

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

Departamento de Biotecnología

---



**Estudios sobre Regeneración y  
Transformación Genética en  
Pepino (*Cucumis sativus* L.) vía  
*Agrobacterium tumefaciens***

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

Jorge Alexandre Fonseca Miguel

Dirigida por:

Dr. Vicente Moreno Ferrero

Dr. Philippe Richard Ellul

**Valencia, Junio 2017**



# Estudios sobre Regeneración y Transformación Genética en Pepino (*Cucumis sativus* L.) Vía *Agrobacterium tumefaciens*

Memoria e investigación realizadas por Jorge Alexandre Fonseca Miguel en el Laboratorio de 'Cultivo in vitro y Mejora Vegetal' del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica de Valencia – Consejo Superior de Investigaciones Científicas), para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo por el Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia.

Valencia, a 15 de Junio de 2017

Jorge Alexandre Fonseca Miguel



D. Vicente Moreno Ferrero, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Genética del Departamento de Biotecnología, de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia y

D. Philippe Richard Ellul, Doctor en Ciencias Biológicas por el Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia

Hacen constar que:

D. Jorge Alexandre Fonseca Miguel, Licenciado en Ingeniería Agronómica, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia y que lleva por título: "Estudios sobre regeneración y transformación genética en pepino (*Cucumis sativus* L) vía *Agrobacterium tumefaciens*".

Para que así conste a los efectos académicos oportunos, firma el presente certificado en Valencia a 12 de Mayo de 2017.

D. Vicente Moreno Ferrero

D. Philippe Richard Ellul



*A mi padre*





## AGRADECIMIENTOS

A todas las personas e instituciones que de una forma u otra han permitido la consecución de este trabajo, y en especial a mis directores de tesis, el Dr. Vicente Moreno Ferrero y el Dr. Philippe Ellul por todo el apoyo y disponibilidad, a la Agencia Española de Cooperación Internacional por la beca de doctorado concedida, a los doctores Alejandro Atarés, Benito Pineda y Begoña García por la incansable ayuda en la recta final de la tesis, y a mi familia, amigos y colegas por su indispensable presencia, mis más sinceros agradecimientos.

Valencia, a 12 de mayo de 2017

Jorge Alexandre Fonseca Miguel



“Los antiguos que desearon ilustrar ilustre virtud por todo el reino, primero ordenaron bien sus propios estados. Deseando ordenar bien sus propios estados, ellos primero regularon sus familias. Deseando regular sus familias, ellos primero cultivaron sus personas. Deseando cultivar sus personas, ellos primero rectificaron sus corazones. Deseando rectificar sus corazones, ellos primero procuraron ser sinceros en sus pensamientos. Deseando ser sinceros en sus pensamientos, ellos primero extendieron al sumo sus conocimientos. Tal extensión de conocimientos asienta en la investigación de las cosas.

Cosas siendo investigadas, conocimiento se tornó completo. Sus conocimientos estando completos, sus pensamientos eran sinceros. Sus pensamientos siendo sinceros, sus corazones eran entonces rectificados. Sus corazones siendo rectificados, sus personas eran cultivadas. Sus personas siendo cultivadas, sus familias eran reguladas. Sus familias siendo reguladas, sus estados eran correctamente gobernados. Sus estados siendo correctamente gobernados, todo el reino se había hecho tranquilo y feliz.”

*Confucio (551 a. C. – 479 a. C.)*

*El gran aprendizaje (500 a. C.)*



# Índice general

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	vii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b> .....	xiii
<b>RESÚMENES</b> .....	xvii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
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
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
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 .....	69
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 (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 .....	99
9.3.1. Efecto de la duración del co-cultivo sin presión de selección y del medio inductor de organogénesis con presión selectiva .....	99
9.3.2. Efecto de un proceso de selección mixto en la fase de co-cultivo y en la etapa de inducción de organogénesis .....	103
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 .....	114
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
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 morfogenética.....	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 morfogenética .....	159
1.2.11. Endoreduplicación 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 morfogenética.....	168
2.1.1.2. Efecto de la cefotaxima sobre la respuesta morfogenética.....	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
<b>2.2. DISCUSIÓN</b> .....	<b>210</b>
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 .....	220
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
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	<b>265</b>
<b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>267</b>

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Transformación genética de pepino vía <i>Agrobacterium</i> .....	37
<b>Tabla 2.</b> Solución mineral MS.....	59
<b>Tabla 3.</b> Medio de germinación MG .....	60
<b>Tabla 4.</b> Solución vitamínica RT .....	60
<b>Tabla 5.</b> Medio base MB3 .....	61
<b>Tabla 6.</b> Medios de inducción de organogénesis.....	62
<b>Tabla 7.</b> Medios de inducción de organogénesis con $\text{CuSO}_4$ .....	63
<b>Tabla 8.</b> Medios de inducción de organogénesis con $\text{AgNO}_3$ .....	64
<b>Tabla 9.</b> Medios de desarrollo y elongación de brotes K02 y FCu .....	65
<b>Tabla 10.</b> Medio de lavado MB .....	71
<b>Tabla 11.</b> Medio de crecimiento de bacteria LB líquido .....	72
<b>Tabla 12.</b> Medio de crecimiento de bacteria LB sólido.....	72
<b>Tabla 13.</b> Medio de crecimiento de levadura/ bacteria YEP líquido.....	72
<b>Tabla 14.</b> Estudios previos al co-cultivo de explantes primarios con <i>A. tumefaciens</i> .....	91
<b>Tabla 15.</b> Co-cultivo de explantes primarios con la cepa LBA4404 y el vector pBIN19.....	98
<b>Tabla 16.</b> Co-cultivo de explantes primarios con la cepa LBA4404 o C58 y el vector pBIG121-Hm.....	114
<b>Tabla 17.</b> Efecto de la acetosiringona sobre la respuesta organogénica de explantes de cotiledón del cultivar 'Marketer' en el medio IB 05 25.....	170
<b>Tabla 18.</b> Efecto de la cefotaxima sobre la respuesta organogénica de explantes de cotiledón del cultivar 'Marketer' tras el pase por los medios de inoculación LB o YEP sin <i>Agrobacterium</i> .....	170
<b>Tabla 19.</b> Efecto de la cefotaxima sobre la respuesta organogénica de explantes de cotiledón del cultivar 'Marketer' tras el pase por el medio de inoculación LB sin <i>Agrobacterium</i> .....	171

<b>Tabla 20.</b> Efecto de la concentración de kanamicina sobre explantes de cotiledón inoculados con una cepa de <i>A. tumefaciens</i> que porta el plásmido pBIN19.....	176
<b>Tabla 21.</b> Ensayos con plantas seleccionadas como presuntas transgénicas: test de ápice y test de explante en medio con kanamicina y análisis por PCR.....	178
<b>Tabla 22.</b> Efecto del co-cultivo sin presión de selección y del medio de inducción de organogénesis con presión selectiva (25 mg/l de kanamicina) sobre la expresión del gen delator <i>uidA-int</i> en los callos seleccionados .....	182
<b>Tabla 23.</b> Efecto del co-cultivo sin presión de selección y del medio de inducción de organogénesis con 25 mg/l de kanamicina sobre el porcentaje de callos con brotes y el número de plantas seleccionadas como presuntas transgénicas .....	183
<b>Tabla 24.</b> Efecto de un co-cultivo mixto (primera etapa sin presión de selección y segunda con 25 mg/l de kanamicina) sobre la expresión del gen <i>uidA-int</i> en los callos seleccionados.....	188
<b>Tabla 25.</b> Efecto de un co-cultivo mixto (primera etapa sin presión de selección y segunda con 25 mg/l de kanamicina) sobre la extensión de las zonas con expresión del gen delator <i>uidA-int</i> en los callos seleccionados .....	189
<b>Tabla 26.</b> Efecto de un proceso de selección mixto (primera etapa sin presión de selección y segunda con 25 mg/l de kanamicina) sobre la expresión del gen delator <i>uidA-int</i> en los callos seleccionados .....	190
<b>Tabla 27.</b> Efecto de un proceso de selección mixto (primera etapa sin presión de selección y segunda con 25 mg/l de kanamicina) sobre la extensión de las zonas con expresión del gen delator <i>uidA-int</i> en los callos seleccionados .....	191
<b>Tabla 28.</b> Efecto del nitrato de plata y del sulfato de cobre en el medio de inducción de organogénesis con presión selectiva sobre el porcentaje de callos con brotes y el número de plantas seleccionadas como presuntas transgénicas.....	197
<b>Tabla 29.</b> Análisis de expresión del gen delator <i>uidA-int</i> en plantas seleccionadas tras el cultivo en medio de inducción de organogénesis selectivo (25 mg/l de kanamicina), el subcultivo en medio de elongación selectivo (100 mg/l de kanamicina) y el enraizamiento de los brotes en medio base selectivo (100 mg/l de kanamicina) .....	198
<b>Tabla 30.</b> Efecto del nitrato de plata y del sulfato de cobre en el medio de inducción de organogénesis con presión selectiva (25 mg/l de kanamicina) sobre la tasa de transformación genética.....	199

<b>Tabla 31.</b> Porcentaje de callos con brotes y número de plantas presuntamente transgénicas tras la selección con higromicina B.....	205
<b>Tabla 32.</b> Análisis de expresión del gen delator <i>uidA-int</i> en plantas seleccionadas tras el cultivo en medio con higromicina.....	207
<b>Tabla 33.</b> Tasa de transformación genética tras la selección en medio con 10 mg/l de higromicina B .....	209



# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Efecto del tipo de explante y del medio de cultivo sobre la respuesta morfo genética de la línea 'Wisconsin 2843'.....	121
<b>Figura 2.</b> Organogénesis a partir de explantes de cotiledón procedentes de plántulas de 4 días de la línea 'Wisconsin 2843'.. .....	123
<b>Figura 3.</b> Efecto del tipo de explante y del medio de cultivo sobre la respuesta morfo genética del cultivar 'Marketer'.....	124
<b>Figura 4.</b> Efecto del tipo de explante y del medio de cultivo sobre la respuesta morfo genética del cultivar 'Negrito'.....	125
<b>Figura 5.</b> Crecimiento y organogénesis a partir de explantes de cotiledón procedentes de plántulas de 4 días del cultivar 'Marketer'.....	126
<b>Figura 6.</b> Organogénesis en explantes de cotiledón de plántulas de 4 días del cultivar 'Negrito'.. .....	126
<b>Figura 7.</b> Respuesta organogénica en explantes de cuatro líneas puras de pepino.....	128
<b>Figura 8.</b> Efecto del sulfato de cobre en la respuesta morfo genética.....	131
<b>Figura 9.</b> Efecto de las condiciones de incubación en la respuesta de explantes de pepino. ....	133
<b>Figura 10.</b> Efecto de la edad de la plántula a partir de la que se extraen los explantes de cotiledón sobre la respuesta morfo genética.....	137
<b>Figura 11.</b> Efecto de la edad de la plántula sobre el grado de endorreduplicación en los núcleos de las células de los explantes de cotiledón de la línea 'Wisconsin 2843'. ....	138
<b>Figura 12.</b> Efecto de la edad de la plántula sobre el grado de endorreduplicación en los núcleos de las células de los explantes de cotiledón del cultivar 'Marketer'.....	138
<b>Figura 13.</b> Efecto de la edad de la plántula sobre el grado de endorreduplicación en los núcleos de las células de los explantes de cotiledón del cultivar 'Negrito'. ....	139
<b>Figura 14.</b> Efecto de la edad de la plántula sobre el nivel de ploidía de las plantas regeneradas a partir de segmentos de cotiledón de la línea 'Wisconsin 2843'. ....	139
<b>Figura 15.</b> Efecto de la edad de la plántula sobre el nivel de ploidía de las plantas regeneradas a partir de segmentos de cotiledón del cultivar 'Marketer'. ....	140

<b>Figura 16.</b> Efecto de la edad de la plántula sobre el nivel de ploidía de las plantas regeneradas a partir de segmentos de cotiledón del cv. 'Negrito'.....	140
<b>Figura 17.</b> Efecto del nitrato de plata sobre la respuesta morfológica de los explantes de cotiledón de pepino.....	142
<b>Figura 18.</b> Plantas de los cultivares 'Marketer' y 'Negrito' seleccionadas como presuntas transgénicas tras el cultivo en los medios de inducción de organogénesis, elongación y enraizamiento suplementados con 25 mg/l de kanamicina. ....	177
<b>Figura 19.</b> Análisis PCR con una sonda del gen <i>nptII</i> de hojas de las plantas seleccionadas tras el proceso de transformación genética de los cultivares 'Marketer' y 'Negrito' con una cepa de <i>A. tumefaciens</i> que porta el plásmido pBIN19 .....	177
<b>Figura 20.</b> Ensayo histoquímico con X-Gluc de la expresión del gen delator <i>uidA-int</i> en callos seleccionados tras la inoculación de explantes del cultivar 'Marketer' con la cepa C58 de <i>A. tumefaciens</i> que porta el plásmido pBIG121-Hm.....	184
<b>Figura 21.</b> Análisis PCR con una sonda del gen <i>nptII</i> de muestras de plantas seleccionadas tras el proceso de transformación genética del cultivar 'Marketer' con la cepa C58 de <i>A. tumefaciens</i> que porta el plásmido pBIG121-Hm.....	184
<b>Figura 22.</b> Primeras etapas en la selección de brotes tras la inoculación de explantes del cultivar 'Marketer' con la cepa C58 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que porta el vector pBIG121-Hm.....	200
<b>Figura 23.</b> Efecto de 10 mg/l de higromicina sobre explantes de cotiledón del cultivar 'Marketer' que no fueron inoculados con <i>Agrobacterium</i> .....	204
<b>Figura 24.</b> Selección de callos y plantas del cultivar 'Marketer' en medio con higromicina. ....	206
<b>Figura 25.</b> Ensayo histoquímico con X-Gluc de la expresión del gen delator <i>uidA-int</i> en explantes de hoja de plantas seleccionadas en medio con higromicina. ....	206
<b>Figura 26.</b> Hipótesis en torno a la aparición de quimeras en experimentos de co-cultivo de explantes de pepino con <i>Agrobacterium</i> .....	224
<b>Figura 27.</b> Tipos de quimeras en el caso que surja una célula mutante en el domo meristemático.....	225
<b>Figura 28.</b> Elongación y enraizamiento de plantas transgénicas de la línea 'Wisconsin 2843'.. ..	226
<b>Figura 29.</b> Método para la segregación de una planta transgénica a partir de una quimera. ....	227



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>(n)C:</b>	un grado de endorreduplicación de n veces
<b>2,4-D:</b>	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
<b>2,4,5-T:</b>	ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético
<b>6-BA:</b>	6-Benciladenina
<b>ABA:</b>	ácido abscísico
<b>ADN:</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>B 25:</b>	medio suplementado con 2,5 mg/l de 6-benciladenina
<b>BC1:</b>	primer retrocruce ( <i>Backcross</i> )
<b>BC2:</b>	segundo retrocruce ( <i>Backcross</i> )
<b>cDNA:</b>	el ADN complementario
<b>CEBAS:</b>	Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura
<b>CMV:</b>	virus del mosaico del pepino
<b>Cre-lox:</b>	sistema de recombinación usado para llevar a cabo delecciones, inserciones, translocaciones o inversiones en sitios específicos del ADN
<b>cv.:</b>	cultivar
<b>dNTPs:</b>	desoxinucleótidos trifosfato
<b>DO<sub>600</sub>:</b>	densidad óptica a 600 nm de longitud de onda
<b>e.g.:</b>	por ejemplo
<b>F1:</b>	primera generación filial
<b>F2:</b>	segunda generación filial
<b>FCu:</b>	medio suplementado con 0,01 mg/l de ácido naftalenacético, 0,1 mg/l de 6-benciladenina y 1 mg/l de sulfato de cobre

<b>FISH:</b>	hibridación fluorescente <i>in situ</i>
<b>g/l:</b>	gramo por litro
<b>GLP-1:</b>	péptido similar al glucagón tipo 1
<b>GLP-T:</b>	gen que codifica para una proteína de fusión (contiene diez repeticiones en tándem del análogo GLP-1)
<b>Gus (uidA):</b>	gen de la $\beta$ -glucuronidasa
<b>Gus-int (uidA-int):</b>	gene de la $\beta$ -glucuronidasa con intrón
<b>hpt:</b>	gen que codifica una higromicina fosfotransferasa
<b>i.e.:</b>	es decir
<b>IAA:</b>	ácido indol-3-acético
<b>iaaM:</b>	gen que codifica para una triptófano monooxigenasa
<b>IB 005 25:</b>	medio suplementado con 0,05 mg/l de ácido indol-3-acético y 2,5 mg/l de 6-benciladenina
<b>IB 05 10:</b>	medio suplementado con 0,5 mg/l de ácido indol-3-acético y 1,0 mg/l de 6-benciladenina
<b>IB 05 25:</b>	medio suplementado con 0,5 mg/l de ácido indol-3-acético y 2,5 mg/l de 6-benciladenina
<b>IBMCP:</b>	Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas
<b>K02:</b>	medio suplementado con 0,2 mg/l de quinetina (6-furfurilaminopurina)
<b>kDa:</b>	kilodaltons
<b>LB:</b>	medio de Luria-Bertani
<b>Lux:</b>	unidad de la iluminancia o nivel de iluminación que equivale a un lumen/m <sup>2</sup>
<b>M:</b>	molaridad
<b>MB3:</b>	medio de Moreno et al. (1985)

<b>MG:</b>	medio de Moreno et al. (1984)
<b>mg/l:</b>	miligramo por litro
<b>mM:</b>	milimolar
<b>mRNA:</b>	RNA mensajero
<b>MS:</b>	solución mineral de Murashige y Skoog (1962)
<b>NAA:</b>	ácido $\alpha$ -naftalenacético
<b>ng</b>	nanogramo
<b>nm:</b>	nanómetro
<b><i>nptII:</i></b>	gen que codifica una neomocina-fosfo-transferasa II
<b>Pb:</b>	par de bases
<b>PCR:</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b><i>pDefH9:</i></b>	promotor del gen <i>Deficiens Homologue 9 (DefH9)</i>
<b>PI:</b>	indica una accesión del sistema estadounidense
<b>Píxel:</b>	la superficie homogénea más diminuta que forma parte de una imagen digital
<b><i>PMI</i> o <i>pmi:</i></b>	gen que codifica una fosfo-manosa-isomerasa
<b>pv.:</b>	patovar
<b>r.p.m.:</b>	revoluciones por minuto
<b>ROS:</b>	especies reactivas de oxígeno
<b>RT:</b>	solución vitamínica de Staba (1969)
<b>SAM:</b>	ápice meristemático del brote
<b>SE:</b>	error estándar
<b>spp.:</b>	especies (taxonomía)
<b>T-DNA:</b>	ADN de transferencia
<b>UE:</b>	Unión Europea

<b><math>V_G/V_P</math>:</b>	heredabilidad en sentido amplio (varianzas genotípica / fenotípica)
<b><i>vir</i>:</b>	genes de virulencia
<b>X-Gluc:</b>	sustrato cromogénico (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido)
<b>YEP:</b>	medio con extracto de levadura, peptona y cloruro de sodio
<b><math>\mu\text{g}</math>:</b>	microgramo
<b><math>\mu\text{l}</math>:</b>	microlitro
<b><math>\mu\text{M}</math>:</b>	micromolar

*Resúmenes*



## Resumen

El pepino es una de las especies hortícolas más importantes a nivel económico. Pese a su relevancia agronómica, no puede decirse que a día de hoy se disponga de un método de transformación adecuado. Los problemas a la hora de conseguir plantas transgénicas de pepino estriban en la baja respuesta morfogénica en explantes de ciertos genotipos, la escasa adecuación de los métodos de selección, el descenso en la tasa de regeneración debido a los tratamientos habituales en un experimento de transformación y, sobre todo, la alta tasa de escapes. En función de la problemática existente, el primer objetivo del presente trabajo ha sido la evaluación de la respuesta morfogénica en explantes de pepino y el desarrollo de métodos de regeneración potencialmente útiles en experimentos de transformación. Estos estudios se han llevado a cabo con dos cultivares comerciales, cuatro líneas puras y una línea que ha sido utilizada frecuentemente en programas de mejora genética de pepino. Se han empleado distintos tipos de explantes primarios para determinar cuál o cuáles pueden ser los más adecuados en un experimento de transformación. Se ha estudiado la influencia del estado ontogénico de la plántula sobre el grado de mixoploidía en explantes de cotiledón. Asimismo, se ha determinado el nivel de ploidía de las plantas regeneradas a partir de estos explantes. Por lo que respecta al medio de cultivo, además de estudiar el efecto de componentes habituales (e.g. reguladores del crecimiento) se ha evaluado el de otros que no lo son tanto, como el nitrato de plata o el sulfato de cobre. En el contexto del segundo objetivo se han realizado una serie de estudios sobre las etapas del proceso de transformación mediante co-cultivo de explantes de pepino con *Agrobacterium tumefaciens*. Se han analizado diversos factores, tales como la cepa de *Agrobacterium*, la forma de llevar a cabo las fases de inoculación y co-cultivo, la adecuación de distintos genes marcadores en el proceso de selección y la influencia de distintos componentes del medio de cultivo. Asimismo, se han tratado de inferir las causas que generan la aparición de escapes o de quimeras en experimentos de transformación de pepino. Por último, sobre la base de los resultados obtenidos, se proponen algunas soluciones que podrían ayudar a evitar este problema en futuros experimentos.





## Summary

Cucumber is one of the most important horticultural species at economic level. Despite its agronomic relevance, there is currently no efficient transformation method available. The problems to obtain transgenic cucumber plants are mainly due to the low morphogenetic response in explants of certain genotypes, poor adequacy of selection methods, decrease in regeneration rate as a consequence of the usual treatments in a transformation experiment and, above all, the high rate of 'escape' plants. Taking into account the existing problems, the first objective of the present work has been the evaluation of the morphogenetic response in cucumber explants and the development of regeneration methods potentially useful in transformation experiments. These studies have been carried out with two commercial cultivars, four pure lines and one line that has been frequently used in cucumber breeding programs. Different types of primary explants have been evaluated to determine which may be the most suitable in a transformation experiment. The influence of the ontogenic state of the seedling on the degree of myxoploidy in cotyledon explants has been studied. Likewise, the ploidy level of regenerated plants from these explants has been determined. Regarding the culture medium, the effect of growth regulators, as well as that of other components, such as silver nitrate or copper sulphate, has been studied. In the context of the second objective, studies on the different stages of the transformation process by co-cultivation of cucumber explants with *Agrobacterium tumefaciens* have been carried out. Several factors, such as the *Agrobacterium* strain, how to carry out the phases of inoculation and co-culture, the suitability of different marker genes in the selection process and the influence of different components of the culture medium have been analyzed. Attempts have also been made to infer the causes of the occurrence of 'escape' plants or the formation of chimeras in cucumber transformation experiments. Finally, based on the results obtained, some solutions that could help to avoid this problem in future experiments are proposed.



## Resum

El cogombre és una de les espècies hortícoles més importants a nivell econòmic. A pesar de la seua rellevància agronòmica, no pot dir-se que a hores d'ara es dispose d'un mètode de transformació adequat. Els problemes a l'hora d'aconseguir plantes transgèniques de cogombre consisteixen en la baixa resposta morfogènica en explants de certs genotips, l'escassa adequació dels mètodes de selecció, el descens en la taxa de regeneració degut als tractaments habituals en un experiment de transformació i, sobretot, l'alta taxa de fugues. En funció de la problemàtica existent, el primer objectiu del present treball ha sigut l'avaluació de la resposta en explants de cogombre i el desenvolupament de mètodes de regeneració potencialment útils en experiments de transformació. Estos estudis s'han dut a terme amb dos cultivars comercials de cogombre, tres línies pures i una línia que ha servit de base en programes de millora. S'han empleat distints tipus d'explants primaris per a determinar quin o quins poden ser els més adequats en un experiment de transformació. Pel que fa al mig de cultiu, a més d'estudiar l'efecte de components habituals (e.g. reguladors del creixement) s'ha avaluat el d'altres que no ho són tant, com el nitrat de planta o el sulfat de coure. Així mateix, s'ha analitzat el grau de mixoploidia en alguns explants i l'efecte de certs tractaments sobre el nivell de ploidia de les plantes regenerades. En el context del segon objectiu s'han realitzat una sèrie d'estudis sobre les etapes del procés de transformació per mitjà de co-cultiu d'explants de cogombre amb *Agrobacterium tumefaciens*. S'han analitzat diversos factors, com ara el cep d'*Agrobacterium*, la forma de dur a terme les fases d'inoculació i co-cultiu, l'adequació de distints gens marcadors en el procés de selecció i la influència de distints components del mig de cultiu. Així mateix, s'han tractat d'inferir les causes que generen l'aparició de plantes no transgèniques (*escape plants*) o de quimeres en experiments de transformació de cogombre. Finalment, sobre la base dels resultats obtinguts es plantegen algunes solucions que ajuden a evitar estos problemes en futurs experiments.



# I. Introducción

---

## 1. Generalidades sobre el pepino y especies relacionadas

La familia de las cucurbitáceas incluye, según la fuente consultada, entre 115 – 125 géneros y en torno a unas 950 especies. En realidad, la clasificación botánica de géneros y especies está en continua revisión, hasta el punto de que, sobre la base de datos obtenidos a través de marcadores y secuencias de DNA nuclear y cloroplástico, recientemente se han catalogado algunas poblaciones como nuevas especies (Sebastiana et al., 2010) que, de confirmarse como tales, están a la espera de recibir el correspondiente nombre científico.

La familia Cucurbitaceae incluye algunas especies cultivadas de gran relevancia económica, entre las que destacan la sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), el pepino (*Cucumis sativus* L.), el melón (*Cucumis melo* L.), las calabazas y calabacines (*Cucurbita* spp.), así como otras especies con una menor importancia y cuyo cultivo se restringe a zonas tropicales (e.g. *Lagenaria* spp.). El cultivo de las principales especies ocupa unos 9 millones de hectáreas y la producción anual está en torno a los 240 millones de toneladas (<http://faostat.fao.org>), lo que da idea de su importancia económica a nivel mundial.

Las especies cultivadas de esta familia exhiben un elevado polimorfismo en el tamaño, forma y color del fruto, debido probablemente a la selección intuitiva durante el proceso de domesticación, así como a la selección más dirigida que dio origen primero a los cultivares autóctonos y, más tarde, a los cultivares modernos. Conviene resaltar que el polimorfismo del fruto se extiende a las especies silvestres. En este sentido, la distribución de la variación en los caracteres del fruto en las especies cultivadas y silvestres de los géneros *Cucumis*, *Citrullus* y *Cucurbita* (por citar los que incluyen las

principales especies cultivadas) contrasta con lo que ocurre en el tomate (la única hortícola cuya importancia económica supera a la de la sandía, pepino y melón) y las especies silvestres relacionadas (incluidas antes en el género *Lycopersicon* y ahora agrupadas en el género *Solanum*). En la gran mayoría de especies cultivadas, el efecto de la selección por parte de los seres humanos ha llevado a un elevado polimorfismo en el órgano u órganos comestibles. Esto es lo que ocurre en el caso del tomate, donde se puede encontrar una variación extrema en caracteres relacionados con el tamaño, forma y color del fruto. En cambio, en todas las especies silvestres relacionadas con el tomate el fruto es siempre pequeño y redondo, variando solo en el color que adquiere en la madurez (verde en la mayoría de especies silvestres y anaranjado o rojo en unas pocas). En cambio, las especies silvestres de la familia Cucurbitaceae exhiben una extrema variación no solo en el tamaño, forma y color del fruto, sino también en otros aspectos, tales como la presencia o no de espinas de longitud, grosor y dureza variables.

La familia Cucurbitaceae exhibe también una rica diversidad en la expresión del sexo, hasta el punto de que el pepino ha servido como una especie modelo en estudios relacionados con la determinación sexual (Tanurdzic y Banks, 2004). Se ha propuesto también el uso del melón como modelo alternativo al tomate en estudios sobre maduración del fruto (Ezura y Owino, 2008). Las cucurbitáceas han sido utilizadas también como especies modelo en trabajos sobre aspectos relacionados con la biología de los haces vasculares, ya que los jugos del xilema y floema pueden ser fácilmente recogidos, haciendo factible el estudio de eventos de señalización a larga distancia (Lough y Lucas, 2006). Teniendo en cuenta la importancia que está adquiriendo el problema de la salinidad, es de esperar que en los próximos años se utilice esta particularidad de las cucurbitáceas para avanzar en el conocimiento del transporte iónico ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) a larga distancia, cosa que no puede llevarse a cabo cuando se utiliza *Arabidopsis thaliana* como especie modelo (Olías et al., 2009).

## 2. Mutantes e identificación de genes en pepino

Los mutantes se han convertido en una de las herramientas genómicas más potentes (Emmanuel y Levy, 2002). En efecto, la detección de un mutante permite inferir la función del gen alterado a través de la caracterización fenotípica de dicho mutante. Además, el hecho de que la alteración de un gen provoque un efecto dramático en el fenotipo revela que el gen en cuestión tiene una gran relevancia en el control del carácter.

En realidad, el valor de los mutantes se conoce desde hace mucho tiempo y, pese a que ahora nadie duda en señalar su utilidad como herramientas genómicas esenciales, lo cierto es que tuvieron una gran trascendencia en el análisis genético por métodos clásicos (e.g. la identificación de mutantes homeóticos fue clave a la hora de iniciar un campo de investigación tan fructífero como el de la 'Genética del Desarrollo').

Con todo, el empleo de mutantes espontáneos o inducidos (por métodos químicos o físicos) para el análisis genético tenía, y sigue teniendo, una importante limitación: la clonación del gen alterado en un mutante mediante una estrategia de clonaje posicional, aunque factible, supone varios años de trabajo e implica una gran cantidad de esfuerzo, al menos por lo que se refiere a las especies de interés agronómico. No es de extrañar, por tanto, que se hayan clonado tan pocos genes a partir de mutantes espontáneos o inducidos en las especies relevantes. En el caso del pepino, y al igual que ocurre con otras especies de cosecha, se dispone de un gran número de mutantes espontáneos en las colecciones de germoplasma, pero por las razones antes mencionadas solo se han clonado algunos de los genes alterados en dichos mutantes (Call y Wehner, 2011).

La reciente publicación del borrador de la secuencia del pepino (Huang et al., 2009), o al menos de una parte importante del genoma, y la anotación de los genes contenidos en la secuencia, ha supuesto un enorme salto cualitativo. De manera análoga, el desarrollo de métodos de secuenciación de nueva generación (*next generation sequencing*; Egan et al., 2012; Ray y Satya, 2014) y, sobre todo, el abaratamiento de costes, ha hecho que lo que antes parecía una quimera ahora se está convirtiendo en una realidad. En efecto, ya no solo es factible obtener el borrador de la secuencia de una especie, sino que en algunas, es posible secuenciar el genoma de uno o varios genotipos con un coste razonable. Estos

avances están facilitando la identificación de los genes alterados en mutantes espontáneos o inducidos.

En cualquier caso, la mejor solución estriba en una aproximación basada en la mutagénesis insercional. En este caso, se genera una colección de mutantes de inserción por T-DNA y, tras el escrutinio correspondiente, se identifican mutantes con alteraciones en diversos caracteres (Pérez-Martín et al., 2017). Puesto que en un mutante de inserción el gen alterado queda etiquetado por el T-DNA, la clonación del mismo se puede llevar a cabo mediante técnicas basadas en la PCR (TAIL-PCR o Anchor-PCR), lo que facilita enormemente la tarea. Si, como ya ocurre en algunas especies, se dispone de la secuencia del genoma, la tarea se simplifica aún más porque en este caso, tras la clonación de la secuencia flanqueante al inserto o FST (del inglés, *Flanking Sequence Tag*), ni siquiera hace falta clonar el gen, sino simplemente buscar la secuencia correspondiente al FST *in silico*, es decir en el banco de datos que habitualmente es de dominio público y por tanto está a disposición de la comunidad científica.

Hasta hace poco, los programas de mutagénesis insercional estaban prácticamente restringidos a dos especies, *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*. Los rápidos avances en el programa internacional de genómica funcional de *Arabidopsis* mediante esta aproximación (Krysan et al., 1999; Springer, 2000; Alonso et al., 2003; Li et al., 2003) se explican no solo por su corto ciclo biológico, reducido tamaño y otras características típicas de una planta modelo, sino sobre todo por su capacidad para admitir un sistema de transformación *in planta* que, al no plantear ninguna dificultad técnica, está al alcance de cualquiera. El caso del arroz es más relevante, no solo por su importancia económica (es uno de los tres cultivos básicos para la humanidad), sino sobre todo porque es paradigmático e ilustra lo que puede conseguirse cuando la investigación se centra en lo esencial. Hasta hace bien poco, el arroz se consideraba como una especie recalcitrante en cultivo *in vitro*, mientras que ahora se considera como una especie modelo. Este cambio dramático de percepción se debió, básicamente, al descubrimiento de que las células del escutelo del grano de arroz (y de otras gramíneas) son competentes tanto para la regeneración como para la integración de transgenes (Hiei et al., 1994; Ishida et al., 1996). A partir de aquí, el esfuerzo concertado de muchos laboratorios ha permitido generar cientos de miles de líneas T-DNA y de ahí los avances obtenidos en el programa



internacional de genómica funcional del arroz (Kim et al., 2003; Chen et al., 2003 b; An et al., 2003; Sallaud et al., 2004; Peng et al., 2005; Wang et al., 2005; Jeong et al., 2006).

El desarrollo de métodos de transformación en otras especies está permitiendo avances importantes en programas de genómica funcional. Así por ejemplo, en un proyecto en colaboración entre los laboratorios del Dr. Moreno (IBMCP, Valencia), el Dr. Lozano (Universidad de Almería) y la Dra. Bolarín (CEBAS, Murcia) hemos generado más de 7.000 líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicon*) y especies silvestres relacionadas (*S. pennellii*, *S. pimpinellifolium* y *S. cheesmaniae*), lo que está permitiendo la identificación de genes que controlan caracteres del desarrollo reproductivo en el tomate (Pérez-Martín et al., 2017), así como genes implicados en la respuesta o tolerancia a la salinidad y estrés hídrico en especies silvestres relacionadas (Atarés et al., 2011).

En el caso del pepino, pese a la importancia que tendría, el abordaje de un programa de mutagénesis insercional no es factible de momento porque no se dispone de métodos eficaces para la obtención de plantas transgénicas. El problema es que para que esta estrategia tenga sentido no basta con obtener decenas o cientos de líneas T-DNA, sino que hay que generar miles y, hoy por hoy, esto no es factible en esta especie.

### **3. Problemática en torno al aprovechamiento de la variación extraespecífica**

La variación extraespecífica es sin duda la más rica, porque siempre se pueden encontrar fuentes de variación adecuadas para un carácter en especies relacionadas a la que es objeto del programa de mejora (normalmente especies silvestres), en especies menos relacionadas (e.g. de géneros o familias diferentes), e incluso en otras filogenéticamente muy alejadas (e.g. virus, bacterias, levaduras u otros organismos).

Pese a ser la más rica, la variación extraespecífica ha sido históricamente la menos explotada en el campo de la mejora debido, por un lado, a las barreras de incompatibilidad sexual que usualmente impedían la obtención de híbridos interespecíficos que sirvieran como puentes genéticos para la transferencia de genes de una a otra especie y, por otro, a la dificultad que planteaba la introgresión de genes desde fuentes de variación muy alejadas. Para solventar estas limitaciones, se han desarrollado

una gama de métodos de cultivo *in vitro* que permiten obtener híbridos interespecíficos sexuales (e.g. rescate de embriones, polinización *in vivo* y cultivo *in vitro* de óvulos fertilizados, polinización y fertilización *in vitro*, injerto de estigma o estilo, fusión de núcleos espermáticos con protoplastos de células del saco embrionario), métodos de fusión de protoplastos que posibilitan la obtención de híbridos somáticos (simétricos, asimétricos, gametosomáticos y cíbridos), y métodos de ingeniería genética molecular (i.e. transformación genética).

Por lo que respecta a las especies cultivadas del género *Cucumis* (melón y pepino), se han obtenido escasos resultados en cuanto al aprovechamiento de las fuentes de variación extraespecífica mediante métodos tradicionales de mejora.

En el caso del melón, la tremenda equivocación en cuanto al lugar de origen de esta especie condicionó negativamente las posibilidades de aprovechar la variación extraespecífica en especies relacionadas. Al asumir que el melón era una especie de origen africano, toda la investigación se centró históricamente en las especies silvestres de este continente. Como consecuencia, aunque los trabajos relacionados con la búsqueda de fuentes de variación extraespecífica (sobre todo para resistencia a estrés biótico y tolerancia a estrés abiótico) se vieron acompañados por el éxito, los resultados a nivel práctico fueron nulos porque, pese al meritorio esfuerzo de diversos grupos, no hubo forma de conseguir híbridos interespecíficos sexuales entre el melón y cualquiera de las especies silvestres de origen africano (Kroon et al., 1979; Kho et al., 1980; Chen y Adelberg, 2000). Como caso extremo, para intentar conseguir híbridos entre melón y especies de origen africano, Chatterjee y More (1991) realizaron unas 1200 polinizaciones manuales y no consiguieron que cuajara ni un solo fruto.

En honor a la verdad, sí hay un resultado concreto, aunque fuera producto del azar o la casualidad. Granberry y Norton (1980) refirieron la obtención de híbridos interespecíficos entre una accesión semisilvestre de melón (PI 140471) y una accesión de *Cucumis metuliferus* (PI 292190), una especie de origen africano. En principio, se dudó del resultado publicado porque no hubo forma reproducir el cruce en otros laboratorios, ni siquiera empleando los mismos genotipos parentales. Es más, los propios autores reconocieron que no fueron capaces de reproducir en su propio laboratorio lo que ellos

mismos habían publicado. Con todo, los análisis en las progenies de los híbridos Granberry y Norton (1980) sugieren que el resultado no fue producto de la imaginación de los autores, sino algo real, por mucho que fuera debido al azar. Lo interesante de este resultado concreto no es tanto el propósito perseguido (los autores pretendían utilizar los híbridos como puentes genéticos a fin de introducir resistencia a nemátodos en el melón) como las consecuencias que pueden extraerse del mismo en términos evolutivos, ya que el trabajo ilustra cómo se pueden superar en la naturaleza barreras de incompatibilidad que cualquier investigador calificaría como 'estrictas'.

Ante la problemática existente, para obtener híbridos interespecíficos entre el melón y cualquiera de las especies silvestres de origen africano hay que recurrir a alguna de las técnicas de cultivo *in vitro* que permiten la obtención de híbridos sexuales o de aquellas otras que permiten la obtención de híbridos somáticos. Esta última aproximación fue la que se utilizó en el laboratorio del Dr. Moreno para obtener los primeros híbridos asimétricos entre el melón y dos especies silvestres de origen africano: *C. melo* (+) *C. myriocarpus* (Roche, 1991; Bordas et al., 1998) y *C. melo* (+) *C. anguria* (Dabauza et al., 1998).

El reciente descubrimiento del origen asiático del melón y de que la especie hermana del complejo *C. melo/C. trigonus/C. callosus* es *Cucumis picrocarpus*, una especie autóctona de Australia (Sebastiana et al., 2010) ha abierto un nuevo abanico de posibilidades a la hora de utilizar fuentes de variación extraespecífica en la mejora del melón. De hecho, es factible obtener híbridos interespecíficos sexuales entre el melón y *C. trigonus* o *C. callosus* y lo que hace falta ahora es estudiar la compatibilidad sexual con otras especies de procedencia asiática y australiana. En el caso de que haya compatibilidad sexual se podrá abordar la transferencia de genes mediante métodos convencionales. De no ser así, habrá que utilizar los métodos basados en la fusión de protoplastos o la transformación genética.

Por lo que se refiere al pepino, la problemática en torno al uso de la variación extraespecífica ha sido diferente de la señalada para el melón. El origen asiático del pepino ha estado claro desde hace mucho tiempo; el problema consistió en asumir que había muy pocas especies asiáticas relacionadas con el pepino. Hoy por hoy se conocen

casi tantas especies de *Cucumis* asiáticas y australianas como africanas, pero en su tiempo se pensó que la única especie relacionada con el pepino era *Cucumis hystrix*. No es de extrañar por tanto que las investigaciones se hayan centrado en la obtención de híbridos sexuales *C. sativus* (x) *C. hystrix*. El uso de métodos convencionales dio resultados negativos, pero mediante la técnica del rescate de embriones Chen et al., (1997) consiguieron híbridos interespecíficos entre el pepino ( $2n = 2x = 14$ ) y *Cucumis hystrix* ( $2n = 2x = 24$ ). Como era previsible, los híbridos interespecíficos con 19 cromosomas eran infértiles pero, tras su duplicación cromosómica, consiguieron una nueva especie alopoliploide ( $2n = 38$  cromosomas), a la que denominaron *Cucumis hytivus* (Chen y Kirkbride, 2000). A continuación, realizaron la caracterización citogenética del alopoloide sintético y estudiaron las características de sus progenies (Chen et al., 2003 a; Zhuang et al., 2006). Más recientemente, se han publicado datos adicionales sobre la diversificación fenotípica de los híbridos *Cucumis sativus* (x) *C. hystrix* en respuesta a ciertos cambios ambientales (Yu et al., 2015).

Es evidente que hay que tratar de seguir incidiendo en el aprovechamiento de los recursos fitogenéticos existentes en especies relacionadas mediante métodos clásicos o técnicas de cultivo *in vitro*. No obstante, conviene tener en cuenta que el uso de un híbrido interespecífico sexual o del alotetraploide como puente genético implica un largo programa de retrocruzamiento a fin de lograr la transferencia del gen o genes deseables al tiempo que se elimina la enorme cantidad de genes indeseables de la especie silvestre y se restituyen las características de la especie cultivada. La hibridación somática asimétrica puede ser una opción más rápida y eficaz a la hora de transferir una cantidad limitada de información genética de una a otra especie (Roche, 1991, Tesis Doctoral).

La alternativa para el uso eficaz de la variación extraespecífica en la mejora del pepino es la transformación genética, pero para ello deben cumplirse dos requisitos: i) haber identificado y clonado el gen o genes que controlan el carácter deseable; y ii) disponer de un método de transformación que permita la transferencia de dichos genes. Por lo que respecta a esto último, el pepino es una especie que plantea una problemática compleja en el apartado de la transformación, hasta el punto de que algunos la califican como especie recalcitrante. Como se comentará a continuación, la obtención de plantas transgénicas de pepino es factible, pero no resulta nada fácil conseguir la transformación

de los genotipos relevantes para la mejora y ello explica que, pese a su importancia económica, se hayan publicado pocos trabajos en este sentido.

## 4. Transformación genética en pepino

### 4.1. Métodos de transformación

El método más empleado a la hora de obtener plantas transgénicas de pepino se basa en el co-cultivo de explantes primarios con *Agrobacterium tumefaciens* (ver Tabla 1). La cepa de *A. tumefaciens* más habitual en estos trabajos es la LBA4404, aunque también se han utilizado las cepas C58 y EHA101, entre otras.

El procesamiento y la transferencia del T-DNA están regulados por la activación de los genes *vir*, cuya expresión se puede inducir por una serie de señales liberadas por las células heridas, tales como la acetosiringona o compuestos fenólicos relacionados (Gelvin, 2003). Como consecuencia, durante el proceso de infección y/o co-cultivo de los explantes primarios de pepino con *Agrobacterium* se suele suplementar el medio con acetosiringona a concentraciones que oscilan entre 50 y 200 mg/l, tal y como suele hacerse también con otras muchas especies.

Se han publicado también unos pocos artículos en los que se refiere el empleo de *Agrobacterium rhizogenes* como vector biológico. Por ejemplo, Trulson et al. (1986) mencionaron la obtención de plantas que expresaban el gen marcador *nptII*, mientras que Mark et al. (1989) describieron la síntesis de opinas en plantas tratadas con la cepa de *A. rhizogenes*. Con independencia del escaso número de artículos publicados, la utilidad de *A. rhizogenes* en el caso del pepino se restringe a aplicaciones muy concretas.

El uso de métodos biolísticos no es habitual en el caso del pepino, pero también se han publicado algunos trabajos en este sentido. Hace ya algunos años, Chee y Slightom (1992) refirieron la obtención de plantas transgénicas mediante bombardeo de callos embriogénicos con micropartículas cargadas con ADN, aunque la tasa de transformación que describen (16 %) parece un tanto elevada. De forma similar, tratando cultivos en suspensión de células embriogénicas con micropartículas cargadas, Schulze et al. (1995) obtuvieron un promedio de 4 plantas transgénicas por experimento, una cifra que parece más razonable. Por su parte, Kodama et al. (1993) utilizaron explantes de cotiledón como

diana en los experimentos de biolística, aunque no está claro que lograran la regeneración de plantas transgénicas.

Los métodos biolísticos alcanzaron una gran popularidad en su tiempo porque se pensó que conducirían a una tasa de transformación más elevada y, sobre todo, porque al permitir el uso de métodos de regeneración directa o casi directa estarían exentos del problema que supone la variación somaclonal en experimentos de transformación. A la hora de la verdad, tal y como ha ocurrido en el caso del pepino, una buena parte de los experimentos sobre biolística se realizan con células embriogénicas de callos o cultivos en suspensión, lo que no evita una cierta tasa de variación somaclonal, sino más bien al contrario. El problema en todo caso no radica en lo anterior (al fin y al cabo el bombardeo con micropartículas se puede hacer sobre explantes primarios y luego regenerar por vía directa o casi directa), sino en el número y estructura de los insertos en las plantas transgénicas. En los experimentos sobre biolística lo habitual es la presencia de insertos con varias o muchas copias en tándem y, lo que es peor, con profundas reordenaciones (Svitashev et al., 2002). La estructura anómala de los insertos representa un problema tanto a la hora de utilizar la transformación para el análisis funcional de un gen como para abordar un programa de mutagénesis insercional, y desde luego plantea serios inconvenientes a la hora de conseguir alguna aplicación práctica relacionada con la mejora.

En la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* las plantas transgénicas suelen tener una o pocas copias integradas en distintas localizaciones cromosómicas, no siendo habitual la presencia de insertos con varias copias en tándem o con reordenaciones profundas. Es más, cuando se obtienen y analizan muchas líneas T-DNA lo que se comprueba es que el número medio de insertos es moderado, lo que resulta conveniente tanto desde un punto de vista básico como aplicado. Así por ejemplo, en el contexto del amplio programa de mutagénesis insercional en el arroz se estimó que el número medio de insertos por línea T-DNA estaba en torno a 2 (Jeon et al., 2000), una cifra que coincide con la obtenida en el programa de mutagénesis insercional de tomate antes mencionado (Pérez-Martin et al., 2017).

Debido a estas y otras razones, el co-cultivo de explantes primarios con *Agrobacterium tumefaciens* se ha convertido en el método de transformación más universal. En este sentido, conviene resaltar que la hipótesis de que muchas plantas (e.g. las gramíneas y el resto de las monocotiledóneas) no tenían la capacidad biológica de interactuar con *Agrobacterium* quedó totalmente desacreditada hace algunos años, hasta el punto de que en el contexto del programa de mutagénesis insercional del arroz (una gramínea) las decenas de miles de líneas T-DNA que están disposición del consorcio internacional se han generado empleando *Agrobacterium tumefaciens* como vector biológico.

#### **4.2. Adecuación de los genes marcadores en la selección de plantas transgénicas**

La lectura de algunas revisiones puede dar la idea de que en el campo de la transformación genética existe una amplia gama de genes marcadores a disposición del investigador. En realidad, las posibilidades de elección son bastante limitadas y por ello la identificación de nuevos genes marcadores o de nuevos sistemas de selección tendría un enorme interés.

Existen diversas estrategias de selección para las que se utilizan distintos tipos de genes marcadores. Normalmente se denomina como 'selección negativa' a cualquier sistema que inhiba el crecimiento de las células no transgénicas, y, por tanto, facilite la detección de eventos de transformación. Por el contrario, la 'selección positiva' consiste en favorecer el crecimiento de las células transgénicas sin que ello conduzca a la inhibición o muerte de las no transgénicas. Por su parte, los sistemas de 'contra-selección' están pensados para inhibir o provocar la muerte de las células transgénicas y solo se utilizan para ciertos propósitos (e.g. integración dirigida al sitio e identificación de genes mediante etiquetado por transposón). El método más habitual consiste en el uso del gen *iaaH* que codifica una indol-acetamida hidrolasa que provoca la muerte de las células transgénicas en medio con naftalen-acetamida (NAM). Evidentemente, estos sistemas no sirven para el propósito de seleccionar plantas transgénicas y por tanto no se volverán a mencionar. Sí se hará, en cambio, una breve mención de alguna de las estrategias que se han ideado para identificar eventos de transformación sobre la base de una respuesta determinada en cultivo *in vitro*, o de un fenotipo particular en las células o plantas transgénicas. Por último, también se hará un breve comentario sobre la posibilidad de

regenerar plantas transgénicas sin utilizar un esquema de selección, es decir sin el empleo de genes marcadores.

Por lo que respecta a los marcadores que se emplean para la selección negativa, Miki y McHugh (2004) dan una lista de genes que confieren resistencia a antibióticos, así como otros que confieren resistencia a herbicidas, o a otras drogas. Sus datos revelan que hasta aquel momento la mayor parte de los investigadores había empleado un número de genes marcadores muy limitado. Según Miki y McHugh (2004), en 2002 se publicaron 61 trabajos en los que el sistema de selección se basó en resistencia a la kanamicina, 19 en resistencia a higromicina y otros 19 en resistencia a fosfotricina. Con relación a ensayos de campo para una posible solicitud de aprobación en USA durante los años 2001 y 2002, las cifras que aportan son: 949 (resistencia a kanamicina), 65 (resistencia a higromicina), 327 (resistencia a fosfotricina), 507 (resistencia a glifosato) y 122 (otros tipos de marcadores o delatores). Conviene señalar que el dato correspondiente a resistencia al glifosato puede ser engañoso, ya que lo que se pretendía en estos trabajos no era utilizar un sistema de selección, sino introducir resistencia a un herbicida.

Por lo que respecta al pepino, en la exhaustiva revisión de Yin et al. (2005 a) se describen los marcadores empleados hasta tal fecha para proceder a una selección 'negativa'. De los 42 trabajos que citan, en 30 se utilizó el gen *nptII* (resistencia a kanamicina), en 7 el gen *hpt* (higromicina) y en 5 el gen *bar* (fosfotricina). Además, los autores del mencionado artículo citan 11 experimentos realizados en el laboratorio del Dr. Stefan Malepszy con una línea de pepino casi pura ('Borszczagowski'). En 10 de estos experimentos utilizaron el gen *nptII* y en tan solo uno el gen *hpt*.

La situación actual no difiere de la que había en 2004 o 2005, tanto a nivel general como, a nivel más particular, en el caso del pepino (revisado recientemente por Wang et al., 2015).

Por lo que respecta a genes marcadores que confieren resistencia a antibióticos, los dos más utilizados siguen siendo el gen *nptII* (Fraley et al., 1983, Carrer et al., 1993) y el gen *hpt* o *hph* (Waldron et al., 1985). El primero codifica una neomicina-fosfotransferasa II que confiere resistencia a kanamicina o antibióticos relacionados, como neomicina, paromomicina, G418, etc. El segundo codifica una higromicina-fosfotransferasa que



confiere resistencia a higromicina B. Aunque se trata de marcadores muy diferentes, los efectos de los antibióticos para los que determinan resistencia son muy similares ya que ambos, kanamicina e higromicina, inhiben la elongación de los polipéptidos durante la síntesis proteica (Gonzalez et al., 1978).

Por lo que se refiere a marcadores que confieren resistencia a herbicidas, los más empleados son el gen *pat* o *bar* (DeBlock et al., 1989), que codifica una fosfinotricina-acetiltransferasa y confiere resistencia a la fosfinotricina, y el gen *cp4* (Barry et al., 1992) que codifica una 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato-sintasa y confiere resistencia al glifosato.

Se han utilizado también otros genes que confieren resistencia a diferentes drogas. Entre estos, el más empleado es el gen *dhfr* (Herrera-Estrella et al., 1983) que codifica una dihidrofolato reductasa y confiere resistencia al metotrexato.

La mayor parte de los genes marcadores tiene un origen bacteriano, pero hay algunas excepciones. Por ejemplo, el gen *EPSPs* de plantas superiores (petunia, maíz) es homólogo del *cp4* (Zhou et al 1995) y también confiere resistencia al glifosato. Se ha discutido también la posible utilidad de un homólogo del gen *dhfr* identificado en el ratón (*DHFR*, Eichholtz et al., 1987), aunque el que se utiliza habitualmente es el que procede de *Escherichia coli*. De la misma forma, Mentewab y Stewart (2005) describieron que la sobreexpresión de un transportador ABC de *Arabidopsis thaliana* confiere resistencia a la kanamicina en plantas transgénicas. En su momento, el trabajo tuvo un impacto notable, no solo por la revista en donde apareció el artículo (*Nature Biotechnology*), sino sobre todo por la posibilidad de emplear un marcador procedente de plantas, alternativo al *nptII*, lo que en teoría podía soslayar la polémica con relación al uso de genes marcadores de origen bacteriano. A la hora de la verdad, la mayor parte de los investigadores sigue usando el gen *nptII* (*Escherichia coli* Tn5).

Tal y como se ha comentado antes, existe la alternativa de emplear una estrategia de 'selección positiva'. El sistema habitual consiste en transformar con el gen *pmi* o *manA*, que codifica una fosfo-manosa-isomerasa, y añadir manosa al medio de cultivo (Joersbo y Okkels, 1996). La manosa no es un azúcar adecuado para las células vegetales, pero no es

tóxico. La idea es, pues, favorecer el crecimiento de las células transgénicas sin llegar a inhibir el de las no transgénicas.

Normalmente se enfatiza que el sistema de selección positiva (i.e. el que se basa en el gen *PMI*) tiene la ventaja con respecto a la selección negativa (i.e. la que se fundamenta en el empleo de los genes *nptII*, *hpt*, *bar*, etc.) de que soslaya uno de los problemas de tipo legal relacionados con la liberación de plantas transgénicas al medio ambiente. Ciertamente, la presencia de genes marcadores que confieren resistencia a antibióticos o herbicidas en las plantas transgénicas choca con la normativa de la UE desde 2006. Sin embargo, el uso de genes marcadores para selección negativa no representa en la práctica ningún problema porque se pueden eliminar *a posteriori* mediante un sistema de co-transformación, es decir colocando el gen marcador y el gen o genes de interés en *trans* (e.g. en dos mini-Ti que, a su vez, pueden introducirse en la misma cepa o en dos cepas de *Agrobacterium*) o en *cis* (i.e. en el mismo mini-Ti, y por tanto en la misma cepa de *Agrobacterium*). El problema no estriba, por tanto, en la selección negativa *per se*, sino en la eficacia del método de selección.

Se han descrito también estrategias de selección que no implican el uso de genes marcadores propiamente dichos. La que parecía más prometedora se basa en el empleo del gen *ipt* de *Agrobacterium tumefaciens* que codifica una isopentenil-transferasa que conduce a la síntesis de isopentenil-adenina. Teniendo en cuenta que el tratamiento con citoquininas suele conducir a un retraso de la senescencia, Gan y Amasino (1995) idearon una estrategia para retrasar la senescencia en plantas transgénicas. Consistía en poner el gen *ipt* bajo control del promotor de un gen de *Arabidopsis thaliana* (*SAG12*) que inicialmente se describió como específico de senescencia. De esta manera, cuando se inicia la senescencia en las hojas adultas de una planta transgénica con la construcción *SAG12::ipt* se debería activar la expresión del gen, lo que conduciría a la síntesis de citoquininas, lo que a su vez retrasaría la senescencia. En teoría, el sistema se autorregularía, ya que el gen no debería actuar tras haber cumplido su función. Pese a ello, el sistema no tiene interés práctico porque el promotor *SAG12* no es específico de senescencia y la excesiva acumulación de citoquinina provoca fenotipos anómalos. En concreto, en el contexto de un proyecto europeo, los dos directores de esta Tesis, y otros miembros del grupo, comprobaron que, en efecto, las plantas transgénicas de tomate y

pepino con el gen *SAG12::ipt* experimentan un retraso de senescencia muy notable, pero el resultado no tuvo interés práctico porque las plantas exhibían el 'síndrome de citoquinina' (i.e. compacidad, mayor ramificación y otros fenotipos anómalos). A pesar de ello, Endo et al. (2002) propusieron esta estrategia como un sistema para seleccionar plantas transgénicas libres de genes marcadores.

De manera alternativa, Ebinuma et al. (2001) propusieron el empleo de los genes *rol* de *Agrobacterium rhizogenes*. El problema es que las plantas transgénicas tienen un desarrollo radicular anómalo (i.e. un síndrome similar a lo que se denomina en inglés como "*hairy root*"), aparte de otras anomalías.

Además, se han identificado algunos genes de *Arabidopsis thaliana* que, en principio, podrían estar implicados en la respuesta morfogenética. No es de extrañar por tanto que se haya propuesto el empleo de alguno de estos genes (e.g. *ESR1*, Banno et al., 2001; *CK11*, Zuo et al., 2002) para la selección de plantas transgénicas libres de marcadores. No obstante, el problema es el mismo que para el gen *ipt*. Es decir, la expresión (o sobreexpresión) de estos genes genera un 'síndrome de citoquininas' y los fenotipos anómalos de las plantas transgénicas anulan la utilidad del sistema. Para que tuviera interés esta estrategia habría que modular la expresión de estos genes (i.e. *ipt*, *ESR1*, *CK11*, *ipt*) a fin de lograr lo que se pretende (i.e. seleccionar eventos de transformación) sin que ello se vea acompañado por efectos pleiotrópicos indeseables en las plantas transgénicas.

#### **4.3. Adecuación de los genes delatores en la detección de eventos de transformación**

Se han descrito una serie de genes delatores para facilitar la detección de eventos de transformación, para emplearlos como alternativa a los genes marcadores, o para una amplia gama de propósitos.

Hay dos delatores (*Lc* y *Lcf* o *Luc*) que inicialmente generaron grandes expectativas pero que, con el tiempo, han caído en desuso. El gen *Lc* del maíz codifica un factor de transcripción tipo Myc, de la familia R, que controla la síntesis de antocianina (Ludwig et al. 1989). El descubrimiento de que el gen regula corriente arriba la síntesis de

flavonoides (Bradley et al., 1998) llevó a la obtención de plantas transgénicas de tomate que producían frutos con altos niveles de flavonoles (Bovy et al., 2002). Además, teniendo en cuenta la coloración más oscura que promueve la expresión del gen *Lc* en distintas partes de la planta, Ludwig et al. (1989) propusieron su empleo como delator. En teoría, tiene la gran ventaja de que la evaluación o visualización del fenotipo no implica la destrucción del material vegetal y, además, sería ideal para delatar eventos de transformación en plantas cultivadas en invernadero o campo, condiciones poco adecuadas para detectar la expresión de otros delatores no destructivos, como el *gfp*. Aún así, el gen *Lc* se utiliza muy poco como delator porque la acumulación de antocianina provoca efectos pleiotrópicos, tales como el aumento del número de tricomas u otras alteraciones en el desarrollo.

Aunque por razones distintas, lo mismo ha ocurrido con el gen *lfc* o *luc*. El gen en cuestión se clonó a partir de la luciérnaga y codifica una luciferasa (Ow et al., 1986). Podría haber sido un delator ideal por el brillo espectacular que genera su expresión en presencia del adecuado sustrato (luciferina). Christensen y Quail (1996) postularon el uso del gen *lfc* como delator en monocotiledóneas, ya que por aquella época se consideraban recalcitrantes para la transformación y hacía falta diseñar cualquier estrategia que permitiera solventar los problemas existentes. A la hora de la verdad, el gen *lfc* o *luc* ha tenido escasa utilidad como delator tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas debido, por un lado, a que la luciferina es demasiado cara y, por otro, a que la expresión del gen genera un coste energético tan elevado que normalmente conduce a un descenso del rendimiento.

A diferencia de los anteriores, los genes que codifican ciertas proteínas fluorescentes han sido de gran utilidad. Prasher et al. (1992) identificaron el gen *gfp* (*green fluorescent protein*) a partir de la medusa *Aequorea victoria* y Chalfie et al. (1994) propusieron su empleo como delator en experimentos de transformación. Inicialmente hubieron problemas con el uso de este gen porque los diferentes organismos tienen una preferencia por el uso de distintos codones. A pesar de ello, una vez averiguada la causa del problema, se modificó la secuencia por mutagénesis dirigida al sitio y se introdujeron ciertos cambios (e.g. cambio de una serina por treonina en la posición 65; Zhang et al.,

2001a) para incrementar la fluorescencia y optimizar la visualización bajo un microscopio adecuado.

En la actualidad, hay disponibles varios genes que conducen a la síntesis de proteínas fluorescentes. Genéricamente se denominan como *gfp* (término que emplearemos de ahora en adelante) pero, aparte del *gfp* propiamente dicho, que da una proteína con fluorescencia verde, hay otros (*yfp*, *bfp*, *cfp*) que codifican proteínas con fluorescencias de distinto colores y que por tanto se pueden visualizar empleando los filtros adecuados. Se han publicado magníficas revisiones sobre este tipo de genes, así como sobre las características o propiedades de las proteínas fluorescentes (e.g. Stewart, 2001; Chudakov et al., 2005; Stewart, 2006)

Las distintas versiones de los genes *gfp* se han utilizado como delatores en experimentos de transformación convencional (e.g. Haselof et al., 1997; Rouwendal et al., 1997; Elliott et al., 1999; Molinier et al., 2000; Kaepler et al., 2001), en la transferencia dirigida a los cloroplastos (e.g. Sidorov et al., 1999), así como para cosas tan diversas como la monitorización del movimiento de proteínas, estudios de compartimentación celular, análisis funcional de promotores y silenciamiento génico inducido por virus (Rizzuto et al., 1995; Köhler 1998; Ruiz et al., 1998). Se han empleado también como marcadores alternativos en experimentos de hibridación somática (Olivares-Fuster et al., 2002) e incluso para producir plantas ornamentales que emiten una fluorescencia brillante en las partes vegetativas o las flores (Mercuri et al., 2002).

La utilidad de las proteínas GFP como deladoras está fuera de toda duda, pero cuando se discute en torno a su adecuación generalmente se habla solo de las ventajas y pocas veces se comentan los posibles inconvenientes. Una ventaja incuestionable es que la detección de la fluorescencia no implica el uso de un sustrato ni, lo que es más importante, la destrucción del material vegetal; lo único que hace falta es disponer de una lupa o un microscopio que permita detectar la fluorescencia y que, por supuesto, tenga los filtros adecuados. Es más discutible su utilidad a la hora de analizar el material vegetal en el invernadero, porque para ello hace falta un equipo muy costoso.

Molinier et al. (2000) indicaron que, en función de la intensidad de la fluorescencia, eran capaces de distinguir entre plantas homocigóticas y hemicigóticas de tabaco. Si así fuera,

el gen *gfp* no solo tendría interés como delator propiamente dicho, sino que también permitiría llevar a cabo análisis de segregación en progenies TG2, o detectar de forma temprana plantas homocigóticas a fin de obtener las correspondientes líneas homocigóticas en TG3. Con relación a lo primero, este método evitaría el típico análisis de expresión del marcador (e.g. resistencia a kanamicina en el caso del gen *nptII*) que, aunque no representa ningún problema, conlleva a descartar las plantas acigóticas. De esta forma, no solo se podría hacer el análisis de segregación, sino que también se podría seleccionar un número adecuado de plantas homocigóticas, hemicigóticas y acigóticas para llevar a cabo una evaluación en el invernadero. El problema es que, pese a lo indicado por Molinier et al. (2000), no está claro que haya una relación inequívoca entre la configuración en el locus correspondiente (homocigosis *versus* hemicigosis) y la intensidad de fluorescencia.

Otro tema que conviene tener en cuenta es que el *gfp* es un delator adecuado para ciertas especies, pero no para otras. Por ejemplo, en el laboratorio del Dr. Moreno se ha comprobado que no conviene utilizar el *gfp* como delator en el caso del tomate. En esta especie, el *gfp* sirve para ciertos propósitos (e.g. agroinoculación en flores o frutos), pero no para detectar eventos de transformación de manera temprana y tampoco se expresa en las partes vegetativas de la planta o, si lo hace, su expresión queda enmascarada. En cambio, el *gfp* es un buen delator en melón, aunque, eso sí, no es tan fiable como el *uidA* a la hora de detectar eventos muy tempranos de expresión transitoria o estable (Dr. Moreno, comunicación personal).

Además, pese a que en ciertas especies no hay problema para utilizar el *gfp* como delator, la intensidad de fluorescencia difiere a lo largo de los procesos de crecimiento y morfogénesis, así como en distintas partes de las plantas regeneradas. Por ejemplo, en el laboratorio del Dr. Moreno se han obtenido plantas transgénicas de *Pelargonium hortorum* (geranio), *Pelargonium peltatum* (murciana) y *Kalanchoe blossfeldiana* que combinan larga vida, compacidad y androesterilidad (García-Sogo et al., 2010, 2012). Los dos primeros caracteres tienen interés desde un punto de vista ornamental y el tercero representa una ventaja adicional porque evita la dispersión del polen. En estos experimentos se utilizó el gen *nptII* como marcador y se evaluó la adecuación del *gfp* como delator. Por lo que se refiere a la identificación de células, yemas o brotes

transgénicos, se pudo comprobar que la presencia de la proteína GFP sirve para detectar eventos de transformación en ciertas etapas del proceso, pero no en otras. Además, la GFP se detecta en las partes vegetativas y reproductivas de estas plantas transgénicas, pero no de la misma forma en todas las células. Así pues, para estas especies el *gfp* se puede utilizar no solo como delator propiamente dicho, sino también como sustituto del gen marcador para detectar eventos de transformación, pero antes hay que saber en qué etapas del proceso conviene hacer la detección.

Por otro lado, la evaluación exhaustiva del patrón de expresión en las plantas transgénicas llevó a la conclusión de que el *gfp* sería adecuado para el análisis funcional de ciertos promotores, pero no de otros. Así pues, si no se tiene una idea clara de en qué partes de la planta se expresa el gen en cuestión y cuál es su posible función, sería muy arriesgado hacer el análisis funcional del promotor sobre la base del *gfp*. En este caso, lo mejor sería utilizar el gen *uidA*.

Volviendo al tema de la adecuación del gen *gfp* para detectar eventos de transformación a nivel temprano, surge la cuestión de si en las células de una determinada especie puede haber algún tipo de proceso que enmascare la fluorescencia o, lo que es peor, algún tipo de autofluorescencia que lleve a 'falsos positivos'. Con relación a lo primero, es evidente que en determinados tejidos de ciertas especies (como el tomate) hay procesos bioquímicos que enmascaran la expresión GFP. Esto no representa ningún problema siempre y cuando se haya hecho un análisis *a priori*, aunque por supuesto conlleva a la no utilización del *gfp* para este propósito. Por lo que respecta a lo segundo, en teoría no hay genes homólogos a los *gfp* en vegetales superiores y por tanto no debería haber autofluorescencia en los tejidos de la planta. Sin embargo, Molinier et al. (2000) alertaron de que la reacción de herida que se genera a la hora de obtener explantes de tabaco produce una autofluorescencia con un espectro similar. Rakosy-Tican et al. (2007) señalan que en patata no ocurre lo mismo. Aún así, cuando se pretende utilizar el sistema para detectar eventos tempranos de expresión transitoria o estable convendría analizar con detalle los explantes de las plantas *wild-type* a fin de tener la certeza de no detectar 'falsos positivos'.

La alternativa es utilizar el gen *uidA* o *gusA* (Jefferson, 1987; Jefferson et al., 1987). El gen *uidA* codifica una  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) que en presencia de un sustrato adecuado da una coloración azul intenso. La visualización no precisa de un equipo especial, de forma que solo se requiere una lupa o microscopio para detectar la expresión en ciertas partes de la planta (e.g. estomas, tricomas) o en células de un tejido determinado. Con respecto al *gfp*, tiene el inconveniente de que el ensayo suele implicar la destrucción del material vegetal. A pesar de ello, con relación al *gfp*, tiene una serie de ventajas. En primer lugar, el color azul (GUS +) se detecta en todas las partes de la planta. Este es el principal motivo por el que se elige el *uidA* (en lugar del *gfp*) para llevar a cabo el análisis funcional de un promotor o para la identificación de genes mediante 'trampas génicas'. Aún así, conviene tener en cuenta que, si no se realizan algunos cambios en el protocolo original (Jefferson et al., 1987), hay tejidos u órganos de la planta que pueden dar color azul en presencia del sustrato que se utiliza para detectar el GUS (e.g. anteras; Dr. Moreno, comunicación personal). Con todo, esto no ocurre en las primeras etapas del proceso de transformación, ni durante el crecimiento de callo o la morfogénesis. En estas fases, el GUS es fiable y permite detectar eventos tempranos de expresión transitoria o estable, no solo en yemas y brotes adventicios (organogénesis) o proembriones y embriones (embriogénesis somática), sino también en grupos de células o incluso en células concretas. Este es el motivo por el que elegimos el *gusA* como delator en este trabajo.

#### **4.4. Transformación sin genes marcadores o empleando solo genes delatores**

Uno de los aspectos que se contempla en la polémica sobre las plantas transgénicas es el que se refiere al uso habitual de genes marcadores en los experimentos de transformación, especialmente los que confieren resistencia a antibióticos o herbicidas. Por el momento, no se ha detectado ningún problema relacionado con el medio ambiente o el consumidor. Aún así, con el fin de soslayar uno de los aspectos de la polémica, se han ideado sistemas para eliminar los genes marcadores *a posteriori*, tales como los basados en la co-transformación, el empleo de elementos transponibles, los sistemas para recombinación específica de sitio, etc.

Inicialmente, estos sistemas se desarrollaron asumiendo que no era factible la transformación sin genes marcadores. No obstante, se ha publicado que sí se pueden



obtener plantas transgénicas sin un esquema de selección propiamente dicho. En concreto, de Vetten et al. (2003) emplearon una cepa virulenta de *Agrobacterium* (AGLO) para infectar explantes de distintos clones o genotipos de patata, que fueron incubados sin ningún agente selectivo. La detección de eventos de transformación se realizó mediante una simple PCR. Según los autores, dependiendo del genotipo de patata, la frecuencia de plantas transgénicas oscilaba entre el 1 % y el 5 %. Aunque las frecuencias de transformación que describen en el trabajo parecen un tanto elevadas lo cierto es que se han publicado estimas similares en cítricos. En efecto, en un trabajo sobre transformación en lima, Domínguez et al. (2002) utilizaron un T-DNA con un marcador *nptII* y un delator *uidA*, pero no utilizaron ni el marcador ni el delator para seleccionar las plantas transgénicas. La identificación se hizo *a posteriori* mediante PCR. De esta forma, encontraron 31 transformantes de 620 plantas analizadas, lo que da una frecuencia de transformación del 5,6 %. Tal y como se discute en este trabajo, los resultados indican que es factible obtener plantas transgénicas sin selección para resistencia a un antibiótico o herbicida ni sobre la base de la detección de expresión de un delator, al menos en especies en las que se dispone de un sistema de transformación eficaz. En cambio, como también indican estos mismos autores no es razonable utilizar esta estrategia en especies recalcitrantes o, en aquellas otras, como el pepino, en las que todavía no se han desarrollado métodos eficaces de transformación.

Algunos autores han recomendado la obtención de plantas transgénicas en ausencia de un esquema selectivo (i.e. sin genes marcadores) y sobre la base exclusiva de la detección con genes delatores. La propuesta no está dirigida a soslayar la polémica con los genes marcadores, sino a solventar el problema que supone en algunas especies la aparición de múltiples escapes o de quimeras. En estas especies, no está claro que el empleo de un esquema selectivo (e.g. resistencia a un antibiótico o herbicida) suponga una ventaja, e incluso para algunos investigadores representa un inconveniente. Por este motivo, en las especies donde es habitual la aparición de escapes o de quimeras, algunos autores han propuesto el empleo exclusivo del gen *uidA* (e.g. Christou y McCabe, 1992; Kim y Minamikawa, 1996), mientras que otros se decantan por el *gfp* (e.g. Ghorbel et al., 1999; Zhang et al., 2001a).

El problema es que ni siquiera así se solventa el problema de los escapes o quimeras. Por ejemplo, Berthomieu et al. (1994) inocularon explantes de una línea de *Brassica oleracea* de rápido crecimiento (i.e. ciclo biológico acelerado) con una cepa de *Agrobacterium* cuyo T-DNA contenía un gen delator *uidA*. Obtuvieron 751 plantas en ausencia de un esquema selectivo propiamente dicho y analizaron la expresión del gen *uidA* en las plantas regeneradas. De las 751, 61 fueron GUS (+), lo que en principio indica una elevada tasa de transformación. Por desgracia, los análisis moleculares revelaron que casi todas las plantas eran quimeras y no transformantes sólidos.

Otro posible problema asociado a la ausencia de un esquema selectivo estriba en la posibilidad de obtener plantas transgénicas con los genes foráneos silenciados. Por ejemplo, Domínguez et al. (2002) obtuvieron plantas transgénicas de lima con y sin esquema selectivo. Sus resultados indicaron que el empleo de un esquema de selección (en este caso, resistencia a kanamicina conferida por el gen *nptII*) limitaba el número de plantas transgénicas con transgenes silenciados. En cambio, en ausencia de selección el 30 % de las plantas transgénicas tenían silenciados todos los genes transferidos.

#### **4.5. Métodos de regeneración en experimentos de transformación**

A la hora de llevar a cabo un experimento de transformación en una especie difícil como el pepino todos los factores son importantes, pero uno de los más determinantes es el método de regeneración. Evidentemente, el método para la regeneración de plantas a partir de un cierto genotipo tiene que ser tan eficaz como sea posible, pero al mismo tiempo debe ser acorde con los requerimientos de un experimento de transformación. Por un lado, es previsible que los tratamientos habituales en un experimento de transformación (e.g. infección y co-cultivo con *Agrobacterium*, cultivo en medios con un agente selectivo, etc.) conduzcan a un descenso en la tasa de regeneración. Por otro lado, hay que tratar de conseguir que la variación fenotípica en las plantas transgénicas se deba exclusivamente al efecto del gen o genes transferidos, pero no a cambios de tipo somaclonal.

Es factible abordar la transformación genética de algunos genotipos de pepino empleando una vía de regeneración basada en la embriogénesis somática (e.g. Burza et al., 2006) e incluso se ha demostrado que se puede inducir el proceso de embriogénesis

somática en un medio sin auxina (Mashayekhi et al., 2008). Con todo, en el caso del pepino, el uso de esta vía suele implicar el uso de líneas embriogénicas establecidas, lo que no resulta conveniente debido a la alta tasa de variación somaclonal en las plantas regeneradas.

La vía de regeneración más habitual en experimentos de transformación con el pepino se basa en la organogénesis casi directa o indirecta a partir de explantes de cotiledón, limbo o peciolo de hoja y, con menor frecuencia, segmentos de hipocótilo. Los métodos básicos de regeneración se desarrollaron hace años en el laboratorio del Dr. Stefan Malepszy (ver revisión en Malepszy, 1988).

Con el fin de aumentar la eficacia del proceso de organogénesis adventicia a partir de explantes de pepino se han propuesto soluciones muy diversas, tales como la adición de ABA (Tabei et al., 1998), el uso de ciertas combinaciones de auxinas y citoquininas (Selvaraj et al., 2007), el suplemento del medio con aminoácidos o poliaminas (Zhu y Chen, 2005; Selvaraj et al., 2007; Vasudevan et al., 2008), la adición de  $\text{AgNO}_3$  al medio de cultivo (Mohiuddin et al., 2005), etc.

La disponibilidad de un sistema de regeneración eficiente es, sin duda, un factor determinante, pero el problema es que, como se ha comentado antes, el proceso de infección con *Agrobacterium* y la presencia del agente selectivo a lo largo del proceso de transformación normalmente disminuyen la tasa de regeneración. En el caso del pepino, el descenso es dramático, hasta el punto de que en el laboratorio del Dr. Malepszy se estima que estos tratamientos disminuyen la tasa de regeneración por un factor de 20 (Yin et al., 2005b). De ahí, la necesidad de disponer de un sistema de regeneración eficaz antes de abordar un experimento de transformación.

La elección del tipo de explante es otro factor clave, no solo porque condiciona la eficacia de regeneración, sino porque además influye sobre la frecuencia de plantas poliploides que surgen tras el proceso de regeneración. Ello se debe a que las plantas de pepino tienen una estructura polisomática, es decir algunos tejidos u órganos de las plantas presentan un cierto grado de mixoploidía, al igual que ocurre en otras cucurbitáceas como el melón y la sandía (Ellul et al., 2007). De esta forma, debido a procesos de endoreduplicación asociados al desarrollo, mientras que las células de la línea germinal

mantienen el grado de ploidía característico de la especie (i.e. 2C), las de la línea somática pueden tener niveles de ploidía superiores (e.g. 4C, 8C, etc.). No es de extrañar por tanto que el uso de explantes con células poliploides preexistentes conduzca a la regeneración de plantas tetraploides o, lo que es menos habitual, con niveles superiores de ploidía. El grado de mixoploidía (i.e. la frecuencia y distribución de células con distinto nivel de ploidía) depende del tipo de órgano y el estado ontogénico del mismo. En general, la frecuencia de células con mayor nivel de ploidía aumenta con la edad del órgano, y de ahí la conveniencia de utilizar explantes de plantas relativamente jóvenes (e.g. procedentes de semillas germinadas *in vitro*).

Aunque la mixoploidía de los explantes de partida es una de las causas preexistentes de variación somaclonal, la aparición de cambios numéricos, estructurales o puntuales en las plantas regeneradas puede deberse a causas inherentes al propio cultivo *in vitro*. Entre estas, una de las más importantes es el tipo de morfogénesis: en general, la regeneración por vía directa o casi directa no genera más variación que la preexistente en el material de partida, mientras que la regeneración por vía indirecta conduce a una cierta tasa de variación somaclonal, mayor o menor dependiendo de las condiciones de cultivo, número de subcultivos, duración de cada subcultivo, etc.

A fin de minimizar la tasa de variación somaclonal, Burza y Malepszy (1995) desarrollaron un método de regeneración basado en la organogénesis casi directa a partir de microexplantes de pepino que, según ellos, es adecuado para diversos genotipos de esta especie. Utilizando un método similar, Gambley y Dodd (1990) indicaron que era factible obtener unos 50 ápices o brotes caulinares por cotiledón cultivando microexplantes de la parte basal de este órgano. Al aplicar la técnica basada en el uso de microexplantes de hoja en experimentos de transformación, Burza et al. (2006) describieron eficacias que oscilaban entre el 0,8% y el 6,5%. Si se comparan estas cifras con las que aparecen en algunos de los trabajos antes mencionados los resultados no parecen especialmente destacables, pero en realidad las tasas de transformación que describen Burza et al. (2006) son razonablemente altas y además creíbles. Los autores destacan que el método tiene la ventaja de que evita la variación somaclonal en las plantas regeneradas. En realidad, para sustentar tal afirmación harían falta estudios adicionales no solo en las plantas regeneradas sino sobre todo en las progenies de dichas plantas, pero como el

método conlleva un proceso de regeneración de tipo casi directo (y no indirecto) parece lógico que la tasa de variación somaclonal sea mínima.

En todo caso, conviene resaltar que para conseguir la regeneración de plantas de pepino por organogénesis casi directa no hace falta utilizar microexplantes, sino que se pueden utilizar explantes convencionales (i.e. del tamaño habitual en estos trabajos). La decisión de utilizar microexplantes o explantes convencionales depende de la eficacia del método de regeneración y no de la tasa de variación somaclonal que, previsiblemente, será la misma en ambos casos siempre que se utilicen métodos de regeneración casi directa o, en todo, sistemas que tiendan a minimizar la fase de callo.

## **5. Introducción y expresión de genes foráneos en plantas transgénicas de pepino que potencialmente pueden conferir caracteres relevantes**

Debido a las dificultades que plantea la obtención de plantas transgénicas de pepino, son escasos los trabajos publicados en los que describa la transferencia de genes que, potencialmente, puedan conferir fenotipos relevantes para la mejora. Además, en la mayor parte de los casos, los genotipos utilizados como receptores no son los más adecuados desde el punto de vista del mejorador, sino aquellos que ofrecen una mejor respuesta en cultivo *in vitro*. Con todo, merece la pena comentar algunos de estos trabajos, porque reflejan lo que podría conseguirse si se dispusiera de métodos de transformación más eficaces.

### **5.1. Tolerancia o resistencia a virus**

Lo que se denomina como resistencia derivada del patógeno viral, es decir la basada en la expresión de genes completos o truncados del propio virus en plantas transgénicas, se ha convertido en uno de los métodos más eficaces para introducir resistencia a enfermedades ocasionadas por virus. Pese a lo que se creía inicialmente, la estrategia no es producto exclusivo de la mente del investigador sino que es un invento de la evolución. En efecto, la introgresión natural de secuencias virales en el genoma de las plantas y el proceso de silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) asociado a la expresión de dichas secuencias es uno de los mecanismos que explica la aparición de ciertos genes de resistencia a virus en plantas (Mette et al., 2002).

Según Chee y Slightom (1991), la expresión del gen de la proteína de cubierta del CMV en plantas transgénicas de pepino (cv. 'Poinsett 76') ofrecía una cierta protección frente a la infección artificial por CMV en ensayos realizados en fitotrón. La proteína de cubierta del virus (24 KDa) se acumulaba en las plantas transgénicas alcanzando niveles de 14 ng/mg de proteína celular total. La expresión del gen de la proteína de cubierta del CMV aumentaba la resistencia en ensayos de campo (Gonsalves et al., 1992), aunque la protección no era total. A las 8 semanas del transplante, solo el 5 % de las plantas transgénicas del cv. 'Poinsett 76', así como las de un cultivar considerado como resistente al CMV ('Marketmore 76'), exhibían síntomas de la enfermedad, mientras que en las plantas no transgénicas (cv. 'Poinsett 76') el porcentaje de infección era del 72 %. A las 30 semanas en campo, los porcentajes de infección eran: 35% en las plantas transgénicas, 62 % en las del cultivar 'Marketmore 76' (considerado como resistente) y 85 % en el control (i.e. plantas del cv. 'Poinsett 76').

De forma similar, en un trabajo independiente, Nishibayashi et al. (1996a) señalaron que la acumulación de transcritos correspondientes al gen de la proteína de cubierta del CMV (*CMV-cp*) parecía estar positivamente correlacionada con la resistencia al virus. En este trabajo los autores indican que, para su sorpresa, no había relación entre la acumulación de mRNA y de la proteína correspondiente, hasta el punto de que la proteína de cubierta del virus no era detectable en las hojas y los cotiledones de las plantas transgénicas. La aparente anomalía no era tal, ya que si bien por aquella época se creía que la resistencia mediada por el patógeno estaría causada por la interferencia en el ciclo vital del virus generada por la acumulación de la proteína de cubierta, en la actualidad se sabe que la resistencia suele deberse a la activación de un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional (PTGS). Con independencia de las causas subyacentes de la resistencia, la progenie de un cruce entre plantas transgénicas y control exhibía una notable resistencia a la infección por CMV, pero no a la infección por el virus del mosaico del calabacín (ZYMV). Aunque esto último era previsible, lo extraño es que, según los autores, estas mismas plantas mostraban un reducido grado de síntomas tras una doble inoculación con CMV y ZYMV.

Continuando con la estrategia de introducción de resistencia a virus mediante expresión de genes procedentes del patógeno, uno de los trabajos más destacables es el publicado

por Gal-On et al. (2005). El virus del mosaico moteado del fruto de pepino (CFMMV) ocasiona severos síntomas, incluyendo moteado amarillo en hojas y frutos, que en ocasiones llegan a producir el marchitamiento de las plantas. Como no se había identificado una fuente de resistencia al virus dentro de la propia especie, los autores introdujeron el gen de la replicasa mediante transformación con *Agrobacterium* en un cultivar partenocárpico de pepino. Analizaron 14 progenies de las plantas transgénicas e identificaron 8 líneas con diversos grado de resistencia. Las plantas de una de estas líneas (I44), homocigótica para el gen de la replicasa, se mostraban inmunes al CFMMV tanto por inoculación mecánica como a través de injertos, e incluso por infección a través de la raíz, cultivando las plantas en un suelo infestado por el patógeno viral. Es interesante resaltar que los autores observaron también un retraso en la aparición de síntomas tras la infección artificial con tres tobamovirus relacionados con CFMMV. Más interesante aún, al usar la línea homocigótica I44 como patrón no aparecían síntomas de la enfermedad en variedades susceptibles injertadas sobre dichos patrones. Sobre la base de sus resultados, los autores enfatizaron que este era el primer trabajo en el que se describía protección de un cultivar sensible frente a un patógeno viral que se transmite a partir del suelo mediante injerto sobre un patrón transgénico.

## 5.2. Tolerancia o resistencia frente a hongos fitopatógenos

La estrategia para abordar este objetivo en la mejora del pepino se ha basado, al menos de momento, en la expresión de genes que codifican proteínas PR (*pathogenesis related genes*), habiéndose obtenido resultados dispares.

La expresión de un gen de arroz que codifica una quitinasa confirió un cierto grado de resistencia a *Botrytis cinerea*, mientras que la expresión de genes que codifican quitinasas de petunia, tabaco o judía no proporcionó resistencia a *Colletotrichum lagenarium*, *Alternaria cucumerina*, *Botrytis cinerea*, y *Rhizoctonia solani* (Punja y Raharjo, 1996; Raharjo et al., 1996)

Según Tabei et al. (1998) y Kishimoto et al. (2002), la expresión del cDNA de un gen de arroz que codifica una quitinasa de clase I (*RCC2*) bajo el control del promotor 35S estaba positivamente correlacionada con la resistencia a *Botrytis cinerea*. Según los autores, los niveles de la quitinasa de arroz en la línea CR32 (más resistente) y CR3 (resistencia

moderada) eran más elevados que en la línea CR20 (susceptible al hongo fitopatógeno). A diferencia de lo que ocurría en las plantas control, en las transgénicas no había crecimiento del micelio fúngico en las hojas lo que, como especulan los autores, podría deberse a la elevada expresión y presencia de la quitinasa de arroz en células epidérmicas y del mesófilo de las hojas.

Tabei et al. (1999) llevaron a cabo un ensayo de riesgos ambientales en ambiente semi-confinado con las líneas transgénicas de pepino, llegando a la conclusión de que, aparte de los efectos que produce la expresión del gen RCC2, no se detectaban otras diferencias entre las plantas transgénicas y no transgénicas.

### **5.3. Tolerancia frente a estrés abiótico**

Aunque no en el grado que sería deseable, se han ido logrando avances en torno a la identificación de genes que, supuestamente, están implicados en mecanismos de respuesta o tolerancia frente a diversos tipos de estrés abiótico, como la salinidad y la escasez de agua (Cuartero et al., 2006, 2009; Pineda et al., 2012), entre otros factores de estrés. Teniendo en cuenta que algunos de estos tipos de estrés abiótico ocasionan importantes descensos en la producción de hortalizas (así como en otras muchas especies), cabría esperar que en el caso del pepino se hubieran publicado numerosos trabajos dirigidos a incrementar la tolerancia frente a estos tipos de estrés abiótico utilizando la transgénesis como herramienta metodológica. En la práctica, los pocos trabajos publicados se refieren al tema de las bajas temperaturas, que aún siendo un problema importante, sobre todo en los lugares donde se practica una horticultura más intensiva, no es el más acuciante.

Sobre la base de la hipótesis de que algunos genes de respuesta a bajas temperaturas codifican proteínas con la función de dehidrasas (Close 1997), se han obtenido plantas transgénicas de pepino que expresan algunas de ellas. Por ejemplo, Rorat et al. (2004) construyeron un casete (GTDhn10) constituido por el promotor del gen de la glucosil-transferasa de *Solanum soganandinum* y el cDNA del gen *DHN10* (que codifica una dehidrina) y lo transfirieron a plantas de pepino. Detectaron la acumulación del mRNA del gen *DHN10* en hoja, cotiledón, hipocótilo y raíz de tres líneas transgénicas y los análisis posteriores indicaron que la acumulación del transcrito de *DHN10* estaba positivamente



correlacionada con la tolerancia a las bajas temperaturas (Yin et al., 2004 b). Lo sorprendente es que no llegaron a detectar la proteína DHN10 en estas plantas, lo que genera serias dudas en cuanto a la mayor tolerancia al frío de las líneas transgénicas porque en este caso no parece probable que el fenotipo se deba a un mecanismo de silenciamiento postranscripcional, sino a la presencia de la proteína en cuestión.

Yin et al. (2005 b) refieren un experimento similar, utilizando en este caso un casete constituido por el promotor del gen de la glucosil-transferasa de *S. sogarandinum* y el cDNA del gen *DHN24* (que también codifica una dehidrina), aunque que nosotros sepamos no se han publicado datos sobre el fenotipo de las plantas transgénicas.

#### **5.4. Mejora de la calidad organoléptica**

Los trabajos realizados en esta dirección se han centrado en tratar de eliminar, o al menos reducir, el sabor amargo característico de los frutos de muchos cultivares de pepino mediante la expresión de un gen que codifica la taumatina. Por lo que se refiere a los experimentos de transformación con este gen, aparte de los análisis habituales, se han llevado a cabo estudios más sistemáticos con las plantas transgénicas de los que cabe extraer algunas conclusiones interesantes.

La taumatina es una proteína vegetal que confiere sabor dulce y que se sintetiza en los frutos de una planta perenne (*Thaumatococcus daniellii* Bennet) extendida en el África occidental. Se utiliza como edulcorante en la industria agroalimentaria (donde se denomina como E957) ya que se considera seguro en términos agroalimentarios (FEMA GRAS™, 2016). Iyengar et al. (1979) determinaron la secuencia completa de aminoácidos de la taumatina I e indicaron que este edulcorante es 100.000 veces más dulce que la sacarosa sobre una base molar, aunque los datos en torno a su capacidad como edulcorante oscilan según la fuente consultada.

Se obtuvieron plantas transgénicas de pepino con el cDNA del gen de la taumatina II bajo control del promotor 35S (Szwacka et al., 1996, 1999). De las 10 líneas transgénicas analizadas, seis tenían una copia del gen de la taumatina II y las otras cuatro tenían de dos a cinco copias. No se detectaron truncamientos o reordenaciones en el casete de expresión de la taumatina II (Szwacka et al., 2002a). La localización cromosómica de la

construcción *p35S::thaumatinIIcDNA-pnos::nptII* se estudió por FISH, observándose una inserción preferencial en las regiones eucromáticas de los cromosomas 1, 2, 3 y 4 (Tagashira et al., 2005).

Se observaron niveles variables en la expresión del gen de la taumatina II y una ausencia de correlación entre los niveles de acumulación de mRNA y proteína, sugiriendo que la expresión puede estar controlada tanto a nivel transcripcional como traduccional. No se observó tampoco una correlación entre los niveles de transcrito y el número de copias, pese a que las diferencias en la acumulación de mRNA llegaban a ser hasta 10 veces mayores en distintas líneas (Szwacka et al., 2002 b).

Los análisis Northern revelaron la presencia de niveles altos o moderados del mRNA de la taumatina en frutos maduros de dos plantas TG1, manteniéndose los niveles del transcrito en las correspondientes progenies TG2 y TG3. Los análisis Western permitieron detectar la proteína en su forma procesada (22KDa) en 11 de las 16 plantas TG2 evaluadas. Se observó además que la acumulación de taumatina II en los órganos de líneas TG3 independientes variaba en un contexto espacio-temporal (Szwacka et al., 2002a).

En los frutos de las plantas TG2 se observó una correlación positiva entre acumulación de la proteína (i.e. taumatina II) y la intensidad del sabor dulce. Se analizaron 256 frutos y, como era de esperar, el sabor de los mismos difería del de la taumatina comercial, probablemente debido a la interacción con otros metabolitos endógenos. Conviene resaltar que, según los autores, los frutos de una línea tenían un sabor dulce, en lugar del típico sabor ácido o amargo de los frutos del *wild-type*. Por lo que respecta al aroma, los frutos de algunas líneas exhibían el típico del pepino, mientras que otros tenían un aroma diferente (Szwacka et al., 2002 a y b).

Los experimentos con las plantas transgénicas que expresaban el gen de la taumatina II no quedaron aquí, sino que se llevaron a cabo estudios adicionales sobre la composición química y perfiles metabólicos de los frutos, la producción de algunas líneas transgénicas en ensayos piloto, e incluso el efecto que producía el suministro de dichos frutos como parte esencial de la dieta en ratas de laboratorio.

Por lo que respecta a la composición química, los frutos de las plantas transgénicas tenían un nivel más alto de proteína (20.3% *versus* 17.9% de materia seca) y menos fibra (9.4 *versus* 11.4% de materia seca). Al analizar los contenidos de diversos iones en la ceniza de tales frutos se observaron menores niveles de Na, K, Ca y Mg y, en cambio, mayores niveles de Fe y Cu (Kosieradzka et al., 2001).

Se analizaron también los perfiles metabólicos en frutos de cinco líneas transgénicas independientes con respecto a los de plantas regeneradas *in vitro* pero no transgénicas (i.e. equivalentes al control, excepto por la posible existencia de cambios somaclonales). Las diferencias en los perfiles obtenidos en las plantas transgénicas se atribuyeron a la localización cromosómica del gen foráneo (i.e. a un efecto de posición), pero los resultados fueron poco claros porque la frecuencia de cambios en los 68 metabolitos que se analizaron con detalle oscilaba entre el 17% y el 40%, valores similares a los obtenidos en los frutos de las plantas utilizadas como control en estos experimentos (Tagashira et al., 2005).

En los ensayos piloto realizados en campo, las líneas transgénicas tenían una producción equivalente a la de las plantas no transgénicas (Gajc-Wolska et al., 2001). En cambio, la calidad organoléptica de los frutos transgénicos era mayor (Gajc-Wolska et al., 2003) ya que tenían un sabor más dulce o, lo que es lo mismo, menos amargo que el de los frutos de la línea original. Si bien esto era previsible, lo que no queda claro es el por qué los frutos transgénicos exhibían una mayor firmeza de la carne.

La alimentación de ratas de laboratorio con dietas equivalentes en el nivel de proteína pero que contenían 0 o 15% de liofilizados obtenidos a partir de pepinos transgénicos y no transgénicos durante 5 semanas reveló una ausencia de cualquier efecto sobre la ganancia de peso o el estado de salud aparente de los animales (Kosieradzka et al., 2001).

Twardowska (2003) obtuvo resultados similares en el contexto del proyecto de investigación de su Tesis Doctoral. Aunque la mencionada Tesis está escrita en polaco, atendiendo a lo que indican Yin et al. (2005 b), el mencionado investigador observó además un mayor nivel de hematocrito en las ratas de laboratorio tras la alimentación con pepinos transgénicos, lo cual atribuyó a los mayores niveles de hierro y proteína en dichos frutos. Según parece, este autor llegó a realizar incluso ensayos propios del campo

de la tecnología de alimentos con una línea transgénica caracterizada por la producción de frutos más dulces. Tras demostrar que se cumplía el principio de la equivalencia sustancial entre frutos transgénicos y no transgénicos, ensayó varias combinaciones de los primeros con frutos frescos o procesados de otras especies para ver si ello producía, o no, algún tipo de alteración en sus características básicas. En todos los casos observó una alta estabilidad de la taumatina II, tanto tras seis horas de almacenamiento de los frutos frescos como a las 4 semanas de conservación en ácido acético.

Por último, en el trabajo antes mencionado (Twardowska, 2003) se realizó un ensayo con algo equivalente a lo que aquí denominaríamos como un panel de cata. Para los que intervinieron en tal ensayo, los frutos de las líneas transgénicas tenían menor aceptación cuando se presentaban como único alimento para el consumo en fresco pero, en cambio, resultaban ventajosos en diversas combinaciones con otros frutos y especialmente después del procesado. La mayor aceptación del producto procesado se debía, como era de esperar, al sabor más dulce. En cambio, la menor aceptación de los frutos para el cultivo en fresco radicaba en la presencia de una mancha de color oscuro en el extremo proximal del fruto (i.e. el más cercano al pedicelo).

Aparte del interés intrínseco del trabajo, los resultados del mismo reflejan la línea tan sutil que separa la aceptación o rechazo de un nuevo producto en el mercado. Por lo que se refiere a los transgénicos, el trabajo revela además la conveniencia de no quedarse en un fenotipado restringido al carácter para el que se pretende obtener una cierta mejora, sino una evaluación más amplia que excluya efectos pleiotrópicos del gen foráneo sobre otros caracteres relevantes, así como los correspondientes ensayos de producción que demuestren que ésta no se ve alterada por el efecto que produce la expresión de dicho gen o por un excesivo coste energético asociado al uso de promotores constitutivos.

### **5.5. Pepinos transgénicos en la industria de cosméticos**

En algunas regiones o países del mundo, como en Corea, los frutos del pepino no solo se utilizan para el consumo en fresco o una vez procesados, sino que se emplean incluso como una especie de cosmético para mantener la tersura de la piel y retrasar el envejecimiento de la misma. Teniendo esto en cuenta y la asociación que habitualmente se hace entre la acumulación de radicales de oxígeno activo (ROS) y el envejecimiento de

la piel, aparte de otros muchos efectos indeseables para el ser humano, Lee et al. (2003) obtuvieron plantas transgénicas de pepino que expresaban un gen que codifica una superóxido-dismutasa (SOD) supuestamente implicada en la eliminación de ROS y por tanto en la defensa frente al estrés oxidativo en los organismos aeróbicos.

En concreto, los autores transfirieron un casete de expresión (denominado *mSOD1*) constituido por el cDNA de un gen de la yuca que codifica una Cu-Zn-SOD bajo control del promotor de un gen (ascorbato oxidasa) que, aunque no de forma específica, se expresa preferentemente en frutos. Evaluaron tres líneas transgénicas independientes, observando un alto nivel de expresión del gen *mSOD1* en el fruto, pero no en las hojas. La actividad específica SOD (unidades/mg de proteína) era tres veces mayor en los frutos de las plantas transgénicas que en los correspondientes controles. Al analizar las siete isoenzimas de la superóxido dismutasa presentes en frutos de las plantas transgénicas de pepino, detectaron un mayor nivel de expresión tanto en el gen de la yuca transferido (*mSOD1*), como en dos de los genes endógenos, mientras que la expresión de los otros cuatro no se veía alterada. Los resultados son interesantes porque reflejan la complejidad de los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo (i.e. la expresión de un gen foráneo que codifica una SOD conduce al aumento de la expresión de dos genes que codifican enzimas relacionados o isoenzimas), pero lo serían aún más si se aportaran datos sobre la utilidad de las nuevas líneas transgénicas para solventar el problema planteado o, alternativamente, para aumentar la tolerancia frente a distintos tipos de estrés abiótico (e.g. salinidad, escasez de agua, bajas temperaturas, etc.) en los que la acumulación de ROS juega un papel clave.

## 5.6. Mejora de la producción

Salyaev et al. (2002) introdujeron dos genes (*UGT* de maíz y *ACB* de *Arabidopsis*) en distintas especies, incluyendo el pepino, a fin de incrementar la producción. El gen *UGT* (*iaglu*) de maíz codifica una UGT-transferasa (IAA-glucosa sintasa) que, por lo que parece, está relacionada con la acumulación de IAA en el endospermo de la semilla, mientras que el gen *ACB* de *Arabidopsis thaliana* codifica un transportador para acil-CoAs. Los autores señalan que las líneas transgénicas de pepino dieron una producción de hasta 46 kg por planta en invernadero, unas tres veces más que las plantas del cultivar original. Aunque el

aumento de la producción en las líneas transgénicas parece espectacular, el rendimiento por planta no llega a la que se obtiene con los cultivares híbridos en los lugares donde se practica una agricultura más tecnificada (e.g. sureste español). En cualquier caso, conviene resaltar que los resultados anteriores se presentaron en un Congreso (Creta, 2002) y, que nosotros sepamos, no se han publicado en una revista científica, por lo que resulta difícil emitir cualquier juicio al respecto.

### 5.7. Frutos sin semillas

En algunas especies, la capacidad de desarrollar frutos partenocárpicos es un carácter valioso porque, por un lado, permite mantener la producción bajo condiciones desfavorables de polinización y, por otro, la ausencia de semillas es un atributo de calidad que demanda el consumidor. La mayor parte de los frutos de sandía sin semillas que se comercializan actualmente derivan de líneas triploides, obtenidas a partir del cruce entre líneas diploides y autotetraploides (Ellull et al., 2007). En cambio, en el caso del pepino, la mayor parte de los frutos sin semillas se obtienen a partir de líneas ginoicas que tienen un mayor o menor grado de partenocarpia facultativa.

Pese a la importancia del carácter, es mucho lo que falta por conocer en torno a la base genética y modo de acción génica que determinan la capacidad de producir frutos partenocárpicos de pepino (Sun et al., 2004). Con todo, se sabe desde hace tiempo que el aumento en el nivel de auxina en los óvulos durante ciertas fases del desarrollo floral (e.g. preantesis o antesis) conducen a una cierta tasa de cuajado del fruto en ausencia de polinización. Por este motivo, Rotino et al. (1997) patentaron y publicaron un método para obtener frutos partenocárpicos basado en la transferencia y expresión de la secuencia codificadora del gen *iaaM* de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* bajo control de las señales reguladoras en 5' de un gen de *Antirrhinum majus* que se expresa preferentemente en óvulos (*DefH9*). En concreto, los autores observaron que la expresión de este gen conducía a la formación de frutos partenocárpicos en tabaco y berenjena, aunque era previsible que tuviera un efecto similar en otras especies.

Yin et al. (2006) lograron resultados similares en pepino utilizando el mismo casete de expresión (*pDefH9::iaaM*). Los autores obtuvieron 9 líneas transgénicas independientes (i.e. procedentes de distintos explantes) y, al cultivar las plantas en el invernadero,

observaron que el cuajado de fruto en ausencia de polinización oscilaba entre el 60% y el 100%, dependiendo de la línea transgénica en cuestión.

### 5.8. Objetivos relacionados con la salud

Se han creado muchas expectativas en torno al uso potencial de plantas transgénicas como biofactorías para la síntesis de productos relevantes para el ser humano o, incluso, para solventar problemas relacionados con la salud humana. Recientemente, un grupo chino ha publicado un trabajo en pepino en el que se intenta dar una solución alternativa e ingeniosa al problema de la diabetes.

La molécula GLP-1 es un péptido de 30 aminoácidos semejante al glucagón con actividad de hormona cuya función reguladora consiste en estimular la secreción de insulina para equilibrar los niveles de glucosa en sangre.

Zhao et al. (2009) construyeron un gen artificial o quimérico (GLP-T) constituido por 10 copias de la secuencia codificadora del péptido (GLP-1) situadas en tándem bajo control del elemento regulador G10-90 (Ishige et al., 1999). Para seleccionar las células transgénicas utilizaron un esquema de selección negativa basado en el empleo del gen marcador *nptII*. No obstante, el vector (pX6) se diseñó de forma que las líneas transgénicas finales estuvieran libres del gen marcador. Para ello, el casete de expresión correspondiente al marcador se situó entre dos módulos *loxP*, a fin de lograr la eliminación del mismo mediante recombinación inducida por tratamiento con  $\beta$ -estradiol (Zuo et al., 2001).

Tras la infección y co-cultivo de los explantes de pepino con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* portadora del vector pX6, y el subsiguiente cultivo de los explantes en medio con kanamicina, solo pudieron identificar 4 líneas transgénicas. Los análisis *Western* revelaron que dos de ellas expresaban la proteína de fusión (GLP-T) y, como es lógico, estas fueron las líneas seleccionadas en los ensayos con ratas diabéticas.

Los ensayos de actividad biológica en las ratas diabéticas revelaron que el nivel de glucosa en el suero se reducía significativamente tras la administración de la proteína de fusión GLP-T extraída a partir de los frutos de las líneas transgénicas de pepino. Teniendo en cuenta que los análisis adicionales en las ratas alimentadas con esta dieta no revelan

ningún efecto dañino aparente, los autores concluyen que sus resultados pueden proporcionar una nueva vía o una estrategia alternativa para la prevención o cura de la diabetes en seres humanos.

Los resultados de algunos de los trabajos citados anteriormente ilustran lo que se podría lograr utilizando la transgénesis como herramienta para abordar objetivos de mejora u otros objetivos relevantes para el ser humano, al tiempo que reflejan las limitaciones a la hora de llevar a cabo experimentos de transformación genética con el pepino.

Así por ejemplo, sin realizar ningún tipo de crítica al trabajo de Zhao et al. (2009), lo cierto es que obtener un total de 4 plantas transgénicas independientes resulta poco satisfactorio porque ofrece escasas posibilidades a la hora de seleccionar aquella o aquellas que exhiban un fenotipo relevante. Es verdad que en el trabajo en cuestión los autores tuvieron la fortuna de identificar dos líneas (de las cuatro obtenidas) que sintetizaban la proteína de fusión (GLP-T), pero normalmente para identificar una línea con fenotipo adecuado se requiere evaluar (y por tanto obtener) un mayor número de plantas. El escaso número de líneas transgénicas que se obtuvo en este trabajo no se debió al hecho de utilizar una estrategia que permitía la eliminación del gen marcador mediante una modalidad del sistema *cre-lox*, ya que la selección se hizo como es habitual (i.e. en medio con kanamicina) y la eliminación se llevó a cabo *a posteriori*. El problema fue que la eficacia del método de transformación era muy baja. De hecho, conviene resaltar que para conseguir las 4 líneas transgénicas los autores tuvieron que utilizar 2.000 explantes de cotiledón, lo que tiene un gran mérito porque representa una enorme cantidad de trabajo. En cualquier caso, este trabajo ilustra perfectamente las dificultades que plantea la transformación genética en pepino.

### **5.9. Transformación genética de pepino vía *Agrobacterium***

En la Tabla 1 se resumen los trabajos publicados de transformación genética de pepino (*Cucumis sativus* L.) vía *Agrobacterium*.



**Tabla 1.** Transformación genética de pepino (*Cucumis sativus* L.) vía *Agrobacterium*.

Genotipo	Tipo de Explante	Proceso Morfogenético	<i>Agrobacterium</i> (cepa)	Genes Transferidos (*)	Resultado	Referencia
Cv. Straight Eight	Segmentos de hipocótilo	Embriogénesis	<i>A. rhizogenes</i> (A4)	<i>nptII</i>	Plantas	Trulson et al. 1986
Líneas Gy3 y Straight Eight	Hipocótilo	Embriogénesis	<i>A. rhizogenes</i> (LBA-9402)	<i>Agropina, manopina</i>	Embriones somáticos	Mark et al. 1989
Cv. Poinsett 76	Cotiledón (5 mm <sup>2</sup> ) de plántulas 3-5 días	Embriogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (C58Z707)	<i>nptII</i>	Plantas	Chee 1990 b
Línea GY14A	Cotiledón de 4 días	Embriogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>nptII</i>	Plantas	Hammar y Grumet 1990 (Abstract)
Cv. Poinsett 76	Cotiledón (5 mm <sup>2</sup> ) de plántulas 3-5 días	Embriogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (C58Z707)	<i>nptII, GUS, CMV-C cp</i>	Plantas	Chee y Slightom 1991
Cv. Rebella	Cotiledón (corte transversal a mitad) de plántulas 7 días	Organogénesis	<i>A. rhizogenes</i> (A4T, A4T::Neo, BN1010, BN1010::Neo)	<i>Opinas</i>	Raíces adventicias	McInnes et al. 1991
CV. Noval	Segmentos internodales	Organogénesis	<i>A. rhizogenes</i> (A4)	<i>rolABC, aux</i>	Raíces adventicias	Amselem y Tepfer 1992
Líneas 3672 y 3676	Segmentos de pecíolo (4-6 mm) y hoja (0,5 cm <sup>2</sup> )	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>nptII</i>	Plantas	Sarmiento et al. 1992

**Tabla 1.** Transformación genética de pepino (*Cucumis sativus* L.) vía *Agrobacterium* (cont.).

Genotipo	Tipo de Explante	Proceso Morfogénico	<i>Agrobacterium</i> (cepa)	Genes Transferidos (*)	Resultado	Referencia
Cv. Shinhokusei Nr.1	Cotiledón	Embriogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)	<i>hpt</i>	Plantas	Tabei et al. 1994
Cvs. Spring Swallow y Tasty Green	Hoja, pecíolo, cotiledón, hipocótilo	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>(nptII)</i>	Plantas transgénicas putativas	Mohiuddin et al. 1995 (Abstract)
Línea 1021	Segmentos de hipocótilo de plántulas 7 días	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (EHA101)	<i>CMV-O cp</i>	Plantas	Nishibayashi et al. 1996 a
Línea 1021	Segmentos de hipocótilo de plántulas 7-10 días	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (EHA101)	<i>GUS</i>	Plantas	Nishibayashi et al. 1996 b
Cv. Endeavor	Pecíolo (4,5 mm largo) de plántulas 10-21 días	Embriogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (EHA105)	<i>nptII</i> , <i>CH5B</i> , y genes de la <i>quitinasa acidica de petunia</i> y de la <i>quitinasa básica de tabaco</i>	Plantas	Raharjo et al. 1996
Cv. Endeavor	Pecíolo (4,5 mm largo) de plántulas 10-21 días	Embriogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (EHA105)	<i>nptII</i>	Plantas	Raharjo y Punja 1996
Hibrido Bambina (partenocárpico)	Cotiledón (mitad proximal dividida 2 partes a través veno central) de plántulas 5-7 días	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>luc</i>	Plantas	Sapountzakis y Tsiftaris 1996 (Abstract)

**Tabla 1.** Transformación genética de pepino (*Cucumis sativus* L.) vía *Agrobacterium* (cont.).

Genotipo	Tipo de Explante	Proceso Morfogénico	<i>Agrobacterium</i> (cepa)	Genes Transferidos (*)	Resultado	Referencia
Línea del cv. Borszczagowski	Hoja	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>cDNA Taumatina II , nptII</i>	Plantas	Szwacka et al. 1996
Cv. Borszczagowski	Hoja (micro y macroexplantes)		<i>A. tumefaciens</i>		Callo transgénico putativo	El-Kazzaz y Malepszy 1997
		Cotiledón	Organogénesis	<i>A. rhizogenes</i> (R1000, R1601)	<i>opinas</i>	Raíces adventicias
	Cotiledón	Organogénesis	<i>A. rhizogenes</i> (R1000, R1601)	<i>manopina , agropina</i>	Raíces adventicias	Shi et al. 1998
Cv. Shimoshirazu	Cotiledón de plántulas 1 día	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>RCC2</i>	Plantas	Tabei et al. 1998
Cv. Jinyan 4	Cotiledón, hipocótilo		<i>A. rhizogenes</i> (A4)	<i>GUS</i>	Plantas	Bin et al. 2000 (Abstract)
Cv. Poinsett 76	Cotiledón	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (EHA105)	<i>bar</i>	Brotes	Ganapathi y Perl-Treves 2000 (Abstract)
	Cotiledón		<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>WMV-2 CP</i>	Plantas	Huizhong et al. 2000 (Abstract)

**Tabla 1.** Transformación genética de pepino (*Cucumis sativus* L.) vía *Agrobacterium* (cont.).

Genotipo	Tipo de Explante	Proceso Morfogénico	<i>Agrobacterium</i> (cepa)	Genes Transferidos (*)	Resultado	Referencia
Cv. Spring Swallow	Cotiledón	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (GU2260)	<i>GUS</i>	Plantas	Mohiuddin et al. 2000
	Cotiledón, hipocótilo		<i>A. rhizogenes</i> (A4)	<i>Agropina</i>	Raíces adventicias	Chunna y Yafu 2001 (Abstract)
			<i>A. tumefaciens</i>	<i>RCC2</i>	Plantas	Kishimoto et al. 2002 (Abstract)
Var. Chungjang				<i>nptII, ZGMMV-CP</i>	Plantas	Lee et al. 2002
Híbridos (partenocárpico): Bambina, Brunex	Cotiledón de plántulas 5 días	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII</i>	Brotes	Sapountzakis y Tsafaris 2002 (Abstract)
Cv. Sheetal	Cotiledón	Organogénesis directa	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>nptII, GUS</i>	Plantas	Soniya y Das 2002 (Abstract)
Cv. Green Long	Cotiledón de plántulas 1 día	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (EHA105)	<i>nptII, GUS</i>	Brotes	Vasudevan et al. 2002
Cv. Çengel köy	Cotiledón (corte transv. y longit. en 2 mitades), hipocótilo (0,5-1 y 2 cm longitud)	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (EHA101)	<i>nptII, GUS</i>	Plantas	Kose y Koç 2003

**Tabla 1.** Transformación genética de pepino (*Cucumis sativus* L.) vía *Agrobacterium* (cont.).

Genotipo	Tipo de Explante	Proceso Morfogenético	<i>Agrobacterium</i> (cepa)	Genes Transferidos (*)	Resultado	Referencia
Cv. Winter Long	Cotiledón	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>mSOD1</i>	Plantas	Lee et al. 2003
Cv. Jinyansihao	Cotiledón	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i>	<i>ABP1</i>	Plantas	Jigang et al. 2004 (Abstract)
	Cotiledón			<i>CBF3</i>	Plantas	Xiao-Yan et al. 2004 (Abstract)
Línea del cv. Borszczagowski	Hoja	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>GUS</i> (estudios de expresión bajo el promotor PR-2d de tabaco)	Plantas	Yin et al. 2004 a
Línea del cv. Borszczagowski	Hoja	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>pGT::Dhn10</i>	Plantas	Yin et al. 2004 b
Cv. Eunchim	Nudo cotiledonar	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404, GV3101, EHA101)	<i>GUS, bar</i>	Plantas	Cho et al. 2005
(Cv. Partenocárpico)	Cotiledón		<i>A. tumefaciens</i>	Gen putativo de 54-kDa de la replicasa de CFMMV	Plantas	Gal-On et al. 2005 (Abstract)

**Tabla 1.** Transformación genética de pepino (*Cucumis sativus* L.) vía *Agrobacterium* (cont.).

Genotipo	Tipo de Explante	Proceso Morfogenético	<i>Agrobacterium</i> (cepa)	Genes Transferidos (*)	Resultado	Referencia
Poinsett 76	Cotiledón	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (EHA105)	<i>nptII</i> , <i>GUS</i>	Plantas	Rajagopalan y Perl-Treves 2005
Cv. Poinsett 76	Cotiledón de plántulas 5 días	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (EHA105, LBA4404)	<i>nptII</i> , <i>GUS</i>	Plantas	Sureshkumar et al. 2005 (Abstract)
Cv. Greenlong	Cotiledón	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (EHA105)	<i>nptII</i> , <i>bar</i>	Plantas	Vengadesan et al. 2005
	Nudo cotiledonar		<i>A. tumefaciens</i>	<i>DREB1A</i>	Plantas	Wei et al. 2005 (Abstract)
	Cotiledón e yema axilar	Organogénesis	<i>A. rhizogenes</i> (K599)	<i>rolC</i>	Raíces adventicias	Xiang et al. 2005 (Abstract)
Línea del cv. Borszczagowski	(1) Hoja (microexplantes: 2–3 mm <sup>2</sup> ); (2) Yema apical de plántulas 7-10 días.	(1) Organogénesis directa;	<i>A. tumefaciens</i> (1) LBA4404; (2) LBA4404; EHA105	(1) <i>nptII</i> y otras construcciones (2) <i>GUS</i> , <i>hpt</i>	(1) y (2) Plantas	Burza et al. 2006
		(2) Embriogénesis (cultivo en suspensión).				
Cv. Jinyan no. 7	Cotiledón, hipocotilo (ambos de plántulas 4 días)	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (EHA105)	<i>pmi</i>	Plantas	He et al. 2006
Cv. DongNong 649	Cotiledón	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i>	<i>laaM</i>	Plantas	Su et al. 2006 (Abstract)

**Tabla 1.** Transformación genética de pepino (*Cucumis sativus* L.) vía *Agrobacterium* (cont.).

Genotipo	Tipo de Explante	Proceso Morfogenético	<i>Agrobacterium</i> (cepa)	Genes Transferidos (*)	Resultado	Referencia
Cv. Poinsett 76	Cotiledón	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (EHA105)	<i>nptII</i>	Plantas	Sureshkumar et al. 2006 (Abstract)
Línea S06	Cotiledón	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>ATT1</i>	Plantas	Wang et al. 2006 (Abstract)
Cv. Borszczagowski (línea B)			<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>pDefH9-iaaM</i>	Plantas	Yin et al. 2006
Var. S06 y S52			<i>A. tumefaciens</i>	<i>CsMADS06, GFP</i>	Plantas	Lai et al. 2007 (Abstract)
Línea S52	Cotiledón	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>ACS1</i>	Plantas	Li et al. 2007 (Abstract)
Cv. 649			<i>A. tumefaciens</i>	<i>iaaM</i>	Plantas	Liu y Qin 2007 (Abstract)
Cv. Poinsett 76	Cotiledón de plántulas 5 días	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (EHA105)	<i>bar</i>	Plantas	Vasudevan et al. 2007
Cv. Eunsung	Hipocótilo	Embriogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (EHA101)	<i>GUS</i>	Plantas	Kim et al. 2008
	Cotiledón	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i>	<i>BCL-2</i>  <i>BnCS</i>	Plantas  Plantas	ByungWhan y ByungHoon 2009 (Abstract)  Liu et al. 2009 (Abstract)

**Tabla 1.** Transformación genética de pepino (*Cucumis sativus* L.) vía *Agrobacterium* (cont.).

Genotipo	Tipo de Explante	Proceso Morfogénico	<i>Agrobacterium</i> (cepa)	Genes Transferidos (*)	Resultado	Referencia
Cv. Jinyan	Entrenudo de plántulas 10 días		<i>A. tumefaciens</i> (EHA105)	<i>hpt</i>	Plantas	Miao et al. 2009 (Abstract)
Línea de mejora 2M1	Nudo cotiledonar de plántulas 4-5 días (cortados transversalmente en 2 partes)	Embriogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)	<i>GLP-T</i>	Plantas	Zhao et al. 2009
				<i>ICE1</i>	Plantas	Liu et al. 2010 (Abstract)
Cv. Eunchim	Nudo cotiledonar de plántulas 7-10 días	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (EHA101)	<i>TPSP</i>	Plantas	Kim et al. 2010
Cv. Poinsett76	Cotiledón	Organogénesis directa	<i>A. tumefaciens</i> (EHA105, LBA4404)	<i>sGFP</i>	Plantas	Selvaraj et al. 2010 (Abstract)
Cv. Swarnamukhi	Cotiledón de plántulas 7-10 días	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>HBsAg</i>	Plantas	Unni y Soniya 2010 (Abstract)
Var. Simpang Pulai	Cotiledón	Organogénesis	<i>A. rhizogenes</i> (A4)	<i>rolB</i> , <i>GUS</i> (estudios de expresión <i>GUS</i> bajo distintos promotores)	Raíces adventicias	Anuar et al. 2011
Línea de mejora 02-8	Cotiledón de plántulas 8 días	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (EHA105)	<i>PacPAP</i>	Plantas	Cao et al. 2011



**Tabla 1.** Transformación genética de pepino (*Cucumis sativus* L.) vía *Agrobacterium* (cont.).

Genotipo	Tipo de Explante	Proceso Morfogenético	<i>Agrobacterium</i> (cepa)	Genes Transferidos (*)	Resultado	Referencia
Cv. Eunsung	Cotiledón con nudo cotiledonar	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (EHA101)	<i>nptII</i>	Plantas	Jang et al. 2011
Cv. Jinyan-4	Cotiledón (cortado en 3 segmentos) de plántulas 3 días	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>nptII, CsACO4</i>	Plantas	Chen et al. 2012
Cv. Poinsett 76 SR			<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>CBF1</i>	Plantas	Gupta et al. 2012 (Abstract)
Cv. Shinhokusei No. 1	Cotiledón (corte transversal a mitad c/ parte distal descartada; parte proximal cortada longitudinal/en 2 trozos)	Organogénesis directa	<i>A. tumefaciens</i> (EHA105) (infiltración p/ vacío)	<i>GFP, nptII</i>	Plantas	Nanasato et al. 2013
Cv. Xintaimici	Nudo cotiledonar	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>CsNMAPK</i>	Plantas	Wang et al. 2013
Var. Esfahan	Cotiledón (cortado en 5 segmentos de 5 mm <sup>2</sup> )	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>tPA</i>	Plantas	Asgari et al. 2014
Var. Shital	Callos de hoja, nudo y entrenudo	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	<i>GUS</i>	Callos	Faisal et al. (2015)

**Tabla 1.** Transformación genética de pepino (*Cucumis sativus* L.) vía *Agrobacterium* (cont.).

Genotipo	Tipo de Explante	Proceso Morfogenético	<i>Agrobacterium</i> (cepa)	Genes Transferidos (*)	Resultado	Referencia
Cv. Ashley	(1) Meristemo apical del brote; (2) Cotiledón  (ambos de plántulas 3 días)	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (‘ShooterG’) (1) Microinyección; (2) Inmersión en medio de infección	<i>nptII</i>	Plantas	Baskaran et al. 2016
Cv. Eunsung	Cotiledón con nudo cotiledonar (2-3 cm de longitud) de plántulas 7-10 días	Organogénesis	<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)	<i>PAC</i>	Plantas	Jang et al. 2016

## (\*) Abreviaturas

<i>ABP1</i>	Gen que codifica una proteína de unión a auxina.	<i>nptII</i>	Gen de la neomicina fosfotransferasa de tipo II.
<i>ACS1</i>	Gen que codifica para 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico sintasa.	<i>PAC</i>	Recombinante de los genes que codifican para las enzimas fitoeno sintasa ( <i>psy</i> ) y caroteno desaturasa ( <i>crtI</i> ).
<i>ATT1</i>	Gen que codifica una monooxigenasa del citocromo P450.	<i>PacPAP</i>	Gen de la proteína antiviral de <i>Phytolacca</i> ( <i>PAP</i> ) defectivo y no virulento.
<i>aux</i>	Genes del plasmido Ri (región TR) involucrado en el proceso de inducción de raíces y en su crecimiento.	<i>pDefH9</i>	Promotor del gen <i>Deficiens Homologue 9</i> ( <i>DefH9</i> ) de <i>Antirrhinum majus</i> (expresado preferentemente en óvulos).
<i>bar</i>	Gen de resistencia a bialafos.	<i>pDefH9-iaaM</i>	(Construcción quimérica).
<i>BCL-2</i>	Gen humano relacionado con la apoptosis.	<i>pmi</i>	Gen que codifica para la fosfomanosa isomerasa.
<i>BnCs</i>	Gene implicado en la respuesta al frío de <i>Brassica napus</i> .	<i>pGT::Dhn10</i>	Casete con el promotor del gen de la glucosil-transferasa (GT) y el cDNA del gen que codifica una dehidrina ( <i>Dhn10</i> ), ambos de <i>S. sogarandinum</i> .
<i>CBF1-3</i>	Subfamilia de activadores transcripcionales de <i>Arabidopsis thaliana</i> inducidos por el frío.	<i>RCC2</i>	cDNA de un gen de arroz que codifica una quitinasa de clase I.
<i>CFMMV</i>	Virus del mosaico moteado del fruto de pepino.	<i>rolABC</i>	Genes del plasmido Ri (región TL) involucrado en el proceso de inducción de raíces y en su crecimiento.
<i>CH5B</i>	Gen de la quitinasa básica de judía.	<i>rolB, C</i>	Oncogenes de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> en plantas perteneciente al grupo <i>rolABC</i> .
<i>CMV-C cp</i>	Gen de la proteína de la cubierta del virus del mosaico del pepino (cepa C).	<i>sGFP</i>	<i>GFP</i> sintético.
<i>CMV-O cp</i>	Gen de la proteína de la cubierta del Virus del mosaico del pepino (cepa O).	T-DNA	DNA de transferencia (cadena única).
<i>CsACO4</i>	Gene que codifica para 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) Oxidasa (ACO) de <i>Cucumis sativus</i> .	<i>tPA</i>	cDNA del gen que codifica el activador tisular del plasminógeno humano.
<i>CsMADS06</i>	cDNA conteniendo una secuencia de MADS-box obtenido de <i>Cucumis sativus</i> .	<i>TPSP</i>	Construcción con los genes TPS y TPP de <i>Escherichia coli</i> que codifican para una trehalosa-6-fosfato (T-6-P) sintasa y T-6-P fosfatasa, respectivamente.
<i>CsNMAPK</i>	Gen que codifica para una proteína quinasa activada por mitógenos de <i>Cucumis sativus</i> .	<i>WMV-2 CP</i>	Gen de la proteína de la cubierta del virus del mosaico de la sandía-2.
<i>DREB1A</i>	(Designado también como <i>CBF3</i> ).	<i>ZGMMV-CP</i>	Gen de la proteína de la cubierta del virus del mosaico moteado verde del calabacín.
<i>GFP</i>	Gen que codifica para la proteína verde fluorescente.		
<i>GLP-T</i>	Codifica para una proteína de fusión (contiene diez repeticiones en tándem del análogo <i>GLP-1</i> - péptido similar al glucagón tipo 1).		
<i>GUS (uidA)</i>	Gen de la $\beta$ -glucuronidasa.		
<i>HbsAg</i>	Gen que codifica el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (VHB).		
<i>hpt</i>	Gen de la higromicina fosfotransferasa.		
<i>iaaM</i>	Gen de <i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> que codifica para una triptófano monooxigenasa.		
<i>ICE1</i>	Regulador positivo del gen <i>CBF3</i> e implicado en la respuesta al estrés por frío.		
<i>luc</i>	Gen reportero luciferasa.		
<i>mSOD1</i>	cDNA de un gen de la yuca que codifica una CuZnSOD (gen de la enzima superóxido dismutasa 1).		



## II. Objetivos

---

### **Problemática en torno a la transformación genética en pepino**

La transformación genética se ha convertido en una herramienta esencial para lograr aplicaciones prácticas y avances del conocimiento que, además de su interés intrínseco, abren el camino para abordar nuevos objetivos de mejora. Desde un punto de vista aplicado, la obtención de plantas cisgénicas acorta de manera sustancial el tiempo que requiere la transferencia de un gen de una línea a otra de la misma especie, o entre genotipos de dos especies sexualmente compatibles, mediante un programa de retrocruzamiento. En todo caso, la utilidad esencial de la transformación estriba en la posibilidad de introgresar genes procedentes de especies no relacionadas, superando las barreras de incompatibilidad sexual que normalmente impiden la obtención de híbridos interespecíficos. Se trata de un objetivo clave porque si bien la variación extraespecífica es la más rica sigue siendo la menos explotada.

Para que ello sea factible, se precisan avances sustanciales en el conocimiento de la base genética de los caracteres de interés agronómico. Se trata de un campo en el que la transformación puede aportar tanto o más que en su vertiente aplicada. En efecto, la transformación es, hoy por hoy, un método esencial para el análisis funcional de genes y, al mismo tiempo, es la técnica en la que se fundamenta la mutagénesis insercional, sea con vectores convencionales, vectores de activación transcripcional o con trampas génicas (i.e. de intensificadores, promotores y genes). La mutagénesis insercional es, de hecho, la herramienta genómica que más está aportando en el conocimiento de la base genética de los caracteres de interés agronómico.

A la hora de aplicar la transformación con fines básicos o aplicados hay que obtener un número suficiente de plantas transgénicas independientes (i.e. que deriven de distintos eventos de integración). Normalmente se requiere un mínimo de diez plantas transgénicas independientes, aunque idealmente deberían obtenerse algunas más. Hay que disponer, pues, de un método de transformación eficaz y que además se pueda aplicar a cualquier genotipo relevante. En el caso de la mutagénesis insercional el

requerimiento es aún más estricto, porque no basta con obtener diez o veinte plantas transgénicas, sino que hay que generar miles de líneas T-DNA.

El pepino es una de las especies hortícolas más importantes a nivel económico. Pese a su relevancia agronómica, no puede decirse que a día de hoy se disponga de un método de transformación adecuado. Ciertamente, se han descrito protocolos de transformación que se han utilizado para transferir algunos genes (por desgracia, no muchos) que podían conferir caracteres relevantes. En alguno de estos trabajos, se citan tasas de transformación relativamente altas, pero estos datos se refieren no tanto a la frecuencia de eventos de transformación independientes sino al número o la frecuencia de callos preseleccionados en medio selectivo. Atendiendo a las estimas que aparecen en trabajos de autores más estrictos, la conclusión es que la eficacia real de los protocolos de transformación en el pepino dista mucho de la que sería deseable. Esto supone una grave limitación porque para abordar con garantías ciertos objetivos se precisan métodos más eficaces y para plantear de forma realista un programa de mutagénesis insercional haría falta un enorme salto cualitativo.

Los problemas a la hora de conseguir plantas transgénicas de pepino estriban en la baja respuesta morfogenética en explantes de ciertos genotipos, la escasa adecuación de los métodos de selección, el descenso en la tasa de regeneración debido a los tratamientos habituales en un experimento de transformación y, sobre todo, la alta tasa de escapes. En relación con el primer punto, se precisa el desarrollo de métodos adecuados en un programa de transformación. Por lo que respecta al segundo punto, las alternativas disponibles son por desgracia escasas porque a la hora de la verdad hay pocos marcadores útiles. Para complicar las cosas, los tratamientos de inoculación y co-cultivo con *Agrobacterium* y el empleo de un esquema de selección generan un descenso de la tasa de regeneración. Así, en el laboratorio del Dr. Stefan Malepszy, un investigador de reconocido prestigio en este campo, se estima que, debido a los tratamientos habituales en un experimento de transformación genética, la tasa de regeneración en pepino disminuye por un factor de 20. En nuestro laboratorio el descenso no es tan significativo pero, con independencia del factor de reducción, lo cierto es que la tasa de regeneración disminuye, y mucho. Con todo, el problema más acuciante es el que deriva de la frecuente aparición de escapes o de quimeras tras el proceso de selección.

## Objetivos del presente trabajo

En función de la problemática existente, los objetivos concretos del presente trabajo han sido los siguientes:

- 1) Evaluación de la respuesta cultural y morfogénica en explantes de pepino y desarrollo de métodos de regeneración potencialmente útiles en experimentos de transformación.

Se ha realizado un estudio sobre algunos de los factores que afectan a la tasa de regeneración a partir de explantes de pepino con el fin de encontrar unas condiciones adecuadas para un experimento de transformación. Estos estudios se han llevado a cabo con dos cultivares comerciales de pepino ('Marketer' y 'Negrito'), tres líneas puras (cedidas por 'Semillas Fitó') y una línea que ha servido de base en programas de mejora ('Wisconsin 2843'). Se han empleado distintos tipos de explantes primarios para determinar cuál o cuáles pueden ser los más adecuados en un experimento de transformación. Por lo que respecta al medio de cultivo, además de estudiar el efecto de componentes habituales (e.g. reguladores del crecimiento) se ha evaluado el efecto de otros componentes que no lo son tanto, como el nitrato de planta o el sulfato de cobre. Asimismo, se ha analizado el grado de mixoploidía en algunos explantes y el efecto de ciertos tratamientos sobre el nivel de ploidía de las plantas regeneradas.

- 2) Análisis de las etapas del proceso de transformación en pepino mediante co-cultivo de explantes con *Agrobacterium tumefaciens*.

Se han analizado diversos factores relacionados con el protocolo de transformación, tales como la cepa de *Agrobacterium*, la forma de llevar a cabo las fases de inoculación y co-cultivo, la adecuación de distintos genes marcadores en el proceso de selección y la influencia de distintos componentes del medio de cultivo. Asimismo, se han tratado de inferir las causas que generan la aparición de escapes o de quimeras en experimentos de transformación de pepino. Por último, sobre la base de los resultados obtenidos se plantean algunas soluciones que ayuden a evitar estos problemas en futuros experimentos.





# III. Material y Métodos

---

## 1. Material Vegetal

A lo largo de este proyecto de investigación, se emplearon una serie de cultivares y líneas de mejora de pepino elegidos por su importancia desde un punto de vista comercial o en programas de mejora vegetal. En concreto, se utilizaron los cultivares 'Marketer' y 'Negrito', comercializados por la empresa Semillas Fitó SA, la línea 'Wisconsin 2843' (una línea de mejora de acceso libre en la que, gracias a la labor de diferentes centros públicos de investigación, se han introducido diversos genes de resistencia a enfermedades) y cuatro líneas puras ('Fitó-1', 'Fitó-11', 'Fitó-13' y 'Fitó-17') gentilmente cedidas por Semillas Fitó SA.

## 2. Técnicas básicas de cultivo in vitro

### 2.1. Esterilización de semillas

Las plántulas axénicas se obtienen a partir de semillas que, previamente, han pasado por un proceso de esterilización o desinfección. Las semillas 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 agente desinfectante. A continuación, se elimina la solución desinfectante mediante tres lavados sucesivos (5, 10 y 15 minutos, respectivamente) con agua destilada estéril.

## **2.2. Obtención de plántulas axénicas**

Tras el proceso de esterilización de semillas, se procedió a la siembra de las mismas en tubos de ensayo de vidrio (25 mm de diámetro x 150 mm de altura) que contenían unos 10 ml de medio MG (Tabla 3). Los tubos de ensayo se cubrieron con tapones de plástico traslúcido y se colocaron verticalmente en una gradilla de metal, la cual se envolvió primero con film de plástico transparente y después con papel de aluminio.

La incubación se realizó en dos fases. En la primera, las semillas se incubaron durante 24-36 horas en condiciones de oscuridad continua a  $26 \pm 2$  °C. Tras la emergencia de la radícula, se retiró el papel de aluminio y los tubos de ensayo con las semillas recién germinadas se incubaron en las condiciones estándar descritas en el apartado III.2.10. A los 3 días las plántulas presentaban un grado de desarrollo suficiente para poder proceder al corte de explantes. No obstante, en función del tipo de experimento, se utilizaron explantes de plántulas de 3 a 10 días de edad.

## **2.3. Extracción de explantes de cotiledón a partir de plántulas axénicas**

Los explantes de cotiledón se extrajeron de plántulas de 3, 4, 7 ó 10 días. Se eliminaron los extremos distal y proximal del cotiledón. Tras el proceso de corte, el cotiledón se dividía, o no, por la mitad. De esta forma, se obtenían dos tipos de explantes a los que denominamos como 'medio cotiledón' o 'cotiledón entero'. Este último tipo de explante, se empleó únicamente en los primeros estudios sobre morfogénesis con plántulas de 4 días.

## **2.4. Obtención de plantas axénicas por cultivo de ápices meristemáticos**

Tras la extracción de los cotiledones a partir de las plántulas de 4 días, se procedió al corte del ápice caulinar con una pequeña porción de hipocótilo (1-1,5 cm de longitud). Los ápices se sembraron, manteniendo su polaridad, en medio base MB3 (Tabla 5). El cultivo se realizó en botes de vidrio de 500 ml cubiertos con una tapa de plástico traslúcida y que contenía aproximadamente 55 ml de medio de cultivo. Se sembraron cuatro ápices por bote y el período de cultivo fue de 3-4 semanas. La incubación se llevó a cabo en las condiciones estándar (apartado III.2.10).

## **2.5. Extracción de explantes de hoja a partir de plantas axénicas**

A las 3-4 semanas de cultivo, se obtuvieron plantas bien desarrolladas a partir de los ápices meristemáticos. Se utilizaron las dos o tres primeras hojas desarrolladas más próximas a la zona apical de la planta, excluyendo las que tenían señales de daño o senescencia prematura debido al contacto con la parte interna del recipiente de vidrio. Para la extracción de explantes, se eliminaron los bordes laterales de la hoja y la porción restante se troceó en segmentos de unos 0,7-0,8 cm<sup>2</sup>.

## **2.6. Cultivo de explantes primarios e inducción de organogénesis**

Los explantes de cotiledón o de hoja se cultivaron con el envés en contacto con el medio de inducción de organogénesis (Tabla 6). Se emplearon botes de vidrio de 300 ml cubiertos con una tapa de plástico traslúcida, que contenían unos 42 ml de medio de cultivo, o placas Petri de 90 mm de diámetro x 15 mm de altura, con unos 20 ml de medio de cultivo. Se cultivaron 6 explantes por recipiente y el periodo de incubación fue, normalmente, de 3 semanas. Las placas Petri se sellan con Parafilm para reducir la probabilidad de contaminación externa. La incubación se realizó bajo condiciones estándar (apartado III.2.10), excepto en un experimento en el que se estudió el efecto de diferentes fotoperiodos.

## **2.7. Desarrollo de brotes**

Las estructuras adventicias procedentes del cultivo de explantes primarios se cultivaron en los medios de desarrollo y elongación de brotes K02 o FCu (Tabla 9). En el primer caso, el periodo de cultivo era de dos semanas, mientras que en el segundo el periodo de incubación fue variable. Se emplearon botes de vidrio de 300 ml cubiertos con una tapa de plástico traslúcida, conteniendo unos 42 ml de medio de cultivo. El número de brotes por recipiente fue normalmente de 6. La incubación se realizó bajo condiciones estándar (apartado III.2.10).

## **2.8. Enraizamiento de brotes axénicos**

Los brotes desarrollados se cultivaron en el medio base MB3 (Tabla 5). Se emplearon botes de vidrio de 500 ml cubiertos con una tapa de plástico traslúcido y que contenían unos 55 ml de medio de cultivo. Se sembraron normalmente cuatro ápices meristemáticos por recipiente. La duración fue normalmente de 3-4 semanas. La incubación se llevó a cabo en condiciones estándar (apartado III.2.10).

## **2.9. Propagación clonal**

Para la propagación clonal *in vitro* se aislaron explantes de aproximadamente 1-1,5 cm de longitud que contenían el meristemo caulinar apical o segmentos de tallo con yemas axilares procedentes de plantas de 3-4 semanas crecidas en medio base MB3 (Tabla 5). El subcultivo se realizó en el mismo medio base, manteniendo la polaridad de los explantes.

El cultivo se realizó en botes de vidrio de 500 ml cubiertos con una tapa de plástico traslúcida, y la duración fue, normalmente, de 3-4 semanas. La incubación se realizó bajo condiciones estándar (apartado III.2.10).

## **2.10. Condiciones de incubación**

En la mayor parte de experimentos, la incubación del material vegetal se llevó a cabo en una cámara de cultivo en la que se controlaron las condiciones de luz, temperatura y humedad. El fotoperiodo fue de 16 horas luz/ 8 horas oscuridad, la intensidad luminosa, suministrada por una fuente de luz fría (tubos *Sylvania GroLux*), fue de 2000 luxes (equivalente a 34 E/m<sup>2</sup>/s), la temperatura de 26 ± 2 °C y la humedad relativa osciló entre el 70% durante el periodo oscuro y el 40% durante el periodo luminoso.

### 3. Morfogénesis de explantes primarios vía organogénesis

Los estudios de regeneración de pepino vía organogénesis se llevaron a cabo empleando distintos genotipos, tipos de explante y, por lo que se refiere al medio de cultivo, además de estudiar el efecto de componentes habituales (e.g. reguladores del crecimiento), se evaluó el efecto de otros componentes que no lo son tanto (e.g. nitrato de planta), u otros como el sulfato de cobre a concentraciones muy superiores a las habitualmente empleadas. Se estudiaron además diferentes condiciones de incubación. Lo que pretendíamos era optimizar la respuesta morfogenética y adecuar el proceso de regeneración a las características de un experimento de transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*.

El protocolo de regeneración se realizó en tres pasos: inducción de organogénesis; desarrollo y elongación de brotes; y enraizamiento.

En el primer punto se pretendió inducir la diferenciación de yemas adventicias en explantes de cotiledón o de hoja. Los explantes se cultivaron con el envés en contacto con el medio de inducción sólido. En función de las condiciones experimentales, se observaron los tres tipos de organogénesis: directa (es decir, sin formación de callo aparente), casi directa (con escasa proliferación celular) e indirecta (tras la formación de callo).

En la segunda fase se intentó el desarrollo de los brotes a partir de las yemas adventicias. El cultivo se realizó en el medio de desarrollo y elongación de brotes. Al concluir esta fase, se procedió a una lectura de la frecuencia de explantes con estructuras adventicias y el índice organogénico.

En la tercera fase se procedió al enraizamiento de los brotes para obtener una planta con un estado de desarrollo adecuado. El cultivo se llevó a cabo en medio base (i.e. sin reguladores del crecimiento).

#### **4. Determinación del nivel de ploidía mediante citometría de flujo**

El análisis se realizó mediante la cuantificación del contenido de ADN nuclear de las células de cotiledones y hojas jóvenes procedentes de cultivo axénico, según el método de Smulders et al. (1994).

Un fragmento de tejido vegetal (aprox. 1 cm<sup>2</sup>) se colocó en una placa Petri de 50 mm de diámetro, a la que se añadió 200 µl de tampón de extracción de núcleos (Partec, Münster, Germany), y se troceó finamente con una cuchilla. Tras resuspenderse la mezcla se filtró a través de una malla de nylon de 50 µm (Nyblot) y se le adicionó 800 µl de la solución de tinción de ADN conteniendo 1 mg/l de fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2-phenyl-indole) (DAPI staining solution, Partec). A continuación se acopla la suspensión de núcleos al analizador de ploidía (PA-II Ploidy Analyser, Partec), lo cual está equipado con una lámpara de mercurio que emite luz ultravioleta de 366 nm. El flujo de núcleos en suspensión pasa por una cámara de cuarzo (conducto de 10 µm), la cual no permite el paso simultáneo de dos unidades, siendo iluminado por la fuente de luz ultravioleta. Como resultado, el fluorocromo DAPI fijado al ADN emite una fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN del núcleo, siendo esta reconocida y captada por un fotorreceptor. El sistema informático integrado convierte cada señal fluorescente en un punto sobre la pantalla que se sitúa en distintas posiciones de acuerdo con su intensidad. Los resultados pueden visualizarse en un gráfico, con los datos ordenados según el contenido nuclear de ADN (eje de abscisas), y el número de núcleos de cada tipo (eje de ordenadas). Se realizó una calibración previa, situando el pico correspondiente a un contenido de ADN igual a 2C (diploide) sobre el valor que se desee (50 ò 100) de la escala de abscisas.

## 5. Soluciones minerales, vitaminas y medios de cultivo

Se presenta a continuación la composición de los medios de cultivo empleados en los estudios de morfogénesis de explantes primarios. Algunos de estos medios se han utilizado también en el proceso de transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*.

### 5.1. Solución mineral MS (Murashige y Skoog, 1962)

<b>Tabla 2. Solución mineral MS ( Murashige y Skoog, 1962) <sup>(1)</sup> .</b>	
<b><u>Solución mineral MSI</u></b>	
<b><i>Macronutrientes</i></b>	<b><i>(mg/l)</i></b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b><u>Solución mineral MSII</u></b>	
<b><i>Micronutrientes</i></b>	<b><i>(mg/l)</i></b>
KI	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,30
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,60
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025
<b><u>Solución mineral MSIII</u></b>	
<b><i>FeNa·EDTA</i></b>	<b><i>(mg/l)</i></b>
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> ·EDTA	37,3
<sup>(1)</sup> las soluciones MSI, II y III se preparan por separado; al preparar la solución de sales inorgánicas en agua destilada, sólo se añade un componente cuando el previo esté bien disuelto.	

## 5.2. Medio de germinación MG (Moreno et al., 1984)

**Tabla 3.** Medio de germinación MG (Moreno et al., 1984).

<i>Componentes</i>	<i>(g/l)</i>
Solución mineral	MS <sup>(1)</sup>
Sacarosa	10
Agar <sup>(2)</sup>	8
pH <sup>(3)</sup>	5,7

<sup>(1)</sup> solución mineral de Murashige y Skoog (1962)  
<sup>(2)</sup> agar Industrial (Pronadisa)  
<sup>(3)</sup> ajustado con 0,1/1 N KOH y de HCl antes de añadir el agar y de esterilizar.

## 5.3. Solución de vitaminas RT (Staba, 1969)

**Tabla 4.** Solución de vitaminas RT (Staba, 1969) <sup>(1)</sup>.

<i>Vitaminas</i>	<i>(mg/l)</i>
Nicotinamida	0,2
Piridoxina-HCl	0,2
D-Biotina	0,1
Colina-HCl	0,1
Pantotenato de calcio	0,1
Tiamina-HCl	0,1
Ácido fólico	0,05
Ácido p-aminobenzoico	0,05
Rivoflavina	0,05
Cianocobalamina	0,00015

<sup>(1)</sup> se prepara una solución *stock* 1000X y se almacena a -20°C; se añade al medio antes de su esterilización.



#### 5.4. Medio base MB3 (Moreno et al., 1985)

**Tabla 5.** Medio base MB3 (Moreno et al., 1985).

<i>Componentes</i>	<i>(g/l)</i>
Solución mineral	MS <sup>(1)</sup>
Sacarosa	30
Myo-inositol	0,1
Tiamina-HCl	0,001
Vitaminas	RT <sup>(2)</sup>
Agar <sup>(3)</sup>	8
pH <sup>(4)</sup>	5,7

<sup>(1)</sup> solución mineral de Murashige y Skoog (1962)  
<sup>(2)</sup> solución vitamínica de Staba (1969)  
<sup>(3)</sup> agar Industrial o Agar Bacteriológico Europeo  
<sup>(4)</sup> ajustado con 0,1/1 N KOH y 0,1/1 N HCl antes de añadir el agar y esterilizar.

### 5.5. Medios de inducción de organogénesis

<b>Tabla 6. Medios de inducción de organogénesis B 10, B 25, B 50, IB 05 10, IB 005 25, IB 05 25 y IB 05 50.</b>							
<b>Componentes</b>	<b>B 10</b>	<b>B 25</b>	<b>B 50</b>	<b>IB 05 10</b>	<b>IB 005 25</b>	<b>IB 05 25</b>	<b>IB 05 50</b>
	<b>(g/l)</b>						
Solución mineral	MS <sup>(1)</sup>	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Sacarosa	30	30	30	30	30	30	30
Myo-inositol	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tiamina-HCl	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Vitaminas	RT <sup>(2)</sup>	RT	RT	RT	RT	RT	RT
IAA <sup>(3)</sup>	-	-	-	0,5x10 <sup>-3</sup>	0,05x10 <sup>-3</sup>	0,5x10 <sup>-3</sup>	0,5x10 <sup>-3</sup>
6-BA <sup>(4)</sup>	1x10 <sup>-3</sup>	2,5x10 <sup>-3</sup>	5x10 <sup>-3</sup>	1x10 <sup>-3</sup>	2,5x10 <sup>-3</sup>	2,5x10 <sup>-3</sup>	5x10 <sup>-3</sup>
Agar <sup>(5)</sup>	8	8	8	8	8	8	8
pH <sup>(6)</sup>	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7

<sup>(1)</sup> solución mineral de Murashige y Skoog (1962)  
<sup>(2)</sup> solución vitamínica de Staba (1969)  
<sup>(3)</sup> ácido indol-3-acético  
<sup>(4)</sup> 6-bencilaminopurina  
<sup>(5)</sup> Agar Industrial (Pronadisa)  
<sup>(6)</sup> ajustado con 0,1/1 N KOH y 0,1/1 N HCl antes de añadir el agar y de esterilizar.

**Tabla 7.** Medios de inducción de organogénesis con  $\text{CuSO}_4$  (Cu): B 25 + 1Cu, IB 05 25 + 0Cu, IB 05 25 + 0,2Cu, IB 05 25 + 1Cu, IB 05 25 + 5Cu.

<b>Componentes</b>	<b>B 25 + 1Cu</b>	<b>IB 05 25 + 0Cu</b>	<b>IB 05 25 + 0,2Cu</b>	<b>IB 05 25 + 1Cu</b>	<b>IB 05 25 + 5Cu</b>
	<b>(g/l)</b>				
Solución mineral	MS <sup>(1)</sup>	MS	MS	MS	MS
Sacarosa	30	30	30	30	30
Myo-inositol	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tiamina-HCl	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Vitaminas	RT <sup>(2)</sup>	RT	RT	RT	RT
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$1 \times 10^{-3}$	-	$0,2 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-3}$
IAA <sup>(3)</sup>	-	$0,5 \times 10^{-3}$	$0,5 \times 10^{-3}$	$0,5 \times 10^{-3}$	$0,5 \times 10^{-3}$
BA <sup>(4)</sup>	$2,5 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-3}$
Agar <sup>(5)</sup>	8	8	8	8	8
pH <sup>(6)</sup>	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7

<sup>(1)</sup> solución mineral de Murashige y Skoog (1962)  
<sup>(2)</sup> solución vitamínica de Staba (1969)  
<sup>(3)</sup> ácido indol-3-acético  
<sup>(4)</sup> 6-bencilaminopurina  
<sup>(5)</sup> agar industrial (Pronadisa)  
<sup>(6)</sup> ajustado con 0,1/1 N KOH y 0,1/1 N HCl antes de añadir el agar y de esterilizar.

**Tabla 8.** Medios de inducción de organogénesis con AgNO<sub>3</sub> (Ag): B 25 + 0,8Ag (5 μM), IB 05 25 + 0Ag, IB 05 25 + 0,08Ag (0,5 μM), IB 05 25 + 0,8Ag (5 μM), IB 05 25 + 8Ag (50 μM).

<b>Componentes</b>	<b>B 25 + 0,8Ag (5μM Ag)</b>	<b>IB 05 25 + 0Ag (0μM Ag)</b>	<b>IB 05 25 + 0,08Ag (0,5μM Ag)</b>	<b>IB 05 25 + 0,8Ag (5μM Ag)</b>	<b>IB 05 25 + 8Ag (50μM Ag)</b>
	<b>(g/l)</b>				
Solución mineral	MS <sup>(1)</sup>	MS	MS	MS	MS
Sacarosa	30	30	30	30	30
Myo-inositol	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tiamina-HCl	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Vitaminas	RT <sup>(2)</sup>	RT	RT	RT	RT
AgNO <sub>3</sub>	0,8495x10 <sup>-3</sup>	-	0,08495x10 <sup>-3</sup>	0,8495x10 <sup>-3</sup>	8,495x10 <sup>-3</sup>
IAA <sup>(3)</sup>	-	0,5x10 <sup>-3</sup>	0,5x10 <sup>-3</sup>	0,5x10 <sup>-3</sup>	0,5x10 <sup>-3</sup>
BA <sup>(4)</sup>	2,5x10 <sup>-3</sup>	2,5x10 <sup>-3</sup>	2,5x10 <sup>-3</sup>	2,5x10 <sup>-3</sup>	2,5x10 <sup>-3</sup>
Agar <sup>(5)</sup>	8	8	8	8	8
pH <sup>(6)</sup>	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7

<sup>(1)</sup> solución mineral de Murashige y Skoog (1962)  
<sup>(2)</sup> solución vitamínica de Staba (1969)  
<sup>(3)</sup> ácido indol-3-acético  
<sup>(4)</sup> 6-bencilaminopurina  
<sup>(5)</sup> agar Industrial (Pronadisa)  
<sup>(6)</sup> ajustado con 0,1/1 N KOH y 0,1/1 N HCl antes de añadir el agar y de esterilizar.

## 5.6. Medios de desarrollo y elongación de brotes

**Tabla 9.** Medios de desarrollo y elongación de brotes K02 y FCu.

<b>Componentes</b>	<b>K02</b>	<b>FCu</b>
	<b>(g/l)</b>	
Solución mineral	MS <sup>(1)</sup>	MS
Sacarosa	30	30
Myo-inositol	0,1	0,1
Tiamina-HCl	0,001	0,001
Vitaminas	RT <sup>(2)</sup>	RT
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	-	1x10 <sup>-3</sup>
NAA <sup>(3)</sup>	-	0,01x10 <sup>-3</sup>
6-BA <sup>(4)</sup>	-	0,1x10 <sup>-3</sup>
Kin <sup>(5)</sup>	0,2x10 <sup>-3</sup>	-
Agar <sup>(6)</sup>	8	8
pH <sup>(7)</sup>	5,7	5,7

<sup>(1)</sup> solución mineral de Murashige y Skoog (1962)  
<sup>(2)</sup> solución vitamínica de Staba (1969)  
<sup>(3)</sup> ácido α-naftalenacético  
<sup>(4)</sup> 6-bencilaminopurina  
<sup>(5)</sup> quinetina (6-furfurilaminopurina)  
<sup>(6)</sup> agar Industrial en K02 y Agar Bacteriológico Europeo en Fcu  
<sup>(7)</sup> ajustado con 0,1/1 N KOH y 0,1/1 N HCl antes de añadir el agar y de esterilizar.

## 6. Transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*

El método de transformación genética se basó en el co-cultivo de explantes con *Agrobacterium tumefaciens* y la regeneración *in vitro* de plantas, teniendo como punto de partida el protocolo de Ellul et al. (1995) para sandía (*Citrullus lanatus* L.). En la transformación genética se emplea un sistema de vector binario constituido por dos plásmidos, es decir, uno con la región *vir* y otro desarmado, de inferior tamaño, y que contiene el gen marcador y el gen delator.

### 6.1. Material vegetal

Los procedimientos para la obtención del material vegetal estéril son iguales a los mencionados en el apartado III.2 (Técnicas básicas de cultivo *in vitro*). Se utilizaron explantes de cotiledón entero procedentes de plántulas de 3-7 días de los genotipos 'Wisconsin 2843', 'Marketer' o 'Negrito'.

### 6.2. Cepas bacterianas, vectores y genes incluidos en el T-DNA

Se utilizaron 2 cepas desarmadas de *A. tumefaciens* conteniendo diferentes plásmidos de ayuda Ti. La cepa LBA4404 contiene el vector binario pBin19 o pBIG121-Hm, y la cepa C58 el vector binario pBIG121-Hm. El pBin19 porta el gen marcador *nptII* bajo el control del promotor de la nopalina sintasa (NOS) y con el terminador NOS. El pBIG121-Hm contiene el gen marcador *nptII* bajo el control del promotor NOS y con el terminador NOS; el gen *hpt* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador NOS; y el delator *uidA-int* que contiene las mismas señales de regulación que el anterior.

Las características de los genes marcadores (*nptII* y *hpt*) y del gen delator (*uidA-int*) incluidos en los vectores mencionados son las siguientes:

El gen de la *aminoglucósido-3'-fosfotransferasa II (APH (3')-II)* o *nptII* deriva del transposón Tn5 de *Escherichia coli*, y codifica el enzima neomicina-fosfotransferasa II que inactiva por fosforilación antibióticos aminoglicósidos, como la kanamicina, neomicina o geneticina (G418). Su expresión permite detoxificar estos antibióticos en las células de las

plantas transformadas con éxito, constituyendo un importante método de selección en la transformación de plantas.

El gen de la *higromicina fosfotransferasa* (*hpt*, *hph* o *aphIV*) ha sido aislado de *E. coli* y codifica la enzima higromicina fosfotransferasa (HPT) que detoxifica el antibiótico higromicina B (Hm). Un elevado número de plantas han sido transformadas con este gen, y la higromicina B se ha mostrado eficaz en la selección de una amplia gama de plantas, incluyendo las monocotiledóneas, siendo el segundo antibiótico más frecuentemente usado para la selección después de la kanamicina (Miki y McHugh, 2004). La mayoría de plantas presenta más sensibilidad a la higromicina B que a la kanamicina o geneticina (Hauptmann et al., 1988; Meijer et al., 1991; Schrott, 1995).

El gen *uidA* (*gusA*) procedente de *E. coli* codifica la enzima  $\beta$ -glucuronidasa que cataliza la reacción de hidrólisis de los  $\beta$ -D-glucurónidos en presencia del sustrato apropiado, siendo el gen delator más ampliamente utilizado en plantas (Miki y McHugh, 2004). Su actividad puede ser monitoreada en las células transformadas a través de métodos fluorimétricos e histoquímicos al formarse un producto azulado. En el primer caso, cuando el sustrato es el 4-metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glucurónido (MUG), se forma un producto fluorescente, la 4-metil umbeliferona (MU), cuantificable por fluorimetría. En el segundo, cuando el sustrato es el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido (X-Gluc), se produce un precipitado detectable visualmente (Jefferson et al., 1987). El gen quimérico, al incluir un intrón, sólo puede producir proteína activa en las células de las plantas, resultando en un delator optimizado en experimentos de transformación transitoria o estable (Vancanneyt et al., 1990; Ohta et al., 1990).

### **6.3. Preparación de la suspensión bacteriana**

#### **6.3.1. Crecimiento bacteriano**

El cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* se prepara a partir de un inóculo glicerinado (mantenido a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) en un medio sólido selectivo LB (Tabla 12) (Maniatis et al., 1982), suplementado con 100 mg/l de kanamicina para evitar el crecimiento de bacterias que no contengan el plásmido binario. Se retira una muestra de las colonias que crecen en este medio y se utiliza de inóculo para cultivo en medio LB líquido (Tabla 11,) suplementado

igualmente con 100 mg/l de kanamicina y a pH 7. El primer cultivo se efectúa en matraces de 100 ml de capacidad conteniendo 10 ml de medio nutritivo, tapados con algodón graso (o hidrófobo) para favorecer la aireación y se incuban en oscuridad a 28 °C y en agitador orbital a 230 r.p.m. Transcurridas 24h en este cultivo y 12h en los posteriores, se toma una alícuota de 2,5 ml de cultivo bacteriano y se subcultiva en matraces de 250 ml de capacidad con 25 ml de medio LB líquido fresco de la misma composición y bajo las mismas condiciones de incubación.

### **6.3.2. Preparación del cultivo bacteriano para la transformación**

Las bacterias se cultivan en medio líquido LB suplementado con 100 mg/l de kanamicina, ajustando el pH a 5,7 o 7 dependiendo del experimento. La incubación se realiza en oscuridad a 28 °C, y en agitador orbital a 230 r.p.m., hasta alcanzar la densidad óptica pretendida. Antes de la inoculación de los explantes se ajusta la densidad óptica, es decir, un valor de DO a 600 nm de 0,2-0,3 ó 0,7-0,8 (dependiendo del experimento). Por último, se añade acetosiringona (3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenona) esterilizada por filtración a una concentración final de 200 µM. La acetosiringona es un compuesto fenólico inductor de los genes de virulencia (*vir*) en cepas de *Agrobacterium tumefaciens* productoras de octopina (Stachel et al., 1985).



#### 6.4. Método de transformación, selección y regeneración de plantas transgénicas

Los diferentes tipos de explante (cotiledón) procedentes de plántulas de distintas edades y genotipos se siembran en placas Petri que contienen medio de inducción de organogénesis (**fase de precultivo**), para promover el inicio de divisiones celulares. El precultivo se realizó en los medios IB 05 25, IB 005 25 y B 25 (Tabla 6). La duración de esta fase de precultivo fue variable dependiendo del experimento en cuestión (desde 6-8 horas hasta 2 días). La incubación se realizó bajo condiciones estándar (apartado III.2.10).

A continuación se introducen los explantes en botes de vidrio conteniendo la suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* con una  $DO_{600}$  de 0,2-0,3 ó 0,7-0,8 (**fase de infección**) durante 7-10 minutos y se agitan frecuentemente. Tras esta fase de infección, los explantes se colocan sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de bacterias.

Los explantes se colocan después en placas Petri conteniendo medio de inducción de organogénesis (**fase de co-cultivo**), al que se le añade acetosiringona (3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenona) esterilizada por filtración a una concentración final de 200  $\mu$ M. La acetosiringona es un compuesto fenólico inductor de los genes de virulencia (*vir*) en cepas de *Agrobacterium tumefaciens* productoras de octopina (Stachel et al., 1985). El co-cultivo tuvo una duración variable (1, 2, 2-3, 3 o 5 días), realizándose normalmente en estufa de oscuridad a 28 °C, aunque también se efectuó bajo condiciones estándar de incubación. En dos experimentos concretos, el co-cultivo incluyó una primera fase sin presión de selección (1 día) y una segunda en la que se añadió kanamicina al medio (1, 2, 4 o 5 días).

Para la erradicación de *A. tumefaciens* los explantes se colocan en botes de vidrio conteniendo una solución con un antibiótico antibacteriano (cefotaxima) durante 7 ó 10 minutos y se agitan frecuentemente (**fase de lavado**). Se han empleado distintas concentraciones de cefotaxima (300-600 mg/l) y el pH de la solución de lavado (Tabla 10) se ajustó a 4,4 o 5,7. Tras la fase de lavado los explantes se secan sobre papel de filtro estéril.

A continuación, los explantes se someten a los pasos del proceso morfogénico (organogénesis) descritos en el apartado III.3, con las adaptaciones al proceso de

transformación (**fase de regeneración**). El medio de regeneración selectivo contiene kanamicina (25-100 mg/l) o higromicina B (10 mg/l), además de la cefotaxima (300-600 mg/l) para evitar el crecimiento de *Agrobacterium*. Pese a lo indicado, en algunos experimentos se retrasó el inicio de la presión de selección (1-5 días).

En lo que se refiere a la **inducción de organogénesis**, además de las diversas combinaciones de reguladores de crecimiento, se añadieron otros componentes el medio de cultivo, tales como el nitrato de planta (0,8 mg/l) o el sulfato de cobre (1 mg/l) (Tabla 6-8). El cultivo, durante un periodo de 3 o 4 semanas, se realizó en botes de vidrio y bajo condiciones estándar de incubación. En la etapa de **desarrollo y elongación de brotes** (3 semanas) se utilizaron los medios K02 o FCu (Tabla 9). A menudo, hicieron falta varios subcultivos en alguna de las primeras fases del proceso de morfogénesis para lograr el desarrollo de las estructuras organogénicas. Por último, la etapa de **enraizamiento** (3-4 semanas) se llevó a cabo en el medio MB3 (Tabla 5).

En determinados experimentos, al finalizar el cultivo en el medio de inducción de organogénesis se realizó el análisis de la expresión del gen delator *uidA-int* (ensayo histoquímico con X-Gluc) a partir de callos nodulosos cortados transversalmente. De la misma forma, a partir de las plantas regeneradas en los experimentos de transformación, se retiraron igualmente muestras para el ensayo con X-Gluc a partir de hojas, se llevó a cabo el análisis molecular (mediante PCR) y se realizó el cultivo de explantes y de ápices caulinares en medio selectivo para corroborar la expresión del gen marcador. Estas evaluaciones están descritas en los apartados III.6.6-6.8.

## 6.5. Medios de cultivo específicos para la transformación

### 6.5.1. Medios de lavado

<b>Tabla 10.</b> Medio de lavado MB + 0cf, MB + 100cf, MB + 200cf, MB + 300cf, MB + 400cf, MB + 500cf, MB + 600cf.							
<b>Componentes</b>	<b>MB + 0cf</b>	<b>MB + 100cf</b>	<b>MB + 200cf</b>	<b>MB + 300cf</b>	<b>MB + 400cf</b>	<b>MB + 500cf</b>	<b>MB + 600cf</b>
	<b>(g/l)</b>						
Solución mineral	MS <sup>(1)</sup>	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Sacarosa	30	30	30	30	30	30	30
Cefotaxima <sup>(2)</sup>	-	100x10 <sup>-3</sup>	200x10 <sup>-3</sup>	300x10 <sup>-3</sup>	400x10 <sup>-3</sup>	500x10 <sup>-3</sup>	600x10 <sup>-3</sup>
pH <sup>(3)</sup>	5,70 o 4,40 (cuando no se indica lo contrario es 5,70)						

<sup>(1)</sup> solución mineral de Murashige y Skoog (1962)  
<sup>(2)</sup> antibiótico; añadido después de esterilizar y de enfriar el medio.  
<sup>(3)</sup> ajustado con 0,1/1 N KOH y 0,1/1 N HCl antes de añadir el agar y de esterilizar.

**6.5.2. Medios de crecimiento de bacteria LB líquido y sólido (Luria-Bertani) y YEP líquido**

<b>Tabla 11.</b> Medio de crecimiento de bacteria LB líquido (Luria-Bertani).		<b>Tabla 12.</b> Medio de crecimiento de bacteria LB sólido (Luria-Bertani).		<b>Tabla 13.</b> Medio de crecimiento de levadura/ bacteria YEP líquido.	
<i>Componentes</i>	<i>(g/l)</i>	<i>Componentes</i>	<i>(g/l)</i>	<i>Componentes</i>	<i>(g/l)</i>
Bacto-triptona	10	Bacto-triptona	10	Extracto de levadura	10
Bactoyeast extract	5	Bactoyeast extract	5	Peptona	10
NaCl	10	NaCl	10	NaCl	5
pH <sup>(1)</sup>	7; 5,7	Agar	20	pH <sup>(1)</sup>	5,7
<sup>(1)</sup> ajustado con 0,1/1 N KOH y 0,1/1 N HCl antes de esterilizar.		<sup>(1)</sup> ajustado con 0,1/1 N KOH y 0,1/1 N HCl antes de añadir el agar y esterilizar.		<sup>(1)</sup> ajustado con 0,1/1 N KOH y 0,1/1 N HCl antes de esterilizar.	

### 6.6. Evaluación de la resistencia a la kanamicina en transformantes primarios

Tal y como se ha indicado anteriormente, el gen *nptII* de *Escherichia coli* codifica el enzima neomicina-fosfotransferasa II que inactiva por fosforilación antibióticos aminoglicósidos, como la kanamicina, neomicina o geneticina. La expresión de este gen confiere resistencia a estos antibióticos que son tóxicos para las células de las plantas y, por lo tanto, ofrece un método de selección del material vegetal sometido al proceso de transformación.

En el **test de ápice** se evaluó el desarrollo de la parte aérea y la formación de raíces a partir del ápice terminal o de yemas axilares de las plantas inicialmente seleccionadas como presuntas transgénicas (subcultivadas varias veces) en medio base MB3 (Tabla 5) selectivo (25mg/l de kanamicina).

En el **test de explante** se determinó la formación de estructuras morfogénicas a partir de segmentos de hoja de las plantas inicialmente seleccionadas como presuntas transgénicas (subcultivadas varias veces) en medio B 10 (Marketer) o IB 05 25 (Negrito (Tabla 6) selectivo (25 mg/l de kanamicina).

### 6.7. Análisis de la expresión del gen delator *uidA-int* (*Gus-int*)

El ensayo histoquímico con X-Gluc (Jefferson et al., 1987) se realizó a partir de material vegetal sometido a un medio de cultivo selectivo, conteniendo kanamicina o higromicina B. Se utilizaron explantes de callos nodulosos y de hojas. Para ello, la sección de cada explante se incubó durante 24 horas a 37 °C en solución tamponada con X-Gluc. Las secciones fueron posteriormente aclaradas con etanol (70%), para eliminar las clorofilas.

## 6.8. Extracción de ADN y análisis PCR

Las extracciones de ADN genómico se realizaron a partir de hojas jóvenes de acuerdo con adaptaciones del protocolo descrito por Rogers y Bendich (1994). Así pues, se trituraron muestras de tejidos de aprox. 1g de peso fresco en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. A continuación se transfirió 0,25 g del tejido molido por descongelar a un *ependorf*, se añadieron 300  $\mu$ l del tampón 2xCTAB (precalentado a 65 °C), al que previamente se había añadido 0,2% de  $\beta$ -mercaptoetanol, y se incubó durante 5 minutos a 65 °C. Posteriormente se adicionaron 200  $\mu$ l de cloroformo:isoamílico (24:1). Tras centrifugar durante 10 minutos se recuperó el sobrenadante, se añadieron 1/10 (volumen) del tampón CTAB 10x (precalentado a 65 °C), se mezcló y se adicionó un volumen de cloroformo: isoamílico (24:1). Se centrifugó durante 5 minutos y al sobrenadante resultante se añadió el mismo volumen del tampón CTAB *precipitation Buffer*. A continuación se centrifugó durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 0,5 ml del tampón TE altamente salino, y se precipitó de nuevo con 1 ml de etanol absoluto. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos, se recogió el precipitado que se lavó con 500  $\mu$ l de etanol al 70%, se dejó secar al aire durante 10 minutos y se disolvió en 30  $\mu$ l de TE 0,1X. La concentración de ADN se estimó comparando la intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio intercalada en el ADN, tras realizarse una electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X, con la fluorescencia emitida por un patrón de concentración conocida ( $\lambda$ /HindIII). Las reacciones de amplificación se efectuaron en un volumen total de 20  $\mu$ l, conteniendo 0,2  $\mu$ g de ADN genómico, 0,6  $\mu$ M de cada cebador, 0,4 mM de dNTPs, Tampón 10x + MgCl<sub>2</sub> 1X, y 0,5 unidades de Taq ADN polimerasa. Se utilizaron los siguientes cebadores: 5'-AAG ATG GAT TGC ACG CAG GTT C-3' (directo) y el 5'-GAA GAA CTC GTC AAG AAG GCG A-3'(inverso). Las reacciones se desarrollaron en un termociclador "Minicycler™" (MJ Research Inc.) en las siguientes condiciones: incubación inicial a 94 °C (2 min); 30 ciclos a 94 °C (30s), 55 °C (30s) y 72°C (1 min); y una incubación final a 72°C durante 10 min. Los productos de la PCR fueron posteriormente detectados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,4% y tinción con bromuro de etidio. El tamaño de las bandas se estima por

comparación con el marcador de peso molecular conocido: Generuler 100 bp DNA (Fermentas). El producto de la ampliación esperado para el gen *nptII* es de 781 pb.

## **7. Tratamiento estadístico**

Para el tratamiento de los datos experimentales se utilizó el programa informático Statgraphic Centurion XVI, versión 16.1.18. (StatPoint Technologies, Inc.).

Se realizó un tratamiento descriptivo de los datos, poniéndose de manifiesto las características más relevantes y su síntesis, con representaciones en gráficas o tablas que incluyeron el error estándar (SE).

## 8. RESPUESTA MORFOGENÉTICA EN EXPLANTES DE PEPINO

### 8.1. Efecto del genotipo, explante y medio de cultivo sobre la respuesta organogénica

Se evaluó la respuesta cultural y morfofenética de explantes de cultivares de pepino en diversos medios de cultivo mediante un diseño de tipo factorial (3 cultivares x 3 tipos de explantes x 6 medios de cultivo).

Genotipos. Empleamos dos cultivares comerciales o variedades de polinización abierta ('Marketer' y 'Negrito') y una línea de mejora ('Wisconsin 2843'). Sus características son las siguientes:

Características del cultivar 'Marketer'. Las plantas tienen un crecimiento vigoroso y son de tipo monoico (i.e. presentan flores masculinas y femeninas). Es una variedad de ciclo medio cuyos frutos, de color verde oscuro, presentan espinas de color blanco de escasa longitud y no muy abundantes. Las empresas que comercializan este tipo de pepino recomiendan recolectar los frutos antes de la madurez completa, cuando alcanzan una longitud de unos 20-22 cm, con el fin de que las semillas no hayan culminado su desarrollo, de manera que no resulten molestas para el consumidor.

Características del cultivar 'Negrito'. Es una variedad muy productiva, con frutos cilíndricos de unos 20 cm de longitud y unos 5 cm de diámetro. El fruto tiene un color verde oscuro, un sabor agradable y desarrolla un escaso número de semillas, lo que es ventajoso desde el punto de vista del consumidor. La planta, típicamente trepadora, desarrolla múltiples zarcillos y tiene un aspecto áspero debido a la presencia de numerosos pelos. Pese al gran número de tricomas, las plantas son sensibles a diversas plagas y enfermedades, como la mosca blanca, los pulgones, el oídio y el mildiu, lo que supone un serio problema cuando se cultiva en invernadero al final de la primavera o durante el verano.

Características de la línea 'Wisconsin 2843'. Es una línea de mejora en la que se fueron introduciendo, paso a paso, múltiples genes de resistencia a enfermedades (Peterson et al., 1985). Las plantas de 'Wisconsin 2843' son homocigóticas para genes de resistencia al virus del mosaico del pepino (CMV), *Cladosporium cucumerinum* (pudrición o costra de la raíz; *scab spot rot*), *Pseudomonas lacrymans* (mancha angular de la hoja), *Colletorichum*



*lagenarium* (antracnosis) y *Pseudoperonospora cubensis* (mildiu vellosa; *downy mildew*). Sobre las fuentes de resistencia al mildiu vellosa hay una cierta controversia porque, sea por un manejo inadecuado o por cualquier otra razón, una de las principales fuentes de variación (PI 197087) parece haber perdido la resistencia al patógeno o, al menos, ciertos genes de resistencia (revisado en un artículo de *Cucurbit Genetics Cooperative Report* por Criswell et al., 2010-2011). A pesar de lo indicado, en nuestras condiciones de invernadero las plantas de 'Wisconsin 2843' se mostraron como resistentes o altamente tolerantes a este tipo de mildiu incluso en épocas del año en las que no tenía sentido cultivar otras líneas de pepino sensibles al patógeno. Además, 'Wisconsin 2843' segrega para dos niveles de resistencia a *Sphaerotheca fuliginea* (mildiu pulverulento; *powdery mildew*, PM). Uno de ellos es el tipo intermedio que muestra la accesión 'Cy-14', mientras que el otro es el que exhibe 'WI 1983', una accesión notablemente resistente a este mildiu. Las plantas de 'Wisconsin 2843' son también heterocigóticas para resistencia a *Erwinia tracheiphila* (fuego bacteriano) y *Corynespora cassicola* (mancha de la hoja; *target leaf spot*). Aparte de genes de resistencia, 'Wisconsin 2843' tiene otras características que aumentan su interés en programas de mejora. En efecto, se han incorporado genes que permiten un desarrollo partenocárpico del fruto, lo que se complementa con el hecho de que las plantas son ginoicas (i.e. solo desarrollan flores femeninas). Por si fuera poco, los frutos de 'Wisconsin 2843' carecen de cucurbitacinas por lo que no tienen un sabor amargo.

Explantos. Utilizamos dos tipos de explantos procedentes de cotiledones de plántulas de 4 días y otro de hojas de plantas axénicas que se habían obtenido mediante cultivo de ápices en medio base MB3 (Moreno et al., 1985) (Tabla 5).

Explantos de cotiledón enteros ('cot. entero' en las figuras). Se obtuvieron eliminando la parte proximal (i.e. la más cercana al ápice) y la parte distal de los cotiledones de plántulas de 4 días que habían crecido en medio MG (Moreno et al., 1984) en una cámara de incubación con fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad. Los explantos se cultivaron con el envés en contacto con el medio.

Explantes de cotiledón cortados transversalmente ('cot. mitad' en las figuras). En primer lugar, se eliminaron las partes proximal y distal de los cotiledones de plántulas de 4 días y, a continuación, cada cotiledón se cortó transversalmente para obtener dos explantes, es decir, cuatro por cada plántula. Los explantes se cultivaron con el envés en contacto con el medio.

Explantes de hoja. Procedían de plantas axénicas cultivadas en medio MB3 (Moreno et al., 1985) durante 3-4 semanas en una cámara de incubación con fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. Para la obtención de los explantes se utilizaron las dos o tres primeras hojas desarrolladas más próximas a la zona apical de la planta, sin señales de daño o senescencia prematura, eliminándose sus bordes laterales y troceándose en segmentos de unos 0,7-0,8 cm<sup>2</sup>. Los explantes se cultivaron con el envés en contacto con el medio.

Medios de cultivo. Para la inducción de organogénesis, se suplementó el medio MB3 (Moreno et al., 1985) (Tabla 5), con diversas combinaciones de ácido-indol-acético (IAA) y 6-benciladenina (6-BA), resultando en los seis los medios (Tabla 6) que se describen a continuación:

B.10: MB3 + 1 mg/l de 6-BA.

B.25: MB3 + 2,5 mg/l de 6-BA.

B.50: MB3 + 5 mg/l de 6-BA.

IB.05.10: MB3 + 0,5 mg/l de IAA + 1 mg/l de 6-BA.

IB.05.25: MB3 + 0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA.

IB.05.50: MB3 + 0,5 mg/l de IAA + 5 mg/l de 6-BA.

Tras la fase de inducción de organogénesis (3 semanas), se procedió al subcultivo de los callos organogénicos a medio de desarrollo y elongación de brotes K02 (MB3 + 0,2 mg/l de quinetina; Tabla 9) durante otras 2 semanas. Por último, se procedió al enraizamiento de los brotes adventicios en medio MB3 (Tabla 5) durante 3-4 semanas.

Los medios de cultivo se esterilizaron en el autoclave a 115°C durante 30 minutos.

Condiciones de incubación. El cultivo se realizó en una cámara de cultivo *in vitro* con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad (apartado III.2.10).

Estimación de la respuesta. Tras el cultivo de los explantes en cada medio de inducción (Tabla 6) y el subcultivo a medio K02 (Tabla 9), estimamos la respuesta organogénica anotando dos variables:

Frecuencia de explantes con brotes. En las figuras se expresa en forma de porcentaje  $\pm$  el error asociado a la frecuencia. El error se calculó con la fórmula  $\sqrt{([p \times (1-p)]/n)}$ , donde p es la frecuencia en tanto por uno y n el número de explantes incubados.

Índice organogénico. Esta segunda variable trata de estimar la magnitud de la respuesta organogénica asignando a cada callo un valor de 0 a 3 en función de la extensión o número de estructuras organizadas, es decir, yemas adventicias o brotes. En las figuras se expresa el valor del índice  $\pm$  el error estándar. A la hora de cuantificar la respuesta organogénica, en lugar del número de brotes por callo, elegimos este índice, porque en pepino no suele ser habitual que se desarrollen brotes individualizables en los callos primarios (i.e. los que derivan del explante), lo que dificulta cuantificar la respuesta sobre la base de una variable basada en el número de brotes por callo.

## **8.2. Efecto del medio de cultivo sobre la respuesta morfogénica de cuatro líneas puras**

Tal y como se comentará en el apartado de 'Resultados y Discusión', antes de iniciar este proyecto de investigación, uno de los objetivos era estimar la heredabilidad en sentido amplio de la respuesta organogénica en pepino. Para ello solicitamos algunas líneas puras a la empresa 'Semillas Fitó', quien nos cedió amablemente cuatro de sus líneas puras. Se evaluó la respuesta de estas líneas en diversos medios de cultivo, según un diseño factorial (4 líneas puras x 6 medios de cultivo).

Genotipos. Se evaluaron cuatro líneas puras suministradas por la empresa 'Semillas Fitó', cuyos códigos eran: SF-1, SF-11, SF-13 y SF17. Como es lógico, la empresa no nos dio ninguna información sobre el origen o las características de sus líneas puras, lo que resulta perfectamente comprensible. No obstante, lo que sí nos indicó es que, en función de su procedencia, cabía esperar importantes diferencias entre ellas.

Explantes. Se utilizaron segmentos de cotiledón enteros de plántulas de 4 días. El procedimiento de obtención se describe en el apartado III.8.1.

Medios de cultivo. Se utilizaron los mismos medios que en el experimento anterior (apartado III.8.1 y Tabla 6). El medio base fue el MB3 (Tabla 5) y los seis medios tenían las siguientes combinaciones de reguladores del crecimiento: B 10 (1 mg/l de 6-BA), B 25 (2,5 mg/l de 6-BA), B 50 (5 mg/l de 6-BA), IB 05 10 (0,5 mg/l de IAA + 1 mg/l de 6-BA), IB 05 25 (0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA), y IB 05 50 (0,5 mg/l de IAA + 5 mg/l de 6-BA).

Condiciones de incubación. El cultivo se realizó en una cámara de cultivo *in vitro* con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad (apartado III.2.10).

Estimación de la respuesta. Tras el cultivo de los explantes en cada medio de inducción (Tabla 6) y el subcultivo a medio K02 (Tabla 9), estimamos la respuesta organogénica sobre la base de las siguientes variables:

Frecuencia de explantes con brotes. En las figuras se expresa en forma de porcentaje  $\pm$  el error asociado a la frecuencia. El error se calculó con la fórmula  $\sqrt{([p \times (1-p)]/n)}$ , donde p es la frecuencia en tanto por uno y n el número de explantes incubados.

Índice organogénico. Esta segunda variable trata de estimar la magnitud de la respuesta organogénica asignando a cada callo un valor de 0 a 3 en función de la extensión o número de estructuras organizadas, es decir, yemas adventicias o brotes. En las figuras se expresa el valor del índice  $\pm$  el error estándar.

### **8.3. Efecto del sulfato de cobre en la respuesta organogénica de explantes de tres cultivares de pepino**

El cobre es un micronutriente y por tanto se suministra en los medios de cultivo de las células vegetales a concentraciones muy bajas. Por ejemplo, en la solución mineral de Murashige y Skoog (1962) este ion metálico se añade en forma de sulfato de cobre a una concentración de 0,025 mg/l. Con todo, los resultados previos del grupo (García-Sogo, 1990) indicaron que la adición al medio de cultivo de concentraciones inusualmente elevadas de sulfato de cobre (desde 0,1 hasta 10 mg/l) producía un notable incremento de la respuesta organogénica en callos de melón procedentes tanto de explantes como de protoplastos. Decidimos por tanto evaluar el efecto del cobre en la respuesta organogénica de explantes de distintos cultivares de pepino mediante un diseño de tipo factorial (3 cultivares x 4 concentraciones de sulfato de cobre).

Genotipos. 'Wisconsin 2843', 'Marketer' y 'Negrito'. Sus características se describen en el apartado III.8.1.

Explantos. Se utilizaron segmentos de cotiledón enteros de plántulas de 4 días. El procedimiento de obtención se describe en el apartado III.8.1.

Medios de cultivo. Se utilizó el medio MB3 (Moreno et al., 1985) con 0,5 mg/l de ácido indolacético y 2,5 mg/l de 6-benciladenina (IB 05 25). Este medio se suplementó con las siguientes concentraciones de sulfato de cobre (Tabla 7):

- 0,025 mg/l. Es la concentración recomendada en la solución de Murashige y Skoog (1962). Conviene señalar que en las figuras este medio aparece como Cu (0) porque se trata del medio de referencia o control, aunque realmente tiene la cantidad de sulfato de cobre antes indicada.
- 0,2 mg/l. Aparece como Cu (0,2) en las figuras.
- 1 mg/l. Aparece como Cu (1,0) en las figuras.
- 5 mg/l. Aparece como Cu (5,0) en las figuras.

Condiciones de incubación. El cultivo se realizó en una cámara de cultivo *in vitro* con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad (apartado III.2.10).

Estimación de la respuesta. Al igual que en los experimentos anteriores, estimamos la respuesta organogénica sobre la base de las siguientes variables:

Frecuencia de explantes con brotes. En las figuras se expresa en forma de porcentaje  $\pm$  el error asociado a la frecuencia. El error se calculó con la fórmula  $\sqrt{([p \times (1-p)]/n)}$ , donde p es la frecuencia en tanto por uno y n el número de explantes incubados.

Índice organogénico. Esta segunda variable trata de estimar la magnitud de la respuesta organogénica asignando a cada callo un valor de 0 a 3 en función de la extensión o número de estructuras organizadas, es decir, yemas adventicias o brotes. En las figuras se expresa el valor del índice  $\pm$  el error estándar.

#### **8.4. Efecto de las condiciones de incubación sobre la respuesta organogénica en explantes de pepino**

En los anteriores experimentos los explantes de pepino se incubaron, como es habitual, en una cámara con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad. Algunos investigadores (Chee, 1990a; Punja et al., 1990; Raharjo y Punja, 1992) han defendido el uso de una incubación previa en condiciones de oscuridad. Para comprobar el posible efecto beneficioso del cultivo previo en oscuridad, realizamos un ensayo en el que empleamos distintas condiciones de incubación para el cultivo de explantes de cotiledón de pepino. El ensayo se llevó a cabo con un diseño de tipo factorial (3 cultivares x 3 condiciones de incubación).

Genotipos. 'Wisconsin 2843', 'Marketer' y 'Negrito'. Sus características se describen en el apartado III.8.1.

Explantes. Se utilizaron segmentos de cotiledón enteros de plántulas de 4 días. El procedimiento de obtención se describe en el apartado III.8.1.

Medio de cultivo. Se utilizó el medio MB3 (Moreno et al., 1985) con 0,5 mg/l de ácido indolacético y 2,5 mg/l de 6-benciladenina (IB 05 25 (Tabla 6).

Condiciones de incubación. Se utilizaron las siguientes condiciones de incubación:

- 4 semanas en condiciones de fotoperiodo, es decir, 16 horas luz / 8 horas oscuridad. En la figuras se denomina como '4 fotoperiodo'.
- 1 semana en oscuridad y tres con el mismo fotoperiodo. En las figuras se denomina como '1 oscuridad + 3 fotoperiodo'.
- 2 semanas en oscuridad y 2 con fotoperiodo. En las figuras se denomina como '2 oscuridad + 2 fotoperiodo'.

Estimación de la respuesta. Al igual que en los experimentos anteriores, estimamos la respuesta organogénica sobre la base de las siguientes variables:

Frecuencia de explantes con brotes. En las figuras se expresa en forma de porcentaje  $\pm$  el error asociado a la frecuencia. El error se calculó con la fórmula  $\sqrt{([p \times (1-p)]/n)}$ , donde p es la frecuencia en tanto por uno y n el número de explantes incubados.

Índice organogénico. Esta segunda variable trata de estimar la magnitud de la respuesta organogénica asignando a cada callo un valor de 0 a 3 en función de la extensión o número de estructuras organizadas, es decir, yemas adventicias o brotes. En las figuras se expresa el valor del índice  $\pm$  el error estándar.

### **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**

#### **Efecto de la edad de la plántula sobre la respuesta organogénica**

Se evaluó la influencia del estado ontogénico del material de partida sobre la respuesta morfogenética. Para ello, se utilizó un diseño factorial (3 x 3) en el que se cultivaron explantes de cotiledón de plántulas de 4, 7 y 10 días de los tres cultivares que habíamos venido utilizando en los experimentos previos.

Genotipos. 'Wisconsin 2843', 'Marketer' y 'Negrito'. Sus características se describen en el apartado III.8.1.

Explantes. Se utilizaron segmentos de cotiledón enteros. El procedimiento de obtención se describe en el apartado III.8.1.

Estado ontogénico de las plántulas. Se utilizaron plántulas de 4, 7 y 10 días que habían crecido en medio MG (Moreno et al., 1984 (Tabla 3)).

Medio de cultivo. Se utilizó el medio MB3 (Moreno et al., 1985) con 0,5 mg/l de ácido indolacético y 2,5 mg/l de 6-benciladenina (IB 05 25 (Tabla 6)).

Condiciones de incubación. El cultivo se realizó en una cámara de cultivo *in vitro* con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad (apartado III.2.10).

Estimación de la respuesta. Al igual que en los experimentos anteriores, estimamos la respuesta organogénica sobre la base de las siguientes variables:

Frecuencia de explantes con brotes. En las figuras se expresa en forma de porcentaje  $\pm$  el error asociado a la frecuencia. El error se calculó con la fórmula  $\sqrt{([p \times (1-p)]/n)}$ , donde p es la frecuencia en tanto por uno y n el número de explantes incubados.

Índice organogénico. Esta segunda variable trata de estimar la magnitud de la respuesta organogénica asignando a cada callo un valor de 0 a 3 en función de la extensión o

número de estructuras organizadas, es decir, yemas adventicias o brotes. En las figuras se expresa el valor del índice  $\pm$  el error estándar.

#### **Determinación del grado de mixoploidía en los explantes de cotiledón en función del estado ontogénico de la plántula.**

Se llevó a cabo la cuantificación del contenido de ADN nuclear de las células del explante según el método de Smulders y colaboradores (1994). Los cotiledones de plántulas de 4, 7 o 10 días se trocearon finamente con una cuchilla en una placa Petri de 50 mm de diámetro. Se añadieron 200  $\mu$ L de tampón de extracción de núcleos (Partec, Münster, Alemania) y 800  $\mu$ L de una solución que contenía 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2phenyl-indole; DAPI *staining solution*, Partec) cuya función es teñir el ADN. Tras resuspender la mezcla, se filtró a través de una malla de nylon de 50  $\mu\text{m}$ . La suspensión de núcleos se hizo 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 366 nm. La corriente de núcleos en suspensión pasa por una cámara de cuarzo (conducto de 10  $\mu\text{m}$  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. El sistema se calibra previamente situando el pico correspondiente a un contenido de ADN igual a 2C (diploide en fase G1) sobre el valor que se desee de la escala de abscisas.

#### **Determinación del nivel de ploidía en las plantas regeneradas.**

El método es idéntico al indicado anteriormente, excepto por el hecho de que, en este caso, el tejido vegetal es un fragmento de hoja joven (primera o segunda hoja de cada planta regenerada) de aproximadamente 1  $\text{cm}^2$ .



## 8.6. Efecto del nitrato de plata sobre la respuesta organogénica de los explantes de cotiledón

Se estudió el efecto del nitrato de plata sobre la organogénesis en explantes de pepino mediante un diseño de tipo factorial (3 cultivares x 4 concentraciones de nitrato de plata).

Genotipos. 'Wisconsin 2843', 'Marketer' y 'Negrito'. Sus características se describen en el apartado III.8.1.

Explantes. Se utilizaron segmentos de cotiledón enteros de plántulas de 4 días. El procedimiento de obtención se describe en el apartado III.8.1.

Medios de cultivo. Se utilizó el medio MB3 (Moreno et al., 1985) con 0,5 mg/l de ácido indolacético y 2,5 mg/l de 6-benciladenina (IB 05 25) suplementado con las siguientes concentraciones de nitrato de plata: 0, 0,08, 0,8 y 8 mg/l (Tabla 8).

Condiciones de incubación. El cultivo se realizó en una cámara de cultivo *in vitro* con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad (apartado III.2.10).

Estimación de la respuesta. Al igual que en los experimentos anteriores, estimamos la respuesta organogénica sobre la base de las siguientes variables:

Frecuencia de explantes con brotes. En las figuras se expresa en forma de porcentaje  $\pm$  el error asociado a la frecuencia. El error se calculó con la fórmula  $\sqrt{([p \times (1-p)]/n)}$ , donde p es la frecuencia en tanto por uno y n el número de explantes incubados.

Índice organogénico. Esta segunda variable trata de estimar la magnitud de la respuesta organogénica asignando a cada callo un valor de 0 a 3 en función de la extensión o número de estructuras organizadas, es decir, yemas adventicias o brotes. En las figuras se expresa el valor del índice  $\pm$  el error estándar.

## 9. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PEPINO MEDIANTE CO-CULTIVO DE EXPLANTES PRIMARIOS CON *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

### 9.1. Experimentos previos a la inoculación de los explantes con *Agrobacterium*

En un proceso de transformación vía *Agrobacterium* los explantes se ven sometidos a condiciones estresantes, debido a las fases de infección y co-cultivo, así como por la utilización de antibióticos a lo largo del proceso de selección. Esto se traduce en un descenso en la respuesta morfogénica. Por este motivo, en este apartado evaluamos algunos factores que podrían afectar la respuesta organogénica de pepino durante las etapas del proceso de transformación. En este sentido, el medio de inoculación no incluyó *Agrobacterium* y, a lo largo del proceso de regeneración, no se incluyó en el medio un antibiótico selectivo, para no enmascarar la posible influencia de esos factores. En concreto, se estudió el efecto de la aplicación de la acetosiringona, dos medios de infección (LB y YEP) (Tablas 11 y 13) y la aplicación en los medios de lavado y regeneración de diferentes concentraciones de cefotaxima, el antibiótico habitualmente utilizado para erradicar *Agrobacterium*.

#### 9.1.1. Efecto de la acetosiringona sobre la respuesta morfogénica

La acetosiringona (3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenona) es un compuesto fenólico inductor de los genes de virulencia (*vir*) en determinadas cepas de *Agrobacterium tumefaciens* y se utiliza habitualmente en el proceso de transformación genética a concentraciones de 50 - 200  $\mu\text{M}$ , aunque su inclusión no es estrictamente imprescindible. En este experimento se evaluó el efecto de la incorporación de 200  $\mu\text{M}$  de acetosiringona en los medios de inoculación y co-cultivo (sin *Agrobacterium*), sobre la posterior respuesta morfogénica. En el proceso de regeneración no se utilizó el antibiótico selectivo, para no enmascarar la influencia del factor estudiado. El diseño experimental contó, pues, con un solo factor (adición, o no, de acetosiringona).

Genotipo. 'Marketer'. Sus características se describen en el apartado III.8.1.

Explantes. Se utilizaron segmentos de cotiledón enteros de plántulas de 4 días. El procedimiento de obtención se describe en el apartado III.8.1.

Precultivo de los explantes. Se utilizó el medio MB3 (Moreno et al., 1985) con 0,5 mg/l de IAA y 2,5 mg/l de 6-BA (medio IB 05 25) (Tabla 6).

Inoculación (sin *Agrobacterium*). Empleamos el medio LB líquido (Tabla 11) a pH 5,7, suplementado o no con 200 µM de acetosiringona.

Co-cultivo. Utilizamos el medio IB 05 25 (MB3 + 0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6), suplementado o no con 200 µM de acetosiringona.

Lavado. Empleamos el medio MB (Tabla 10) que se ajustó a un pH 5,7.

Antibiótico selectivo. No incluido.

Regeneración.

Inducción de organogénesis. Empleamos el medio IB 05 25 (MB3 + 0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6).

Desarrollo y elongación de brotes. Utilizamos el medio K02 (MB3 + 0,2 mg/l de quinetina) (Tabla 9).

Enraizamiento de los brotes. Empleamos el medio MB3 (Moreno et al., 1985) (Tabla 5).

Condiciones de incubación. El cultivo se realizó en una cámara de cultivo *in vitro* con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad (apartado III.2.10). La fase de co-cultivo se realizó también en la cámara de cultivo *in vitro* pero en oscuridad continua.

Estimación de la respuesta. Al igual que en los experimentos anteriores, estimamos la respuesta organogénica sobre la base de las siguientes variables:

Frecuencia de explantes con brotes. En las figuras se expresa en forma de porcentaje ± el error asociado a la frecuencia. El error se calculó con la fórmula  $\sqrt{[p \times (1-p)]/n}$ , donde p es la frecuencia en tanto por uno y n el número de explantes incubados.

Índice organogénico. Esta segunda variable trata de estimar la magnitud de la respuesta organogénica asignando a cada callo un valor de 0 a 3 en función de la extensión o número de estructuras organizadas, es decir, yemas adventicias o brotes. En las figuras se expresa el valor del índice ± el error estándar.

En la Tabla 14 (C1) se presenta un resumen del protocolo.

### 9.1.2. Efecto de la cefotaxima sobre la respuesta morfogénica

La cefotaxima es uno de los antibióticos más utilizados para erradicar *Agrobacterium* tras las fases de inoculación y co-cultivo de explantes. A fin de evaluar su efecto sobre la posterior respuesta organogénica de los explantes, se realizaron dos experimentos consecutivos.

PRIMER EXPERIMENTO. Los explantes de pepino se sumergieron en dos medios de inoculación (LB y YEP) sin *Agrobacterium*, ajustando el pH a 5,7. El medio LB (Luria-Bertani) es uno de los más utilizados para el cultivo de *Agrobacterium*, mientras que el YEP (extracto de levadura + peptona + cloruro de sodio), aún siendo más habitual para el cultivo de levaduras, se ha empleado también para *Agrobacterium*. Se utilizaron tres concentraciones de cefotaxima (100, 200 y 300 mg/l). Por tanto, el diseño es de tipo factorial (2 medios de infección x 3 concentraciones de cefotaxima).

Genotipos. 'Marketer'. Sus características se describen en el apartado III.8.1.

Explantes. Se utilizaron segmentos de cotiledón enteros de plántulas de 4 días. El procedimiento de obtención se describe en el apartado III.8.1.

Precultivo de los explantes. Se utilizó el medio MB3 (Moreno et al., 1985) con 0,5 mg/l de IAA y 2,5 mg/l de 6-BA (medio IB 05 25) (Tabla 6).

Inoculación (sin *Agrobacterium*). Empleamos el medio LB o YEP líquido (Tablas 11 y 13, respectivamente) a pH 5,7.

Co-cultivo. Utilizamos el medio IB 05 25 (MB3 + 0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6).

Lavado. Empleamos el medio MB (Tabla 10) que se ajustó a un pH 5,7, suplementado con diferentes concentraciones del antibiótico cefotaxima (100, 200 y 300 mg/l).

Antibiótico selectivo. No incluido.

Regeneración.

Inducción de organogénesis. Empleamos el medio IB 05 25 (MB3 + 0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6), suplementado con diferentes concentraciones de cefotaxima (100, 200 y 300 mg/l).

Desarrollo y elongación de brotes. Utilizamos el medio K02 (MB3 + 0,2 mg/l de quinetina) (Tabla 9), suplementado con diferentes concentraciones de cefotaxima (100, 200 y 300 mg/l).

Enraizamiento de los brotes. Empleamos el medio MB3 (Moreno et al., 1985) (Tabla 5), suplementado con diferentes concentraciones de cefotaxima (100, 200 y 300 mg/l).

Condiciones de incubación. El cultivo se realizó en una cámara de cultivo *in vitro* con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad (apartado III.2.10). La fase de co-cultivo se realizó también en la cámara de cultivo *in vitro* pero en oscuridad continua.

Estimación de la respuesta. Al igual que en los experimentos anteriores, estimamos la respuesta organogénica sobre la base de las siguientes variables:

Frecuencia de explantes con brotes. En las figuras se expresa en forma de porcentaje  $\pm$  el error asociado a la frecuencia. El error se calculó con la fórmula  $\sqrt{[p \times (1-p)]/n}$ , donde p es la frecuencia en tanto por uno y n el número de explantes incubados.

Índice organogénico. Esta segunda variable trata de estimar la magnitud de la respuesta organogénica asignando a cada callo un valor de 0 a 3 en función de la extensión o número de estructuras organizadas, es decir, yemas adventicias o brotes. En las figuras se expresa el valor del índice  $\pm$  el error estándar.

En la Tabla 14 (C2) se presenta un resumen del protocolo.

SEGUNDO EXPERIMENTO. Los explantes del cultivar 'Marketer', que habían pasado por el medio LB (sin *Agrobacterium*), se cultivaron en medio IB 05 25 con distintas concentraciones de cefotaxima (desde 0 hasta 600 mg/l). Se trata de un diseño jerárquico con un solo factor (concentración de cefotaxima).

Genotipos. 'Marketer'. Sus características se describen en el apartado III.8.1.

Explantes. Se utilizaron segmentos de cotiledón enteros de plántulas de 4 días. El procedimiento de obtención se describe en el apartado III.8.1.

Precultivo de los explantes. Se utilizó el medio MB3 (Moreno et al., 1985) con 0,5 mg/l de IAA y 2,5 mg/l de 6-BA (medio IB 05 25) (Tabla 6).

Inoculación (sin *Agrobacterium*). Empleamos el medio LB líquido (Tabla 11) a pH 7,0.

Co-cultivo. Utilizamos el medio IB 05 25 (MB3 + 0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6).

Lavado. Empleamos el medio MB (Tabla 10) que se ajustó a un pH 5,7, suplementado con varias concentraciones del antibiótico cefotaxima (0, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 mg/l).

Antibiótico selectivo. No incluido.

Regeneración.

Inducción de organogénesis. Empleamos el medio IB 05 25 (MB3 + 0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6), suplementado con varias concentraciones del antibiótico cefotaxima (0, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 mg/l).

Desarrollo y elongación de brotes. Utilizamos el medio K02 (MB3 + 0,2 mg/l de quinetina) (Tabla 9), suplementado con varias concentraciones del antibiótico cefotaxima (0, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 mg/l).

Enraizamiento de los brotes. Empleamos el medio MB3 (sin reguladores de crecimiento; Moreno et al., 1985) (Tabla 5), suplementado con varias concentraciones del antibiótico cefotaxima (0, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 mg/l).

Condiciones de incubación. El cultivo se realizó en una cámara de cultivo *in vitro* con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad (apartado III.2.10). La fase de co-cultivo se realizó también en la cámara de cultivo *in vitro* pero en oscuridad continua.

Estimación de la respuesta. Al igual que en los experimentos anteriores, estimamos la respuesta organogénica sobre la base de las siguientes variables:

Frecuencia de explantes con brotes. En las figuras se expresa en forma de porcentaje  $\pm$  el error asociado a la frecuencia. El error se calculó con la fórmula  $\sqrt{([p \times (1-p)]/n)}$ , donde p es la frecuencia en tanto por uno y n el número de explantes incubados.

Índice organogénico. Esta segunda variable trata de estimar la magnitud de la respuesta organogénica asignando a cada callo un valor de 0 a 3 en función de la extensión o número de estructuras organizadas, es decir, yemas adventicias o brotes. En las figuras se expresa el valor del índice  $\pm$  el error estándar.

En la Tabla 14 (C3) se presenta un resumen del protocolo seguido.

### 9.1.3. Descripción de los experimentos realizados

**Tabla 14.** Estudios previos al co-cultivo de explantes primarios con *Agrobacterium tumefaciens*.

	Experimentos		
	C1	C2	C3
Cultivar	Marketer		
Tipo de explante	'Cotiledón entero' (plántulas de 4 días)		
<b>Etapas y medios de cultivo</b>	IB 05 25 (6-8 h)		
(1) Precultivo: (1.1) Medio de inducción de organogénesis			
(2) Inoculación ( <i>sin Agrobacterium</i> ): (2.1) Medio de inoculación	LB [pH 5,7] + AS (0/ 200µM) (7 min)	LB/ YEP [pH 5,7] (7 min)	LB [pH 7,0] (7 min)
(3) Co-cultivo (3.1) Medio de co-cultivo	IB 05 25 + AS (0/ 200µM) (2-3 días)	IB 05 25 (2-3 días)	IB 05 25 (2-3 días)
(4) Lavado: (4.1) Medio de lavado	MB [pH 5,7] (7 min)	MB [pH 5,7] + CF (100/ 200 / 300) (7 min)	MB [pH 5,7] + CF (0/ 100/ 200/ 300/ 400/ 500/ 600) (7 min)
(5) Regeneración: (5.1) Medio de inducción de organogénesis	IB 05 25 (3 semanas)	IB 05 25 + CF (100/ 200 / 300) (3 semanas)	IB 05 25 + CF (0/ 100/ 200/ 300/ 400/ 500/ 600) (3 semanas)
(5.2) Medio de desarrollo y elongación de ápices	K02 (2 semanas)	K02 + CF (100/ 200 / 300) (2 semanas)	K02 + CF (0/ 100/ 200/ 300/ 400/ 500/ 600) (2 semanas)
(5.3) Medio de enraizamiento	MB3 (3-4 semanas)	MB3 + CF (100/ 200 / 300) (3-4 semanas)	MB3 + CF (0/ 100/ 200/ 300/ 400/ 500/ 600) (3-4 semanas)

<sup>(1)</sup> DO 600. **Abreviaturas:** AS - Acetosiringona; CF (x) – x mg/l del antibiótico cefotaxima; kan (x) – x mg/l del antibiótico kanamicina.

## **9.2. Co-cultivo de explantes primarios de los cultivares 'Marketer' y 'Negrito' con el vector pBIN19 y selección con kanamicina**

Transcurridos treinta años desde la primera publicación de transformación en pepino vía *Agrobacterium* (Trulson et al., 1986), no puede decirse que a día de hoy se disponga de un método de transformación adecuado, hasta el punto de que, pese al número de artículos que se han publicado sobre el tema (ver 'Introducción'), algunos autores siguen considerando a esta especie como recalcitrante (Nanasato et al., 2013; Fraenkel, 2014). Los problemas principales a la hora de conseguir plantas transgénicas de pepino estriban en la escasa adecuación de los métodos de selección, la baja eficacia de los métodos de regeneración a partir de ciertos tipos de explantes y, sobre todo, en el descenso de la tasa de regeneración como consecuencia de los tratamientos habituales en un experimento de transformación. Ante la problemática existente, en el contexto de esta Tesis se estudiaron una serie de factores relacionados con las distintas etapas del proceso de transformación vía *Agrobacterium*, tales como cepas, vectores, densidad óptica del inóculo, genotipos, edad del explante, forma de llevar a cabo el proceso de selección, tipo y concentración del agente selectivo, entre otros.

La elección de la dosis del antibiótico selectivo es un factor crítico en el éxito de un proceso de transformación vía *Agrobacterium*. La kanamicina es uno de los antibióticos selectivos más empleados en el proceso de selección y, por lo que respecta a las cucurbitáceas, se ha utilizado a concentraciones comprendidas entre 25 y 200 mg/l (Gaba y Antignus, 1992; Ellul et al., 1995; Wang et al., 2015). El ajuste de la concentración es clave porque lo que se busca es una situación de compromiso en el sentido de que se dé ventaja a las células que hayan integrado el T-DNA al tiempo que se minimice la formación de escapes.

Con el objetivo de encontrar la concentración más adecuada de kanamicina en el proceso de transformación en pepino, en la primera parte de este experimento se estudió el efecto de tres concentraciones de kanamicina (25, 50 y 75 mg/l) en el medio selectivo utilizando explantes del cv. 'Marketer' y, en función de los resultados obtenidos, en la segunda fase del experimento se estudió la aplicación de una concentración de kanamicina de 25 mg/l utilizando explantes del cv. 'Negrito'.



En concreto, las condiciones experimentales fueron las siguientes:

Cepa de *Agrobacterium tumefaciens*. Se utilizó la cepa LBA4404.

Vectores y genes marcadores/delatores. Se empleó el vector pBin19 que porta el gen marcador *nptII*.

Genotipos. En la primera parte del experimento se utilizó el cv. 'Marketer' y en la segunda el cv. 'Negrito'. Sus características se describen en el apartado III.8.1.

Explantos. Se utilizaron segmentos de cotiledón enteros de plántulas de 4 días. El procedimiento de obtención se describe en el apartado III.8.1.

Precultivo de los explantes. Se precultivaron los explantes en el medio IB 05 25 (MB3 + 0,5 mg/l de IAA y 2,5 mg/l de 6-BA (Tabla 6) durante 6-8 horas.

Inoculación con *Agrobacterium*. Empleamos el medio LB líquido (Tabla 11) a pH 5,7, suplementado con 100 mg/l de kanamicina y 200 µM de acetosiringona, con una DO<sub>600</sub> de 0,7-0,8. El tiempo de inoculación fue de 7 minutos.

Co-cultivo con *Agrobacterium*. Utilizamos el medio IB 05 25 (Tabla 6), suplementado con 200 µM de acetosiringona. El periodo de co-cultivo fue de 2-3 días.

Lavado y erradicación de la bacteria. Empleamos el medio MB (Tabla 10) que se ajustó a un pH 5,7, suplementado 300 mg/l del antibiótico cefotaxima. La duración de esta fase fue de 7 minutos.

Antibiótico selectivo. Kanamicina a las concentraciones que se indican las a continuación.

Proceso de selección.

Inducción de organogénesis. Empleamos el medio IB 05 25 (Tabla 6), suplementado con 300 mg/l de cefotaxima y las siguientes concentraciones de kanamicina:

- 1ª parte del experimento (cv. 'Marketer'): 25, 50, o 75 mg/l de kanamicina;
- 2ª parte del experimento (cv. 'Negrito'): 25 mg/l de kanamicina.

Estas concentraciones se utilizaron en siguientes etapas de la regeneración.

Desarrollo y elongación de brotes. Utilizamos el medio K02 (MB3 + 0,2 mg/l de quinetina (Tabla 9), suplementado con 300 mg/l de cefotaxima y las concentraciones de kanamicina anteriormente indicadas.

Enraizamiento de los brotes seleccionados. Empleamos el medio MB3 (sin reguladores de crecimiento; Moreno et al., 1985) (Tabla 5), suplementado con 300 mg/l de cefotaxima y las concentraciones de kanamicina anteriormente indicadas.

Condiciones de incubación. El cultivo se realizó en una cámara de cultivo *in vitro* con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad (apartado III.2.10). La fase de co-cultivo se realizó también en la cámara de cultivo *in vitro* pero en oscuridad continua.

Variables relacionadas con la respuesta morfogenética.

Porcentaje de callos con brotes (respecto al número de explantes inoculados). Se estimó tras el cultivo de los explantes en el medio de inducción de organogénesis (Tabla 6) con presión de selección y el subcultivo a medio de elongación de brotes (Tabla 9) con presión de selección. En las figuras se expresa en forma de porcentaje  $\pm$  el error asociado a la frecuencia.

Variables relacionadas con el proceso de selección.

Porcentaje de plantas que sobreviven. Se determinó al finalizar el cultivo en medio de enraizamiento (Tabla 5) contabilizando las plantas supervivientes (sin señales de contaminación) que pasaron por el proceso selectivo. En las figuras se expresa en forma de porcentaje  $\pm$  el error asociado a la frecuencia.

Número de plantas seleccionadas. Número de plantas consideradas como presuntas transgénicas al final del experimento.

Evaluación de la expresión del gen marcador.

Test de ápice. Desarrollo de la parte aérea y el sistema radicular a partir del ápice terminal o de yemas axilares de las plantas inicialmente seleccionadas como presuntas transgénicas (subcultivadas varias veces) en medio base MB3 (Tabla 5) selectivo.

Test de explante. Formación de estructuras morfogenéticas a partir de segmentos de hoja de las plantas inicialmente seleccionadas como presuntas transgénicas (subcultivadas varias veces) en medio IB 05 25 (Tabla 6) selectivo.

Caracterización molecular mediante PCR. Para confirmar la presencia de genes foráneos en las plantas de pepino se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (Mullis et al., 1986, 1994). A continuación se describe el protocolo utilizado.

Extracción del ADN. El ADN se obtuvo a partir de tejido de hoja congelado inmediatamente en nitrógeno líquido a  $-80^{\circ}$  C. El protocolo de extracción de ADN ha sido adaptado de Rogers y Bendich (1994).

1. Moler en un Eppendorf con la ayuda de un émbolo de metal 0,25 g de tejido de hoja congelada en nitrógeno líquido hasta que quede reducido a un polvo fino.
2. Añadir 300  $\mu$ l de CTAB 2X precalentado a  $65^{\circ}$  C al que previamente se le ha añadido 0,2% de  $\beta$ -mercaptoetanol.
3. Homogeneizar e incubar durante 5 minutos a  $65^{\circ}$  C.
4. Añadir un volumen de 200  $\mu$ l Cloroformo/Isoamílico 24:1, homogeneizar y centrifugar durante 10 minutos en microcentrífuga.
5. Recuperar el sobrenadante y añadir 1/10 (volumen) de CTAB 10X precalentado a  $65^{\circ}$  C.
6. Mezclar y añadir un volumen de Cloroformo / Isoamílico 24:1.
7. Centrifugar durante 5 minutos.
8. Recuperar el sobrenadante y precipitar con un volumen de CTAB *precipitation Buffer*.
9. Centrifugar durante 3 minutos y eliminar el sobrenadante.
10. Resuspender el precipitado en 0,5 ml de TE altamente salino y precipitar con 1 ml de etanol absoluto.
11. Centrifugar durante 10 minutos y eliminar el sobrenadante.
12. Lavar el precipitado con 500  $\mu$ l de etanol al 70%, eliminar por decantación y dejar secar al aire durante 10 minutos.
13. Resuspender el precipitado en 30  $\mu$ l de TE 0,1X.

Estimación de la concentración de ADN mediante electroforesis en un gel de agarosa. La concentración de ADN se estima comparando la intensidad de la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio intercalado en el ADN, tras realizar una electroforesis en gel de

agarosa al 1% en tampón TAE 1X, con la fluorescencia emitida por un patrón de concentración conocida ( $\lambda/HindIII$ ).

Análisis PCR. Las reacciones PCR se llevan a cabo utilizando 0,2  $\mu\text{g}$  de ADN genómico de cada planta en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ . Los ciclos de amplificación son controlados por un termociclador "Minicycler™" de MJ Research Inc.

Cada reacción de PCR contiene los siguientes componentes:

Componente	Concentración final	Concentración stock
ADN	0,2 $\mu\text{g}$	0,2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$
Cebador 5'	0,6 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$
Cebador 3'	0,6 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$
dNTPs	0,4 mM	10 mM
Tampón 10x + $\text{MgCl}_2$	1x	10x
$\text{H}_2\text{O}$ (hasta 20 $\mu\text{l}$ )	-	-
Taq polimerasa	0,5 U	5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$

La secuencia de los cebadores empleados es la siguiente:

Componente	<i>nptII</i>
Cebador 5'	5'-AAGATGGATTGCACGCAGGTTC-3'
Cebador 3'	5'-GAAGAACTCGTCAAGAAGGCGA-3'

Las condiciones para la amplificación del fragmento de la secuencia del gen *nptII* son:

Ciclo	Desnaturalización	Hibridación	Polimerización
1	2 minutos a 94° C	-	-
30	30 segundos a 94° C	30 segundos a 55° C	1 minutos a 72° C
1 (último)	-	-	10 minutos a 72° C

Además de las muestras de las plantas transformadas, incluimos los siguientes controles:

- a) Mezcla con ADN genómico de plantas no transformadas (Control negativo);
- b) Mezcla con ADN plasmídico o genómico portador del gen analizado (Control positivo).

Análisis de los productos de la reacción PCR: Electroforesis de ADN. La presencia o ausencia del fragmento amplificado se determina mediante electroforesis en gel de agarosa 1,4% y tinción con bromuro de etidio. El tamaño de las bandas se estima por comparación con el marcador de peso molecular conocido: Generuler 100 bp DNA (Fermentas). Los productos de PCR de las plantas que contienen el gen analizado muestran una banda de ADN de tamaño conocido, correspondiente a la amplificación del ADN situado entre los cebadores. En nuestro caso, el tamaño de los productos de amplificación para *nptII* son de 781 pb.

Soluciones y tampones empleados.

Tampón CTAB 2X	Tampón CTAB 10X	CTAB <i>precipitation Buffer</i>	TE altamente salino
2% CTAB (w/v)	10% CTAB (w/v)	1% CTAB (w/v)	10 mM Tris (pH = 8)
100 mM Tris (pH = 8)	0,7 M NaCl	50 mM Tris (pH = 8)	1 mM EDTA (pH = 8)
20 mM EDTA (pH = 8)		10 mM EDTA (pH = 8)	1 M NaCl
1,4 M NaCl			
1% PVP (Mr 40.000)			
0,2% $\beta$ -mercaptoetanol			

*Abreviaturas:*

CTAB = Bromuro de hexadecil-trimetil-amonio

Tris = Tris(hidroximetil)aminometano

PVP = Polivinilpirrolidona

En la Tabla 15 (C4) se presenta un resumen del proceso de transformación.

## 9.2.1. Descripción de los experimentos realizados

Tabla 15. Co-cultivo de explantes primarios con la cepa LBA4404 y el vector pBIN19.

	Experimento	
	C4	
Cultivar	Marketer	Negrito
Tipo de explante	'Cotiledón entero' (plántulas de 4 días)	
<i>Agrobacterium</i> (cepa)	LBA4404	
Vector	pBin19	
Densidad óptica (Agro) <sup>(1)</sup>	0,7 - 0,8	
<b>Etapas y medios de cultivo</b>		
(1) Precultivo: (1.1) Medio de inducción de organogénesis	IB 05 25 (6-8 h)	
(2) Inoculación: (2.1) Medio de inoculación	LB [pH 5,7] + kan (100) + AS (200µM) (7 min)	
(3) Co-cultivo (3.1) Medio de co-cultivo	IB 05 25 + AS (200µM) (2-3 días)	
(4) Lavado: (4.1) Medio de lavado	MB [pH 5,7] + CF (300) (7 min)	
(5) Regeneración: (5.1) Medio de inducción de organogénesis	IB 05 25 + CF (300) + kan (25/ 50/ 75)	IB 05 25 + CF (300) + kan (25)
(5.2) Medio de desarrollo y elongación de ápices	K02 + CF (300) + kan (25/ 50/ 75)	K02 + CF (300) + kan (25)
(5.3) Medio de enraizamiento	MB3 + CF (300) + kan (25/ 50/ 75)	MB3 + CF (300) + kan (25)
<sup>(1)</sup> DO <sub>600</sub> . <b>Abreviaturas:</b> AS - Acetosiringona; CF (x) – x mg/l del antibiótico cefotaxima; kan (x) – x mg/l del antibiótico kanamicina.		

### **9.3. Co-cultivo de explantes primarios del cultivar 'Marketer' con la cepa C58 que porta el vector pBIG121-Hm y selección con kanamicina**

#### **9.3.1. Efecto de la duración del co-cultivo sin presión de selección y del medio inductor de organogénesis con presión selectiva**

En este experimento se utilizó la cepa C58 con el vector pBIG121-Hm que porta dos genes marcadores, *nptII* (resistencia a la kanamicina) y *hpt* (resistencia a higromicina), así como el gen delator *uidA-int* o *GUS-intrón*. La selección se realizó sobre la base de la expresión del gen *nptII*. Como explantes se emplearon segmentos de cotiledón de plántulas de 7 días. No se modificó el periodo de precultivo de los explantes (6-8 horas), pero sí hicimos algunos cambios en el proceso de inoculación con *Agrobacterium*. En concreto, la densidad óptica de la suspensión bacteriana ( $DO_{600}$ ) se ajustó a 0,2-0,3. Al disminuir la densidad óptica del inóculo bacteriano, aumentamos el periodo de infección (10 minutos). Conviene señalar también que modificamos el pH del medio LB (7,0) porque algunos autores han señalado que es el óptimo para el crecimiento de *Agrobacterium* (Cheng et al., 1997; Park et al., 2010). Aparte de los cambios mencionados, el objetivo del experimento fue estudiar el efecto del periodo de co-cultivo y la influencia del medio empleado en el proceso de selección.

El co-cultivo es una de las fases que más influye en la eficiencia de transformación (Kose y Koç, 2003; Yin et al., 2005a; Kim et al., 2010; Nanasato et al., 2013), ya que bajo condiciones inadecuadas se puede producir un crecimiento excesivo de la bacteria y/o necrosis de los explantes, lo cual conlleva a una menor tasa de transformación (Nanasato et al., 2013). En este experimento ensayamos el efecto de un co-cultivo sin presión de selección (i.e. sin kanamicina) durante un periodo de 1, 3 o 5 días.

Asimismo, utilizamos tres medios de inducción de organogénesis (Tabla 6): B25 (MB3 + 2,5 mg/l de 6-benciladenina); IB 005 25 (MB3 + 0,05 mg/l de ácido indol-3-acético + 2,5 mg/l de 6-benciladenina); IB 05 25 (MB3 + 0,5 mg/l de ácido indol-3-acético + 2,5 mg/l de 6-benciladenina). Se trata, pues, de un diseño factorial (3 periodos de co-cultivo x 3 medios de cultivo).

En concreto, las condiciones experimentales fueron las siguientes:

Cepa de *Agrobacterium tumefaciens*. Se utilizó la cepa C58.

Vectores y genes marcadores/delatores. Se empleó el vector pBIG121-Hm que porta dos genes marcadores (*nptII* y *hpt*) y el gen delator *uidA-int*.

Genotipo. Cultivar 'Marketer'. Sus características se describen en el apartado III.8.1.

Explantos. Segmentos de cotiledón enteros de plántulas de 7 días. El procedimiento de obtención se describe en el apartado III.8.1.

Precultivo de los explantes. Se precultivaron durante 6-8 horas en los tres medios que utilizamos en la fase de inducción de organogénesis (ver proceso de selección).

Inoculación con *Agrobacterium*. 10 minutos en el medio LB líquido (Tabla 11) a pH 7,0, suplementado con 100 mg/l de kanamicina y 200  $\mu$ M de acetosiringona, con una  $DO_{600}$  de 0,2-0,3.

Co-cultivo con *Agrobacterium*. Se ensayaron tres periodos de co-cultivo (1, 3 y 5 días) en los tres medios de cultivo que utilizamos en las fases de precultivo y de inducción de organogénesis (ver proceso de selección). Los tres medios se suplementaron con 200  $\mu$ M de acetosiringona.

Lavado y erradicación de la bacteria. 10 minutos en el medio MB (Tabla 10) que se ajustó a un pH 4,4, suplementado 300 mg/l del antibiótico cefotaxima.

Antibiótico selectivo. Kanamicina.

Proceso de selección.

Inducción de organogénesis. Empleamos tres medios de cultivo: B 25 (MB3 + 2,5 mg/l de 6-BA), IB 005 25 (MB3 + 0,05 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA) e IB 05 25 (MB3 + 0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA (Tabla 6). Los tres medios se suplementaron con 300 mg/l de cefotaxima y 25 mg/l de kanamicina.

Desarrollo y elongación de brotes. Utilizamos el medio K02 (MB3 + 0,2 mg/l de quinetina (Tabla 9), suplementado con 300 mg/l de cefotaxima y 25 mg/l de kanamicina.



Enraizamiento de los brotes seleccionados. Empleamos el medio MB3 (sin reguladores de crecimiento; Moreno et al., 1985) (Tabla 5) suplementado con 300 mg/l de cefotaxima y 25 mg/l de kanamicina en los primeros subcultivos, mientras que en los siguientes no se incluyó la kanamicina.

Condiciones de incubación. El cultivo se realizó en una cámara de cultivo *in vitro* con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad (apartado III.2.10). La fase de co-cultivo se realizó también en la cámara de cultivo *in vitro* pero en oscuridad continua.

Variables relacionadas con la respuesta morfogénica.

Porcentaje de explantes con callos nodulares. Se estimó tras el cultivo de los explantes en el medio de inducción de organogénesis (Tabla 6) con presión selectiva. Conviene aclarar que el término 'callo nodular' alude a un callo en el que aparecen zonas semi-compactas en las que usualmente se produce la diferenciación de yemas adventicias y brotes. En las figuras se expresa en forma de porcentaje.

Porcentaje de explantes con brotes y porcentaje de callos nodulares con brotes. Estas variables se estimaron tras el cultivo de los explantes en el medio de desarrollo y elongación de brotes con presión de selección. En las figuras se expresan en forma de porcentaje  $\pm$  el error asociado a la frecuencia.

Variables relacionadas con el proceso de selección.

Número de plantas seleccionadas. Número de plantas consideradas como presuntas transgénicas al final del experimento.

Análisis de la expresión del gen delator (*uidA-int*). Se estimó el porcentaje de explantes que originan callos nodulares con zonas o grupos de células GUS+, así como el porcentaje de callos 'nodulares' (respecto al número total de callos) que tienen zonas o grupos de células GUS+. En las figuras, los resultados se expresan en forma de porcentaje.

Para llevar a cabo el análisis histoquímico X-GLUC, se recogieron las muestras y se les añadió la solución X-GLUC en cantidad suficiente para que las cubriera. Estas muestras se dejaban durante 24 horas en oscuridad a 37°C para que tuviera lugar la reacción histoquímica.

**Solución X-GLUC**

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
<b>X-GLUC</b> (Disolver en DMSO 1%)	1.0 mM
<b>Tampón Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	100 mM
<b>Tampón NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	100 mM
<b>EDTA</b>	10 mM
<b>K-Ferricyanide (FeIII)</b>	0,5 mM
<b>K-Ferricyanide (FeII)</b>	0,5 mM
<b>Triton X-100</b>	0,1%
<b>Agua destilada</b>	Hasta completar volumen deseado

Tras la incubación, se eliminaba la solución X-GLUC y se realizaban varios lavados con etanol 70% para eliminar la clorofila de los tejidos y poder detectar mejor la tinción azul que produce la expresión del gen *uidA*. Las fotografías de estas muestras se tomaron con la ayuda de una lupa (MZFLIII; Leica).

Caracterización molecular mediante PCR. El método se describe en el apartado III.9.2.

En la Tabla 16 (C5) se presenta un resumen del proceso de transformación.

### 9.3.2. Efecto de un proceso de selección mixto en la fase de co-cultivo y en la etapa de inducción de organogénesis

En este apartado evaluamos dos métodos alternativos a la hora de llevar a cabo el proceso de selección en medio con kanamicina. En realidad, se trata de dos experimentos distintos, en cada uno de los cuales se plantea una cuestión diferente. No obstante, como se realizaron al mismo tiempo, con el mismo material y en las mismas condiciones, los resultados se presentan en este apartado como si se tratara de dos partes del mismo ensayo. Los experimentos se denominaron de forma arbitraria como A ('co-cultivo mixto') y B ('selección mixta').

El 'co-cultivo mixto' incluye dos etapas: la primera sin presión de selección (1 día), y la segunda, de duración variable (1 día [A1], 2 días [A2], 4 días [A4] o 5 días [A5]), con presión de selección (25 mg/l de kanamicina).

Por lo que respecta a la 'selección mixta', tras un co-cultivo sin presión de selección (1 día), se lavaron los explantes y se transfirieron al medio de inducción de organogénesis, dividiéndose esta fase en dos etapas: la primera, de duración variable (1 día [B1], 2 días [B2], 3 días [B3], 4 días [B4] o 5 días [B5]) sin presión de selección; y la segunda (3-4 semanas) con presión de selección (25 mg/l de kanamicina).

El experimento de transformación se llevó a cabo con segmentos de cotiledón del cultivar 'Marketer' y la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIG121-Hm. Las condiciones experimentales fueron idénticas a las descritas en el apartado anterior con algunos cambios: en este caso, con la inclusión de una etapa con o sin presión de selección en la fase de co-cultivo o de regeneración (inducción de organogénesis), respectivamente; aumentamos la concentración de cefotaxima a 600 mg/l para impedir el crecimiento de *Agrobacterium*; en la fase de regeneración sólo se realizó la etapa de inducción de organogénesis.

En la evaluación tratamos de cuantificar el grado de expresión *uidA-int* (ensayo histoquímico) en callos 'nodulares', es decir, no solo evaluamos la existencia o no de grupos de células GUS (+) en los callos procedentes de los explantes inoculados con *Agrobacterium*, sino que también intentamos estimar la superficie de las zonas GUS (+) en estos mismos callos, al seccionar y fotografiar las muestras de los mismos y cuantificar

el número de píxeles de color azul intenso, despreciando cualquier punto con tinción tenue o dudosa.

En concreto, las condiciones experimentales fueron las siguientes:

Cepa de *Agrobacterium tumefaciens*. Se utilizó la cepa C58.

Vectores y genes marcadores/delatores. Se empleó el vector pBIG121-Hm que porta dos genes marcadores (*nptII* y *hpt*) y el gen delator *uidA-int*.

Genotipo. Empleamos el cv. 'Marketer. Sus características se describen en el apartado III.8.1.

Explantos. Segmentos de cotiledón enteros de plántulas de 7 días. El procedimiento de obtención se describe en el apartado III.8.1.

Precultivo de los explantes. En el medio B 25 (MB3 + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6) durante 6-8 horas.

Inoculación con *Agrobacterium*. 10 minutos en el medio LB líquido (Tablas 11) a pH 7,0, suplementado con 100 mg/l de kanamicina y 200  $\mu$ M de acetosiringona, con una  $DO_{600}$  de 0,2-0,3.

Co-cultivo con *Agrobacterium*.

- Co-cultivo mixto: En la primera etapa (1 día), utilizamos el medio B 25 (MB3 + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6), suplementado con 200  $\mu$ M de acetosiringona y, en la segunda etapa, el mismo medio suplementado con 25 mg/l de kanamicina al medio durante 1 día [A1], 2 días [A2], 4 días [A4] o 5 días [A5].

- Selección mixta: Utilizamos el medio B 25 (MB3 + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6), suplementado con 200  $\mu$ M de acetosiringona (1 día).

Lavado y erradicación de la bacteria. 10 minutos en el medio MB (Tabla 10) que se ajustó a un pH 4,4, suplementado con 600 mg/l del antibiótico cefotaxima.

Antibiótico selectivo. Kanamicina.

### Proceso de selección.

Inducción de organogénesis. Los explantes se transfirieron al medio de inducción de organogénesis B 25 (Tabla 6), suplementado con 600 mg/l del antibiótico cefotaxima, dividiéndose esta fase en dos etapas: la primera (sólo para la 'selección mixta'), de duración variable (1 día [B1], 2 días [B2], 3 días [B3], 4 días [B4] o 5 días [B5]) sin presión de selección; y la segunda (3-4 semanas) con presión de selección (25 mg/l de kanamicina).

Tras la etapa de inducción de organogénesis, se procedió al análisis de expresión del delator *uidA-int* (ensayo histoquímico X-GLUC).

Condiciones de incubación. El cultivo se realizó en una cámara de cultivo *in vitro* con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad (apartado III.2.10). La fase de co-cultivo se realizó también en la cámara de cultivo *in vitro* pero en oscuridad continua.

### Variables relacionadas con la respuesta morfogénica.

Porcentaje de explantes con callos nodulares. Se estimó tras el cultivo de los explantes en el medio de inducción de organogénesis (Tabla 6) con presión de selección. En las figuras se expresa en forma de porcentaje.

Análisis de la expresión del gen delator (*uidA-int*). En este experimento no solo evaluamos la existencia o no de grupos de células GUS (+) en los callos nodulares procedentes de los explantes inoculados con *Agrobacterium*, sino que también intentamos estimar la superficie de las zonas GUS (+) en estos mismos callos, al seccionar y fotografiar las muestras de los mismos y cuantificar el número de píxeles de color azul intenso, despreciando cualquier punto con tinción tenue o dudosa.

Por lo que respecta a presencia o ausencia de expresión, las variables anotadas fueron las siguientes:

- Porcentaje de explantes con callos 'nodulares' que tienen zonas o grupos de células GUS+.
- Porcentaje de callos 'nodulares' (respecto al número total de callos) con zonas o grupos de células GUS+.

Con relación a la extensión de las zonas con expresión del gen delator *uidA-int* en los callos seleccionados, las variables anotadas fueron las siguientes:

- Área Gus+ por explante. Extensión del área GUS+ por explante estimada mediante el recuento de píxeles.
- Área Gus+ por callo. Extensión del área GUS+ por callo estimada mediante el recuento de píxeles.
- Área Gus+ por callo Gus+. Extensión del área GUS+ por callo GUS+ estimada mediante el recuento de píxeles.

El análisis histoquímico GUS se realizó tal y como se describe en los apartados III.6.7 y III.9.3.1.

En la Tabla 16 (C6) se presenta un resumen del proceso de transformación.

### **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**

En estudios previos, comprobamos la dificultad de efectuar el proceso de selección empleando concentraciones de kanamicina de 50 - 75 mg/l y por ello elegimos una concentración de 25 mg/l. Sin embargo, el número de escapes era alto. En este experimento optamos por mantener una dosis de kanamicina de 25 mg/l en el medio de inducción de organogénesis y aumentarla a 100 mg/l tanto en el medio de elongación de brotes como en la primera fase del proceso de enraizamiento de dichos brotes. Se trata de una estrategia similar a la empleada por Rajagopalan y Perl-Treves (2005) para disminuir la tasa de escapes.

Adicionalmente, decidimos suplementar el medio de inducción de organogénesis con nitrato de plata o sulfato de cobre, así como utilizar un medio de elongación de brotes con sulfato de cobre. Los objetivos eran aumentar la calidad de la respuesta organogénica y reducir los efectos que produce el estrés generado por el protocolo de transformación.

Por otro lado, en el experimento anterior observamos que la tasa de transformación, transitoria o estable, estimada sobre la base de la superficie ocupada por células GUS (+) en los callos seleccionados, aumentaba considerablemente cuando se empleaba un 'co-cultivo mixto' (1 día sin presión de selección seguido por 2 días con presión de selección). Con el fin de corroborar este resultado, en el presente experimento comparamos lo que ocurre cuando al emplean estas condiciones con respecto a lo que sucede con un co-cultivo de la misma duración (3 días) sin presión de selección.

En concreto, las condiciones experimentales fueron las siguientes:

Cepa de *Agrobacterium tumefaciens*. Se utilizó la cepa C58.

Vectores y genes marcadores/delatores. Se empleó el vector pBIG121-Hm que porta dos genes marcadores (*nptII* y *hpt*) y el gen delator *uidA-int*.

Genotipo. Empleamos el cv. 'Marketer. Sus características se describen en el apartado III.8.1.

Explantos. Segmentos de cotiledón enteros de plántulas de 3 días. El procedimiento de obtención se describe en el apartado III.8.1.

Precultivo de los explantes. En el medio B 25 (MB3 + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6) durante 2 días.

Inoculación con *Agrobacterium*. 10 minutos en el medio LB líquido (Tabla 11) a pH 7,0, suplementado con 100 mg/l de kanamicina y 200  $\mu$ M de acetosiringona, con una  $DO_{600}$  de 0,2-0,3.

Co-cultivo con *Agrobacterium*. Se realizó de dos maneras:

- Co-cultivo mixto: en el medio B 25 (MB3 + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6), suplementado con 200  $\mu$ M de acetosiringona (durante 1 día), seguido de una segunda etapa en la que se añadió 25 mg/l de kanamicina al medio (durante 2 días).

- Co-cultivo continuo sin presión de selección: en el medio B 25 (MB3 + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6), suplementado con 200  $\mu$ M de acetosiringona (durante 3 días).

En ambos casos, se realizó en la cámara de cultivo bajo condiciones de fotoperiodo.

Lavado y erradicación de la bacteria. 10 minutos en el medio MB (Tabla 10) que se ajustó a un pH 4,4, suplementado con 600 mg/l del antibiótico cefotaxima.

Antibiótico selectivo. Kanamicina.

Proceso de selección.

Inducción de organogénesis. Empleamos el medio B 25 (Tabla 6), suplementado con 300 mg/l de cefotaxima y 25 mg/l de kanamicina.

- Co-cultivo mixto: el medio se suplementó con 5 $\mu$ M de  $AgNO_3$  [M1] o 1 mg/l de  $CuSO_4$  [M2].

- Co-cultivo continuo: el medio se suplementó con 5 $\mu$ M de  $AgNO_3$  [M3].

Desarrollo y elongación de brotes. Utilizamos el medio FCu (MB3 + 0,01 mg/l de NAA + 0,1 mg/l de 6-BA + 1 mg/l de sulfato de cobre) (Tabla 9), suplementado con 300 mg/l de cefotaxima y 100 mg/l de kanamicina.

Enraizamiento de los brotes seleccionados. Empleamos el medio MB3 (Tabla 5), suplementado con 300 mg/l de cefotaxima y 100 mg/l de kanamicina en el primer subcultivo. Los siguientes subcultivos se llevaron a cabo en medio sin kanamicina.



Condiciones de incubación. El cultivo se realizó en una cámara de cultivo *in vitro* con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad (apartado III.2.10).

Variables relacionadas con la respuesta morfogénica.

Porcentaje de explantes con callos nodulares. Se estimó tras el cultivo de los explantes en el medio de inducción de organogénesis (Tabla 6) con presión de selección. En las figuras se expresa en forma de porcentaje.

Porcentaje de explantes con brotes y porcentaje de callos nodulares con brotes. Estas variables se estimaron tras el cultivo de los explantes en el medio de desarrollo y elongación de brotes (Tabla 9) con presión de selección. En las figuras se expresan en forma de porcentaje  $\pm$  el error asociado a la frecuencia.

Variables relacionadas con el proceso de selección.

Número de plantas seleccionadas. Número de plantas consideradas como presuntas transgénicas al final del experimento.

Análisis de la expresión del gen delator (*uidA-int*). El análisis histoquímico GUS en hojas de las plantas seleccionadas se realizó tal y como se describe en los apartados III.6.7 y III.9.3.1. Se consideran como positivas (GUS +) aquellas plantas en las que se detectó expresión GUS en todas las hojas analizadas.

Estimación de la tasa de transformación.

Número de plantas transgénicas con relación al número los explantes inoculados. En este caso se asume que cada planta seleccionada deriva de un evento de integración independiente.

Número de callos que dan al menos una planta transgénica con relación al número de explantes inoculados. En este caso se asume que las plantas GUS (+) que proceden de un callo podrían derivar del mismo evento de transformación.

En la Tabla 16 (C7) se presenta un resumen del proceso de transformación.

#### **9.4. Selección con higromicina tras el co-cultivo de explantes primarios de los cultivares 'Marketer', 'Negrito' y 'Wisconsin 2843'**

En el experimento anterior incrementamos la concentración de kanamicina (de 25 a 100 mg/l) tanto en el medio de elongación (FCu) como en el de enraizamiento de los brotes (MB3) para reducir el número de escapes. Gracias a esta modificación del protocolo, se obtuvieron algunas plantas transgénicas del cultivar 'Marketer' con expresión estable del gen delator *uidA-int*. Una solución alternativa para reducir la tasa de escapes estriba en cambiar el agente selectivo, por ejemplo sustituir la kanamicina por higromicina B. Para estudiar la adecuación de la higromicina como agente selectivo en pepino, realizamos un experimento con los tres cultivares que habíamos venido utilizando: 'Marketer', 'Negrito' y 'Wisconsin 2843'. El protocolo de transformación fue básicamente el mismo que el empleado en el experimento anterior, aunque con pequeños cambios. En este caso, utilizamos la cepa LBA4404 de *A tumefaciens* que porta el vector pBIG121-Hm. Debido a la mayor toxicidad de la higromicina, optamos por hacer un co-cultivo con la cepa de *Agrobacterium* sin presión de selección. Además, para evitar posibles problemas de densidad crítica inicial en la primera etapa, realizamos una 'selección mixta', es decir, cultivamos los explantes inoculados en el medio de inducción de organogénesis durante dos días sin presión de selección y, a continuación, se subcultivaron al mismo medio con 10 mg/l de higromicina. En resumen, en este experimento de co-cultivo de explantes de los cultivares 'Marketer' y 'Negrito' y 'Wisconsin 2843' se utilizó la cepa LBA4404 de *Agrobacterium*, una 'selección mixta' y la higromicina B como antibiótico selectivo.

En concreto, las condiciones experimentales fueron las siguientes:

Cepa de *Agrobacterium tumefaciens*. Se utilizó la cepa LBA4404.

Vectores y genes marcadores/delatores. Se empleó el vector pBIG121-Hm que porta dos genes marcadores (*nptII* y *hpt*) y el gen delator *uidA-int*.

Genotipos. 'Marketer' y 'Negrito' y 'Wisconsin 2843'. Sus características se describen en el apartado III.8.1.

Explantos. Segmentos de cotiledón enteros de plántulas de 3 días. El procedimiento de obtención se describe en el apartado III.8.1.

Precultivo de los explantes. En el caso de los cultivares 'Wisconsin 2843' y 'Negrito' se empleó el medio IB 05 25 (MB3 + 0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6), mientras que en el cultivar 'Marketer' utilizamos el medio B 25 (MB3 + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6). El periodo de precultivo fue de 2 días.

Inoculación con *Agrobacterium*. 10 minutos en el medio LB líquido (Tabla 11) a pH 7,0, suplementado con 100 mg/l de kanamicina y 200  $\mu$ M de acetosiringona, con una  $DO_{600}$  de 0,2-0,3.

Co-cultivo con *Agrobacterium*. En el caso de los cultivares 'Wisconsin 2843' y 'Negrito' se empleó el medio IB 05 25 (MB3 + 0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6), mientras que en el cultivar 'Marketer' utilizamos el medio B 25 (MB3 + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6). Los medios se suplementaron con 200  $\mu$ M de acetosiringona. El periodo de co-cultivo fue de 2 días y la incubación se realizó en la cámara de cultivo bajo condiciones de fotoperiodo (apartado III.2.10).

Lavado y erradicación de la bacteria. 10 minutos en el medio MB (Tabla 10) que se ajustó a un pH 4,4, suplementado con 600 mg/l del antibiótico cefotaxima.

Antibiótico selectivo. Higromicina B.

Proceso de selección.

Inducción de organogénesis. En los cultivares 'Wisconsin 2843' y 'Negrito' se empleó el medio IB 05 25 (MB3 + 0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6), mientras que en el cultivar 'Marketer' utilizamos el medio B 25 (MB3 + 2,5 mg/l de 6-BA) (Tabla 6), ambos suplementado con 600 mg/l de cefotaxima. Para evitar problemas de densidad crítica inicial, realizamos una 'selección mixta', es decir, primero cultivamos los explantes inoculados en el medio de inducción de organogénesis durante dos días sin presión de selección y, a continuación, se subcultivaron al mismo medio con 10 mg/l de higromicina. En la segunda fase, los medios se suplementaron con 5 $\mu$ M de  $AgNO_3$ .

Desarrollo y elongación de brotes. Utilizamos el medio FCu (MB3 + 0,01 mg/l de NAA + 0,1 mg/l de 6-BA + 1 mg/l de sulfato de cobre) (Tabla 9), suplementado con 300 mg/l de cefotaxima y 10 mg/l de higromicina B durante los primeros subcultivos. En el último subcultivo no se incluyó el antibiótico selectivo.

Enraizamiento de los brotes seleccionados. Empleamos el medio MB3 (sin reguladores de crecimiento) (Tabla 5), suplementado en con 300 mg/l del antibiótico cefotaxima.

Condiciones de incubación. El cultivo se realizó en una cámara de cultivo *in vitro* con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad (apartado III.2.10).

Variables relacionadas con la respuesta morfogénica.

Porcentaje de explantes con callos nodulares. Se estimó tras el cultivo de los explantes en el medio de inducción de organogénesis (Tabla 6) con presión de selección. En las figuras se expresa en forma de porcentaje.

Porcentaje de explantes con brotes y porcentaje de callos nodulares con brotes. Estas variables se estimaron tras el cultivo de los explantes en el medio de desarrollo y elongación de brotes (Tabla 9) con presión de selección. En las figuras se expresan en forma de porcentaje  $\pm$  el error asociado a la frecuencia.

Variables relacionadas con el proceso de selección.

Número de plantas seleccionadas. Número de plantas consideradas como presuntas transgénicas al final del experimento.

Análisis de la expresión del gen delator (*uidA-int*). El análisis histoquímico GUS en hojas de las plantas seleccionadas se realizó tal y como se describe en los apartados III.6.7 y III.9.3.1. Se consideran como positivas (GUS +) aquellas plantas en las que se detectó expresión GUS en todas las hojas analizadas.

Estimación de la tasa de transformación.

Número de plantas transgénicas con relación al número los explantes inoculados. En este caso se asume que cada planta seleccionada deriva de un evento de integración independiente.

Número de callos que dan al menos una planta transgénica con relación al número de explantes inoculados. En este caso se asume que las plantas GUS (+) que proceden de un callo podrían derivar del mismo evento de transformación.

En la Tabla 16 (C8) se presenta un resumen del proceso de transformación.

9.5. Descripción de los experimentos realizados

Tabla 16. Co-cultivo de explantes primarios con la cepa LBA4404 o C58 y el vector pBIG121-Hm.

	Experimentos														
	C5			C6					C7			C8			
Línea o cultivar	Marketer										Wisconsin 2843	Negrito			
Tipo de explante	'Cotiledón entero'														
	(plántulas de 7 días)						(plántulas de 3 días)								
<i>Agrobacterium</i> (cepa)	C58						C58			LBA4404					
Vector	pBIG121-Hm														
Densidad óptica (Agro) <sup>(1)</sup>	0,2 - 0,3														
<b>Código de los tratamientos</b> <sup>(2)</sup>	A1	A2	A4	A5	B1	B2	B3	B4	B5	M1	M2	M3			
<b>Etapas y medios de cultivo</b>															
(1) Precultivo: (1.1) Medio de inducción de organogénesis	B 25/ IB 005 25/ IB 05 25				B 25					IB 05 25					
	(6-8 h)						(2 días)								
(2) Inoculación: (2.1) Medio de inoculación	LB [pH 7,0] + kan (100) + AS (200µM) (10 min)														
(3) Co-cultivo (3.1) Medio de co-cultivo 1 (sin presión de selección)	(B 25/ IB 005 25/ IB 05 25) + AS (200µM)				B 25 + AS (200µM)					IB 05 25 + AS (200µM)					
	(1/ 3/ 5 días)				(1 día)			(1 día)		(3 días)		(2 días)			
(3.2) Medio de co-cultivo 2 (con presión de selección)	(NR)				B25 + AS (200µM) + kan (25)			(NR)		B25 + AS (200µM) + kan (25)		(NR)			
					1	2	4	5							
										(2 días)					
(4) Lavado: (4.1) Medio de lavado	MB [pH 4,40] + CF (300) (10 min)				MB [pH 4,40] + CF (600) (10 min)										
(5) Regeneración: (5.1) Medio de inducción de organogénesis 1 (sin presión de selección)	(NR)				(NR)					(NR)		B 25 + CF (600)		IB 05 25 + CF (600)	
					1	2	3	4	5						
										(2 días)					
(5.2) Medio de inducción de organogénesis 2 (con presión de selección)	(B 25/ IB 005 25/ IB 05 25) + CF (300) + kan (25)				B 25 + CF (600) + kan (25)					B 25 + CF (600) + kan (25)		B 25		IB 05 25	
										+ 5µM AgNO <sub>3</sub> + 1 mg/l CuSO <sub>4</sub> + 5µM AgNO <sub>3</sub>		+ 5µM AgNO <sub>3</sub> + CF (600) + hpt (10)			
(5.3) Medio de desarrollo y elongación de brotes	K02 + CF (300) + kan (25)				(NR)					FCu + CF (300) + kan (100)		FCu + CF (300) + hpt (10); FCu + CF (300)			
(5.4) Medio de enraizamiento	MB3 + CF (300) + kan (25); MB3 + CF (300)				(NR)					MB3 + CF (300) + kan (100); MB3 + CF (300)		MB3 + CF (300)			

<sup>(1)</sup> DO<sub>600</sub>. <sup>(2)</sup> Identificación de algunos tratamientos. **Abreviaturas:** NR - no realizado; AS - Acetosiringona; CF (x) - x mg/l del antibiótico cefotaxima; kan (x) - x mg/l del antibiótico kanamicina; hpt (x) - x mg/l del antibiótico higromicina.

# IV. Resultados y Discusión

---

## 1. RESPUESTA MORFOGENÉTICA EN EXPLANTES DE PEPINO

### 1.1. RESULTADOS

#### 1.1.1. Efecto del genotipo, explante y medio de cultivo sobre la respuesta organogénica

En el primer experimento analizamos la respuesta cultural y morfofenética de explantes de tres cultivares de pepino en seis medios de cultivo. Con relación al material de partida, empleamos dos cultivares comerciales o variedades de polinización abierta ('Marketer' y 'Negrito') y una línea de mejora ('Wisconsin 2843').

Las plantas del cultivar 'Marketer' tienen un crecimiento vigoroso y son de tipo monoico (i.e. presentan flores masculinas y femeninas). Se trata de una variedad de ciclo medio cuyos frutos, de un color verde oscuro, presentan espinas de color blanco de escasa longitud y no muy abundantes. Las empresas que comercializan este tipo de pepino recomiendan recolectar los frutos antes de la madurez completa, cuando alcanzan una longitud de unos 20-22 cm, con el fin de que las semillas no hayan culminado su desarrollo, de manera que no resulten molestas para el consumidor.

'Negrito' es una variedad muy productiva, con frutos cilíndricos de unos 20 cm de longitud y unos 5 cm de diámetro. El fruto tiene un color verde oscuro, un sabor agradable y desarrolla un escaso número de semillas, lo que es ventajoso desde el punto de vista del consumidor. La planta, típicamente trepadora, desarrolla múltiples zarcillos y tiene un aspecto áspero debido a la presencia de numerosos pelos. Pese al gran número de tricomas, las plantas de esta variedad son sensibles a diversas plagas y enfermedades, como la mosca blanca, los pulgones, el oídio y el mildiu, lo que supone un serio problema cuando se cultiva en invernadero al final de la primavera o a lo largo del verano.

'Wisconsin 2843' es una línea de mejora obtenida por Peterson et al. (1985) en la que se fueron introduciendo, paso a paso, múltiples genes de resistencia a enfermedades. Así, las plantas de esta línea son homocigóticas para genes de resistencia al virus del mosaico del pepino (CMV), *Cladosporium cucumerinum* (pudrición o costra de la raíz; *scab spot rot*), *Pseudomonas lacrymans* (mancha angular de la hoja) y *Colletorichum lagenarium* (antracnosis).

En el artículo antes mencionado, los autores indican que 'Wisconsin 2843' es también una línea homocigótica para genes de resistencia a *Pseudoperonospora cubensis* (mildiu vellosa; *downy mildew*). Sobre las fuentes de resistencia a este tipo de mildiu hay una cierta controversia porque, sea por un manejo inadecuado o por cualquier otra razón, una de las principales fuentes de variación (PI 197087) parece haber perdido la resistencia al patógeno o, al menos, ciertos genes de resistencia (revisado en un artículo de *Cucurbit Genetics Cooperative Report* por Criswell et al., 2010-2011). A pesar de lo indicado, en nuestras condiciones de invernadero las plantas de 'Wisconsin 2843' se mostraron como resistentes o altamente tolerantes a este tipo de mildiu incluso en épocas del año en las que no tenía sentido cultivar otras líneas de pepino sensibles al patógeno.

Además, la línea 'Wisconsin 2843' segrega para dos niveles de resistencia a *Sphaerotheca fuliginea* (mildiu pulverulento; *powdery mildew*, PM). Uno de ellos es el tipo intermedio que muestra la accesión 'Cy-14', mientras que el otro es el que exhibe 'WI 1983', una accesión notablemente resistente a este tipo de mildiu. Las plantas de 'Wisconsin 2843' son también heterocigóticas para resistencia a *Erwinia tracheiphila* (fuego bacteriano) y *Corynespora cassiicola* (mancha de la hoja; *target leaf spot*).

Aparte de genes de resistencia, 'Wisconsin 2843' tiene otras características que aumentan su interés en programas de mejora. En efecto, en esta línea se han incorporado genes que permiten un desarrollo partenocárpico del fruto, lo que se complementa con el hecho de que las plantas son ginoicas (i.e. solo desarrollan flores femeninas). Por si fuera poco, los frutos de 'Wisconsin 2843' carecen de cucurbitacinas por lo que no tienen un sabor amargo.



Con relación a los explantes, utilizamos tres tipos: dos procedentes de cotiledones de plántulas de 4 días y el otro de hojas de plantas axénicas que se habían obtenido mediante cultivo de ápices en medio base. Los explantes de cotiledón a los que denominamos como "enteros" se obtuvieron eliminando la parte proximal (i.e. la más cercana al ápice) y la parte distal de los cotiledones de plántulas de 4 días que habían crecido en medio MG (Moreno et al., 1984). Los explantes de cotiledón cortados transversalmente se obtuvieron eliminando primero la parte proximal y la parte distal de los cotiledones de plántulas de 4 días y, a continuación, cada cotiledón se cortó transversalmente para obtener dos explantes (i.e. cuatro por cada plántula). Los explantes de hoja procedían de plantas axénicas cultivadas en medio MB3 (Moreno et al., 1985) durante 20-25 días. Se utilizaron las dos primeras hojas expandidas de cada planta cortando la lamina foliar en segmentos de unos 0,7-0,8 cm<sup>2</sup>.

Los seis medios de cultivo empleados en este estudio son modificaciones del MB3 (Moreno et al., 1985) con los siguientes reguladores del crecimiento: B 10 (1 mg/l de 6-BA), B 25 (2,5 mg/l de 6-BA), B 50 (5 mg/l de 6-BA), IB 05 10 (0,5 mg/l de IAA + 1 mg/l de 6-BA), IB 05 25 (0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA), IB 05 50 (0,5 mg/l de IAA + 5 mg/l de 6-BA).

Tras el cultivo de los explantes en cada medio, estimamos la respuesta organogénica anotando dos variables: la frecuencia de explantes que desarrollan brotes (expresada en las figuras en forma de porcentaje  $\pm$  el error estándar asociada a la frecuencia) y lo que denominamos como 'índice organogénico'. Esta segunda variable trata de estimar la magnitud de la respuesta organogénica asignando a cada callo un valor de 0 a 3 en función de la extensión o número de estructuras organizadas (yemas adventicias o brotes). A la hora de cuantificar la respuesta organogénica, en lugar del número de brotes por callo, elegimos el índice, porque, al igual que ocurre en otras cucurbitáceas como el melón y la sandía, en pepino no suele ser habitual que se desarrollen brotes individualizables en los callos primarios (i.e. los que derivan del explante), lo que dificulta cuantificar la respuesta sobre la base de una variable basada en el número de brotes por callo. En general, en los callos primarios aparecen yemas adventicias y primordios de brotes que requieren una fase de elongación en un medio adecuado. Para ello, se transfieren a medio con reducida concentración de reguladores del crecimiento (ver

'Material y Métodos'). Lo más efectivo no es tratar de separar el ápice de cada brote, sino subcultivar grupos de yemas adventicias o primordios de brotes al medio de elongación.

Por lo que respecta al cultivo de explantes primarios de la línea 'Wisconsin 2843', los mejores resultados se obtienen con explantes de cotiledón, más concretamente con lo que hemos denominado como segmentos de cotiledones enteros (figura 1). Cuando se emplean estos explantes, la frecuencia de callos con brotes oscila entre el 20% y el 35% en algunos medios de cultivo (figura 1a), mientras que el índice organogénico está en torno a 0,5 – 0,6 (Figura 1b). El corte transversal de los segmentos de cotiledón no supone ningún beneficio, ya que en el mejor de los casos el porcentaje de explantes con brotes supera por poco el 20% (Figura 1a). Los resultados con explantes de hoja (Figura 1) son similares a los obtenidos con segmentos de cotiledón cortados transversalmente.

Por otro lado, no se aprecia un efecto claro del medio de cultivo. No obstante, si se consideran los resultados obtenidos con los tres tipos de explantes, la elección podría recaer en un medio con 2,5 mg/l de 6-benciladenina, suplementado o no con 0,5 mg/l de ácido indolacético.

Las características del proceso de formación callo y de la respuesta organogénica en explantes de cotiledón entero de la línea 'Wisconsin 2843' se pueden apreciar en la Figura 2. Como puede verse, el crecimiento inicialmente desorganizado va siendo sustituido por un callo de tipo nodular a partir del cual van surgiendo grupos de yemas adventicias. Por lo que respecta a los explantes de cotiledón, las yemas adventicias suelen aparecer en la zona de corte más próxima al ápice de la planta. Más adelante, van apareciendo nuevas yemas adventicias en zonas cercanas que, poco a poco, se van extendiendo.

A las dos o tres semanas, estas yemas adventicias dan lugar a primordios de brotes. En esta etapa no se pueden contar los brotes y de ahí es que hayamos utilizado el índice organogénico para hacer una estimación cuantitativa de la respuesta morfogénica.

Tal y como se ha comentado antes, la elongación de los brotes requiere un subcultivo a medio con reducida concentración de citoquinina (Figura 2d). Para este propósito se puede emplear un medio base MB3 (Moreno et al., 1985) suplementado con 0,2 mg/l de quinetina (K02) o, alternativamente, el mismo medio MB3 con 0,01 mg/l de ácido

naftalenacético y 0,1 mg/ de 6-benciladenina (medio FCu). El enraizamiento de los brotes desarrollados no supone ningún problema, ya que basta con transferir los ápices a medio base o, alternativamente, a un medio con 0,1 mg/l de ácido indolacético o ácido indolbutírico.

Con relación al cultivar 'Marketer', los mejores resultados se obtienen empleando cotiledones enteros (Figura 3). En efecto, en un medio de cultivo con 2,5 mg/l de 6-benciladenina (suplementado, o no, con 0,5 mg/l de ácido indolacético) la frecuencia de explantes con brotes llega al 60%. De forma similar, el valor del índice organogénico en estos medios (en torno a 1) indica que la respuesta es satisfactoria. En cambio, al igual que ocurre con 'Wisconsin 2843', la respuesta morfogénica de los explantes de cotiledón cortados transversalmente (Figura 3) y de los explantes de hoja (Figura 3) del cultivar 'Marketer' es mucho menor.

Los callos de los explantes de cotiledón del cultivar 'Marketer' tienen un color más claro que los de 'Wisconsin 2843' y son menos compactos (Figura 5a). La diferenciación de yemas adventicias se centra principalmente en la zona de corte más próxima al ápice de la planta. Al principio aparece un grupo con varias yemas y la respuesta se va amplificando con el tiempo. La elongación de los brotes requiere de un subcultivo a medio con reducida concentración de reguladores del crecimiento (Figura 5b).

La respuesta organogénica de los explantes de cotiledón enteros del cultivar 'Negrito' es muy satisfactoria, al menos en ciertos medios de cultivo. En concreto, en los medios suplementados con 0,5 mg/l de ácido indolacético y 1 o 2,5 mg/l de 6-benciladenina, el porcentaje de explantes con brotes está en torno al 80% (Figura 4a) y el índice organogénico se aproxima a 1,5 (Figura 4b).

Al igual que ocurre con los otros dos genotipos ('Wisconsin 2843' y 'Marketer'), la respuesta de los explantes de cotiledón cortados transversalmente del cultivar 'Negrito' es menor (Figura 4) con independencia del medio de cultivo. Lo que resulta un tanto sorprendente es que la respuesta de los explantes de hoja sea tan baja (Figura 4), lo que revela la existencia de una interacción genotipo x explante.

Los callos de los explantes del cultivar 'Negrito' son más parecidos a los de 'Marketer' que a los de 'Wisconsin 2843'. En general, tienen un color blanquecino y son bastante friables (Figura 6a). Curiosamente, en algunos de estos callos aparecen unas zonas de crecimiento que son reminiscentes a lo que se denomina como 'callo semejante a gel' (*gel-like callus*). La aparición de este tipo de callo no es habitual en medios de cultivo como los que hemos empleado en este estudio, sino más bien en los que se utilizan para promover una respuesta embriogénica. Se trata de callos muy friables en donde se desarrollan células proembriogénicas que quedan inmersas en una especie de matriz que tiene la apariencia de un gel (de ahí el término '*gel-like callus*'). Normalmente, estas células dan lugar a embriones somáticos cuando el callo semejante a gel se subcultiva en un medio adecuado.

Si se tiene en cuenta la frecuencia de explantes que diferencian yemas y brotes adventicios, los mejores resultados se han obtenido con segmentos de cotiledón enteros del cultivar 'Negrito', ya que hasta el 80 % de los callos procedentes de estos explantes diferencian yemas y primordios de brotes. En el caso del cultivar 'Marketer' la respuesta de estos explantes es bastante satisfactoria (60 %), mientras que en la línea 'Wisconsin 2843' el resultado es simplemente aceptable (30-35 %).

En general, la respuesta de los explantes de cotiledón cortados transversalmente es menor que la de los segmentos de cotiledón enteros. Este resultado cabe atribuirlo a que la organogénesis se produce principalmente en la zona de corte del cotiledón más próxima al ápice meristemático. Como consecuencia, cuando se cortan los explantes transversalmente aparecen dos segmentos claramente diferenciados en cuanto a su respuesta: el más próximo al ápice (i.e. segmento proximal) suele diferenciar yemas y primordios de brotes; en cambio, el más alejado del ápice (i.e. segmento distal) normalmente no lo hace. Por este motivo, cuando se estima la respuesta organogénica en forma de frecuencia, la respuesta de los explantes cortados transversalmente es menor.

En los tres cultivares, los peores resultados se obtienen con explantes de hoja. En particular, resulta un tanto sorprendente la baja respuesta de los explantes de hoja del cultivar 'Negrito' sobre todo si se tiene en cuenta la elevada tasa de regeneración en

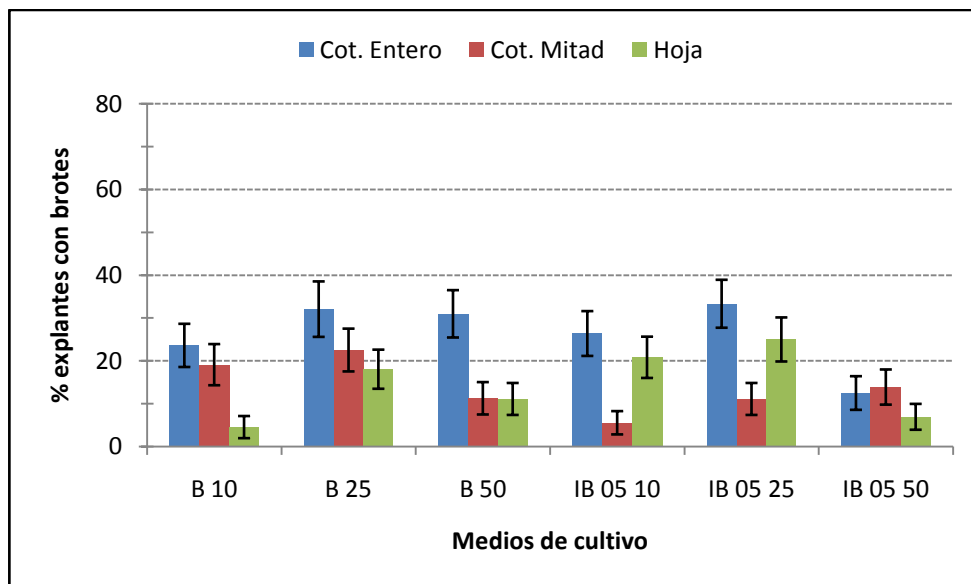
explantes de cotiledón enteros de este cultivar. Estos y otros resultados indican la existencia de un efecto de interacción entre el genotipo y el explante.

De forma similar, existe una interacción clara entre el medio de cultivo y el genotipo de partida. Así por ejemplo, antes hemos comentado que la máxima respuesta se obtiene en explantes de cotiledón enteros del cultivar 'Negrito, pero eso se debe a los resultados obtenidos en dos de los medios, ya que en los otros la respuesta es menor que en los explantes del cv. 'Marketer'.

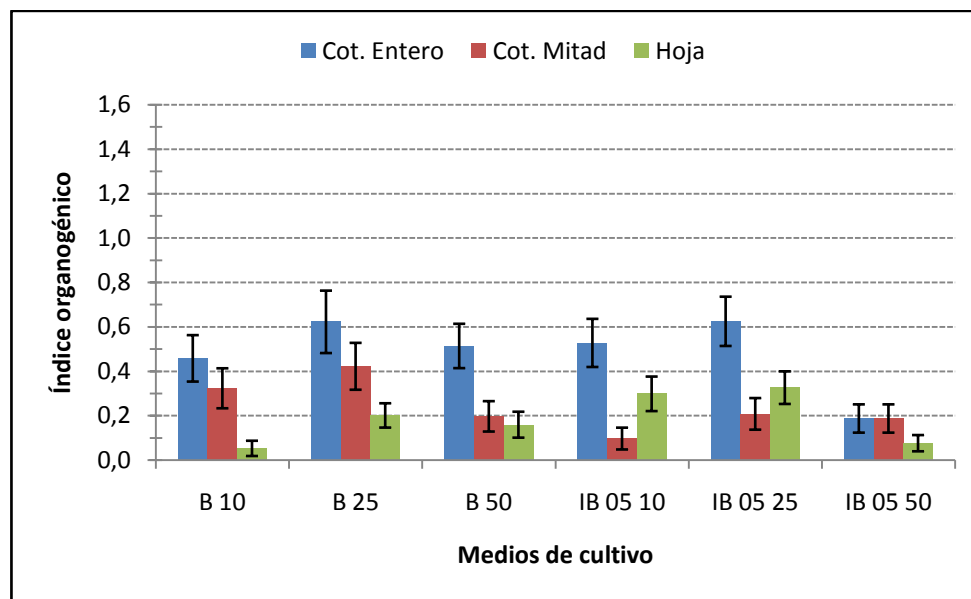
Con relación al medio de cultivo, no es fácil llegar a una clara conclusión sobre cuál es el mejor. No obstante, en general los mejores resultados se obtienen empleando medios suplementados con 0,5 mg/l de ácido indolacético y 1,0 mg/l o 2,5 mg/l de 6-bencialdenina.

**Figura 1.** Efecto del tipo de explante y del medio de cultivo sobre la respuesta morfológica de la línea 'Wisconsin 2843'.

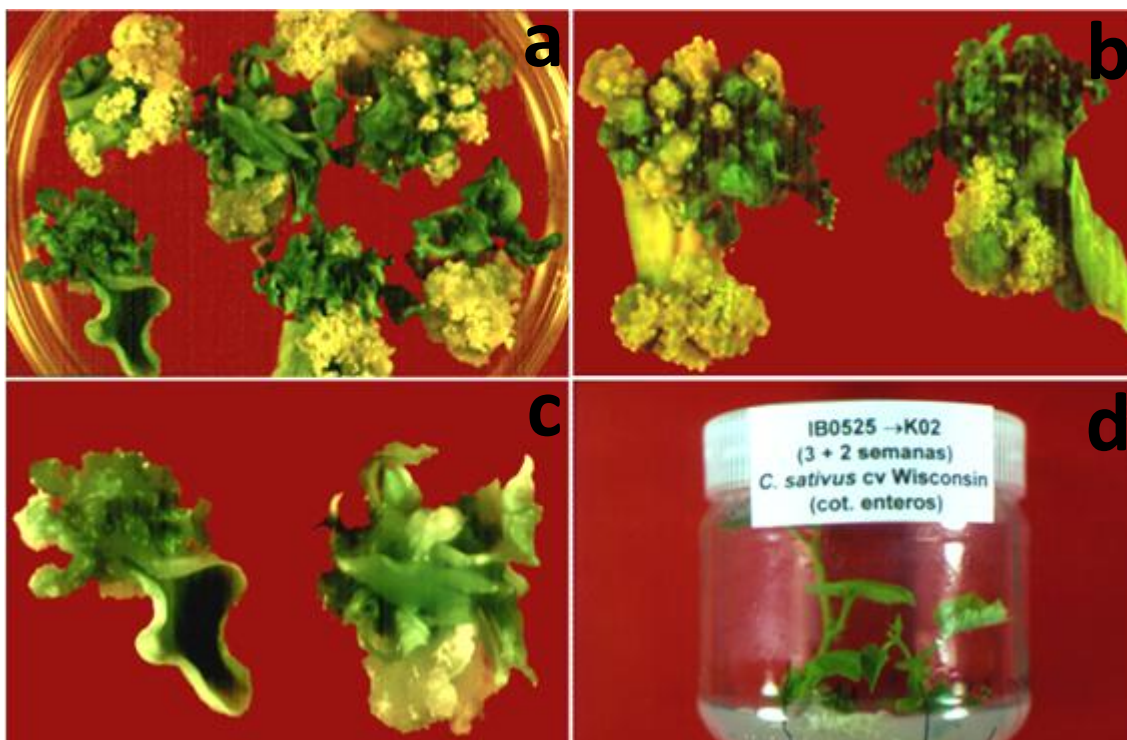
(a) Porcentaje de explantes con brotes



(b) Índice organogénico



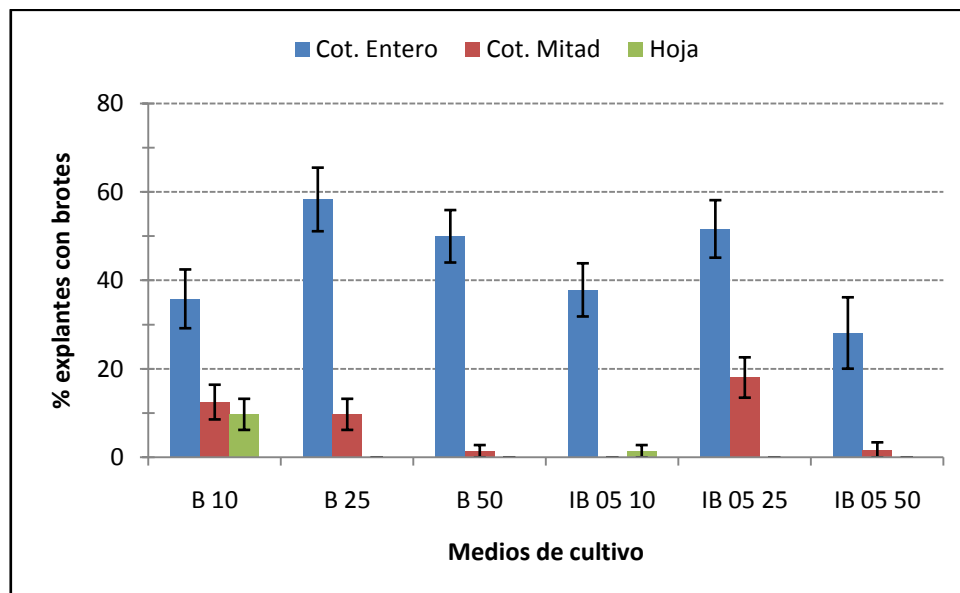
Nota: los explantes de cotiledón (cot. entero en la figura) se obtuvieron eliminando la parte proximal (i.e. la más cercana al ápice) y distal de los cotiledones de plántulas de 4 días. Los explantes de cotiledón cortados (cot. mitad en la figura) se obtuvieron eliminando primero las partes proximal y distal y, luego, cortando transversalmente cada cotiledón. Los segmentos de hoja procedían de plantas axénicas cultivadas en medio MB3 (Moreno et al., 1985) durante 20-25 días. Se utilizaron las dos primeras hojas expandidas de cada planta cortando la lamina foliar en segmentos de unos 0,7-0,8 cm<sup>2</sup>. La primera variable alude a la frecuencia de explantes que desarrollan brotes  $\pm$  el error estándar asociado a la frecuencia (figura 1a). El índice organogénico trata de estimar la magnitud de la respuesta organogénica asignando a cada callo un valor de 0 a 3 en función de la extensión o número de estructuras organizadas (yemas adventicias o brotes). En la figura 1b se muestra el valor medio del índice organogénico  $\pm$  el error estándar. Los medios de cultivo son modificaciones del MB3 con los siguientes reguladores del crecimiento: B 10 (1 mg/l de 6-BA), B 25 (2,5 mg/l de 6-BA), B 50 (5 mg/l de 6-BA), IB 05 10 (0,5 mg/l de IAA + 1 mg/l de 6-BA), IB 05 25 (0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA), IB 05 50 (0,5 mg/l de IAA + 5 mg/l de 6-BA).



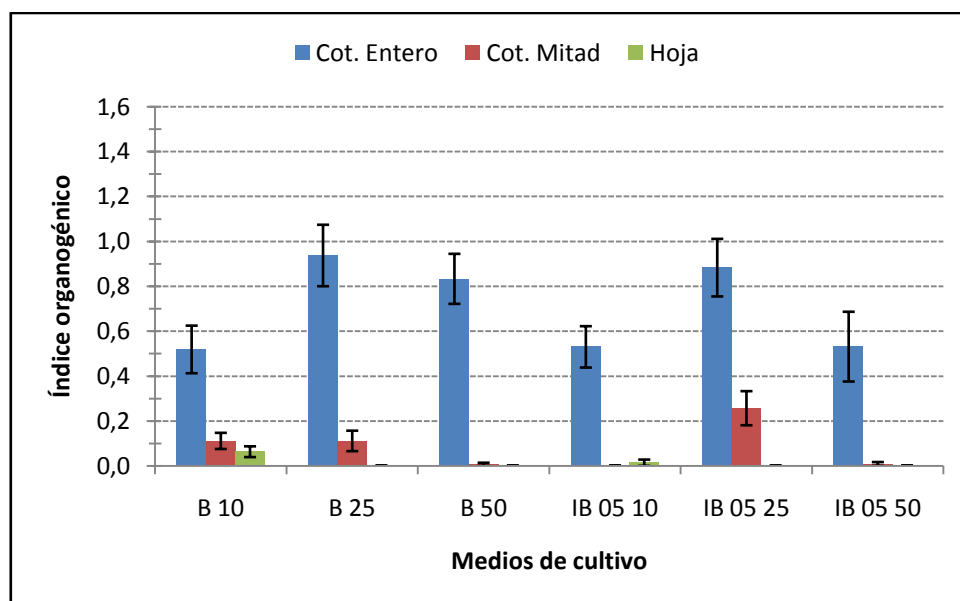
**Figura 2.** Organogénesis a partir de explantes de cotiledón procedentes de plántulas de 4 días de la línea 'Wisconsin 2843'. (a) Explantes tras 3 semanas de cultivo en medio IB 05 25; (b) y (c) Detalle del crecimiento y organogénesis en diversos explantes; (d) Plantas regeneradas tras 2 semanas en el medio de elongación K02.

**Figura 3.** Efecto del tipo de explante y del medio de cultivo sobre la respuesta morfogénica del cultivar 'Marketer'.

(a) Porcentaje de explantes con brotes



(b) Índice organogénico

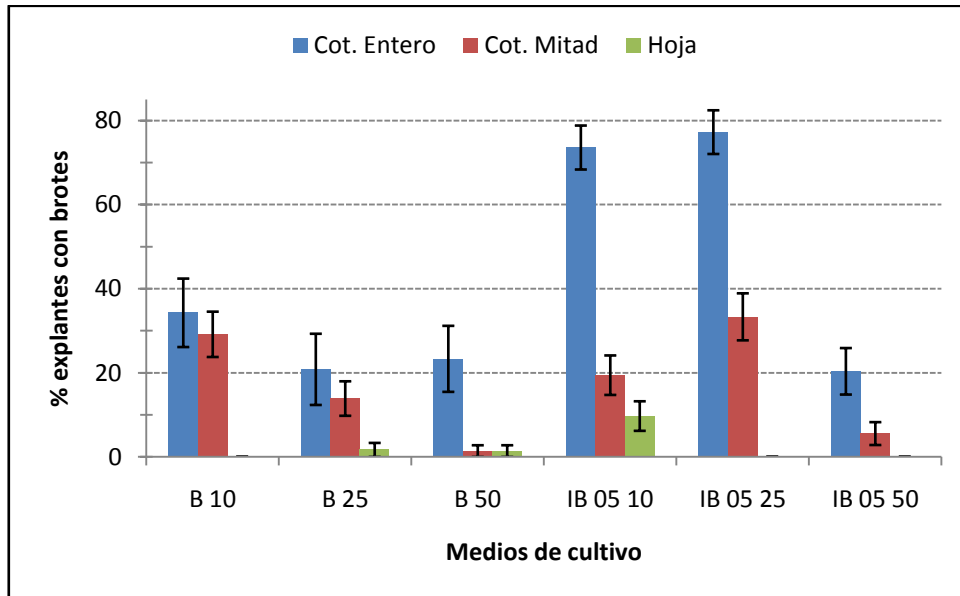


Nota: ver comentarios sobre el diseño experimental y las variables en el pie de la figura 1.

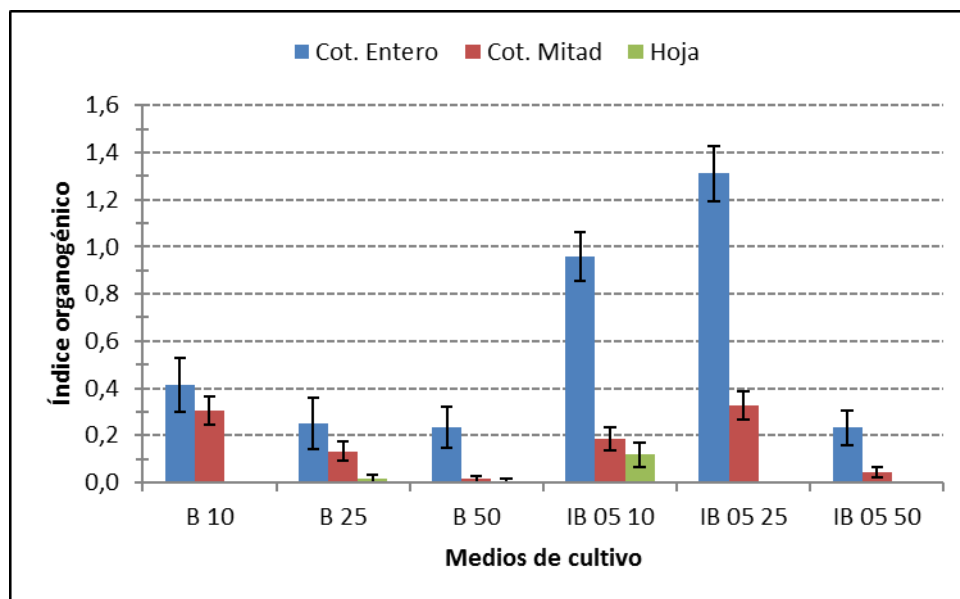


**Figura 4.** Efecto del tipo de explante y del medio de cultivo sobre la respuesta morfogénica del cultivar 'Negrito'.

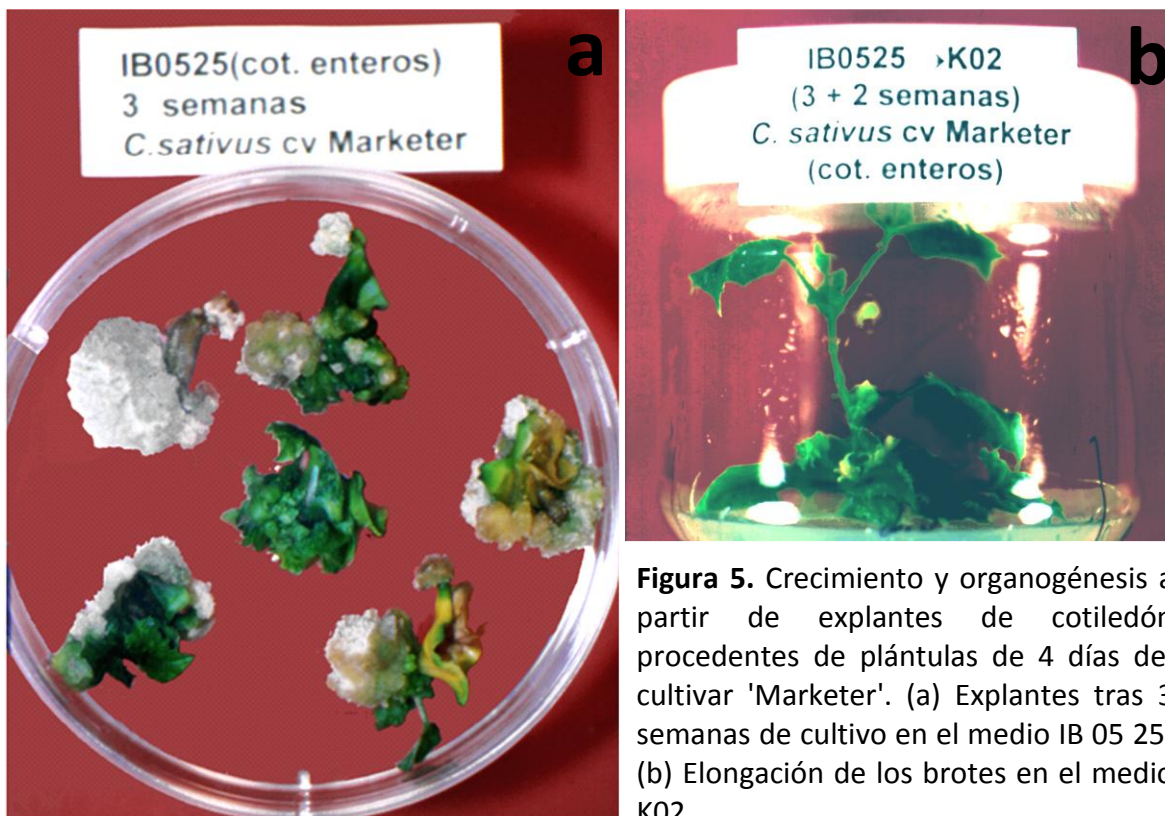
(a) Porcentaje de explantes con brotes



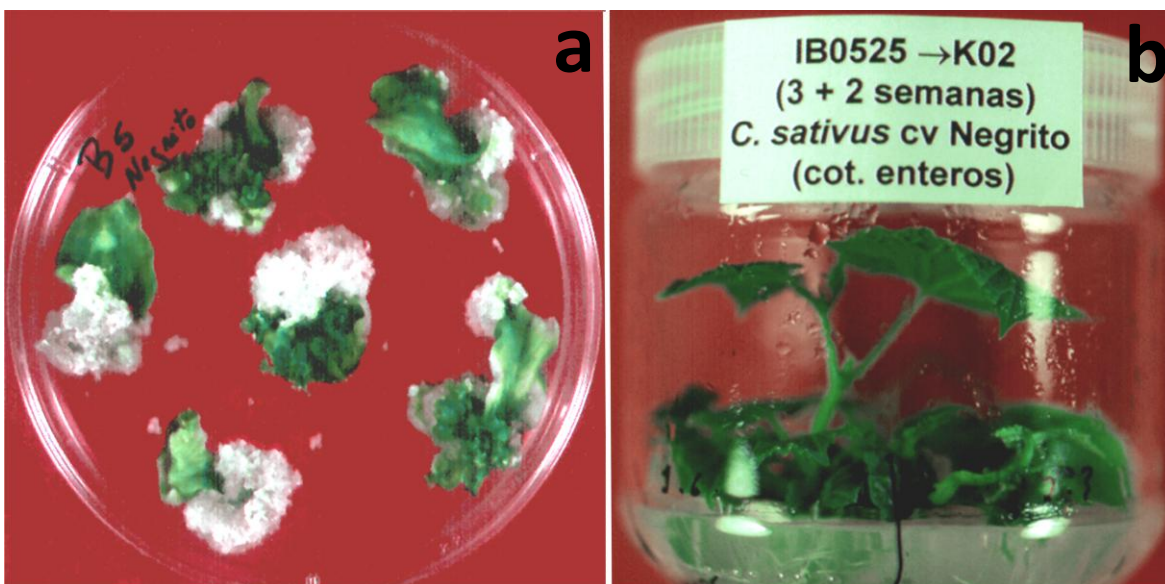
(b) Índice organogénico



Nota: ver comentarios sobre el diseño experimental y las variables en el pie de la figura 1.



**Figura 5.** Crecimiento y organogénesis a partir de explantes de cotiledón procedentes de plántulas de 4 días del cultivar 'Marketer'. (a) Explantes tras 3 semanas de cultivo en el medio IB 05 25; (b) Elongación de los brotes en el medio K02.



**Figura 6.** Organogénesis en explantes de cotiledón de plántulas de 4 días del cultivar 'Negrito'. (a) Explantes tras 3 semanas de cultivo en el medio IB 05 25; (b) Plantas regeneradas tras 2 semanas en el medio de elongación K02.

### **1.1.2. Efecto del medio de cultivo sobre la respuesta morfogénica de cuatro líneas puras**

Tal y como se comentará de forma más amplia en el apartado de 'Discusión', antes de iniciar este proyecto de investigación, uno de los objetivos que nos planteamos fue estimar la heredabilidad en sentido amplio de la respuesta organogénica en pepino.

Para ello solicitamos algunas líneas puras a la empresa de semillas Fitó. Lo que esperábamos (o pretendíamos) era encontrar dos líneas puras con importantes diferencias en la respuesta organogénica, es decir una de alta o muy alta respuesta y otra de baja o muy baja respuesta, para, tras el cruce entre ambas, obtener la  $F_1$  y la  $F_2$ , así como los retrocruces respectivos ( $BC_1$  y  $BC_2$ ). De esta forma, podríamos hacer una estima de la heredabilidad del carácter y, a ser posible, del número de genes principales o genes mayores que intervienen en la respuesta morfogénica.

Como es lógico, la empresa no nos dio ninguna información concreta sobre el origen o las características de las cuatro líneas puras que nos cedió, lo que resulta perfectamente comprensible porque éste es uno de los secretos mejor guardados por las compañías de semillas que se dedican a la obtención y comercialización de híbridos  $F_1$ . No obstante, lo que sí nos indicó uno de los investigadores de dicha empresa es que, en función de su procedencia, cabía esperar importantes diferencias entre las líneas puras.

Procedimos por tanto a evaluar la respuesta de los explantes de las cuatro líneas puras en los seis medios de cultivo que habíamos empleado en el experimento anterior. El diseño experimental fue el mismo, con la salvedad de que, en función de los resultados de dicho experimento, en este caso solo utilizamos segmentos de cotiledón enteros.

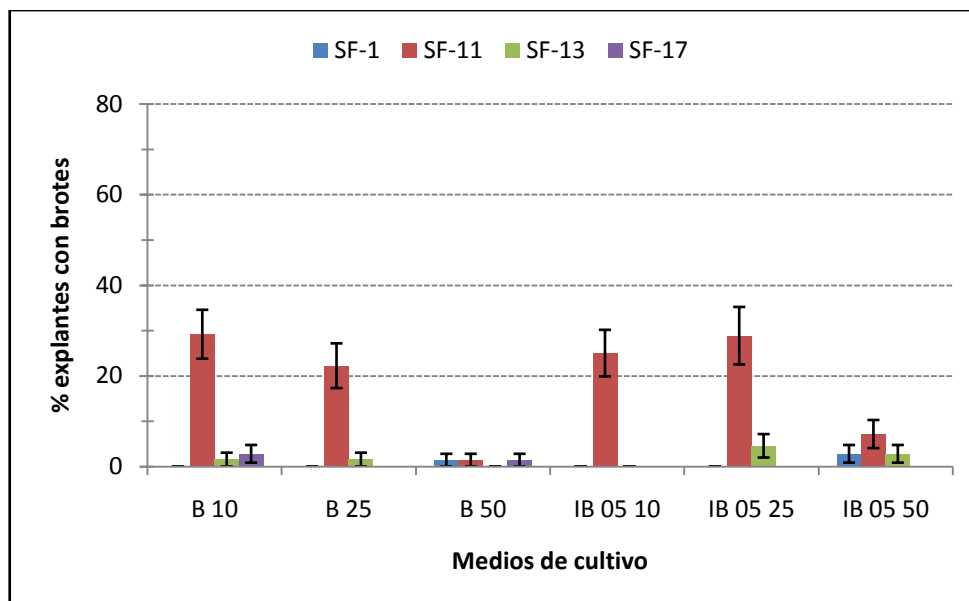
Los resultados que se muestran en la figura 7 indican que en los explantes de 3 líneas puras (las que la empresa nos había suministrado con los códigos SF-1, SF-13 y SF-17) la respuesta organogénica fue muy baja, ya que en el mejor de los casos el porcentaje de explantes con yemas o brotes no llegó ni siquiera al 5% (en general, oscilaba entre 0% y 3% (Figura 7a).

Por paradójico que pueda parecer, estos resultados eran positivos para nosotros ya que necesitábamos al menos una línea pura de muy baja respuesta a fin de poder estimar la heredabilidad. El problema es que, para conseguirlo, necesitábamos otra línea pura de alta respuesta. Por desgracia, la cuarta línea pura (la que la empresa nos había suministrado con el código SF-11) tenía una respuesta de tipo intermedio. En efecto, el porcentaje de callos con yemas y brotes en los explantes de esta línea solo llegó al 30% en algunos medios de cultivo.

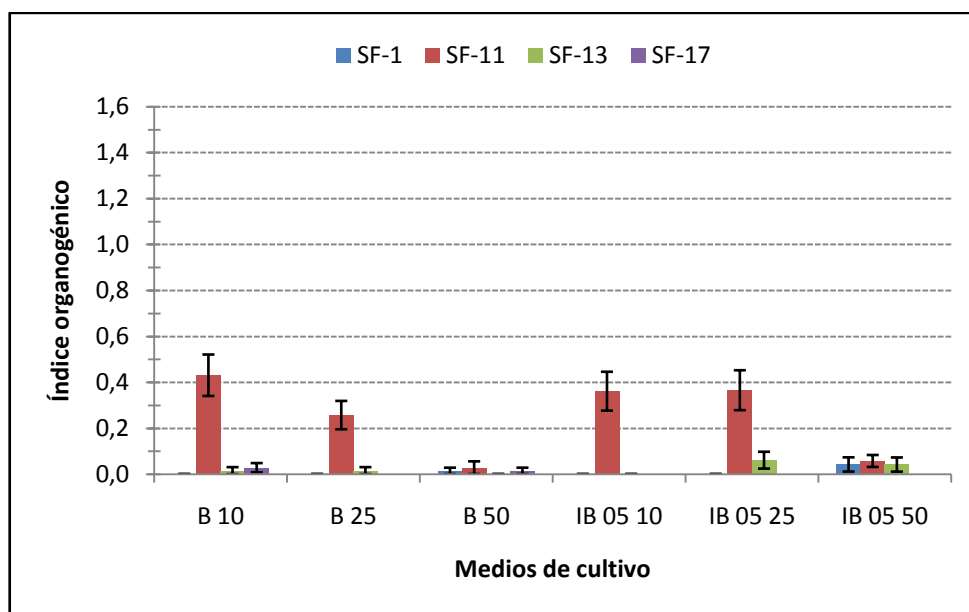
Así pues, en función de los resultados obtenidos, abandonamos nuestra pretensión inicial de estimar la heredabilidad y el número de genes implicados en la respuesta morfogénica en explantes de pepino.

**Figura 7.** Respuesta organogénica en explantes de cuatro líneas puras de pepino.

(a) Porcentaje de explantes con brotes



(b) Índice organogénico



Nota: el diseño experimental es el mismo que el indicado en la figura 1, con la salvedad de que en este caso utilizamos un único tipo explante (segmentos de cotiledón enteros). Se han mantenido los códigos de las líneas puras (SF-1, SF-11, SF-13 y SF-17) cedidas por la empresa Semillas Fitó.

### 1.1.3. Efecto del sulfato de cobre en la respuesta organogénica de explantes de tres cultivares de pepino

El cobre es un micronutriente y por tanto se suministra en los medios de cultivo de las células vegetales a concentraciones muy bajas. Por ejemplo, en la solución mineral de Murashige y Skoog (1962) este ion metálico se añade en forma de sulfato de cobre a una concentración de 0,025 mg/l. Con todo, al realizar un estudio sobre el efecto de distintas concentraciones de los elementos minerales que aparecen en forma de micronutrientes en la solución de Murashige y Skoog (1962), García-Sogo (1990) comprobó que la adición al medio de cultivo de concentraciones inusualmente elevadas de sulfato de cobre (desde 0,1 hasta 10 mg/l) producía un notable incremento de la respuesta organogénica en callos de melón procedentes tanto de explantes como de protoplastos. Lo sorprendente es que el efecto positivo del cobre se producía a concentraciones muy elevadas, entre 4 y 400 veces superiores a la concentración de la solución mineral MS (Murashige y Skoog, 1962).

Decidimos por tanto evaluar el efecto del cobre en la respuesta organogénica de explantes de pepino. Para ello, se procedió al cultivo de segmentos de cotiledón enteros de los tres cultivares antes mencionados ('Wisconsin 2843', 'Marketer' y 'Negrito') en un medio MB3 (Moreno et al., 1985) con 0,5 mg/l de ácido indolacético y 2,5 mg/l de 6-benciladenina. Se suplementó este medio con tres concentraciones de sulfato de cobre (0,2 mg/l, 1 mg/l y 5 mg/l) y como referencia se empleó el mismo medio con la concentración habitual de la solución MS (0,025 mg/l). Al respecto, conviene señalar que en las figuras este medio aparece como Cu (0) porque se trata del medio de referencia o control, aunque realmente tiene la cantidad de sulfato de cobre antes indicada.

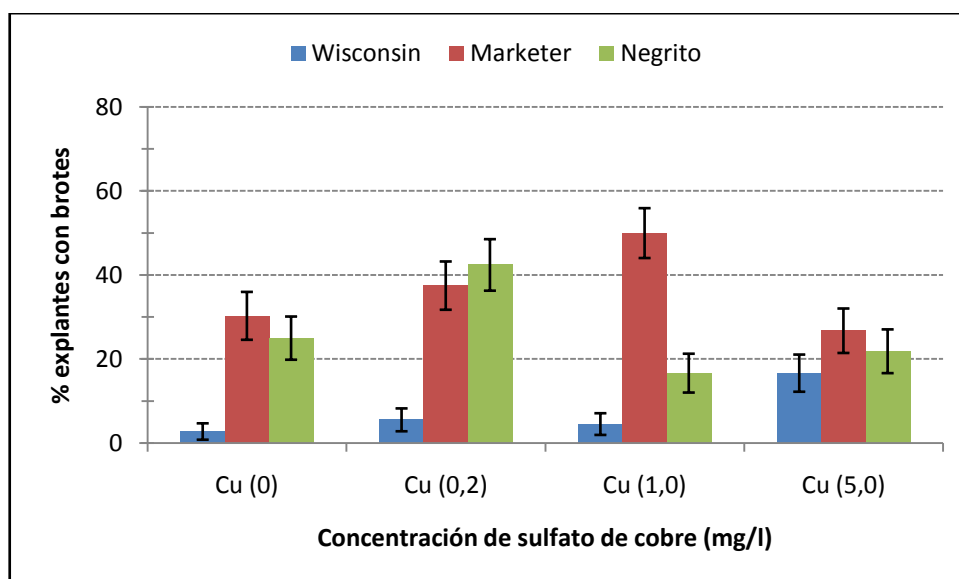
En general, el porcentaje de callos con brotes y el índice organogénico tienden a aumentar con la adición de sulfato de cobre al medio de cultivo, aunque en cada cultivar la concentración óptima parece ser distinta (Figura 8). En el caso del cultivar 'Marketer' los mejores resultados se obtienen en un medio con 1 mg/l de sulfato de cobre. En cambio, en el cultivar 'Negrito' la mayor respuesta se produce cuando el medio se suplementa con 0,2 mg/l. En el cultivar de menor respuesta organogénica ('Wisconsin 2843') el efecto del cobre es beneficioso pero solo cuando se emplea a mayor concentración (5 mg/l).

En conjunto, los resultados indican que la adición de altas concentraciones de sulfato de cobre al medio de cultivo resulta beneficiosa para la respuesta organogénica en pepino. A pesar de ello, en términos cuantitativos, los resultados no son favorables como los que se obtienen en melón (García-Sogo, 1990).

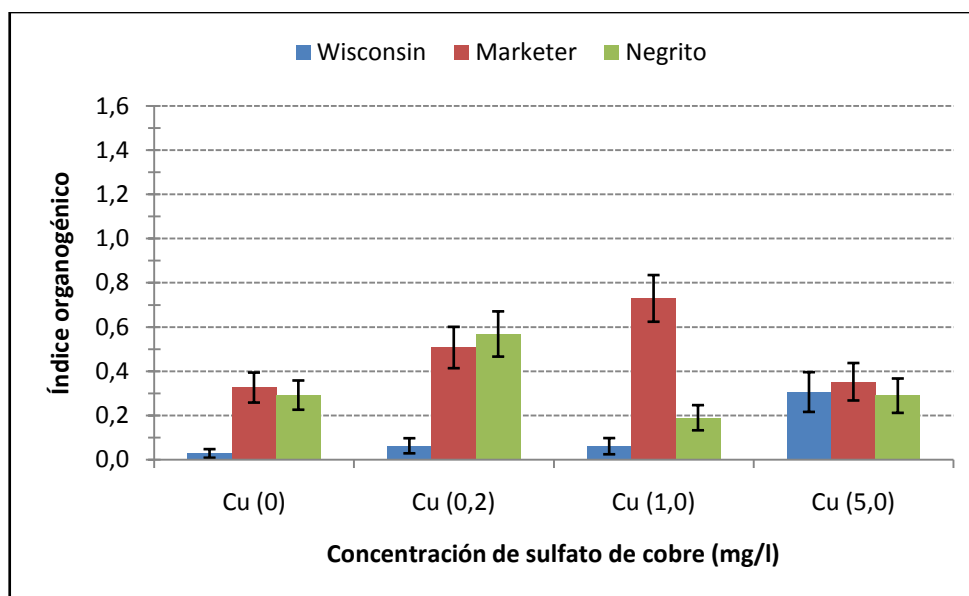
Lo que sí resulta destacable en el caso de los explantes de pepino es que el grado de desarrollo de los primordios de brotes, es decir, la calidad de la respuesta organogénica, aumenta con la adición de sulfato de cobre al medio de cultivo.

**Figura 8.** Efecto del sulfato de cobre en la respuesta morfológica.

(a) Porcentaje de explantes con brotes



(b) Índice organogénico



Nota: se cultivaron segmentos de cotiledón enteros de los cultivares 'Wisconsin 2843', 'Marketer' y 'Negrito' en un medio MB3 (Moreno et al., 1985) con 0,5 mg/l de ácido indolacético y 2,5 mg/l de 6-benciladenina. Se suplementó el medio con tres concentraciones de sulfato de cobre: 0,2 mg/l [Cu (0,2)], 1 mg/l [Cu (1,0)] y 5 mg/l [Cu (5,0)]. Como referencia se empleó el mismo medio con la concentración de la solución MS (0,025 mg/l). Conviene aclarar que en la figura este medio aparece como [Cu (0)].

#### **1.1.4. Efecto de las condiciones de incubación sobre la respuesta organogénica en explantes de pepino**

Al igual que hacemos en nuestro laboratorio, la mayor parte de autores opta por incubar los explantes de pepino en una cámara con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad. A pesar de ello, algunos investigadores (Chee, 1990a; Punja et al., 1990; Raharjo y Punja, 1992) han defendido el uso de una incubación previa en condiciones de oscuridad. Según estos autores, para conseguir la máxima respuesta organogénica en pepino, conviene cultivar los explantes durante 1 a 3 semanas en oscuridad y, a partir de ahí, transferir los recipientes a una cámara con fotoperiodo o, alternativamente, subcultivar los callos al mismo medio de cultivo e incubar en condiciones de fotoperiodo.

Para comprobar el posible efecto beneficioso del cultivo previo en oscuridad, realizamos un experimento en el que empleamos distintas condiciones de incubación para el cultivo de explantes de cotiledón de los tres cultivares ('Wisconsin 2843', 'Marketer' y 'Negrito').

En concreto, se utilizaron las siguientes condiciones de incubación: 4 semanas con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad (testigo), 1 semana en oscuridad y tres con el mismo fotoperiodo o dos semanas en oscuridad y 2 con fotoperiodo. En todos los casos, el cultivo de los explantes se llevó a cabo en un medio MB3 (Moreno et al., 1985) con 0,5 mg/l de ácido indolacético y 2,5 mg/l de 6-benciladenina

Por lo que se refiere a la duración del periodo previo de incubación en oscuridad (una o dos semanas), no observamos diferencias en la respuesta morfogénica (Figura 9). En cambio, cuando se comparan los resultados de la incubación en fotoperiodo con respecto a los obtenidos cuando se hace un cultivo previo en oscuridad, la conclusión es evidente: la respuesta morfogénica es mucho menor en el segundo caso que en el primero. Los resultados no dependen del genotipo de partida, ya que se observa lo mismo en los tres cultivares (Figura 9).

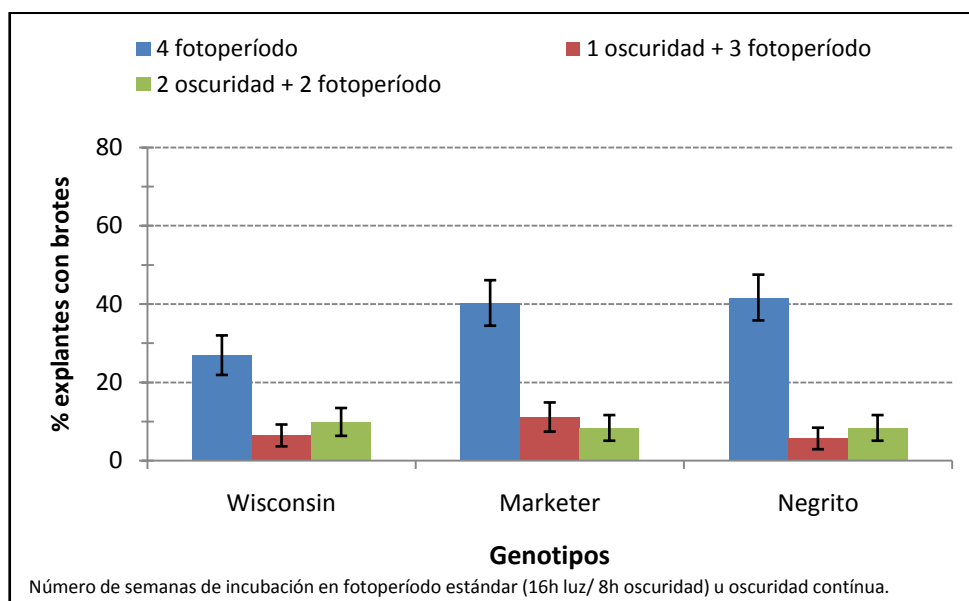
Selvaraj et al. (2007) hicieron un estudio similar al nuestro, aunque ellos emplearon distintos cultivares y un medio de cultivo diferente. A pesar de las diferencias en las condiciones experimentales, sus resultados fueron idénticos a los nuestros: el cultivo de los explantes en oscuridad durante 2 o 3 semanas disminuía notablemente la respuesta morfogénica.



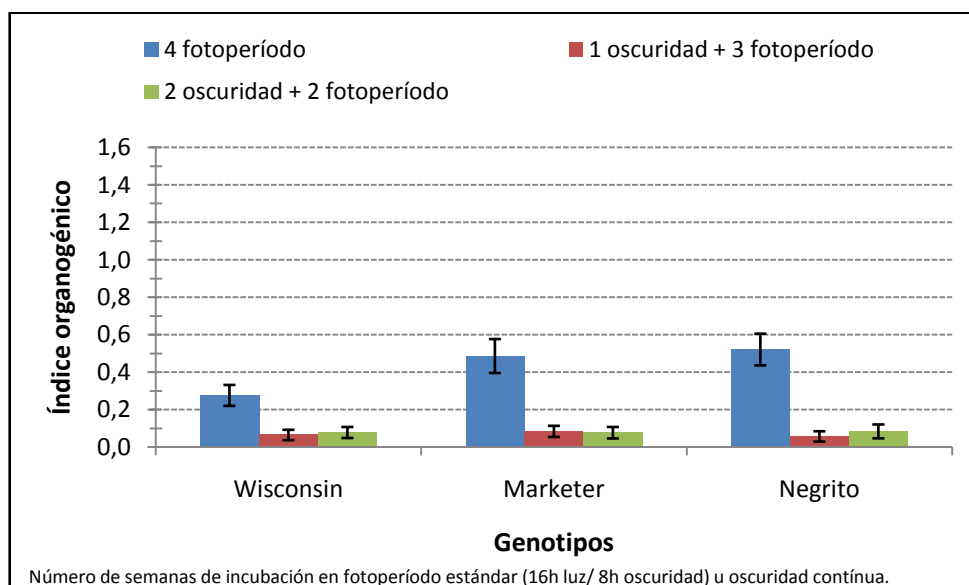
Así pues, a partir de aquí decidimos seguir utilizando las condiciones habituales de incubación (i.e. fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad) desde el inicio del cultivo de los explantes de pepino.

**Figura 9.** Efecto de las condiciones de incubación en la respuesta de explantes de pepino.

(a) Porcentaje de explantes con brotes



(b) Índice organogénico



Nota: se cultivaron segmentos de cotiledón enteros de 'Wisconsin 2843', 'Marketer' y 'Negrito' en un medio MB3 (Moreno et al., 1985) con 0,5 mg/l de IAA y 2,5 mg/l de 6-BA. Se utilizaron las siguientes condiciones de incubación: 4 semanas con fotoperiodo (16 horas luz /

8 horas oscuridad), 1 semana en oscuridad y tres con fotoperiodo o dos semanas en oscuridad y 2 con fotoperiodo.

#### **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**

Para evaluar la influencia del estado ontogénico del material de partida sobre la respuesta morfogénica, se cultivaron explantes de cotiledón enteros de plántulas de 4, 7 y 10 días en el medio IB 05 25 (medio MB3 suplementado con 0,5 mg/l de ácido indolacético y 2,5 mg/l de 6-benciladenina). El estudio se llevó a cabo con explantes de los tres cultivares ('Wisconsin 2843', 'Marketer' y 'Negrito') y la respuesta morfogénica se evaluó con las variables habituales (porcentaje de explantes con brotes e índice organogénico).

Como puede verse en la Figura 10, en los cultivares 'Wisconsin 2843' y 'Negrito' no se aprecian diferencias en la respuesta morfogénica en explantes procedentes de plántulas de 4 y 7 días (28-30% en Wisconsin y 40-44% en Negrito). En cambio, la respuesta morfogénica desciende notablemente cuando se utilizan explantes de plántulas de 10 días (5% en Wisconsin y 23% en Negrito). En el caso del cultivar 'Marketer' la respuesta va disminuyendo (desde el 50% hasta el 37%) a medida que aumenta la edad de la plántula. En conjunto, los resultados de este estudio indican que la respuesta morfogénica tiende a disminuir en estados ontogénicos más tardíos.

La edad de la plántula no solo afecta a la respuesta morfogénica, sino que también determina el grado de mixoploidía en los explantes de cotiledón. En efecto, tras la germinación, se inicia el proceso de endoreduplicación en las células de los cotiledones, lo que determina la aparición de núcleos con mayores niveles de ploidía.

La duplicación espontánea en las células del callo que se origina a partir del explante puede llevar a la regeneración de plantas tetraploides o con mayor nivel de ploidía. Asimismo, el hecho de que las plantas tengan una estructura polisomática y que, salvo en las células de la línea germinal, haya un cierto grado de endoreduplicación, lo que

conduce a la formación de tejidos u órganos mixoploides, puede ser otra de las causas que determinan la regeneración de plantas con mayores niveles de ploidía.

Nuestros resultados previos con cucurbitáceas (García-Sogo, 1990; Ellul, 2002) indicaron que en los cotiledones de las plántulas la tasa de endoreduplicación aumenta con la edad de la planta, alcanzando el máximo cuando se produce la expansión de los cotiledones. En cualquier caso, dentro de una especie, se observan diferencias entre genotipos y por tanto procedimos a analizar el grado de mixoploidía o la distribución de núcleos (2C, 4C, 8C, 16C) en cotiledones de los tres cultivares de pepino empleados en este trabajo ('Wisconsin 2843', 'Marketer' y 'Negrito'), así como el nivel de ploidía de una muestra de las plantas regeneradas a partir de segmentos de cotiledón.

El estudio mediante citometría de flujo con un analizador de ploidía Partec indicó que, con independencia de la edad de la planta, los cotiledones de los tres cultivares son mixoploides. En 'Wisconsin 2843' la frecuencia de núcleos 2C disminuye ligeramente con la edad de la plántula (desde el 32% hasta el 28%) (Figura 11), mientras que en 'Marketer' y 'Negrito' se mantiene más o menos en torno al 25% (Figuras 12 y 13, respectivamente).

Por lo que respecta a la edad de la planta, las diferencias no son importantes, lo que era de esperar porque en este estudio no llegamos a utilizar plántulas de mayor edad con los cotiledones totalmente expandidos. Decidimos hacerlo así porque ya sabíamos que tras el proceso de expansión de los cotiledones la respuesta morfogenética desciende de forma dramática. Por otro lado, en este caso concreto tampoco se aprecian diferencias dignas de mención en los tres cultivares analizados.

Los resultados obtenidos indican que en estas fases del desarrollo ontogénico hay un elevado número de células con núcleos 4C e incluso 8C en los segmentos de cotiledón (Figuras 11-13). En cualquier caso, conviene aclarar que el número de núcleos 2C, 4C y 8C no equivale al número de células diploides, tetraploides y octoploides. Ello se debe a que, por ejemplo, una parte de los núcleos 4C se corresponde con células tetraploides en fase G1, pero la otra parte se corresponde con células diploides que acaban de culminar la fase S o que están en la fase G2 del ciclo celular. Así pues, el porcentaje de núcleos 2C, 4C y 8C da una idea de la distribución de células diploides, tetraploides y octoploides, pero las frecuencias no son exactamente las mismas.

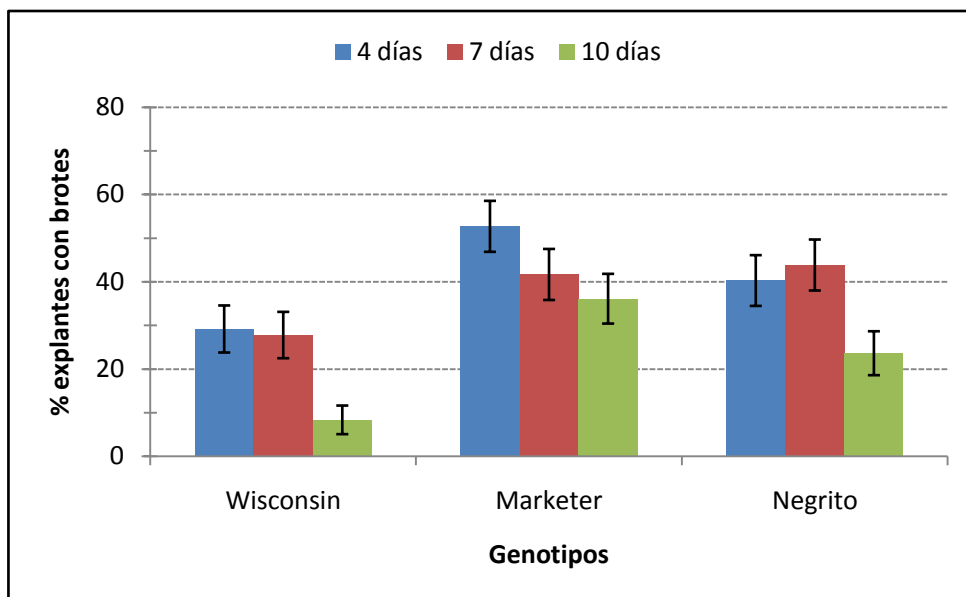
A continuación se analizaron 88 plantas regeneradas (en torno a 10 por cultivar y edad de la planta) a partir de segmentos de cotiledón. Para el análisis en el citómetro utilizamos la segunda hoja (i.e. la primera completamente expandida) de cada planta axénica. Lo hicimos así porque nuestros estudios previos habían indicado que el grado de mixoploidía es prácticamente nulo en la segunda hoja de una planta axénica, a diferencia de lo que ocurre con hojas adultas de una planta cultivada en invernadero, y por tanto refleja el nivel de ploidía de la línea germinal de la planta en cuestión.

Los resultados que se muestran en las Figuras 14-16 hay que interpretarlos con cierta cautela porque, si bien el número total de plantas analizadas (88) es considerable, la muestra o el número de plantas por genotipo y edad de la planta es relativamente escaso (en torno a 10).

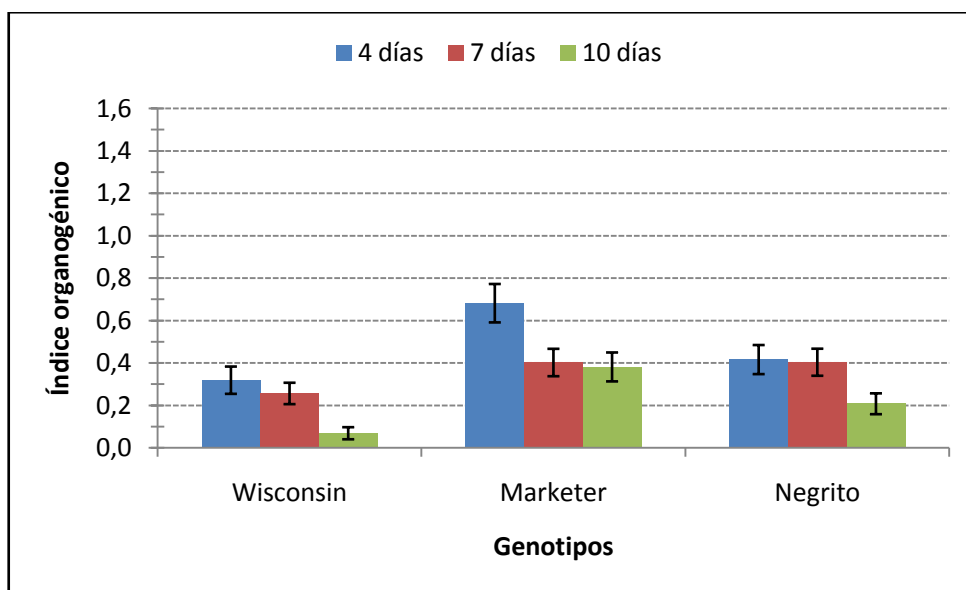
Con todo, los resultados indican que la frecuencia de plantas diploides generalmente disminuye con la edad de la plántula. Este resultado era previsible porque coincide con nuestras observaciones previas. Lo que no esperábamos es que en los cultivares 'Marketer' y 'Negrito' la frecuencia de plantas diploides fuera tan baja, incluso cuando se utilizan segmentos de cotiledón de plántulas de 4 días (22 % y 30 %, respectivamente).

**Figura 10.** Efecto de la edad de la plántula a partir de la que se extraen los explantes de cotiledón sobre la respuesta morfogénica.

(a) Porcentaje de explantes con brotes

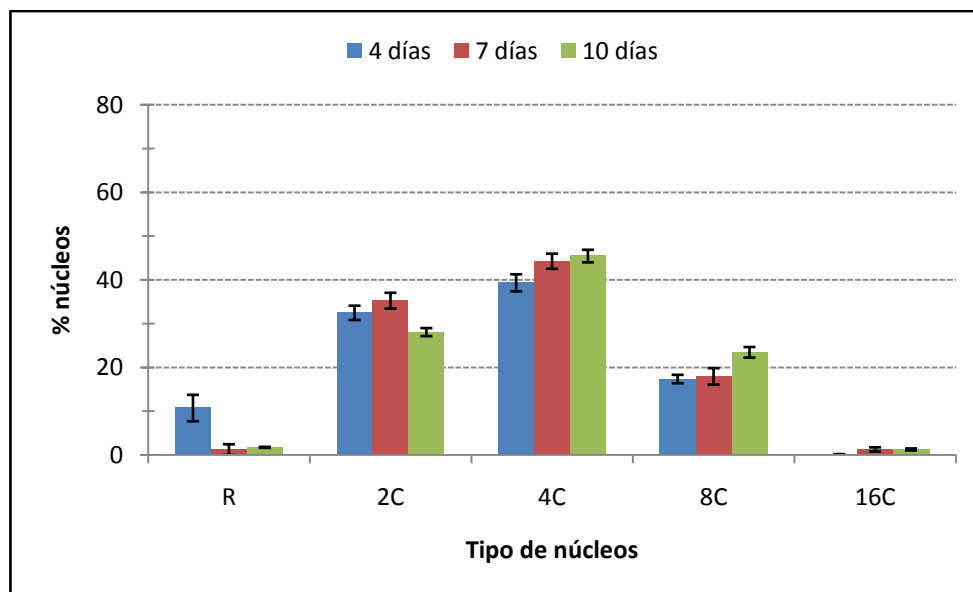


(b) Índice organogénico



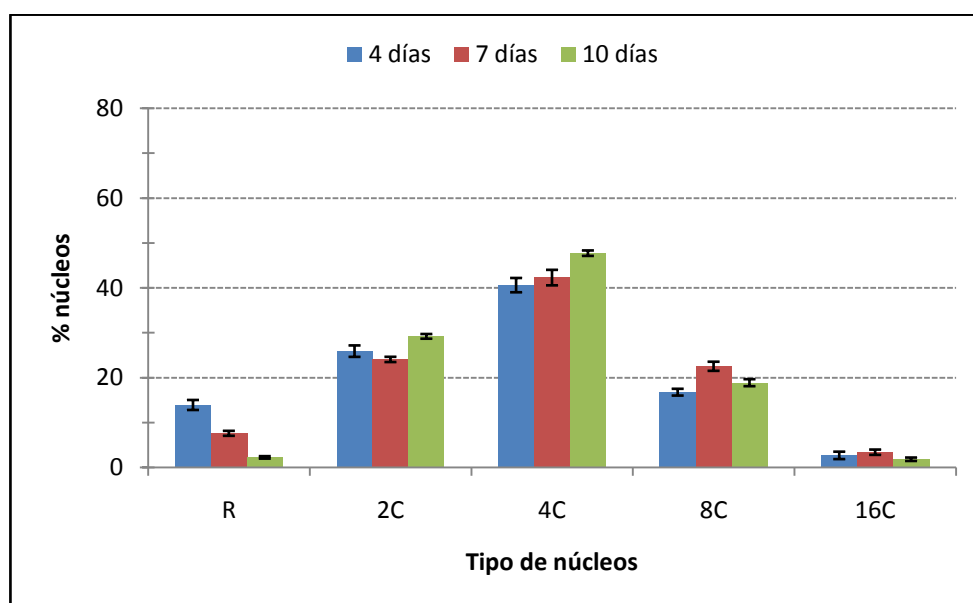
Nota: se cultivaron segmentos de cotiledón enteros de plántulas de 4, 7 y 10 días de los cultivares 'Wisconsin 2843', 'Marketer' y 'Negrito'. El cultivo se realizó en medio IB 05 25 (MB3 suplementado con 0,5 mg/l de IAA y 2,5 mg/l de 6-BA) y la incubación se llevó a cabo en una cámara con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad.

**Figura 11.** Efecto de la edad de la plántula sobre el grado de endorreducción<sup>(1)</sup> en los núcleos de las células de los explantes de cotiledón de la línea 'Wisconsin 2843'.



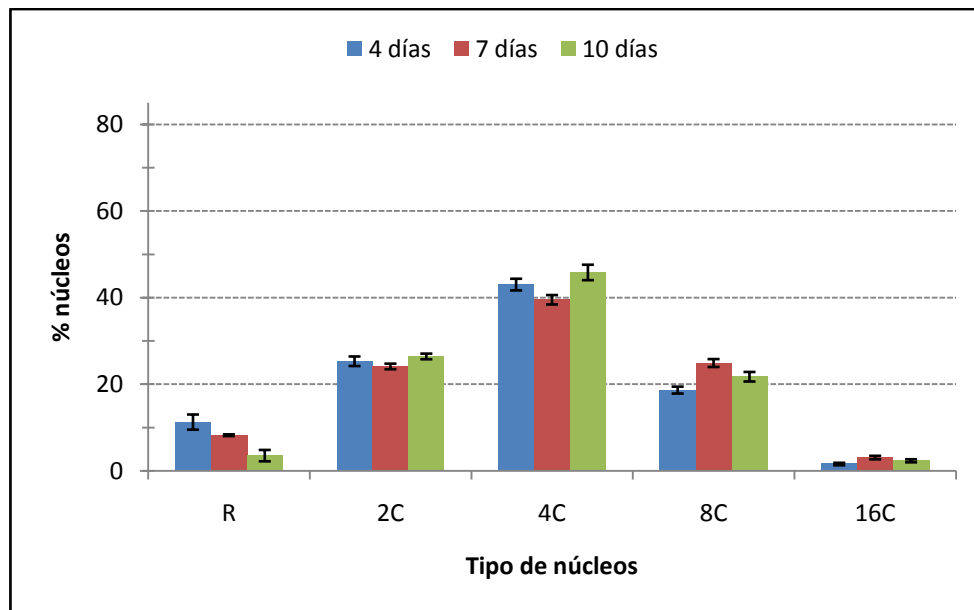
<sup>(1)</sup> Cuantificación del contenido de ADN nuclear de células de cotiledón (citometría de flujo). Los datos reflejan el porcentaje de núcleos de cada tipo (2C, 4C, 8C, 16C)  $\pm$  el error estándar asociado a la frecuencia. R = residual en el histograma obtenido en el analizador Partec que surge como consecuencia de la ruptura de algunos núcleos.

**Figura 12.** Efecto de la edad de la plántula sobre el grado de endorreducción<sup>(1)</sup> en los núcleos de las células de los explantes de cotiledón del cultivar 'Marketer'.



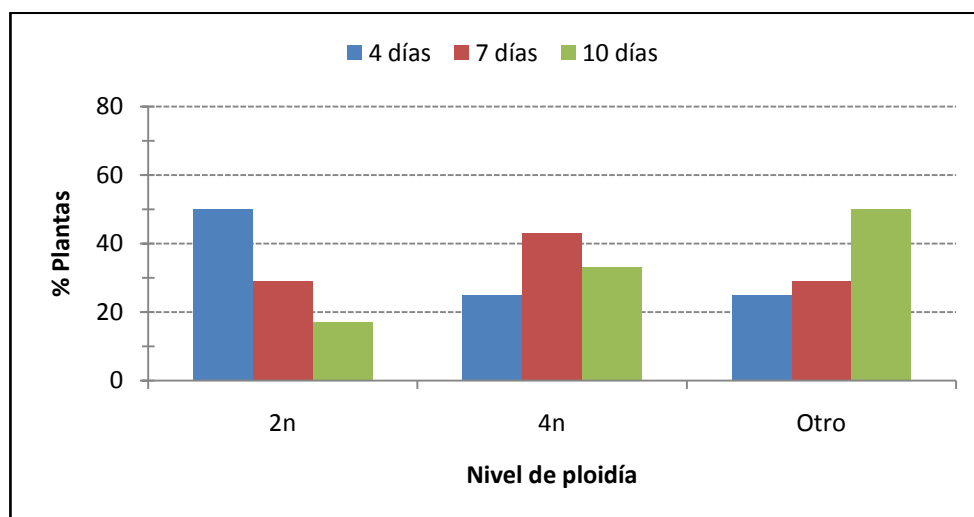
<sup>(1)</sup> Cuantificación del contenido de ADN nuclear de células de cotiledón (citometría de flujo). Los datos reflejan el porcentaje de núcleos de cada tipo (2C, 4C, 8C, 16C)  $\pm$  el error estándar asociado a la frecuencia. R = residual en el histograma obtenido en el analizador Partec que surge como consecuencia de la ruptura de algunos núcleos.

**Figura 13.** Efecto de la edad de la plántula sobre el grado de endorreducción<sup>(1)</sup> en los núcleos de las células de los explantes de cotiledón del cultivar 'Negrito'.



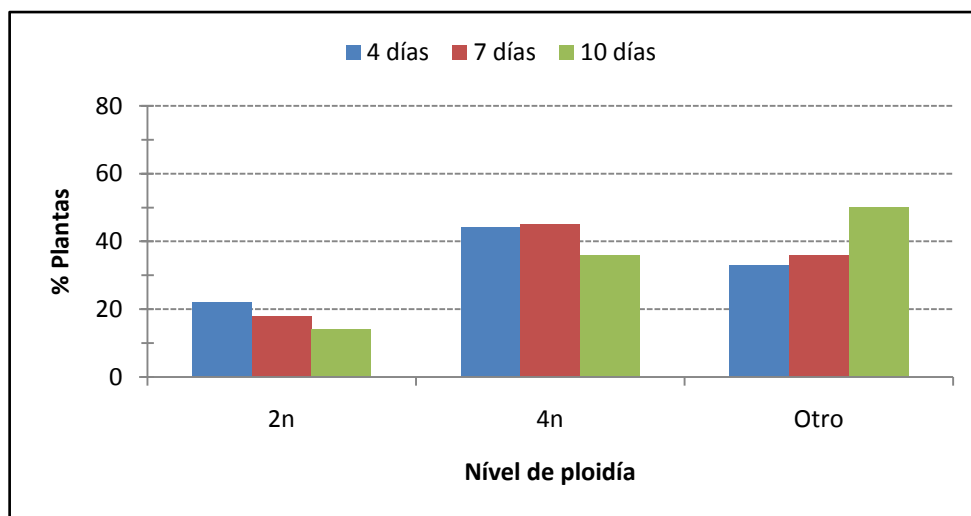
<sup>(1)</sup> Cuantificación del contenido de ADN nuclear de células de cotiledón (citometría de flujo). Los datos reflejan el porcentaje de núcleos de cada tipo (2C, 4C, 8C, 16C)  $\pm$  el error estándar asociado a la frecuencia. R = residual en el histograma obtenido en el analizador Partec que surge como consecuencia de la ruptura de algunos núcleos.

**Figura 14.** Efecto de la edad de la plántula sobre el nivel de ploidía<sup>(1)</sup> de las plantas regeneradas a partir de segmentos de cotiledón de la línea 'Wisconsin 2843'.



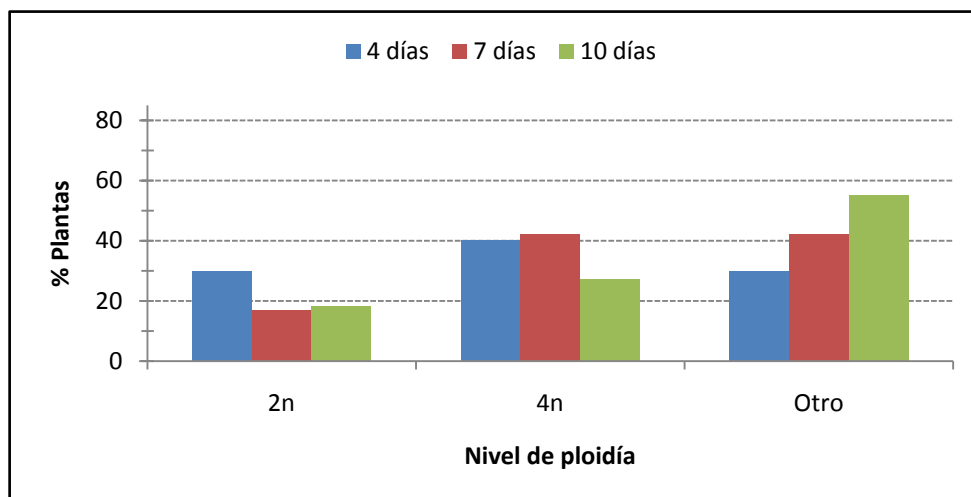
<sup>(1)</sup> El nivel de ploidía de cada planta se estimó sobre la base del análisis del contenido de ADN nuclear en células de hojas jóvenes (citometría de flujo). Se indica el porcentaje de plantas diploides (2n), tetraploides (4n) o con otro nivel de ploidía.

**Figura 15.** Efecto de la edad de la plántula sobre el nivel de ploidía <sup>(1)</sup> de las plantas regeneradas a partir de segmentos de cotiledón del cultivar 'Marketer'.



<sup>(1)</sup> El nivel de ploidía de cada planta se estimó sobre la base del análisis del contenido de ADN nuclear en células de hojas jóvenes (citometría de flujo). Se indica el porcentaje de plantas diploides (2n), tetraploides (4n) o con otro nivel de ploidía.

**Figura 16.** Efecto de la edad de la plántula sobre el nivel de ploidía <sup>(1)</sup> de las plantas regeneradas a partir de segmentos de cotiledón del cv. 'Negrito'.



<sup>(1)</sup> El nivel de ploidía de cada planta se estimó sobre la base del análisis del contenido de ADN nuclear en células de hojas jóvenes (citometría de flujo). Se indica el porcentaje de plantas diploides (2n), tetraploides (4n) o con otro nivel de ploidía.



### 1.1.6. Efecto del nitrato de plata sobre la respuesta organogénica de los explantes de cotiledón

Se ha descrito que la adición de nitrato de plata al medio de cultivo (desde 0,2 hasta 8,5 mg/l) aumenta la respuesta morfogénica en explantes de cotiledón de algunos cultivares de pepino (Mohiuddin et al., 1997, 2005). De forma similar, la adición de nitrato de plata parece tener un efecto beneficioso sobre la organogénesis en cultivares de especies del género *Brassica* (Palmer, 1992; Eapen y George 1997; Hu et al., 1999), así como en ají (Hyde y Phillips 1996), yuca (Zhang et al., 2001b), rábano (Curtis et al., 2004), girasol (Chraibi et al., 1991), melón (Roustan et al., 1992) y en *Bouteloua dactyloides*, una gramínea silvestre que medra en las grandes praderas de Norteamérica (Fei et al., 2000). La adición de nitrato de plata fue también positiva para la iniciación de callos embriogénicos en arroz y maíz (Adkins et al., 1993; Vain et al., 1989), el desarrollo de embriones somáticos de café (Fuentes et al., 2000), así como en cultivo de anteras de repollo (Achar 2002).

Los efectos beneficiosos del nitrato de plata podrían estar relacionados con su efecto inhibitorio sobre la acción del etileno. En cultivo *in vitro*, los explantes o callos de ciertas especies liberan etileno, lo que provoca su acumulación en los recipientes habituales que tienen un intercambio gaseoso limitado (Chi et al., 1991). Por este motivo, es probable que la acumulación de etileno ocasione una inhibición de la regeneración de brotes (Chraibi et al., 1991) o una alteración del crecimiento y desarrollo del material vegetal (Pua, 1993).

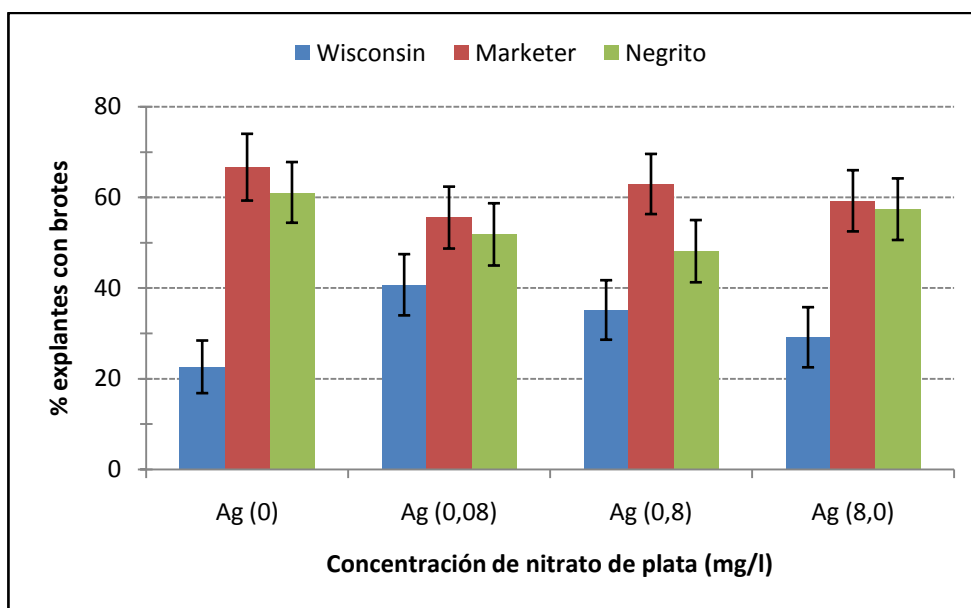
A fin de evaluar el efecto del nitrato de plata sobre la organogénesis en explantes de pepino, cultivamos segmentos de cotiledón de 'Wisconsin 2843', 'Marketer' y 'Negrito' en medio IB 05 25 con diversas concentraciones de nitrato de plata (0, 0,08, 0,8 y 8 mg/l (Tabla 8). La incubación se realizó en fotoperiodo (16 horas luz / 8 horas oscuridad) y la lectura se llevó a cabo a los 35 días de cultivo.

Los resultados indicaron que el efecto del nitrato de plata depende del genotipo (Figura 17). En efecto, en los cultivares 'Marketer' y 'Negrito' no se aprecia un efecto positivo sobre la frecuencia de callos con brotes. Sí se observa un incremento del índice organogénico (que estima la cantidad de estructuras organogénicas por callo) en el medio

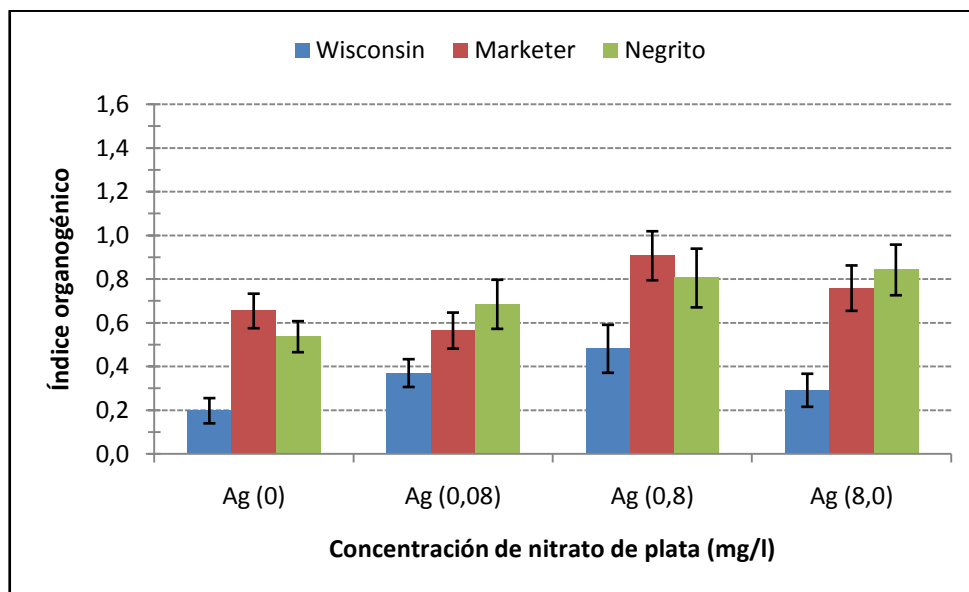
de cultivo con 0,8 mg/l de nitrato de plata; no obstante, si se consideran las dos variables, no se puede concluir un efecto destacable en estos dos cultivares. En cambio, en 'Wisconsin 2843' (que, por comparación, es el cultivar de menor respuesta) se aprecia un aumento tanto del porcentaje de callos con brotes (del 20% al 40%) como del índice organogénico (de 0,2 a 0,4).

**Figura 17.** Efecto del nitrato de plata sobre la respuesta morfogénica de los explantes de cotiledón de pepino.

(a) Porcentaje de explantes con brotes



(b) Índice organogénico



Nota: se cultivaron segmentos de cotiledón enteros de plántulas de 4 días de los cultivares 'Wisconsin 2843', 'Marketer' y 'Negrito'. El cultivo se realizó en medio IB 05 25 al que se le adicionaron las siguientes concentraciones de AgNO<sub>3</sub>: 0, 0,08, 0,8 y 8 mg/l. La incubación se llevó a cabo con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad.

## 1.2. DISCUSIÓN

### 1.2.1. Crecimiento y formación de callo en explantes de pepino

Tal y como se ha comentado en el apartado de 'Resultados', a los pocos días de incubación lo primero que se observa en los explantes de pepino son unas rondas de división celular como consecuencia de la reacción de herida en las zonas de corte del explante. A partir de aquí se inicia una fase de crecimiento que va dando lugar a la formación de un callo desorganizado. Por lo que respecta al empleo de este término (callo 'desorganizado'), conviene hacer una aclaración.

Hasta hace poco se asumía que el proceso de división celular que da lugar a la formación de un callo requiere de una fase previa de des-diferenciación en las células del explante que conduce a una reprogramación en términos epigenéticos. En los primeros años del cultivo *in vitro* se llegó a hablar de la formación de un callo 'indiferenciado'. No obstante, con el tiempo resultó evidente que este término era incorrecto y en su lugar empezó a hablarse de callo 'desorganizado', que es que hemos empleado nosotros en este trabajo.

De esta forma, las células diferenciadas del explante darían lugar a otras que sin llegar a ser de tipo meristemático (i.e. las que conforman el SAM o las yemas axilares) se pueden comportar como células equivalentes, lo que permite, primero, una fase de división activa y, más adelante, un proceso de diferenciación que da lugar al crecimiento organizado, es decir, al desarrollo de yemas adventicias y brotes, en el caso de que la regeneración se produzca vía organogénesis.

Esta percepción tradicional o clásica se ha puesto en cuestión a raíz de la publicación de un artículo del grupo de Elliot Meyerowitz (Sugimoto et al 2010). Los autores analizaron el inicio del proceso de formación de callo a partir de diversos tipos de explantes (raíces, cotiledones y pétalos) de *Arabidopsis thaliana*. Según ellos, las primeras fases del crecimiento son análogas a las que ocurren en el extremo apical de la raíz (RAM), aun cuando los explantes procedan de la parte aérea de la planta. El análisis de genes que supuestamente se expresan de forma específica en células del periciclo de la raíz les llevó a proponer que en los explantes de órganos de la parte aérea hay tipos celulares

equivalentes al periciclo de la raíz. Además, observaron que la formación de callos a partir de explantes de raíz, cotiledones y pétalos estaba suprimida en mutantes de *Arabidopsis* defectivos en el proceso de emisión de raíces laterales. Sobre la base de estos resultados, los autores concluyen que en los órganos de la parte aérea hay células equivalentes al periciclo de la raíz y que en la fase inicial del proceso de formación de callo a partir de explantes de la parte aérea se activa un programa de desarrollo similar o idéntico al que determina la aparición de raíces laterales. Es más, los autores concluyen que la formación de un callo no es un simple proceso de reprogramación hacia un estado indiferenciado como habitualmente se asume.

Sus resultados son verdaderamente interesantes pero la conclusión es discutible ya que se precisarían datos adicionales para sustentar una afirmación tan rotunda. En cualquier caso, nosotros hemos estado utilizando en este trabajo el término crecimiento desorganizado (o callo desorganizado) porque no entra en conflicto ni con los resultados descritos en la publicación antes mencionada ni con lo que se aprecia morfológicamente en las primeras etapas del cultivo de explantes.

### **1.2.2. Influencia del cultivar en la respuesta organogénica**

Sin lugar a dudas, el genotipo es uno de los factores más determinantes en la respuesta morfogénica, y en particular en la diferenciación de yemas adventicias y brotes a través de organogénesis.

Conviene aclarar que en este apartado utilizamos el término 'genotipo' de forma genérica, ya que las diferencias en la respuesta morfogénica no solo afectan a distintas especies, sino también a variedades, cultivares o líneas de una misma especie, e incluso en el caso de alógamas o especies de reproducción vegetativa, a plantas individuales o genotipos concretos de una misma especie.

Es frecuente catalogar a las especies como de 'alta respuesta morfogénica', 'asequibles o de respuesta intermedia', o 'recalcitrantes'. En realidad, el calificativo 'recalcitrante', o el uso del término 'recalcitrancia', tiene poco sentido porque, con el transcurso del tiempo, especies que antes se consideraron como recalcitrantes han pasado a catalogarse

como especies asequibles, o incluso de alta respuesta. Uno de los ejemplos más dramáticos en este sentido es el de las gramíneas.

Hace algunos años, las gramíneas estaban consideradas como especies recalcitrantes en cultivo *in vitro*, tanto desde el punto de vista de la regeneración como en el campo de la transformación genética. Pese a los ímprobos esfuerzos para encontrar unas condiciones culturales adecuadas, los resultados no eran satisfactorios porque casi todos los investigadores utilizaban los mismos tipos de explantes. Con el tiempo se descubrió que en el escutelo de la semilla habían células competentes para la regeneración (Hiei et al., 1994) y, a partir de ahí, cambió todo. En el caso concreto del arroz, el cambio fue dramático porque, tal y como se ha comentado en la 'Introducción', en los últimos años se han obtenido varios cientos de miles de líneas T-DNA aprovechando la competencia para la regeneración de las células del escutelo. De esta manera, el arroz ha pasado de ser una especie recalcitrante a una especie modelo, al menos por lo que se refiere a las monocotiledóneas.

El pepino no está considerada como una especie recalcitrante por lo que se refiere a la respuesta morfogenética *in vitro*; sin embargo, la dificultad para obtener plantas transgénicas, debido principalmente a la alta frecuencia de escapes, explica el que algunos autores la incluyan en esta categoría.

Tal y como han observado otros autores (Wehner y Locy, 1981; Kim et al., 1988; Malepszy, 1988), en el presente trabajo hemos encontrado notables diferencias en la capacidad de regeneración de distintos cultivares comerciales o líneas de pepino. Así, considerando la frecuencia de explantes que diferencian yemas y brotes adventicios, los segmentos de cotiledón enteros del cultivar 'Negrito' tienen mayor respuesta (hasta el 80 %) que los de 'Marketer' (60 %) y mucho mayor que los de 'Wisconsin 2843' (30 -35 %).

No obstante, tal y como se ha comentado en el apartado de 'Resultados' el factor genotipo actúa en interacción con el tipo de explante. Así por ejemplo, mientras que los segmentos de cotiledón enteros del cultivar Negrito tienen una elevada respuesta organogénica, los explantes de hoja tienen una baja respuesta.

### 1.2.3. Respuesta organogénica en explantes de cuatro líneas puras de pepino

La descripción de las diferencias en la respuesta organogénica de distintos cultivares de pepino tiene un interés práctico, ya que permite catalogar los mismos como cultivares de alta, media o baja respuesta, lo que a su vez facilita la elección del material más adecuado para abordar un programa de aprovechamiento de la variación somaclonal, hibridación somática o transformación genética.

No obstante, desde un punto de vista básico, la mera constatación de las diferencias en la capacidad de regeneración, o la simple enumeración de los genotipos de alta, media o baja respuesta, tiene poca utilidad. La influencia del factor 'genotipo' indica que debe haber un componente genético y, en consecuencia, la capacidad de regeneración se puede considerar como cualquier otro carácter, es decir, debe estar influido por el genotipo, el ambiente (i.e. el medio de cultivo, recipiente, condiciones de incubación, etc.) y la interacción genotipo-ambiente.

Así pues, lo que sería deseable es estimar la heredabilidad para tener una idea de la contribución de la variación genética o aditiva con respecto a la variación fenotípica. A partir de ahí, lo ideal sería proceder a la disección genética del carácter para conocer los genes principales (i.e. genes mayores en sentido clásico) que determinan la respuesta morfogenética.

Antes de iniciar este proyecto de investigación, uno de los objetivos que nos planteamos fue estimar la heredabilidad en sentido amplio (i.e.  $H^2 = V_G/V_P$ ) de la respuesta organogénica en explantes pepino. Para ello solicitamos algunas líneas puras a una empresa de semillas (Fitó). Lo que esperábamos era encontrar dos líneas puras extremas, una de alta y otra de baja respuesta organogénica. Si lo lográbamos, utilizaríamos estas líneas puras como parentales para obtener la  $F_1$ , la  $F_2$  y los retrocruces respectivos ( $BC_1$  y  $BC_2$ ), lo que permitiría hacer una estima de la heredabilidad y del número de genes implicados.

Evidentemente, la empresa no nos dio ninguna información sobre el origen de las líneas puras, lo que resulta perfectamente comprensible porque este es uno de los secretos mejor guardados por las compañías de semillas que se dedican a la obtención y comercialización de híbridos  $F_1$ . Lo que sí nos indicó uno de los investigadores de la

empresa fue que, en función de la procedencia de estas líneas, cabía esperar importantes diferencias entre ellas.

Por desgracia, no fue así. Los resultados experimentales indicaron que tres líneas puras (SF-1, SF-13 y SF-17) eran de muy baja o casi nula respuesta morfogénica. Por paradójico que pueda parecer, este resultado era positivo para nosotros, ya que se trataba de líneas puras extremas en cuanto a su baja respuesta. El problema es que la otra línea pura (SF-11) tenía una respuesta intermedia y, en consecuencia, no pudimos abordar el objetivo inicialmente planteado.

#### **1.2.4. Efecto del tipo de explante sobre la respuesta morfogénica**

Se han utilizado diversos explantes para conseguir la regeneración de plantas en pepino vía organogénesis: cotiledones (Trulson y Shahin, 1986; Kim et al., 1988; Chee, 1990a), hojas (Malepszy, 1988; Chee y Tricoli, 1988; Malepszy y Nadolska-Orczyk, 1989; Burza et al., 1995; Seo et al., 2000), peciolas (Punja et al., 1990) e hipocótilos (Rajasekaran et al., 1983; Ziv y Gadasi, 1986; Chee, 1990a; Selvaraj et al., 2006). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, algunos autores consideran que los explantes procedentes de cotiledón son los más adecuados (Ziv, 1992; Tabei, 1997; Chaturvedi y Bhatnagar, 2001; Selvaraj et al., 2007), debido tanto a su fácil accesibilidad como a la aceptable o buena respuesta organogénica, al menos por comparación con la que se obtiene con otros tipos de explantes.

Nuestros resultados son acordes con las observaciones de otros autores. En general, estimando la respuesta en función del porcentaje de explantes que desarrollan brotes y del índice organogénico, se puede concluir que los segmentos de cotiledón ofrecen mejor respuesta que los explantes de hoja.



### **1.2.5. Preparación del explante de cotiledón y localización de las células competentes para la regeneración**

En los experimentos que hemos llevado a cabo empleando explantes de cotiledón, el tipo de corte influye en la respuesta organogénica. En nuestras condiciones, lo que hemos denominado como segmentos de cotiledón enteros responden mejor que los explantes de cotiledón cortados transversalmente. En realidad, este resultado cabe atribuirlo principalmente a que la organogénesis se inicia en la zona de corte del cotiledón más próxima al ápice meristemático. Como consecuencia, cuando se cortan los explantes transversalmente aparecen dos segmentos con distinta respuesta: el segmento proximal (es decir, el más cercano al ápice) suele diferenciar yemas y primordios de brotes, mientras que el distal (i.e. el más alejado del ápice) normalmente no lo hace. Por este motivo, cuando se estima la organogénesis en función del porcentaje de explantes con yemas y brotes, la respuesta de los explantes cortados transversalmente es menor.

En otros trabajos efectuados con explantes de cotiledón se han descrito resultados diferentes. Así, Ali et al. (1991) observaron una mayor respuesta en explantes de cotiledón de pepino cortados transversalmente que en cotiledones enteros. Teniendo en cuenta que estos autores emplearon un cultivar muy distinto a los utilizados en nuestro trabajo, los resultados discrepantes podrían explicarse por un efecto de interacción entre el genotipo y el tipo de corte del explante.

En otros trabajos efectuados en nuestro laboratorio con explantes de cotiledón de melón y sandía se han obtenido también resultados diferentes a los descritos en esta Tesis. Así, Ellul (2002) observó que el tipo de corte efectuado a la hora de obtener los explantes de cotiledón de sandía repercute sobre diversos aspectos de la respuesta cultural y morfogenética. Con relación al crecimiento celular y la formación de yemas adventicias, los mejores resultados los obtuvo empleando cotiledones cortados transversalmente, en comparación con lo que ocurría cuando utilizaba cotiledones enteros (i.e. separados de la planta por un simple corte en el extremo más próximo al meristemo apical). En concreto, cuando utilizaba explantes de 3 días, el corte transversal del cotiledón producía un aumento del porcentaje de explantes con brotes y, sobre todo, del número de brotes por explante.

En su trabajo con melón, García-Sogo (1990) observó básicamente lo mismo, aunque en su caso la respuesta organogénica era mayor en términos cuantitativos a la observada por Ellul (2002) en sandía.

La relación entre el mayor daño mecánico que se realiza al cortar transversalmente los explantes de cotiledón y el incremento de la respuesta organogénica podría explicar este efecto positivo, lo que apoyaría la idea de que una mayor reacción de herida puede estimular o incrementar la respuesta organogénica.

Por otro lado, la respuesta organogénica de los explantes de cotiledón de las tres especies (pepino, melón y sandía) se localiza en una zona concreta, aunque conviene matizar esta afirmación. En pepino, Gambley y Dodd (1990) y Pérez-Sanjuan (1999) destacan la ausencia absoluta de organogénesis en las mitades distales de los segmentos de cotiledón, es decir en los explantes más alejados del ápice de la planta. En melón (García-Sogo, 1990) y sandía Ellul, 2002), la aptitud para la regeneración de la parte distal de un cotiledón cortado transversalmente no es nula, pero la predominancia de la organogénesis en la parte proximal es evidente y apoya la idea de una competencia diferente en las células de un mismo órgano.

La aparición de respuesta organogénica de forma preferente en esa zona podría deberse a un cierto balance de hormonas endógenas Ellul (2002). No obstante, un patrón de regeneración tan preciso podría indicar también una competencia restringida a ciertas células con una localización histológica concreta. De hecho, se ha descrito la presencia de células totipotentes en el nudo cotiledonario (i.e. en la parte basal del cotiledón) no solo en estas tres cucurbitáceas (melón, pepino y sandía), sino también en soja (Cheng et al., 1980; Hinchee et al., 1988) y guisante (Puonti-Kaerlas, 1991).

#### **1.2.6. Efecto de los reguladores del crecimiento**

En el caso del pepino, la organogénesis se puede conseguir por vía directa, casi directa o indirecta. En el primer caso, lo habitual es emplear el ápice meristemático o las yemas axilares como explantes y generalmente basta con utilizar un medio básico o, en todo caso, un medio con baja concentración de citoquinina. En cambio, para promover una

respuesta de tipo casi directo o indirecto hay que añadir reguladores del crecimiento (generalmente auxinas y citoquininas) al medio de cultivo.

Cuando se aborda la obtención de plantas transgénicas mediante co-cultivo de explantes primarios con *Agrobacterium*, conviene utilizar un proceso de regeneración de tipo casi directo, ya que de esta forma se minimiza la tasa de variación somaclonal. Aun así, y pese al riesgo de inducir un cierto grado de variación, algunos autores optan por un proceso de regeneración por vía indirecta. Debido a ello, los comentarios que haremos a continuación sobre el tema de los reguladores del crecimiento aluden a los efectos que se han descrito sobre la formación de callo o la respuesta morfogénica y no a las consecuencias que ello pueda tener sobre la tasa de variación somaclonal.

Se han utilizado distintos tipos y combinaciones de reguladores del crecimiento para promover la formación callo e inducir respuesta organogénica en explantes de pepino. Por lo que se refiere a la primera etapa, es decir, la formación de callo, Selvaraj et al. (2007) observaron una elevada proliferación celular en las zonas de corte de la mitad proximal de explantes de cotiledón en medio con una combinación de NAA y 6-BA. Handley y Chambliss (1979) indicaron que una combinación de NAA y Kinetina en el medio MS activaba la formación de un callo nodular compacto y observaron que la tasa de proliferación dependía del cultivar empleado.

Si la combinación de reguladores es adecuada, lo habitual es que, tras la formación de callo, se produzca la diferenciación de yemas adventicias. Así, Selvaraj et al. (2007) describieron la formación de callo organogénico en explantes de cotiledón del cultivar 'Poinset' en un medio con NAA y 6-BA. De forma similar, Punja et al. (1990) y Seo et al. (2000) observaron la formación de callo nodular y el desarrollo de yemas adventicias a partir de explantes de peciolo y hojas en medio con una combinación de NAA y 6-BA.

En nuestro trabajo con explantes de tres cultivares de pepino ('Wisconsin 2843', 'Marketer' y 'Negrito') hemos obtenido buenos resultados empleando una combinación de IAA (0,5 mg/l) y 6-BA (1 o 2,5 mg/l). La adición de auxina es ventajosa, o no, según el objetivo que se pretenda. En general, la presencia de una baja concentración de auxina determina un mayor crecimiento inicial y en ocasiones conduce a un índice organogénico algo mayor. Desde el punto de vista del aprovechamiento de la variación somaclonal esto

puede ser ventajoso ya que la mayor intensidad del crecimiento desorganizado en las primeras etapas puede aumentar la tasa de variación. En experimentos de transformación genética la mayor intensidad de división celular en las células del explante puede ser positiva pero, en cambio, el aumento de la tasa de variación es un factor negativo.

Por otro lado, los medios de cultivo que hemos empleado en este trabajo estaban diseñados para conseguir un proceso de regeneración vía organogénesis. A pesar de ello, en los callos del cultivar 'Negrito', observamos la presencia de zonas muy friables con una apariencia semejante a lo que suele denominarse como callo semejante a gel (*gel like callus*). En el caso del pepino, este es el tipo de callo que interesa cuando lo que se pretende es lograr un proceso de embriogénesis somática.

Para inducir respuesta embriogénica en explantes pepino se suele emplear una secuencia de dos medios. En el primero, lo habitual es añadir 2,4-D, 2,4,5-T o NAA en combinación con una citoquinina, mientras que en el segundo se elimina la auxina o se reduce la concentración. Así por ejemplo, Malepszy y Nadolska-Orczyk (1983) incubaron explantes de hoja de tres cultivares de pepino en un medio que contenía 1,2 mg/l de 2,4,5-T y 0,8 mg/l de 6-BA o, alternativamente, en un medio con 0,4 mg/l de 2,4-D y 0,8 mg/l de 6-BA. En el medio con 2,4,5-T obtuvieron el típico callo semejante a gel compuesto de agregados multicelulares de tipo proembriogénico. Tras el subcultivo de estos callos proembriogénicos a medios sin auxina o con reducida concentración de auxina llegaron a obtener hasta 220 embriones a partir de un explante de hoja.

No es frecuente utilizar el 2,4-D o 2,4,5-T para inducir respuesta organogénica. A pesar de ello, Selvaraj et al. (2006) describieron la formación de callo nodular con yemas adventicias en explantes de hipocótilo del cultivar 'Poinset' incubados en un medio con 2,4-D y 6-BA.

Tal y como se ha comentado antes, la inducción de respuesta organogénica está casi restringida a la zona del cotiledón más próxima al ápice meristemático. En este sentido, Selvaraj et al. (2007) observaron que los segmentos distales del cotiledón (es decir los más alejados del ápice) no dieron lugar a respuesta organogénica y ni siquiera fueron capaces de dar un callo profuso. De forma similar, Gambley y Dodd (1990) indicaron que

la activación de células totipotentes inducida por citoquinina estaba restringida a la mitad proximal de los cotiledones de pepino.

El desarrollo o la elongación de brotes se puede conseguir en medios con distintas combinaciones de reguladores. Por ejemplo, Wehner y Locy (1981) consiguieron el desarrollo de brotes a partir de explantes de cotiledón en un medio con NAA y 6-BA. Seo et al. (2000) obtuvieron también una respuesta aceptable con explantes de hoja cultivados en medio con NAA y 6-BA. Nishibayashi et al. (1996b) y Raharjo et al. (1996) describieron la regeneración de brotes a partir de explantes de hipocótilo en medios con combinaciones de NAA/6-BA, IAA/Kinetina o 2,4-D/6-BA.

Selvaraj et al. (2007) optaron por emplear la zeatina. En concreto, utilizaron un medio MS que contenía NAA, 6-BA y zeatina, junto con L-glutamina. De esta forma, observaron que, sobre la superficie del callo, se producía el desarrollo de protuberancias nodulares a partir de las que emergían un gran número de brotes adventicios.

La zeatina es una potente citoquinina que se ha utilizado con éxito en cultivo *in vitro* de especies muy diversas. Por lo que respecta al pepino, Punja et al. (1990) y Selvaraj et al. (2006) describieron la formación de brotes en medio con zeatina. En el trabajo de Selvaraj et al. (2006) se obtuvieron los mejores resultados empleando una combinación de NAA/6-BA/Zeatina. No obstante, Selvaraj et al. (2007) resaltaron que la zeatina solo dio buen resultado cuando se utilizaba a baja concentración. En su caso, el uso de concentraciones similares a las que son habituales con otras citoquininas (e.g. 6-BA o Kinetina) ocasionaba una reducción de la respuesta organogénica.

Punja et al. (1990) describieron una gama de frecuencias de regeneración a partir de explantes de peciolo (14–96%), hoja (0–75%) y cotiledón (0–38%) de diversas líneas puras de pepino en medios con combinaciones de 2,4-D/6-BA, NAA/Kinetina o NAA/Zeatina. Lo sorprendente es que, en su caso, los explantes de cotiledón dieron la menor respuesta organogénica.

Por lo que respecta al número de subcultivos en el medio de inducción de organogénesis se han propuesto diversas soluciones. Malepszy y Nadolska-Orczyk (1983), Trulson y Shahin (1986) y Bergervoet et al. (1989) recomendaron repetidos subcultivos en el medio

de inducción para conseguir una alta frecuencia de regeneración de brotes en pepino. En cambio, Punja et al. (1990) y Selvaraj et al. (2006) sugirieron uno y dos subcultivos, respectivamente. En un trabajo posterior, Selvaraj et al. (2007) propusieron dos subcultivos de 20 días cada uno en la primera etapa de formación de callo y otros dos subcultivos por el mismo periodo durante la etapa de desarrollo de yemas y brotes. Nuestros resultados son similares a los de Punja et al. (1990), ya que hemos comprobado que basta con un periodo de 21 días en el medio de inducción de organogénesis para conseguir una buena respuesta, sobre todo a partir de explantes de cotiledón.

En cultivo de explantes primarios de pepino, lo habitual es que en el medio de inducción se originen estructuras organogénicas que no pueden calificarse como brotes, ya que tienen un desarrollo reducido y no pueden individualizarse con facilidad. Lo habitual es subcultivar estas estructuras organogénicas a un medio de elongación. Selvaraj et al. (2006; 2007) optaron por añadir una baja concentración de ácido giberélico ( $GA_3$ ) en el medio de elongación. Nosotros hemos comprobado que no hace falta suplementar el medio de cultivo con giberelina, ya que el desarrollo y elongación de los brotes se puede conseguir de manera rápida y eficaz en un medio con baja concentración de auxina y citoquinina (e.g. 0,01 mg/l de NAA y 0,1 mg/l de 6-BA) o sin auxina y con baja concentración de citoquinina (e.g. 0,2 mg/l de quinetina).

Tras la elongación, el enraizamiento de los brotes se puede conseguir en un medio base o, en todo caso, en un medio con una baja concentración de auxina. Al igual que hemos hecho nosotros, la mayor parte de autores opta por emplear IAA o IBA a baja concentración (e.g. 0,1 a 0,5 mg/l). No obstante, Compton et al. (2001) y Selvaraj et al. (2002) utilizaron NAA. Desde nuestro punto de vista, no es lo más adecuado ya que el NAA promueve el desarrollo de un sistema radicular anómalo, incluso cuando se utiliza a baja concentración. Cuando se utiliza NAA, los brotes enraízan pero la fase de aclimatación se alarga excesivamente porque las plantas requieren un tiempo adicional para desarrollar un nuevo sistema radicular. Por esta razón, en el caso del pepino, nosotros pensamos que lo mejor es utilizar IAA o 6-IBA en el medio de enraizamiento, o simplemente un medio base sin auxina.

### 1.2.7. Efecto del sulfato de cobre

El cobre se considera como un micronutriente y por tanto se suministra en los medios de cultivo de las células vegetales a concentraciones muy bajas. Así por ejemplo, en la solución mineral más utilizada, la de Murashige y Skoog (1962), el cobre se suministra en forma de sulfato de cobre a una concentración de 0,025 mg/l.

A pesar de ello, al realizar un estudio sobre el efecto de distintas concentraciones de los elementos minerales que aparecen en forma de micronutrientes en la solución de Murashige y Skoog (1962), García-Sogo (1990) comprobó que la adición de concentraciones inusualmente elevadas de sulfato de cobre (desde 0,1 hasta 10 mg/l) al medio de cultivo producía un incremento de la respuesta organogénica estimada en función de la frecuencia de explantes de cotiledón que desarrollan yemas adventicias y brotes, y sobre todo del índice organogénico, un parámetro que estima la cantidad de estructuras organizadas. Lo sorprendente es que el efecto positivo del cobre se producía a concentraciones muy elevadas, entre 4 y 400 veces superiores a la concentración de la solución mineral de Murashige y Skoog (1962).

Ellul (2002) observó también que la adición de altas concentraciones de sulfato de cobre (desde 0,1 hasta 1 mg/l) promovía un aumento de la respuesta organogénica en segmentos de cotiledón de sandía. Aun así, el efecto positivo no era tan acentuado como el descrito en melón. Además, en el caso de la sandía, el empleo de elevadas concentraciones de sulfato de cobre (5 a 50 mg/l) tenía un efecto negativo.

Los resultados que hemos obtenido en cultivo de explantes de cotiledón de pepino indican que la adición de concentraciones moderadas (desde 0,2 hasta 5 mg/l) de sulfato de cobre provoca un ligero aumento tanto de la frecuencia de explantes con brotes como del índice organogénico. El efecto beneficioso no es tan espectacular en términos cuantitativos como el descrito en melón (García-Sogo, 1990), pero lo que sí resulta notable es la mayor calidad de la respuesta organogénica.

El efecto del cobre no es exclusivo de las cucurbitáceas, ya que también se han descrito efectos positivos en algunas gramíneas como triticale y trigo hexaploide (Purnhauser, 1991; Purnhauser y Gyulai, 1993), cebada (Dahleen, 1995; Castillo et al., 1998), e incluso

en cultivo de anteras de trigo hexaploide (Purnhauser y Gyulai, 1993) y trigo tetraploide (Ghaemi et al., 1994).

No se sabe todavía en qué se basa el efecto positivo del cobre sobre la respuesta organogénica pero se pueden plantear algunas hipótesis. Por ejemplo, Purnhauser y Gyulai (1993) atribuyen el efecto al hecho de que el ion  $\text{Cu}^{+2}$  es un componente o cofactor de varias enzimas importantes implicadas en el transporte de electrones, la biosíntesis de carbohidratos o el metabolismo de los polifenoles.

La participación del ion cobre en la composición de enzimas que intervienen en los procesos de detoxificación de ROS podría ser relevante en este contexto. Las evidencias indirectas que apoyan esta hipótesis se basan en estudios *in vivo*. Se ha comprobado que ciertas enzimas en las que el ion cobre actúa como cofactor incrementan su actividad en respuesta a una dosis adicional de cobre (e.g. diamino oxidasa: Walker y Loneragan, 1981; ascorbato oxidasa: Loneragan et al., 1982; polifenol-oxidasa: Lyszcz et al., 1976; Walker y Loneragan, 1981). Asumiendo que *in vitro* ocurra lo mismo, el incremento de la actividad de estas enzimas podría mejorar la respuesta de forma directa (suponiendo que, de una u otra forma, estuvieran implicadas en la organogénesis), o indirecta, limitando la acumulación de polifenoles o el nivel de estrés generado por el propio cultivo *in vitro*.

Teniendo en cuenta que el cobre actúa sobre el número y el desarrollo de las estructuras organizadas (yemas adventicias y brotes), podría actuar directa o indirectamente sobre la expresión de genes implicados en el crecimiento de callo y la respuesta morfogenética. En este sentido conviene resaltar que aunque el cobre tiene un efecto positivo en melón, pepino y sandía (principalmente en melón) la intensidad del efecto depende del genotipo (variedad, cultivar o línea). Además, la adición de altas concentraciones de cobre provoca un cambio en la proporción del crecimiento desorganizado respecto al organizado, es decir, limita la formación de callo y, en cambio, provoca una amplificación de la respuesta organogénica. Esto sugiere que el cobre podría modular la expresión de genes relacionados con el crecimiento de callo y la respuesta organogénica.

Alternativamente, el cobre podría alterar el nivel endógeno o la actividad de reguladores del crecimiento endógenos. De hecho, el efecto que provoca la adición de sulfato de cobre mimetiza el efecto que producen ciertas citoquininas. En todo caso, conviene



señalar que el cobre no tiene el mismo efecto en todos los explantes. Por lo que se refiere al melón, pepino y sandía, el cobre tiene un efecto muy positivo en explantes de cotiledón pero no ocurre lo mismo con explantes de hipocótilo, lo que sugiere que el efecto depende del estado epigenético de las células o de los niveles de hormonas endógenas.

#### **1.2.8. Efecto de las condiciones de incubación**

Algunos autores (Chee, 1990a; Punja et al., 1990; Raharjo y Punja, 1992) aducen que el cultivo de los explantes de cotiledón en oscuridad es conveniente (e incluso opinan que es esencial) para la inducción de respuesta organogénica en pepino. Según estos autores, los mejores resultados se obtienen cuando se cultivan los explantes durante 2-3 semanas en condiciones de oscuridad y, a partir de ahí, se transfieren al mismo medio en condiciones de fotoperiodo (normalmente, 16 horas luz / 8 horas oscuridad)

Otros autores discrepan de lo anterior. Por ejemplo, Selvaraj et al. (2007) estudiaron el efecto del cultivo de los explantes en oscuridad durante 2-3 semanas y llegaron a la conclusión de que los resultados eran negativos. Puede que la discrepancia se deba a los diferentes cultivares empleados por unos y otros, o quizá también a los diferentes medios de cultivo.

Nosotros hicimos algunos ensayos en este sentido. En concreto, comparamos la respuesta de explantes incubados durante 4 semanas en condiciones de fotoperiodo (16 horas luz / 8 horas oscuridad) con respecto a los incubados durante un cierto tiempo en oscuridad (1 semana en oscuridad y tres con fotoperiodo, o dos semanas en oscuridad y 2 con fotoperiodo). Los resultados no dejaron lugar a dudas: el cultivo en oscuridad disminuye notablemente la respuesta morfogénica. En definitiva, pese a que el medio de cultivo y los cultivares que nosotros empleamos eran diferentes a los utilizados por Selvaraj et al. (2007), nuestros resultados fueron coincidentes.

### **1.2.9. Influencia de la edad de la planta a partir de la que se obtienen los explantes**

Al igual que ocurre en otras muchas especies, en las cucurbitáceas el estado ontogénico de la planta que se emplea para la obtención de los explantes primarios es un factor de gran importancia. En el caso particular de que se utilicen segmentos de cotiledón de plántulas procedentes de semilla, la edad del material de partida puede ser aún más determinante, ya que la ventana del desarrollo que permite la inducción de organogénesis es más estrecha que si se utilizan otros tipos de explantes (e.g. segmentos de hoja de plantas axénicas).

Dong y Jia (1991) evaluaron la respuesta organogénica en explantes de cotiledón de un cultivar de sandía y observaron que los mejores resultados se lograban con plántulas de 5 días. En cambio, cuando utilizaban plántulas en estados ontogénicos más tardíos (10, 15 y 20 días) la frecuencia de explantes con respuesta disminuía notablemente. En un trabajo con otros tres cultivares de sandía, Compton y Gray (1993) obtuvieron resultados similares. Estos autores señalaron que, además de una disminución en la frecuencia de explantes con respuesta morfogénica, el número de brotes por explante se reducía de forma drástica al utilizar plántulas con edades superiores a los 5 días.

Ellul (2002) obtuvo resultados aún más extremos en un estudio con tres cultivares de sandía. Consiguió una respuesta organogénica satisfactoria con segmentos de cotiledón de plántulas de 3 días (35% en 'Sugar Baby', 20% en 'Crimson Sweet' y 50% en 'Dulce Maravilla'), pero la frecuencia de explantes con respuesta y el número de brotes por explante caía de forma drástica al emplear explantes de plántulas de 5, 7, 9 y 11 días.

Los resultados obtenidos por García-Sogo (1990) indican que en el caso del melón la ventana del desarrollo es un poco más amplia, ya que se puede conseguir una respuesta satisfactoria con segmentos de cotiledón de plántulas de 3 a 6 días. No obstante, al igual que ocurre en sandía, la frecuencia de explantes con yemas adventicias y el número de brotes por explante se reduce de forma drástica al utilizar plántulas mayor edad. Los resultados de Niedz et al. (1989) concuerdan con los descritos por García-Sogo (1990) ya que obtuvieron la mejor respuesta morfogénica al emplear segmentos de cotiledón de plántulas de 4 a 7 días.

En pepino, Cade et al. (1990) y Colijn-Hooymans et al. (1994) llegaron a la conclusión de que el factor más importante para la regeneración de brotes a partir de segmentos de cotiledón es, precisamente, la edad de la plántula donante. Los dos grupos aconsejan el uso de plántulas 4 a 6 días, aunque resaltan la existencia de una cierta variabilidad en la respuesta dependiendo del cultivar.

En un trabajo con seis líneas de pepino, Pérez-Sanjuan (1999) obtuvo los mejores resultados empleando segmentos de cotiledón de plántulas de 3 días, mientras que Selvaraj et al. (2007) consiguieron una elevada respuesta utilizando explantes de plántulas de 5 días.

Por lo que se refiere a la regeneración a partir de explantes de cotiledón, los resultados anteriores revelan que en las tres cucurbitáceas (pepino, melón y sandía) hay una ventana del desarrollo que permite encontrar células competentes para la morfogénesis en plántulas relativamente jóvenes. Por lo que parece, la ventana del desarrollo se abre tras el proceso de la germinación y se cierra tras la expansión de los cotiledones. De esta forma, a partir del momento en el que se inicia la expansión de los cotiledones, hay una disminución drástica de la respuesta morfogenética en la mayor parte de los genotipos.

#### **1.2.10. Efecto del nitrato de plata sobre la respuesta morfogenética**

El etileno ( $C_2H_4$ ) es una hormona producida y liberada en forma gaseosa por casi todas las plantas. Actúa como intermediario de diferentes respuestas de la planta frente a distintos estímulos ambientales o condiciones de estrés y parece jugar un importante papel en distintas fases del desarrollo ontogénico, tales como la germinación de semillas, la formación del primordio del ápice o de la raíz, y diversos procesos de diferenciación celular (Abeles et al., 1992).

En algunas especies, el etileno determina el tipo de flores que aparecen en la planta. Así, en algunas especies monoicas o andromonoicas el tratamiento con un inhibidor de la biosíntesis de etileno (amino-etoxi-vinil-glicina o AVG) induce el desarrollo de flores masculinas. De forma similar, la aplicación con spray de nitrato de plata, un inhibidor de la acción del etileno, induce la formación de flores masculinas y, en algunos genotipos, también hermafroditas. Este conocimiento permitió el desarrollo de un método sencillo

pero muy efectivo para inducir o promover el desarrollo de flores masculinas en líneas ginoicas de pepino sobre la base del tratamiento con una solución de nitrato de plata en una fase concreta del desarrollo de la planta (Den Nijs y Visser, 1979). Este método ha tenido una importante repercusión en los programas de mejora del pepino.

En cultivo *in vitro*, los explantes o callos de ciertas especies pueden liberar etileno, lo que provoca su acumulación en recipientes con un intercambio gaseoso limitado (Chi et al., 1991). La acumulación de etileno suele ocasionar una inhibición de la regeneración de brotes (Chraibi et al., 1991) o una alteración de procesos de crecimiento y desarrollo del material vegetal (Pua, 1993).

Por lo que se refiere a especies de la familia Brassicaceae, algunos autores (Curtis et al., 2004) han propuesto que el etileno podría actuar como un regulador negativo de la regeneración de brotes, mientras que otros (Chi y Pua 1989; Bhalla y Smith 1998; Zhang et al., 2000) opinan que podría ser la causa de la recalcitrancia en ciertos genotipos de col china y coliflor.

Se ha descrito que la adición de nitrato de plata al medio de cultivo permitió superar el problema de la recalcitrancia en *Brassica campestris* (Chi y Pua 1989; Chi et al., 1991). De forma similar, la adición de este inhibidor de la síntesis de etileno condujo a un aumento de la respuesta morfogénica en algunas especies del género *Brassica* (Palmer, 1992; Eapen y George 1997; Hu et al., 1999), así como en ají (Hyde y Phillips, 1996), yuca (Zhang et al., 2001b), rábano (Curtis et al., 2004), girasol (Chraibi et al., 1991), melón (Roustan et al., 1992) y en una gramínea silvestre (*Bouteloua dactyloides*) que medra en las grandes praderas de Norteamérica (Fei et al., 2000).

La adición de nitrato de plata fue también positiva para el desarrollo de embriones somáticos de café (Fuentes et al., 2000), así como en cultivo de anteras de repollo (Achar, 2002). Se han descrito también efectos beneficiosos en algunas monocotiledóneas (e.g. arroz, maíz), en concreto para mejorar la iniciación de callos embriogénicos y la subsiguiente regeneración de plantas (Adkins et al., 1993; Vain et al., 1989).

Por lo que se refiere al pepino, Mohiuddin et al. (1997) indicaron que la adición de nitrato de plata favorecía la respuesta organogénica de explantes de cotiledón. Años más tarde

(Mohiuddin et al., 2005) publicaron los resultados de otro estudio en el que evaluaron el efecto de distintas concentraciones de nitrato de plata (1, 10, 30, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) sobre la organogénesis en explantes de cotiledón (proximal y distal) de dos cultivares de baja respuesta ('Spring Swallow' y 'Tasty Green'). La novedad de este estudio con respecto al anterior consistió en añadir el inhibidor de la síntesis de etileno tanto en el medio de regeneración como en el medio de germinación de semillas. Según los autores, la adición de 1, 10, 30 y 50  $\mu\text{M}$  (es decir, desde 0,17 a 8,45 mg/l) a los dos medios de cultivo condujo a un aumento de la respuesta organogénica en los explantes de cotiledón más próximos al ápice. En cambio, no apreciaron ningún efecto positivo en los explantes de tipo distal (i.e. la parte del cotiledón más alejada del ápice de la planta). Por otro lado, la adición de 100  $\mu\text{M}$  de nitrato de plata (aproximadamente, 17 mg/l) afectó negativamente a la capacidad de regeneración.

Estos resultados son similares a los descritos por Roustan et al. (1992) en melón. Al igual que ocurre en pepino, las concentraciones moderadas de nitrato de plata mejoraban la respuesta organogénica en los explantes de melón, mientras que una concentración excesiva (80  $\mu\text{M}$ ) tenía efectos negativos.

#### **1.2.11. Endorreduplicación en los explantes de cotiledón y nivel de ploidía de las plantas regeneradas**

Desde hace tiempo se sabe que las plantas tienen una estructura polisomática, es decir, mientras que las células de la línea germinal mantienen el nivel de ploidía característico de la especie, las células somáticas que conforman los tejidos u órganos de la planta pueden tener distintos niveles de ploidía o, expresado de forma más correcta, distintos contenidos del valor C. Por tanto, frente a lo que antes se asumía, los tejidos u órganos de una planta son habitualmente mixoploides.

El aumento de dosis génica se puede producir a través de un proceso de amplificación génica (restringido a grupos de genes o fragmentos cromosómicos concretos), pero habitualmente se lleva a cabo mediante endopoliploidía, lo que determina la duplicación del complemento cromosómico. A su vez, la endopoliploidía puede lograrse mediante endomitosis o endorreduplicación (D'Amato, 1984; Joubès y Chevalier, 2000). En el primer caso, la duplicación se produce por la formación de un núcleo de restitución tras

una alteración (en este caso, genéticamente programada) de la anafase media o tardía. En cambio, la endorreducción implica que, tras la fase S (en la que se produce la replicación del material genético) y la fase G<sub>2</sub>, no se pasa como es habitual a la fase M (mitosis), sino a la fase G<sub>1</sub>. De esta manera, se produce una duplicación cromosómica en ausencia de mitosis.

Por lo que se refiere a la arquitectura cromosómica de los núcleos de restitución, las consecuencias de ambos procesos serían las mismas en cuanto al número de cromátidas, pero distintas en cuanto al número de centrómeros y secuencias pericentroméricas. Tras la endomitosis cada cromosoma debería tener su centrómero, mientras que tras un proceso endorreducción dos o más cromátidas compartirían un centrómero, así como las secuencias adyacentes. Como consecuencia, el número de cromosomas se mantiene, mientras que el número de cromáticas aumenta. Por otro lado, los dos procesos de endopoliploidía no se distribuyen por igual en animales y plantas (Traas et al., 1998), ya que generalmente se asume que la endomitosis, frecuente en células animales, raramente ocurre en angiospermas (D'Amato, 1984). Así pues, la endorreducción sería el mecanismo primario de endopoliploidía en las plantas superiores.

Se han propuesto diversas hipótesis en cuanto al significado biológico de los procesos de endorreducción en plantas (D'Amato, 1984; Traas et al., 1998; Joubès y Chevalier, 2000); Larkins et al., 2001; Barow, 2006). El nivel de ploidía de las células de un órgano determinado suele estar relacionado con el tamaño de dicho órgano, por lo que parece lógico pensar que la tasa de endorreducción debe tener un papel primordial en este sentido. Es lo que ocurre por ejemplo en el pericarpio del fruto de tomate, donde se llegan a detectar núcleos con un contenido de ADN equivalente a 256C, o incluso más (Bertin, 2005; Cheniclet et al., 2005; Mathieu-Rivet et al., 2010). Aunque tanto éste como otros casos sugieren una relación entre tasa de endorreducción y tamaño final de un tejido u órgano, conviene resaltar que hay evidencias en sentido contrario o, al menos, resultados en los que esta relación no está tan clara.

Es frecuente encontrar elevados valores del valor medio C en células de tejidos u órganos con una elevada actividad biosintética. Parecía lógico pensar que la endorreducción suministraría la base para la amplificación y subsiguiente incremento de expresión de

genes relacionados con estos procesos biosintéticos. En ocasiones, parece que así ocurre, pero también hay evidencias en sentido contrario. Así por ejemplo, las células del endospermo de maíz experimentan sucesivos ciclos de endorreduplicación hasta que algunos núcleos alcanzan contenidos de 96C y 192C. La amplificación génica se inicia 10 días después de la polinización, lo que coincide con el inicio de la acumulación de almidón y proteínas de almacenamiento. La coincidencia llevó a asumir que el proceso de endorreduplicación proporcionaría la base para el aumento de tamaño celular y el incremento en los niveles de expresión de genes relacionados con la acumulación de almidón y proteínas. Para analizar esta asociación, Leiva-Neto et al. (2004) expresaron un alelo mutante de una kinasa-A dependiente de ciclina que confiere un fenotipo dominante negativo en la línea mutante de maíz. Como esperaban, la expresión ectópica del enzima defectivo disminuía la actividad kinasa y reducía a la mitad el valor medio C en los núcleos de las células del endospermo, pero, sorprendentemente, ello no afectó al tamaño celular y solo provocó una ligera disminución de la acumulación de almidón y proteínas de almacenamiento en las células del endospermo.

Otra hipótesis es que la endorreduplicación podría tener un efecto tampón sobre la acumulación de daños o de mutaciones en el ADN al suministrar copias adicionales de genes relevantes. Pese a que la hipótesis es muy sugerente, de momento hay pocas evidencias experimentales que apoyen este tipo de argumentación.

La endorreduplicación suele estar asociada a procesos de diferenciación celular. La cuestión que surge en este sentido es si la endorreduplicación es causa o efecto de tales procesos de diferenciación. Al respecto, convendría resaltar que el incremento de dosis génica a través de endorreduplicación no tiene por qué conducir a mayores niveles de expresión. De hecho, las evidencias en el campo de la transformación genética revelan que en muchos casos el aumento del número de copias no conduce a un aumento, sino a la reducción de expresión o anulación de función del gen, principalmente debido a la activación de mecanismos de silenciamiento génico postranscripcional. Teniendo esto en cuenta, es muy posible que la endorreduplicación sea un mecanismo de modulación de expresión génica mucho más sutil de lo que inicialmente se había pensado.

Con independencia de su significado biológico la endorreducción tiene una connotación de tipo práctico, ya que la presencia de células con mayor contenido de ADN en el explante de partida puede conducir a la regeneración de plantas poliploides. Así ocurre cuando se regeneran plantas a partir de segmentos de cotiledón de pepino.

En el experimento en el que se analizó la influencia de la edad de la plántula utilizada como fuente de explantes primarios (4, 7 y 10 días tras la germinación), descartamos el uso de plantas con cotiledones expandidos porque los experimentos previos en melón (García-Sogo, 1990), pepino (Pérez-Sanjuan, 1999) y sandía Ellul, 2002) habían indicado que, tras la separación y expansión de los cotiledones aumenta considerablemente el valor medio C. A pesar de ello, incluso en cotiledones de plántulas de 4 días hay una cantidad considerable de núcleos 4C y 8C.

Tal y como se comentó en el apartado de 'Resultados', conviene aclarar que el número de núcleos 2C, 4C y 8C no equivale al número de células diploides, tetraploides y octoploides, ya que, por ejemplo, una parte de los núcleos 4C se corresponde con células tetraploides en fase G1, pero la otra parte se corresponde con células diploides que acaban de culminar la fase S o que están en la fase G2 del ciclo celular. El porcentaje de núcleos 2C, 4C y 8C da una idea de la distribución de células diploides, tetraploides y octoploides, pero las frecuencias no son exactamente las mismas.

Teniendo en cuenta lo anteriormente indicado, los análisis por citometría de flujo indicaron que, incluso en plantas de 4 días, solo la mitad de las células del explante inicial (probablemente menos) son diploides. Esto se traduce en que, en general, menos de la mitad de las plantas regeneradas a partir de segmentos de cotiledón son diploides.



## 2. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PEPINO MEDIANTE CO-CULTIVO DE EXPLANTES PRIMARIOS CON *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

### 2.1. RESULTADOS

Antes de iniciar los experimentos de transformación propiamente dichos se realizaron tres ensayos en los que evaluamos el efecto de la presencia de acetosiringona (AS) en los medios de inoculación y co-cultivo, el tipo de medio de infección (LB o YEP) y la adición de distintas concentraciones de cefotaxima sobre la respuesta organogénica de los explantes de pepino. En estos experimentos, el medio de inoculación no contenía *Agrobacterium*, ya que el propósito era comprobar que la respuesta morfogenética no se veía afectada por los tratamientos que habitualmente se hacen en el co-cultivo de explantes primarios.

Por lo que se refiere a los experimentos de transformación con *Agrobacterium*, utilizamos el típico sistema binario basado en el empleo de dos plásmidos, uno con la región de virulencia (*vir*) y otro desarmado de inferior tamaño (mini-Ti), en el que la región del T-DNA contenía un gen marcador y un gen delator. Se emplearon dos cepas de *A. tumefaciens* (LBA4404 y C58) y diferentes plásmidos Ti (pBIN19 y pBIG121-Hm). El vector pBIN19 solo porta el gen marcador *nptII*, que confiere resistencia a la kanamicina, mientras que el vector PBIG121-Hm porta los genes marcadores *nptII* (resistencia a la kanamicina) y *hpt* (resistencia a higromicina), así como el gen delator *uidA-int* o *GUS-intrón*.

En los experimentos de co-cultivo utilizamos segmentos de cotiledón de plántulas de 3, 4 o 7 días que habían crecido en el medio MG (Moreno et al., 1984). Los explantes se obtenían eliminando tanto la parte proximal (i.e. la más cercana al meristemo terminal) como la parte distal, a fin de generar zonas de corte en las que pudiera haber una reacción de herida. A lo largo de los distintos ensayos, empleamos tres cultivares o líneas de pepino: 'Marketer', 'Negrito' y 'Wisconsin 2843'.

Como suele ser habitual, el método de transformación constaba de diferentes fases: precultivo, infección, co-cultivo, lavado y regeneración. A su vez, esta última fase constaba de tres etapas sucesivas: inducción de organogénesis, desarrollo y elongación de los brotes y enraizamiento de las plantas.

En la fase de precultivo se incubaron los explantes en medio de inducción de organogénesis desde 6-8 horas hasta 2 días, según los experimentos, para promover el inicio de divisiones celulares a fin de facilitar la interacción de las células vegetales con *Agrobacterium*.

El proceso de infección se realizó en medio líquido (normalmente, LB) suplementado con 200  $\mu$ M de acetosiringona, ajustando la suspensión bacteriana a una densidad óptica ( $DO_{600}$ ) de 0,2-0,3 o 0,7-0,8. Lo más habitual era mantener los explantes en el medio de infección durante 7-10 minutos.

A continuación, se realizaba el co-cultivo de las células vegetales con *Agrobacterium*. En general, el periodo de inoculación o infección con *Agrobacterium* fue de 2 o 3 días, pero en algunos experimentos el tiempo osciló entre 1 y 6 días. El co-cultivo se llevó a cabo en medio de inducción de organogénesis con 200  $\mu$ M de acetosiringona (3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenona). La incubación se hacía normalmente en oscuridad a 28°C, aunque en ocasiones se realizó en la cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad. A lo largo de los sucesivos experimentos se evaluó la conveniencia, o no, de añadir el agente selectivo durante el periodo de co-cultivo. Asimismo, realizamos algunos ensayos en los que el co-cultivo incluía una primera etapa sin agente selectivo y una posterior con presión de selección.

Tras las fases de infección y co-cultivo, los explantes se colocaban sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de bacteria. A continuación se realizaba lo que habitualmente se denomina como 'fase de lavado', a fin de erradicar la bacteria. Para ello, los explantes se sumergían en medio líquido MB (Tabla 10) con cefotaxima (300 - 600 mg/l) durante 7-10 minutos. Tras el tratamiento con antibiótico, y a fin de minimizar el riesgo de hiperhidratación, los explantes se colocaban sobre papel de filtro estéril y, una vez eliminado el exceso de medio, se depositaban sobre el medio inductor de organogénesis con el envés hacia dicho medio.

La etapa de inducción de organogénesis se realizó normalmente en el medio IB 05 25 (MB3 suplementado con 0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA). No obstante, en algunos experimentos se utilizaron los medios B 25 (MB3 + 2,5 mg/l de 6-BA) o IB 005 25 (MB3 + 0,05 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA).

Para facilitar la selección de las células que habían incorporado el T-DNA, se adicionó al medio kanamicina (desde 25 hasta 100 mg/l) o higromicina B (10 mg/l), según la naturaleza del gen marcador (*nptII* o *hpt*). Asimismo, para evitar el crecimiento de bacterias que no hubieran sido eliminadas durante el proceso de lavado, el medio contenía una dosis de cefotaxima (300-600 mg/l). Tras la etapa de inducción de organogénesis (3-4 semanas), los callos que habían diferenciado yemas de ápice se transferían a un nuevo medio (K02 o FCu, ver Material y Métodos) para conseguir el desarrollo y elongación de los brotes (3 semanas). Por último, los brotes enraizaban en medio base MB3. Usualmente, los dos medios (elongación y enraizamiento) contenían cefotaxima y el agente selectivo.

A fin de evaluar el resultado de cada experimento de transformación, se estimó la frecuencia de explantes con yemas y brotes adventicios, así como el número de plantas capaces de medrar en presencia del agente selectivo. Tras el proceso de regeneración se realizaron dos ensayos para determinar la expresión del gen marcador tanto en ápices terminales (test de ápice en medio MB3 con agente selectivo) como en hojas de las plantas regeneradas (test de explante en medio IB 05 25 con agente selectivo). Asimismo, cuando el T-DNA portaba el gen delator *uidA-int*, se realizó un análisis histoquímico con X-Gluc en callos que habían diferenciado yemas adventicias (que por su morfología se denominaron como 'callos nodulares') o en hojas u otras partes de las plantas seleccionadas. Asimismo, en algunos ensayos se determinó la presencia del gen marcador mediante PCR en tejidos de las plantas regeneradas. Por último, algunas de las plantas consideradas como transgénicas se cultivaron en el invernadero para evaluar la transmisión de los genes contenidos en el T-DNA a la descendencia.

### 2.1.1. Experimentos previos a la inoculación de explantes con *Agrobacterium*

#### 2.1.1.1. Efecto de la acetosiringona sobre la respuesta morfogénica

*Agrobacterium tumefaciens* ha adoptado un sistema regulador de dos componentes para percibir y reaccionar a la presencia de células vegetales susceptibles (Tzfira y Citovsky, 2000). Los componentes del sistema, VirA, una proteína transmembrana, y virG, una proteína reguladora, reaccionan específicamente a exudados de la célula vegetal herida y promueven la activación transcripcional de los genes *vir* (Winans et al., 1994). Entre los diversos compuestos fenólicos que inducen la expresión de los genes *vir*, los mejor estudiados son la acetosiringona (AS), una molécula fenólica monocíclica, y la  $\alpha$ -hidroxacetosiringona (OH-AS) (Hooykaas y Schilperoort, 1984; Stachel et al., 1985). En ausencia de acetosiringona, o cuando está presente en cantidades limitadas, algunos monosacáridos, como la glucosa y galactosa, también pueden inducir la expresión de genes *vir* (Cangelosi et al., 1990). En el inicio del proceso de señalización, los compuestos fenólicos interactúan con la proteína VirA. Esta interacción puede ser directa o indirecta, a través de dos proteínas (P10 y P21) codificadas por genes del cromosoma o genóforo bacteriano (Lee et al., 1992), que primero se unen al compuesto fenólico y luego facilitan la unión a VirA. En contraste, la inducción de los genes *vir* por azúcares siempre ocurre indirectamente, a través de una proteína de unión glucosa/galactosa codificada por el cromosoma bacteriano, ChvE, que interactúa con VirA y transmite la señal (Shimoda et al., 1993). Como otras proteínas bacterianas de señalización, VirA se autofosforila, y, a continuación, transfiere el grupo fosfato a VirG. Así, VirA actúa como una proteína quinasa y una fosfotransferasa. La proteína VirG fosforilada interactúa con el 'módulo *vir*', una secuencia conservada de 12 pares de bases localizada en la región promotora de los genes *vir*. Esto determina la expresión de los genes de virulencia, lo que a su vez desencadena la secuencia de acontecimientos que conduce a la transferencia del T-DNA a la célula vegetal (Charles et al., 1992; Winans, 1992; Hooykaas y Beijersbergen, 1994; Tzfira y Citovsky, 2000).

Antes de iniciar los experimentos de co-cultivo de explantes primarios de pepino con *Agrobacterium*, se realizó un ensayo para evaluar el efecto de la acetosiringona sobre la posterior respuesta organogénica de los explantes del cultivar 'Marketer'. Como puede

verse en la Tabla 17, la adición de 200  $\mu$ M de acetosiringona en los medios de inoculación y co-cultivo (sin *Agrobacterium*) no modifica el porcentaje de explantes con brotes ni el índice organogénico de los explantes de cotiledón del cultivar 'Marketer'.

#### **2.1.1.2. Efecto de la cefotaxima sobre la respuesta morfogénica**

La cefotaxima es uno de los antibióticos más utilizados para erradicar el *Agrobacterium* tras las fases de inoculación y co-cultivo de explantes primarios. A fin de evaluar su efecto sobre la posterior respuesta organogénica de los explantes, se realizaron dos experimentos consecutivos.

En el primero, los explantes de pepino se sumergieron en dos medios de inoculación (LB y YEP) sin *Agrobacterium*, ajustando el pH a 5,7. El medio LB es uno de los más utilizados para el cultivo de *Agrobacterium*, mientras que el YEP, aún siendo más habitual para el cultivo de levaduras, se ha empleado también para *Agrobacterium*.

Como puede verse en la Tabla 18, la cefotaxima no tiene un efecto negativo sobre la respuesta organogénica en los explantes del cultivar 'Marketer' que han pasado por el medio LB. Los resultados para los explantes que habían pasado por el medio YEP no fueron tan favorables como con el medio LB, y por tanto a partir de este momento decidimos utilizar este último medio.

A continuación, realizamos un experimento adicional en el que los explantes del cultivar 'Marketer', que habían pasado por el medio LB (sin *Agrobacterium*), ajustado en este caso a un pH de 7,0, se sometieron a un mayor rango de concentraciones de cefotaxima (desde 0 hasta 600 mg/l).

Como puede verse en la Tabla 19, la adición de una alta concentración de cefotaxima (600 mg/l) no reduce la respuesta organogénica de los explantes de pepino, lo que puede facilitar la erradicación de la bacteria tras las fases de inoculación y co-cultivo.

**Tabla 17.** Efecto de la acetosiringona sobre la respuesta organogénica de explantes de cotiledón del cultivar 'Marketer' <sup>(\*1)</sup>.

Concentración de acetosiringona ( $\mu\text{M}$ )	Porcentaje de explantes con brotes	Índice organogénico
0	38,2 $\pm$ 8,5	0,50 $\pm$ 0,13
200	34,4 $\pm$ 8,5	0,53 $\pm$ 0,16

(\*1) Se adicionó la acetosiringona en los medios de inoculación LB y de cultivo (sin *Agrobacterium*) y, a continuación, se evaluó la respuesta morfogénica de los explantes cultivados en el medio IB 05 25 seguido del cultivo en el medio K02.

**Tabla 18.** Efecto de la cefotaxima sobre la respuesta organogénica de explantes de cotiledón del cultivar 'Marketer' tras el pase por los medios de inoculación LB o YEP sin *Agrobacterium* <sup>(\*1)</sup>.

Medio de inoculación sin <i>Agrobacterium</i> <sup>(*2)</sup>	Concentración de cefotaxima (mg/l)	Porcentaje de explantes con brotes	Índice organogénico
LB	100	30,2 $\pm$ 6,4	0,35 $\pm$ 0,08
	200	27,8 $\pm$ 6,2	0,30 $\pm$ 0,07
	300	54,7 $\pm$ 6,9	0,67 $\pm$ 0,11
YEP	100	38,2 $\pm$ 6,6	0,37 $\pm$ 0,07
	200	26,4 $\pm$ 6,1	0,25 $\pm$ 0,07
	300	17,3 $\pm$ 5,3	0,18 $\pm$ 0,06

(\*1) Se adicionó la cefotaxima en los medios de lavado y de regeneración y, a continuación, se evaluó la respuesta morfogénica de los explantes cultivados en el medio IB 05 25 seguido del cultivo en el medio K02.

(\*2) El pH de los medios de inoculación (sin *Agrobacterium*) se ajustó a 5,7.

**Tabla 19.** Efecto de la cefotaxima sobre la respuesta organogénica de explantes de cotiledón del cultivar 'Marketer' tras el pase por el medio de inoculación LB sin *Agrobacterium* <sup>(\*1)</sup>.

Concentración de cefotaxima (mg/l)	Porcentaje de explantes con brotes	Índice organogénico
0	67,1 ± 5,7	1,26 ± 0,13
100	70,0 ± 5,5	1,06 ± 0,12
200	50,7 ± 6,1	0,64 ± 0,09
300	53,0 ± 6,2	0,81 ± 0,12
400	36,5 ± 6,1	0,37 ± 0,07
500	47,9 ± 6,0	0,70 ± 0,11
600	61,1 ± 5,8	0,86 ± 0,10

(\*1) El pH del medio de inoculación LB (sin *Agrobacterium*) se ajustó a 7,0. Se adicionó la cefotaxima en los medios de lavado y de regeneración y, a continuación, se evaluó la respuesta morfogénica de los explantes cultivados en el medio IB 05 25 seguido del cultivo en el medio K02.

### **2.1.2. Co-cultivo de explantes primarios de los cultivares 'Marketer' y 'Negrito' con el vector pBIN19 y selección con kanamicina**

En el primer experimento de transformación se inocularon explantes de cotiledón de plántulas de 4 días con la cepa LBA4404 de *Agrobacterium*. La cepa en cuestión portaba el vector pBIN19 en cuyo T-DNA había un gen marcador *nptII* que confiere resistencia a la kanamicina.

Las condiciones experimentales se detallan en el apartado correspondiente del Material y Métodos, pero conviene señalar brevemente que el precultivo de los explantes tuvo una duración de 6-8 horas, la inoculación (7 minutos) se llevó a cabo con la suspensión bacteriana ajustada a una  $DO_{600}$  de 0,7-0,8 en medio LB (Tabla 11), el co-cultivo tuvo una duración de 2-3 días, el cultivo de los explantes se realizó en medio de inducción de organogénesis IB 05 25 (Tabla 6), el desarrollo y elongación de los brotes en medio K02 (Tabla 9) y el enraizamiento de las plantas en medio base MB3 (Tabla 5).

Con el fin de ajustar las condiciones del proceso de selección, en la primera fase del experimento se utilizaron tres concentraciones de kanamicina (25, 50 y 75 mg/l) en explantes inoculados del cultivar 'Marketer'. Los resultados indicaron que, para los explantes de cotiledón de este cultivar, el empleo de 50 o 75 mg/l de kanamicina era excesivo (Tabla 20). En efecto, el porcentaje de explantes que forman callo y desarrollan yemas adventicias y brotes no llega al 2%, en el medio con 50 mg/l de kanamicina. En todo caso, lo peor es que cuando se transfieren los brotes a medio de enraizamiento selectivo y se subcultivan varias veces en el mismo medio (utilizando el ápice terminal o las yemas axilares como explantes) no sobrevive ninguna planta. En cambio, cuando se utiliza una presión de selección más moderada (25 mg/l de kanamicina), el porcentaje de callos con brotes seleccionados está en torno al 4% y, tras los subcultivos sucesivos en medio de enraizamiento selectivo, sobrevive el 25% de las plantas. De esta forma, al final del experimento, seleccionamos 7 plantas del cultivar 'Marketer' como presuntas transgénicas (Tabla 20; Figura 18).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con 'Marketer', en la segunda parte del experimento se inocularon explantes del cultivar 'Negrito' con la misma cepa de *Agrobacterium* (LBA4404), pero en este caso sólo se efectuó el proceso de selección en



medio con 25 mg/l de kanamicina. Con respecto a los resultados obtenidos con 'Marketer', la frecuencia de callos con brotes en el cultivar 'Negrito' fue cuatro veces mayor (en torno al 15 %), aunque el porcentaje de plantas que fueron capaces de sobrevivir tras repetidos subcultivos en medio MB3 selectivo fue menor, en torno al 14 % (Tabla 20). Aún así, al final del experimento seleccionamos 4 plantas de 'Negrito' como presuntas transgénicas (Tabla 20 y Figura 18).

El análisis PCR con sondas correspondientes a la secuencia del gen *nptII* indicó la presencia del marcador en dos de las plantas seleccionadas del cultivar 'Marketer' (Tabla 21 y Figura 19).

Los resultados del análisis de expresión del gen marcador mediante lo que denominamos como 'test de ápice' (cultivo del ápice terminal o de yemas axilares de las plantas seleccionadas al final del experimento en medio MB3 con kanamicina) y 'test de explante' (cultivo de segmentos de hoja de estas mismas plantas en los medios B 10 (cv. 'Marketer') y IB 05 10 (cv. 'Negrito') con kanamicina) no fueron totalmente concluyentes (ver Tabla 21). Por lo que respecta al 'test de ápice', la parte aérea de todas las plantas seleccionadas como presuntas transgénicas se desarrollaba con aparente normalidad pero no sucedía lo mismo con la parte radicular. En efecto, solo una planta del cultivar 'Negrito' desarrolló un sistema radicular adventicio aparentemente normal en medio selectivo, mientras que tres del cultivar 'Marketer' emitían raíces que tardaban en crecer, aunque al final originaban un sistema radicular adventicio aceptable.

Cuando se cultivaron explantes de hoja de las plantas seleccionadas en los medios B 10 (cv. 'Marketer') y IB 05 10 (cv. 'Negrito') con 25 mg/l de kanamicina, se observó que algunos generaban una callosidad e incluso diferenciaban yemas adventicias, pero no llegaron a dar un callo profuso ni una respuesta organogénica normal.

Conviene señalar que a la hora de efectuar la lectura del 'test de ápice' en medio MB3 selectivo o del 'test de explante' en los medios de inducción de organogénesis selectivos, los criterios eran muy restrictivos. Es decir, solo consideramos como 'positivo' aquellos casos en los que los ápices o los explantes de las plantas consideradas como presuntas transgénicas tenían una respuesta en medio selectivo (i.e. con kanamicina) idéntica a la

de los ápices o los explantes de plantas testigo cultivados en medio no selectivo (i.e. sin kanamicina).

Por lo que se refiere al menor desarrollo radicular de las plantas seleccionadas en el 'test de ápice' conviene hacer una aclaración. Cuando las plantas de pepino se subcultivan repetidamente en una cámara de cultivo *in vitro* con fotoperiodo largo (16h luz/ 8 h oscuridad), que es el que utilizamos en nuestro laboratorio, es habitual que florezcan de manera temprana (ver las dos plantas de la figura 18).

El problema es que la floración temprana, más o menos frecuente dependiendo del cultivar o variedad de pepino, está asociada a un menor desarrollo radicular. Esto supone un verdadero problema a la hora de llevar a cabo el 'test de ápice' en plantas consideradas como presuntas transgénicas. En efecto, para estar razonablemente seguro de que la planta es transgénica, lo mejor es subcultivar varias veces en medio de enraizamiento selectivo: si enraíza con normalidad la experiencia que hemos adquirido en el laboratorio con distintas hortícolas indica que la planta es transgénica; no obstante, en el caso particular del pepino, al cabo de unos pocos subcultivos con fotoperiodo largo, lo normal es que las plantas florezcan de manera temprana, lo que limita el desarrollo de raíces adventicias y genera dudas en torno a la naturaleza de dichas plantas.

En cualquier caso, a la hora de interpretar los resultados globales de este experimento surge la duda de si las plantas seleccionadas como 'presuntas transgénicas' eran realmente transgénicas o se trataba de 'escapes'.

Las causas de aparición de escapes en diversas especies, entre las que por desgracia se encuentra el pepino, se comentarán con cierto detalle en el apartado de Discusión. No obstante, aunque sea de forma breve, conviene hacer un comentario preliminar de dos de estas causas con relación al presente experimento.

Por un lado, el silenciamiento del gen marcador *nptII*, como consecuencia de la integración de varias copias del T-DNA o debido a la presencia de una copia truncada, podría explicar la aparente incoherencia de los resultados de la PCR (Figura 19) y de los análisis de expresión del marcador obtenidos mediante el 'test de ápice' y 'test de explante' (Tabla 21). Al respecto, conviene señalar que la PCR (Figura 19) se hacía con

hojas de las plantas que habían sobrevivido, es decir, las que procedían directamente de los brotes tras su elongación y enraizamiento, mientras que los análisis de expresión (Tabla 21) se hacían tras diversos subcultivos de los ápices o yemas axilares en medio selectivo ('test de ápice') o con hojas de estas mismas plantas ('test de explante').

El silenciamiento postranscripcional suele amplificarse con el tiempo (i.e. con los subcultivos repetidos o con las sucesivas generaciones) porque, cuando hay un excesivo número de copias del T-DNA o una copia truncada con una estructura aberrante, los pequeños RNAs de tipo interferente se acumulan de manera progresiva. Si fuera esta la causa, sería lógico que aparecieran plantas PCR (+) que, más adelante, es decir, tras repetidos subcultivos, dieran un resultado negativo o no totalmente positivo en los análisis de expresión del gen marcador (test de ápice y test de explante).

La argumentación parece lógica, pero no creemos que sea la causa en todos los casos. Nuestros resultados en experimentos de transformación de diversas hortícolas (tomate, melón y sandía) con la cepa LBA4404, en los que hemos empleado diversos vectores, revelan que, en general, el número de copias integradas es moderado. Por ejemplo, en el programa de mutagénesis insercional de tomate el grupo ha generado más de 7.000 líneas T-DNA y los análisis efectuados con una muestra considerable de estas plantas revelan que el número medio de insertos es 1,7 (Dr. Moreno, comunicación personal). Es decir, lo normal es que se integren una o dos copias del T-DNA. Ciertamente, se han encontrado algunas plantas con varios insertos (e.g. 4 a 7) y, en ocasiones, alguna línea T-DNA tiene un inserto truncado o con estructura aberrante, pero esto no es lo habitual. Así pues, la hipótesis del silenciamiento del gen marcador puede explicar los resultados obtenidos con alguna o algunas plantas de pepino, pero difícilmente con todas.

Otra hipótesis, en nuestra opinión más probable, es la del quimerismo. Puede que, tras la integración del T-DNA en algunas células del explante original, y a medida que avanza el proceso de formación de callo, se produzca la concrecencia entre células que derivan de la célula transgénica original y células *wild-type* (i.e. no transgénicas). En este caso puede haber una protección cruzada de las células transgénicas con respecto a las *wild-type* y, si así ocurre, es posible que durante el proceso de diferenciación aparezcan yemas y brotes quiméricos. Estos brotes podrían dar quimeras mericlinales o sectoriales, lo cual explicaría

el que la PCR detecte la presencia del marcador al principio, aunque la resistencia a la kanamicina se vaya diluyendo con el tiempo. En teoría, el subcultivo repetido en medio selectivo debería extender el sector de células transgénicas, pero esto va a depender de la estructura de la quimera original. Por otro lado, si la hipótesis del quimerismo es correcta podría haber alguna planta PCR(-) que, a pesar de ello, enraíce con normalidad, tal y como de hecho ocurre en una planta concreta (ver Tabla 21). Lo que podría haber ocurrido en este caso es que la muestra que se tomó para la PCR derivara de una hoja que procedía de una yema axilar sin células transgénicas, mientras que algunas de las raíces adventicias surgieron a partir de un sector con células transgénicas.

**Tabla 20.** Efecto de la concentración de kanamicina sobre explantes de cotiledón inoculados con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que porta el plásmido pBIN19.

Cultivar	Concentración de kanamicina <sup>(*1)</sup>	% de callos con brotes <sup>(*2)</sup>	% de plantas que sobreviven <sup>(*3)</sup>	Nº de plantas seleccionadas <sup>(*4)</sup>
Marketer	25 mg/l	3,78 ± 0,99	25,93 ± 8,59	7
	50 mg/l	1,96 ± 0,97	0	0
	75 mg/l	0,50 ± 0,50	0	0
Negrito	25 mg/l	15,21 ± 2,75	13,79 ± 6,52	4

(\*1) Concentración de kanamicina en el medio de inducción de organogénesis (IB 05 25), medio de elongación (K02) y medio de enraizamiento (MB3).

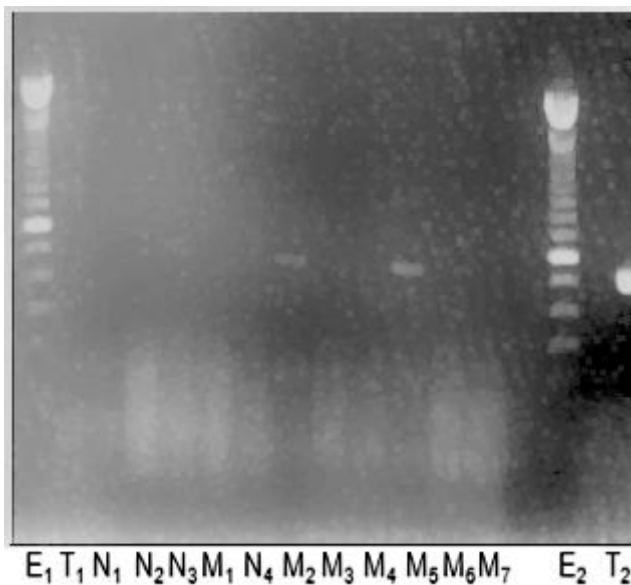
(\*2) Porcentaje de callos con brotes tras el subcultivo de los que habían diferenciado yemas adventicias en el medio de inducción (IB 05 25) al medio de desarrollo y elongación (K02) con la concentración de kanamicina indicada.

(\*3) Porcentaje de plantas que sobreviven tras varios subcultivos (ápice terminal y yemas axilares) en medio de enraizamiento (MB3) con la concentración de kanamicina indicada.

(\*4) Número de plantas seleccionadas como presuntas transgénicas al final del experimento.



**Figura 18.** Plantas de los cultivares 'Marketer' y 'Negrito' seleccionadas como presuntas transgénicas tras el cultivo en los medios de inducción de organogénesis, elongación y enraizamiento suplementados con 25 mg/l de kanamicina.



**Figura 19.** Análisis PCR con una sonda del gen *nptII* de hojas de las plantas seleccionadas tras el proceso de transformación genética de los cultivares 'Marketer' y 'Negrito' con una cepa de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIN19. E1 y E2: escalera 100pb (patrón). Plantas del cultivar 'Marketer': M1 (5c 1.3), M2 (6a 1.2), M3 (6a 2.1), M4 (6a 2.3), M5 (6a 2.4), M6 (6b 1.4) y M7 (9f 1.1). Plantas del cultivar Negrito: N1 (2.5.1), N2 (4.1.1.1), N3 (4.1.2.1) y N4 (6.1.5). T1: testigo negativo; T2: testigo positivo (sonda *nptII*).

**Tabla 21.** Ensayos con plantas seleccionadas como presuntas transgénicas: test de ápice y test de explante en medio con kanamicina y análisis por PCR.

Cultivar	Plantas (*1)	Test de ápice (*2)		Test de explante (*3)						PCR (*4)
		Parte aérea	Sistema radicular	Callos		Yemas		Brotos		
				Kan 0	Kan 25	Kan 0	Kan 25	Kan 0	Kan 25	
Marketer	5c 1.3	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	6a 1.2	+	±	+	±	+	-	+	-	+
	6a 2.1	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	6a 2.3	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	6a 2.4	+	±	+	±	+	±	+	-	+
	6b 1.4	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	9f 1.1	+	±	+	-	+	-	+	-	-
Negrito	2.5.1	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	4.1.1.1	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	4.1.2.1	+	+	+	-	+	-	+	-	-
	6.1.5	+	-	+	-	+	-	+	-	-

(\*1) Plantas seleccionadas inicialmente como presuntas transgénicas.

(\*2) Test de ápice: desarrollo de la parte aérea y de la parte radicular en plantas subcultivadas varias veces (a partir del ápice terminal o de yemas axilares de las plantas inicialmente seleccionadas como presuntas transgénicas) en medio base MB3 suplementado con 25 mg/l de kanamicina.

(\*3) Test de explante: cultivo de segmentos de hojas de plantas subcultivadas varias veces en medio de enraizamiento selectivo. Este test se realizó en los medios B 10 (cv. 'Marketer') y IB 05 10 (cv. 'Negrito') con 0 o 25 mg/l de kanamicina (Kan 0 y Kan 25, respectivamente).

(\*4) Análisis PCR: reacción en cadena de la polimerasa con una sonda correspondiente al gen marcador *nptII* (ver Figura 19).

### **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**

#### **2.1.3.1. Efecto de la duración del co-cultivo sin presión de selección y del medio inductor de organogénesis con presión selectiva**

La cepa C8 de *Agrobacterium tumefaciens* suele considerarse como más virulenta que la LB4404. En principio, la mayor virulencia de una cepa puede estar asociada a mayor tasa de transformación, lo que resulta positivo; no obstante, a veces es difícil erradicar este tipo de cepas mediante el tratamiento con antibióticos convencionales. Aún así, nuestra experiencia previa indicaba que la erradicación de la cepa C58 no supone un problema limitante.

A fin de ensayar nuevas condiciones experimentales, se realizaron algunos cambios en el protocolo de transformación. En primer lugar, se utilizó un vector diferente (pBIG121-Hm) que contiene dos genes marcadores, *nptII* (resistencia a la kanamicina) y *hpt* (resistencia a higromicina), así como el gen delator *uidA-int* o *GUS-intrón*.

En este experimento, la selección se realizó sobre la base de la expresión del gen *nptII*, aunque, tal y como se comentará más adelante, en experimentos posteriores ensayamos también la selección en medio con higromicina.

La ventaja de este vector respecto al anterior no solo estriba en la posibilidad de efectuar la selección con dos antibióticos diferentes (kanamicina o higromicina), sino también en el hecho de que porta el gen delator *uidA-int*. La expresión del gen delator facilita el seguimiento del proceso de transformación a lo largo del tiempo, el análisis de las plantas regeneradas y, además, esta versión del gen *uidA-int* evita falsos positivos, ya que la bacteria no es capaz de procesar correctamente el gen, es decir, no puede efectuar el proceso de corte de intrones y empalme de exones (*splicing*) característico de las células eucarióticas.

Como explantes primarios se emplearon segmentos de cotiledón de plántulas de 7 días. No se modificó el periodo de precultivo de los explantes (6-8 horas), pero sí hicimos algunos cambios en el proceso de infección o inoculación de los explantes con *Agrobacterium*. En concreto, la densidad óptica de la suspensión bacteriana (DO<sub>600</sub>) se

ajustó a 0,2-0,3 (en lugar de 0,7-0,8) a fin de estar seguros de que la bacteria estuviera en la fase temprana de crecimiento exponencial y no hubiera llegado a la fase estacionaria. La mayor parte de autores coincide en que hay que evitar que la bacteria haya llegado a la fase estacionaria, pero no todos coinciden en el valor óptimo de la densidad óptica. Algunos recomiendan valores que se correspondan con la fase media del crecimiento exponencial (Bondt et al., 1994, 1996), mientras que otros se inclinan por valores asociados a la fase temprana (Qiu et al., 2007; Dutt y Grosser, 2009; Tian et al., 2013). Por su parte, Islam et al. (2010) opinan que los valores óptimos dependen de la cepa de *Agrobacterium*.

Al disminuir la densidad óptica del inóculo bacteriano, aumentamos el periodo de infección (10 minutos). Conviene señalar también que modificamos el pH del medio LB (7,0) porque algunos autores han señalado que es el óptimo para el crecimiento de *Agrobacterium* (Cheng et al., 1997; Park et al., 2010).

Aparte de los cambios mencionados, ensayamos el efecto de un co-cultivo sin presión de selección (i.e. sin kanamicina) durante un periodo de 1, 3 y 5 días. Asimismo, utilizamos tres medios de inducción de organogénesis con 25 mg/l de kanamicina: B25 (MB3 + 2,5 mg/l de 6-benciladenina); IB 005 25 (MB3 + 0,05 mg/l de ácido indol-3-acético + 2,5 mg/l de 6-benciladenina); IB 05 25 (MB3 + 0,5 mg/l de ácido indol-3-acético + 2,5 mg/l de 6-benciladenina).

A lo largo del experimento se evaluaron distintas variables. En primer lugar, se contabilizó el número de callos nodulares que se originaban a partir de los explantes inoculados con *Agrobacterium*. Al respecto conviene aclarar que, tal y como se ha comentado antes, el término 'callo nodular' alude a un callo en el que aparecen zonas semi-compactas en las que usualmente se produce la diferenciación de yemas adventicias y brotes.

Como puede verse en la Tabla 22, en los tres medios de inducción de organogénesis, el porcentaje de explantes con callos nodulares osciló entre el 30-39 % (1 día de precultivo), 65-90 % (3 días de precultivo) y 58-86 % (5 días de precultivo). Es decir, en general, a medida que se alarga el periodo de co-cultivo aumenta la frecuencia de explantes con callos nodulares.



Se realizaron análisis histoquímicos (X-Gluc) para detectar la expresión del gen delator *uidA-int*. Los resultados indicaron que la gran mayoría de los callos nodulares presentan grupos de células con expresión GUS (Figura 20). En efecto, en los tres medios de inducción de organogénesis, el porcentaje de callos nodulares con expresión GUS+ osciló entre el 79-95 % con 1 día de precultivo, 97-98 % con 3 días de precultivo y 100 % con 5 días de precultivo (Tabla 22).

Los resultados indican que, al prolongar la duración del co-cultivo con *Agrobacterium*, aumenta el número de callos nodulares. No obstante, conviene tener en cuenta que al prolongar la duración del co-cultivo aumenta la probabilidad de contaminación, ya que la erradicación de la bacteria se hace más difícil. Si se tiene en cuenta que, con independencia del periodo de co-cultivo, la gran mayoría de los callos nodulares (80 - 100 %) tiene uno o más grupos de células con expresión GUS+ (Tabla 22), en nuestra opinión conviene evitar un periodo de co-cultivo excesivamente prolongado y por ello nos inclinamos por una duración de 1 a 3 días.

Para una duración dada del periodo de co-cultivo, no se observó un efecto claro del medio de inducción de organogénesis (B 25, IB 005 25, IB 05 25) con presión selectiva (25 mg/l de kanamicina) sobre el porcentaje de explantes que dan callos, el porcentaje de explantes con callos GUS+ y el porcentaje de callos nodulares con grupos de células GUS+ (Tabla 22). De la misma forma, tras el subcultivo de los explantes con yemas al medio de elongación selectivo (K02 + 25 mg/l de kanamicina) no se apreciaron notables diferencias en el porcentaje de callos con brotes con respecto al número de explantes inoculados (2 - 4 %) y con relación al número de callos nodulares (3 - 9 %) (Tabla 23).

Al final del experimento, se seleccionaron 10 plantas: 2 procedentes de explantes co-cultivados durante un día, 5 durante tres días y 3 durante cinco días (Tabla 23). El análisis PCR en dos de las plantas que procedían del co-cultivo de explantes durante tres días reveló la presencia del gen *nptII* en los tejidos de dichas plantas (Figura 21).

**Tabla 22.** Efecto del co-cultivo sin presión de selección y del medio de inducción de organogénesis con presión selectiva (25 mg/l de kanamicina) sobre la expresión del gen delator *uidA-int* en los callos seleccionados <sup>(\*1)</sup>.

Días de co-cultivo sin PS <sup>(*2)</sup>	Medios de cultivo <sup>(*3)</sup>	nº de explantes <sup>(*4)</sup>	nº de callos nodulares <sup>(*5)</sup>	nº de callos GUS+ <sup>(*6)</sup>	% explantes con callos <sup>(*7)</sup>	% explantes con callos GUS+ <sup>(*8)</sup>	% callos con zonas GUS+ <sup>(*9)</sup>
1	B 25	65	22	21	33,8	32,3	95,5
	IB 005 25	59	23	19	38,9	32,2	82,6
	IB 05 25	65	19	15	29,2	23,1	78,9
3	B 25	88	74	72	84,1	81,8	97,3
	IB 005 25	46	30	29	65,2	63,0	96,7
	IB 05 25	65	58	57	89,2	87,7	98,3
5	B 25	38	22	22	57,9	57,9	100
	IB 005 25	46	32	32	69,6	69,6	100
	IB 05 25	71	61	61	85,9	85,9	100

(\*1) El experimento de co-cultivo se llevó a cabo con segmentos de cotiledón del cultivar 'Marketer' y la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIG121-Hm.

(\*2) Número de días de co-cultivo de los explantes en los medios de inducción de organogénesis sin presión selectiva.

(\*3) Medios de inducción de organogénesis: B25 = MB3 (Moreno et al., 1985) + 2,5 mg/l de 6-BA; IB 005 25 = MB3 + 0,05 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA; IB 05 25 = MB3 + 0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA. En los tres casos, el medio se suplementó con 25 mg/l de kanamicina.

(\*4) Número de explantes inoculados la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIG121-Hm.

(\*5) Número de callos 'nodulares'. El término 'nodular' alude a los callos que originan zonas compactas que habitualmente diferencian yemas adventicias.

(\*6) Número de callos 'nodulares' que tienen zonas o grupos de células GUS+.

(\*7) Porcentaje de explantes con callos 'nodulares'.

(\*8) Porcentaje de explantes con callos 'nodulares' que tienen zonas o grupos de células GUS+.

(\*9) Porcentaje de callos 'nodulares' (respecto al número total de callos) que tienen zonas o grupos de células GUS+.

**Tabla 23.** Efecto del co-cultivo sin presión de selección y del medio de inducción de organogénesis con 25 mg/l de kanamicina sobre el porcentaje de callos con brotes y el número de plantas seleccionadas como presuntas transgénicas <sup>(\*1)</sup>.

Días de co-cultivo <sup>(*2)</sup>	Medios de inducción de organogénesis <sup>(*3)</sup>	% de callos con brotes <sup>(*4)</sup>		Nº de plantas seleccionadas <sup>(*5)</sup>
		respecto al nº de explantes	respecto al nº de callos 'nodulares'	
1	B 25	0	0	0
	IB 005 25	3,39 ± 2,38	8,70 ± 6,01	2
	IB 05 25	0	0	0
3	B 25	2,27 ± 1,60	2,70 ± 1,90	2
	IB 005 25	4,35 ± 3,04	6,67 ± 4,63	3
	IB 05 25	0	0	0
5	B 25	0	0	0
	IB 005 25	2,17 ± 2,17	3,13 ± 3,13	1
	IB 05 25	2,82 ± 1,98	3,28 ± 2,30	2

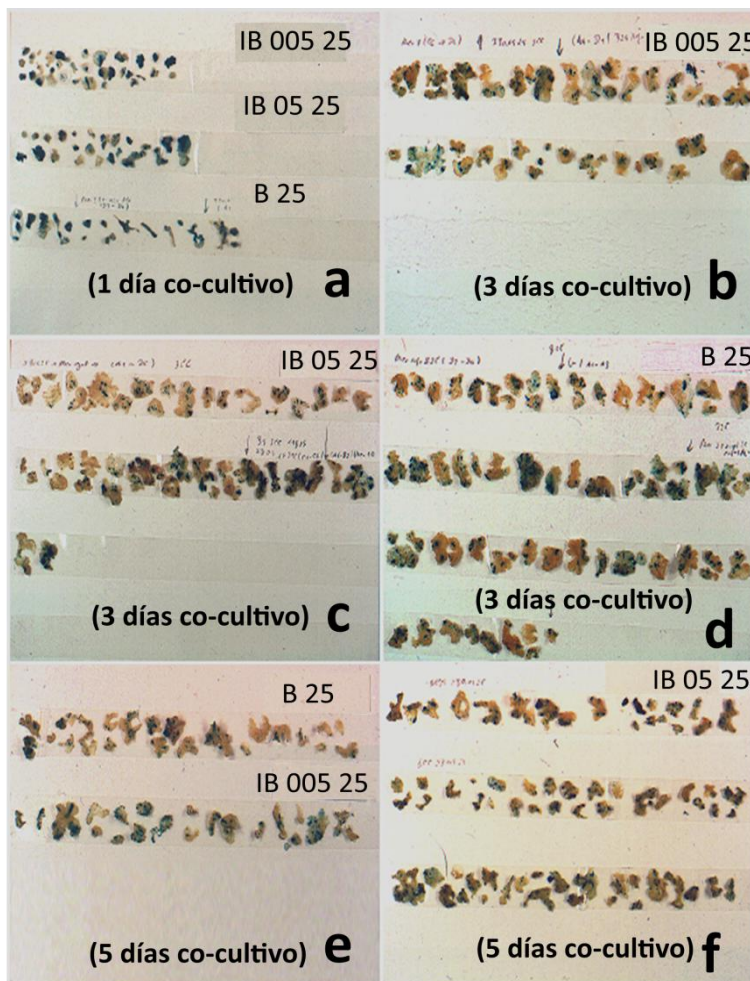
(\*1) El experimento de co-cultivo se llevó a cabo con segmentos de cotiledón del cultivar 'Marketer' y la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIG121-Hm.

(\*2) Número de días de co-cultivo de los explantes en los medios de inducción de organogénesis sin presión selectiva.

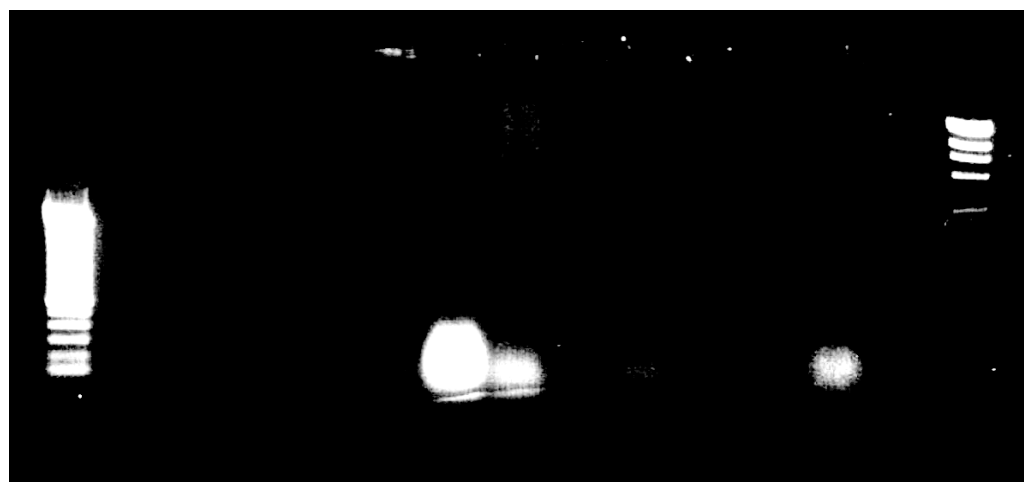
(\*3) Medios de inducción de organogénesis: B25 = MB3 (Moreno et al., 1985) + 2,5 mg/l de 6-BA; IB 005 25 = MB3 + 0,05 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA; IB 05 25 = MB3 + 0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA. En los tres casos, el medio se suplementó con 25 mg/l de kanamicina.

(\*4) Porcentaje de callos con brotes en el medio de elongación (K02) con 25 mg/l de kanamicina. Los datos están referidos al número total de explantes inoculados y al número de callos 'nodulares'. El término 'nodular' alude a los callos que originan zonas compactas que habitualmente diferencian yemas adventicias.

(\*5) Número de plantas seleccionadas como presuntas transgénicas al final del experimento.



**Figura 20.** Ensayo histoquímico con X-Gluc de la expresión del gen delator *uidA-int* en callos seleccionados tras la inoculación de explantes del cultivar 'Marketer' con la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIG121-Hm. **(a)** Co-cultivo durante 1 día en los medios de inducción IB 005 25, IB 05 25 y B 25; **(b)** Co-cultivo durante tres días en el medio IB 005 25; **(c)** Co-cultivo durante 3 días el medio IB 05 25; **(d)** Co-cultivo durante 3 días en el medio B 25; **(e)** Co-cultivo durante 5 día en los medios B 25 e IB 005 25; **(f)** Co-cultivo durante 5 días en el medio IB 05 25.



**Figura 21.** Análisis PCR con una sonda del gen *nptII* de muestras de plantas seleccionadas tras el proceso de transformación genética del cultivar 'Marketer' con la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIG121-Hm. E1 y E2: escalera 100pb (patrón). Plantas PCR (+): 5.5.2 y 8.1. T1: testigo negativo. T2: Testigo positivo (sonda *nptII*).

### **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**

A la hora de decidir la forma de llevar a cabo el co-cultivo de explantes primarios con *Agrobacterium*, algunos autores optan por aplicar una presión de selección en esta etapa, pero la mayoría suele hacerlo tras el lavado de los explantes y su transferencia al medio inductor de morfogénesis.

Por lo que a nosotros se refiere, en los dos primeros experimentos optamos por un co-cultivo sin presión de selección. La diferencia entre ambos fue que en el segundo experimento ensayamos distintos periodos de co-cultivo (1, 3 y 5 días). Los resultados indicaron que al prolongar la duración del co-cultivo aumentaba la frecuencia de callos con grupos de células GUS (+). En principio, esto es ventajoso, pero, dada la frecuencia de aparición de escapes en pepino, el empleo de un co-cultivo largo sin presión selectiva puede agravar este problema. Por este motivo, en la primera parte de este experimento optamos por realizar un co-cultivo mixto, es decir, dividimos esta fase en dos etapas: la primera sin presión de selección (1 día), y la segunda, de duración variable (1, 2, 4 y 5 días), con presión de selección (25 mg/l de kanamicina).

Por otro lado, cuando se lleva a cabo el proceso de selección en medio inductor de morfogénesis, lo habitual es imponer la presión de selección desde el primer día. En teoría, esto tiene la ventaja de que se genera una selección en contra de las células *wild-type* desde el principio del periodo de incubación; no obstante, si el número de eventos independientes de transformación es bajo puede ocurrir que las células que han integrado el T-DNA tengan dificultades para entrar en división debido a un problema de densidad crítica inicial. Como consecuencia, en la segunda parte del experimento decidimos hacer un proceso de selección mixto. Es decir, tras un co-cultivo sin presión de selección (1 día), los explantes se lavaron y se transfirieron al medio de inducción de organogénesis, dividiendo esta fase en dos etapas: la primera, de duración variable (1, 2, 3, 4 y 5 días), sin presión de selección; y la segunda (3-4 semanas) con presión de selección (25 mg/l de kanamicina).

En realidad, se trata de dos experimentos distintos, en cada uno de los cuales se plantea una cuestión diferente. No obstante, como se realizaron al mismo tiempo, con el mismo

material y en las mismas condiciones, los resultados se presentan en este apartado como si se tratara de dos partes del mismo experimento.

El co-cultivo de explantes se llevó a cabo con segmentos de cotiledón del cultivar 'Marketer' y la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIG121-Hm. Las restantes condiciones experimentales fueron idénticas a las descritas en el apartado anterior con una excepción: en este caso, por el tiempo en que los explantes se mantenían sin presión de selección en la fase de co-cultivo o en el medio de inducción de organogénesis, decidimos aumentar la concentración de cefotaxima a 600 mg/l para impedir el crecimiento de *Agrobacterium*.

Conviene aclarar que, para la anotación de los resultados y la exposición de los mismos en las Tablas 24 a 27, decidimos denominar de forma arbitraria a las dos partes del experimento como A (co-cultivo mixto) y B (selección mixta). Además, en este experimento no solo evaluamos la existencia o no de grupos de células GUS (+) en los callos procedentes de los explantes inoculados con *Agrobacterium*, sino que también intentamos estimar la superficie de las zonas GUS (+) en estos mismos callos. De esta forma, tratamos de cuantificar el grado de expresión, ya que no es lo mismo que en un callo aparezca una célula o un pequeño grupo de células GUS (+), lo que podría representar expresión transitoria, que una masa de células con tinción GUS (+), lo que normalmente va a ser debido a integración y expresión estable del gen delator que porta el T-DNA.

Para estimar la extensión de las zonas GUS (+), se seccionaron y fotografiaron todos los callos, y se cuantificó el número de píxeles de color azul intenso, despreciando cualquier punto con tinción tenue o dudosa. Este método tiene la evidente limitación de que a la hora de estimar la extensión de las zonas GUS (+) solo se tiene en cuenta la superficie de corte del callo y no el interior del mismo, donde puede haber un buen número de células GUS (+). Aún así, pensamos que el esfuerzo merecía la pena porque puede dar una idea del número de células con expresión del delator y, sobre todo, distinguir entre la presencia de una o pocas células GUS (+), lo que puede ser debido a expresión transitoria, o de grandes grupos de células GUS (+), lo que suele estar asociado a integración estable.

Por lo que respecta a la primera parte del experimento, tal y como hemos indicado, el co-cultivo mixto (A) se realizó con una primera fase sin presión de selección (1 día) seguida de una segunda fase con 25 mg/l de kanamicina durante 1 día (A1), 2 días (A2), 4 días (A4) y 5 días (A5). Los resultados mostraron que la frecuencia de explantes con callo fue mayor cuando los segmentos de cotiledón se co-cultivaron durante dos o más días con presión de selección (85 - 100 %) y lo mismo sucedió con la frecuencia de explantes que originan callos GUS (+) (65 - 70 %) (Tabla 24). Por lo que respecta a la extensión de la respuesta, la superficie total ocupada por células con expresión del delator es tres veces mayor cuando el co-cultivo implica dos días con presión selectiva que con un solo día. De forma similar, cuando el periodo con presión selectiva es de cuatro días la superficie total con células GUS (+) es más del doble que con un solo día en medio con kanamicina (Tabla 25). No se obtiene en cambio ningún beneficio cuando se alarga la fase de co-cultivo con presión selectiva (i.e. 5 días). Si se consideran las variables relacionadas con la superficie con células GUS (+) por explante o por callo, las conclusiones son similares, es decir, los mejores resultados se obtienen con dos o cuatro días con presión de selección en el co-cultivo mixto (Tabla 25).

En la segunda parte del experimento ensayamos el efecto de un proceso de selección mixto (B), es decir, los explantes se incubaron en medio de inducción de organogénesis, primero sin presión selectiva, durante 1 día (B1), 2 días (B2), 3 días (B3), 4 días (B4) y 5 días (B5), y, a continuación, durante 3-4 semanas en el mismo medio con 25 mg/l de kanamicina. Como puede verse en la Tabla 26, el porcentaje de explantes con callos fue aumentando a medida que se alarga el periodo sin presión de selección (de 1 a 5 días) y lo mismo sucedió con la variable de la frecuencia de explantes con callos GUS (+). Cuando se estimó la superficie total ocupada por grupos de células GUS (+) las conclusiones fueron básicamente las mismas. En efecto, con respecto a lo que ocurre cuando los explantes se incuban un solo día sin presión selectiva, el área con grupos de células GUS (+) es tres o cuatro veces mayor cuando los explantes se mantienen durante dos, tres o cuatro días sin kanamicina (Tabla 27). Los resultados sugieren, pues, que el mantenimiento de los explantes en el medio inductor de organogénesis sin presión selectiva durante un corto periodo (2 a 4 días) puede ser favorable, al menos en lo que se refiere al número de células o grupos de células con expresión del delator.

**Tabla 24.** Efecto de un co-cultivo mixto (primera etapa sin presión de selección y segunda con 25 mg/l de kanamicina) sobre la expresión del gen delator *uidA-int* en los callos seleccionados <sup>(\*1)</sup>.

Co-cultivo mixto (A) ( <sup>*2</sup> )	nº de explantes ( <sup>*3</sup> )	nº de callos ( <sup>*4</sup> )	nº callos GUS+ ( <sup>*5</sup> )	% explantes con callos ( <sup>*6</sup> )	% explantes con callos GUS+ ( <sup>*7</sup> )	% callos con zonas GUS+ ( <sup>*8</sup> )
A1 1 día PS(-) → 1 día PS(+)	72	47	41	65,3	56,9	87,2
A2 1 día PS(-) → 2 días PS(+)	71	61	45	85,9	63,4	73,8
A4 1 día PS(-) → 4 días PS(+)	72	71	49	98,6	68,1	69,0
A5 1 día PS(-) → 5 días PS(+)	19	18	13	94,7	68,4	72,2

(\*1) El experimento de co-cultivo se llevó a cabo con segmentos de cotiledón del cultivar 'Marketer' y la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIG121-Hm.

(\*2) Proceso de co-cultivo mixto (A): Se realizó con una primera fase sin presión de selección (PS-) durante 1 día seguida de una segunda fase con presión de selección (PS+), es decir, con 25 mg/l de kanamicina durante 1 día (A1), 2 días (A2), 4 días (A4) y 5 días (A5).

(\*3) Número de explantes inoculados con la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el vector pBIG121-Hm.

(\*4) Número de callos 'nodulares'.

(\*5) Número de callos 'nodulares' con zonas o grupos de células GUS+.

(\*6) Porcentaje de explantes con callos 'nodulares' con respecto a los explantes inoculados.

(\*7) Porcentaje de explantes con callos 'nodulares' que tienen zonas o grupos de células GUS+.

(\*8) Porcentaje de callos 'nodulares' (respecto al número total de callos) con grupos de células GUS+.



**Tabla 25.** Efecto de un co-cultivo mixto (primera etapa sin presión de selección y segunda con 25 mg/l de kanamicina) sobre la extensión de las zonas con expresión del gen delator *uidA-int* en los callos seleccionados <sup>(\*1)</sup>.

Co-cultivo mixto (A) (*2)	nº explantos (*3)	nº de callos (*4)	nº callos GUS+ (*5)	Área Gus + total (*6)	Área Gus + por explante (*7)	Área Gus + por callo (*8)	Área Gus + por callo Gus+ (*9)
A1 1 día PS(-) → 1 día PS(+)	72	47	41	6478	89,9	137,8	158,0
A2 1 día PS(-) → 2 días PS(+)	71	61	45	17515	246,7	287,1	389,2
A4 1 día PS(-) → 4 días PS(+)	72	71	49	15365	213,4	216,4	313,6
A5 1 día PS(-) → 5 días PS(+)	19	18	13	3740	196,8	207,8	287,7

- (\*1) El experimento de co-cultivo se llevó a cabo con segmentos de cotiledón del cultivar 'Marketer' y la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIG121-Hm.
- (\*2) Proceso de co-cultivo mixto (A): Se realizó con una primera fase sin presión de selección (PS-) durante 1 día seguida de una segunda fase con presión de selección (PS+), es decir, con 25 mg/l de kanamicina durante 1 día (A1), 2 días (A2), 4 días (A4) y 5 días (A5).
- (\*3) Número de explantes inoculados con la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el vector pBIG121-Hm.
- (\*4) Número de callos 'nodulares'.
- (\*5) Número de callos 'nodulares' con zonas o grupos de células GUS+.
- (\*6) Extensión total del área GUS+ estimada mediante el recuento de píxeles (resolución de la imagen digital: 500,125 píxeles por pulgada (ppi)).
- (\*7) Extensión del área GUS+ por explante estimada mediante el recuento de píxeles.
- (\*8) Extensión del área GUS+ por callo estimada mediante el recuento de píxeles.
- (\*9) Extensión del área GUS+ por callo GUS + estimada mediante el recuento de píxeles.

**Tabla 26.** Efecto de un proceso de selección mixto (primera etapa sin presión de selección y segunda con 25 mg/l de kanamicina) sobre la expresión del gen delator *uidA-int* en los callos seleccionados (\*1).

Selección mixta (*2)	nº de explantes (*3)	nº de callos (*4)	nº callos GUS+ (*5)	% explantes con callos (*6)	% explantes con callos GUS+ (*7)	% callos con zonas GUS+ (*8)
B1 1 día PS(-) → 4 semanas PS(+)	72	16	14	22,2	19,4	87,5
B2 2 días PS(-) → 4 semanas PS(+)	71	31	26	43,7	36,6	83,9
B3 3 días PS(-) → 4 semanas PS(+)	65	43	34	66,2	52,3	79,1
B4 4 días PS(-) → 4 semanas PS(+)	76	73	42	96,1	55,3	57,5
B5 5 días PS(-) → 4 semanas PS(+)	18	18	12	100	66,7	66,7

(\*1) El experimento de co-cultivo se llevó a cabo con segmentos de cotiledón del cultivar 'Marketer' y la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIG121-Hm.

(\*2) Proceso de selección mixto (B): Los explantes se incubaron en medio de inducción de organogénesis, primero sin presión selectiva (PS-) durante 1 día (B1), 2 días (B2), 3 días (B3), 4 días (B4) y 5 días (B5), y, a continuación, 3-4 semanas en el mismo medio con presión de selección (PS+), es decir, con 25 mg/l de kanamicina.

(\*3) Número de explantes inoculados con la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el vector pBIG121-Hm.

(\*4) Número de callos 'nodulares'.

(\*5) Número de callos 'nodulares' con zonas o grupos de células GUS+.

(\*6) Porcentaje de explantes con callos 'nodulares' con respecto a los explantes inoculados.

(\*7) Porcentaje de explantes con callos 'nodulares' que tienen zonas o grupos de células GUS+.

(\*8) Porcentaje de callos 'nodulares' (respecto al número total de callos) con grupos de células GUS+.

**Tabla 27.** Efecto de un proceso de selección mixto (primera etapa sin presión de selección y segunda con 25 mg/l de kanamicina) sobre la extensión de las zonas con expresión del gen delator *uidA-int* en los callos seleccionados (\*1).

Selección mixta (B) (*2)	nº explantes (*3)	nº de callos (*4)	nº callos GUS+ (*5)	Área Gus + total (*6)	Área Gus + por explante (*7)	Área Gus + por callo (*8)	Área Gus + por callo Gus+ (*9)
B1 1 día PS(-) → 4 semanas PS(+)	72	16	14	3475	48,3	217,2	248,2
B2 2 días PS(-) → 4 semanas PS(+)	71	31	26	13538	190,7	436,7	520,7
B3 3 días PS(-) → 4 semanas PS(+)	65	43	34	11898	183,5	276,7	349,9
B4 4 días PS(-) → 4 semanas PS(+)	76	73	42	10833	142,5	148,4	257,9
B5 5 días PS(-) → 4 semanas PS(+)	18	18	12	1706	94,8	94,8	142,2

- (\*1) El experimento de co-cultivo se llevó a cabo con segmentos de cotiledón del cultivar 'Marketer' y la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIG121-Hm.
- (\*2) Proceso de selección mixto (B): Los explantes se incubaron en medio de inducción de organogénesis, primero sin presión selectiva (PS-) durante 1 día (B1), 2 días (B2), 3 días (B3), 4 días (B4) y 5 días (B5), y, a continuación, 3-4 semanas en el mismo medio con presión de selección (PS+), es decir, con 25 mg/l de kanamicina.
- (\*3) Número de explantes inoculados con la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el vector pBIG121-Hm.
- (\*4) Número de callos 'nodulares'.
- (\*5) Número de callos 'nodulares' con zonas o grupos de células GUS+.
- (\*6) Extensión total del área GUS+ estimada mediante el recuento de píxeles (resolución de la imagen digital: 500,125 píxeles por pulgada (ppi)).
- (\*7) Extensión del área GUS+ por callo estimada mediante el recuento de píxeles.
- (\*8) Extensión del área GUS+ por callo GUS + estimada mediante el recuento de píxeles.
- (\*9) Extensión del área GUS+ por callo GUS + estimada mediante el recuento de píxeles.

### **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**

El principal problema que plantea la transformación mediada por *Agrobacterium* en pepino es la alta tasa de escapes. En principio, para disminuir la frecuencia de escapes, la solución sería aumentar la concentración del agente selectivo desde la primera fase del proceso de selección. No obstante, los experimentos que realizamos en este sentido indicaron que cuando se suplementaba el medio de inducción de organogénesis con 50 o 75 mg/l de kanamicina no se obtenían los resultados deseados y por ello decidimos rebajar la concentración de kanamicina a 25 mg/l. Puede que la causa se deba a un escaso número de eventos de integración del T-DNA, lo que conduciría a un problema de densidad crítica inicial, o quizá la causa estribe en el estrés adicional que genera el proceso de selección, lo que ralentizaría el crecimiento y organización de las estructuras organogénicas, es decir, las yemas y brotes adventicios.

A fin de encontrar una solución al problema de la aparición de escapes, en el presente experimento decidimos mantener la concentración de kanamicina a 25 mg/l en el medio de inducción de organogénesis y aumentar la concentración del agente selectivo a 100 mg/l tanto en el medio de desarrollo y elongación de brotes como en la primera fase del proceso de enraizamiento de dichos brotes.

El objetivo del experimento era encontrar una solución de compromiso, de forma que, por un lado, la baja concentración de kanamicina en la fase inicial del proceso de selección no inhibiera el desarrollo temprano de las yemas y brotes, al tiempo que el aumento de la concentración de agente selectivo en las fases posteriores disminuyera la tasa de escapes y por tanto permitiera una selección efectiva.

Con todo, para que la estrategia fuera adecuada, deberíamos ser capaces de aumentar no tanto la frecuencia de explantes con estructuras organizadas como la calidad de la respuesta organogénica, lo que habitualmente estimamos con la variable denominada 'índice organogénico'. Por ello, recurrimos a la adición de nitrato de plata o de sulfato de cobre en el medio de inducción de organogénesis, por un lado, y de sulfato de cobre en el medio de desarrollo y elongación de los brotes, por otro.

Tal y como se comentó en un apartado anterior, se ha descrito que la adición de 1 a 50  $\mu\text{M}$  de nitrato de plata (aproximadamente 0,2 a 8,5 mg/l) al medio de cultivo aumenta la respuesta morfogénica en explantes de cotiledón de algunos cultivares de pepino (Mohiuddin et al., 1997, 2005) y de melón (Roustan et al., 1992). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por otros autores, en el primer apartado de la Tesis evaluamos el efecto de diversas concentraciones (0,08, 0,8 y 8 mg/l) de nitrato de plata sobre la organogénesis en segmentos de cotiledón de los cultivares 'Marketer', 'Negrito' y 'Wisconsin 2843'. En los dos primeros cultivares no apreciamos un efecto positivo sobre la frecuencia de callos con brotes, pero sí observamos un aumento del índice organogénico, una variable que estima la cantidad y calidad de las estructuras organogénicas por callo. Curiosamente, los mejores resultados se obtuvieron con 'Wisconsin 2843' (el cultivar de menor respuesta), en el que observamos que la adición de nitrato de plata al medio duplica tanto el porcentaje de callos con brotes (del 20% al 40%) como el índice organogénico (de 0,2 a 0,4).

Se ha propuesto que los efectos beneficiosos del nitrato de plata estarían relacionados con su efecto inhibitor sobre la acción del etileno. En cultivo *in vitro*, los explantes o callos de ciertas especies liberan etileno, lo que provoca su acumulación en los recipientes habituales con un intercambio gaseoso limitado (Chi et al., 1991; Chraibi et al., 1991; Pua, 1993; Mohiuddin et al., 1997, 2005). Es probable que la liberación de etileno a partir de las células vegetales aumente en situaciones de estrés. De hecho, el cultivo *in vitro* genera por sí solo una situación de estrés, pero evidentemente el estrés va a ser mayor cuando las células se ven sometidas a un proceso de inoculación con *Agrobacterium*, o a la selección durante las subsiguientes etapas de un protocolo de transformación.

Puesto que el nitrato de plata tiene un efecto positivo sobre la respuesta organogénica de los explantes de pepino, en particular sobre el índice organogénico, pensamos que la adición de 5  $\mu\text{M}$  de nitrato de plata (aproximadamente 0,8 mg/l) al medio de inducción de organogénesis podría ser beneficiosa en la etapa de selección de las yemas y brotes transgénicos.

Por otro lado, en el contexto de la Tesis Doctoral de la Dra. García Sogo (1990) se comprobó que la adición al medio de cultivo de altas concentraciones de sulfato de cobre (desde 0,1 hasta 10 mg/l) generaba un notable incremento de la respuesta organogénica en callos de melón procedentes de explantes y de protoplastos. Debido a ello, en el contexto del presente trabajo, evaluamos el efecto del cobre en la respuesta organogénica de explantes de pepino de los cultivares 'Marketer', 'Negrito' y 'Wisconsin 2843'. En términos cuantitativos los resultados no fueron tan espectaculares como los obtenidos en melón (García-Sogo, 1990), pero aún así la adición de sulfato de cobre tenía un efecto beneficioso en pepino. En el cultivar 'Marketer' los mejores resultados se obtuvieron en un medio con 1 mg/l de sulfato de cobre, en el cultivar 'Negrito' con 0,2 mg/l y en 'Wisconsin 2843' en un medio con 5 mg/l. Como acabamos de mencionar, en términos cuantitativos el incremento de la respuesta organogénica en los explantes no es tan relevante como ocurre en melón. Aún así, lo más destacable en pepino no es tanto el aumento en el porcentaje de explantes con respuesta como el efecto positivo del cobre en la calidad de la respuesta organogénica, es decir, en el grado de desarrollo de los primordios de brotes. Teniendo en cuenta la importancia de este hecho en la fase de selección de brotes transgénicos de pepino, decidimos realizar un ensayo en que se adicionó 1 mg/l de sulfato de cobre tanto en el medio de inducción de organogénesis como en el medio de desarrollo y elongación de los brotes seleccionados.

Por otro lado, en el experimento descrito en el apartado anterior evaluamos distintas formas de llevar a cabo el co-cultivo de los explantes primarios. En concreto, los explantes se co-incubaron con *Agrobacterium* durante 24 horas sin presión de selección y, a continuación, se co-cultivaron durante distintos tiempos (1 a 5 días) con presión de selección. Lo que observamos fue que la tasa de transformación, transitoria o estable, estimada sobre la base de la superficie ocupada por células GUS (+) en los callos seleccionados, aumentaba considerablemente (hasta 3 veces) cuando se empleaba 1 día sin presión de selección seguido por 2 días con presión de selección. Con el fin de corroborar este resultado, en el presente experimento comparamos lo que ocurre cuando se emplean estas condiciones con respecto a lo que sucede con un co-cultivo de la misma duración pero sin presión de selección.

En este experimento utilizamos segmentos de cotiledón de plántulas de tres días, ya que el empleo de explantes de plántulas más jóvenes podía ser favorable. Por lo que respecta a las restantes condiciones experimentales, no se realizaron cambios importantes. Es decir, seguimos utilizando la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el vector pBIG121-Hm, los explantes de cotiledón del cultivar 'Marketer' se pre-cultivaron durante dos días y la suspensión bacteriana en el medio LB se ajustó a una densidad óptica  $DO_{600} = 0,2-0,3$ . Lo que sí conviene insistir es que, tal y como se ha comentado antes, en el medio de inducción de organogénesis (B 25) la concentración de kanamicina fue de 25 mg/l, mientras que en los medios de desarrollo y elongación de brotes (FCu) y en el medio de enraizamiento (MB3) la concentración fue de 100 mg/l. De añadir que el co-cultivo que se había realizado hasta ahora en la cámara de cultivo *in vitro* en oscuridad completa, se pasó a realizar en las condiciones de fotoperiodo estándar de la misma cámara, i.e. , 16 horas luz/ 8 horas oscuridad (apartado III.2.10), como resultado de un estudio anterior de morfogénesis para los tres genotipos ('Wisconsin 2843', 'Marketer' y 'Negrito') en lo cual un período previo de oscuridad resultó perjudicial para la regeneración de yemas y brotes.

No se apreciaron importantes diferencias en el porcentaje de callos con brotes en medio selectivo, ya que los valores oscilaron entre el 7 % en el medio con 1 mg/l de sulfato de cobre y el 9-11 % en el medio suplementado con 0,8 mg/l (5  $\mu$ M) de nitrato de plata (Tabla 28; Figura 22). En cambio, sí hubieron notables diferencias en el número de plantas seleccionadas como presuntas transgénicas: en el medio con 1 mg/l de sulfato de cobre se obtuvieron 7 plantas, mientras que en el medio suplementado con 5  $\mu$ M de nitrato de plata el número de plantas seleccionadas osciló entre 18 (co-cultivo mixto de 1 día sin presión de selección y 2 días con presión selectiva) y 32 (co-cultivo de 3 días sin presión selectiva) (Tabla 28). Aparentemente, los resultados son mejores con un co-cultivo sin presión de selección, ya que el porcentaje de callos con brotes y el número de plantas seleccionadas dan valores superiores, pero, a cambio, cuando se emplean estas condiciones, aparecieron algunos callos contaminados que, como es lógico, se eliminaron de forma inmediata. Por este motivo, consideramos que lo mejor es un co-cultivo mixto.

Se analizó la expresión del delator *uidA-int* en hojas de algunas plantas seleccionadas (Tabla 29). Las cinco plantas que procedían del medio con sulfato de cobre dieron un

resultado negativo, por lo que se consideraron como escapes. En cambio, entre las que procedían del medio suplementado con nitrato de plata, habían cinco con expresión GUS (+). Cuatro de estas cinco plantas dieron un resultado positivo en todas las hojas analizadas, por lo que se consideraron como transgénicas, mientras que una de ellas (10.1b) dio GUS (+) en algunas hojas y GUS (-) en otras, por lo que probablemente se trataba de una quimera con una alternancia de sectores con células *wild-type* y células transgénicas.

Se controló el callo de procedencia de cada planta, por lo que se pudo estimar la tasa de transformación de dos formas distintas. Asumiendo, que cada planta seleccionada derive de un evento de integración independiente, la tasa de transformación (i.e. número de plantas transgénicas / número de explantes inoculados) oscilaría entre 2,17 % y 3,95 % (Tabla 30).

En principio, las plantas seleccionadas deberían proceder de eventos de integración independientes, ya que intentamos elegir los brotes que estaban relativamente alejados en el callo seleccionado. Pese a las precauciones que tomamos en este sentido, no cabe excluir que en un callo suceda un fenómeno equivalente a lo que en una planta se denomina como 'desplazamiento e invasión de capas histogénicas'. Si ocurre tal cosa, pese a que dos brotes del mismo callo estén relativamente alejados, puede que deriven del mismo evento de integración. Así pues, estimando la tasa de transformación de una forma más conservadora (i.e. número de callos que dan al menos una planta transgénica con respecto al número de explantes inoculados), los valores oscilarían entre 1,09 % y 2,63 % (Tabla 30).



**Tabla 28.** Efecto del nitrato de plata y del sulfato de cobre en el medio de inducción de organogénesis con presión selectiva (25 mg/l de kanamicina) sobre el porcentaje de callos con brotes y el número de plantas seleccionadas como presuntas transgénicas <sup>(\*1)</sup>.

Co-cultivo (*2)	Medios de inducción de organogénesis (*3)	% de callos con brotes <sup>(*4)</sup>		Nº de plantas seleccionadas (*5)
		respecto al nº de explantos	respecto al nº de callos 'nodulares'	
1 día PS(-) → 2 días PS(+)	MIO + 5 µM AgNO <sub>3</sub>	8,70 ± 2,95	8,70 ± 2,95	18
	MIO + 1 mg/l CuSO <sub>4</sub>	7,04 ± 3,06	7,04 ± 3,06	7
3 días PS(-)	MIO + 5 µM AgNO <sub>3</sub>	10,53 ± 3,54	10,53 ± 3,54	32

(\*1) El experimento de co-cultivo se llevó a cabo con segmentos de cotiledón del cultivar 'Marketer' y la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIG121-Hm.

(\*2) Número de días de co-cultivo de los explantes sin presión selectiva (PS-) o con presión selectiva (PS+).

(\*3) Medio de inducción de organogénesis B25 con 5 µM AgNO<sub>3</sub> o 1 mg/l CuSO<sub>4</sub>. En los tres casos, el medio de inducción de organogénesis se suplementó con 25 mg/l de kanamicina.

(\*4) Porcentaje de callos con brotes en el medio de elongación (K02) con 100 mg/l de kanamicina. Los datos están referidos al número total de explantes inoculados y al número de callos 'nodulares'. El término 'nodular' alude a los callos que originan zonas compactas que habitualmente diferencian yemas adventicias.

(\*5) Número de plantas seleccionadas como presuntas transgénicas al final del experimento.

**Tabla 29.** Análisis de expresión del gen delator *uidA-int* en plantas seleccionadas tras el cultivo en medio de inducción de organogénesis selectivo (25 mg/l de kanamicina), el subcultivo en medio de elongación selectivo (100 mg/l de kanamicina) y el enraizamiento de los brotes en medio base selectivo (100 mg/l de kanamicina) <sup>(\*1)</sup>.

Co-cultivo <sup>(*2)</sup>	Medios de inducción de organogénesis <sup>(*3)</sup>	Callo seleccionado <sup>(*4)</sup>	Planta seleccionada <sup>(*5)</sup>	Expresión del delator <i>uidA-int</i> <sup>(*6)</sup>
1 día PS(-) → 2 días PS(+)	MIO + 5 $\mu$ M AgNO <sub>3</sub>	nº 3	3.6d	-
		nº 9	9.1	-
		nº 17	17.5	+
			17.6	+
	MIO + 1 mg/l CuSO <sub>4</sub>	nº 6	6.6a	-
		nº 9	9.3a	-
			9.3b	-
		nº 12	12.2a	-
12.2b	-			
3 días PS(-)	MIO + 5 $\mu$ M AgNO <sub>3</sub>	nº 4	4.3a	-
		nº 6	6.3a	+
		nº 10	10.1a	+
			10.1b	±

(\*1) El experimento de co-cultivo se llevó a cabo con segmentos de cotiledón del cultivar 'Marketer' y la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIG121-Hm.

(\*2) Número de días de co-cultivo de los explantes sin presión selectiva (PS-) o con presión selectiva (PS+).

(\*3) Medio de inducción de organogénesis B25 con 5  $\mu$ M AgNO<sub>3</sub> o 1 mg/l CuSO<sub>4</sub>. En los tres casos el medio de inducción de organogénesis se suplementó con 25 mg/l de kanamicina.

(\*4) Número del callo seleccionado tras el cultivo en medio de inducción de organogénesis con 25 mg/l de kanamicina.

(\*5) Código de la planta seleccionada tras el cultivo en medio de inducción de organogénesis con 25 mg/l de kanamicina, el subcultivo en medio de elongación selectivo (100 mg/l de kanamicina) y el enraizamiento en medio base selectivo (100 mg/l de kanamicina).

(\*6) Análisis de expresión del gen delator *uidA-int* en hojas de las plantas seleccionadas. Se han considerado como positivas (+) aquellas plantas en las que se detectó expresión GUS en todas las hojas analizadas. La planta 10.1b se calificó como (±) ya que no se detectó expresión GUS en todas las hojas analizadas.

**Tabla 30.** Efecto del nitrato de plata y del sulfato de cobre en el medio de inducción de organogénesis con presión selectiva (25 mg/l de kanamicina) sobre la tasa de transformación genética <sup>(\*1)</sup>.

Co-cultivo (*2)	Medio inducción organogénesis (*3)	Nº de explantos (*4)	Nº de callos (*5)	% explantes con callo <sup>(*6)</sup>	Nº plantas GUS + (*7)	Tasa de transformación (*8)
1 día PS(-) → 2 días PS(+)	MIO + 5 µM AgNO <sub>3</sub>	92	92	100	2	2,17 % (1,09 %)
	MIO + 1 mg/l CuSO <sub>4</sub>	71	71	100	0	0
3 días PS(-)	MIO + 5 µM AgNO <sub>3</sub>	76	76	100	3	3,95 % (2,63 %)

(\*1) El experimento de co-cultivo se llevó a cabo con segmentos de cotiledón del cultivar 'Marketer' y la cepa C58 de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIG121-Hm.

(\*2) Número de días de co-cultivo de los explantes sin presión selectiva (PS-) o con presión selectiva (PS+).

(\*3) Medio de inducción de organogénesis B25 con 5 µM AgNO<sub>3</sub> o 1 mg/l CuSO<sub>4</sub>. En los tres casos, el medio de inducción de organogénesis se suplementó con 25 mg/l de kanamicina.

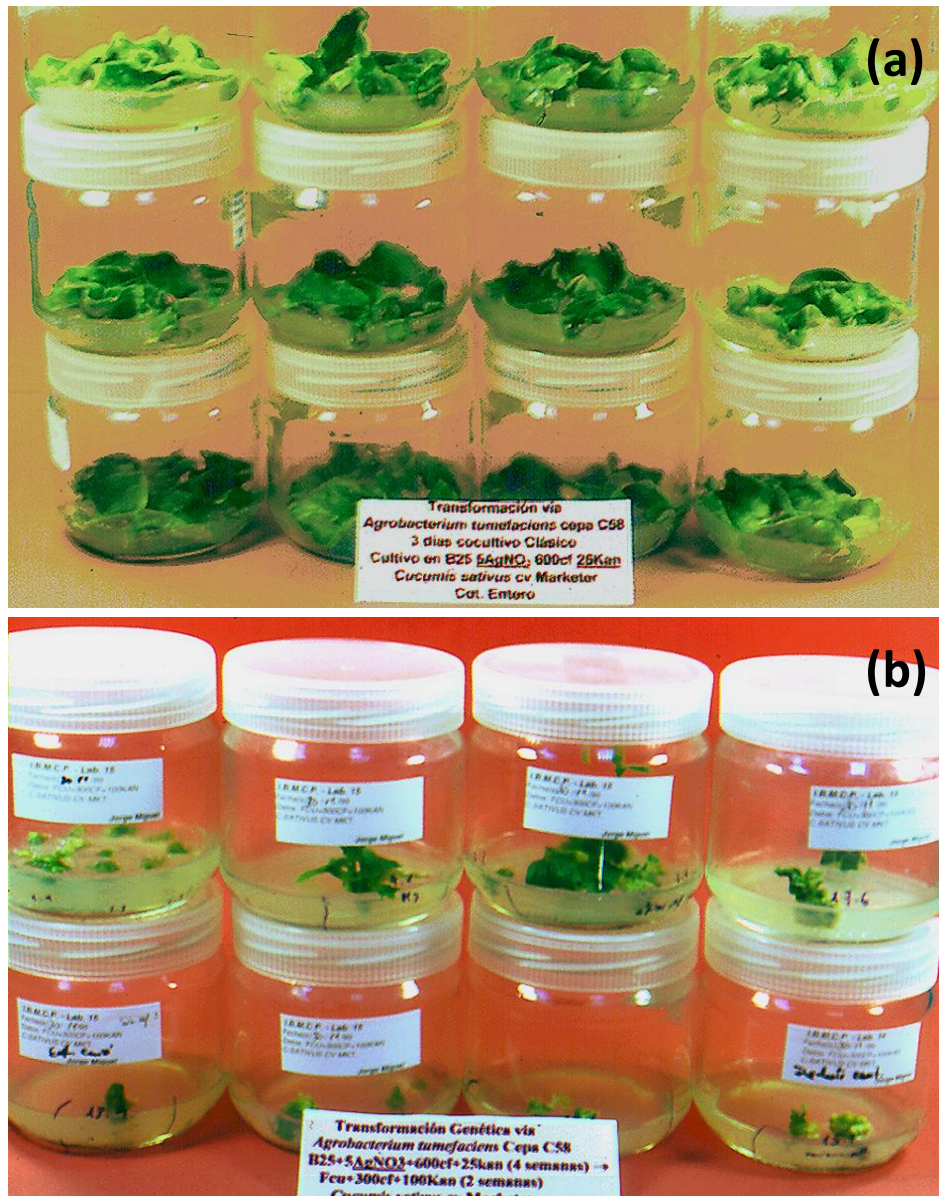
(\*4) Número de explantes inoculados.

(\*5) Número de callos seleccionados en medio con 25 mg/l de kanamicina a partir de los explantes inoculados.

(\*6) Porcentaje de explantes que originan callo en medio selectivo (25 mg/l de kanamicina).

(\*7) Número de plantas con expresión del delator *uidA-int*.

(\*8) Tasa de transformación estimada sobre la base del número de plantas GUS (+) con respecto a los explantes inoculados. Los porcentajes que aparecen en la parte superior de cada celda de la columna se han calculado asumiendo que cada planta con expresión deriva de un evento de transformación independiente. Los valores que aparecen entre paréntesis reflejan una forma más conservadora de estimar la tasa de transformación, es decir, asumiendo que las plantas GUS (+) que proceden de un callo podrían derivar del mismo evento de transformación.



**Figura 22.** Primeras etapas en la selección de brotes tras la inoculación de explantes del cultivar 'Marketer' con la cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens* que porta el vector pBIG121-Hm. (a) Explantes de cotiledón tras el cultivo en el medio de inducción de organogénesis suplementado con 5  $\mu$ M de AgNO<sub>3</sub> y 25 mg/l de kanamicina. (b) Brotes tras el subcultivo en el medio de elongación de brotes con 100 mg/l de kanamicina.

#### **2.1.4. Selección con higromicina tras el co-cultivo de explantes primarios de los cultivares 'Marketer', 'Negrito' y 'Wisconsin 2843'**

Para intentar evitar el problema que ocasiona la frecuente aparición de escapes en pepino, en el experimento anterior incrementamos la concentración de kanamicina (de 25 a 100 mg/l) tanto en el medio de elongación (FCu) como en el medio de enraizamiento (MB3) de los brotes. Gracias a esta modificación del protocolo, al final del proceso de selección se obtuvieron algunas plantas transgénicas del cultivar 'Marketer' con expresión estable del gen delator *uidA-int*.

Una solución alternativa para reducir la tasa de escapes estriba en cambiar el agente selectivo, por ejemplo sustituir la kanamicina por higromicina B. Este último antibiótico tiene un mayor efecto sobre las células *wild-type* que la kanamicina, lo que conlleva ciertas ventajas y algunos inconvenientes. Por lo respecta a las posibles ventajas, en teoría, por su mayor toxicidad, debe ejercer una mayor presión de selección, lo que debería reducir la tasa de escapes. No obstante, si el número de eventos de integración es bajo, puede haber un problema de densidad crítica inicial, lo que dificultaría el proceso de selección, sobre todo en las primeras etapas. Por otro lado, debido a su mayor toxicidad, no conviene emplear altas concentraciones de higromicina, lo que puede también limitar la eficacia del proceso de selección.

Para estudiar la adecuación de la higromicina como agente selectivo en pepino, realizamos un experimento con los tres cultivares que habíamos venido utilizando en este trabajo: 'Wisconsin 2843', 'Marketer', y 'Negrito'. El protocolo de transformación fue básicamente el mismo que el empleado en el experimento anterior, aunque con pequeños cambios.

En este caso, utilizamos la cepa LBA4404 de *A tumefaciens* que porta el vector pBIG121-Hm. Como ya hemos comentado anteriormente, este vector contiene dos genes marcadores (*nptII* y *hpt*), lo que posibilita una selección tanto en medios con kanamicina como en medios con higromicina. Asimismo, el vector porta el gen *uidA-int*, lo que permite evaluar expresión (transitoria o estable) del delator en las primeras etapas del proceso de selección, así como expresión estable al final del mismo, es decir, en las plantas regeneradas.

Teniendo en cuenta la mayor toxicidad de la higromicina, en este caso optamos por hacer un co-cultivo con la cepa de *Agrobacterium* sin presión de selección. De forma similar, para evitar posibles problemas de densidad crítica inicial en la primera etapa, decidimos cultivar los explantes inoculados en el medio de inducción de organogénesis durante dos días sin presión de selección y, a continuación, subcultivarlos al mismo medio con 10 mg/l de higromicina. Por último, en este caso se utilizó el medio de inducción de organogénesis B 25 (MB3 + 2,5 mg/l de 6-BA) o IB 05 25 (MB3 + 0,5 mg/l de IAA + 2,5 mg/l de 6-BA) en función del genotipo, lo cual se suplementó con 5  $\mu$ M de nitrato de plata. La adición de nitrato de plata estuvo motivada por los buenos resultados del experimento anterior.

Como era de esperar, el efecto de la higromicina fue mucho más drástico que el de la kanamicina. A los pocos días de incubación en medio con 10 mg/l de higromicina, los explantes no inoculados (i.e. experimento testigo) pierden totalmente la clorofila, lo que hace que adquieran un aspecto amarillento o blanquecino (Figura 23). No se apreció ningún tipo de crecimiento en las zonas de corte o en cualquier otra parte de los explantes no inoculados.

La mayor parte de la superficie de los explantes inoculados con *Agrobacterium* también adquiere un aspecto clorótico, pero en este caso aparecen algunas zonas de crecimiento, primero desorganizado y más tarde organizado. Por comparación, el crecimiento de estas zonas es considerablemente más lento que cuando se realiza la selección en medio con kanamicina.

El desarrollo de estructuras organizadas en medio con higromicina requiere dos o más subcultivos en medio FCu selectivo. Como puede verse en la Figura 24, en el segundo subcultivo en este medio, algunos callos inicialmente seleccionados pierden el color verde, lo que puede reflejar eventos de expresión transitoria, mientras que otros crecen de forma vigorosa y mantienen el color verde, lo que puede implicar una integración estable del T-DNA.

El porcentaje de callos con brotes seleccionados en medio con higromicina osciló entre, aproximadamente, el 2 % y el 7 %, dependiendo del cultivar o línea de pepino (Tabla 31). Al final del experimento se seleccionaron 6 plantas del cultivar 'Negrito', 15 de la línea 'Wisconsin 2843' y 19 del cultivar 'Marketer' (Tabla 31).

Los análisis de expresión del delator *uidA-int* en hojas de las plantas seleccionadas (Figura 25) mostraron que todas las del cultivar 'Marketer' eran escapes (Tabla 32), lo que indica que la selección con higromicina es mucho menos adecuada en este cultivar que la selección con kanamicina, que sí condujo a la obtención de plantas transgénicas. Los análisis de expresión en hojas de plantas del cultivar 'Negrito' dieron también un resultado negativo.

En cambio, 5 de las 15 plantas seleccionadas de la línea 'Wisconsin 2843' exhibían una expresión consistente GUS (+) (Tabla 32 y Figura 25), lo que revela que para esta línea la selección con higromicina sí es adecuada.

Curiosamente, los estudios que habíamos realizado en el primer apartado de esta Tesis habían indicado que el potencial morfogénico de esta línea es menor que el de los otros dos cultivares. A pesar de ello, el empleo de higromicina como agente selectivo permitió la obtención de plantas transgénicas de 'Wisconsin 2843'.

En el caso de 'Wisconsin 2843' cada planta transgénica deriva de un callo distinto, por lo que da igual estimar la tasa de transformación con respecto a los explantes inoculados o a los callos seleccionados. En concreto, la tasa de transformación en la línea 'Wisconsin 2843' tras la selección con higromicina B fue del 5,2 % (Tabla 33), lo que, teniendo en cuenta las dificultades que ofrece el pepino en este tipo de experimentos, es un resultado muy satisfactorio.

Por otro lado, cuando se rastrea el origen de las plantas de 'Wisconsin 2843', se aprecia que, a partir del mismo callo seleccionado, aparecen tanto escapes como plantas transgénicas (Tabla 32). Esto sugiere que en el callo inicialmente seleccionado había una mezcla de células transgénicas y no transgénicas, es decir, se trataba de un callo quimérico.

Debido a la estructura del callo, es posible que a lo largo del proceso de regeneración se diferencien yemas adventicias por concrecencia y asociación de ambos tipos celulares y que las células *wild-type* (sensibles al agente selectivo) se mantengan debido a la protección cruzada conferida por las células transgénicas (resistentes al agente selectivo). Esto podría originar una planta quimérica, probablemente, de tipo mericlinal o sectorial



(ver Figura 27 en el apartado de Discusión). Por este motivo, el cultivo del ápice terminal y de las yemas axilares de esta planta en medio de enraizamiento podría dar lugar a tres tipos de plantas: *wild-type* (i.e. escapes), transgénicas y quimeras.

Si nuestra hipótesis es correcta, el problema que ocasiona la frecuente aparición de escapes se podría solventar realizando el proceso de propagación no solo a partir del ápice terminal (que es lo que hacíamos en la mayor parte de los casos), sino también de todas las yemas axilares de la planta inicialmente seleccionada. De esta forma, se podría llegar a segregar una o más plantas transgénicas a partir de la quimera seleccionada inicialmente (ver Figura 29 en el apartado de Discusión).

Una solución alternativa consistiría en cultivar explantes de todas las hojas de cada planta seleccionada en medio de inducción de organogénesis con presión de selección (kanamicina o higromicina) para identificar los brotes adventicios y las plantas que realmente derivan de células transgénicas.



**Figura 23.** Efecto de 10 mg/l de higromicina sobre explantes de cotiledón del cultivar 'Marketer' que no fueron inoculados con *Agrobacterium*



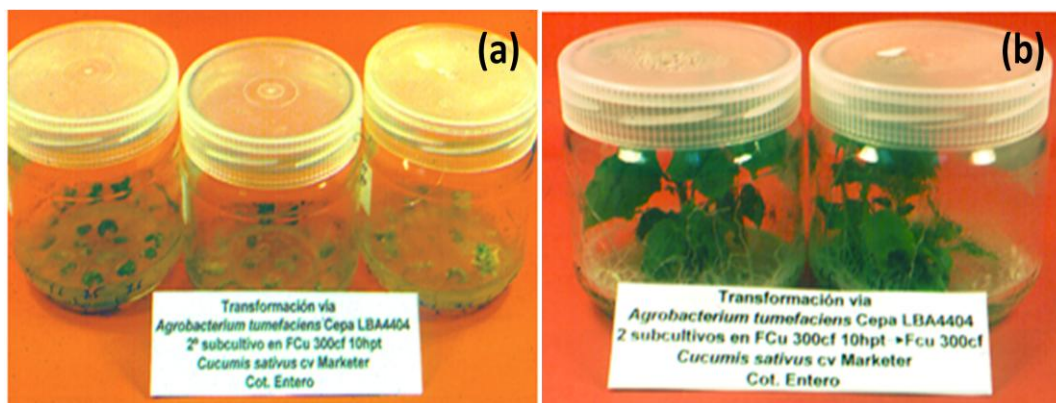
**Tabla 31.** Porcentaje de callos con brotes y número de plantas presuntamente transgénicas tras la selección con higromicina B <sup>(\*1)</sup>.

Cultivar	% de callos con brotes <sup>(*2)</sup>		Nº de plantas seleccionadas <sup>(*3)</sup>
	respecto al nº de explantes	respecto al nº de callos 'nodulares'	
'Marketer'	2,44 ± 1,21	3,20 ± 1,58	19
'Wisconsin'	7,29 ± 2,67	7,78 ± 2,84	15
'Negrito'	1,68 ± 1,18	2,86 ± 2,01	6

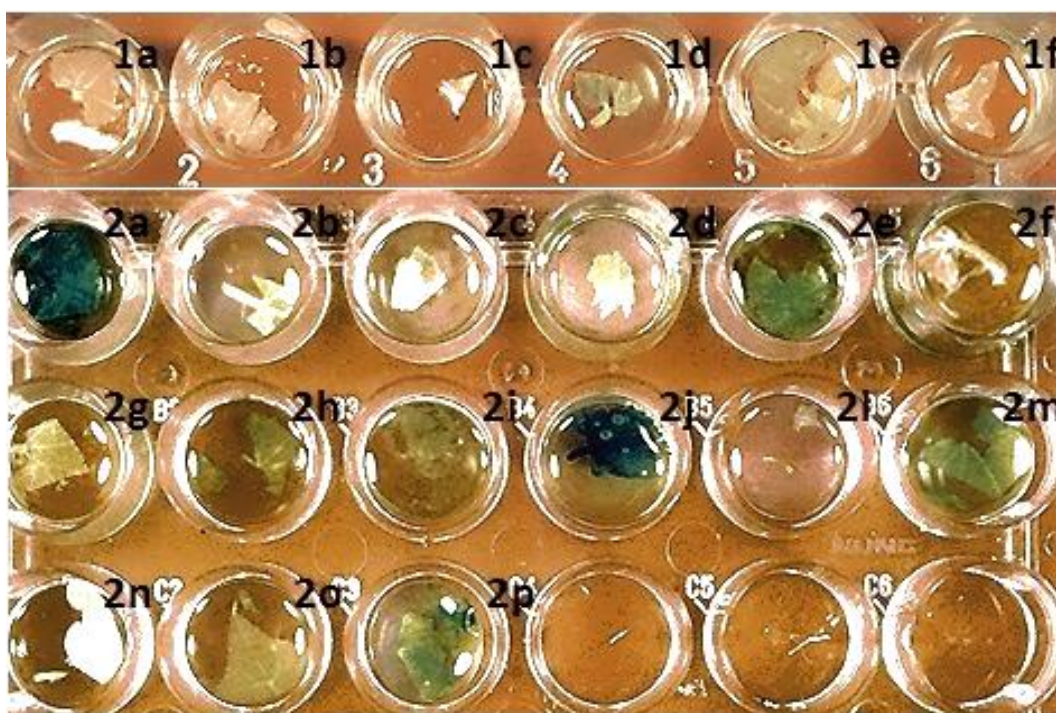
(\*1) El co-cultivo de explantes primarios se llevó a cabo con segmentos de cotiledón de los cultivares 'Marketer', 'Wisconsin 2843' y 'Negrito' y la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIG121-Hm.

(\*2) Porcentaje de callos con brotes en el medio de elongación (FCu) con 10 mg/l de higromicina B. Los datos están referidos al número total de explantes inoculados y al número de callos 'nodulares' (i.e. callos que originan zonas compactas que habitualmente diferencian yemas adventicias).

(\*3) Número de plantas seleccionadas como presuntas transgénicas al final del experimento.



**Figura 24.** Selección de callos y plantas del cultivar 'Marketer' en medio con higromicina B. (a) Callos tras el segundo subcultivo en medio con 10 mg/l de higromicina. (b) Plantas seleccionadas tras la selección con higromicina.



**Figura 25.** Ensayo histoquímico con X-Gluc de la expresión del gen delator *uidA-int* en explantes de hoja de plantas seleccionadas en medio con higromicina. a) La ausencia de expresión en hojas de las plantas del cv. 'Negrito' (1a - f) indicó que todas ellas eran escapes; b) Entre las plantas de la línea 'Wisconsin 2843' (2a-p), algunas no mostraron expresión (escapes), otras solo exhibían una expresión GUS en ciertas zonas de la hoja (presuntas quimeras), mientras que otras (e.g. 2a y 2j) mostraban una expresión consistente en todas las hojas de la planta (transgénicas).

**Tabla 32.** Análisis de expresión del gen delator *uidA-int* en plantas seleccionadas tras el cultivo en medio con higromicina <sup>(\*1)</sup>.

Cultivar	Callo seleccionado (*2)	Planta seleccionada (*3)	Expresión del delator <i>uidA-int</i> (*4)
'Marketer'	nº 1	1.6a	-
		1.6b	-
		1.6c	-
		1.6d	-
	nº 4	4.5a	-
		4.5b	-
		4.5c	-
		4.5d	-
		4.5e	-
		4.5f	-
		4.5g	-
	nº 8	8.3a	-
		8.3b	-
		8.3c	-
		8.3d	-
	nº 16	16.5a	-
		16.5b	-
		16.5c	-
		16.5d	-
	'Wisconsin'	nº 6	6.5a
nº 7		7.5a	-
		7.5b	-
		7.5c	-
nº 12		12.1a	+
		12.1b	-
		12.1c	-
		12.4a	-
		12.4b	-
nº 13		13.6a	+
		13.6b	-
nº 15		15.6a	+
		15.6b	-
	15.6c	-	
nº 16	16.6a	+	

**Tabla 32.** Análisis de expresión del gen delator *uidA-int* en plantas seleccionadas tras el cultivo en medio con higromicina <sup>(\*1)</sup> (cont.).

Cultivar	Callo seleccionado (*2)	Planta seleccionada (*3)	Expresión del delator <i>uidA-int</i> (*4)
'Negrito'	nº 1	1.1a	-
		1.1b	-
		1.1c	-
		1.1d	-
	nº 10	10.1a	-
		10.1b	-

(\*1) El co-cultivo de explantes primarios se llevó a cabo con segmentos de cotiledón de los cultivares 'Marketer', 'Wisconsin 2843' y 'Negrito' y la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIG121-Hm.

(\*2) Número del callo seleccionado tras el cultivo en medio de inducción de organogénesis con 10 mg/l de higromicina.

(\*3) Código de la planta seleccionada tras el cultivo en medio de inducción con 10 mg/l de higromicina y diversos subcultivos en medio de elongación con 10 mg/l de higromicina.

(\*4) Análisis de expresión del gen delator *uidA-int* en hojas de las plantas seleccionadas. Se han considerado como positivas (+) aquellas plantas en las que se detectó expresión GUS en todas las hojas analizadas.

**Tabla 33.** Tasa de transformación genética tras la selección en medio con 10 mg/l de higromicina B <sup>(\*1)</sup>.

Cultivar	Nº de explantes (*2)	Nº de callos (*3)	% explantes con callo (*4)	Nº plantas GUS + (*5)	Tasa de transformación (*6)
'Marketer'	164	125	76,2	0	0
'Wisconsin'	96	90	93,8	5	5,21 % (5,21 %)
'Negrito'	119	70	58,8	0	0

- (\*1) El co-cultivo de explantes primarios se llevó a cabo con segmentos de cotiledón de los cultivares 'Marketer', 'Wisconsin 2843' y 'Negrito' y la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* que porta el plásmido pBIG121-Hm.
- (\*2) Número de explantes inoculados.
- (\*3) Número de callos seleccionados en medio con 10 mg/l de higromicina a partir de los explantes inoculados.
- (\*4) Porcentaje de explantes que originan callo en medio selectivo (10 mg/l de higromicina).
- (\*5) Número de plantas con expresión del delator *uidA-int*.
- (\*6) Tasa de transformación estimada sobre la base del número de plantas GUS (+) con respecto a los explantes inoculados. El porcentaje que aparece en la parte superior de la celda de la columna se ha calculado asumiendo que cada planta con expresión deriva de un evento de transformación independiente. El valor que aparece entre paréntesis refleja una forma más conservadora de estimar la tasa de transformación, es decir, asumiendo que las plantas GUS (+) que proceden de un callo podrían derivar del mismo evento de transformación.

## 2.2. DISCUSIÓN

Aunque se han publicado diversos trabajos sobre la obtención de plantas transgénicas de pepino, la eficacia de los métodos de transformación sigue siendo baja (Wang et al., 2015), por lo que algunos autores consideran al pepino como una especie recalcitrante (Nanasato et al., 2013; Fraenkel, 2014).

Al igual que ocurre con otras muchas especies, la aproximación más habitual a la hora de abordar la transformación genética en pepino es el co-cultivo de explantes primarios con *Agrobacterium tumefaciens*. Los problemas a la hora de utilizar este método para la transferencia de genes en pepino son múltiples, pero los principales estriban en el efecto que tienen los tratamientos habituales (e.g. inoculación y co-cultivo con *Agrobacterium*) sobre la tasa de regeneración, la escasa adecuación de las estrategias de selección, las dificultades para estimar la tasa de transformación y, por encima de todo, la alta frecuencia de escapes.

Por si fuera poco, en el caso del pepino hay problemas adicionales como, por ejemplo, la floración temprana asociada a condiciones de fotoperiodo largo, que dificulta notablemente la selección de las plantas transgénicas en las últimas etapas del proceso (e.g. elongación de los brotes y enraizamiento en medios con presión selectiva).

Teniendo en cuenta la situación existente, en primer lugar se hará una discusión sobre los resultados obtenidos en los experimentos de transformación que hemos llevado a cabo en el contexto de esta Tesis y, a continuación, se comentará de forma más amplia la problemática en torno a las posibles causas de aparición de escapes. Esta segunda parte de la discusión no se enfocará de manera exclusiva en la especie objeto del presente trabajo, sino más bien a nivel general para tratar de entrever algunas soluciones que puedan ser de utilidad en futuros experimentos de transformación con el pepino.

### 2.2.1. Co-cultivo de explantes primarios

La fase de inoculación de los explantes con *Agrobacterium* puede ser determinante en el resultado final de un experimento de transformación (Kose y Koç, 2003; Yin et al., 2005a; Kim et al., 2010; Nanasato et al., 2013). A la hora de diseñar la fase inoculación hay que tener en cuenta diversos aspectos, tales como la elección de la cepa de *Agrobacterium*, el ajuste de la concentración de bacterias, la duración del proceso y la forma de llevarlo a cabo. Si, por la razón que sea, el diseño de esta fase es inadecuado se pueden desencadenar una serie de efectos negativos como, por ejemplo, un crecimiento excesivo de la bacteria, lo que suele dificultar el proceso de erradicación con antibióticos, una respuesta necrótica de los explantes o, lo que es más habitual, un descenso de la tasa de regeneración (Yin et al., 2005a; He et al., 2008; Nanasato et al., 2013).

Por lo que respecta al primer punto, en este trabajo optamos por utilizar las cepas LBA4404 y C58 de *Agrobacterium*. En conjunto, los resultados indicaron que ambas cepas son adecuadas para el pepino. Cuando se utiliza la cepa C58 conviene aumentar la concentración de cefotaxima tanto en el lavado de los explantes como en los medios que se utilizan durante la etapa de selección, pero ello no genera mayores problemas ya que este antibiótico no tiene un efecto negativo sobre la organogénesis. En cualquier caso, si hubiera que elegir una cepa, nos quedaríamos con la LBA4404.

Por lo que respecta a la densidad óptica, la mayor parte de autores coincide en que hay que evitar que la bacteria haya llegado a la fase estacionaria, pero no todos coinciden en el valor óptimo de la densidad óptica. Algunos recomiendan valores que se correspondan con la fase media del crecimiento exponencial (Bondt et al., 1994, 1996), otros se inclinan por valores asociados a la fase temprana (Qiu et al., 2007; Dutt y Grosser, 2009; Tian et al., 2013) y algunos otros opinan que los valores óptimos dependen de la cepa de *Agrobacterium* (Islam et al., 2010). En nuestro caso, al principio ajustamos la densidad óptica de la suspensión bacteriana a valores relativamente altos ( $DO_{600} = 0,7-0,8$ ), por si la mayor concentración de bacterias podía incrementar la tasa de transformación, pero en los siguientes experimentos la densidad óptica de la suspensión bacteriana se ajustó a 0,2-0,3, a fin de estar seguros de que la bacteria estuviera en la fase temprana de crecimiento exponencial y no hubiera llegado a la fase estacionaria.

Ensayamos distintos periodos de co-cultivo a lo largo de los experimentos realizados. La mayor duración del co-cultivo conduce a un mayor porcentaje de callos con grupos de células GUS (+), pero en estas condiciones es más difícil erradicar la bacteria, lo que obliga a eliminar algunos callos que, al menos en principio, podían haber dado plantas transgénicas. En nuestra opinión, el mejor compromiso (i.e. frecuencia de callos con brotes seleccionados y ausencia de contaminación) se consigue con un periodo de co-incubación de dos o tres días.

Por lo que respecta a esta fase, ensayamos también una nueva modalidad, a la que denominamos co-cultivo 'mixto', que consistía en inocular durante un día sin presión de selección, seguido de un periodo variable (uno a cinco días) con presión selectiva (25 mg/l de kanamicina). Los resultados mostraron que la frecuencia de explantes que originan callos GUS (+) fue mayor cuando los segmentos de cotiledón se co-cultivaron durante dos o más días con presión de selección (65 - 70%). Además, en este experimento, intentamos estimar la superficie ocupada por grupos de células con expresión del delator mediante recuento del número de píxeles. Los resultados indicaron que la superficie total ocupada por células con expresión del delator es tres veces mayor con un co-cultivo de dos días con presión selectiva respecto a lo que ocurre con un solo día.

Así pues, si se utiliza un co-cultivo convencional (i.e. sin presión selectiva), los mejores resultados se obtienen con un periodo de dos o tres días. Si, en cambio, se opta por un co-cultivo mixto, lo mejor es incubar durante un día sin presión de selección y dos días con presión selectiva. Al comparar los resultados de ambos sistemas (co-cultivo convencional o mixto) con la misma duración (3 días en ambos casos), no se registraron diferencias entre los dos, aunque, eso sí, en el segundo caso obliga a preparar dos medios (sin y con agente selectivo) y subcultivar los explantes a las 24 horas.



### **2.2.2. Medios de cultivo para la inducción de organogénesis y elongación de los brotes adventicios**

Para inducir la regeneración en cultivo *in vitro*, el diseño del medio de cultivo es clave; no obstante, lo es más aún, si cabe, cuando lo que se persigue es la obtención de plantas transgénicas. En efecto, cuando se realiza un experimento de transformación mediada por *Agrobacterium* en una determinada secuencia de medios lo que cabe esperar es que disminuya la tasa de regeneración debido a factores tales como el estrés adicional que genera la infección y el co-cultivo con la bacteria, el posible problema de densidad crítica inicial en la primera etapa de la selección (i.e. si el número de eventos de integración es bajo, el número inicial de células capaces de división y regeneración es escaso) y el efecto que pueda tener el agente selectivo en las propias células transgénicas. Esto último puede parecer una contradicción porque, salvo que haya un problema de silenciamiento génico, la célula que haya experimentado un evento de integración va a expresar el gen marcador; aún así, el agente selectivo puede tener un efecto negativo, que será mayor o menor dependiendo de su naturaleza (e.g. la higromicina tiene un efecto mucho más drástico sobre las células vegetales que la kanamicina).

#### **2.2.2.1. Reguladores del crecimiento**

En función de los resultados obtenidos en la primera parte del trabajo ('Respuesta Morfogenética en Explantes de Pepino'), seleccionamos dos medios para inducir la organogénesis tras el co-cultivo de los explantes con *Agrobacterium*. Los dos tenían en común el medio base (MB3; Moreno et al., 1985) y diferían en los reguladores de crecimiento: B25 (2,5 mg/l de 6-benciladenina); IB 05 25 (0,5 mg/l de ácido indol-3-acético + 2,5 mg/l de 6-benciladenina). Posteriormente en el apartado de transformación genética se probó el medio IB 005 25 (0,05 mg/l de ácido indol-3-acético + 2,5 mg/l de 6-benciladenina), con una composición aproximada a los anteriores.

Tras efectuar distintos ensayos de transformación y comparar los resultados obtenidos, nuestra conclusión es que se pueden utilizar los tres medios, ya que no hay diferencias sustanciales en cuanto al número de callos con brotes o el número de plantas seleccionadas al final del proceso.

### 2.2.2.2. Nitrato de plata

Con relación a la composición de los medios de cultivo, ensayamos también el efecto de componentes no habituales, como el nitrato de plata, a fin de solventar algunos problemas inherentes a la transformación genética.

El cultivo *in vitro* genera una situación de estrés, lo que tiene un profundo efecto sobre la respuesta de las células vegetales y la variación asociada a procesos de morfogénesis indirecta. Hay dos fuentes de variación somaclonal: la preexistente en el material de partida (e.g. acumulación de mutaciones en las células somáticas, mixoploidía de los explantes primarios, quimerismo inicial) y la inducida a lo largo del cultivo *in vitro* (e.g. mutaciones puntuales por desaminación de citosinas metiladas, cambios estructurales y numéricos por anomalías en la mitosis, cambios puntuales y estructurales debido al movimiento de elementos transponibles, variación epigenética heredable, etc.).

En relación con la variación inducida en procesos de morfogénesis indirecta, ahora suele utilizarse la expresión de 'choque genómico por estrés', un término que en realidad fue propuesto hace años por Barbara McClintock en la conferencia magistral que dio con motivo de la concesión del Premio Nobel (McClintock, 1984 - Nobel lecture presented, 8 December 1983). Conviene enfatizar que todas las causas de la 'variación somaclonal inducida *in vitro*' no son específicas del cultivo *in vitro*, ya que *in vivo* también se acumulan mutaciones puntuales por desaminación de citosinas metiladas o el movimiento de elementos transponibles, hay cambios epigenéticos heredables y, por supuesto, toda la gama de cambios estructurales y numéricos. Lo que ocurre *in vitro* es que la situación de estrés aumenta la tasa de variación y de ahí el término de 'choque genómico por estrés'. El problema es que, por los motivos mencionados al principio de este apartado, la transformación mediada por *Agrobacterium* genera un estrés adicional y esto afecta no solo a la tasa de variación, sino también al proceso de regeneración a partir de las células transgénicas.

Por otro lado, las células vegetales liberan etileno en cultivo *in vitro*, lo que provoca su acumulación en recipientes con un intercambio gaseoso limitado (Chi et al., 1991; Chraibi et al., 1991; Pua, 1993; Mohiuddin et al., 1997, 2005). La liberación de etileno genera una serie de efectos negativos sobre la morfogénesis *in vitro* (Chi y Pua 1989; Chraibi et al.,

1991; Pua, 1993; Bhalla y Smith 1998; Zhang et al., 2000; Curtis et al., 2004) y supone un factor adicional de estrés.

Se ha descrito que la adición de concentraciones moderadas (1 a 50  $\mu\text{M}$ ) de nitrato de plata al medio de cultivo aumenta la respuesta morfogénica en explantes de pepino (Mohiuddin et al., 1997, 2005), melón (Roustan et al., 1992) y otras especies (Chi y Pua, 1989; Chi et al., 1991; Chraibi et al., 1991; Palmer, 1992; Hyde y Phillips, 1996; Eapen y George, 1997; Hu et al., 1999; Fei et al., 2000; Zhang et al., 2001b; Curtis et al., 2004) y se ha propuesto que su efecto beneficioso estaría principalmente relacionado con una inhibición sobre la síntesis de etileno (Turhan, 2004; Kumar et al., 2009).

Por este motivo, evaluamos el efecto de la adición de 0,8 mg/l (5  $\mu\text{M}$ ) de nitrato de plata al medio de inducción de organogénesis tras el co-cultivo de explantes de pepino con *Agrobacterium*. El porcentaje de callos con brotes seleccionados fue satisfactorio (osciló entre 9 y 11%) pero lo más notable fue su efecto beneficioso sobre el desarrollo de las yemas y brotes adventicios, es decir sobre la calidad de la respuesta organogénica. De hecho, en nuestra opinión, la adición de nitrato de plata al medio de inducción fue uno de los factores más relevantes en la obtención de algunas plantas transgénicas del cultivar 'Marketer'.

Por lo que nosotros sabemos, esta es la primera vez que se describe el efecto beneficioso del ión plata sobre la obtención de plantas transgénicas de un cultivar de pepino. Sin embargo, tras efectuar la revisión bibliográfica, hemos encontrado dos referencias en experimentos de transformación con especies muy alejadas. En concreto, se ha descrito que la adición de nitrato de plata al medio fue muy positiva en experimentos de transformación mediada por *Agrobacterium* con el híbrido 'Fuji' de manzano (Seong et al., 2005) y con un genotipo ('Stella') de cerezo (Sgamma et al., 2015).

### 2.2.2.3. Sulfato de cobre

García-Sogo (1990) descubrió que la adición de 1 mg/l de sulfato de cobre, 40 veces más de la concentración recomendada en la solución de Murashige y Skoog (1962), incrementaba sustancialmente la respuesta organogénica en callos procedentes de explantes y de protoplastos de melón. Desde entonces se han publicado diversos trabajos en los que se ha descrito un efecto positivo del cobre en la respuesta morfogenética de especies diversas (Purnhauser, 1991; Purnhauser y Gyulai, 1993; Ghaemi et al., 1994; Dahleen, 1995; Castillo et al., 1998; Ellul et al., 2003).

Sigue sin estar claro en qué se fundamenta el efecto positivo del ión cobre en la respuesta organogénica. Los resultados de nuestro grupo sugieren que el cobre tiene un efecto mimético al de ciertas citoquininas, o refuerza su acción (Dr. Moreno, comunicación personal). Otros autores atribuyen su efecto positivo al hecho de que el ión cobre es un componente o cofactor de enzimas implicadas en el transporte de electrones, la biosíntesis de carbohidratos o el metabolismo de los polifenoles (Purnhauser y Gyulai, 1993). Su presencia en enzimas que intervienen en los procesos de detoxificación de radicales de oxígeno activos (ROS) podría ser relevante. De hecho, se ha comprobado que ciertas enzimas implicadas en la detoxificación de ROS incrementan su actividad en respuesta a una dosis adicional de cobre (Lyszcz et al., 1976; Walker y Loneragan, 1981; Loneragan et al., 1982). El incremento de la actividad de estas enzimas podría mejorar la respuesta organogénica de forma directa (suponiendo que estuvieran implicadas en la organogénesis de una u otra forma), o indirecta, limitando la acumulación de polifenoles o el nivel de estrés generado por el propio cultivo *in vitro*.

Por lo que se refiere a los trabajos de nuestro grupo, la adición de 1 mg/l de sulfato de cobre en los medios de inducción y elongación es un factor esencial a la hora de obtener plantas transgénicas de melón (García-Sogo, 1990; Bordás et al., 1997). De forma similar, en los experimentos de transformación genética en sandía conviene utilizar esta misma concentración de cobre (Ellul, 2002; Ellul et al., 2003, 2007). Por lo que se refiere a trabajos de otros grupos, se ha descrito que la adición de 1,25 mg/l de sulfato de cobre tiene un efecto positivo en la obtención de plantas transgénicas de cebada (Cho et al., 1998) y de sorgo (Wu et al., 2014).

En relación con la transformación genética en pepino, la presencia de una alta concentración de cobre en los medios que se emplean en la etapa de selección de brotes transgénicos podía ser particularmente relevante por su posible papel como mimético o estimulador de la acción de citoquininas, así como por su aparente implicación en la detoxificación de ROS. Por ello, evaluamos el efecto de la adición de 1 mg/l de sulfato de cobre tanto en el medio de inducción de organogénesis como en el medio de elongación. Los resultados indicaron que la adición de esta concentración de ión cobre en la fase de inducción no tiene un efecto positivo ni negativo; en cambio, cuando se añade en la fase de elongación mejora la calidad de la respuesta, lo que facilita la selección de brotes en medio selectivo.

### 2.2.3. Selección de plantas transgénicas de pepino

Tal y como se comentó en la 'Introducción', el gen *nptII* es el marcador más frecuentemente utilizado en experimentos de transformación en los que se emplea una estrategia de selección negativa. Por lo que respecta al pepino, ocurre lo mismo, ya que la mayor parte de autores se ha decantado por el uso de este gen. En la exhaustiva revisión de Yin et al. (2005a) se describen los marcadores empleados hasta tal fecha para llevar a cabo una selección 'negativa'. De los 42 trabajos que citan, en 30 se utilizó el gen *nptII* (resistencia a kanamicina), en 7 el gen *hpt* (higromicina) y en 5 el gen *bar* (fosfotricina). Además, los autores del mencionado artículo citan 11 experimentos realizados en el laboratorio del Dr. Stefan Malepszy con una línea de pepino casi pura ('Borszczagowski'). Con independencia del objetivo perseguido en cada caso, en 10 de estos experimentos utilizaron el gen *nptII* y en tan solo uno el gen *hpt*. Como se indica en una revisión más reciente (Wang et al., 2015), el marcador utilizado de forma mayoritaria en el caso del pepino sigue siendo el gen *nptII*. En nuestra revisión de 73 trabajos de transformación genética en pepino el marcador más utilizado fue igualmente el gen *nptII*.

Por lo que respecta al empleo de un sistema de selección positiva en pepino, conviene mencionar el artículo de He et al. (2006). Según estos autores, las células transgénicas de pepino que expresaban el gen *pmi* eran las únicas capaces de crecer en medio con manosa como fuente de carbono. Con todo, la selección más efectiva se logró en medio con 10 g/l de manosa y 10 g/l de sacarosa. Los autores mencionan que, con esta

estrategia, la tasa de transformación era del 23%, una cifra que parece muy optimista y que además es un tanto discutible, ya que la estima se realizó a partir de tan solo 22 explantes inoculados.

Teniendo en cuenta los resultados previos, decidimos utilizar el gen *nptII* en la mayor parte de los experimentos de transformación. En primer lugar, evaluamos el efecto de distintas concentraciones de kanamicina (25, 50 y 75 mg/l) en los medios de inducción y elongación de brotes. En el caso del cultivar 'Marketer' solo llegamos a seleccionar plantas transgénicas con 25 mg/l de kanamicina y, a partir de ahí, elegimos esta concentración del agente selectivo en la fase de inducción de organogénesis.

Cuando se revisan los artículos sobre transformación mediada por *Agrobacterium* en pepino, se aprecia que no hay acuerdo sobre cuál es la concentración de kanamicina más adecuada en la fase de selección. En algunos de los primeros trabajos publicados (Trulson et al., 1986; Sarmiento et al., 1992) se indicaba que el empleo de 25 mg/l de kanamicina conducía a un excesivo número de escapes. Sin embargo, Vasudevan et al. (2002) eligieron esta misma concentración de agente selectivo y sus resultados fueron satisfactorios. Otros autores han optado por una concentración de 50 mg/l (Kose y Koç, 2003; Nanasato et al., 2013) y algunos otros han llegado a utilizar 100, 150 e incluso 200 mg/l de kanamicina en la etapa de selección (Rajagopalan y Perl-Treves, 2005; Selvaraj et al., 2010; Wang et al., 2013). Muy probablemente la concentración de kanamicina más adecuada depende de las condiciones particulares del experimento y, sobre todo, del genotipo empleado.

Ensayamos también el efecto de lo que denominamos como un proceso de 'selección mixto', en el que los explantes se incubaron en medio de inducción de organogénesis, primero sin presión selectiva (1 a 5 días) y luego durante 3-4 semanas en el mismo medio con 25 mg/l de kanamicina. El porcentaje de explantes con callos GUS (+) fue aumentando a medida que se alargaba el periodo sin presión de selección. Cuando se estimó la superficie total ocupada por grupos de células GUS (+) las conclusiones fueron básicamente las mismas. Los resultados sugieren, pues, que el mantenimiento de los explantes en el medio inductor de organogénesis sin presión selectiva durante un corto

periodo (2 a 4 días) puede ser favorable, al menos en lo que se refiere al número de células o grupos de células con expresión del delator.

Por otro lado, para intentar reducir la tasa de escapes, realizamos otro experimento en el que, tras una fase de inducción de organogénesis en medio con 25 mg/l de kanamicina, se aumentó la dosis de este agente selectivo a 100 mg/l tanto en el medio de elongación como en el medio de enraizamiento de las plantas seleccionadas. El aumento de la concentración de kanamicina en esta fase, junto con la adición de nitrato de plata al medio, fueron probablemente los cambios más determinantes a la hora de obtener plantas transgénicas del cultivar 'Marketer'.

En definitiva, el empleo de kanamicina como agente selectivo permitió la obtención de plantas transgénicas de pepino, aunque no evitó la aparición de escapes. Por ello, realizamos un experimento adicional en el que evaluamos la adecuación de la higromicina como agente selectivo. Pese a que el modo de acción de estos antibióticos es similar (ambos inhiben la elongación de los polipéptidos durante la síntesis proteica), la higromicina tiene un efecto más drástico sobre las células vegetales y por ello suele utilizarse a menor concentración, no solo en el caso del pepino (Wang et al., 2015) sino también en otras especies.

Nosotros optamos por una concentración de 10 mg/l de higromicina en el experimento que realizamos con los tres cultivares que habíamos venido utilizando ('Marketer', 'Negrito' y 'Wisconsin 2843'). No tuvimos éxito con los dos primeros cultivares pero, en cambio, sí logramos seleccionar plantas transgénicas de la línea 'Wisconsin 2843'. Curiosamente, esta línea fue la que mostró una menor respuesta organogénica en los estudios realizados en la primera parte de este trabajo. Los resultados sugieren, pues, que el agente selectivo más adecuado depende no solo de las condiciones particulares del experimento, sino también del genotipo empleado.

#### 2.2.4. Estimación de la tasa de transformación en pepino

En este trabajo optamos por la elección del gen *uidA-int* como delator. Sobre la base de este sistema, evaluamos la expresión GUS (+ o -) en distintas fases del proceso de selección, así como en las plantas seleccionadas como presuntas transgénicas. La expresión del delator y sobre todo la cuantificación o estimación de la superficie ocupada por grupos de células GUS (+) en los callos seleccionados fue muy útil a la hora de evaluar el efecto de diversos cambios en el protocolo experimental. No obstante, aunque la expresión GUS a este nivel da una idea preliminar del efecto de dichos cambios, no permite predecir cuál va a ser el resultado final del experimento, es decir, no aporta datos concretos sobre la tasa de transformación.

Algunos autores estiman la tasa de transformación sobre la base del porcentaje de explantes que originan callos con yemas o brotes adventicios en medio selectivo. Esto explica el que en algunos artículos se citen tasas de transformación en pepino del 10-15-20 %, o incluso más elevadas. En nuestra opinión, esto no es correcto, primero, porque no es lo mismo hacer la estima en el medio de inducción que en el medio de elongación y, en segundo lugar, porque las cifras bajan de forma drástica cuando se analizan las plantas de pepino seleccionadas como presuntas transgénicas.

Nosotros tratamos de hacer estimas que pudiéramos considerar fiables. Para ello, en la primera fase del trabajo, aparte del análisis por PCR (del que luego haremos un comentario), intentamos realizar la estima sobre la base de tres ensayos en las plantas de pepino seleccionadas como presuntas transgénicas: test de expresión del delator en hojas de dichas plantas, evaluación de la resistencia al agente selectivo en explantes de hoja ('test de explante') y enraizamiento del ápice de cada planta en medio con agente selectivo ('test de ápice').

La experiencia del grupo con diversas especies hortícolas (tomate, melón, sandía, calabacín, etc.) y plantas ornamentales (*Ficus*, *Kalanchoe*, *Pelargonium*, *Saintpaulia*, etc.) indica que son métodos robustos que dan resultados fiables. Por desgracia, el pepino es una especie peculiar y hay que reconocer que al principio no entendíamos los resultados discrepantes cuando a veces empleábamos estos tres ensayos con una misma planta seleccionada.



Por lo que se refiere a los dos primeros ensayos (expresión del delator o de la resistencia al agente selectivo en segmentos de hoja de las plantas de pepino consideradas como presuntas transgénicas), nuestra conclusión es que conviene interpretarlos con cuidado porque pueden dar resultados distintos si se realizan con las plantas inicialmente seleccionadas o tras sucesivas rondas de propagación clonal a partir de dichas plantas. El motivo estriba en que, es probable que algunas de estas plantas sean quimeras.

En general, cuando aplicamos estos ensayos en plantas presuntas transgénicas de las especies hortícolas u ornamentales antes mencionadas, el resultado es: sí o no. En cambio, cuando realizábamos estos ensayos en las plantas de pepino inicialmente seleccionadas como presuntas transgénicas el resultado solía ser: ni sí, ni no. Lo que solía aparecer era un resultado intermedio que generaba dudas.

Es decir, en el análisis de expresión del delator no aparecía una expresión GUS (+) en la mayor parte o en toda la superficie del explante (que es lo que solemos considerar como resultado positivo), sino en alguna o algunas zonas del explante. De la misma manera, cuando una planta es transgénica, lo que cabe esperar en el 'test de explante' (resistencia al agente selectivo) es que el crecimiento y la organogénesis sean idénticos (o muy similares) a los de los explantes del *wild-type* en medio no selectivo. En cambio, cuando realizábamos este ensayo en segmentos de hoja de las plantas de pepino inicialmente consideradas como transgénicas lo que ocurría es que solo había crecimiento, desorganizado u organizado, en zonas muy localizadas del explante, razón por la cual al principio estas plantas se consideraron como escapes. Con el tiempo, este tipo de respuesta fue el que nos dio la pista de que estas plantas, o algunas de ellas, podían ser quimeras.

Por lo que respecta al 'test de ápice', ocurría algo similar. El 'test de ápice' se basa en la capacidad de enraizamiento del ápice (o de las yemas axilares) de una planta considerada como presunta transgénica en medio con agente selectivo. Es un ensayo absolutamente fiable en todas las especies con las que trabajamos habitualmente, pero no lo es (o no tiene por qué serlo) en pepino, debido a la posible naturaleza quimérica de algunas plantas inicialmente seleccionadas.

En efecto, si una planta deriva de la concrecencia o asociación de células transgénicas y no transgénicas en la yema adventicia original (Figura 26), el resultado del 'test de ápice' dependerá del tipo de quimera: mericlinal, sectorial o periclinal (Figura 27). Si se trata de una quimera periclinal, la capacidad de enraizamiento en medio selectivo va a depender de la capa histogénica de la que surgen las raíces adventicias (cosa que se desconoce en el caso del pepino) y de si la capa histogénica en cuestión está constituida por células transgénicas o no transgénicas. Si, en cambio, se trata de una quimera mericlinal o sectorial, el resultado dependerá de la estructura de la quimera, es decir del tamaño y la distribución de los sectores con células transgénicas y no transgénicas. Por este motivo, en el caso de que la planta pepino inicialmente seleccionada como transgénica sea una quimera, el 'test de ápice' solo será completamente fiable cuando se haya conseguido segregar una planta transgénica sólida a partir de la quimera original.

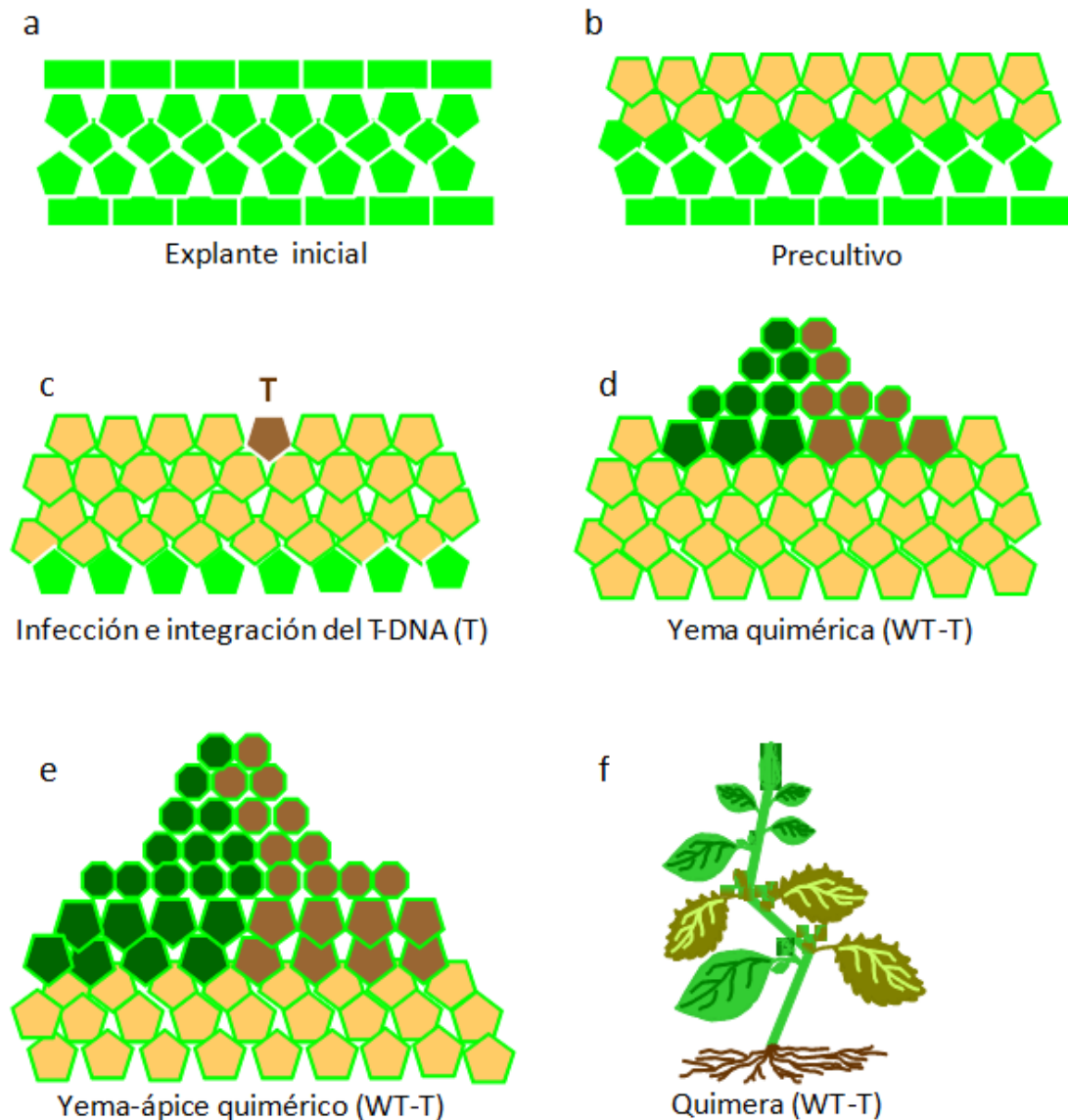
Por si fuera poco, a la hora de emplear el 'test de ápice' en pepino hay que tener en cuenta un problema adicional: cuando las plantas de algunos cultivares se mantienen durante un cierto periodo o se subcultivan varias veces en una cámara con fotoperiodo largo (i.e. 16h luz / 8 h oscuridad) suelen florecer de manera temprana (ver Figura 28, así como las dos plantas en la Figura 18). El problema es que la floración temprana, que sucede con mayor o menor frecuencia dependiendo del cultivar de pepino, está asociada a un menor desarrollo radicular. Esto supone un trastorno a la hora de llevar a cabo el 'test de ápice' en plantas consideradas como presuntas transgénicas. En efecto, para estar razonablemente seguro de que la planta es transgénica, conviene subcultivar el ápice terminal varias veces en medio de enraizamiento selectivo: si enraíza con normalidad nuestra experiencia con otras especies indica que la planta en cuestión es transgénica; no obstante, en el caso particular del pepino, al cabo de pocos subcultivos con fotoperiodo largo, lo normal es que la planta florezca de manera temprana, lo que limita el desarrollo de raíces adventicias y, por tanto, genera dudas sobre si es, o no es, transgénica.

Con los análisis moleculares (PCR o Southern) conviene tener la misma cautela a la hora de estimar la tasa de transformación en pepino. La PCR es tan sensible que basta con que haya una célula o un pequeño grupo de células transgénicas para dar un resultado positivo. Ahora bien, si la planta seleccionada es una quimera el resultado de la PCR, positivo o negativo, va a depender de si la muestra tiene, o no tiene, células transgénicas.

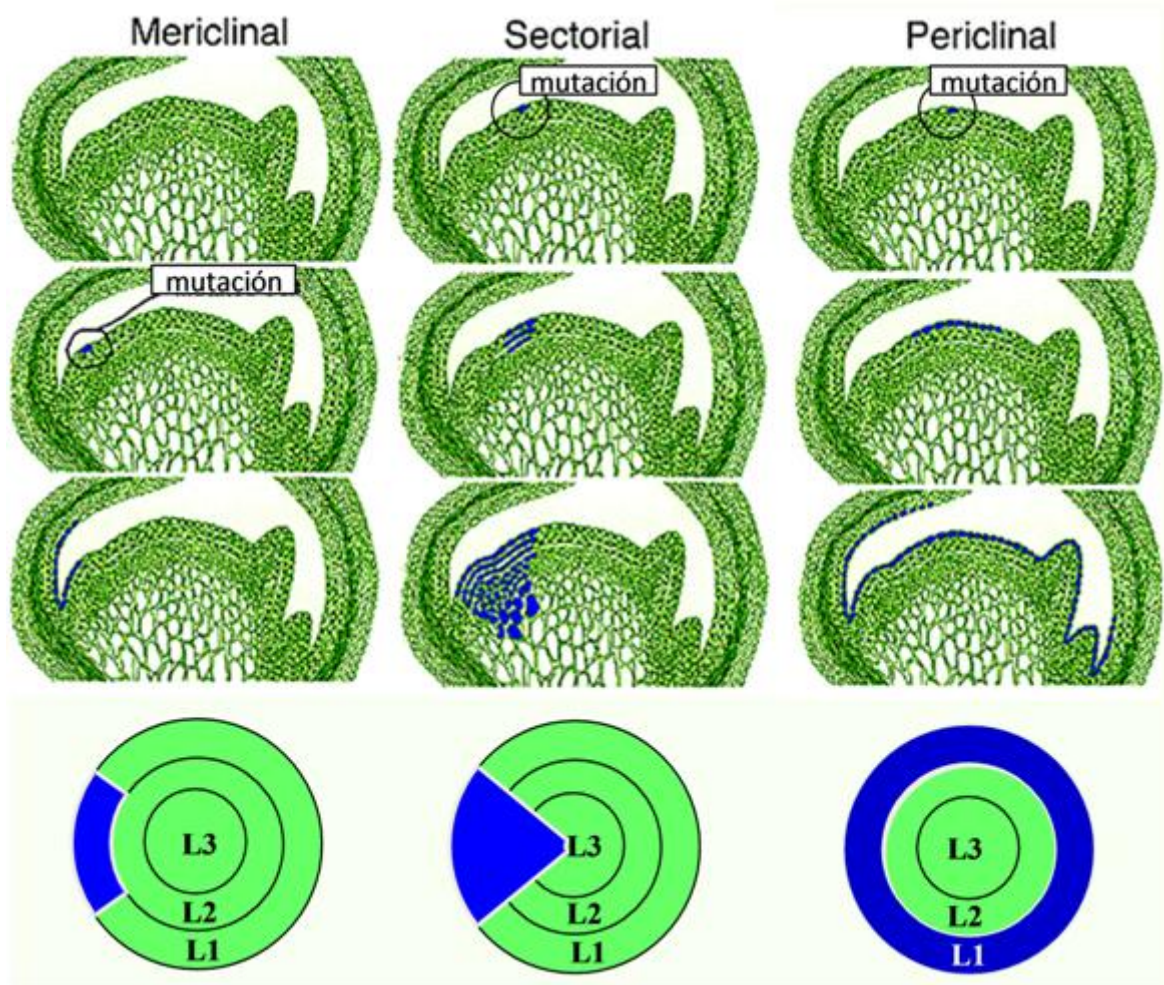
El mismo razonamiento vale para el análisis Southern y por ello hay que interpretar el resultado con suma cautela.

Dada la problemática existente en el caso del pepino, en nuestra opinión lo más adecuado es estimar la tasa de transformación sobre la base de la expresión del delator o de la resistencia al agente selectivo no en la planta inicialmente seleccionada como presunta transgénica sino tras una serie de subcultivos. Además, conviene hacerlo no en uno o pocos explantes (e.g. una o pocas hojas) sino en el mayor número de explantes posibles (i.e. todas las hojas de una misma planta). De esta forma se puede tener una idea de si la planta en cuestión es un escape, una quimera o una planta transgénica sólida. A partir de aquí, ya se puede hacer una prueba de tipo molecular y, sobre todo, analizar la transmisión del gen o genes transferidos en la descendencia de la planta.

Por lo que respecta a la obtención de plantas transgénicas sólidas a partir de una quimera, en nuestra opinión hay dos soluciones. La primera estriba en cultivar explantes de todas las hojas de cada planta seleccionada en medio de inducción de organogénesis con presión de selección (kanamicina o higromicina) para identificar los brotes adventicios y las plantas que realmente derivan de células transgénicas. La segunda estriba en abordar un proceso de sub-clonación a partir de los meristemas preexistentes, es decir, realizar el proceso de propagación no solo a partir del ápice terminal (que es lo que hacíamos hasta que surgió la hipótesis del quimerismo), sino de todas las yemas axilares de la planta inicialmente seleccionada. De esta forma, se puede llegar a segregar una planta transgénica sólida (i.e. constituida totalmente por células transgénicas) a partir de la quimera seleccionada inicialmente (Figura 29).

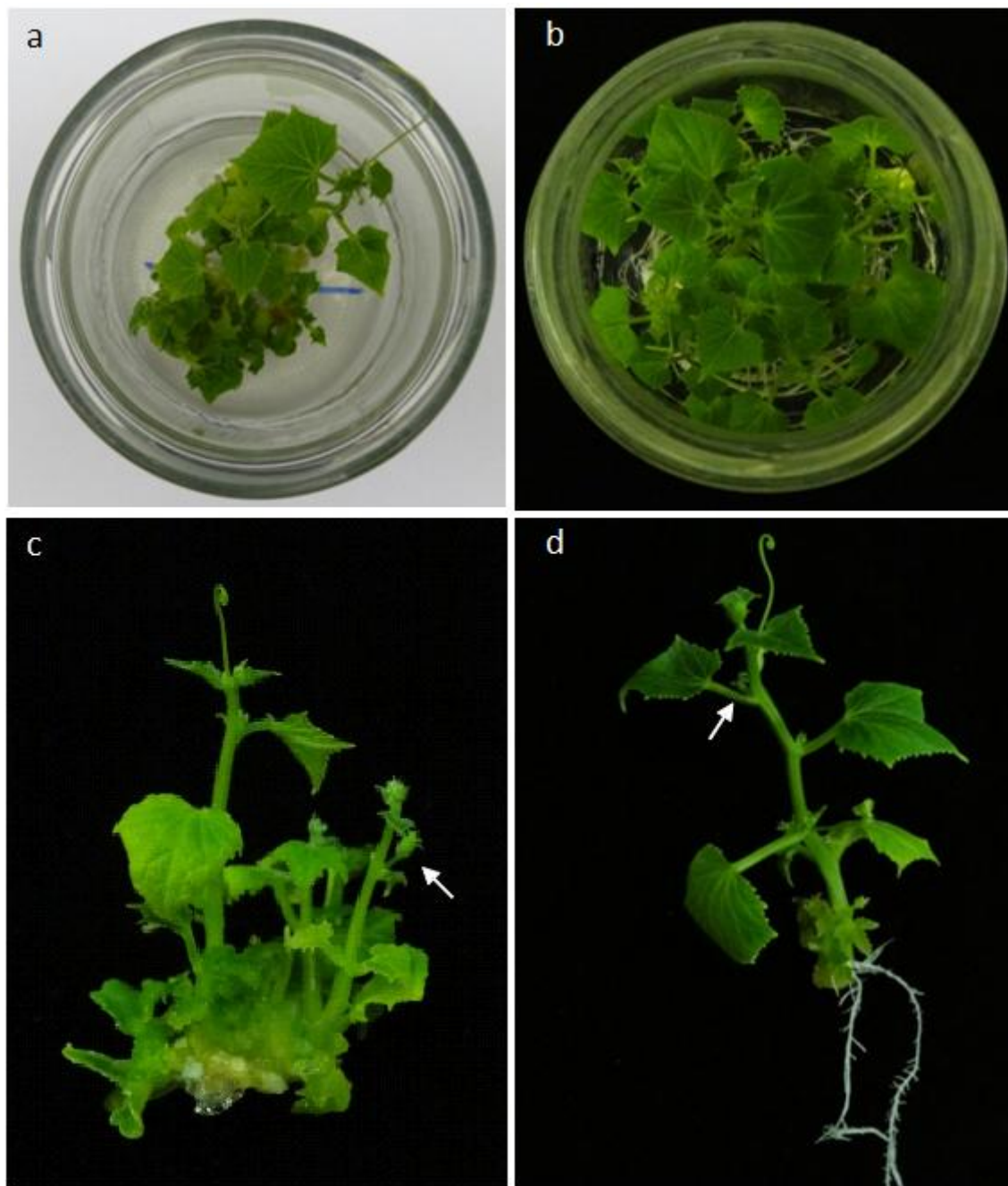


**Figura 26.** Hipótesis en torno a la aparición de quimeras en experimentos de co-cultivo de explantes de pepino con *Agrobacterium*. a) Explante inicial; b) Primeras rondas de división celular a lo largo del precultivo del explante; c) Infección con *Agrobacterium* e integración del T-DNA en la célula (T); d) Formación de una yema adventicia quimérica por concrescencia y asociación de células *wild-type* (color verde oscuro) y transgénicas (color marrón); e) Desarrollo de la yema adventicia y formación de una yema-ápice quimérica; f) Planta quimérica sectorial con células *wild-type* y transgénicas.

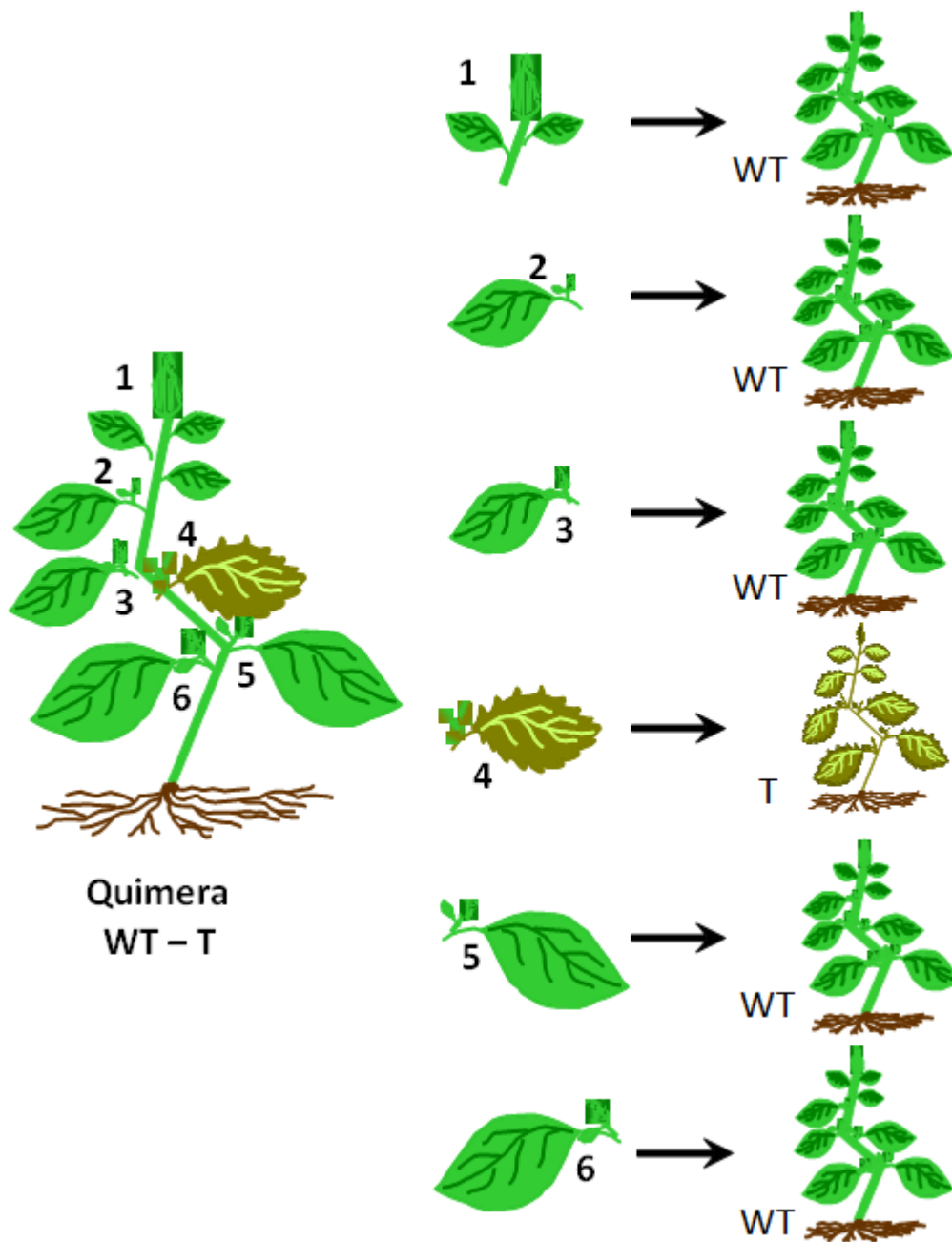


**Figura 27.** Tipos de quimeras en el caso que surja una célula mutante (círculo) en el domo meristemático. En la parte superior de la figura (tomada de la web) se representa el proceso de aparición de los tres tipos de quimeras: si las células mutantes se extienden en una sola capa aparecerá una quimera mericlinal (izquierda); si hay un corrimiento o desplazamiento de capas aparecerá una quimera sectorial (centro); si la mutación ocurre de manera temprana y se extiende por una sola capa el resultado será una quimera periclinal que, a diferencia de las anteriores, se puede mantener de forma estable. En la parte inferior de la figura se esquematizan los tres tipos de quimeras con las capas histogénicas. Nótese que, si bien la figura está pensada para el caso de que surja una célula mutante, los tres tipos de quimeras pueden aparecer en un experimento de transformación siempre que haya una concrecencia o asociación entre células transgénicas y *wild-type* en la yema adventicia original (ver Figura 26).





**Figura 28.** Elongación y enraizamiento de plantas transgénicas de la línea 'Wisconsin 2843'. a) Elongación de brotes en dos callos seleccionados tras varios subcultivos en medio FCu suplementado con 10 mg/l de higromicina; b) Enraizamiento de los brotes en medio MB3; c) Floración temprana (flecha) en un brote incluso en la fase de elongación; d) Floración temprana (flecha) en una planta en medio de enraizamiento.



**Figura 29.** Método para la segregación de una planta transgénica (T) a partir de una quimera (WT-T). En la figura se asume que la yema axilar a partir de la que surge la hoja número 4 está constituida enteramente por células transgénicas; en este caso la planta regenerada a partir de dicha yema debería ser transgénica. Nótese que si la yema en cuestión tuviera una mezcla de células transgénicas y no transgénicas la planta regenerada sería de nuevo una quimera (probablemente sectorial); en este caso habría que recurrir a una o más rondas de propagación a partir del ápice terminal y de cada una de las yemas axilares hasta conseguir la segregación de una planta transgénica sólida.

### **2.2.5. Escapes y quimeras en experimentos de transformación**

Cuando se llevan a cabo experimentos de transformación genética con ciertas especies la tasa de 'escapes' es relativamente alta, lo que representa un problema a la hora de obtener un número suficiente de plantas transgénicas, sea para llevar a cabo el análisis funcional de un gen o para conseguir una aplicación práctica.

Este fenómeno ocurre en especies de la familia Cucurbitaceae, aunque la frecuencia de aparición de escapes difiere según la especie. En sandía, la frecuencia de escapes no suele ser muy elevada (Ellul, 2002; Ellul et al., 2003, 2007). En el caso del melón la tasa de escapes depende de la línea, cultivar o variedad (Dra. García-Sogo y Dr. Pineda, comunicación personal), aunque no representa un problema limitante. En el caso del pepino, la tasa de escapes también depende del genotipo pero, salvo en genotipos concretos, es el principal problema que plantea la transformación genética en esta especie.

A primera vista puede parecer que la aparición de escapes se debe al empleo de un método inadecuado o a la ausencia de eventos de transformación. En realidad, no tiene por qué ser así. El método empleado puede ser adecuado en el sentido de que se consigan eventos de transformación, aunque el resultado final no sea el deseado.

La problemática en torno a este tema queda ilustrada en el título de un artículo de Jordan y McHughen (1988): '*Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots*'. Parece un contrasentido, pero esto es precisamente lo que ocurre en ciertas especies. En realidad, el tema de los escapes y quimeras plantea una problemática mucho más amplia y compleja de lo que parece deducirse por el título del mencionado artículo.



### 2.2.5.1. El cultivo en medio selectivo no excluye la aparición de escapes y quimeras

En la mayor parte de los trabajos publicados sobre transformación genética se hace énfasis en el número total de plantas transgénicas obtenidas o, más habitualmente, en la tasa de transformación (aparente o efectiva). Es lógico que se haga hincapié en los resultados positivos, pero a veces los datos negativos (e.g. los relacionados con la aparición de escapes o quimeras) son tan importantes como los anteriores. Por fortuna, en algunos trabajos sí se aportan datos concretos sobre la aparición de escapes o quimeras.

Por ejemplo, Domínguez et al. (2004) publicaron los resultados de un trabajo exhaustivo en el que caracterizaron las plantas regeneradas en condiciones selectivas que habían obtenido tras el co-cultivo de explantes de citrange (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) y lima (*Citrus aurantifolia*) con *Agrobacterium tumefaciens*. La selección se realizó en un medio con kanamicina (i.e. utilizaron el gen marcador *nptII*) y, a continuación, se analizó la expresión del gen delator (en algunos experimentos el gen *uidA* y en otros el *gfp*) y se llevó a cabo la caracterización molecular.

En el caso de citrange, la frecuencia de plantas regeneradas en medio con kanamicina que expresaban el gen *uidA* (GUS+ en todos los tejidos analizados) fue del  $54,6 \pm 6,3\%$ . El resultado es muy positivo pero conviene resaltar que solo la mitad de estas plantas fueron transgénicas. Dicho de otra forma, sus datos revelaron que la mitad de las plantas obtenidas en medio selectivo eran escapes. Es más, la frecuencia de plantas quiméricas (i.e. GUS+ en ciertas partes de la planta pero no en otras) era muy elevada ( $37,5 \pm 11,4\%$ ).

En el caso de la transformación de lima, sólo el  $8,6 \pm 2,6\%$  de las plantas regeneradas se podían considerar como transformantes sólidos. Las restantes eran escapes ( $72,9 \pm 9,1\%$ ) o quimeras ( $18,5 \pm 7,4\%$ ).

Por su experiencia en la transformación de cítricos, los autores suponían que el número de escapes iba a ser considerable; lo que no esperaban es que la frecuencia de quimeras fuera tan alta.

### 2.2.5.2. Escapes y quimeras

El término escape se podría definir en dos sentidos. En sentido amplio, un escape sería una planta no transgénica obtenida en un experimento de transformación. En sentido estricto, sería una planta no transgénica obtenida tras el empleo de un esquema de selección negativa (e.g. resistencia a un antibiótico, herbicida, u otra droga).

En caso de utilizar un esquema de selección positiva (e.g. gen *pmi* y cultivo en medio con manosa) no tiene sentido hablar de escapes porque, por la propia naturaleza del sistema, es lógico que junto con las plantas transgénicas aparezcan otras que no lo son.

Por lo que respecta a la aparición de quimeras en experimentos de transformación, algunos autores piensan que este problema solo afecta a las especies de reproducción vegetativa. Por desgracia, no es así. Con independencia del modo de reproducción (vegetativa o sexual) la aparición de quimeras en un experimento de transformación puede conducir a resultados difíciles de explicar, o incluso aparentemente absurdos, en la caracterización de las plantas (supuestamente) transgénicas. Además, en una especie de reproducción sexual la aparición de quimeras puede dar resultados anómalos en los análisis de segregación efectuados en la progenie de estas plantas.

Se asume que las angiospermas tienen tres capas histogénicas (L1, L2 y L3) que dan lugar a linajes celulares que, a la larga, determinan la estructura de una planta (Poethig, 1989). Suele decirse también que las células de la línea germinal derivan de la capa L2, aunque a lo largo del desarrollo ontogénico puede haber un corrimiento o desplazamiento de capas, por lo que la estructura final y el destino de cada tipo celular puede diferir de lo esperado.

Por lo que respecta a la transformación, si la regeneración se verifica a través de embriogénesis somática, se asume que no van a aparecer quimeras porque, en teoría, la embriogénesis se produce a partir de células individuales.

Si la regeneración se verifica por organogénesis adventicia, la causa más obvia que explicaría la formación de una quimera en un experimento de transformación estriba en que se origine una yema adventicia a resultas de la asociación o concrecencia de células transgénicas y no transgénicas (Figura 26). Además, pueden aparecer quimeras por la

concrecencia de células de estructuras ya organizadas. Asumiendo lo primero, lo lógico es que, en primer lugar, se forme una quimera mericlinal que, más adelante, puede convertirse en una quimera sectorial (si hay desplazamiento de capas) o, alternativamente, en una quimera de tipo periclinal (Figura 27).

En una especie de reproducción vegetativa la quimera periclinal suele ser estable y la estructura quimérica se puede mantener a lo largo de sucesivas rondas de propagación. En cambio, las quimeras mericlinales o sectoriales deberían experimentar cambios en su estructura a lo largo de los sucesivos ciclos de propagación vegetativa.

En una especie de reproducción sexual los tres tipos de quimeras podrían originar situaciones confusas a la hora de llevar a cabo la caracterización de las plantas (supuestamente) transgénicas. Asumiendo que las células de la línea germinal deriven de la capa L2, si se parte de una quimera periclinal con una estructura L1 (no transgénica) : L2 (transgénica) : L3 (no transgénica), el patrón de segregación sería fácilmente interpretable. En cambio, si en una quimera periclinal hay corrimiento de capas, el patrón de segregación puede no ajustarse a las proporciones esperadas (va a depender del origen de la inflorescencia o de la flor). Lo mismo ocurriría en una quimera mericlinal o sectorial. En este caso, el problema es que no habría un patrón de segregación sino varios, por lo que los resultados serían un tanto erráticos.

Una situación igualmente confusa puede surgir al llevar a cabo los habituales análisis de expresión (e.g. resistencia a kanamicina conferida por el gen marcador *nptII*, expresión del delator *uidA* o *gfp*) o la caracterización molecular (PCR o Southern). Por ejemplo, si una planta TG1 es una quimera periclinal del tipo L1 (no transgénica) : L2 (no transgénica) : L3 (transgénica), la PCR o el Southern realizado en la TG1 darán un resultado positivo, pero los análisis de expresión (en TG1 o TG2) podrían dar resultados negativos, confusos o erráticos. En este caso concreto, si no ha habido un corrimiento de capas y el análisis de expresión se hace en la progenie TG2, lo esperable es que todas las plantas sean sensibles a la kanamicina; si, en cambio, se hace el análisis de expresión con el 'test de explante en la TG1', el resultado dependerá de cuál sea el explante elegido y de qué células del explante participen en el proceso de regeneración. En definitiva, las

quimeras se podrían considerar como un tipo particular de escapes que pueden generar tanta o más confusión que los escapes propiamente dichos.

### 2.2.5.3. Posibles causas de la aparición de escapes

Aunque no hay muchos artículos en los que se realice una discusión sobre este tema, se pueden obtener datos de interés a partir de una serie de trabajos con distintas especies como el tabaco (Park et al., 1998), col (Berthomieu et al., 1994), patata (Rakosy-Tican et al., 2007) u otras como *Crambe abyssinica* (Li et al., 2013). En cualquier caso, desde nuestro punto de vista, los datos más relevantes surgen de una serie de artículos relacionados con la transformación de cítricos (ver las referencias que se citan a continuación). Hasta no hace mucho estas especies se consideraban recalcitrantes para la transformación pero gracias al esfuerzo de distintos laboratorios y, sobre todo, a la magnífica labor que han realizado en el IVIA el grupo de los Dres. Leandro Peña y Luis Navarro, se han podido obtener plantas transgénicas en la mayor parte de especies relevantes.

La regeneración en cítricos se puede conseguir por ambas vías, organogénesis adventicia y embriogénesis somática. Por lo que respecta a la transformación, el método habitual ha consistido en el co-cultivo de segmentos de epicótilo o segmentos internodales de tallo con *Agrobacterium tumefaciens*. De esta forma, se han obtenido plantas transgénicas de naranjo dulce (*Citrus sinensis*) (Peña et al., 1995b; Cervera et al., 1998a; Bond y Roose, 1998), naranjo trifoliado (*Poncirus trifoliata*) (Kaneyoshi et al., 1994), citrange (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) (Peña et al., 1995a; Gutiérrez et al., 1997; Cervera et al., 1998b), lima (*Citrus aurantifolia*) (Peña et al., 1997; Domínguez et al., 2000), naranjo amargo (*Citrus aurantium*) (Ghorbel et al., 2000), pomelo (*Citrus paradisi*) (Luth y Moore 1999; Yang et al., 2000; Costa et al., 2002), limonero (*Citrus limon*) y uno de los patrones habituales en esta última especie (*Citrus macrophyla*) (Ghorbel et al., 2001a).

El empleo de una raza supervirulenta de *Agrobacterium* (Ghorbel et al., 2001a), el desarrollo de métodos de infección y co-cultivo, el diseño de métodos de regeneración (Cervera et al., 1998b; Domínguez et al., 2000; Ghorbel et al., 2001a) y la rápida producción de plantas transgénicas a través del microinjerto de ápices transgénicos en patrones vigorosos (Peña et al., 1995a; Peña y Navarro 1999) han sido los factores claves

en la obtención de plantas transgénicas de cítricos. A pesar de ello, algunas especies relevantes como clementinas (*Citrus clementina*) y satsumas (*Citrus unshiu*) siguen siendo recalcitrantes para la transformación, y lo mismo ocurre con algunos genotipos de naranja amarga, naranja dulce o mandarina Clementina (*Citrus clementina*). Tal y como ocurría cuando se consideraban a los cítricos como especies recalcitrantes, el problema en estos casos no estriba en los factores que habitualmente se contemplan a la hora de diseñar un protocolo de transformación, sino en la alta frecuencia de escapes, que puede oscilar entre el 60 % y 90 % (o más) de las plantas regeneradas (Yu et al., 2002; Costa et al., 2002; Domínguez et al., 2004).

En principio, la aparición de escapes podría deberse a las siguientes causas:

- Efecto negativo del precultivo.
- Diseño inadecuado del proceso de selección.
- Tolerancia endógena de las células vegetales al agente selectivo.
- Selección de células mutantes resistentes al agente selectivo.
- Silenciamiento epigenético del gen marcador y/o delator.
- Persistencia de *Agrobacterium*.
- Expresión transitoria del gen marcador en las primeras etapas del proceso.
- Protección cruzada.
- Reorganizaciones o pérdida del T-DNA

A continuación se realizará una discusión en torno a lo que se conoce sobre cada una de las posibles causas de aparición de escapes.

#### Efecto negativo del precultivo.

Al igual que hacemos nosotros, la mayor parte de los investigadores que trabajan en el campo de la transformación utiliza un precultivo de los explantes en un medio inductor de división celular durante unas horas o pocos días. En teoría, el precultivo de los explantes debería ser positivo por dos razones. En primer lugar, la reacción de herida provocada por el corte de los explantes y el precultivo subsiguiente promoverían la

expresión de los genes *vir*, lo que genera la cadena de acontecimientos que en última instancia determinan las primeras etapas del proceso de desenganche y transferencia del T-DNA. Además, el precultivo en un medio inductor de división celular generaría un cambio en el estado epigenético de las células del explante, ayudando a la desdiferenciación y ulterior acumulación de células en la fase S del ciclo celular. Al respecto, la mayor parte de los investigadores está de acuerdo en que esta fase es la más adecuada para que se produzca la integración del T-DNA.

A pesar de lo indicado, Rakosy-Tican et al. (2007) opinan que una cierta proporción de los escapes en sus experimentos de transformación con la patata podría deberse a que el pre-tratamiento con auxina en la fase inicial del proceso (en realidad, utilizan un medio de precultivo con 10 mg/l de NAA y 10 mg/l de zeatina) actuaría como "una señal que estimularía la aparición de escapes". La base de su argumento es que el proceso de desdiferenciación inducido por auxinas promovería o induciría un estado de competencia en las células no transgénicas, lo que originaría la aparición de escapes. Pese a lo que sugieren en su artículo, estos autores no hicieron un estudio para comparar lo que ocurre cuando se realiza la transformación con y sin un precultivo de los explantes.

Ghorbel et al. (1999) sí hicieron un estudio de este tipo en su trabajo con cítricos (*Citrus aurantium*, *Citrus aurantifolia* y *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) y sus resultados fueron reveladores. Utilizando el gen delator *gfp* fueron capaces de identificar las células competentes para la regeneración, concretamente las que aparecen *de novo* como consecuencia de la reacción de herida en la vecindad del cambium de los explantes. Además, comprobaron que la gran mayoría de las plantas con expresión GFP surgía organogénesis casi directa a partir de estas células, mientras que todas las plantas que aparecían por organogénesis directa a partir de las células del explante eran escapes. Como consecuencia, concluyeron que el proceso de división celular inducido por el precultivo es un requerimiento para la transformación en estas especies.

Peña et al. (2004) realizaron nuevos experimentos en esta misma dirección y aportaron evidencias adicionales de que las células competentes para la transformación están situadas en la callosidad que aparece cerca del anillo de haces vasculares como consecuencia del precultivo de los explantes. Además, observaron que modificando la

composición del medio de cultivo se podía conseguir un mayor número de células en fase S, las cuales, tal y como se ha comentado antes, parecen ser las más propensas para la integración del T-DNA.

Nuestros resultados con el pepino y otras cucurbitáceas son coherentes con las observaciones de estos autores en cítricos. En nuestra opinión, la fase de precultivo es positiva y no cabe considerarla como una de las causas primarias de la aparición de escapes. Puede ser que un precultivo excesivamente largo (e.g. bastantes días o incluso semanas) determine la inducción de competencia en células no transgénicas, pero es difícil que esto ocurra cuando se utiliza un precultivo de unas horas o pocos días (e.g. 2-3 días), que es lo que nosotros hacemos en el caso del pepino y otras cucurbitáceas. Pese a lo que acabamos de indicar, en el caso de cítricos, Ghorbel et al. (1999) utilizaron un precultivo largo (dos a tres semanas) y, aún así, sus resultados indicaron que esta no es la causa de aparición de escapes.

#### Diseño inadecuado del proceso de selección.

No hay duda de que los genes marcadores han jugado, y siguen jugando, un papel importante en el proceso de selección de plantas transgénicas. En general, la presión de selección para un cierto gen marcador (i.e. la concentración del agente selectivo que solo debería permitir el crecimiento y la morfogénesis de las células que expresan dicho gen) se establece mediante lo que suele denominarse como una "curva de muerte". La práctica habitual consiste en ir ensayando distintas concentraciones del agente selectivo (e.g. kanamicina, higromicina, fosfotricina, etc.) hasta encontrar una concentración que inhiba el crecimiento de las células de los explantes del *wild-type*. Evidentemente, pueden haber varias concentraciones en las que el 100 % de los explantes no sean capaces de crecer ni regenerar plantas. Lo lógico es elegir es la menor de las concentraciones que inhiba el crecimiento y la morfogénesis en todos los explantes, ya que de esta forma no deberían haber escapes en el proceso de selección, al tiempo que se evitan los efectos deletéreos asociados a una excesiva concentración del antibiótico, herbicida o cualquier otro producto tóxico. Esta es la teoría, pero por desgracia la experiencia demuestra que los resultados experimentales pueden ser distintos a los esperados.

Por ejemplo, Park et al. (1998) realizaron un estudio para determinar las concentraciones más adecuadas de dos agentes selectivos (fosfinotricina e higromicina) en experimentos de transformación en tabaco. Conviene resaltar que el tabaco es una especie modelo en la que resulta trivial obtener plantas transgénicas. Lo habitual con esta especie es utilizar el gen marcador *nptII* y la kanamicina como agente selectivo. Empleando una concentración de 100 mg/l de kanamicina, lo normal es obtener decenas o centenares de plantas transgénicas a partir de un pequeño número de explantes. Teniendo en cuenta la facilidad que ofrece este esquema de selección puede parecer innecesario ensayar otros agentes selectivos. En realidad no es así, porque a veces se precisa disponer de esquemas de selección alternativos, por ejemplo para llevar a cabo la complementación de un mutante de inserción.

Sea por la razón que sea, Park et al. (1998) estudiaron la adecuación de dos genes marcadores alternativos: *pat* (que codifica una fosfinotricin-acetil-transferasa) y *hpt* (que codifica una higromicina-fosfotransferasa). Como suele ser habitual, antes de los experimentos de transformación evaluaron el comportamiento de explantes de hoja de plantas *wild-type* de tabaco en medios con glufosinato de amonio (fosfinotricina) e higromicina. A resultas de estos estudios, comprobaron que los explantes de tabaco no eran capaces de regenerar brotes adventicios en medios con 2, 3 y 4 mg/ de fosfinotricina, y tampoco lo hacían en un medio con 50 mg/l de higromicina. A continuación, co-cultivaron discos de hoja con cepas de *Agrobacterium tumefaciens* en las que el T-DNA portaba el gen marcador (*hpt* o *pat*) así como un gen *Bt* que confiere resistencia a ciertos insectos. Procedieron entonces a la selección de plantas (supuestamente) transgénicas en cada una de estas 'condiciones selectivas' (i.e. 2, 3 y 4 mg/ de fosfinotricina y 50 mg/l de higromicina). Para determinar si las plantas obtenidas eran realmente transgénicas emplearon tres métodos: i) caracterización molecular por Southern; ii) análisis de expresión del gen marcador (*hpt* o *pat*) mediante cultivo de segmentos de hoja en medios con las respectivas concentraciones de higromicina y fosfinotricina, respectivamente; y iii) un ensayo biológico que consistía en alimentar a ciertos insectos con hojas de las plantas regeneradas a fin de ver el efecto de la expresión del gen *Bt*.



Por lo que respecta a la caracterización molecular, realizaron el análisis de hibridación Southern en 8 plantas seleccionadas en medio con 50 mg/l de higromicina, 7 en medio con 4 mg/l de fosfinotricina (PPT), 43 en medio con 3 mg/l de PPT y 25 en medio con 2 mg/l de PPT. Todas las plantas seleccionadas en medio con 50 mg/l de higromicina eran transgénicas y habían integrado una simple copia del T-DNA. Las 7 plantas seleccionadas en medio con 4 mg/l de PPT eran también transgénicas. Sin embargo, la caracterización molecular indicó que solo 2 de las 43 plantas seleccionadas en medio con 3 mg/l de PPT eran transgénicas, y ninguna de las 25 plantas seleccionadas en medio con 2 mg/l de PPT lo eran. Conviene resaltar que los resultados del 'test de explante' (cultivo de segmentos de hoja en medio selectivo) y del bioensayo (alimentación de larvas con explantes de hoja) fueron concordantes con los resultados de la caracterización molecular.

Es decir, en los explantes de tabaco no inoculados en medios con 2 y 3 mg/l de PPT no se observaba crecimiento ni formación de brotes adventicios, lo que parecía indicar que estas dos concentraciones eran adecuadas para la selección de las plantas transgénicas. Sin embargo, cuando se cultivaban explantes inoculados en los mismos medios se obtenían plantas, pero el 95 - 100 % de las mismas eran escapes.

Para evitar la aparición de escapes, Park et al. (1998) recomendaron utilizar una concentración del agente selectivo superior a la que impide el crecimiento y la morfogénesis en explantes de las plantas *wild-type*. Teniendo en cuenta sus resultados la conclusión parece lógica, pero a la hora de la verdad es un tanto cuestionable. Es verdad que los análisis efectuados (Southern, ensayo de expresión y bioensayo) indicaron que empleando una concentración de 50 mg/l de higromicina o de 4 mg/l de fosfinotricina no obtenían escapes. Aún así, cuando se observan con atención sus datos resulta que en estas condiciones selectivas obtuvieron muy pocas plantas transgénicas (8 y 3, respectivamente), lo que no deja de ser preocupante teniendo en cuenta que el tabaco es una planta modelo en el campo de la transformación. Además, conviene tener en cuenta que si hubieran utilizado estas mismas dosis de higromicina o fosfinotricina en otra especie lo más probable es que ni siquiera se hubiera conseguido la regeneración de plantas (transgénicas o escapes).

Por lo que respecta a la selección sobre la base del gen *nptII*, el incremento de la dosis de kanamicina tampoco garantiza la ausencia de escapes. Así por ejemplo, en experimentos de transformación de patata, Rakosy-Tican et al. (2007) no obtuvieron ningún resultado positivo utilizando una concentración de kanamicina mayor de la que inhibe el crecimiento y la regeneración de las células wild-type. En realidad, lo que observaron tras el co-cultivo fue una disminución de la tasa de regeneración y ello a pesar de que la kanamicina no es tan tóxica como la higromicina o fosfinotricina.

Los experimentos de transformación en cítricos dieron resultados aún más contundentes. La mayor frecuencia de ápices transgénicos (y por tanto la menor tasa de escapes) se logró empleando 100 mg/l de kanamicina en el medio selectivo (Peña et al., 1997; Cervera et al., 1998b). Sorprendentemente, al utilizar concentraciones más elevadas solo obtuvieron escapes (Cervera et al., 1998b). Además, si en lugar de kanamicina se utilizaba geneticina como agente selectivo la tasa de transformación disminuía de forma drástica (Peña et al., 1997).

En definitiva, aunque el aumento de la concentración del agente selectivo parece ser la solución más obvia para disminuir la tasa de escapes (Dong y McHughen 1993; Seabra y Pais 1998; Park et al., 1998; Niu et al., 2000), en la práctica los resultados pueden ser distintos a los esperados. Es más, el empleo de una dosis excesiva de un agente selectivo puede ser perjudicial, ya que las células muertas liberan productos tóxicos que inhiben el crecimiento y la regeneración de las células transformadas (Klee et al., 1987).

Ante la problemática existente, en lugar de incrementar la concentración de un agente selectivo, probablemente lo mejor es tratar de encontrar otro que minimice la tasa de escapes (Kuvshinov et al., 1999). El problema es que, como se ha comentado en la 'Introducción', el número de agentes selectivos es más limitado de lo que pueda parecer.

Algunos autores han propuesto emplear una 'selección gradual', es decir, ir incrementando paso a paso, o subcultivo tras subcultivo, la concentración del agente selectivo. En particular, se ha propuesto el uso de la 'selección gradual' cuando se emplean agentes selectivos con efectos drásticos, tales como la fosfinotricina y la higromicina (Aoshima, 2005; Boszoradova et al., 2011; Abou-Alaiwi et al., 2012; Li et al., 2013). La idea es evitar la liberación de productos tóxicos por parte de las células

mueras, al tiempo que se favorece el crecimiento y la morfogénesis a partir de las células transformadas.

Se ha publicado que una baja concentración de higromicina podría promover la embriogénesis somática (Park et al., 1995; Aoshima, 2005), lo que sería un motivo más para apoyar el empleo de la 'selección gradual'. Puede que esto sea así en el caso del lino (Park et al., 1995) y *Camellia sinensis* (Aoshima, 2005) pero es dudoso que ocurra lo mismo en la gran mayoría de especies. No está clara tampoco la naturaleza de este efecto positivo, a no ser que suceda algo similar a lo que ocurre con la cefotaxima. Este antibiótico no es un agente selectivo (se utiliza para la erradicación de *Agrobacterium*,) pero suele haber un acuerdo en el sentido de que concentraciones moderadas (200 - 300 mg/l) tienen un efecto beneficioso sobre la organogénesis. Aunque no se conoce la naturaleza de este efecto, es probable que se deba a una estimulación del desarrollo organizado a través de la limitación del crecimiento desorganizado. Si así fuera, no se trataría de un efecto directo (inductor o estimulador), sino más bien de un cambio en la relación entre crecimiento organizado y desorganizado.

Con independencia de lo anterior, la mayor parte de autores no utiliza la 'selección gradual' porque a la hora de la verdad no ofrece ninguna ventaja obvia y, en ocasiones, lo único que se consigue es aumentar la frecuencia de escapes.

#### Tolerancia endógena de las células vegetales al agente selectivo.

Tras un experimento de co-cultivo de segmentos de hipocótilo de lino, Jordan y McHughen (1988) consiguieron la regeneración de plantas en medio con kanamicina pero, a continuación, observaron que las progenies de casi todas ellas eran sensibles al agente selectivo. Según estos autores, los escapes podían surgir de células no transformadas que habían experimentado una 'protección' a partir de las células transgénicas, un tema que comentaremos a continuación. Además, propusieron la hipótesis de que las células vegetales de algunas especies podrían tener una cierta 'tolerancia endógena no específica' a los antibióticos o herbicidas utilizados habitualmente para la selección de eventos de transformación.

La hipótesis, aunque sugerente, es poco convincente. Si existiera una cierta tolerancia endógena, habría algún tipo de crecimiento en los explantes no inoculados del *wild-type* cuando se incuban con la presión de selección que se ha elegido para llevar a cabo el experimento de transformación, cosa que en nuestro no sucede nunca, ni en el caso del pepino ni en el resto de especies con las que trabajamos en el laboratorio.

De forma similar, en sus experimentos de transformación en cítricos, Domínguez et al., (2004) tampoco observaron formación de callo o respuesta morfogenética en explantes no inoculados incubados en medio con 100 mg/l de kanamicina, que es la dosis que utilizaron para la selección de plantas transgénicas a partir de explantes inoculados. Es más, para descartar la existencia de una tolerancia endógena no específica, cuantificaron la acumulación del enzima codificado por el gen *nptII* (neomicina-fosfotransferasa-II o NPTII) tanto en hojas de plantas *wild-type* como de plantas seleccionadas por su resistencia a la kanamicina y la expresión del gen delator (*gus* o *gfp*). En una muestra de 20 plantas transgénicas de citrange y lima seleccionadas aleatoriamente la acumulación del enzima NPTII en hojas oscilaba entre 1100-6000 ng NPTII/mg de proteína total en citrange y 2900-9100 en lima. En cambio, detectaron actividad NPTII en hojas de plantas *wild-type* regeneradas a partir de explantes no inoculados tras el cultivo en medio de regeneración sin kanamicina. Como consecuencia, concluyeron que la hipótesis de la tolerancia endógena no específica no es la causa de la aparición de escapes o quimeras en sus experimentos de transformación.

#### Selección de células mutantes resistentes al agente selectivo.

La 'selección *in vitro*' o 'selección a nivel celular' permite la obtención de plantas tolerantes o resistentes frente a un determinado agente selectivo (Carlson, 1973). Si existe correlación de respuestas *in vitro* - *in vivo*, el fenotipo no solo se manifiesta en las células sino también en la plantas regeneradas. De esta forma, es factible obtener resultados de interés práctico, tales como la selección de plantas tolerantes a metales pesados, resistentes a herbicidas o resistentes a enfermedades ocasionadas por un organismo fitopatógeno que sintetiza una toxina que actúa como factor de virulencia.

Birch (1997) propuso que, al igual que se seleccionan *in vitro* plantas mutantes resistentes a un metal pesado, una toxina, etc., se pueden seleccionar mutantes resistentes a

cualquiera de los agentes selectivos que se utilizan en los experimentos de transformación genética, y que por tanto esta sería una de las posibles causas de la aparición de escapes. Su propuesta parece lógica pero es un tanto cuestionable.

Por un lado, está claro que es factible utilizar la selección *in vitro* para intentar conseguir plantas mutantes resistentes a los antibióticos o herbicidas que se utilizan habitualmente en los experimentos de transformación como agentes selectivos. Es más, aunque los primeros resultados en el campo de la fusión de protoplastos se obtuvieron sin el empleo de marcadores (híbridos *Nicotiana glauca* + *N. langsdorfii*; Carlson et al., 1972), la obtención de mutantes mediante selección *in vitro* ha sido clave en el ulterior desarrollo del campo de la hibridación somática. Al respecto cabe destacar el trabajo pionero de Pal Maliga y sus colaboradores, quienes obtuvieron plantas de tabaco resistentes a la estreptomycin (Maliga et al., 1973, 1975) que en su día fueron claves para diseñar estrategias de selección para la identificación de híbridos somáticos. De forma similar, la selección *in vitro* ha permitido la obtención de plantas resistentes a herbicidas, algunas de las cuales podrían competir con ventaja con respecto a las transgénicas del mismo tipo que actualmente están en el mercado.

A pesar de que la selección *in vitro* es uno de los métodos más adecuados para obtener ciertos mutantes (e.g. resistentes a antibióticos o herbicidas), es poco probable que la mayor parte de los escapes que surgen en los experimentos de transformación se deba a la aparición de células mutantes a lo largo del proceso de selección. Hay varios motivos que apoyan la anterior afirmación.

En primer lugar, el fundamento de la selección *in vitro* se basa en la ley de los grandes números. En efecto, para detectar mutantes *in vivo* lo habitual es aplicar tratamientos mutagénicos con agentes físicos (e.g., rayos  $\gamma$ , X, o UV) o productos químicos (e.g. EMS) a fin de incrementar la tasa de mutación. Aún así, para detectar un mutante dominante con un fenotipo relevante hay que cultivar un enorme número de plantas M1 y, de la misma forma, para identificar un mutante recesivo hay que cultivar un gran número de progenies M2 y un número mínimo de plantas por progenie (al menos 11 de cada M2 para detectar un homocigoto recesivo con una probabilidad de fallo del 5%). Esto requiere una enorme superficie de invernadero o de campo, y de ahí las limitaciones del

método tradicional para la detección de mutantes. La ventaja del cultivo *in vitro* es obvia. Si se obtienen callos de crecimiento desorganizado a partir de explantes o de protoplastos se pueden cultivar millones de células en un simple recipiente (e.g. una placa de Petri). Por este motivo, cultivando callos primarios (i.e. procedentes de explantes o protoplastos) o callos de una línea celular permanente en un medio con una cierta presión de selección es bastante probable que se consiga detectar una o varias células mutantes resistentes al agente selectivo que, en condiciones adecuadas, darán lugar a plantas con el fenotipo deseado.

Esto no es lo que sucede en un experimento de transformación. En efecto, en el caso del co-cultivo de explantes primarios con *Agrobacterium*, aunque se lleve a cabo un precultivo antes de la infección, el número de células que surgen por división celular en la zona de herida del explante es muy limitado. Por tanto es poco probable que se detecte un mutante resistente al agente selectivo empleado. En el caso de que se utilice la biolística, el bombardeo con partículas cargadas con ADN suele hacerse directamente en los explantes y por tanto la probabilidad de que aparezca una planta mutante resistente al agente selectivo es aún menor. Está claro que una célula de los tejidos somáticos de la planta podría haber experimentado una mutación que confiriera resistencia a un agente selectivo, pero la probabilidad de este evento es muy baja. Esto puede explicar la aparición de un escape (i.e. una planta), pero no de todos.

En segundo lugar, es verdad que la selección *in vitro* permite obtener mutantes resistentes a ciertos antibióticos o herbicidas que luego resultan de gran utilidad como marcadores en experimentos de hibridación somática, pero no es tan fácil obtener ciertos tipos de marcadores. Por ejemplo, por lo que respecta a los antibióticos, la identificación de mutantes resistentes a la estreptomina mediante selección *in vitro* (Maliga et al., 1973, 1975) tuvo una gran trascendencia. Sin embargo, por la razón que sea, no es fácil obtener mutantes resistentes a la kanamicina o higromicina, que son los antibióticos habitualmente utilizados como agentes selectivos en el campo de la transformación genética. Es más, cuando se pretende utilizar un mutante resistente a la kanamicina como marcador en experimentos de hibridación somática lo habitual es recurrir a la transgénesis y no a la selección *in vitro*, lo que da una idea de la dificultad que supone obtener este tipo de marcadores mediante esta última aproximación.

En tercer lugar, si la aparición de escapes en un experimento de transformación se debiera a la selección de mutantes resistentes a un agente selectivo, los análisis que se hacen *a posteriori* revelarían de inmediato que esta es la causa del problema. En efecto, suponiendo que en un experimento de transformación en el que se utiliza el gen marcador *nptII* apareciera un variante somaclonal resistente a la kanamicina (i.e. un escape), la caracterización mediante el 'test de explante' (cultivo de explantes en medio con kanamicina) y el 'test de ápice' (enraizamiento de ápices en medio con kanamicina) darían un resultado positivo; en cambio, los análisis moleculares (PCR y Southern) indicarían que no se trata de una planta transgénica, sino de un escape.

En cualquier caso, es evidente que puede aparecer un escape como consecuencia de un proceso de mutación (i.e. variación somaclonal), pero lo que no tiene sentido es que todos los escapes obedezcan a esta causa, sobre todo cuando el número de escapes es muy elevado.

#### Silenciamiento del gen marcador y/o de otros genes presentes en el T-DNA.

Tras la integración de uno o varios genes foráneos, el silenciamiento génico puede manifestarse de dos formas: a) pérdida de expresión en algunos tejidos u órganos de una planta; b) como un proceso que afecta a toda la planta.

a) Silenciamiento en algunos tejidos u órganos de una planta.

Rakosy-Tican et al. (2007) analizaron la expresión del delator *gfp* en distintos tejidos de plantas transgénicas de patata y observaron que en un pequeño número de plantas algunos tipos celulares daban GFP+, mientras que otros eran GFP-. Según ellos, esto podría deberse a un silenciamiento dependiente del punto de integración, lo que conduciría a una expresión diferencial a lo largo del desarrollo ontogénico. Puede que así sea, pero como se comentó en la 'Introducción' (ver apartado de genes delatores) esto podría deberse también a una interferencia en la expresión de la proteína GFP como consecuencia de ciertos procesos bioquímicos en distintos tipos celulares.

Por lo que se refiere a la expresión diferencial de un gen delator en distintos tipos celulares, o incluso en células específicas, hay un ejemplo curioso en la bibliografía. Bastar et al. (2004) analizaron el patrón de expresión GFP en plantas transgénicas de

tabaco. Como suele ser habitual en esta especie, en la mayor parte de las plantas transgénicas había una expresión GFP casi ubicua. Sin embargo, en unas pocas plantas encontraron una expresión GFP en forma de mosaico, es decir había células GFP+ y GFP-. El tipo de mosaico difería en plantas transgénicas independientes y se mantenía estable a lo largo de sucesivas rondas de propagación clonal. Lo más notable es que los distintos tipos de mosaicos se heredaban en las descendencias respectivas. Los autores propusieron distintas hipótesis para explicar este resultado pero, como ellos mismos reconocen en el artículo, ninguna de ellas era satisfactoria.

Si ocurriera un silenciamiento dependiente de tipo celular que afectara al gen marcador, podrían obtenerse resultados extraños en los análisis de expresión que se hacen *a posteriori*. Por ejemplo, si el silenciamiento se produjera en las células de la hoja pero no en las de la raíz, al analizar la planta transgénica el 'test de ápice' (enraizamiento en medio selectivo) indicaría que la planta es transgénica, mientras que el 'test de explante' con segmentos de hoja daría un resultado negativo. Lo lógico sería pensar que ha habido algún error en los respectivos ensayos. Sin embargo una simple repetición aclararía la situación y, además, la caracterización molecular permitiría llegar a una conclusión coherente. En todo caso, este tipo de silenciamiento no tiene una relación directa con el tema de los escapes.

#### b) Silenciamiento del gen marcador y/o del gen delator en toda la planta.

Con relación al tema que nos ocupa, la pregunta es si un cierto número de escapes puede deberse a un proceso de silenciamiento que afecte a toda la planta. No hay muchos datos en este sentido, pero hay un trabajo que permite dar una respuesta a esta cuestión. Domínguez et al. (2002) obtuvieron plantas transgénicas de lima empleando un vector que portaba el gen marcador *nptII* y el delator *gfp*. Tras el co-cultivo con *Agrobacterium* procedieron a la regeneración de plantas tanto en medio selectivo (100 mg/l de kanamicina) como no selectivo (i.e., sin kanamicina). A continuación realizaron una caracterización molecular y los análisis de expresión del marcador y del delator. Para su sorpresa, el 30 % de las plantas de lima PCR+ que se habían obtenido sin presión de selección daban un resultado negativo en los respectivos ensayos de expresión del marcador y del delator, lo que sugiere que se había producido un silenciamiento de los



genes presentes en el T-DNA. Los resultados de este trabajo indican que puede haber un silenciamiento diferencial en función de si se utiliza o no una determinada presión de selección. Si así fuera, el empleo de genes marcadores no solo optimizaría el proceso de selección, sino que además disminuiría el número de casos de silenciamiento en plantas transgénicas.

Con independencia de lo anterior, las cuestiones que habría que responder son: ¿Hasta qué punto el silenciamiento génico es una de las causas de la aparición de escapes aun cuando se utilice una cierta presión de selección? ¿Qué mecanismos determinan un proceso de silenciamiento tras las primeras etapas del proceso de transformación?

La primera pregunta no tiene fácil respuesta porque para responder a esta cuestión habría que hacer un Northern o RT-PCR en todas las plantas en las que se hubiera demostrado la integración de los genes foráneos mediante hibridación Southern. Normalmente este tipo de análisis se hace en las plantas que exhiben expresión de los genes foráneos pero no en aquellas otras que se catalogan como escapes. Tal y como se ha comentado antes, Domínguez et al., (2004) analizaron plantas obtenidas en procesos de transformación con y sin presión de selección y llegaron a la conclusión de que en el segundo caso aparecía una elevada frecuencia (hasta el 30 %) con los genes foráneos silenciados. Rakosy-Tican et al. (2007) analizaron por RT-PCR una muestra de las plantas de patata obtenidas en un proceso de transformación con presión de selección y no encontraron ninguna en la que se hubiera silenciado el gen marcador *nptII* (cuya presencia se había detectado por PCR). Los resultados de ambos trabajos no son discrepantes porque, tanto en un caso como en el otro, cuando se utiliza una presión de selección la frecuencia de plantas con silenciamiento es baja (Domínguez et al., 2004) o nula (Rakosy-Tican et al. 2007). El problema es que en segundo caso no se abordó la obtención de plantas transgénicas sin presión de selección y por tanto no pueden hacerse comparaciones en este sentido.

Por lo que respecta a la segunda pregunta (i.e. ¿qué mecanismos determinan un proceso de silenciamiento tras las primeras etapas del proceso de transformación?), en principio se podrían proponer diversas hipótesis para explicar el silenciamiento del gen marcador o, de forma más general, de los genes foráneos introducidos por un proceso de

transformación: i) co-supresión; ii) mecanismos similares a la paramutación; iii) silenciamiento por procesos de reconocimiento de secuencias de ADN foráneo; iv) integración en regiones de ADN altamente repetitivo; v) integración en sitios del genoma donde residen grupos de genes que se silencian a lo largo del desarrollo ontogénico.

i. Co-supresión.

En 1990, Napoli et al. describieron que la introducción de un gen que codifica una chalcona-sintasa en *Petunia hybrida* ocasionaba la anulación de expresión del gen homólogo endógeno en *trans*. El mismo año, Smith et al. (1990) observaron que la transferencia de un gen truncado que codifica una poligalacturonasa inhibía la expresión del gen endógeno en plantas transgénicas de tomate. Desde entonces la inhibición de expresión de un gen endógeno promovida por la transferencia de un gen homólogo (completo o truncado) se conoce como co-supresión, que fue el término propuesto por Napoli et al. (1990) para explicar este tipo de situaciones.

El fenómeno de la co-supresión podría explicar la aparición de escapes en plantas transgénicas que hubieran integrado dos o más insertos, sobre todo cuando uno de ellos está truncado. Es frecuente justificar la aparición de escapes por esta causa, pero hay pocos datos concretos en la bibliografía. De manera alternativa, el silenciamiento en homocigosis del gen marcador es un fenómeno que aparece con una cierta frecuencia cuando se analizan las descendencias de un número suficiente de plantas transgénicas. El silenciamiento en homocigosis no tiene una relación directa con el tema de los escapes (ya que las plantas hemicigóticas expresan el gen marcador) pero sí puede haber una relación causal con la aparición de escapes en plantas con dos o más insertos. Deng et al. (2013) estudiaron de forma exhaustiva un caso de co-supresión del gen marcador *nptII* asociado a la configuración en homocigosis en la descendencia de una planta transgénica de tomate que había integrado varios insertos y llegaron a la conclusión de que la ausencia de expresión se debía a un mecanismo de silenciamiento pos-transcripcional inducido principalmente por la síntesis de pequeños RNAs (sRNA). Es posible que algunas plantas transgénicas con dos o más insertos se comporten como escapes debido a procesos similares.

ii. Mecanismos similares a la paramutación.

Algunas plantas transgénicas pueden considerarse como escapes debido a la pérdida de expresión por procesos similares a la paramutación. Este término fue propuesto en un Congreso de Genética celebrado en Tokio en 1968 por Brink, Coe y Hagemann para explicar las anomalías en el modo de herencia de ciertos genes como, por ejemplo, el locus R de maíz (Brink, 1956, 1958). En realidad, el fenómeno había sido descubierto mucho antes por Bateson y Pellew (1915) al estudiar lo que ellos denominaron como "extraño comportamiento" de las plantas de guisante procedentes del cruce entre individuos *wild type* x "*Rogue*".

Hasta hace poco se desconocían las causas de la paramutación pero con el advenimiento de la transgénesis se ha despertado el interés por este fenómeno (revisado en Chandler y Stam, 2004; Stam y Scheid, 2005) ya que en los últimos años se han encontrado casos de paramutación al estudiar el modo de herencia en las progenie de plantas transgénicas. Por ejemplo, al analizar una colección de unas 7.000 líneas T-DNA de tomate generadas en el laboratorio del Dr. Moreno, se han encontrado tres casos de este tipo. En los tres casos, las plantas transgénicas originales (TG1) expresaban el gen marcador *nptII* de manera sistemática; sin embargo, las respectivas descendencias (TG2) eran sensibles a la kanamicina.

Gao y Zhao (2013) han descrito un fenómeno similar en *Arabidopsis*. Con el fin de analizar el efecto que produce la combinación de dos mutaciones insercionales cruzaron plantas homocigóticas de las respectivas líneas T-DNA (*yuc1-1* y *ag-TD*) y analizaron los fenotipos del híbrido (F1) y de las plantas de la F2. Para su sorpresa, en la F2 se suprimía el fenotipo correspondiente a la mutación *ag-TD*, con independencia de la presencia o no de la mutación *yuc1-1*. La supresión del fenotipo *ag-TD* se mantenía de forma estable a lo largo de sucesivas generaciones por lo que, siguiendo la nomenclatura habitual en el caso de una paramutación al alelo silenciado lo denominaron como *ag-TD\**. Además, tal y como sucede en otros casos de paramutación, el alelo silenciado *ag-TD\** tenía la capacidad de silenciar el alelo *ag-TD*, es decir, convertir *ag-TD* en *ag-TD\**. Los dos insertos de T-DNA se localizaban en intrones de cada uno de los genes respectivos y los autores aportaron

evidencias de que la supresión de una de las mutaciones estaba mediada por interacciones en *trans* de secuencias idénticas en las dos inserciones de T-DNA.

Los resultados de nuestro grupo con tomate y los de otros autores con especies diferentes revelan que, cuando se desencadena un fenómeno de paramutación tras un proceso de transformación, pueden aparecer plantas que, si se analizan en la TG1 se considerarían como transgénicas a todos los efectos, mientras que, si se analizan en la TG2 o en las generaciones siguientes, se considerarían como escapes.

Se asume que la paramutación es un fenómeno que surge con baja frecuencia y por ello se considera como una causa secundaria de la aparición de escapes o, para ser más precisos, de un tipo particular de escapes (e.g. el que se caracteriza por la pérdida de expresión de un determinado gen, no en la planta transgénica, sino en la progenie). Aunque está claro que no es una de las causas principales, es un fenómeno que merece atención. Como se ha comentado antes, la paramutación se descubrió en 1915 pero, salvo por algunos trabajos muy meritorios en maíz, fue objeto de escasa atención hasta tiempos recientes (ver Chandler y Stam, 2004; Stam y Scheid, 2005). La aparición del campo de la 'Epigenética' tuvo mucho que ver en este sentido pero, sin duda, el factor determinante fue el análisis de ciertas anomalías en el modo de herencia de algunas plantas transgénicas. Los mecanismos que desencadenan la paramutación son diversos y muy complejos pero, simplificando de forma extrema, se puede decir que la causa principal estriba en la acumulación de pequeños RNAs interferentes o RNAs anómalos (e.g. de doble cadena) generados por la presencia de repeticiones múltiples en el genoma o en el vector. Por desgracia, es habitual la presencia de repeticiones de ciertos elementos de regulación (e.g. promotor 35s) o de otras secuencias en los vectores y, por ello, es posible que el fenómeno de la paramutación ocurra con mayor frecuencia de lo esperado. El pequeño número de casos bien estudiados puede deberse no tanto a la baja probabilidad del suceso como al hecho de que cuando se detecta un modo de herencia anómalo en una planta transgénica el investigador suele descartarla o, aunque no sea así, cuando intenta efectuar un análisis convencional (e.g. mendeliano) se encuentra con resultados desconcertantes.

iii. Silenciamiento por procesos de reconocimiento de secuencias de ADN foráneo.

Con relación a la posible asociación entre silenciamiento y aparición de escapes, surge la cuestión de hasta qué punto podrían haber procesos de silenciamiento por reconocimiento de secuencias de ADN foráneo. Las plantas han desarrollado mecanismos de tipo adaptativo que les permiten defenderse de procesos de introgresión de ADN foráneo (e.g. secuencias virales) y, sobre todo, de la inestabilidad que genera la acumulación de elementos transponibles o, de forma más general, de ADN repetitivo. Aún así, no está claro que existan procesos específicos de reconocimiento de secuencias de los genes presentes en los vectores habituales y, en particular, de los genes marcadores y delatores.

iv. Integración del T-DNA en regiones heterocromáticas o de ADN altamente repetitivo.

El 80-85 % del genoma del maíz está constituido por elementos transponibles de diversas familias (Vicient, 2010). Sin llegar a tal extremo, las plantas superiores tienen cantidades considerables de elementos transponibles y de otras secuencias de ADN altamente repetitivo. Los elementos transponibles han jugado un papel clave en la evolución de los genomas vegetales y, frente a lo que ocurría antes, en la actualidad ya no se considera al ADN altamente repetitivo como 'ADN basura' porque algunas secuencias de este tipo tienen un importante papel. Una buena parte de las secuencias repetitivas o de ciertos tipos elementos transponibles se silencian de forma casi permanente a través de diversos mecanismos (e.g. metilación) o de cambios en el grado de condensación de la cromatina (i.e. heterocromatina).

Por este motivo, cuando el T-DNA se integra en una región heterocromática o en una zona con secuencias repetitivas que han sido metiladas, lo más probable es que los genes contenidos en el inserto experimenten un proceso de silenciamiento. Ahora bien, las consecuencias de este evento serán diferentes en función del momento en el que se produzca el silenciamiento. Si el gen marcador se silencia de inmediato, la célula transgénica no podrá dividirse y experimentar morfogénesis en medio selectivo, por lo que este evento no será seleccionado. En cambio, si el silenciamiento del gen marcador no es inmediato, puede que dichas células (o las estructuras morfogénicas que deriven de ellas) sean capaces de medrar en condiciones selectivas. Esto explicaría el por qué en las

primeras etapas del proceso las estructuras organizadas son capaces de expresar la resistencia conferida por el gen marcador (y el fenotipo conferido por el delator), aunque, misteriosamente, esta capacidad se pierde más tarde.

Si ocurre lo indicado, cabría esperar que hubiera alguna relación entre el número de escapes y la cantidad de elementos transponibles o secuencias altamente repetitivas, la extensión y distribución de regiones heterocromáticas, etc. Cuando se revisa la bibliografía no parece haber una relación directa en este sentido, pero no hay que llegar a conclusiones precipitadas porque, pese a que los avances recientes en el campo de la genómica han sido realmente espectaculares, seguimos teniendo muchas lagunas en el conocimiento del genoma.

Sin duda, el borrador de la secuencia de una especie suministra una información muy valiosa tanto a nivel básico como aplicado. Aún así, el borrador inicial deriva de la secuenciación de un genotipo y puede que la arquitectura del genoma difiera entre genotipos de la misma especie. Además, la calidad de los datos de secuencia cambia a lo largo del tiempo. Es lo que ha ocurrido en el caso del arroz. Hace algunos años se publicaron los borradores de la secuencias de las dos subespecies, *indica* (Yu et al., 2002) y *japonica* (Goff et al., 2002), pero al cabo de poco tiempo se actualizaron las secuencias respectivas (Yu et al., 2005) y se obtuvieron datos adicionales gracias al empleo de un método secuenciación más potente (International Rice Genome Sequencing Project, 2005). En este sentido, merece la pena revisar los comentarios de Yu et al. (2006) sobre los datos obtenidos en arroz con ambos métodos de secuenciación.

A la hora de intentar una asociación entre tasa de escapes y arquitectura del genoma, conviene tener en cuenta también que en la mayor parte de los casos lo que se tiene no es el borrador de la secuencia completa de una especie, sino el borrador de una parte del genoma, sobre todo de las regiones eucromáticas. Nos sigue faltando, pues, una información esencial ya que, por lo que se refiere al tema de los escapes, la información más relevante no se refiere a las regiones eucromáticas, sino a las heterocromáticas o ricas en secuencias altamente repetidas.

Siguiendo con las gramíneas, en el caso del arroz se dispone de métodos de transformación que han permitido generar decenas de miles de líneas T-DNA y la tasa de

escapes es relativamente baja. Los datos revisados de la secuencia (International Rice Genome Sequencing Project, 2005) indican que el 35% del genoma del arroz está constituido por familias de elementos repetitivos o transposones. En el maíz, la tasa de escapes suele ser mayor que en el arroz pero no es especialmente elevada. Sin embargo, los datos de la secuencia de la línea B73 indican que el 85% del genoma del maíz está constituido por cientos de familias de elementos transponibles distribuidos de manera no uniforme a lo largo del genoma (Schnable et al., 2009).

En otras especies, como el naranjo y la patata, la aparición de escapes es un problema importante. En el naranjo el 20 % del genoma está ocupado por elementos repetitivos (Xu et al., 2013), mientras que en la patata las secuencias repetitivas ocupan el 62,2% del genoma (452,5 Mb) y, dentro de esta cifra, los elementos transponibles representan el 29,4% (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011).

Pasando a especies hortícolas, en el caso del tomate la tasa de escapes es baja. El desarrollo de métodos eficaces de transformación en nuestro laboratorio ha permitido la generación de miles de líneas T-DNA (Pérez-Martín et al., 2017), de forma que el tema de los escapes no representa ningún problema. Los datos del borrador de la secuencia (The Tomato Genome Consortium, 2012) han revelado que la arquitectura del genoma de esta especie es peculiar. Al igual que ocurre en otras especies, los cromosomas del tomate constan de heterocromatina pericéntrica y eucromatina distal, estando las repeticiones concentradas dentro y alrededor de los centrómeros, cromómeros y telómeros. Sin embargo, a diferencia de otras especies (e.g. *Arabidopsis*), el tomate tiene un menor número de retrotransposones con largas repeticiones terminales (LTR). Los datos obtenidos indican que el genoma del tomate es inusual entre las angiospermas, ya que está constituido principalmente por DNA escasamente repetitivo. Por este motivo cabe preguntarse si la escasa proporción del genoma constituida por elementos transponibles y ADN altamente repetitivo está relacionada con la baja tasa de escapes en experimentos de transformación.

Pasando a la tres cucurbitáceas más importantes a nivel económico (melón, sandía y pepino), si se ordenan en función de su tendencia a generar escapes, el pepino tiene el dudoso honor de ocupar la primera posición (la tasa de escapes suele ser elevada), el

melón ocuparía el segundo puesto (en algunos genotipos la tasa de escapes es moderada) y la sandía suele tener menor tendencia a la aparición de escapes.

Por lo que se refiere a la arquitectura de sus genoma, en el caso del pepino se ha estimado que el 24 % (54,4 Mb) está constituido por ADN repetitivo y, dentro de esta cifra, los retrotransposones *Gypsy* y *Copia* ocupan el 10 % (Huang et al., 2009), lo que representa una cantidad muy importante. En el caso del melón, los retrotransposones representan el 14,7 % del genoma, mientras que otros tipos de elementos transponibles ocupan un 5 % adicional (García-Mas et al., 2012). En el caso de la sandía, se ha descrito que el 45,2 % del genoma (159,8 Mb) está constituido por repeticiones de elementos transponibles y, al igual que en el caso del pepino, los retrotransposones con LTR más abundantes son los *Gypsy* y *Copia* (Guo et al., 2013).

En definitiva, no parece haber una relación directa entre tasa de escapes y proporción del genoma ocupado por secuencias repetitivas y elementos transponibles. Aún así, no se puede excluir que haya una relación entre tasa de escapes y peculiaridades en la arquitectura del genoma de ciertas especies tales como la distribución de elementos repetitivos.

v. Integración en sitios del genoma donde residen grupos de genes que se silencian a lo largo del desarrollo ontogénico.

Es posible que puedan haber procesos de silenciamiento por integración del T-DNA en zonas del genoma donde residen genes sometidos a cambios de expresión asociados al desarrollo ontogénico. En particular, hay genes que se expresan en células en división activa que luego se silencian a lo largo de los procesos de diferenciación. Es probable por tanto que la integración en la vecindad de estos genes, o en las regiones intergénicas asociadas, conduzca al silenciamiento de las secuencias introgradadas, por ejemplo por extensión del proceso de metilación a dichas secuencias.

En su trabajo sobre transformación de patata, Rakosy-Tican et al. (2007) comentan que esta podría una de las causas de la aparición de escapes. Su argumentación se basa en que observan claramente una expresión GFP en zonas localizadas del callo que aparece en los explantes cultivados en medio selectivo con kanamicina, pero la expresión del



delator desaparece en el proceso de diferenciación en algunas yemas adventicias, mientras que no lo hace en otras.

En nuestros experimentos con pepino hemos observado algo similar. En efecto, utilizando el delator *uidA*, hemos apreciado expresión GUS localizada en ciertas zonas de crecimiento desorganizado que suelen diferenciar yemas adventicias, aunque *a posteriori* la expresión del delator aparece en unas pero no en otras. En cualquier caso, no podemos llegar a una conclusión concreta porque para este tipo de estudios convendría utilizar el delator *gfp* y no el *uidA*, ya que el ensayo para detectar expresión GUS es destructivo.

#### Persistencia de *Agrobacterium*.

Matzk et al. (1996) y Birch (1997) propusieron que la inadecuada erradicación de la cepa de *Agrobacterium* utilizada como vector biológico podría ser la causa de la aparición de escapes en experimentos de transformación. Ciertamente, la no eliminación de *Agrobacterium* tras las etapas de infección y co-cultivo podría conferir un cierto grado de resistencia al agente selectivo como consecuencia de la expresión del gen marcador presente en un T-DNA que no se hubiera integrado en el genoma. Este tema aparece de forma recurrente en la discusión de los trabajos con especies que tienden a generar un gran número de escapes (e.g. patata; Rakosy-Tican et al., 2007), pero hay pocas evidencias al respecto. Por fortuna, Domínguez et al. (2004) realizaron un estudio en esta dirección y sus resultados fueron inquietantes.

Tras el proceso de infección y co-cultivo de los explantes con *Agrobacterium*, Domínguez et al. (2004) incubaron las plantas de lima en medio con el agente selectivo (kanamicina) y los dos antibióticos (cefotaxima y vancomicina) que utilizaron para tratar de erradicar la bacteria. A los 9 meses, realizaron un subcultivo de estas plantas en medio sin cefotaxima ni vancomicina y las mantuvieron en estas condiciones durante otros tres meses. Para su sorpresa, el 80-90 % de los explantes (i.e. los ápices que se habían transferido a medio sin antibióticos) se infectaron por colonias que tenían toda la apariencia de *Agrobacterium*. Los análisis por PCR de secuencias específicas confirmaron que, en efecto, el agente contaminante era la cepa de *Agrobacterium* que habían utilizado inicialmente. Para ver si los explantes que no se habían contaminado estaban realmente libres de *Agrobacterium*, cultivaron extractos de la base del explante en medio sin cefotaxima y vancomicina y, de

nuevo, hicieron un análisis por PCR de secuencias específicas de *Agrobacterium*. Los resultados de los dos experimentos indicaron que el 49 % y el 12,5 % de estos explantes (aparentemente libres de contaminación) realmente tenían células persistentes de *Agrobacterium*.

Los resultados de Domínguez et al. (2004) son inquietantes por dos razones. En primer lugar, la persistencia de *Agrobacterium* en los tejidos u órganos de una planta no solo puede determinar que se considere como transgénica cuando en realidad es un escape, sino que puede provocar la aparición de escapes adicionales, ya que la no erradicación de la bacteria tras la infección y el co-cultivo puede conferir protección cruzada frente al agente selectivo a células o estructuras organizadas que ni son transgénicas ni tienen *Agrobacterium*. En todo caso, lo más preocupante es que la legislación obliga a que las plantas transgénicas estén libres de *Agrobacterium* antes de su aclimatación y transferencia al invernadero. Los resultados de Domínguez et al. (2004) suponen una llamada de atención en ambos sentidos.

¿Hasta qué punto se dan situaciones similares en otros casos? Los resultados de nuestro laboratorio con hortalizas (tomate, melón, sandía, pepino) y especies ornamentales indican que, cuando se utiliza la cepa LBA4404 de *Agrobacterium*, no hay problema para erradicar la bacteria de manera efectiva y segura. De forma sistemática, tras la selección de las presuntas plantas transgénicas, se cultivan los ápices en medio de enraizamiento con y sin agente selectivo (normalmente kanamicina), pero sin los antibióticos empleados para erradicar *Agrobacterium* (cefotaxima, carbenicilina o vancomicina, según los casos). Además, cultivamos explantes de hoja o de yemas axilares en medio selectivo, pero sin los antibióticos empleados para erradicar *Agrobacterium*. Esto permite hacer el análisis de expresión del marcador con explantes alternativos, al tiempo que se confirma la no presencia de *Agrobacterium* en tejidos u órganos diferentes al ápice.

En un análisis sobre la persistencia de *Agrobacterium* en plantas transgénicas de tabaco, se ha descrito que, cuando no se ha erradicado adecuadamente, la bacteria está presente en la base de las plantas y tiende a colonizar más las raíces que las hojas (Matzk et al., 1996). Asumiendo que ocurra lo mismo en pepino, melón sandía, tomate, u otras especies, los análisis que nosotros realizamos deberían permitir detectar la bacteria si no

ha sido adecuadamente erradicada. Es más, nuestra colección de líneas T-DNA de tomate (más de 7000) se ha mantenido en cultivo *in vitro* por subcultivo de ápices o yemas axilares durante años. Si la bacteria se mantuviera de forma endógena, pronto o tarde detectaríamos su presencia en el medio de cultivo. En definitiva, la no erradicación de *Agrobacterium* puede ser un problema en ciertos casos, pero no en otros.

Para explicar la persistencia de *Agrobacterium* en ciertos casos, pero no en otros, se podrían plantear tres hipótesis. La más obvia consiste en pensar que, a la hora de intentar erradicar la bacteria, no se hayan utilizado los antibióticos adecuados, o no se haya ajustado la concentración al nivel que sería necesario. No creemos que este sea el caso en el trabajo de Domínguez et al. (2004) con lima. En nuestra opinión, los antibióticos elegidos y la concentración de los mismos son perfectamente adecuados.

Puede ocurrir también que *Agrobacterium* no tenga la misma facilidad para colonizar o mantenerse de forma endógena en los tejidos u órganos de distintas especies. Si es así, la capacidad para persistir endógenamente no está relacionada con la relación evolutiva entre la planta y la bacteria ya que, por ejemplo, los cítricos no son huéspedes naturales de *Agrobacterium* y, pese a ello, los resultados de Domínguez et al. (2004) demuestran una elevada capacidad de la bacteria para persistir dentro de la planta durante largos periodos.

Puede, por último, que la causa del problema estribe en la cepa de *Agrobacterium*. Las dificultades para conseguir la transformación en ciertas especies llevan al empleo de cepas virulentas o supervirulentas. Aunque el grado de virulencia está relacionado con los mecanismos de transferencia e integración del T-DNA y no con la persistencia de la bacteria dentro de la planta, los resultados indican que no todas las cepas de *Agrobacterium* responden igual a los antibióticos empleados para su erradicación. Es muy posible que para ciertas cepas los antibióticos actúen como bactericidas, mientras que para otras lo hagan solo como bacteriostáticos, lo que explicaría las dificultades para erradicar estas cepas. En nuestro caso, no hay ningún problema para erradicar la cepa LBA4404 de *Agrobacterium* en experimentos de transformación con muy diversas especies, pero en ocasiones no ha ocurrido lo mismo con la cepa EHA105 (que es más

virulenta pero no supervirulenta), razón por la cual prácticamente se ha descartado el empleo de esta última.

#### Expresión transitoria del gen marcador en las primeras etapas de la transformación.

El mantenimiento y expresión del gen marcador presente en algún T-DNA que no se haya integrado en un cromosoma pero que haya quedado en el citoplasma de la célula (o quizá en otras localizaciones como los espacios intercelulares, o incluso el núcleo) podría ser la causa de la aparición de un cierto número de escapes (Park et al., 1998). Pese a que este tema se comenta de forma recurrente en trabajos con especies que tienden a generar un buen número de escapes, Domínguez et al. (2004) dudan de que sea un factor relevante en cítricos porque en estas especies el proceso de regeneración es lento y comienza muy tarde tras la fase del co-cultivo.

A diferencia de lo que ocurre en cítricos, en experimentos de transformación de pepino, la formación de estructuras organizadas (i.e. yemas adventicias) a partir de la callosidad del explante se verifica de forma temprana tras la fase de co-cultivo. Por este motivo, nosotros pensamos que la expresión transitoria del gen marcador puede ser una de las causas de la aparición de escapes. Además, en el pepino y en otras cucurbitáceas, las células del callo son más sensibles al agente selectivo (normalmente, kanamicina) que las células diferenciadas de la yema adventicia o del brote. Por ello, aunque no podemos aportar evidencias concretas, parece bastante probable que la expresión transitoria del gen marcador en las células con crecimiento desorganizado pueda ser la causa de la aparición de un cierto número de escapes.

#### Protección cruzada.

Al evaluar la adecuación de distintos agentes selectivos en la transformación de arroz, Dekeyser et al. (1989) llegaron a la conclusión de que la higromicina y la fosfinoricina eran los más adecuados. Sin embargo, Christou et al. (1991) indicaron que, cuando se utiliza la higromicina o la fosfinoricina, las células no transgénicas tienen la misma capacidad de regeneración que las transgénicas, debido probablemente a la inactivación de los agentes selectivos por parte de estas últimas.

Desde hace años (Jordan y McHughen 1988; Birch 1997; Park et al., 1998) se piensa que una de las principales causas de la aparición de escapes en algunas especies estriba en la protección de las células no transgénicas por la expresión del gen marcador en las células transgénicas vecinas, lo que provoca una inactivación total o parcial del agente selectivo en esa zona. Se trata de un argumento recurrente pero hay muy pocas evidencias en este sentido.

Utilizando el delator *gfp*, Domínguez et al. (2004) analizaron las primeras etapas del proceso de transformación de citrange y lima tras la fase de co-cultivo y se dieron cuenta de que una buena parte de los escapes derivan de grupos de células GFP (-) que se desarrollan en la vecindad de otras con expresión GFP (+) desde prácticamente el inicio del cultivo en medio selectivo. La ulterior caracterización molecular demostró que las primeras regeneran escapes mientras que las otras dan plantas transgénicas. Como acertadamente señalan, sus resultados no son concluyentes, pero sugieren fuertemente que algunos escapes surgen por mecanismos de protección cruzada. Con todo, el hecho de que un porcentaje considerable de escapes (32 % en citrange y 14% en lima) surjan de la callosidad de la zona de corte del explante en la que no hay células con expresión GFP (+) revela que la protección cruzada no es la única causa de la aparición de escapes.

En los experimentos de transformación de pepino que se presentan en este trabajo no pudimos hacer un seguimiento de este tipo porque optamos por el delator *uidA* y el análisis de expresión GUS es destructivo. No obstante, las observaciones en cítricos coinciden con las realizadas en experimentos de transformación genética de melón en los que se utilizó el delator *gfp* (Dr. Moreno, comunicación personal). Es más, en los callos procedentes de explantes de melón y pepino suelen aparecer grupos de yemas adventicias que, a su vez, originan varios brotes. Por esta razón puede que la protección cruzada tenga mayor importancia en estas cucurbitáceas que en cítricos.

#### Reorganizaciones o pérdida del T-DNA.

Las secuencias de los bordes (RB y LB) del T-DNA actúan como módulos que permiten o facilitan el desenganche inicial del plásmido Ti y la posterior integración de los genes contenidos en el vector en cualquier punto de un cromosoma. Los transposones tienen módulos diferentes, cortos o largos, aunque funcionan de manera similar. No obstante,

por su propia naturaleza, los transposones tienen capacidad de movimiento, mientras que el T-DNA se mantiene en el punto cromosómico donde se ha integrado a lo largo de las generaciones. El análisis genético de plantas transgénicas apoya la anterior afirmación, pero la cuestión es si puede haber alguna excepción, es decir, si puede ocurrir que T-DNA se reorganice o se desenganche, generando un escape.

El análisis de líneas T-DNA de *Arabidopsis* (Krysan et al., 1999; Springer, 2000; Alonso et al., 2003; Li et al., 2003), arroz (Kim et al., 2003; Chen et al., 2003b; An et al., 2003; Sallaud et al., 2004; Peng et al., 2005; Wang et al., 2005; Jeong et al., 2006) y tomate (Pérez-Martín et al., 2017) ha revelado la complejidad del proceso de integración del T-DNA. En muchos casos, la integración no es perfecta y se pierden algunos nucleótidos de uno o ambos bordes. Asimismo, pueden haber reorganizaciones más o menos profundas del inserto, pero se asume que estas reorganizaciones se producen durante el proceso de integración, y no más tarde, por lo que en teoría no deberían motivar la aparición de escapes. Por ejemplo, si la reorganización de un T-DNA genera un marcador truncado, la pérdida de función del gen no debería ocasionar la aparición de un escape, ya que su función debería ser reemplazada por un gen marcador completo en otro inserto.

Pese a lo indicado, tras el análisis de unas 7.000 líneas T-DNA de tomate (Pérez-Martín et al., 2017) encontramos un caso sorprendente (Dr. Moreno, comunicación personal). Se trataba de una planta transgénica cuya descendencia era uniformemente sensible a la kanamicina, lo que parecía indicar que se trataba de un inserto que generaba letalidad en ambos gametos. Este tipo de mutaciones ocurre con una baja frecuencia, pero no cabe incluir este tipo de eventos dentro de la categoría de escapes ya que simplemente se trata de un proceso de letalidad que imposibilita la formación de gametos con el alelo mutante.

En realidad, no era esto lo que ocurría, ya que el Southern de la planta TG1 indicó la presencia de un inserto de T-DNA con el gen *nptII* truncado. Teniendo en cuenta que con el método de transformación que utilizamos en tomate la aparición de escapes es algo excepcional, la pregunta es: ¿cómo se seleccionó esta planta?

Si la reorganización del T-DNA y el truncamiento del gen *nptII* (y por tanto su pérdida de función) se produjo durante el proceso de integración, ¿cómo fue capaz la célula

transgénica de diferenciar una yema adventicia y más tarde un brote en medio selectivo? Y lo que es más difícil de explicar, ¿cómo fue capaz el ápice de esta planta de enraizar en medio selectivo con kanamicina?

Evidentemente, podría tratarse de un escape que hubiera aparecido por cualquiera de las causas anteriormente mencionadas, pero cuando se analizan una a una, la única que no cabe excluir es la persistencia de *Agrobacterium* dentro de la planta. Aún así, se trata de algo altamente improbable porque la planta se mantuvo durante más de dos años por subcultivos repetidos en medio sin antibióticos, lo que pronto o tarde habría ocasionado la contaminación del medio de cultivo por la bacteria endógena.

No podemos dar una explicación coherente a este evento pero la pregunta que surge es si el truncamiento del T-DNA se pudo producir no *a priori* (i.e. durante el proceso de integración), sino *a posteriori*. Si así fuera, tampoco cabría excluir que una planta transgénica perdiera no parte sino todo el T-DNA. Con todo, esto podría explicar la aparición de un escape (extraordinario) pero desde luego no explicaría la presencia de múltiples escapes.

#### **2.2.5.4. Escapes transgénicos**

En sus experimentos de transformación con lima, Domínguez et al. (2004) realizaron el *Southern* de todas las plantas regeneradas en un medio con kanamicina y evaluaron la expresión del gen delator (*uidA*, en unos casos, y *gfp*, en otros) en estas mismas plantas. Sus resultados indicaron que de las 173 plantas regeneradas en medio selectivo, 95 eran transgénicas (45,1 %). Visto de otra manera, esto quiere decir que más de la mitad de las plantas seleccionadas (54,9 %) no eran transgénicas, sino escapes. No obstante, lo más interesante es que 26 de las 95 plantas transgénicas (27,4%) no expresaban ninguno de los genes contenidos en el T-DNA (*nptII* y *uidA* o *gfp*). Esto quiere decir que una cuarta parte de las plantas transgénicas se podrían haber incluido dentro de la categoría de escapes, ya que en estas plantas se había producido el silenciamiento tanto del gen marcador como del gen delator.

Sus resultados tienen un indudable interés porque revelan que la tasa de transformación (real) es mucho mayor que la estimada sobre la base de los datos de expresión de cualquiera de los genes contenidos en el T-DNA.

Ciertamente, estos 'escapes transgénicos' no tienen utilidad a la hora de intentar conseguir un resultado de interés práctico o para llevar a cabo el análisis funcional de un gen, pero representan un material muy valioso para estudiar o llegar a inferir las causas del silenciamiento de los genes foráneos. Por ejemplo, se podría ver si hay, o no, una relación entre el número de insertos de T-DNA y la expresión de los genes transferidos o, lo que sería aún más interesante, determinar si el silenciamiento se debe al punto de integración. Con relación a esto último, de momento no tenemos el borrador de la secuencia de la lima (la que se ha publicado es la del naranjo), pero pronto o tarde estará disponible para la comunidad científica. Cuando así sea, se podría estudiar si el silenciamiento se debe a la integración dentro de un grupo de genes sometidos a un proceso de silenciamiento a lo largo del desarrollo, o a la integración en una zona de DNA altamente repetitivo. Estos datos pueden ser especialmente valiosos para clarificar algunas de las causas del silenciamiento de genes foráneos.



#### 2.2.5.5. Quimeras en experimentos de transformación

Tal y como se ha comentado antes, normalmente se piensa que la aparición de quimeras en experimentos de transformación solo afecta a especies de reproducción vegetativa. Puede que sea un problema más frecuente en estas especies, pero también puede ocurrir en la transformación de especies de reproducción sexual. Si ocurre tal cosa, los ensayos habituales con plantas supuestamente transgénicas darán resultados confusos. Por ejemplo, los análisis de expresión del gen marcador mediante el test de explante en una quimera pueden dar resultados extraños, ya que los segmentos de hoja de un sector que contenga células transgénicas darán un resultado positivo, mientras que los procedentes de un sector que solo tenga células *wild-type* darán un resultado negativo. De forma similar, los análisis de expresión en la descendencia de una quimera pueden dar una segregación no mendeliana, errática o, peor aún, pueden llevar a la conclusión de que los genes transferidos se han perdido (McHughen y Jordan, 1989; Langridge et al., 1992; Ulian et al., 1996; Joersbo et al., 1999) sin que ello tenga que ver con un proceso de letalidad en ambos gametos.

Se ha descrito la aparición de quimeras en experimentos de transformación con diferentes especies, como la col (Berthomieu et al., 1994), el arroz (Park et al., 1996), los cítricos (Domínguez et al., 2004) y la patata (Rakosy-Tican et al., 2007), por poner algunos ejemplos. Conviene resaltar que en este último trabajo se observaron diferencias en el porcentaje de aparición de quimeras entre genotipos de la misma especie (desde menos del 0,5% hasta más del 15%).

En la mayor parte de las publicaciones se asume que las quimeras se originan por concrescencia de células vecinas, transgénicas y no transgénicas, que se agrupan o se organizan conjuntamente para dar lugar a una yema adventicia. Domínguez et al. (2004) obtuvieron un elevado porcentaje de quimeras (12%) y observaron que, en efecto, muchas de ellas derivan de la asociación u organización coordinada de células transgénicas y no transgénicas. Sin embargo, sus resultados indicaron que se pueden formar quimeras por la concrescencia de células procedentes de distintos eventos de transformación. Los autores no solo hicieron análisis Southern en cada una de las plantas que supuestamente procedían de distintos eventos de transformación, sino que repitieron este tipo de análisis en las que procedían del subcultivo de una misma planta.

Para ello, asignaron un número a cada planta transgénica y el mismo número seguido de una letra a las que se habían obtenido por subcultivo de la planta original. A continuación, hicieron el Southern en todas ellas. Sus resultados revelaron que en 5 de 40 casos, las supuestas réplicas clonales (i.e. que procedían de una misma planta) no tenían el mismo genotipo ya que exhibían diferentes patrones de integración, lo que indica que estas quimeras se habían generado por la agrupación de células que procedían de distintos eventos de transformación.

Por otro lado, es bastante probable que el tipo de quimeras (mericlinales, sectoriales o periclinales) dependa del método de transformación o del estado de diferenciación de las células antes del proceso de regeneración. En los experimentos de biolística la energía cinética se ajusta para que las partículas cargadas con ADN no superen el explante y, como en este caso no se requiere un proceso de dediferenciación, la regeneración se verifica habitualmente a partir de células diferenciadas. Lo esperable en este caso es que se formen quimeras periclinales y que la capa transgénica sea la L1 (Christou, 1990; Christou y Ford, 1995). Sin embargo, en experimentos de transformación con *Agrobacterium*, la regeneración se verifica habitualmente tras un proceso de dediferenciación. Por lo que se refiere a los experimentos llevados a cabo con cítricos (Domínguez et al., 2004), en los que la regeneración se verifica tras la formación de un callo a partir de las células del cambium (Ghorbel et al., 1999), las quimeras que surgen son de tipo sectorial.

Pese a lo indicado, no se puede concluir que todas las quimeras que aparecen a partir de células diferenciadas sean periclinales y las que lo hacen a partir de células dediferenciadas sean sectoriales, ya que hay excepciones. Por ejemplo, Schmölling y Schell (1993) obtuvieron quimeras periclinales en experimentos de transformación de tabaco con *Agrobacterium* y, alternativamente, Domínguez et al. (2004) obtuvieron una quimera periclinal en sus experimentos de transformación con cítricos.

En relación con este tema, surge la cuestión de hasta qué punto pueden aparecer quimeras a lo largo de un proceso de regeneración casi directa o indirecta en pepino, una especie que se caracteriza por la elevada frecuencia de escapes. No hemos hecho un estudio en este sentido, pero nos atrevemos a sugerir que la probabilidad es alta. Tal y

como se ha comentado antes, a partir del callo procedente de un explante de pepino pueden aparecer una o varias zonas con respuesta organogénica. Ahora bien, en una zona concreta no suele aparecer una sola yema adventicia, sino un grupo de yemas que originan varios brotes a partir de esta zona concreta. Por esta razón, la protección cruzada puede tener mayor importancia en pepino que en otras especies. Además, la forma en que se organizan los grupos de yemas en un callo puede facilitar la formación de quimeras. En efecto, las yemas que aparecen agrupadas pueden proceder de células independientes del callo (i.e. células de crecimiento desorganizado que se diferencian y organizan en distintas estructuras organogénicas), pueden derivar de un proceso de organogénesis adventicia recurrente (i.e. organogénesis a partir de las células de la yema inicial o de las yemas subsiguientes) o por una mezcla de ambos procesos. En los dos últimos casos es bastante probable que haya un fenómeno similar al de la invasión de capas histogénicas, en cuyo caso las yemas que aparecen agrupadas compartirían células de distinto origen. Como decíamos, de momento no tenemos ninguna evidencia concreta en este sentido, pero en el futuro intentaremos hacer una disección de las primeras etapas del proceso en pepino para ver hasta qué punto se originan quimeras (transgénicas-no transgénicas) de distintos tipos como consecuencia de las características del proceso de regeneración.



## V. Conclusiones

---

### RESPUESTA MORFOGENÉTICA EN EXPLANTES DE PEPINO

1. Se ha logrado la regeneración de plantas mediante organogénesis adventicia a partir de explantes de cotiledón de dos cultivares ('Marketer' y 'Negrito'), una línea que ha servido de base en programas de mejora ('Wisconsin 2843') y cuatro líneas puras (SF-1, SF-11, SF-13 y SF-17). La respuesta morfo genética de los dos cultivares es elevada, la de 'Wisconsin 2843' y línea pura SF-11 es aceptable, y la de las otras tres líneas puras es muy baja.
2. La inducción de organogénesis adventicia se puede conseguir en medios con diversas combinaciones de ácido indol-acético (IAA) y 6-bencilaldenina (6-BA). Si lo que se pretende es una respuesta de tipo casi directo, lo mejor es utilizar un medio con 1 o 2,5 mg/l de 6-BA; si, en cambio, lo que se persigue es una respuesta de tipo más indirecto, los mejores resultados se obtienen en medio con 0,5 mg/l de IAA y 2,5 mg/l de 6-BA.
3. El estado ontogénico de la planta afecta tanto a la respuesta organogénica de los explantes de cotiledón como a la frecuencia de plantas con niveles de ploidía superiores al del material de partida. Teniendo en cuenta ambas cuestiones, los mejores resultados se obtienen con cotiledones de plántulas de 4 días.
4. La adición de altas concentraciones de sulfato de cobre (de 0,2 a 5 mg/l) al medio de cultivo mejora la respuesta organogénica.
5. La adición de 5  $\mu$ M de nitrato de plata (0,8 mg/l) al medio de cultivo también es beneficiosa, aunque su efecto depende del genotipo. En 'Marketer' y 'Negrito' no se aprecia un efecto positivo sobre la frecuencia de callos con brotes, pero sí hay un aumento del índice organogénico. En cambio, en 'Wisconsin 2843' se duplica tanto el porcentaje de callos con brotes como el índice organogénico.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PEPINO MEDIANTE CO-CULTIVO DE EXPLANTES PRIMARIOS CON *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

6. Las dos cepas de *Agrobacterium* utilizadas en este trabajo (LBA4404 y C58) son adecuadas en experimentos de transformación con el pepino. No obstante, la LBA4404 es más fácil de erradicar, lo que reduce la tasa de contaminación.
7. Por lo que respecta a la fase de co-cultivo de explantes con *Agrobacterium*, el mejor compromiso entre frecuencia de callos con brotes seleccionados y ausencia de contaminación se consigue con dos o tres días de co-incubación.
8. El empleo de kanamicina ha permitido la selección de plantas transgénicas del cultivar 'Marketer'. Los mejores resultados se han obtenido con 25 mg/l en el medio de inducción de organogénesis y 100 mg/l tanto en la etapa de elongación como en el medio de enraizamiento de las plantas seleccionadas.
9. Se han obtenido plantas transgénicas de 'Wisconsin 2843' empleando 10 mg/l de higromicina B como agente selectivo.
10. La adición de 5  $\mu$ M de nitrato de plata al medio de inducción de organogénesis y de 1 mg/l de sulfato de cobre en el medio de elongación facilita la selección de brotes en experimentos de transformación.
11. El principal problema que plantea la transformación en pepino es la aparición de escapes y quimeras. Sobre la base de los resultados obtenidos, se han planteado algunas soluciones para disminuir la frecuencia de escapes, así como para obtener transformantes sólidos a partir de quimeras.

## VI. Referencias Bibliográficas

---

- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME. 1992.** Ethylene in plant biology. Academic Press, San Diego, 2nd edition.
- Abou-Alaiwi WA, Potlakayala SD, Goldman SL, Josekutty PC, Karelia DN, Rudrabhatla SV. 2012.** *Agrobacterium*-mediated transformation of the medicinal plant *Centaurea montana*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **109**: 1-8.
- Achar PN. 2002.** A study of factors affecting embryo yields from anther culture of cabbage. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **69**: 183-188.
- Adkins SW, Kunanuvatchaidach R, Gray SJ, Adkins AL. 1993.** Effect of ethylene and culture environment on rice callus proliferation. *J. Exp. Bot.* **44**: 1829-1835.
- Ali N, Skirvin RM, Splittstoesser WE. 1991.** Regeneration of *Cucumis sativus* from cotyledons of small explants. *HortScience* **26**: 925.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR. 2003.** Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657.
- Amselem J, Tepfer M. 1992.** Molecular basis for novel root phenotypes induced by *Agrobacterium rhizogenes* A4 on cucumber. *Plant Molecular Biology* **19**: 421–432.
- An S, Park S, Jeong D-H, Lee D-Y, Kang H-G, Yu J-H, Hur J, Kim S-R, Kim Y-H, Lee M, Han S, Kim S-J, Yang J, Kim E, Wi SJ, Chung HS, Hong J-P, Choe V, Lee H-K, Choi J-H, Nam J, Kim S-R, Park P-B, Park KY, Kim WT, Choe S, Lee C-B, An G. 2003.** Generation and analysis of end sequence database for T-DNA tagging lines in rice. *Plant physiology* **133**: 2040–2047.
- Anuar MR, Ismail I, Zainal Z. 2011.** Expression analysis of the 35S CaMV promoter and its derivatives in transgenic hairy root cultures of cucumber (*Cucumis sativus*) generated by *Agrobacterium rhizogenes* infection. *African Journal of Biotechnology* **10**: 8236-8244.
- Aoshima Y. 2005.** Efficient embryogenesis in the callus of tea (*Camellia sinensis*) enhanced by the osmotic stress or antibiotic treatment. *Plant Biotechnology* **22**: 277-280.
- Asgari M, Javaran MJ, Moieni A, Masoumiasl A, Abdolinasab M. 2014.** Production of human tissue plasminogen activator (tPA) in *Cucumis sativus*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* **44**: 182-192.

- Atarés A, Moyano E, Morales B, Schleicher P, García-Abellán JO, Antón T, García-Sogo B, Perez-Martin 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.
- Banno H, Ikeda Y, Niu Q-W, Chua N-H. 2001.** Overexpression of *Arabidopsis ESR1* induces initiation of shoot regeneration. *The Plant Cell*. **13**: 2609-2618.
- Barow M. 2006.** Endopolyploidy in seed plants. *BioEssays* **28**: 271-281.
- Barry G, Kishore G, Padgett S, Taylor M, Kolacz K, Weldon M, Re D, Eichholtz D, Fincher K, Hallas L. 1992.** Inhibitors of amino acid biosynthesis: strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. In: *Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants*. Singh BK, Flores HE, Shannon JC (Ed.). *Am. Soc. Plant Physiol.*, Rockville, MD, p. 139–145.
- Baskaran P, Soós V, Balázs E, Van Staden J. 2016.** Shoot apical meristem injection: A novel and efficient method to obtain transformed cucumber plants. *South African Journal of Botany* **103**: 210-215.
- Bastar MT, Luthar Z, Skof S, Bohanec B. 2004.** Quantitative determination of mosaic *GFP* gene expression in tobacco. *Plant Cell Rep.* **22**: 939–944.
- Bateson, W. and Pellew, C. 1915.** On the genetics of ‘rogues’ among culinary peas (*Pisum sativum*). *J. Genet.* **5**: 15-36.
- Bergervoet JHW., Van der Mark F, Custers JBM. 1989.** Organogenesis versus embryogenesis from long-term suspension cultures of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Rep.* **8**: 116–119.
- Berthomieu P, Béclin C, Charlot F, Doré C, Jouanin L. 1994.** Routine transformation of rapid cycling cabbage (*Brassica oleracea*) - molecular evidence for regeneration of chimeras. *Plant Sci.* **96**: 223–235.
- Bertin N. 2005.** Analysis of the tomato fruit growth response to temperature and plant fruit load in relation to cell division, cell expansion and DNA endoreduplication. *Annals of Botany* **95**: 439–447.
- Bhalla PL, Smith N. 1998.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of cauliflower, *Brassica oleracea* var. *botrytis*. *Mol. Breed.* **4**: 531-541.
- Bin F, Chun-Hui Z, Guan-Lin W. 2000.** Transformation of *Cucumis sativus* by *A. rhizogenes* and regeneration of transformed hairy root. *Journal of Liaoning Normal University (Natural Science Edition)* **2**.
- Birch RG. 1997.** Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 297-326.
- Bond JE, Roose ML. 1998.** *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. *Plant Cell Reports* **18**: 229-234.



- Bondt AD, Eggermont K, Druart P, De Vil MD, Goderis I, Vanderleyden J, Broekaert WF. 1994.** *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Rep.* **13**: 587–593.
- Bondt AD, Eggermont K, Penninckx I, Goderis I, Broekaert WF 1996.** *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* **15**: 549–554.
- Bordas M, González-Candelas L, Dabauza M, Ramón D, Moreno V. 1998.** Somatic hybridization between an albino *Cucumis melo* L. mutant and *Cucumis myriocarpus* Naud. *Plant Science* **132**: 179–190.
- 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.
- Boszoradova E, Libantova J, Matusikova I, Poloniova Z, Jopcik M, Berenyi M, Moravcikova J. 2011.** *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of economically important oilseed rape cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **107**: 317-323.
- Bovy A, de Vos R, Kemper M, Schijlen E, Pertejo MA, Muir S, Collins G, Robinson S, Verhoeven M, Hughes S, Santos-Buelga C. 2002.** High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes *LC* and *C1*. *The Plant Cell* **14**: 2509-2526.
- Bradley JM, Davies KM, Deroles SC, Bloor SJ, Lewis DH. 1998.** The maize *Lc* regulatory gene up-regulates the flavonoid biosynthetic pathway of *Petunia*. *The Plant Journal* **13**: 381-392.
- Brink RA. 1956.** A genetic change associated with the R locus in maize which is directed and potentially reversible. *Genetics* **41**: 872–889.
- Brink RA. 1958.** Paramutation at the R locus in maize. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **23**: 379-391.
- Burza W, Malepszy S. 1995.** Direct plant regeneration from leaf explants in cucumber (*Cucumis sativus* L.) is free of stable genetic variation. *Plant Breeding* **114**: 341-345.
- Burza W, Zuzga S, Yin Z, Malepszy S. 2006.** Cucumber (*Cucumis sativus* L.). In: *Methods in molecular biology 343: Agrobacterium protocols*. Wang K (Ed.). Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, Vol. **1**, p. 427-438.
- ByungWhan M, ByungHoon M. 2009.** *Agrobacterium*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) with human BCL-2-encoding gene. *Horticulture, Environment and Biotechnology* **50**: 571–575.
- Cade RM, Wehner TC, Blazich FA. 1990.** Effect of explant age and growth regulator concentration on adventitious shoot formation from cucumber cotyledonary tissue. *Cucurbit. Genet. Coop. Rep.* **13**: 14-17.
- Call AD, Wehner TC. 2011.** Gene list 2010 for cucumber. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* **33-34**: 69-103.

- Cangelosi GA, Ankenbauer RG, Nester EW. 1990.** Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6708-6712.
- Cao B, Lei J, Chen G, Cao P, Liu X, Chen, Q, Wei X. 2011.** Testing of disease-resistance of pokeweed antiviral protein gene (*PacPAP*) in transgenic cucumber (*Cucumis sativus*). *African Journal of Biotechnology* **10**: 6883-6890.
- Carlson PS, Smith HH, Dearing RD. 1972.** Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2292-2294.
- Carlson PS. 1973.** Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco. *Science* **180**: 1366-1368.
- Carrer H, Hockenberry TN, Svab Z, Maliga P. 1993.** Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. *Molecular and General Genetics* **241**: 49-56.
- Castillo AM, Egana B, Sanz JM, Cistue L. 1998.** Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. *Plant Cell Reports* **17**: 902-906.
- Cervera M, Juárez J, Navarro A, Pina JA, Durán-Vila N, Navarro L, Peña L. 1998a.** Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Res.* **7**: 51–59.
- Cervera M, Juárez J, Pina JA, Navarro L, Peña L. 1998b.** *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrange: factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep.* **18**: 271–278.
- Chalfie M. 1994.** Green fluorescent protein as a marker for gene-expression. *Trends in Genetics* **10**: 151.
- Chandler VL, Stam M. 2004.** Chromatin conversations: mechanisms and implications of paramutation. *Nature Reviews Genetics* **5**: 532-544.
- Charles TC, Jin S, Nester EW. 1992.** Two-component sensory transduction systems in phytobacteria. *Annual Review of Phytopathology* **30**: 463–484.
- Chatterjee M, More TA. 1991.** Interspecific Hybridization in *Cucumis* spp. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* **14**: 69-70.
- Chaturvedi R, Bhatnagar SP. 2001.** High-frequency shoot regeneration from cotyledon explants of watermelon cv. Sugar Baby. *In Vitro Cell. & Dev. Biol. - Plant* **37**: 255–258.
- Chee PP, Slightom JL. 1991.** Transfer and expression of cucumber mosaic virus coat protein gene in the genome of *Cucumis sativus*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **116**: 1098-1102.
- Chee PP, Slightom JL. 1992.** Transformation of cucumber tissues by microprojectile bombardment: identification of plants containing functional and non-functional transferred genes. *Gene* **118**: 255–260.

- Chee PP, Tricoli DM. 1988.** Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension cultures of *Cucumis sativus* L. *Plant Cell Rep.* **7**: 274–277.
- Chee PP. 1990 a.** High frequency somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. *HortScience* **25**: 792-793.
- Chee, P. 1990 b.** Transformation of *Cucumis sativus* tissue by *Agrobacterium tumefaciens* and the regeneration of transformed plants. *Plant Cell Reports* **9**: 245-248.
- Chen J-F, Adelberg J. 2000.** Interspecific hybridization in *Cucumis*-Progress, problems, and perspectives. *HortScience* **35**: 11-15.
- Chen J-F, Kirkbride JH. 2000.** A new synthetic species of *Cucumis* (*Cucurbitaceae*) from interspecific hybridization and chromosome doubling. *Brittonia* **52**: 315–319.
- Chen J-F, Staub J, Qian C, Jiang J, Luo X, Zhuang F. 2003 a.** Reproduction and cytogenetic characterization of interspecific hybrids derived from *Cucumis hystrix* Chakr. x *Cucumis sativus* L. *Theoretical and Applied Genetics* **106**: 688–695.
- Chen J-F, Staub JE, Tashiro Y, Isshiki S, Miyazaki S. 1997.** Successful interspecific hybridization between *Cucumis sativus* L. and *C. hystrix* Chakr. *Euphytica* **96**: 413–419.
- Chen S, Jin W, Wang M, Zhang F, Zhou J, Jia Q, Wu Y, Liu F, Wu P. 2003 b.** Distribution and characterization of over 1000 T-DNA tags in rice genome. *The Plant journal* **36**: 105–113.
- Chen Y-H, Fu X-M, Wu H, Zang J. 2012.** *CsACO4*, an *ACC oxidase* gene regulating male differentiation in cucumber. *African Journal of Biotechnology* **11**: 13069-13074.
- Cheng M, Fry JE, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan Y. 1997.** Genetic Transformation of Wheat Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* **115**: 971–980.
- Cheng TY, Saka H, Voqui-Dinh TH. 1980.** Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. *Plant Sci. Letters* **19**: 91-99.
- Cheniclet C, Rong WY, Causse M, Frangne N, Bolling L, Carde JP, Renaudin JP. 2005.** Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiol.* **139**: 1984-1994.
- Chi G-L, Barfield DG, Sim G-E, Pua E-C. 1990.** Effect of AgNO<sub>3</sub> and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. *Plant Cell Rep.* **9**: 195-198.
- Chi G-L, Pua E-C, Goh C-J. 1991.** Role of ethylene on *de novo* shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson *in vitro*. *Plant Physiol.* **96**: 178-183.
- Chi G-L, Pua E-C. 1989.** Ethylene inhibitors enhanced *de novo* shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *Chinensis* (Chinese cabbage) *in vitro*. *Plant Sci.* **64**: 243-250.

- Cho MA, Choi PS, Song YM, Park YO, Ko SM, Min SR, Liu JR. 2005.** The use of glufosinate as a selective marker for the transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Korean Journal of Plant Biotechnology* **32**: 161-165.
- Cho M-J, Jiang W, Lemaux PG. 1998.** Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. *Plant Science* **138**: 229-244.
- Chraibi KM, Latche A, Rouston J-P, Fallot J. 1991.** Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt. *Plant Cell Rep.* **10**: 204-207.
- Christensen AH, Quail PH. 1996.** Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research* **5**: 213-218.
- Christou P, Ford T, Kofron M. 1991.** Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Nature Biotechnology* **9**: 957-962.
- Christou P, Ford TL. 1995.** Recovery of chimeric rice plants from dry seed using electric discharge particle acceleration. *Ann. Botany* **75**: 449-454.
- Christou P, McCabe DE. 1992.** Prediction of germ-line transformation events in chimeric *Ro* transgenic soybean plantlets using tissue-specific expression patterns. *The Plant J.* **2**: 283-290.
- Christou P. 1990.** Morphological description of transgenic soybean chimeras created by delivery, integration and expression of foreign DNA using electric discharge particle acceleration. *Ann. Botany* **66**: 379-386.
- Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov KA. 2005.** Fluorescent proteins as a toolkit for *in vivo* imaging. *Trends in biotech.* **23**: 605-613.
- Chunna Y, Yafu W. 2001.** Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of cucumber. *Journal of Lanzhou University* **37**: 77-81.
- Close TJ. 1997.** Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum* **100**: 291-296.
- Colijn-Hooymans CM, Hakkert JC, Jansen J, Custers JBM. 1994.** Competence for regeneration of cucumber cotyledons is restricted to specific developmental stages. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **39**: 211-217.
- Compton ME, Pierson BL, Staub JE. 2001.** Micropropagation for recovery of *Cucumis hystrix*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **64**: 63-67.
- 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.
- Costa M, Otoni W, Moore G. 2002.** An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. *Plant Cell Rep.* **21**: 365-373.

- Criswell AD, Call AD, Wehner TC. 2010-2011.** Genetic control of downy mildew resistance in cucumber-a review. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* **33-34**: 13-16.
- Cuartero J, Bolarín MC, Asíns MJ, Moreno V. 2006.** Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1045–1058.
- Cuartero J, Bolarín MC, Moreno V, Pineda B. 2008.** Tolerancia a la salinidad. In: *La adaptación al ambiente y los estreses abióticos en mejora vegetal*. Ávila CM, Atienza SG, Moreno MT, Cubero JI (Ed.). Junta de Andalucía - Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Consejería de Agricultura y Pesca, Dirección General de Planificación y Análisis de Mercados - Servicio de Publicaciones y Divulgación, Sevilla, España, p. 233-261.
- Cuartero J, Bolarín MC, Moreno V, Pineda B. 2009.** Molecular tools for enhancing salinity tolerance in plants. In: *Molecular Techniques in Crop Improvement*. Jain SM, Brar DS, (Ed.). Springer Netherlands, p. 373–405.
- Curtis IS, Nam HG, Sakamoto K. 2004.** Optimized shoot regeneration system for the commercial Korean radish 'Jin Ju Dae Pyong'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **77**: 81-87.
- D'Amato F. 1984.** Role of polyploidy in reproductive organs and tissues. In: *Embryology of angiosperms*. Johri BM (Ed.). Springer Berlin Heidelberg, p. 519–566.
- 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.
- Dahleen LS. 1995.** Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **43**: 267-269.
- De Block M, De Brouwer D, Tenning P. 1989.** Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants. *Plant Physiol.* **91**: 694-701.
- De Vetten N, Wolters AM, Raemakers K, van der Meer I, der Stege R, Heeres E, Heeres P, Visser R. 2003.** A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nature biotechnology* **21**: 439-442.
- Dekeyser R, Claes B, Marichal M, Van Montagu M, Caplan A. 1989.** Evaluation of selectable markers for rice transformation. *Plant Physiology* **90**: 217-223.
- Den Nijs APM and Visser D. L. 1979.** Silver compounds inducing male flowers in gynoeious cucumbers. *Cucurbit. Genet. Coop. Rep.* **2**: 14-15.
- Deng L, Pan Y, Chen X, Chen G, Hu Z. 2013.** Small RNAs were involved in homozygous state-associated silencing of a marker gene (*Neomycin phosphotransferase II: nptII*) in transgenic tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **68**: 8-15.

- Domínguez A, Cervera M, Pérez RM, Romero J, Fagoaga C, Cubero J, López MM, Juárez JA, Navarro L, Peña L. 2004.** Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of *citrus* explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. *Molecular Breeding. Mol Breed* **14**: 171–183.
- Domínguez A, Fagoaga C, Navarro L, Moreno P, Peña L. 2002.** Regeneration of transgenic citrus plants under non selective conditions results in high-frequency recovery of plants with silenced transgenes. *Molecular Genetics and Genomics* **267**: 544-556.
- Domínguez A., Guerri J., Cambra M., Navarro L., Moreno P. and Peña L. 2000.** Efficient production of citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Rep.* **19**: 427–433.
- Dong J-Z, Jia S-R. 1991.** High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad). *Plant Cell Rep.* **9**: 559-562.
- Dong J-Z, McHughen A. 1993.** An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* **88**: 61-71.
- Dutt M, Grosser JW. 2009.** Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium* – mediated transformation of *citrus*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **98**: 331-340.
- Eapen S, George L. 1997.** Plant regeneration from peduncle segments of oil seed *Brassica* species: influence of silver nitrate and silver thiosulfate. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **51**: 229-232.
- Ebinuma H, Komamine A. 2001.** MAT (Multi-Auto-Transformation) vector system. The oncogenes of *Agrobacterium* as positive markers for regeneration and selection of marker-free transgenic plants. *In Vitro Cell. & Develop. Biology-Plant* **37**: 103-113.
- Egan AN, Schlueter J, Spooner DM. 2012.** Applications of next-generation sequencing in plant biology. *Am. J. Bot.* **99**: 175–185.
- Eichholtz DA, Rogers SG, Horsch RB, Klee HJ, Hayford M, Hoffmann NL, Braford SB, Fink C, Flick J, O'Connell KM, Fraley RT. 1987.** Expression of mouse *dihydrofolate reductase* gene confers methotrexate resistance in transgenic petunia plants. *Somatic Cell and Molecular Genetics* **13** :67-76.
- El-Kazzaz A, Malepszy S. 1997.** A study of genetic transformation of *Cucumis sativus* L. via *Agrobacterium tumefaciens* through tissue culture. *Mansoura University Journal of Agricultural Sciences* **22**: 757-770.
- Elliott AR, Campbell JA, Dugdale B, Brettell RIS, Grof CPL. 1999.** Green-fluorescent protein facilitates rapid *in vivo* detection of genetically transformed plant cells. *Plant Cell Reports* **18**: 707-714.
- Ellul P, Lelivelt C, Naval M, Noguera FJ, Sanchez S, Atarés, A, Moreno V, Corella P, Dirks R. 2007.** Watermelon. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Transgenic Crops V*. Pua E-C, Davey MR (Ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, Vol. **60**, p. 129-165.

- Ellul P, Moreno V, Roig LA. 1995.** Transformación genética en sandía (*Citrullus lanatus* L.) mediante co-cultivo de explantes con *Agrobacterium tumefaciens*. In: *Actas del VI Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas*. p. 304.
- Ellul P, Rios G, Atares A, Roig LA, Serrano R, Moreno V. 2003.** The expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HAL1 gene increases salt tolerance in transgenic watermelon (*Citrullus lanatus* [Thunb.] Matsum & Nakai). *Theor. Appl. Genet* **107**: 462-469.
- Ellul P. 2002.** Morfogenésis *in vitro* y obtención de plantas transgénicas de sandía (*Citrullus lanatus* [Thunb.] Matsum. & Nakai.). *Tesis Doctoral*. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Emmanuel E, Levy AA. 2002.** Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 112–117.
- Endo S, Sugita K, Sakai M, Tanaka H, Ebinuma H. 2002.** Single-step transformation for generating marker-free transgenic rice using the *ipt*-type MAT vector system. *The Plant Journal* **30**: 115-122.
- Ezura H, Owino WO. 2008.** Melon, an alternative model plant for elucidating fruit ripening. *Plant Science* **175**: 121–129.
- Faisal SM, Haque MS, Nasiruddin KM. 2015** *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation in Cucumber (var. Shital) as Influenced by Explant, Inoculation Time and Co-cultivation Period. *Universal Journal of Plant Science* **3**: 25-31.
- Fei S, Read PE, Riordan TP. 2000.** Improvement of embryogenic callus induction and shoot regeneration of buffalograss by silver nitrate. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **60**: 197-203.
- FEMA GRAS™. 2016.** Interim FEMA GRAS™ 28 List August 2016. [http://www.femaflavor.org/sites/default/files/linked\\_files/Interim%20GRAS%2028%2020151214.pdf](http://www.femaflavor.org/sites/default/files/linked_files/Interim%20GRAS%2028%2020151214.pdf).
- Fraenkel R, Kovalski I, Troadec C, Bendahmane A, Perl-Treves R. 2014.** Development and evaluation of a cucumber TILLING population. *BMC Research Notes* **7**: 846.
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffman NL, Woo SC. 1983.** Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* **80**: 4803-4807.
- Fuchs M, Gonsalves D. 1995.** Resistance of transgenic hybrid squash ZW-20 expressing the coat protein genes of zucchini yellow mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 to mixed infections by both potyviruses. *Nature Biotechnology* **13**: 1466–1473.
- Fuchs M, Tricoli DM, Carney KJ, Schesser M, McFerson JR, Gonsalves D. 1998.** Comparative virus resistance and fruit yield of transgenic squash with single and multiple coat protein genes. *Plant Disease* **82**: 1350–1356.
- Fuentes SR, Calheiros MB, Manetti-Filho J, Vieira LG. 2000.** The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **60**: 5-13.
- Gaba V, Antignus Y. 1992.** An *in vitro* selection method for a melon variety which regenerates by direct organogenesis. *Cucurbit. Genet. Coop. Rep.* **15**: 65-66.

- Gaba V, Feldmesser E, Amit Gal-On H, Antignus Y. 1995.** Genetic transformation of a recalcitrant melon (*Cucumis melo* L.) variety. In: *Proceedings of Cucurbitaceae '94: Evaluation and Enhancement of Cucurbit Germplasm*. Gateway Printing. Lester GE, Dunlap JR. (Ed.). Edinburg, TX, USA. Vol **94**, p. 188-190.
- Gajc-Wolska J, Szwacka M, Malepszy S. 2001.** Evaluation of transgenic lines of cucumber (*Cucumis sativus* L.) with gene of thaumatin. *Vegetable Crops Research Bulletin* **54**: 5-9.
- Gajc-Wolska J, Szwacka M, Malepszy S. 2003.** Sensory characteristic of cucumber fruits (*Cucumis sativus* L.) with thaumatin gene. *Acta Hort* **604**: 449-451.
- Gal-On A, Wolf D, Antignus Y, Patlis L, Ryu KH, Min BE, Pearlsman M, Lachman O, Gaba V, Wang Y, Shibolet Y, Yang J, Zelcer A. 2005.** Transgenic cucumbers harboring the 54-kDa putative gene of cucumber fruit mottle mosaic tobamovirus are highly resistant to viral infection and protect non-transgenic scions from soil infection. *Transgenic Research* **14**: 81–93.
- 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**: 177–183.
- Gan S, Amasino RM. 1995.** Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**: 1986.
- Ganapathi A, Perl-Treves R. 2000.** *Agrobacterium*-mediated transformation in *Cucumis sativus* via direct organogenesis. *Acta Hort. (ISHS)* **510**: 405-408.
- Gao Y, Zhao Y. 2013.** Epigenetic Suppression of T-DNA Insertion Mutants in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **6**: 539–545.
- García-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, Bourgeois M, Mir G, González VM, Hénaff E, Câmara F, Cozzuto L, Lowy E, Alioto T et al. 2012.** The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**: 11872-11877.
- García-Sogo B, Pineda B, Castelblanque L, Antón T, Medina M, Roque E, Torresi C, Beltrán JP, Moreno V, Cañas LA. 2010.** Efficient transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* and production of male-sterile plants by engineered anther ablation. *Plant Cell Rep.* **29**: 61-77.
- García-Sogo B, Pineda B, Roque E, Antón T, Atarés A, Borja M, Beltrán JP, Moreno V, Cañas LA. 2012.** Production of engineered long-life and male sterile *Pelargonium* plants. *BMC Plant Biology* **12**: 156.
- 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*. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, España.
- Gelvin SB. 2003.** *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**: 16–37.
- Ghaemi M, Sarrafi A, Alibert G. 1994.** The effects of silver nitrate, colchicine, cupric sulfate and genotype on the production of embryoids from anthers of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **36**: 355-359.



- Ghorbel R, Domínguez A, Navarro L, Peña L. 2000.** High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium* L.) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of citrus tristeza Virus. *Tree Physiol.* **20**: 1183–1189.
- Ghorbel R, Juarez J, Navarro L, Peña L. 1999.** Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating transgenic woody fruit plants. *Theor. Appl. Genet.* **99**: 350-358.
- Ghorbel R, La-Malfa S, López MM, Petit A, Navarro L, Peña L. 2001a.** Additional copies of *virG* from pTiBo542 provide a super-transformation ability to *Agrobacterium tumefaciens* in citrus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **58**: 103–110.
- Ghorbel R, López C, Fagoaga C, Moreno P, Navarro L, Flores R, Peña L. 2001b.** Transgenic citrus plants expressing the citrus tristeza virus p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Molecular Plant Pathology* **2**: 27-36.
- Giménez E, Pineda B, Capel J, Antón MT, Atarés A, Pérez-Martín F, García-Sogo B, Angosto T, Moreno V, Lozano R. 2010.** Functional analysis of the Arlequin mutant corroborates the essential role of the *Arlequin/TAGL1* gene during reproductive development of tomato. *PLoS One* **5**: e14427.
- Giovannoni JJ. 2007.** Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 283–289.
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D et al. 2002.** A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* **296**: 92-100.
- Gonsalves D, Chee P, Provvidenti R, Seem R, Slightom Jerry L. 1992.** Comparison of coat protein-mediated and genetically-derived resistance in cucumbers to infection by cucumber mosaic virus under field conditions with natural challenge inoculations by vectors. *Nature Biotechnology* **10**: 1562–1570.
- Gonzalez A, Jimenez A, Vazquez D, Davies JE, Schindler D. 1978.** Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta* **521**: 459-469.
- Granberry DM, Norton JD. 1980.** Response of progeny from interspecific cross of *Cucumis melo* x *C. metuliferus* to *Meloidogyne incognita acrita*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **105**: 180–183.
- Guo S, Zhang J, Sun H, Salse J, Lucas WJ, Zhang H, Zheng Y, Mao L, Ren Y, Wang Z, Min J. 2013.** The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nature Genetics* **45**: 51-58.
- Gupta N, Rathore M, Goyary D, Khare N, Anandhan S, Pande V, Ahmed Z. 2012.** Marker-free transgenic cucumber expressing *Arabidopsis cbf1* gene confers chilling stress tolerance. *Biologia Plantarum* **56**: 57-63.

- Gutiérrez MA, Luth DE, Moore GA. 1997.** Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Rep.* **16**: 745–753.
- Hammar SA, Grumet R. 1990.** Regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *HortScience* **25**: 1070.
- Handley LW, Chambliss OL. 1979.** *In vitro* propagation of *Cucumis sativus* L. *HortScience* **14**: 22-23.
- Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S. 1997.** Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2122-2127.
- Hauptmann RM, Vasil V, Ozias-Akins P, Tabaeizadeh Z, Rogers SG, Fraley RT, Horsch RB, Vasil IK. 1988.** Evaluation of selectable markers for obtaining stable transformants in the *Gramineae*. *Plant Physiology* **86**: 602-606.
- He Z, Chen L, Yao W, Dai J. 2008.** Recent Progress in Cucumber (*Cucumis sativus*) Transformation. *Transgenic Plant Journal* **2**: 39-44.
- He Z, Duan Z, Liang W, Chen F, Yao W, Liang H, Yue C, Sun Z, Chen F, Dai J. 2006.** Mannose selection system used for cucumber transformation. *Plant Cell Reports* **25**: 953–958.
- Herrera-Estrella L, De Block M, Messens E, Hernalsteens J-P, Van Montagu M, Schell J. 1983.** Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *The EMBO Journal* **2**: 987.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. 1994.** Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* **6**: 271-282.
- Hinchee MA, Connor-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SJ, Gasser CS, Fischhoff DA, Re DB, Fraley RT, Horsch RB. 1988.** Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Biotechnology* **6**: 915-922.
- Hirschi KD. 2003.** Insertional mutants: a foundation for assessing gene function. *Trends in Plant Science* **8**: 205–207.
- Hooykaas PJJ, Beijersbergen AGM. 1994.** The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annual Review of Phytopathology* **32**: 157-179.
- Hooykaas PJJ, Schilperoort RA. 1984.** The molecular genetics of crown gall tumorigenesis. *Advances in Genetics* **22**: 209-283.
- Hu Q, Andersen SB, Hansen LN. 1999.** Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from *Brassica napus* and related species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **59**: 189-96.

- Huang S, Li R, Zhang Z, Li L, Gu X, Fan W, Lucas WJ, Wang X, Xie B, Ni P, Ren Y, Zhu H, Li J, Lin K, Jin W, Fei Z, Li G, Staub J, Kilian A, van der Vossen EA, Wu Y, Guo J, He J, Jia Z, Ren Y, Tian G, Lu Y, Ruan J, Qian W, Wang M, Huang Q, Li B, Xuan Z, Cao J, Asan, Wu Z, Zhang J, Cai Q, Bai Y, Zhao B, Han Y, Li Y, Li X, Wang S, Shi Q, Liu S, Cho WK, Kim JY, Xu Y, Heller-Uszynska K, Miao H, Cheng Z, Zhang S, Wu J, Yang Y, Kang H, Li M, Liang H, Ren X, Shi Z, Wen M, Jian M, Yang H, Zhang G, Yang Z, Chen R, Liu S, Li J, Ma L, Liu H, Zhou Y, Zhao J, Fang X, Li G, Fang L, Li Y, Liu D, Zheng H, Zhang Y, Qin N, Li Z, Yang G, Yang S, Bolund L, Kristiansen K, Zheng H, Li S, Zhang X, Yang H, Wang J, Sun R, Zhang B, Jiang S, Wang J, Du Y, Li S. 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature Genetics* **41**: 1275–1281.
- Huang S, Li R, Zhang Z, Li L, Gu X, Fan W, Lucas WJ, Wang X, Xie B, Ni P, Ren Y et al. 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature Genetics* **41**: 1275-1281.
- Huizhong W, Peijie Z, Xiaoyun Z. 2000. Regeneration of transgenic cucumber plants with a WMV-2 CP gene. *Acta phytophysiological Sinica* **26**: 267-272.
- Hyde CL, Phillips GC. 1996. Silver nitrate promotes shoot development and plant regeneration of chile pepper (*Capsicum annuum* L.) via organogenesis. *In Vitro Cell. & Dev. Biol. - Plant* **32**: 72-80.
- International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**: 793-800.
- Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* **14** :745-750.
- Ishige F, Takaichi M, Foster R, Chua N-H, Oeda K. 1999. A G-box motif (GCCACGTGCC) tetramer confers high-level constitutive expression in dicot and monocot plants. *The Plant Journal* **18**: 443–448.
- Islam A, Chowdhury J, Seraj ZI. 2010. Establishment of optimal conditions for an *Agrobacterium*-mediated transformation in four tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) varieties grown in Bangladesh. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences* **34**: 171-179.
- Iyengar RB, Smits P, Van Der Ouderaa F, Van Der Wel H, Van Brouwershaven J, Ravesteyn P, Richters G, Van Wassenaar PD. 1979. The complete amino-acid sequence of the sweet protein thaumatin i. *European Journal of Biochemistry* **96**: 193–204.
- Jang HA, Kim HA, Know SY, Choi DW, Choi PS. 2011. The use of cotyledonary-node explants in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Plant Biotechnology* **38**: 198–202.
- Jang HA, Utomo SD, Kwon SY, Ha S-H, Xing-guo Y, Choi PS. 2016. Production of transgenic cucumber expressing phytoene synthase-2A carotene desaturase gene. *Journal of Plant Biotechnology* **43**: 341-346.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. 1987. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J.* **6**: 3901-3907.

- Jefferson RA. 1987.** Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant. Mol. Biol. Rep.* **5**: 387–405.
- Jeon JS, Lee S, Jung KH, Jun SH, Jeong DH, Lee J, Kim C, Jang S, Yang K, Nam J, An K, Han MJ, Sung RJ, Choi HS, Yu JH, Choi JH, Cho SY, Cha SS, Kim SI, An G. 2000.** T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *The Plant journal* **22**: 561–570.
- Jeong D-H, An S, Kang H-G, Moon S, Han J-J, Park S, Lee HS, An K, An G. 2002.** T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiology* **130**: 1636–1644.
- Jeong D-H, An S, Park S, Kang H-G, Park G-G, Kim S-R, Sim J, Kim Y-O, Kim M-K, Kim S-R, Kim J, Shin M, Jung M, An G. 2006.** Generation of a flanking sequence-tag database for activation-tagging lines in japonica rice. *The Plant journal* **45**: 123–132.
- Jigang B, Xiujuan W, Qianxun Y, Ming T. 2004.** Regeneration and transformation of *Cucumis sativus* cv jinyansihao. *Zhongguo Nongye Kexue* **37**: 263-267.
- Joersbo M, Brunstedt J, Marcussen J, Okkels FT. 1999.** Transformation of the endospermous legume guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) and analysis of transgene transmission. *Mol. Breed.* **5**: 521–529.
- Joersbo M, Okkels FT. 1996.** A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. *Plant Cell. Rep.* **16**: 219–221.
- Jordan MC and McHughen A. 1988.** Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots. *Plant Cell Rep.* **7**: 285–287.
- Joubès J, Chevalier C. 2000.** Endoreduplication in higher plants. *Plant Molecular Biology* **43**: 735-745.
- Kaepler HF, Carlson AR, Menon GK. 2001.** Routine utilization of green fluorescent protein as a visual selectable marker for cereal transformation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant.* **37**: 120-126.
- Kaneyoshi J, Kobayashi S, Nakamura Y, Shigemoto N, Doi Y. 1994.** A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). *Plant Cell Reports* **13**: 541-5.
- Kerje T, Grum M. 2000.** The origin of melon, *Cucumis melo*: A review of the literature. *Acta Hort. (ISHS)* **510**: 37-44.
- Kho YO, Den Nijs APM, Franken J. 1980.** Interspecific hybridization in *Cucumis* L. II. The crossability of species, an investigation of *in vivo* pollen tube growth and seed set. *Euphytica* **29**: 661-672.
- Kim H-A, Lee B-Y, Jeon J-J, Choi D-W, Choi P-S, Setyo DU, Lee J-H, Kang T-H, Lee Y-J. 2008.** GUS gene expression and plant regeneration via somatic embryogenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Plant Biotechnology* **35**: 275-280.
- Kim HA, Min SR, Choi DW, Choi PS, Hong SG. 2010.** Development of transgenic cucumber expressing *TPSP* gene and morphological alterations. *Journal of Plant Biotechnology* **37**: 72-76.
- Kim JW, Minamikawa T. 1996.** Transformation and regeneration of french bean plants by the particle bombardment process. *Plant Sci.* **117**: 131–138.

- Kim S-G, Chang J-R, Cha HC, Lee K-W. 1988.** Callus growth and plant regeneration in diverse cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **12**: 67-74.
- Kim S-R, Lee J, Jun S-H, Park S, Kang H-G, Kwon S, An G. 2003.** Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants. *Plant. Mol. Biol.* **52**: 761–773.
- Kirkbride JH. 1993.** *Biosystematic monograph of the genus Cucumis (Cucurbitaceae) : botanical identification of cucumbers and melons.* Parkway Publishers, Boone, NC, USA.
- Kishimoto K, Nishizawa Y, Tabei Y, Hibi T, Nakajima M, Akutsu K. 2002.** Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Science* **162**: 655–662.
- Klee H, Horsch R, Rogers S. 1987.** *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **38**: 467-486.
- Kodama H, Irifune K, Kamada H, Morikawa H. 1993.** Transgenic roots produced by introducing *Ri-rol* genes into cucumber cotyledons by particle bombardment. *Transgenic Research* **2**: 147–152.
- Köhler RH. 1998.** GFP for *in vivo* imaging of subcellular structures in plant cells. *Trends in Plant Sci.* **3**: 317-320.
- Kose E, Koç NK. 2003.** *Agrobacterium*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) and plant regeneration. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **17**: 56–62.
- Kosieradzka I., Sawosz E., Pastuszewska B., Szwacka M., Malepszy S., Bielecki W., Czumińska K. 2001.** The effect of feeding diets with genetically modified cucumbers on the growth and health status of rats. *J. Animal and Feed Sci.* **10 (Suppl. 2)**: 7-12.
- Kroon GH, Custers JBM, Kho YO, Den Nijs APM, Varekamp HQ 1979.** Interspecific hybridization in *Cucumis* (L.). I. Need for genetic variation, biosystematic relations and possibilities to overcome crossability barriers. *Euphytica* **28**: 723-728.
- Krysan PJ, Young JC, Sussman MR. 1999.** T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **11**: 2283–2290.
- Kumar V, Parvatam G, Ravishankar GA. 2009.** AgNO<sub>3</sub> - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electronic Journal of Biotechnology* **12**: 1-15.
- Kuvshinov V, Koivu K, Kanerva A, Pehu E. 1999.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of greenhousegrown *Brassica rapa* ssp. *oleifera*. *Plant Cell Rep.* **18**: 773–777.
- Lai L, Pan J-S, He H-L, Cai R. 2007.** *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) with MADS-box like gene. *Journal of Shanghai Jiaotong University(Agricultural Science)* **04**.
- Langridge P, Brettschneider R, Lazzeri P, Lörz H. 1992.** Transformation of cereals via *Agrobacterium* and the pollen pathway: a critical assessment. *The Plant Journal* **2**: 631-638.

- Larkins BA, Dilkes BP, Dante RA, Coelho CM, Woo YM, Liu Y. 2001.** Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *Journal of Experimental Botany* **52**: 183-192.
- Lee GP, Kim CS, Ryu KH, Rark KW. 2002.** *Agrobacterium*-mediated transformation of *Cucumis sativus* expressing the coat protein gene of zucchini green mottle mosaic virus (ZGMMV). In: *Proceedings of XXVIth International Horticultural Congress - Asian plants with unique horticulture potential, genetic resources, cultural practices and utilization (Symposium 11) - Toronto, Canada, 12 August 2002, S11-P-11*: 300.
- Lee H-S, Kwon E-J, Kwon S-Y, Jeong Y-J, Lee E-M, Jo M-H, Kim H-S, Woo I-S, Shinmyo A, Yoshida K, Kwak S-S. 2003.** Transgenic cucumber fruits that produce elevated level of an anti-aging superoxide dismutase. *Molecular Breeding* **11**: 213-220.
- Lee K, Dudley MW, Hess KM, Lynn DG, Joerger RD, Binns AN. 1992.** Mechanism of activation of *Agrobacterium* virulence genes: identification of phenol-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8666-8670.
- Leiva-Neto JT, Grafi G, Sabelli PA, Dante RA, Woo YM, Maddock S, Gordon-Kamm WJ, Larkins BA. 2004.** A dominant negative mutant of cyclin-dependent kinase A reduces endoreduplication but not cell size or gene expression in maize endosperm. *The Plant Cell*. **16**: 1854-1869.
- Li L, Pan J-S, He H-L, Wu A-Z, Cai R. 2007.** Technology of regeneration and *ACS1* Genes transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)* **1**.
- Li Y, Rosso MG, Strizhov N, Viehoveer P, Weisshaar B. 2003.** GABI-Kat SimpleSearch: a flanking sequence tag (FST) database for the identification of T-DNA insertion mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* **19**: 1441-1442.
- Liu L, Duan L, Zhang J, Zhang Z, Mi G, Ren H. 2010.** Cucumber (*Cucumis sativus* L.) over-expressing cold-induced transcriptome regulator *ICE1* exhibits changed morphological characters and enhances chilling tolerance. *Scientia Horticulturae* **124**: 29-33.
- Liu W-P, Lu S-W, Liu J-X, Nan X-R, Liu J-L, Li Z-G. 2009.** *Agrobacterium*-mediated transformation of cucumber for *BnCS* gene. *Northern Horticulture* **01**.
- Liu, H, Qin, Z. 2007.** Cloning of tryptophan monooxygenase gene in *Pseudomonas syringae* and transformation into cucumber. *Acta Hort. (ISHS)* **731**:95-98.
- Loneragan JF, Delhaize E, Webb J. 1982.** Enzymic diagnosis of copper deficiency in subterranean clover. I. Relationship of ascorbate oxidase activity in leaves to plant copper status. *Crop and Pasture Science*. **33**: 967-979.
- Lough TJ, Lucas WJ. 2006.** Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 203-232.
- Luan F, Delannay I, Staub JE. 2008.** Chinese melon (*Cucumis melo* L.) diversity analyses provide strategies for germplasm curation, genetic improvement, and evidentiary support of domestication patterns. *Euphytica* **164**: 445-461.

- Ludwig SR, Habera LF, Dellaporta SL, Wessler SR. 1989.** *Lc*, a member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the *myc*-homology region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7092-7096.
- Luth D, Moore G. 1999.** Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **57**: 219-222.
- Lyszcz S, Ruszkowska M, Wojcieszka U, Zinkiewicz E. 1976.** The activity of ascorbic acid and catechol oxidase, the rate of photosynthesis and respiration as related to plant organs, stage of development and copper supply. *Acta agrobotanica* **29**: 99–105.
- Malepszy S, Nadolska-Orczyk A. 1983.** *In vitro* culture of *Cucumis sativus*. I. Regeneration of plantlets from callus formed by leaf explants. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **111**: 273-276.
- Malepszy S, Nadolska-Orczyk A. 1989.** *In vitro* culture of *Cucumis sativus*. VIII: Variation in the progeny of phenotypically not altered R1 plants. *Plant Breeding* **102**: 66-72.
- Malepszy S. 1988.** Cucumber (*Cucumis sativus* L.). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Crops II*. Bajaj YPS (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Vol. **6**, p. 277–293.
- Maliga P, Sz.-Breznovits A, Marton L, 1973.** Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco. *Nature New Biology* **244**: 29-30.
- Maliga P, Sz.-Breznovits A, Marton L, Joo F. 1975.** Non-Mendelian streptomycin-resistant tobacco mutant with altered chloroplasts and mitochondria. *Nature* **255**: 401-402.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1982.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Mark F, Bergervoet JHW, Custers JBM. 1989.** Transformation of cucumber with *Agrobacterium rhizogenes*. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* **12**: 35–36.
- Mashayekhi K, Sharifani M, Shahsavand M, Kalati H. 2008.** Induction of somatic embryogenesis in absence of exogenous auxin in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *International Journal of Plant Production* **2**: 163–166.
- Mathieu-Rivet E, Gévaudant F, Sicard A, Salar S, Do PT, Mouras A, Fernie AR, Gibon Y, Rothan C, Chevalier C, Hernould M. 2010.** Functional analysis of the anaphase promoting complex activator CCS52A highlights the crucial role of endo-reduplication for fruit growth in tomato. *The Plant Journal* **62**: 727-741.
- Matzk A, Mantell S, Schiemann J. 1996.** Localization of persisting *Agrobacteria* in transgenic tobacco plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 373–381.
- McClintock B. 1984** [Nobel lecture presented, 8 December 1983]. The significance of responses of the genome to challenge. In: *Les Prix Nobel 1983*. Almquist & Wiksell International, Stockholm-Sweden, p. 174-193.
- McHughen A, Jordan MC. 1989.** Recovery of transgenic plants from 'escape' shoots. *Plant Cell Rep.* **7**: 611–614.

- McInnes E, Morgan AJ, Mulligan BJ, Davey MR. 1991.** Roots induced on cucumber cotyledons by the agropine Ri plasmid TR-DNA exhibit the transformed phenotype. *Plant Cell Reports* **9**: 647-650.
- Meijer EGM, Schilperoort RA, Rueb S, Van Os-Ruygrok PE, Hensgens LAM. 1991.** Transgenic rice cell lines and plants: expression of transferred chimeric genes. *Plant Mol. Biol.* **16**: 807-820.
- Mentewab A, Stewart CN. 2005.** Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* ABC transporter confers kanamycin resistance to transgenic plants. *Nature Biotechnology*. **23**: 1177-1180.
- Mercuri A, Sacchetti A, De Benedetti L, Schiva T, Alberti S. 2002.** Green fluorescent flowers. *Plant Sci.* **162**: 647-654.
- Mette MF, Kanno T, Aufsatz W, Jakowitsch J, Van Der Winden J, Matzke MA, Matzke AJM. 2002.** Endogenous viral sequences and their potential contribution to heritable virus resistance in plants. *The EMBO J.* **21**: 461-469.
- Miao M, Xu R, Zheng L, Zhou H, Zhang Z, Cheng H. 2009.** High-efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) using stem nodes as explants. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **84**: 199–203.
- Miki B, McHugh S. 2004.** Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of biotechnology* **107**: 193–232.
- Mohiuddin AKM, Abdullah ZC, Chowdhury MKU, Napis S. 2005.** Enhancement of adventitious shoot regeneration in *Cucumis sativus* L. using AgNO<sub>3</sub>. *Plant Tissue Cult.* **15**: 15-23.
- Mohiuddin AKM, Chowdhury MKU, Abdullah ZC, Napis S. 1997.** Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber *in vitro* shoot regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **51**: 75-78.
- Mohiuddin AKM, Harikrishna K, Chowdhury MKU, Abdullah ZC, Napis S. 2000.** Influence of acetosyringone on *Agrobacterium*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Tissue Cult.* **10**: 167-173.
- Mohiuddin AKM, Saimat R, Napis S. 1995.** Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of cucumber [*Cucumis sativus*] and muskmelon [*Cucumis melo*]. In: *Proceedings of the 2nd UPM-JICA Biotechnology Seminar, Seremban, Negeri Sembilan (Malaysia), 12-14 Jan*, p. 15-19.
- Molinier J, Himer C, Hahne G. 2000.** Use of green fluorescent protein for detection of transformed shoots and homozygous offspring. *Plant Cell Rep.* **19**: 219–223.
- Moreno V, Garcia-Sogo M, Granell I, Garcia-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.
- Moreno V, Zubeldia L, Roig LA. 1984.** A method for obtaining callus cultures from mesophyll protoplasts of melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Sci. Lett.* **34**: 195-201.
- Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki RK, Horn GT, Erlich H. 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. In: *Symposium on Quantitative Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. **51**, p. 263-273.



- Mullis, KB., Ferré F, Gibbs RA (Ed.). 1994.** The polymerase chain reaction (PCR). Birkhäuser Verlag AG, Basel, Switzerland.
- Murashige T, Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.
- Nanasato Y, Konagaya K-I, Okuzaki A, Tsuda M, Tabei Y. 2013.** Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by combination of vacuum infiltration and co-cultivation on filter paper wicks. *Plant Biotechnology Reports* **7**: 267-276.
- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. 1990.** Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell*. **2**: 279-289.
- Naudin C. 1859.** Essais d'une monographie des especès et des variétés du genre *Cucumis*. *Ann. Sci. Nat. Bot.* **4**:5-87.
- Niedz RP, Smith SS, Dunbar KB, Stephens CT, Murakishi HH. 1989.** Factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **18**: 313-319.
- Nishal B, Tantikanjana T, Sundaresan V. 2005.** An inducible targeted tagging system for localized saturation mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**: 3-12.
- Nishibayashi S, Hayakawa T, Nakajima T, Suzuki M, Kaneko H. 1996 a.** CMV protecton in transgenic cucumber plants with an introduced *CMV-O cp* gene. *Theoretical and Applied Genetics* **93**: 672-678.
- Nishibayashi S, Kaneko H, Hayakawa T. 1996 b.** Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants using *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration from hypocotyl explants. *Plant Cell Reports* **15**: 809-814.
- Niu X, Li X, Veronese P, Bressan RA, Weller SC, Hasegawa PM. 2000.** Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of peppermint. *Plant Cell Rep.* **19**: 304-310.
- Norton JD, Granberry DM. 1980.** Characteristics of progeny from an interspecific cross of *Cucumis melo* with *C. metuliferus*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **105**: 174-180.
- Ohta S, Mita S, Hattori T, Nakamura K. 1990.** Construction and expression in tobacco of a  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant and Cell Physiology* **31**: 805-813.
- Olías R, Eljakaoui Z, Li J, De Morales PA, Marín-Manzano MC, Pardo JM, Belver A. 2009.** The plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na<sup>+</sup> between plant organs. *Plant, Cell & Environment* **32**: 904-916.
- Olivares-Fuster O, Peña L, Duran-Vila N, Navarro L. 2002.** Green fluorescent protein as a visual marker in somatic hybridization. *Annals of Botany* **89**: 491-497.

- Østergaard L, Yanofsky MF. 2004.** Establishing gene function by mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **39**: 682–696.
- Ow DW, Wood KV, DeLuca M, DeWet JR, Helinski DR, Howell SH. 1986.** Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* **234**: 856–859.
- Palmer CE. 1992.** Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate. *Plant Cell Rep.* **11**: 541–545.
- Park NI, Park JH, Lee CY, Lee SY, Park SU. 2010.** *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of  $\beta$ -glucuronidase reporter gene in hairy roots of *Angelica gigas* Nakai. *Plant Omics Journal* **3**: 115–120.
- Park SH, Pinson SR, Smith RH. 1996.** T-DNA integration into genomic DNA of rice following *Agrobacterium* inoculation of isolated shoot apices. *Plant Mol. Biol.* **32**: 1135–1148.
- Park SH, Rose SC, Zapata C, Srivatanakul M, Smith RH. 1998.** Cross-protection and selectable marker genes in plant transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **34**: 117–121.
- Park YD, Ronis DH, Boe AA, Cheng ZM. 1995.** Plant regeneration from leaf tissue of four North Dakota genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Am. J. Potato Res.* **72**: 329–338.
- Peña L, Cervera M, Juárez J, Ortega C, Pina JA, Durán-Vila N, Navarro L. 1995 a.** High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. *Plant Sci.* **104**: 183–191.
- Peña L, Navarro L. 1999.** Transgenic citrus. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Transgenic Trees*. Bajaj YPS (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, Vol. **44**, p. 39–54.
- Peña L, Pérez RM, Cervera M, Juárez JA, Navarro L. 2004.** Early events in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of citrus explants. *Annals of Botany* **94**: 67–74.
- Peña L., Cervera M., Juárez J., Navarro A., Pina J.A., Durán-Vila N. and Navarro L. 1995 b.** *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* **14**: 616–619.
- Peña L., Cervera M., Juárez J., Navarro A., Pina JA. and Navarro L 1997.** Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing.): factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep.* **16**: 731–737.
- Peng H, Huang H, Yang Y, Zhai Y, Wu J, Huang D, Lu T. 2005.** Functional analysis of GUS expression patterns and T-DNA integration characteristics in rice enhancer trap lines. *Plant Science* **168**: 1571–1579.
- Pérez-Martín F, Yuste-Lisbona FJ, Pineda B, Angarita-Díaz MP, García-Sogo B, Antón T, Sánchez S, Giménez E, Atarés A, Fernández-Lozano A, Ortíz-Atienza A, García-Alcázar M, Castañeda L, Fonseca R, Capel C, Goergen G, Sánchez J, Quispe JL, Capel J, Angosto T, Moreno V, Lozano R. 2017.** A collection of enhancer trap insertional mutants for functional genomics in tomato. *Plant Biotechnology Journal* 1–14.

- 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.
- Périn C, Hagen L, De Conto V, Katzir N, Danin-Poleg Y, Portnoy V, Baudracco-Arnas S, Chadoeuf J, Dogimont C, Pitrat M. 2002.** A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations. *Theoretical and Applied Genetics* **104**: 1017–1034.
- Peterson CE, Staub JE, Palmer M, Crubaugh L. 1985.** Wisconsin 2843, a multiple disease resistant cucumber population. *HortScience* **20**: 309-310.
- Pineda B, García-Abellán JO, Antón T, Pérez F, Moyano E, García Sogo B, Campos JF, Angosto T, Morales B, Capel J, Moreno V, Lozano R, Bolarín M C, Atarés A. 2012.** Tomato: Genomic Approaches for Salt and Drought Stress Tolerance. In: *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress*. Tuteja N, Gill SS, Tiburcio AF, Tuteja R (Ed.). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, p. 1085–1120.
- Pineda B, Giménez-Caminero E, García-Sogo B, Antón MT, Atarés A, Capel J, Lozano R, Angosto T, Moreno V. 2010.** Genetic and physiological characterization of the *arlequin* insertional mutant reveals a key regulator of reproductive development in tomato. *Plant & Cell Physiology* **51**: 435–447.
- Poethig S. 1989.** Genetic mosaics and cell lineage analysis in plants. *Trends Genet.* **5**: 273–277.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. 1992.** Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**: 229-233.
- Prins M. 2003.** Broad virus resistance in transgenic plants. *Trends in Biotechnology* **21**: 373–375.
- Pua E-C. 1993.** Cellular and molecular aspects of ethylene on plant morphogenesis of recalcitrant *Brassica* species *in vitro*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **34**: 191-209.
- Punja ZK, Abbas N, Sarmiento GG, Tang FA. 1990.** Regeneration of *Cucumis sativus* var. *sativus* and *C. sativus* var. *hardwickii*, *C. melo*, and *C. metuliferus* from explants through somatic embryogenesis and organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **21**: 93-102.
- Punja ZK, Raharjo SHT. 1996.** Response of transgenic cucumber and carrot plants expressing different chitinase enzymes to inoculation with fungal pathogens. *Plant Disease* **8**: 999-1005.
- Puonti-Kaerlas J. 1991.** Tissue culture and genetic transformation of pea (*Pisum sativum* L.). In: *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science*. Uppsala Univ., Sweden, p. 340.
- Purnhauser L, Gyulai G. 1993.** Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **35**: 131-139.
- Purnhauser L. 1991.** Stimulation of shoot and root regeneration in wheat *Triticum aestivum* callus cultures by copper. *Cereal Research Communications* **19**: 419-423.
- Qiu D, Diretto G, Tavarza R, Giuliano G. 2007.** Improved protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene *Cs ZCD*. *Sci. Hortic.* **112**: 172-175.

- Raharjo SH, Punja ZK. 1992.** Initiation, maintenance and plantlet regeneration from long-term suspension cultures of pickling cucumber. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* **15**: 35-39.
- Raharjo SHT, Hernandez MO, Zhang YY, Punja ZK. 1996.** Transformation of pickling cucumber with chitinase-encoding genes using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* **15**: 591–596.
- Raharjo, SHT, Punja ZK. 1996.** Selection and multiplication of transgenic embryogenic tissue of cucumber using a suspensión culture procedure. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* **19**: 42-46.
- Rajagopalan PA, Perl-Treves R. 2005.** Improved cucumber transformation by a modified explant dissection and selection protocol. *HortScience.* **40**: 431-435.
- Rajasekaran K, Mullins MG, Nair Y. 1983.** Flower formation *in vitro* by hypocotyl explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Annals of Botany* **52**: 417-420.
- Rakosy-Tican E, Aurori CM, Dijkstra C, Thieme R, Aurori A, Davey MR. 2007.** The usefulness of the *gfp* reporter gene for monitoring *Agrobacterium*-mediated transformation of potato dihaploid and tetraploid genotypes. *Plant Cell Rep.* **26**: 661-671.
- Ray S, Satya P. 2014.** Next generation sequencing technologies for next generation plant breeding. *Front Plant Sci.* **5**: 367.
- Rizzuto R, Brini M, Pizzo P, Murgia M, Pozzan T. 1995.** Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Current Biology* **5**: 635-642.
- Roche MV. 1991.** Obtención de híbridos somáticos *Cucumis melo* (x) *C. myriocarpus* mediante fusión de protoplastos. *Tesis Doctoral*. Universidad de Valencia, España.
- Rogers SO, Bendich AJ. 1994.** Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi In: *Plant Molecular Biology Manual*. Gelvin SB, Schilperoort RA (Ed.). Dordrecht: Springer Netherlands, p. 183–190.
- Rorat T, Grygorowicz WJ, Irzykowski W, Rey P. 2004.** Expression of KS-type dehydrins is primarily regulated by factors related to organ type and leaf developmental stage during vegetative growth. *Planta* **218**: 878–885.
- Rotino GL, Perri E, Zottini M, Sommer H, Spena A. 1997.** Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature biotechnology* **15**: 1398–1401.
- Roustan JP, Latche A, Fallot J. 1992.** Enhancement of shoot regeneration from cotyledons of *Cucumis melo* by AgNO<sub>3</sub>, an inhibitor of ethylene action. *J. Plant Physiol.* **140**: 485-488.
- Rouwendal GJA, Mendes O, Wolbert EHJ, Douwe de Boer A. 1997.** Enhanced expression of tobacco of the gene encoding green fluorescent protein by modification of its codon usage. *Plant Molecular Biology* **33**: 989-999.
- Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC. 1998.** Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant Cell* **10**: 937–946.

- Sallaud C, Gay C, Larmande P, Bès M, Piffanelli P, Piégu B, Droc G, Regad F, Bourgeois E, Meynard D, Périn C, Sabau X, Ghesquière A, Glaszmann JC, Delseny M, Guiderdoni E. 2004. High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards *in silico* reverse genetics. *The Plant journal* **39**: 450–464.
- Salyaev RK, Rekoslavskaya NI, Mapelli S. 2002. Increase of productivity in transgenic plants with introduced genes UGT, ACB and ACP. In: *Abstracts of the 13th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology - Crete, Greece*.
- Sapountzakis G, Tsaftaris AS. 2002. *In vitro* regeneration and genetic transformation of parthenocarpic cucumber hybrids. *Acta Hort. (ISHS)* **579**: 77-82.
- Sapountzakis G.; Tsaftaris AS. 1996. Transfer and Expression of the Firefly Luciferase Gene in Cucumber. *CGC*. **19**: 38-41.
- Sarmiento GG, Alpert K, Tang FA, Punja ZK. 1992. Factores influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and expression on kanamycin resistance in pickling cucumber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **31**: 185-193.
- Schmülling T, Schell J. 1993. Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras. *Plant Mol. Biol.* **21**: 705-708.
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA, Minx P et al. 2009. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* **326**: 1112-1115.
- Schrott M. 1995. Selectable markers and reporter genes. In: *Gene transfer to plants*. Potrykus I, Spangenberg G. (Ed.). Springer-Verlag, Germany, p. 325-336.
- Schulze J, Balko C, Zellner B, Koprek T, Hänsch R, Nerlich A, Mendel RR. 1995. Biolistic transformation of cucumber using embryogenic suspension cultures: long-term expression of reporter genes. *Plant Science* **112**: 197–206.
- Seabra RC, Pais MS. 1998. Genetic transformation of European chestnut. *Plant Cell Rep.* **17**: 177–182.
- Sebastian P, Schaefer H, Telford IRH, Renner SS. 2010. Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 14269–14273.
- Selvaraj N, Kasthuriengan S, Vasudevan A, Manickavasagam M, Choi CW, Ganapathi A. 2010. Evaluation of green fluorescent protein as a reporter gene and phosphinothricin as the selective agent for achieving a higher recovery of transformants in cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Poinsett76) via *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cellular & Develop. Biology-Plant* **46**: 329-337.
- Selvaraj N, Vasudevan A, Manickavasagam M, Ganapathi A. 2006. *In vitro* organogenesis and plant formation in cucumber. *Biologia plantarum* **50**: 123-126.
- Selvaraj N, Vasudevan A, Manickavasagam M, Kasthuriengan S, Ganapathi A. 2007. High frequency shoot regeneration from cotyledon explants of cucumber via organogenesis. *Scientia Horticulturae* **112**: 2–8.

- Selvaraj N, Vengadesan G, Vasudevan A, Prem Anand R, Ramesh Anbazhagan V, Ganapathi A. 2002.** Micropropagation of *Cucumis sativus* L. from field grown plants. In: *Proceedings of the Cucurbitaceae 2002, ISHS Press, Belgium*, p. 149-156.
- Seo SH, Bai DG, Park HY. 2000.** High frequency shoot regeneration from leaf explants of cucumber. *J. Plant Biotech.* **2**: 51–54.
- Seong ES, Song KJ, Jegal S, Yu CY, Chung IM. 2005.** Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine affect *Agrobacterium*-mediated apple transformation. *Plant Growth Regulation* **45**: 75-82.
- Serrano R, Culiñáiz-Maciá FA, Moreno V. 1998.** Genetic engineering of salt and drought tolerance with yeast regulatory genes. *Scientia Horticulturae* **78**: 261–269.
- Sgamma T, Thomas B, Muleo R. 2015.** Ethylene inhibitor silver nitrate enhances regeneration and genetic transformation of *Prunus avium* (L.) cv Stella. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **120**: 79-88.
- Shi H, Li L, Pan R. 1997.** Effects of polarity and NAA concentration on transformation of cucumber cotyledons by *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* **5**: 43–47.
- Shi H-P, Li L, Pan R-C. 1998.** Genetic transformation of *Cucumis sativus* by *Agrobacterium rhizogenes*. *Acta Botanica Sinica* **40**: 470–473.
- Sidorov VA, Kasten D, Pang S-Z, Hajdukiewicz PTJ, Staub JM, Nehra NS. 1999.** Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *The Plant Journal* **19**: 209-216.
- Smith CJ, Watson CF, Bird CR, Ray J, Schuch W, Grierson D. 1990.** Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Mol Gen Genet.* **224**: 477-481.
- 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.
- Soniya EV, Das MR. 2002.** *In vitro* organogenesis and genetic transformation in popular *Cucumis sativus* L. through *Agrobacterium tumefaciens*. *Indian J. Exp. Biol.* **40**: 329-333.
- Spena A, Saedler H, Sommer H, Rotino GL. 1997.** Methods for producing parthenocarpic or female sterile transgenic plants. *Patent Pub. No.:* **WO/1998/028430**, **International Application No.:** **PCT/EP1997/007202**.
- Springer PS. 2000.** Gene traps: tools for plant development and genomics. *The Plant Cell* **12** :1007-1020.
- Staba EJ. 1969.** Plant tissue culture as a technique for the phytochemist. In: *Recent advances in phytochemistry*. Seikel MK, Runcekles VC. (Ed.). Appleton-Century-Crofts, New York, Vol. **2**, p. 75-106.

- 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.
- Stam M, Scheid OM. 2005.** Paramutation: an encounter leaving a lasting impression. *Trends in Plant Science* **10**: 283-290.
- Stewart CN. 2001.** The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Rep.* **20**: 376-382.
- Stewart CN. 2006.** Go with the glow: fluorescent proteins to light transgenic organisms. *Trends in Biotech.* **24**: 155-162.
- Su S, Liu H, Qin Z. 2006.** Establishment of genetic transformation system by *Agrobacterium*-mediated parthenocarpy gene of cucumber. *Journal of Northeast Agricultural University* **03**.
- Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM. 2010.** *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev. Cell* **18**: 463-471.
- Sun Z, Lower RL, Staub JE. 2004.** Generation means analysis of parthenocarpic characters in a processing cucumber (*Cucumis sativus* L.) population. In: *Proceedings of the 8th Eucarpia Conference, Cucurbitaceae 2004: Progress in cucurbit genetics and breeding research, Olomouc, The Czech Republic, July 12-17*, p. 365-372.
- Sureshkumar P, Selvaraj N, Ganapathi A, Kasthuriengan S, Vasudevan A, Anbazhagan, VR. 2005.** Assessment of factors influencing *Agrobacterium* mediated transformation in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Plant Biotechnology* **7**: 225-231.
- Sureshkumar P, Selvaraj N, Kasthuriengan S; Ganapathi, A. 2006.** *Agrobacterium* mediated transformation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) In: *Late submission abstracts of the Meeting of the Society for In Vitro Biology – Minneapolis, USA., 3-7 June 2006*.
- Svitashev SK, Pawlowski WP, Makarevitch I, Plank DW, Somers DA. 2002.** Complex transgene locus structures implicate multiple mechanisms for plant transgene rearrangement. *The Plant Journal* **32**: 433-445.
- Szwacka M, Krzymowska M and Malepszy S. 1999.** Thaumatin expression in transgenic cucumber plants. In: *Plant Biotechnology and in vitro Biology in the 21st Century*. Altman A, Ziv M, Izhar S. (Ed.). Kluwer Academy Publishers. Netherlands, p. 609-612.
- Szwacka M, Krzymowska M, Kowalczyk ME, Osuch A. 2000.** Transgenic cucumber plants expressing the thaumatin gene. In: *Progress in Biotechnology*. Bielecki S, Tramper J, Polak J (Ed.). Elsevier, Vol. **17**, p. 43-48.
- Szwacka M, Krzymowska M, Osuch A, Kowalczyk ME, Malepszy S. 2002 a.** Variable properties of transgenic cucumber plants containing the thaumatin II gene from *Thaumatococcus daniellii*. *Acta Physiologiae Plantarum* **24**: 173-185.
- Szwacka M, Morawski M, Burza W. 1996.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated cucumber transformation with thaumatin II cDNA. *Genetica Pol.* **37A**: 126-129.

- Szwacka M, Piworun E, Ozdoba A, Szelaĝ T, Urbańczyk-Wochniak E. 2002 b.** Spatial and temporal expression of the sweet protein (thaumatin II) gene in transgenic cucumber plants. In: *10th IAPTC&B Congress: Plant Biotechnology 2002 and Beyond, Orlando, Florida, USA, 42-A*.
- Tabei Y, Kitade S, Nishizawa Y, Kikuchi N, Kayano T, Hibi T, Akutsu K. 1998.** Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Cell Reports* **17**: 159–164.
- Tabei Y, Koga-Ban Y, Nishizawa Y, Kayano T, Tanaka H, Akutsu K, Hibi T. 1999.** Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene and its environmental risk assessment. In: *Plant and Animal Genome VII Conference, San Diego, USA, P530*.
- Tabei Y, Nishio T, Kurihara K, Kanno T. 1994.** Selection of transformed callus in a liquid medium and regeneration of transgenic plants in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Breeding Science* **44**: 47–51.
- Tabei Y. 1997.** Study on breeding of cucurbitaceae using biotechnology. *Bulletin of the National Institute of Agrobiological Resources* **11**: 1–107.
- Tagashira N, Pląder W, Filipecki M, Yin Z, Wisniewska A, Gaj P, Szwacka M, Malinowski R, Kondo K, Malepszy S. 2005.** Transgene integration site strongly influencing metabolic profiles of cucumber plants. *Transgenic Research* (in press).
- Tanurdzic M, Banks JA. 2004.** Sex-determining mechanisms in land plants. *The Plant Cell* **16**: S61–S71.
- The Potato Genome Sequencing Consortium. 2011.** Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* **475**: 189 - 195.
- The Tomato Genome Consortium. 2012.** The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**: 635-641.
- Tian N, Liu, Liu S, Ting H, Huang J, Van Der Krol S, Bouwmeester H, Liu Z. 2013.** An improved *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Artemisia annua* L. using stem internodes as explants. *Czech J. Genet. Plant Breed.* **49**: 123-129.
- Traas J, Hülskamp M, Gendreau E, Höfte H. 1998.** Endoreduplication and development: rule without dividing?. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 498–503.
- Trulson AJ, Shahin EA. 1986.** *In vitro* plant regeneration in the genus *Cucumis*. *Plant Science* **47**: 35-43.
- Trulson AJ, Simpson RB, Shahin EA. 1986.** Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium rhizogenes*. *Theor. Appl. Genet.* **73**: 11–15.
- Turhan H. 2004.** The Effect of Silver Nitrate (Ethylene Inhibitor) on *in vitro* Shoot Development in Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biotechnology* **3**: 72-74.
- Twardowska A. 2003.** The application of transgenic cucumber containing thaumatin gene for direct consumption and food technology (in Polish). *PhD Thesis, Poznań University of Life Sciences, Faculty of Food Technology, Wojska Polskiego, Poznań, Poland*.



- Tzfira T, Citovsky V. 2000.** From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*–plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology* **1**: 201-212.
- Ulían EC, Magill JM, Magill CW, Smith RH. 1996.** DNA methylation and expression of *NPTII* in transgenic petunias and progeny. *Theor. Appl. Genet.* **92**: 976–981.
- Unni SC, Soniya EV. 2010.** Transgenic *Cucumis sativus* expressing the hepatitis B surface antigen. *Plant Molecular Biology Reporter* **28**: 627-634.
- Vain P, Yean H, Flament P. 1989.** Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L. by AgNO<sub>3</sub>. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **18**: 143-151.
- Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M. 1990.** Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular and General Genetics* **220**: 245-250.
- 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**: 24-32.
- Vasudevan A, Selvaraj N, Ganapathi A, Kasthuriengan S, Anbazhagan VR, Manickavasagam M, Choi CW. 2008.** Leucine and spermidine enhance shoot differentiation in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **44**: 300–306.
- Vengadesan G, Anand RP, Selvaraj N, Perl-Treves R, Ganapathi A. 2005.** Transfer and expression of *nptII* and *bar* genes in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant.* **41**: 17-21.
- Vicient CM. 2010.** Transcriptional activity of transposable elements in maize. *BMC Genomics* **11**: 1-10.
- Waldron C, Murphy EB, Roberts JL, Gustafson GD, Armour SL, Malcolm SK. 1985.** Resistance to hygromycin B. A new marker for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **5**: 103–108.
- Walker CD, Loneragan JF. 1981.** Effects of copper deficiency on copper and nitrogen concentrations and enzyme activities in aerial parts of vegetative subterranean clover plants. *Annals of Botany* **47**: 65-73.
- Wang J, Li L, Shi Z-Y, Wan X-S, An L-S, Zhang J-L. 2005.** T-DNA Integration Category and Mechanism in Rice Genome. *Journal of Integrative Plant Biology* **47**: 350–361.
- Wang J, Zhang S, Wang X, Wang L, Xu H, Wang X, Shi Q, Wei M, Yang F. 2013.** *Agrobacterium*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) using a sense mitogen-activated protein kinase gene (*CsNMAPK*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **113**: 269-277.

- Wang S-L, Ku S S, Ye X-G, He C-F, Kwon S Y, Choi P S. 2015.** Current status of genetic transformation technology developed in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Integrative Agriculture* **14**: 469-482.
- Wang Y, Gu XF, Zhang SP, Miao H, Chen GH, Xie BY. 2014.** Transformation of RNAi vector in cucumber (*Cucumis sativus*) *in vitro* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection. *Chinese Bulletin of Botany* **49**: 183-189.
- Wang Y-R, Chen L-M, Pan J-S, He H-L, Cai R. 2006.** Establishment of high effective regeneration system in cucumber (*Cucumis sativus* L.) and *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)* **02**.
- Wehner TC, Locy RD. 1981.** Tissue culture propagation of field grown cucumber selections. *Cucurbit. Genet. Coop. Rep.* **4**: 20-22.
- Wei J, Jie L, Yan-Ming Z, Xi B, Cui-Hong D, Ai-Ju H. 2005 .** Transformation of *DREB1A* gene regulated by different promoters into cucumber. *Journal of Northeast Agricultural University* **4**.
- Whitaker TW, Bemis WP. 1976.** Cucurbits, Cucumis, Citrullus, Cucurbita, Lagenaria (Cucurbitaceae). In: *Evolution of Crop Plants*. Simmonds NW (Ed.). Longman, London, U.K., p. 64–69.
- Whitaker TW, Davis GN. 1962.** Cucurbits: botany, cultivation and utilization. *Leonard Hill, London*.
- Winans SC, Mantis NJ, Chen CY, Chang CH, Han DC. 1994.** Host recognition by the VirA, VirG two-component regulatory proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Research in Microbiology* **145**: 461-473.
- Winans SC. 1992.** Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiological Reviews* **56**: 12–31.
- Wu E, Lenderts B, Glassman K, Berezowska-Kaniewska M, Christensen H, Asmus T, Zhen S, Chu U, Cho M-J, Zhao Z-Y. 2014.** Optimized *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation protocol and molecular data of transgenic sorghum plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **50**: 9-18.
- Xiang TH, Wang LL, Pang JL, Chen M, Xu C. 2005.** Hairy root induced by wild-type *Agrobacterium rhizogenes* K599 in soybean, cucumber and garden balsam *in vivo*. *Yi Chuan* **27**: 783-786.
- Xiao-Yan D, Xing-Guo Z, Xin J, Chang-Wen S, Cheng-Gang S. 2004.** Transformation of cold-induced transcription activator *CBF 3* into cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Southwest Agricultural University* **5**.
- Xie, J, Wehner TC. 2001.** Gene list 2001 for cucumber. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* **24**: 110–136.
- Xu Q, Chen LL, Ruan X, Chen D, Zhu A, Chen C, Bertrand D, Jiao WB, Hao BH, Lyon MP, Chen J et al. 2013.** The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nature Genetics* **45**: 59–66.
- Yang ZN, Ingelbrecht IL, Louzada E, Skaria M, Mirkov TE. 2000.** *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). *Plant Cell Rep.* **19**: 1203-1211.

- Yin Z, Bartoszewski G, Szwacka M, Malepszy S. 2005 a.** Cucumber transformation methods - the review. *Biotechnologia* **1**: 95-113.
- Yin Z, Hennig J, Szwacka M, Malepszy S. 2004 a.** Tobacco PR-2d promoter is induced in transgenic cucumber in response to biotic and abiotic stimuli. *Journal of Plant Physiology* **161**: 621-629.
- Yin Z, Malinowski R, Ziółkowska A, Sommer H, Plcader W, Malepszy S. 2006.** The DefH9-iaaM-containing construct efficiently induces parthenocarpy in cucumber. *Cellular & Molecular Biology Letters* **11**: 279–290.
- Yin Z, Malinowski R, Ziółkowska A, Sommer H, Plcader W, Malepszy S. 2006.** The DefH9-iaaM-containing construct efficiently induces parthenocarpy in cucumber. *Cellular & Molecular Biology Letters* **11**: 279–290.
- Yin Z, Pawłowicz I, Bartoszewski G, Malinowski R, Malepszy S, Rorat T. 2004 b.** Transcriptional expression of a *Solanum sogarandium* pGT::Dhn10 gene fusion in cucumber, and its correlation with chilling tolerance in transgenic seedlings. *Cellular & Molecular Biology Letters* **9**: 891–902.
- Yin Z, Pląder W, Wiśniewska A, Szwacka M, Malepszy S. 2005 b.** Transgenic cucumber - a current state. *Folia Horticulturae* **17**: 73–90.
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao MA et al. 2002.** A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* **296**: 79-92.
- Yu J, Ni P, Wong GK-S. 2006.** Comparing the whole-genome-shotgun and map-based sequences of the rice genome. *Trends in plant science*. **11**: 387-391.
- Yu J, Wang J, Lin W, Li S, Li H, Zhou J, Ni P, Dong W, Hu S, Zeng C, Zhang J. 2005.** The genomes of *Oryza sativa*: A history of duplications. *PLoS Biol.* **3**: e38.
- Yu X, Hyldgaard B, Rosenqvist E, Ottosen C-O, Chen J. 2015.** Interspecific hybridization in *Cucumis* leads to the divergence of phenotypes in response to low light and extended photoperiods. *Frontiers in Plant Science*. **6**: 1-10.
- Zhang CL, Chen DF, McCormac AC, Scott NW, Elliott MC, Slater A. 2001 a.** Use of the *GFP* reporter as a vital marker for *Agrobacterium*-mediated transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Molecular Biotechnology* **17**: 109–117.
- Zhang FL, Takahata Y, Watanabe M, Xu JB. 2000.** *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep.* **19**: 569-575.
- Zhang J, Guo D, Chang Y, You C, Li X, Dai X, Weng Q, Zhang J, Chen G, Li X, Liu H, Han B, Zhang Q, Wu C. 2007.** Non-random distribution of T-DNA insertions at various levels of the genome hierarchy as revealed by analyzing 13 804 T-DNA flanking sequences from an enhancer-trap mutant library. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* **49**: 947–959.
- Zhang P, Phansiri S, Puonti-Kaerlas J. 2001 b.** Improvement of cassava shoot organogenesis by the use of silver nitrate *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **67**: 47-54.

- Zhao L, Liao F, Wang C, Chen M, Wei A, Du S, Ma B, Hu X, Wu Z, Wang R, Li M. 2009.** Generation of transgenic cucumbers with expression of a ten-tandem repeat long-acting *GLP-1* analogue and their biological function on diabetic rats. *Chinese Science Bulletin* **54**: 4658–4663.
- Zhou H, Arrowsmith JW, Fromm ME, Hironaka CM, Taylor ML, Rodriguez D, Pajeau ME, Brown SM, Santino CG, Fry JE. 1995.** Glyphosate-tolerant *CP4* and *GOX* genes as a selectable marker in wheat transformation. *Plant Cell Rep.* **15**: 159-163.
- Zhu C, Chen Z. 2005.** Role of polyamines in adventitious shoot morphogenesis from cotyledons of cucumber *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **81**: 45–53.
- Zhuang F-Y, Chen J-F, Staub JE, Qian C-T. 2006.** Taxonomic relationships of a rare *Cucumis* species (*C. hystrix* Chakr.) and its interspecific hybrid with cucumber. *HortScience* **41**: 571–574.
- Ziv M, Gadasi G., 1986.** Enhanced embryogenesis and plant regeneration from cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus by activated charcoal in solid/liquid double-layer cultures. *Plant Sci.* **47**: 115–122.
- Ziv M. 1992.** Micropropagation of *Cucumis* spp. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-Tech and Micropropagation III*. Bajaj YPS (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Vol. **19**, p. 72–90.
- Zuo J, Niu Q-W, Ikeda Y, Chua N-H. 2002.** Marker-free transformation: increasing transformation frequency by the use of regeneration-promoting genes. *Current Opinion in Biotechnology* **13**: 173-180.
- Zuo J, Niu Q-W, Møller SG, Chua N-H. 2001.** Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nature Biotechnology* **19**: 157–161.

