

Índice general

ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	xiii
RESÚMENES	xvii
I. INTRODUCCIÓN	
1. Generalidades sobre el pepino y especies relacionadas	1
2. Mutantes e identificación de genes en pepino	3
3. Problemática en torno al aprovechamiento de la variación extraespecífica	5
4. Transformación genética en pepino	9
4.1. Métodos de transformación	9
4.2. Adecuación de los genes marcadores en la selección de plantas transgénicas	11
4.3. Adecuación de los genes delatores en la detección de eventos de transformación	15
4.4. Transformación sin genes marcadores o empleando solo genes delatores	20
4.5. Métodos de regeneración en experimentos de transformación	22
5. Introducción y expresión de genes foráneos en plantas transgénicas de pepino que potencialmente pueden conferir caracteres relevantes	25
5.1. Tolerancia o resistencia a virus	25
5.2. Tolerancia o resistencia frente a hongos fitopatógenos	27
5.3. Tolerancia frente a estrés abiótico	28
5.4. Mejora de la calidad organoléptica	29
5.5. Pepinos transgénicos en la industria de cosméticos	32
5.6. Mejora de la producción	33
5.7. Frutos sin semillas	34

5.8. Objetivos relacionados con la salud	35
5.9. Transformación genética de pepino vía <i>Agrobacterium</i>	36
II. OBJETIVOS	49
III. MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Material Vegetal	53
2. Técnicas básicas de cultivo <i>in vitro</i>	53
2.1. Esterilización de semillas.....	53
2.2. Obtención de plántulas axénicas.....	54
2.3. Extracción de explantes de cotiledón a partir de plántulas axénicas.....	54
2.4. Obtención de plantas axénicas por cultivo de ápices meristemáticos.....	54
2.5. Extracción de explantes de hoja a partir de plantas axénicas	55
2.6. Cultivo de explantes primarios e inducción de organogénesis	55
2.7. Desarrollo de brotes.....	55
2.8. Enraizamiento de brotes axénicos.....	56
2.9. Propagación clonal	56
2.10. Condiciones de incubación.....	56
3. Morfogénesis de explantes primarios vía organogénesis	57
4. Determinación del nivel de ploidía mediante citometría de flujo.....	58
5. Soluciones minerales, vitamínica y medios de cultivo	59
5.1. Solución mineral MS.....	59
5.2. Medio de germinación MG.....	60
5.3. Solución vitamínica RT.....	60
5.4. Medio base MB3	61
5.5. Medios de inducción de organogénesis	62
5.6. Medios de desarrollo y elongación de brotes	65
6. Transformación genética vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	66
6.1. Material vegetal.....	66
6.2. Cepas bacterianas, vectores y genes incluidos en el T-DNA	66

6.3. Preparación de la suspensión bacteriana.....	67
6.3.1. Crecimiento bacteriano	67
6.3.2. Preparación del cultivo bacteriano para la transformación	68
6.4. Método de transformación, selección y regeneración de plantas transgénicas	68
6.5. Medios de cultivo específicos para la transformación	71
6.5.1. Medios de lavado	71
6.5.2. Medios de crecimiento de bacteria LB líquido y sólido y YEP líquido	72
6.6. Evaluación de la resistencia a la kanamicina en transformantes primarios	73
6.7. Análisis de la expresión del gen delator <i>uidA-int</i> (<i>Gus-int</i>)	73
6.8. Extracción de ADN y análisis PCR	74
7. Tratamiento estadístico	75
8. RESPUESTA MORFOGENÉTICA EN EXPLANTES DE PEPINO	76
8.1. Efecto del genotipo, explante y medio de cultivo sobre la respuesta organogénica	76
8.2. Efecto del medio de cultivo sobre la respuesta morfogénica de cuatro líneas puras	79
8.3. Efecto del sulfato de cobre en la respuesta organogénica de explantes de tres cultivares de pepino.....	80
8.4. Efecto de las condiciones de incubación sobre la respuesta organogénica en explantes de pepino.....	82
8.5. Efecto de la edad de la plántula sobre la respuesta organogénica y el grado de mixoploidía de los explantes de cotiledón y el nivel de ploidía de las plantas regeneradas	83
8.6. Efecto del nitrato de plata sobre la respuesta organogénica de los explantes de cotiledón	85
9. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PEPINO MEDIANTE CO-CULTIVO DE EXPLANTES PRIMARIOS CON <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	86
9.1. Experimentos previos a la inoculación de los explantes con <i>Agrobacterium</i>	86
9.1.1. Efecto de la acetosiringona sobre la respuesta morfogénica.....	86
9.1.2. Efecto de la cefotaxima sobre la respuesta morfogénica.....	88

9.1.3. Descripción de los experimentos realizados	91
9.2. Co-cultivo de explantes primarios de los cultivares 'Marketer' y 'Negrito' con el vector pBIN19 y selección con kanamicina	92
9.2.1. Descripción de los experimentos realizados	98
9.3. Co-cultivo de explantes primarios del cultivar 'Marketer' con la cepa C58 que porta el vector pBIG121-Hm y selección con kanamicina	100
9.3.1. Efecto de la duración del co-cultivo sin presión de selección y del medio inductor de organogénesis con presión selectiva	100
9.3.2. Efecto de un proceso de selección mixto en la fase de co-cultivo y en la etapa de inducción de organogénesis	104
9.3.3. Efecto del nitrato de plata y del sulfato de cobre en el medio de inducción de organogénesis y del aumento de la concentración de kanamicina en los medios de elongación y enraizamiento	107
9.4. Selección con higromicina tras el co-cultivo de explantes primarios de los cultivares 'Marketer', 'Negrito' y 'Wisconsin 2843'	110
9.5. Descripción de los experimentos realizados	113
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1. RESPUESTA MORFOGENÉTICA EN EXPLANTES DE PEPINO	115
1.1. RESULTADOS	115
1.1.1. Efecto del genotipo, explante y medio de cultivo sobre la respuesta organogénica	115
1.1.2. Efecto del medio de cultivo sobre la respuesta morfogénica de cuatro líneas puras	129
1.1.3. Efecto del sulfato de cobre en la respuesta organogénica de explantes de tres cultivares de pepino	129
1.1.4. Efecto de las condiciones de incubación sobre la respuesta organogénica en explantes de pepino	132
1.1.5. Efecto de la edad de la plántula sobre la respuesta organogénica y el grado de mixoploidía de los explantes de cotiledón y el nivel de ploidía de las plantas regeneradas	134

1.1.6. Efecto del nitrato de plata sobre la respuesta organogénica de los explantes de cotiledón.....	141
1.2. DISCUSIÓN.....	144
1.2.1. Crecimiento y formación de callo en explantes de pepino	144
1.2.2. Influencia del cultivar en la respuesta organogénica.....	145
1.2.3. Respuesta organogénica en explantes de cuatro líneas puras de pepino.....	147
1.2.4. Efecto del tipo de explante sobre la respuesta morfogénica.....	148
1.2.5. Preparación del explante de cotiledón y localización de las células competentes para la regeneración.....	149
1.2.6. Efecto de los reguladores del crecimiento	150
1.2.7. Efecto del sulfato de cobre.....	155
1.2.8. Efecto de las condiciones de incubación.....	157
1.2.9. Influencia de la edad de la planta a partir de la que se obtienen los explantes.....	158
1.2.10 Efecto del nitrato de plata sobre la respuesta morfogénica	159
1.2.11.Endorreduplicación en los explantes de cotiledón y nivel de ploidía de las plantas regeneradas.....	161
2. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PEPINO MEDIANTE CO-CULTIVO DE EXPLANTES PRIMARIOS CON <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	165
2.1. RESULTADOS.....	165
2.1.1. Experimentos previos a la inoculación de explantes con <i>Agrobacterium</i>	168
2.1.1.1. Efecto de la acetosiringona sobre la respuesta morfogénica.....	168
2.1.1.2.Efecto de la cefotaxima sobre la respuesta morfogénica.....	169
2.1.2. Co-cultivo de explantes primarios de los cultivares 'Marketer' y 'Negrito' con el vector pBIN19 y selección con kanamicina	172
2.1.3. Co-cultivo de explantes primarios del cultivar 'Marketer' con la cepa C58 que porta el vector pBIG121-Hm y selección con kanamicina.....	179
2.1.3.1.Efecto de la duración del co-cultivo sin presión de selección y del medio inductor de organogénesis con presión selectiva	179

2.1.3.2. Efecto de un proceso de selección mixto en la fase de co-cultivo y en la etapa de inducción de organogénesis	185
2.1.3.3. Efecto del nitrato de plata y del sulfato de cobre en el medio de inducción de organogénesis y del aumento de la concentración de kanamicina en los medios de elongación y enraizamiento	192
2.1.4. Selección con higromicina tras el co-cultivo de explantes primarios de los cultivares 'Marketer', 'Negrito' y 'Wisconsin 2843'	201
2.2. DISCUSIÓN	210
2.2.1. Co-cultivo de explantes primarios	211
2.2.2. Medios de cultivo para la inducción de organogénesis y elongación de los brotes adventicios	213
2.2.2.1. Reguladores del crecimiento	213
2.2.2.2. Nitrato de plata	214
2.2.2.3. Sulfato de cobre	216
2.2.3. Selección de plantas transgénicas de pepino	217
2.2.4. Estimación de la tasa de transformación en pepino	219
2.2.5. Escapes y quimeras en experimentos de transformación	228
2.2.5.1. El cultivo en medio selectivo no excluye la aparición de escapes y quimeras	229
2.2.5.2. Escapes y quimeras	230
2.2.5.3. Posibles causas de la aparición de escapes	232
2.2.5.4. Escapes transgénicos	260
2.2.5.5. Quimeras en experimentos de transformación	261
V. CONCLUSIONES	265
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	267