	80.00 ± 8.45 (ab)	80.00 ± 8.45 (ab)	0.71 ± 0.22 (a)	0.71 ± 0.22 (a)	30.00	30.00
PS7	40.00 ± 10.35 (cd)	-	0.29 ± 0.13 (b)	-	33.33	-

Nota: Para cada parámetro evaluado (i.e. porcentaje de callos con brote o nº de brotes por callo), \* indica diferencias significativas en una línea en función del medio de cultivo empleado; y letras distintas indican diferencias significativas entre las líneas cultivadas en un mismo medio.

En conjunto, los resultados indican que ambos medios son útiles para la regeneración *in vitro* de plantas de melón piel de sapo en diferentes tipos de líneas. Entre estas líneas, algunas exhiben una elevada respuesta morfogénica (i.e. PS2 y PS6), y en otras la respuesta es menor (i.e. resto de líneas). Por otro lado, los resultados indican que la región distal del cotiledón tiene una capacidad morfogénica sensiblemente menor respecto a la región proximal. Con todo, el potencial de morfogénesis de la región distal es más que aceptable y puede ser empleado en la mayor parte de las líneas para la regeneración de plantas completas. Este resultado tiene un enorme interés ya que esta parte del cotiledón habitualmente se suele desechar por la baja respuesta morfogénica. Los resultados expuestos en este trabajo de investigación ponen de manifiesto la utilidad de este tipo de explante a la hora de regenerar plantas completas, permitiendo regenerar un mayor número de plantas a partir de una plántula de partida (i.e. 2 cotiledones = 8 explantes). Por tanto, como se comentaba anteriormente, el resultado tiene un enorme interés especialmente cuando la disponibilidad de semilla es escasa, o ésta es de enorme valor.

## 4.2. Efecto del tipo de explante y del método de cultivo sobre la respuesta morfogénica y la regeneración de plantas en distintas líneas de melón piel de sapo

El objetivo del segundo experimento fue evaluar el efecto del tipo de explante y del método de cultivo sobre la morfogénesis y la regeneración de plantas en distintas líneas de melón piel de sapo. Al igual que en el anterior experimento, se evaluó la respuesta en la región proximal y distal del cotiledón.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio con cultivares de melón cantalupo sugerían que el cultivo en medio líquido a lo largo de los primeros días proporcionaban una mejor respuesta morfogénica (Albalat, 2016). En el contexto de este trabajo de investigación quisimos evaluar si el método de cultivo (líquido o sólido) durante los primeros días podría mejorar la respuesta morfogénica a largo plazo. Para ello, los explantes se cultivaron sobre medio líquido (IB 0.2/2.5 liq.) durante los 3 primeros días, y después se transfirieron a placas con medio gelificado con agar, es decir, medio sólido, y los resultados se compararon con los obtenidos a partir de explantes cultivados desde el primer día sobre medio sólido (IB 0.2/2.5 sol.).

Al igual que en el anterior experimento, los resultados se evaluaron en tres las fases que se describen en el apartado 4.1 (figura 5).

### 4.2.1. Efecto del tipo de explante y del método de cultivo sobre la inducción del callo organogénico.

Como se puede ver en la tabla 8, las líneas PS2 y PS6 fueron las de mayor potencial morfogénico. En la línea PS2 se obtuvieron resultados sensiblemente mejores de inducción empleando este nuevo método de cultivo (i.e. cultivo en líquido durante 3 días). Sin embargo, en la mayor parte de las líneas los resultados de inducción morfogénesis (ver ICO) fueron un poco mejores empleando medio sólido desde el inicio (tabla 8).

**Tabla 8.** Inducción de morfogénesis a partir de explantes de cotiledón proximal de diferentes líneas de melón piel de sapo

Línea	Índice de Crecimiento Desorganizado (ICD)		Índice de Crecimiento Organizado (ICO)		Porcentaje de explantes con respuesta organogénica	
	IB 0.2/2.5 liq.	IB 0.2/2.5 sol.	IB 0.2/2.5 liq.	IB 0.2/2.5 sol.	IB 0.2/2.5 liq.	IB 0.2/2.5 sol.
PS1	1.04 ± 0.09 (ab)	<b>1.67 ± 0.13*</b> (a)	0.75 ± 0.09 (a)	0.67 ± 0.09 (d)	<b>79.17 ± 8.47*</b> (b)	66.67 ± 9.83 (b)
PS2	<b>1.21 ± 0.12*</b> (a)	0.75 ± 0.09 (b)	1.88 ± 0.11 (a)	1.63 ± 0.10 (b)	100.00 ± 0.00 (a)	100.00 ± 0.00 (a)
PS3	0.75 ± 0.11 (bc)	<b>0.83 ± 0.17*</b> (b)	0.71 ± 0.09 (c)	<b>1.13 ± 0.07*</b> (c)	70.83 ± 9.48 (bc)	<b>100.00 ± 0.00*</b> (a)
PS4	0.17 ± 0.08 (d)	0.50 ± 0.17 (bc)	0.54 ± 0.12 (c)	<b>1.08 ± 0.06*</b> (c)	58.33 ± 10.28 (c)	<b>100.00 ± 0.00*</b> (a)
PS6	0.54 ± 0.10 (c)	0.29 ± 0.11 (c)	1.21 ± 0.08 (b)	<b>1.92 ± 0.06*</b> (a)	100.00 ± 0.00 (a)	100.00 ± 0.00 (a)
PS7	0.91 ± 0.18 (ab)	0.67 ± 0.17 (bc)	1.08 ± 0.06 (b)	<b>1.21 ± 0.08*</b> (c)	100.00 ± 0.00 (a)	100.00 ± 0.00 (a)

Nota: Para cada parámetro evaluado (i.e. ICD, ICO o % de explantes con respuesta organogénica), \* indica diferencias significativas en una línea en función del método de cultivo empleado; y letras distintas indican diferencias significativas entre las líneas cultivadas para un mismo método de cultivo.

Además, en algunas de las líneas el porcentaje de explantes con respuesta organogénica fue del 100% cuando el cultivo se realizó desde el principio sobre medio sólido (i.e. PS3 y PS4). Sin embargo, el porcentaje de explantes con respuesta organogénica en estas líneas fue

significativamente menor empleando el nuevo método de cultivo (tabla 8). Por el contrario, en la línea PS1 (una línea de menor respuesta organogénica) se obtuvieron mejores resultados empleando este nuevo método, al menos en cotiledones proximales (tabla 8).

En explantes de cotiledón distal de la línea PS2 también mejoró la inducción del callo organogénico en medio líquido, pero al igual que ocurría con explantes proximales, en la mayor parte de las líneas se obtuvieron mejores resultados sobre el medio sólido. De nuevo, en las líneas PS3 y PS4 no se consiguió la inducción de morfogénesis en todos los explantes cuando estos se cultivaron sobre medio líquido (tabla 9).

**Tabla 9.** Inducción de morfogénesis a partir de explantes de cotiledón distal de diferentes líneas de melón piel de sapo

Línea	Índice de Crecimiento Desorganizado (ICD)		Índice de Crecimiento Organizado (ICO)		Porcentaje de explantes con respuesta organogénica	
	IB 0.2/2.5 líq.	IB 0.2/2.5 sol.	IB 0.2/2.5 líq.	IB 0.2/2.5 sol.	IB 0.2/2.5 líq.	IB 0.2/2.5 sol.
PS1	0.92±0.08 (a)	<b>1.42 ±0.15*</b> (a)	0.58±0.12 (cd)	0.79 ±0.12 (c)	58.33±10.28 (cd)	70.83±9.48 (b)
PS2	0.58±0.10 (b)	0.75 ±0.09 (b)	1.71±0.11 (a)	1.45 ±0.12 (a)	100.00±0.00 (a)	100.00±0.00 (a)
PS3	0.79±0.11 (ab)	0.79 ±0.17 (b)	0.58±0.10 (cd)	<b>1.08 ±0.06*</b> (b)	70.83±9.48 (bc)	<b>100.00 ±0.00*</b> (a)
PS4	0.13±0.06 (c)	<b>0.79 ±0.17*</b> (b)	0.50±0.11 (d)	<b>1.00 ±0.00*</b> (bc)	45.83±10.83 (d)	<b>100.00 ±0.00*</b> (a)
PS6	<b>0.92 ±0.13*</b> (a)	0.29 ±0.13 (c)	1.16±0.10 (b)	<b>1.63 ±0.10*</b> (a)	100.00±0.00 (a)	100.00±0.00 (a)
PS7	0.29±0.09 (c)	<b>0.75 ±0.14*</b> (b)	0.88±0.07 (bc)	0.92 ±0.06 (bc)	91.67±5.76 (ab)	91.67 ±5.76 (a)

Nota: Para cada parámetro evaluado (i.e. ICD, ICO o % de explantes con respuesta organogénica), \* indica diferencias significativas en una línea en función del método de cultivo empleado; y letras distintas indican diferencias significativas entre las líneas cultivadas para un mismo método de cultivo.

Respecto a la primera fase del cultivo concluimos que el nuevo método de cultivo no parece favorecer la inducción del callo organogénico, y salvo en el caso de explantes proximales de la línea PS1, en general se observa que el medio líquido conduce a un mayor de callo desorganizado en detrimento del callo organizado.

#### 4.2.2. Efecto del tipo de explante y del método de cultivo sobre el desarrollo de las estructuras organogénicas.

Durante la etapa de desarrollo de las estructuras organogénicas observamos una amplificación de lo que habíamos observado durante la etapa de inducción. En este sentido, y teniendo en cuenta los índices de crecimiento desorganizado y organizado, en explantes de cotiledón proximal la mayor parte de las líneas exhibían mayor crecimiento desorganizado en medio líquido (en detrimento del desarrollo organogénico), mientras que en medio sólido se observaba un mayor desarrollo de estructuras organizadas (tabla 10).

**Tabla 10.** Morfogénesis en callos procedentes de explantes de cotiledón proximal de diferentes líneas de melón piel de sapo

Línea	Índice de Crecimiento Desorganizado (ICD)		Índice de Crecimiento Organizado (ICO)	
	IB 0.2/2.5 líq.	IB 0.2/2.5 sol.	IB 0.2/2.5 líq.	IB 0.2/2.5 sol.
PS2	1.47 ± 0.13 (b)	2.13 ± 0.07* (ab)	1.93 ± 0.16 (a)	<b>2.87 ± 0.07*</b> (a)
PS3	<b>2.73 ± 0.09*</b> (a)	1.67 ± 0.13 (b)	1.87 ± 0.11 (a)	2.00 ± 0.13 (c)
PS4	2.33 ± 0.13 (a)	2.20 ± 0.08 (ab)	1.33 ± 0.10 (b)	<b>2.07 ± 0.12*</b> (bc)
PS6	<b>2.53 ± 0.11*</b> (a)	2.00 ± 0.00 (b)	1.93 ± 0.09 (a)	<b>2.40 ± 0.10*</b> (b)
PS7	1.53 ± 0.13 (b)	2.40 ± 0.10* (a)	1.20 ± 0.08 (b)	1.27 ± 0.09 (d)

Nota: Para cada parámetro evaluado (i.e. ICD o ICO), \* indica diferencias significativas en una línea en función del medio de cultivo empleado; y letras distintas indican diferencias significativas entre las líneas cultivadas en un mismo medio.

En explantes distales no se observó un mayor desarrollo desorganizado en los explantes que habían sido cultivados sobre medio líquido, pero se vio que los cultivados sobre medio sólido desde el principio tenían un índice de callo organogénico significativamente mayor (tabla 11).

**Tabla 11.** Morfogénesis en callos procedentes de explantes de cotiledón distal de diferentes líneas de melón piel de sapo

Línea	Índice de Crecimiento Desorganizado (ICD)		Índice de Crecimiento Organizado (ICO)	
	IB 0.2/2.5 líq.	IB 0.2/2.5 sol.	IB 0.2/2.5 líq.	IB 0.2/2.5 sol.
PS2	1.73 ± 0.14 (c)	2.60 ± 0.10* (a)	1.80 ± 0.08 (a)	<b>2.53 ± 0.11*</b> (a)
PS3	2.73 ± 0.09 (a)	2.67 ± 0.10 (a)	1.66 ± 0.10* (a)	1.27 ± 0.09 (c)
PS4	2.27 ± 0.09 (b)	2.20 ± 0.14 (b)	0.87 ± 0.07 (c)	<b>1.87 ± 0.11*</b> (b)
PS6	2.53 ± 0.11 (a)	2.20 ± 0.08 (b)	1.33 ± 0.13 (b)	<b>2.47 ± 0.10*</b> (a)
PS7	1.33 ± 0.10* (d)	2.13 ± 0.07 (b)	1.00 ± 0.00 (c)	<b>1.27 ± 0.09*</b> (c)

Nota: Para cada parámetro evaluado (i.e. ICD o ICO), \* indica diferencias significativas en una línea en función del medio de cultivo empleado; y letras distintas indican diferencias significativas entre las líneas cultivadas en un mismo medio.

Respecto a la segunda fase del cultivo concluimos que el nuevo método de cultivo no mejora el desarrollo de estructuras organogénicas respecto a lo que ocurre utilizando en método convencional. En general, el cultivo durante los primeros días de los explantes sobre medio líquido promueve crecimiento desorganizado a lo largo del tiempo, especialmente en los explantes que exhiben mayor potencial de morfogénesis como son los proximales.

#### 4.2.3. Efecto del tipo de explante y del método de cultivo sobre la regeneración de plantas

En relación con la última fase del experimento, es decir, la fase de regeneración de plantas, la mayor parte de las líneas acusó la menor eficacia del nuevo método de cultivo en la inducción de morfogénesis y el desarrollo de estructuras organogénicas. Así, y con la excepción de la línea PS2, el porcentaje de callos con brote fue significativamente menor en aquellos que se habían obtenido

con el nuevo método, tanto a partir de cotiledones proximales (tabla 12) como de distales (tabla 13).

**Tabla 12.** Regeneración de planta a partir de callos procedentes de cotiledón proximal de diferentes líneas de melón piel de sapo. Porcentaje callos que desarrollan brotes, número de brotes que se pueden individualizar a partir de un callo y porcentaje de plantas diploides.

Línea	Porcentaje de callos con brote		Nº brotes/callos		Porcentaje de plantas diploides	
	IB 0.2/2.5 líq.	IB 0.2/2.5 sol.	IB 0.2/2.5 líq.	IB 0.2/2.5 sol.	IB 0.2/2.5 líq.	IB 0.2/2.5 sol.
PS1	-	-	-	-	-	-
PS2	100.00 ± 0.00 (a)	100.00 ± 0.00 (a)	0.64 ± 0.23 (a)	1.07 ± 0.40 (ab)	33.33	<b>54.54</b>
PS3	26.67 ± 9.34 (bc)	<b>80.00 ± 8.45*</b> (ab)	0.43 ± 0.17 (ab)	0.64 ± 0.13 (b)	16.66	<b>33.33</b>
PS4	20.00 ± 8.45 (c)	<b>73.33 ± 9.34*</b> (b)	0.50 ± 0.14 (ab)	<b>0.93 ± 0.07*</b> (ab)	33.33	38.89
PS6	53.33 ± 0.11 (ab)	<b>100.00 ± 0.00*</b> (a)	0.71 ± 0.16 (a)	<b>1.36 ± 0.13*</b> (a)	20.00	<b>38.89</b>
PS7	13.33 ± 7.18 (c)	26.67 ± 9.34 (c)	0.14 ± 0.10 (b)	0.57 ± 0.14* (b)	0.00	42.86

Nota: Para cada parámetro evaluado (i.e. porcentaje de callos con brote o nº de brotes por callo), \* indica diferencias significativas en una línea en función del medio de cultivo empleado; y letras distintas indican diferencias significativas entre las líneas cultivadas en un mismo medio.

**Tabla 13.** Regeneración de planta a partir de callos procedentes de cotiledón distal de diferentes líneas de melón piel de sapo. Porcentaje callos que desarrollan brotes, número de brotes que se pueden individualizar a partir de un callo y porcentaje de plantas diploides.

Línea	Porcentaje de callos con brote		Nº brotes/callos		Porcentaje de plantas diploides	
	IB 0.2/2.5 líq.	IB 0.2/2.5 sol.	IB 0.2/2.5 líq.	IB 0.2/2.5 sol.	IB 0.2/2.5 líq.	IB 0.2/2.5 sol.
PS1	-	-	-	-	-	-
PS2	93.33 ± 5.27 (a)	100.00 ± 0.00 (a)	0.43 ± 0.17 (a)	0.64 ± 0.20 (ab)	16.66	<b>50</b>
PS3	6.67 ± 5.27 (c)	20.00 ± 8.45 (d)	0.36 ± 0.13 (a)	0.29 ± 0.13 (b)	33.33	25.00
PS4	13.33 ± 7.18 (c)	<b>60.00 ± 10.35*</b> (bc)	0.21 ± 0.11 (a)	<b>0.43 ± 0.14*</b> (ab)	50.00	33.33
PS6	40.00 ± 10.36 (b)	<b>80.00 ± 8.45*</b> (ab)	0.43 ± 0.14 (a)	<b>0.71 ± 0.22*</b> (a)	33.33	30.00
PS7	6.67 ± 5.27 (c)	40.00 ± 10.35* (cd)	0.07 ± 0.07 (a)	0.29 ± 0.13* (b)	0.00	33.33

Nota: Para cada parámetro evaluado (i.e. porcentaje de callos con brote o nº de brotes por callo), \* indica diferencias significativas en una línea en función del medio de cultivo empleado; y letras distintas indican diferencias significativas entre las líneas cultivadas en un mismo medio.

Asimismo, en la mayor parte de las líneas, el número de brotes individualizables por callo era menor en los callos obtenidos mediante el nuevo método de cultivo. Además, comprobamos que, en general, el porcentaje de plantas diploides era mayor cuando se empleaba el método convencional (i.e. cultivo en medio sólido). Por ejemplo, en la línea PS2 se había obtenido de media en torno a un 50% de plantas diploides en el anterior experimento, independientemente de la combinación de reguladores de crecimiento empleada (ver tablas 6 y 7). Sin embargo, sólo el 33% (a partir de explantes proximales) y el 17% (a partir de explantes distales) de las plantas regeneradas utilizando el nuevo método de cultivo eran diploides (ver tablas 12 y 13). También se

observaron resultados similares en otras líneas (i.e. PS3 y PS3 en explantes proximales). No se puede descartar en este sentido que el cultivo en medio líquido durante los primeros días promueva una mayor tasa de endoreduplicación o que favorezca la competencia de las células poliploides presentes en el tejido de partida.

En conjunto, los resultados indican que el cultivo en medio líquido de los explantes de cotiledón de las líneas de melón piel de sapo evaluadas en este trabajo de investigación no sólo no incrementan la tasa morfogénica sino que, además, tienen un efecto pernicioso sobre la calidad de las estructuras organogénicas y el porcentaje de plantas diploides que se regeneran.

#### 4.3. Transformación genética en la variedad de melón piel de sapo “*Pipa de Oro*”

El objetivo de este experimento fue evaluar si las mejores condiciones de morfogénesis en melón piel de sapo permitirían obtener plantas transgénicas. Para ello, se utilizaron plántulas en estadio ontogénico 2-3 y, como material de partida, 4 explantes de cotiledón (i.e. dos proximales y dos distales). Tras las etapas de inoculación y lavado de los explantes, el cultivo se realizó sobre medio IB sólido (i.e. gelificado con agar) suplementado con el agente selectivo (ver apartado 3.6.3). La transformación genética se llevó a cabo con un plásmido que contenía, además del gen *nptII* que confiere resistencia a la kanamicina, el gen delator GFP. La metodología de transformación genética fue básicamente la que se describe en Atarés et al (2011).

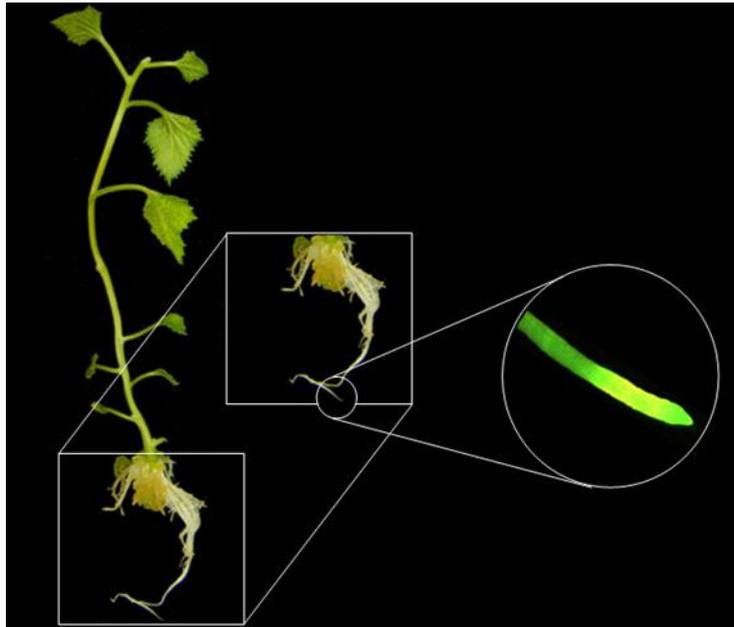
**Tabla 14.** Eficacia de transformación en melón piel de sapo (“*Pipa de Oro*”) utilizando explantes de cotiledón como material de partida.

Cultivar	<i>Pipa de Oro</i> (PS6)
Condiciones de cultivo	Cultivo en medio sólido
Medio de cultivo	IB 0.2/2.5
Nº explantes de cotiledón	60
Nº transgénicas diploides	23
Eficacia útil de transformación	19%

Nota: La eficacia útil de transformación se obtiene dividiendo el número de plantas transgénicas diploides procedentes de eventos independientes de transformación por el número de cotiledones empleados en el experimento.

Como se puede ver en la tabla 14, se obtuvieron 23 plantas transgénicas diploides partiendo de 60 cotiledones de partida, es decir, se alcanzó una eficacia útil de transformación del 19%. La naturaleza transgénica de las plantas regeneradas en el medio selectivo (i.e. suplementado con 100 mg/l de kanamicina) se verificó visualizando la proteína delatora GFP. El gen GFP codifica para una proteína fluorescente verde que se puede visualizar en un microscopio equipado con los filtros apropiados cuando el material vegetal que expresa la proteína se observa bajo condiciones de luz ultravioleta (figura 6).

El experimento nos permitió verificar la idoneidad del método de regeneración para la obtención de plantas transgénicas en experimentos de transformación genética de melón piel de sapo. Sobre la base de la eficacia obtenida (tabla 14), los resultados se pueden considerar como excepcionales habida cuenta de la escasa bibliografía relacionada con la transformación genética de estos cultivares de melón (ver apartado 5.2. de discusión).



**Figura 6.** Presunta planta transgénica y verificación de la naturaleza transgénica mediante la visualización de la expresión GFP en raíces.



## 5. DISCUSIÓN

---

### 5.1. Efecto del tipo de explante a la hora de obtener respuesta morfogénica

Según Moreno et al (1985), uno de los factores que más influye en la respuesta morfogénica es el tipo de explante. Estos autores demostraron que en función de la fuente de material vegetal, los resultados pueden ser muy distintos. En sus experimentos con segmentos de hipocotilo y cotiledón, observaron que la frecuencia de callos con brotes en explantes procedentes de cotiledón era muy alta, mientras que los explantes procedentes de hipocotilo apenas originaban algunos brotes. Srivastava et al (1989) obtuvieron resultados similares en sandía. En este caso, aunque consiguieron la regeneración de plantas a partir de callos de hipocotilo, los resultados más interesantes siempre los obtuvieron con explantes procedentes de cotiledón.

En experimentos realizados con explantes de distinta procedencia (cotiledón, hoja, hipocotilo y tallo), García-Sogo (1990) comprobó notables diferencias en la capacidad organogénica de estos explantes, siendo siempre los callos derivados de explantes de cotiledón los que exhibían mayor aptitud morfogénica. En los trabajos realizados con los mutantes de melón 'Yellow Green' y 'Halo', Orts et al (1986) observaron estructuras organizadas en los explantes de hipocotilo y tallo del cultivar 'Yellow Green' con una frecuencia muy alta (100%), pero estas estructuras no dieron lugar en ningún caso a la formación de brotes. Sin embargo, el estudio morfogénico en explantes de cotiledón y hoja reveló la diferenciación de brotes con unas frecuencias del 13,1% y 14,7% respectivamente.

Punja et al (1990) obtuvieron frecuencias de regeneración que oscilaron entre el 0% y el 75% en explantes de cotiledón de melón y entre el 0% y el 38% en explantes de hoja. Da Silva (1999) también comprobó que los callos derivados de cotiledón propiciaban mejor respuesta que los de hoja en los cinco cultivares de melón que estudió. En trabajos más recientes también se ha reportado la misma tendencia. Así, Nuñez Pelanius et al (2007) indicaron que los explantes de cotiledón de melón Galia generan mayor morfogénesis que los que derivan de hipocotilo y hoja. En definitiva, son varios los autores que coinciden en que los cotiledones son la mejor fuente de material vegetal para realizar estudios morfogénicos (Wehner & Locy, 1981; Moreno et al, 1985; Cade et al, 1990).

Recientemente, Albalat (2016) observaron que los explantes de cotiledón de melón cantalupo en estadios ontogénicos 2-3 eran los más adecuados para generar respuesta morfogénica. Por las razones expuestas, en este trabajo hemos utilizado explantes cotiledonarios en estadio ontogénico 2-3 de diferentes cultivares piel de sapo para evaluar la respuesta

morfogenética. Además, evaluamos la respuesta morfogenética en diferentes tipos de explante de cotiledón. Más concretamente, se evaluó la respuesta morfogenética en explantes distales (los más alejados del peciolo) respecto a los que ocupan una posición proximal (los más cercanos al peciolo) en el cotiledón. En pepino, Pérez Sanjuán (1999) observó que la única vía para regenerar plantas de pepino era utilizar explantes de la zona proximal del cotiledón. Gambley & Dodd (1990) describieron resultados similares en esta especie. En sandía, Compton & Gray (1993) también reportaron la ausencia absoluta de morfogénesis en las regiones distales del cotiledón. Nosotros pudimos constatar que, en general, la morfogénesis es mayor en cotiledones proximales; sin embargo, todos los cultivares generan una respuesta satisfactoria con independencia del tipo de explante empleado. Por ejemplo, en la etapa de inducción de respuesta morfogenética, el porcentaje de explantes con yema era similar en explantes distales y proximales. En efecto, en todas las líneas, salvo en la línea PS1 (en la que se obtuvo en torno a un 70% de explantes con respuesta en ambos tipos de explante), en torno al 100% de los explantes tanto distales como proximales generó respuesta morfogenética. Sin embargo, el índice organogénico, con el que evaluamos la calidad e intensidad de la respuesta organogénica, era ligeramente menor en los explantes distales. En la etapa de desarrollo de los callos organogénicos también pudimos constatar que el índice organogénico era ligeramente menor en los explantes distales. Por el contrario, el índice de callo desorganizado era ligeramente mayor en explantes distales. Conviene indicar que, en general, el crecimiento desorganizado suele ir en detrimento del crecimiento organizado, por lo que los resultados que hemos observados parecen coherentes. En este sentido, en la etapa de desarrollo de las estructuras organogénicas, el explante distal exhibe menor índice de crecimiento organizado que el explante proximal, mientras que ocurre lo contrario con índice de crecimiento desorganizado. En la etapa de regeneración de plantas, los resultados son muy dependientes del cultivar. En este sentido, las diferencias entre las líneas PS2, PS4 y PS6 son escasas ya que el porcentaje de callos que desarrollan brotes individualizables es prácticamente el mismo independientemente del tipo de explante cotiledonario empleado. Sin embargo, en las líneas PS3 y PS7 desarrollan significativamente más brotes individualizables a partir de explantes proximales. Además, en general, los callos procedentes de explantes proximales generan más brotes por callo que los procedentes de explantes distales. Respecto al nivel de ploidía, no parece que el tipo de explante tenga efecto sobre el porcentaje de plantas poliploides. Los resultados obtenidos indican que los explantes proximales de cotiledón de los cultivares piel de sapo evaluados desarrollan mayor respuesta que los distales. Con todo, los explantes distales generan una respuesta satisfactoria y podrían ser empleados como material de partida cuando la disponibilidad de semilla es escasa o de elevado interés.

## **5.2. Efecto de la composición del medio de cultivo a la hora de obtener respuesta morfogenética**

La respuesta morfogenética es consecuencia de la interacción de múltiples factores, siendo la composición del medio de cultivo uno de ellos. En relación con los componentes de medio, el tipo y concentración de los reguladores de crecimiento pueden ser determinantes en la obtención de la respuesta morfogenética. En los trabajos realizados con explantes de cotiledón de pepino por Gambley & Dodd (1990) quedó de manifiesto que las citoquininas quinetina (K; 2 a 5 mg/l), isopenteniladenina (2iP; 1 a 5 mg/l) y benciladenina (BAP; 0,5 a 1 mg/l) daban lugar a altas frecuencias de callos con brotes cuando se utilizaban como únicos reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. Sin embargo, cuando los medios contenían la auxina ácido indolacético (IAA) se inhibía la formación de brotes y aumentaba el crecimiento de callo. En una especie silvestre de la

familia de las cucurbitáceas (*Citrullus colocynthis*), Dabauza (1995) observó que la utilización de BA como único regulador de crecimiento era suficiente para estimular la organogénesis en explantes de cotiledón. Posteriormente, comprobaron que la adición de NAA (ácido naftalenacético) al medio de cultivo tenía consecuencias negativas sobre la regeneración de brotes. De forma similar, Srivastava et al (1989) comprobaron el efecto pernicioso de NAA sobre la regeneración de brotes en explantes procedentes de cotiledón de sandía, y concluyeron que la sola presencia de BAP en el medio de cultivo era suficiente para promover la regeneración de brotes.

Tras evaluar 6 cultivares de pepino en medios que contenían NAA y BAP, Ali et al (1991) observaron que las frecuencias de regeneración eran variables dependiendo del genotipo en cuestión. Da Silva (1999) también observó que el efecto del medio de cultivo era dependiente del genotipo. Los mejores resultados en los cultivares 'Amarelo', 'Cantaloup Charentais' y 'Eldorado' los obtuvo en un medio que contenía 1,5 mg/l de IAA y 6,0 mg/l de K. Sin embargo, para el cultivar 'Melón de Onteniente' resultó más adecuado un medio con tan sólo 1,0 mg/l de BAP.

Sobre la base de evidencias previas del grupo sobre la regeneración de plantas de melón cantalupo, en este trabajo de investigación hemos querido comparar la respuesta morfogénica en dos medios de cultivo, uno de ellos suplementado con ácido indolacético y benciladenina, y el otro suplementado con ácido indolacético, benciladenina y zeatina. A pesar de que la zeatina es un regulador de crecimiento poco empleado en cucurbitáceas, resultados recientes obtenidos en nuestro grupo indicaron que la combinación de ácido indolacético, benciladenina y zeatina incrementaba considerablemente la capacidad organogénica en explantes de cotiledón de melón cantalupo (Albalat, 2016). En este medio de cultivo, el elevado índice de callo organizado era muy elevado, mientras que el índice de callo desorganizado era muy bajo. En definitiva, la calidad de la respuesta organogénica era elevada. Nosotros hemos observado que en algunas líneas (i.e. PS2, PS4 o PS6), la zeatina mejora la inducción de la respuesta organogénica, mientras que en otras líneas (i.e. PS1 o PS7) se obtuvo mejor inducción en el medio no suplementado con zeatina. En las etapas posteriores parece que la adición de zeatina no mejora la cantidad o calidad de la respuesta organogénica. En este sentido, tanto el porcentaje de brotes que se pueden individualizar como el número de brotes que se pueden obtener por callo organogénico fue similar para la mayor parte de las líneas evaluadas en ambos medio de cultivo. Los resultados obtenidos indican que la adición de zeatina podría mejorar la inducción de callo organogénico en algunos de los cultivares piel de sapo que hemos evaluado en este trabajo de investigación (i.e. PS2, PS4 o PS6), sin embargo, en etapas posteriores de desarrollo de las estructuras organogénicas podría ser más conveniente emplear el medio de cultivo sin suplemento de zeatina.

### **5.3. Efecto del método de cultivo a la hora de obtener respuesta morfogénica**

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se puso de manifiesto que el crecimiento y la respuesta organogénica de callos derivados de explantes de cotiledón del cv. Cantaloup Charentais eran sensibles al tipo y concentración del agente gelificante (Bordas, 1994). La influencia del tipo y concentración del agente gelificante en el crecimiento, morfogénesis y multiplicación en los sistemas de cultivo *in vitro* de tejidos se encuentra bien descrita en la literatura para diversas especies (revisado en Bordas, 1994). Se ha comprobado que una concentración alta de agente gelificante reduce la capacidad organogénica y el número de brotes por explante. Este efecto adverso podría deberse a una insuficiente absorción de agua, citoquininas u otros elementos minerales del medio de cultivo. Sin embargo, concentraciones bajas del agente gelificante pueden

promover fenómenos de hiperhidratación como consecuencia de un exceso de absorción de agua, junto con algunos de los componentes del medio de cultivo (i.e. micronutrientes, iones específicos o reguladores de crecimiento).

Albalat (2016) comprobó que el cultivo de explantes de cotiledón de melón sobre medio líquido tiene efectos positivos sobre la prematura inducción de estructuras organogénicas. Sin embargo, el cultivo prolongado de las estructuras organogénicas sobre el soporte líquido induce fenómenos de hiperhidratación. Albalat (2016) propone cultivar los explantes sobre soporte líquido durante un corto periodo de tiempo en aras de acelerar la inducción de la respuesta organogénica, y posteriormente transferir las estructuras organogénicas a medio de cultivo sólido, es decir, gelificado con agar.

Teniendo en cuenta la importancia que podría tener la disponibilidad de los componentes del medio de cultivo sobre la prematura inducción de estructuras organogénicas, en este trabajo quisimos evaluar la aptitud morfogenética de explantes (tanto proximales como distales) de los cultivares piel de sapo mediante esta nueva metodología. Para ello, los explantes se mantuvieron durante los tres primeros días sobre medio líquido y después se transfirieron a medio sólido. Los resultados del experimento indicaron que esta estrategia de cultivo no mejora ni la cantidad ni la calidad de las estructuras organogénicas respecto al cultivo en medio sólido. De hecho, en todas los cultivares piel de sapo evaluados se obtuvieron peores resultados en relación con la inducción de morfogénesis utilizando soporte líquido respecto al cultivo en medio sólido.

#### **5.4. Efecto de los diferentes requerimientos culturales y morfogenéticos a la hora de obtener plantas transgénicas**

Para abordar con éxito la transferencia de genes foráneos a una especie vegetal es necesario disponer de un sistema eficaz y reproducible que permita la regeneración de plantas. Cuando se tiene puesto a punto un método de transformación genética en una especie se asume que el éxito del método se debe al protocolo de transformación, es decir, a la metodología para llevar a cabo la infección de los explantes con la bacteria. Sin embargo, lo que realmente importa a la hora de poner a punto un método de transformación genética son otros parámetros como la calidad del material de partida, el tipo de explante utilizado, el estado ontogénico de la plántula y el medio de cultivo que se emplea para la inducción de la morfogénesis. El principal objetivo del presente trabajo de investigación ha sido la evaluación de la respuesta morfogenética en explantes de cotiledón de melón piel de sapo y el desarrollo de métodos de regeneración potencialmente útiles en experimentos de transformación. A partir de plantas seleccionadas tras la germinación de la semilla, hemos evaluado dos tipos de explante de cotiledón (proximal y distal), medios de cultivo suplementados con dos combinaciones de reguladores de crecimiento y un nuevo método de cultivo de explantes. Nuestros resultados sugerían que los mejores resultados se obtenían empleando un medio de cultivo suplementado con ácido indolacético y benciladenina, utilizando tanto explantes proximales como distales y realizando el cultivo desde la extracción de los explantes sobre medio sólido.

Para testar la utilidad real de los resultados obtenidos se diseñó un experimento de transformación genética con uno de los cultivares de mayor respuesta (i.e. Pipa de Oro: PS6). Para llevar a cabo el experimento de transformación se utilizaron explantes proximales y distales de cotiledón procedentes de plántulas que se encontraban en el estadio ontogénico 2-3. Tras la inoculación de los explantes y posterior eliminación de la bacteria (48 horas después), los explantes

se transfirieron a medio sólido (suplementado con los reguladores ácido indolacético y benciladenina) con presión de selección (100 mg/l de kanamicina), siguiendo el mismo protocolo descrito en Atarés et al (2011). Los resultados fueron excepcionales ya que nos permitieron obtener una eficacia útil de transformación genética del 19%. Es decir, se obtuvieron 19 plantas transgénicas diploides procedentes de eventos independientes de transformación por cada 100 explantes de cotiledón inoculados.

A pesar de que se han desarrollado numerosos protocolos de transformación en los últimos 20 años, las eficiencias de transformación genética en melón ha sido en general muy bajas (Nuñez-Paleniús et al, 2006; 2008; Ren et al, 2012). Además, suelen ser muy dependientes de genotipo (Guis et al, 1998; Galperin et al, 2003; Akasaka-Kennedy et al, 2004; Rhimi et al, 2006) y del material de partida (Fang & Grumer, 1990; Guis et al, 2000). Que nosotros sepamos, los mejores resultados en la literatura han sido los obtenidos en el cultivar Galia por Núñez Paleniús et al (2006), con eficacias de transformación que iban del 7,5 al 12,5%. Sin embargo, los autores indicaron que sólo el 20% de las plantas transgénicas regeneradas eran diploides, por lo que las eficacias útiles de transformación que obtuvieron en los diferentes experimentos que realizaron iban del 1,5 al 2,5%. En general, la mayor parte de los trabajos de transformación genética de melón describen eficacias de entre el 0,7 y el 3% (ver Fang & Grumer, 1990; Gaba et al, 1992; Bordas, 1994; Guis et al, 2000; Akasaka-Kennedy et al, 2004; Yalcin-Mendi et al, 2004; Curuk et al, 2005; Castelblanque et al, 2008; García-Almodóvar et al, 2017). Según Hellens & Mullineaux (2000), otros factores tales como la cepa de *Agrobacterium*, el marcador de selección y las construcciones usadas pueden determinar la eficacia final de transformación genética. También se ha descrito que el periodo de precultivo de los explantes, previo a la inoculación con *Agrobacterium*, y las condiciones de cocultivo de los explantes con la bacteria (i.e. tiempo y/o temperatura) pueden determinar diferencias en la eficacia de transformación (Valle's & Lasa, 1994; Ayub et al, 1996; Guis et al, 2000; Fullner & Nester, 1996; Yasmin & Debener, 2010; Sharma et al, 2011).

Los experimentos realizados en nuestro laboratorio con diferentes especies de interés hortícola u ornamental (i.e. tomate, sandía, melón, pelargonium, kalanchoe, Ficus) han permitido establecer unas condiciones óptimas para los experimentos de transformación genética. Estas condiciones incluyen un precultivo de 24 horas de los explantes antes de la etapa de inoculación con *Agrobacterium*, un periodo de inoculación de 48 horas, el ajuste de la densidad óptica del inóculo bacteriano a 0,1-0,2, la eliminación del crecimiento bacteriano mediante un lavado de unos 10 minutos con medio básico suplementado con 400 mg/ de cefotaxima y, dependiendo de la especie, un periodo de cultivo de 2-3 días sin presión de selección tras el lavado de los explantes. Por otro lado, los diferentes ensayos realizados por el grupo indican que la cepa LBA 4404 es la más adecuada para obtener los mejores resultados en estas especies. Con estas condiciones se ha obtenido eficacias de transformación genética de en torno al 25% en tomate (Sánchez, 2016; Goergen, 2016), más del 100% en silvestres relacionadas como *Solanum pennellii* (Atarés et al, 2011) y de entre el 11 y el 75% en *Kalanchoe blossfeldiana* (García-Sogo et al, 2010). Sin embargo, las eficacias de transformación en otras especies han sido más modestas, y en este sentido se han obtenido eficacias de en torno al 3% en melón (Bordas et al, 1997), entre el 2,8 y el 5,3% en sandía (Ellul et al, 2003) y del 3% *Pelargonium* (García-Sogo et al, 2012). Comoquiera que los diferentes parámetros del protocolo de transformación genética están establecidos y han dado excelentes resultados en distintas especies, en este trabajo hemos actuado sobre otros requerimientos que consideramos importantes para abordar con éxito la transformación genética de melón piel de

sapo. Que nosotros sepamos, el único trabajo de transformación genética de melón piel de sapo ha sido realizado por García-Almodóvar et al (2017) y los autores describen una tasa útil de transformación genética del 3,8%. En nuestros experimentos, la evaluación de una serie de factores, entre los que destacaríamos la calidad de los explantes de partida, la edad ontogénica de la plántula y la combinación de reguladores de crecimiento, nos ha permitido poner a punto un eficiente protocolo de regeneración de plantas de melón piel de sapo. La adecuación de este protocolo a nuestro método de transformación genética (Atarés et al, 2011) ha hecho factible la obtención de plantas transgénicas con una eficacia útil de transformación del 19%. Actualmente se están realizando transformaciones genéticas en nuestro laboratorio con otras de las líneas piel de sapo que se han evaluado en este trabajo para conocer si es factible obtener resultados similares a los obtenidos con el cultivar "Pipa de Oro".

## 6. CONCLUSIONES

---

1. La evaluación de diferentes requerimientos culturales y morfogénéticos relacionados con la inducción de organogénesis adventicia en cultivares de melón piel de sapo melón ha revelado lo siguiente: i) la calidad de la respuesta morfogénética que se obtiene a partir de explantes de cotiledón es excepcional cuando se emplean plántulas en estadios ontogénicos 2 o 3, ii) aunque los explantes proximales generan mayor morfogénesis, los de la zona distal resultan también adecuados para este propósito, iii) la combinación de ácido indolacético y benciladenina, aunque también su combinación con zeatina, generan una elevada respuesta morfogénética. Los resultados obtenidos empleando zeatina, una hormona poco habitual en los experimentos de morfogénesis en melón, sugieren tenerla en cuenta a la hora de evaluar nuevas líneas.
2. El empleo de un soporte líquido durante los 3 primeros días de cultivo de los explantes primarios de cotiledón no mejora la respuesta morfogénética respecto al cultivo en medio gelificado con agar. Este nuevo método de cultivo, muy útil en otros cultivares de melón, promueve un mayor desarrollo de callo desorganizado y reduce la tasa de regeneración de plantas diploides de melón piel de sapo.
3. Basándonos en los resultados obtenidos a partir de los experimentos de morfogénesis, se ha puesto a punto una metodología eficiente para la obtención de plantas transgénicas de melón piel de sapo. La eficacia útil de transformación genética que se ha obtenido es significativamente mayor a las reportadas para esta especie, lo que nos permitirá aplicar con éxito la transferencia de genes o la tecnología emergente de edición génica.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Adelberg JW, Rhodes BB, Skorupska HT & Brifges WC; 1994. Explant origin affects the frequency of tetraploid plants from tissue cultures of melon. *HortScience*, 29(6): 689-692.
- Akasaka-Kennedy Y, Tomita K & Ezura H; 2004. Efficient plant regeneration and Agrobacterium-mediated transformation via somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Science* V. 166, (3): 763-769.
- Albalat Peraita V; 2016. Sistemas de alto rendimiento en la regeneración in vitro de melón y pepino. <http://hdl.handle.net/10251/76819>.
- Ali N, Skirvin RM, Splittstoesser WE; 1991. Regeneration of *Cucumis sativus* from cotyledons of small explants. *HortScience* 26: 925.
- Arce-Ochoa JP, Dainello F, Pike LM & Drews D; 1995. Field performance comparison of two transgenics summer squash hybrids to their parental hybrid line. *HortScience*, 30 (3): 492-493.
- Atarés A, Moyano E, Morales B, Schleicher P, García-Abellán JO, Antón T, García-Sogo B, PerezMartin F, Lozano R, Flores FB, Moreno V, Bolarin M del C, Pineda B; 2011. An insertional mutagenesis programme with an enhancer trap for the identification and tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild-related species *Solanum pennellii*. *Plant Cell Reports* 30: 1865–1879.
- Ayub R, Guis M, Amor MB, Gillot L, Roustan JP, Latché A, Bouzayen M & Pech JC; 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature Biotechnology*, 14 (1996), pp. 862–866.
- Baixauli C, Giner A, Aguilar JM, Núñez A; 2008. Comparativa de nuevas variedades de melón del tipo piel de sapo. *Horticultura Internacional*, 61:44-47.
- Ben Tahar S, De Both MTJ; 1988. Introduction of foreign genes into melon (*Cucumis melo* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. En: *Cucurbitaceae 88, Proc. Eucarpia Cucurbit Genetics and Breeding*. Avignon-Montfavet, Francia, pp. 209-216.
- Bezirganoglu I, Hwang SY, Shaw J F; et al. ; 2014. Efficient production of transgenic melon via *Agrobacterium*-mediated transformation. 13: 3218-322.

- Bordás M, Montesinos MC, Dabauza M, Salvador A, Roig LA, Serrano R, Moreno V; 1997. Transfer of the yeast salt tolerance gene HAL 1 to *Cucumis melo* L. cultivars and in vitro evaluation of salt tolerance. *Transgenic Research* 6: 41 – 50.
- Bordás M, Moreno V & Roig LA; 1991. Organogenic and embryogenic potential of several commercial lines of *Cucumis melo* L. *Cucurbit Genetics Cooperative*, (14): 71-73.
- Bordás M; 1994. Ingeniería genética en melón (*Cucumis melo*L.): Transferencia, integración y expresión de genes foráneos. 483 ff. Tesis (Doctorado en Ingeniería Agronómica)- E. T. S. I. A. Universidad Politécnica de Valencia. España
- Burza W, Zuzga S, Tin Z & Malepszy S. Cucumber (*Cucumis sativus* L.). Cucumber transformation. *Methods in Molecular Biology*, vol. 343: *Agrobacterium Protocols*, 2/e, volume 1.
- Cade RM, Wehner TC & Blazich FA; 1990. Effect of explant age and growth regulator concentration on adventitious shoot formation from cucumber cotyledonary tissue. *Cucurbit Genetics Cooperative*, (13): 14-17.
- Castelblanque L, Marfa V, Claveria E, Martínez I, Pérez-Grau L, Dolcet-Sanjuan R & Pitrat M; 2008. Improving the genetic transformation efficiency of *Cucumis melo* subsp. *melo* 'Piel de Sapo' via *Agrobacterium*. Pitrat M. (ed): *Cucurbitaceae, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae*, Avignon (France), May 21-24th, 2008, pp. 627-631.
- Chaux CL, y Foury CL; 1992. *Productions Legumieres*. Editorial Lavoisier París. Tomo 3: 303-360.
- Chee PP; 1991a. Plant regeneration from cotyledons of *Cucumis melo* 'Topmark'. *HortScience*, 26 (7): 908-910.
- Chovelon V, Restier V, Giovinazzo N, Dogimont C, Aarouf J; 2011. Histological study of organogenesis in *Cucumis melo* L. after genetic transformation: Why is it difficult to obtain transgenic plants?. *Plant Cell Rep.* 30:2001-2011.
- Compton ME & Gray DJ; 1994. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of tetraploid watermelon. *HortScience*, 29 (3): 211-213.
- Compton ME, Gray DJ; 1993. Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid and tetraploid watermelon. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 118: 151–157.
- Curuk S, Cetiner S, Elman C, Xia X, Wang Y, Yeheskel A, Zilberstein L, Perl Treves R, Watad AA, Gaba V; 2005. Transformation of recalcitrant melon (*Cucumis melo* L.) cultivars is facilitated by wounding with carborundum. *Eng. Life Sci* 5:169-177.
- Da Silva Souza A; 1999. Respuesta cultural y orfogenética de explantes y protoplastos de diversos cultivares de melón y primeros resultados en torno a la hibridación somática. *Cucumis melo* L., *Citrullus lanatus*. Thunberg Matsumura & Nakai. Tesis doctoral Universidad politécnica de Valencia, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos.
- Dabauza M, Gonzalez L, Bordas M, Roig LA, Ramon D, Moreno V; 1998. Regeneration and characterisation of *Cucumis melo* L. (+) *Cucumis anguria* L. var. *longipes* (Hook. Fil.) Meeuse somatic hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52: 123-131.

- Debeaujon I & Branchard M; 1992. Induction of somatic embryogenesis and caulogenesis from cotyledon and leaf protoplast-derived colonies of melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Reports*, 12 (1):37-40.
- Dong JZ, Yang MZ, Jia SR, Chua NH; 1991. Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. *Bio-Technology*, 9: 9,858-863.
- Ellul P, Rios G, Atares A, Roig L, Serrano R & Moreno V; 2003. The expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HAL1 gene increases salt tolerance in transgenic watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsun. & Nakai.] *Theor. Appl. Genet.*, 107 (3) , pp. 462– 469.
- Esquinas-Alcazar, Gulick JT & Gulick JP; 1983. Genetic resources of Cucurbitaceae: a global report. International Board for Plants Genetic Resources, Rome.
- Ezura H & Oosawa K; 1994. Ploidy of somatic embryos and the ability to regenerate plantlets in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Reports*, 14 (2/3): 107-111.
- Fakhrai H & Fakhrai F; 1991. Hormonal control of growth and development. En: Pollard JW; Walker JM (eds.). *Plant Cell and Tissue Culture*. The Humana Press Inc., Clifton, USA, pp: 49-56.
- Fang G & Grumet R; 1990. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants. *Plant Cell Reports*, 9 (3): 160-164.
- Fang GW, Grumet R; 1993. Genetic engineering of potyvirus resistance using constructs derived from the zucchini yellow mosaic virus coat protein gene. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 6: 3, 358-367.
- Fassuliotis G & Nelson BV; 1992. Regeneration of tetraploid muskmelons from cotyledons and their morphological differences from two diploid muskmelon genotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117 (5): p. 863-866.
- Ficcadenti N & Rotino GL; 1995. Genotype and medium affect shoot regeneration of melon. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 40 (3): 293-295.
- Fullner KJ & Nester EW; 1996. Temperature effects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* (178): 1498–1504.
- Gaba V & Antignus Y; 1992. An in vitro selection method for a melon variety which regenerates by direct organogenesis. *Cucurbit Genetics Cooperative*, (15): 65-66.
- Galperin M, Patlis L, Ovadia A, Wolf D, Zelcer A & Kenigsbuch D; 2003. A melon genotype with superior competence for regeneration and transformation. *Plant Breeding* 122, 66-69.
- Gambley RL & Dodd WA; 1990. An in vitro technique for the production de novo of multiple shoots In cotyledon explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20(3): 177-183.
- Gambley RL & Dodd WA; 1991. The influence of cotyledons in axillary and adventitious shoot production from cotyledonary nodes of *Cucumis sativus* L. (cucumber). *Journal of Experimental Botany*, 42 (242): 1131-1135.

- García-Almodóvar, R & Gosalvez, B & Aranda, Miguel & Burgos, Lorenzo; 2017. Production of transgenic diploid Cucumis melo plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 10.1007/s11240-017-1227-2.
- García-Sogo B; 1990. Morfogénesis en cultivo in vitro de melón; regeneración de plantas con alta eficacia a partir de células y protoplastos. Tesis Doctoral. Valencia, España: Universidad de Valencia. Facultad de Ciencias Biológicas. 337p.
- Goergen G; 2016. Generación de líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), identificación de mutantes de inserción afectados en caracteres del desarrollo y caracterización de mutantes de fruto partenocárpico. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Biotecnología, (IBMCP), Valencia, España
- Gonsalves C, Xue B, Yepes M, Fuchs M, Ling K, Namba S, Chee P, Slightom L & Gonsalves D; 1994. Trasferring cucumber mosaic virus-white leaf strain coat protein gene into Cucumis melo L. and evaluating transgenic plants for protection against infections. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119 (2): 345-355.
- Gray DJ, McColley DW & Compton ME; 1993. High-frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of Cucumis melo cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118 (3): 425-432.
- Grisvard J, Seignac M, Chateau M & Branchard M; 1990. Changes in a repetitive DNA sequence during callus culture of Cucumis melo. *Plant Science*, 72(1): 81-91.
- Guis M, Amor MB, Latché A, Pech JC & Roustan JP; 2000. A reliable system for the transformation of cantaloupe charentais melon (*Cucumis melo* L. var. cantalupensis) leading to a majority of diploid regenerants. *Scientia Horticulturae*, Vol. 84 (1-2): 91-99.
- Guis M, Roustan JP, Dogimont C, Pitrat M & Pech JC; 1998. Melon Biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 15:1, 289-312.
- Handro W & Floch EIS; 1990. A organização de um laboratório de cultura de recidos de plantas. Torres AC & Caldas LD (eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas*. ABCTP/EMBRAPA-CNPH, Brasília, Brasil, parte II, pp: 29-36.
- Hao J, Niu Y, Yang B, Gao F, Zhang L, Wang J, Hasi A; 2011 Transformation of a marker-free and vector-free antisense ACC oxidase gene cassette into melon via pollen tube pathway. *Biotechnol. Lett.* 33:55-61.
- Harlan JR, Wet JMJ, Stemler ABL; 1997. Origin of Africa plant domestication. In: *The origin of agriculture and crop domestication*. A.B. Damania et al. (Eds.). ICARDA, IPGRI, FAO e UC/GRCP.
- Hellens R & Mullineaux P; 2000. A guide to Agrobacterium binary Ti vectors. *Trends Plant Science* (5): 446–451.
- Hossain M, Rahman SM, Islam R & Joarder OI; 1993. High efficiency plant regeneration from petiole explants of *Carica papaya* L. through organogenesis. *Plant Cell Reports*, 13: 99102.
- Jain K & More TA; 1992. In vitro regeneration in Cucumis melo cv. Pusa Madhuras. *Cucurbit Genetics Cooperative*, (15):62-64.

- Japón J; 1981. Cultivo de Melón y Sandía. Hojas divulgadoras Núm. 23-24/81HD. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Jeffrey C; 1990. Systematic of the Cucurbitaceae: An overview in biology and utilization of the Cucurbitaceae (DM Bates, RW Robinson y C Jeffrey, eds.) Cornell University Press, Ithaca, USA
- Kathal R, Bhatnagar SP & Bhojwani SS; 1994. Plant regeneration from the callus derived from root explants of *Cucumis melo* L. cv. Pusa Sharbati. *Plant Science*, 98(1/2): 137-142.
- Kerje T; 2003. Descriptors for Melon (*Cucumis melo*, L.). Internacional Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Kim YH & Janick K; 1989. Somatic embryogenesis and organogenesis in cucumber. *HortScience*, 24 (4): 702.
- Kirkbride JH; 1993. Biosystematic monograph of the genus *Cucumis* (Cucurbitaceae). Parkway Publishers, 159 p., Boone, North Carolina, USA.
- Li R, Sun Y, Zhang L & Li X; 1990. Plant regeneration from cotyledon protoplasts of Xinjiang muskmelon. *Plant Cell Reports*, 9 (4): 199-203-
- Linnaeus C ; 1753. *Species plantarum*. Impensis Laurentii Salvii, Estocolmo, Suecia.
- Litz RE & Jarret RL; 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca WM; Mroginski LA (eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, parte A, cap. 7, pp: 143-172
- Lou H & Kako S; 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cucumber. *HortScience*, 29 (8): 906-909
- Lou H & Kako S; 1995. Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. *Scientia Horticulturae*, 64: 11-20.
- Lou H, Obara-Okeyo P, Tamaki M & Kako S; 1996. Influence of sucrose concentration on in vitro morphogenesis cultured cucumber cotyledon explants. *Journal of Horticultural Science*, 71 (3): 497-502.
- Mackay WA, NG TJ & Hammerschlag FA; 1989. Direct and indirect regeneration of *Cucumis melo* L. from cotyledon culture. *Cucurbit Genetics Cooperative*, (12): 55-57.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J; 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Mármol J; 2008. Cultivo intensivo del melón. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación.
- Mármol J; 2007. Cultivo intensivo del melón. Hojas divulgadoras Núm. 21-25HD. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Mathews H, Schopke C, Carcamo R, Chavarriaga P, Fauquet C & Beachy RN; 1993. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. *Plant Cell Reports*, 13: 328-333
- Melara MV & Gatica Arias AM; 2009. Effect of BAP and IAA on shoot regeneration in cotyledonary explants of Costa rica melon genotypes. *Agronomía Costarricense* 33(1): 125-131. ISSN: 0377-9424.

- Mohiuddin AKM, Abdullah ZC, Chowdhury MKU & Suhaimi Napis; 2005. Enhancement of adventitious shoot regeneration in *Cucumis sativus* L. using AgNO<sub>3</sub>. *Plant Tissue Cult.* 15(1): 15-23, 2005 (June).
- Molina RV & Nuez F; 1995b. Correlated response of in vitro regeneration capacity from different source of explants in *Cucumis melo*. *Plant Cell Reports*, 15, (1/2): 129-132.
- Molina RV & Nuez F; 1996. The inheritance of organogenic response in melon. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46 (3): 251-256.
- Moreno V & Roig LA; 1990. Somaclonal variation in cucurbits. En BAJAJ y PS (ed.). *Biotechnology in agricultura and forestry*. Vol. 11. Somaclonal variation in crop improvement I. Springer Verlag Heidelberg, Berlin, p: 435-464.
- Moreno V, M, Granell I, García-Sogo B & Roig LA; 1985. Plant regeneration from calli of melon (*Cucumis melo* L. cv. 'Amarillo oro'). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5: 139-146.
- Nanasato Y, Konogaya K, Okuzaki A, Tsuda M & Tabei Y; 2012. Improvement of Agrobacterium mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by combination of vacuum infiltration and co-cultivation on filter paper wicks. *Plant Biotechnol Rep.* DOI 10.1007/s11816-012-0260-1.
- Niedz RP, Smith SS, Dumbar KB, Stephens CT & Musakishi HH; 1989. Factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 18 (3): 313-319.
- Nora FR, Peters JA, Schuch MW, Lucchetta L, Marini L, Silva JA & Rombaldi CV; 2001. Melon regeneration and transformation using an apple ACC oxidase antisense gene. *Rev. Bras. De Agrociência*, v.7 n 3, p.201-204.
- Nuñez-Palenius HG, Cantliffe DJ, Huber DJ, Ciardi J & Klee H; 2006. Transformation of muskmelon 'Galia' hybrid parental line (*Cucumis melo* L. var. *reticulatos* Ser.) with an antisense ACC oxidase gene. *Plant Cell Rep*, 25: 198-205.
- Nuñez-Palenius HG, Febres VJ, Ochoa-Alejo N, Klee HJ, & Cantliffe DJ; 2007. Effect of explant source on refeneration and genetic transformation efficiency in Galia melon (*Cucumis melo* L.) male and female parental lines. Horticultural Sciences Department. IFAS. University of Florida, Gainesville, FL 32611, USA.
- Nuñez-Palenius HG, Gomez-Lim M, Ochoa-Alejo N, Gumet R, Lester G & Cantliffe DJ; 2008. Melon Fruits: Genetic Diversity, Physiology, and Biotechnology Features. *Journal Critical Reviews in Biotechnology*, Volume 28.
- Orts MC, García-Sogo B, Roche MV, Roig LA & Moreno V; 1987. Morphogenetic response of calli derived from primary explants of diverse cultivars of melón. *HortScience*, 22(4): 666.
- Orts MC, Roche MV, Salvador A, García-Sogo B, Roig LA & Moreno V; 1986. Características culturales y morfogenéticas de dos mutantes recesivos de melón: 'Yellos-Green' y 'Halo'. *Actas de II Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas*, vol. II, pp: 861-869. Córdoba, España.

- Pérez-Sanjuan A; 1999. Estudio de las primeras etapas del proceso de transformación genética en pepino mediante co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens*. Trabajo Final de Carrera. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Punja ZK, Abbas N, Sarmiento GG & Tang FA; 1990a. Regeneration of *Cucumis sativus* var. *sativus* and *C. sativus* var. *hardwickii*, *C. melo*, and *C. metuliferus* from explants through somatic embryogenesis and organogenesis. Influence of explant source, growth regulator regime and genotype. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21 (2): 93-102.
- Ren Y, Bang H, Curtis IS, Gould J, Patil BS & Crosby KM; 2012. *Agrobacterium*-mediated transformation and shoot regeneration in elite breeding lines of western shipper cantaloupe and honeydew melons (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 108:147–158.
- Rhimi A, Fadhel NB & Boussaid M; 2006. Plant regeneration via somatic embryogenesis from in vitro tissue culture in two Tunisian *Cucumis melo* cultivars Maazoun and Beji. *Plant Cell, Tissue and Organic Culture*, Volume 84 (2): 239-243.
- Rhimi A, Hernould M & Boussaid M; 2007. *Agrobacterium* mediated transformation of Tuniasian *Cucumis melo* cv. Maazoun. *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (18), pp. 2162-2165.
- Sanchez S; 2016. Generación de mutantes de inserción de tomate cultivado y Silvestre e identificación de genes implicados en procesos de desarrollo y tolerancia a estrés abiótico. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Biotecnología, (IBMCP), Valencia, España
- Sekiya J, Hamade R, Kimura O, Mizuno K & Shimose N; 1990. Purification and properties of ascorbate oxidase from cucumber fruit.
- Sharma M, Kothari-Chajer A, Jagga-Chug S & Kothari SL; 2010. Factoris influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Eleusine coracana* L. Gaertn. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* Vol. 105: 93-104.
- Silberstein L, Kovalski I, Huang R, Anagostou K, Jahn JM, Perl-Treves R; 1999. Molecular variation in melon (*Cucumis melo* L.) as revealed by RFLP and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 79:101-111.
- Smulders MJM, Rus-Kortekaas W, Guissen LJW; 1994. Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Plant Sci*. 97: 53–60.
- Srivastava DR, Andrianov VM & Piruzian ES; 1989. Tissue culture and plant regeneration of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad. cv. Melitopolski). *Plant Cell Rep.* 83300-302.
- Stachel SE, Messens E, Van Montagu M, 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.
- Tabei Y, Kanno A, Igarashi I & Nishio T; 1987. Plant regeneration from cotyledon protoplast of *Cucumis melo* L. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 56 (2): 236–237
- Tabei Y, Kanno T & Nishio T; 1991. Regulation og organogenesis and somatic embryogenesis by auxin in melon, *Cucumis melo* L. *Plant Cell Reports*, 10 (5): 225-229.

- Tamaro D; 1981. Manual de Horticultura. 6ta. Edición Ed. Gustavo Gili. Barcelona, España.
- Toyoda H, Hosoi Y, Yamamoto A, Nishiguchi T, Maeda K, Takebayashi T, Shiomi T, Ouchi S ;1991. Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Tissue Culture Letters*, 8: 21-27.
- Trentini L; 1998. Orígenes e botánica del melón. *Suplemento a l'Informatore Agrario* 3: 56.
- Truslon AJ & Shahin EA; 1986. In vitro plant regeneration in the genus *Cucumis*. *Plant Science*, 47 (1): 35-43.
- Valles MP, Lasa JM; 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of comercial melon (*Cucumis melo* L., cv. Amarillo Oro). *Plant Cell Rep.* 13:145-148.
- Vasudevan A, Ganapathi A, Selvaraj N, Muruganantham M & Vengadesan G; 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 25: 14-16.
- Vasudevan A, Selvaraj N, Ganapathi A & Choi CW; 2007. *Agrobacterium*-mediated Genetic transformation in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *American Journal of Biotechnology and Biochemistry* 3 (1): 24-32, 2007.
- Whener TC & Locy RD; 1981. In vitro adventitious shoot and root formation of cultivars and lines of *Cucumis sativus*. *HortScience* 16: 759.
- Yadav RC, Saleh MT & Grumet R; 1996. High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45(3): 207-214.
- Yalcin-Mendi NY, Ipek M, Serbest-Kobaner S, Curuk S, Aka C, Kacar Y, Cetiner S, Gaba V, Grumet R; 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation of Kirkagac 637 a recalcitrant melon (*Cucumis melo* L.) cultivar with ZYMV coat protein encoding gene. *Eur J Hortiv Sci* 69:258-262.
- Yasmin A & Debener T; 2010. Transient gene expression in rose petals via *Agrobacterium* infiltration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 102 (2): 245-250.
- Yin Z, Szwacka M, Malinowski R & Malepszy S; 2004. Differences in the inheritance stability of kanamycin resistance between transgenic cucumbers (*Cucumis sativus* L.) containing two constructs. *Journal Apply Genetics* 45(3): 307–313.
- Zapata M, Cabrera P, Bañón S, Roth P; 1989. El melón. 174 p. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Zapata M; 1989. La comercialización del melón: Evolución histórica y proceso actual. *Horticultura*, 46:16-23.
- Zhang XP, Rhodes BB & Adelberg JW; 1994. Shoot regeneration from immature cotyledons of watermelon. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, (17): 111-115.