



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Sistemas de alto rendimiento en la regeneración *in vitro* de melón y pepino

Victoria Albalat Peraita
Valencia, Diciembre 2016

Dirigido por: Dr. Vicente Moreno Ferrero
Dr. Benito José Pineda Chaza

Universidad Politécnica de Valencia
Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

“Donde no falta voluntad, siempre hay un camino”

J.R.R. Tolkien

Antes de comenzar a leer todas estas hojas, todo este tiempo invertido transformado ahora en palabras, quería agradecer este trabajo a mucha gente.

A mis padres, porque aunque me equivoqué al hacer la solicitud del master, si, me equivoqué y me cogieron en uno que no había solicitado, me apoyaron y me motivaron a continuar y empezar esta aventura sin mirar atrás.

A Susana y Begoña, mis hermanas, que a parte de todo lo que hacen por mi, son eso, mis hermanas y se que siempre me van a dar los mejores consejos posibles. Os quiero.

A los jopas, Alba, Belén, Guille y Mar por aguantar los rollos que os he contado sobre lo que hacía en el laboratorio, escuchar toda la explicación, fingir interés e incluso, en ocasiones, hacer preguntas.

No podía no incluir a Rubias, Boludas y Gilis por hacer de este año único, por sentir que podía hacerlo todo, por resolver todas y cada una de mis dudas sobre genética de plantas sin hacerme sentir inferior. Todos mis aprobados tienen vuestro nombre, sobre todo el de Ana. Muchas gracias compi, de verdad.

Adrián, por hacer de este año un gran año. Por escucharme siempre que lo necesito y por apoyarme en todas mis dudas y decisiones sobre mi futuro aunque eso suponga alborotar el suyo.

A todos los miembros del laboratorio de Cultivo in Vitro, a Vicente por aceptarme y valorarme dándome esta responsabilidad para empezar un proyecto que en un principio, confiaba en que podía ser interesante y no se equivocaba; a Benito por todo lo que me ha ayudado en la construcción del trabajo escrito y con la presentación. No sé que habría hecho sin tus indicaciones y tu implicación de verdad. A Begoña por ayudarme con las transformaciones genéticas y aportar sonrisas y conversaciones a la monotonía en las mañanas de trabajo; y finalmente a Carlos, porque realmente sin él, esto no habría sido lo mismo. Hay tantas cosas que podría agradecerte que no se ni por donde empezar. Has hecho que me sienta cómoda todos los días desde el primero, has hecho que me sintiera importante pero a la vez responsable de mis actos, has hecho que disfrute desde el aprendizaje más tonto hasta el más complicado y sobre todo has hecho que encuentre a un amigo que he disfrutado durante todos estos meses. Me habría encantado que estuvieras en mi presentación pero bueno, ya la comentaremos seguro.

Índice general

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

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Pepino y melón: origen, taxonomía y descripción morfológica.....	1
1.2. Importancia económica.....	3
1.3. La regeneración in vitro de plantas de pepino y melón.....	3
2. Antecedentes y objetivos.....	7
3. Materiales y Métodos.....	9
3.1. Material vegetal.....	9
3.2. Técnicas básicas de cultivo <i>in vitro</i>	9
3.2.1. Esterilización.....	9
3.2.2. Germinación y obtención de plántulas axénicas.....	9
3.2.3. Extracción y cultivo de explantes primarios.....	10
3.2.4. Regeneración de plantas a partir de explantes primarios.....	10
3.2.5. Determinación del nivel de ploidía de las plantas regeneradas mediante citometría de flujo.....	11
3.3. Nomenclatura y composición de los medios de cultivo.....	11
3.3.1. Nomenclatura de los medios de cultivo.....	11

3.3.2. Composición de los medios de cultivo.....	11
3.4. Variables evaluadas en los experimentos de morfogénesis.....	12
3.5. Tratamiento estadístico.....	13
3.6. Transformación genética.....	13
3.6.1. Agrobacterium tumefaciens: cepa bacteriana, plásmido y genes incluidos en el T-DNA.....	13
3.6.2. Cultivo de Agrobacterium tumefaciens.....	13
3.6.3. Método de transformación: selección y regeneración de plantas transgénicas.....	13
3.6.4. Enraizamiento de los brotes transgénicos.....	14
4. Resultados.....	
4.1. Estudios relacionados con la respuesta morfogénica en pepino.....	15
4.1.1. Efecto del estadio ontogénico del cotiledón sobre la morfogénesis adventicia en explantes de cotiledón de pepino.....	15
4.1.2. Efecto del tipo de explante sobre la morfogénesis adventicia de pepino..	17
4.1.3. Efecto del medio de cultivo sobre la morfogénesis adventicia en mini-explantes de pepino.....	20
4.1.4. Efecto del soporte de cultivo sobre la morfogénesis adventicia en mini-explantes y micro-explantes de pepino.....	21
4.2. Estudios relacionados con la respuesta morfogénica en melón.....	24
4.2.1. Efecto del estadio ontogénico y del tipo de explante sobre la morfogénesis adventicia en explantes de cotiledón de melón.....	24
4.2.2. Efecto del medio de cultivo sobre la morfogénesis adventicia en mini-explantes de melón.....	25
4.2.3. Efecto del soporte de cultivo sobre la morfogénesis adventicia en mini-explantes y micro-explantes de melón.....	27
4.2.4. Efecto del medio de cultivo sobre la morfogénesis adventicia en explantes de hoja de planta axénica de melón.....	28
4.3. Transformación genética de melón cantalupo.....	29
4.4. Análisis del nivel de ploidía en plantas regeneradas a partir de cotiledón de melón cantalupo.....	30

5. Discusión	33
5.1. Importancia del estadio ontogénico para la obtención de respuesta morfogénica.....	33
5.2. Importancia del tipo de explante para la obtención de respuesta morfogénica.....	34
5.3. Importancia de la composición del medio de cultivo para la obtención de respuesta morfogénica.....	36
5.4. Importancia del soporte de cultivo para la obtención de respuesta morfogénica.....	38
5.5. Importancia diferentes requerimientos culturales y morfogénicos en los experimentos de transformación genética.....	39
6. Conclusiones	43
7. Bibliografía	45

Índice de figuras

Figura 1	Algunos detalles morfológicos de la planta de pepino. A) tallo, B) hoja, C) flor y D) fruto.....	2
Figura 2	Algunos detalles morfológicos de la planta de melón. A) tallo, B) hoja, C) flor y D) fruto.....	3
Figura 3	Índices CD y ORG utilizados para estimar el crecimiento desorganizado y organizado de los callos.....	12
Figura 4	Diferentes estadios ontogénicos del cotiledón.....	15
Figura 5	Respuesta morfogénica en explantes de cotiledón de pepino Marketer.....	16
Figura 6	Respuesta morfogénica en explantes de cotiledón de pepino Holandés.....	17
Figura 7	Detalle de los diferentes tipos de explante que se utilizaron en el experimento. De cada planta se podían extraer más de 2 secciones de hipocotilo (H), 2 explantes de cotiledón distal (CD) y 4 (2 de cada cotiledón) explantes de cotiledón proximal (CP).....	17
Figura 8	Detalle de la morfogénesis en explantes de hipocotilo o cotiledón de pepino Marketer dependiendo del estadio de desarrollo, el tipo de explante cotiledonario (distal o proximal) y si se han o no recortado....	18
Figura 9	Detalle de la morfogénesis en diferentes tipos de explante de pepino Holandés dependiendo del estadio de desarrollo, el tipo de explantes (distal o proximal) y si se han o no recortado.....	19
Figura 10	Detalle de los explantes que se utilizaron en el experimento. Cada cotiledón se disecciona en explantes, 2 de la zona proximal (CP) y otros dos de la distal (CD), de manera que de cada plántula se pueden extraer 8 explantes.....	20
Figura 11	Respuesta morfogénica en explantes de cotiledón de pepino Holandés cultivados en medios que combinan auxina (NAA) con thidiazuron (NT), zeatina (NZ), benciladenina (NB) y benciladenina más zeatina (NBZ).....	21
Figura 12	Detalle de la obtención de los miniexplantes (A) y microexplantes (B) y del sistema de cultivo que se empleó. De cada planta se obtienen 8 mini-explantes (A) o 16-20 micro-explantes (B).....	21

Figura 13	Respuesta morfogenética en explantes de hoja de pepino Holandés cultivados en medios que combinan diferentes concentraciones de ácido naftalen-acético (0.1 mg/l y 0.02 mg/l) con benciladenina (NB). Las flechas indican las zonas de mayor calidad morfogenética.....	23
Figura 14	Germinación anómala en semillas de melón Galia y Piel de Sapo.....	24
Figura 15	Detalle de la morfogénesis en explantes de hipocotilo o cotiledón de melón cantalupo dependiendo del estadio de desarrollo y el tipo de explante cotiledonario (distal o proximal).....	25
Figura 16	Respuesta morfogenética en explantes de cotiledón de melón Cantalupo cultivados en medios que combinan auxina (IAA) con thidiazuron (IT), zeatina (IZ), benciladenina (IB) y benciladenina más zeatina (IBZ).....	26
Figura 17	Detalle de los microexplantes sobre medio líquido y sólido a los 12 días de cultivo. Las flechas indican las zonas en las que se produce el rápido desarrollo de estructuras organogénicas (i.e. yemas) a los 12 días de cultivo. En ese periodo, estas estructuras no se han desarrollado completamente en los explantes cultivados sobre medio sólido. Arriba a la derecha se pueden ver explantes con elevada respuesta morfogenética después de transferir a medio sólido los explantes que se encontraban sobre medio líquido.....	27
Figura 18	Respuesta morfogenética en explantes de hoja de melón Cantalupo cultivados en medios que combinan ácido indol-acético con benciladenina (IB) y benciladenina más zeatina (IBZ). Las flechas indican la amplitud de la morfogénesis.....	28
Figura 19	Detalle de algunas de las etapas del proceso de transformación genética. A) Expresión GUS en estructuras organogénicas (i.e. yemas) en miniexplantes a los 20 días de la transformación. B) Expresión GUS en estructuras organogénicas (i.e. yemas) en explantes normales de la zona proximal a los 20 días de la transformación. Se aprecia un mayor número de eventos positivos GUS en los miniexplantes. C) Callos con estructuras organogénicas procedentes de miniexplantes en medio con presión de selección (i.e. 100 mg/l). D) Elongación y enraizamiento de brotes transgénicos en medio selectivo (i.e. 100 mg/l).....	29

Índice de tablas

Tabla 1	Efecto del estadio ontogénico sobre el crecimiento y la morfogénesis de callos procedentes de explantes de cotiledón de pepino Marketer. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD)...	16
Tabla 2	Efecto del estadio ontogénico sobre el crecimiento y la morfogénesis de callos procedentes de explantes de cotiledón de pepino Holandés. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD)...	16
Tabla 3	Efecto del tipo de explante sobre el crecimiento y la morfogénesis de callos de pepino Marketer. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).....	18
Tabla 4	Efecto del tipo de explante sobre el crecimiento y la morfogénesis de callos de pepino Holandés. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).....	19
Tabla 5	Efecto del medio de cultivo sobre la morfogénesis de callos procedentes de explantes de cotiledón de pepino Holandés. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD)...	20
Tabla 6	Efecto del medio de cultivo sobre la morfogénesis de callos procedentes de explantes de hoja de pepino Holandés. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).....	22
Tabla 7	Efecto del estadio ontogénico sobre el crecimiento y la morfogénesis de callos procedentes de explantes de cotiledón de melón Cantalupo. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD)...	24
Tabla 8	Efecto del medio de cultivo sobre la morfogénesis de callos procedentes de explantes de cotiledón de melón Cantalupo. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).	26
Tabla 9	Efecto del medio de cultivo sobre la morfogénesis de callos procedentes de explantes de hoja de melón Cantalupo. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).....	28
Tabla 10	Eficacias de transformación de melón con explantes y miniexplantes como material de partida.....	29
Tabla 11	Análisis del nivel de ploidía en plantas regeneradas en experimentos de morfogénesis o transformación genética a partir de explantes de cotiledón.....	31

Resumen

Para abordar con éxito las técnicas de cultivo *in vitro* aplicadas a la mejora vegetal es necesario disponer de sistemas eficientes y reproducibles que permitan, en última instancia, la regeneración de plantas a partir del material de partida. En este trabajo de investigación hemos querido avanzar en el conocimiento de los requerimientos culturales y morfogénicos de cultivares de pepino y melón para seleccionar los que, por ser más adecuados y eficientes, puedan ser útiles en futuros programas de mejora que precisen la utilización de las técnicas de cultivo *in vitro*. Los experimentos realizados nos han permitido identificar el estadio ontogénico y el tipo de explante más adecuados para mejorar la cantidad y calidad de la respuesta morfogénica en ambas especies. Asimismo, los estudios con diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento han determinado que las mejores respuestas se obtienen en pepino con la combinación de ácido naftalen-acético y benciladenina, mientras que en melón resulta más adecuado utilizar ácido indol-acético y benciladenina o una combinación de benciladenina y zeatina. También hemos descubierto que los explantes de pequeño calibre cultivados sobre medio líquido hasta la inducción de las primeras estructuras organizadas incrementan la aptitud para la morfogénesis. Así, las mejores condiciones en melón permiten obtener eficacias de transformación genética muy elevadas para esta especie y reducen la regeneración de plantas poliploides.

Summary

In order to successfully address the in vitro culture techniques applied to plant breeding, it is necessary to have efficient and reproducible systems that ultimately allow the regeneration of plants from the starting material. In this research we wanted to advance our knowledge of the cultural and morphogenetic requirements in melon and cucumber cultivars to select the ones that, being most suitable and efficient, can be useful in future breeding programs that require the use of in vitro culture techniques. The experiments that we have developed in this research have enabled us to identify the ontogenetic stage and the type of explant most suitable to improve the quantity and quality of the morphogenetic response in both species. Furthermore, studies with different combinations of growth regulators have determined that the best responses were obtained in cucumber with the combination of naphthalene acetic acid and benzyladenine, while in melon is more appropriate indole acetic acid and benzyladenine or a combination of benzyladenine and zeatin. We have also found that cultured, small caliber explants on liquid medium until induction of the first organized structures increase the ability to morphogenesis. Thus, the best conditions in melon allow for obtaining very high efficiencies of genetic transformation for this species and reduce the regeneration of polyploid plants.

1. Introducción

1.1. Pepino y melón: origen, taxonomía y descripción morfológica

El origen de estos dos cultivos tiene capítulos muy similares. Pese a que no se conoce con certeza, parece ser que sus inicios se encuentran en Asia, concretamente en el sudeste y este de este continente (China y Japón). Algunos investigadores indican que estas dos especies podrían ser originarias de India o Irán, y que a partir de ahí se expandieron hacia Egipto. Con independencia de su origen, lo cierto es que con el paso de los años estas especies han sido introducidas en numerosos países de climas principalmente cálidos, ya que son cultivos exigentes en calor. En algo que si están de acuerdo los estudios es que los frutos de estas plantas se utilizan desde hace más de 5.000 años, y eran ya conocidos por israelitas, egipcios, romanos y griegos. La expansión de los cultivares por Europa ocurrió a través del imperio Romano, aunque su entrada en España no se produjo hasta la dominación Árabe (Mármol, 2008; Mármol, 2011).

A nivel taxonómico, la familia *Cucurbitaceae* comprende dos subfamilias (*Zanonioiceae* y *Cucurbitaceae*), 8 tribus, 118 géneros y 825 especies (Jeffrey, 1990). Entre estas especies se encuentran el melón (*Cucumis melo* L.), el pepino (*Cucumis sativus* L.), la calabaza (*Cucúrbita pepo* L.) o la sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.), que son las de mayor relevancia económica (Esquinas-Alcázar y Gulick, 1983). El género *Cucumis* se encuentra dividido en dos subgéneros en función del número cromosómico básico de las especies que lo integran. El subgénero *Cucumis* incluye a *C. sativus* y posee un número cromosómico básico de $x=7$, mientras que el subgénero *Melo*, en el que se encuentra *C. melo*, incluye especies con un número cromosómico básico de $x=12$.

Las dos especies son diferentes desde un punto de vista morfológico, aunque comparten ciertas características. Por lo que respecta a pepino, se trata de una planta anual de porte herbáceo con un sistema radicular muy potente, lo cual es lógico teniendo en cuenta que su enorme productividad debe de ir acompañada de un equilibrio entre la parte aérea y el sistema radicular. Cuenta con una raíz principal que se ramifica rápidamente a través de raíces secundarias que se extienden superficialmente. Éstas son muy alargadas y finas, y tiene la capacidad de poder emitir raíces adventicias por encima del cuello. El tallo, anguloso y áspero al tacto (figura 1A), es de porte herbáceo, rastrero o trepador. Su crecimiento es indeterminado, y forma nudos y entrenudos en un número variable según la variedad y condiciones de cultivo. A partir de cada nudo se forma una hoja y un zarcillo simple, y en la axila de la hoja se desarrolla un brote lateral y una o varias flores. Las hojas son alternas, largamente pecioladas, de borde dentado y limbo acorazonado, con tres a cinco lóbulos más o menos pronunciados, siendo más acentuado el central que con frecuencia termina en punta (figura 1B). Son de color verde oscuro

por el haz y algo grisáceo y más claro por el envés, y están recubiertas por un tomento suave que se vuelve áspero al envejecer. Las flores se disponen en las axilas de las hojas sobre un corto pedúnculo. El color de sus pétalos es amarillo intenso (figura 1C). Existe una gran variabilidad en la expresión del sexo en pepino, de manera que hay especies hermafroditas, ginoicas, monoicas, andromonoicas y androicas, estando este carácter controlado por el genotipo y los factores medioambientales y hormonales (Yamasaki et al, 2003). El fruto del pepino es un pepónide, de superficie lisa o con protuberancias o “verrugas” de las que salen espinas que, según su fortaleza, pueden pinchar. En cuanto al color, adquiere distintas tonalidades durante su formación, a lo largo de los primeros estadios es verde claro, después verde oscuro y cuando madura es generalmente amarillo o incluso blanco. La pulpa tiene un color blanquecino, siendo bastante acuosa, y en su interior se encuentran las semillas repartidas a lo largo del fruto. Éstas son ovales, algo aplastadas y de color blanco-amarillento (figura 1D).

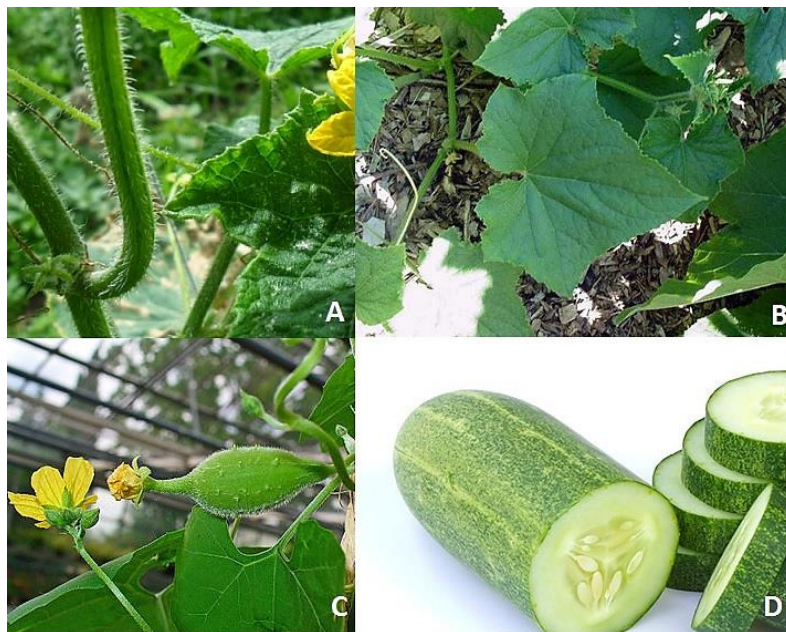


Figura 1. Algunos detalles morfológicos de la planta de pepino. A) tallo, B) hoja, C) flor y D) fruto.

La planta de melón es una planta herbácea, de porte rastrero o trepador. Su sistema radicular es abundante, muy ramificado y de rápido desarrollo. El tallo principal (figura 2A) está cubierto de formaciones pilosas y presenta nudos en los que se desarrollan hojas, zarcillos y flores. Las hojas, con los márgenes dentados, son de limbo orbicular aovado, reniforme o pentagonal y con 3 a 7 lóbulos (figura 2B). Las flores, (figura 2C), con pétalos de color amarillo, son solitarias y pueden ser masculinas, femeninas o hermafroditas. Las masculinas suelen aparecer en primer lugar sobre los entrenudos más bajos, mientras que las femeninas y hermafroditas aparecen más tarde, en las ramificaciones de segunda y tercera generación. El fruto presenta morfologías variables: esférica, elíptica, aovada, etc. La corteza puede ser lisa, reticulada o estriada, y su color verde, amarillo, anaranjado o blanco. La pulpa también puede tener diversos colores y en la placenta, que puede ser seca, gelatinosa o acuosa en función de su consistencia, se encuentran las semillas (figura 2D).

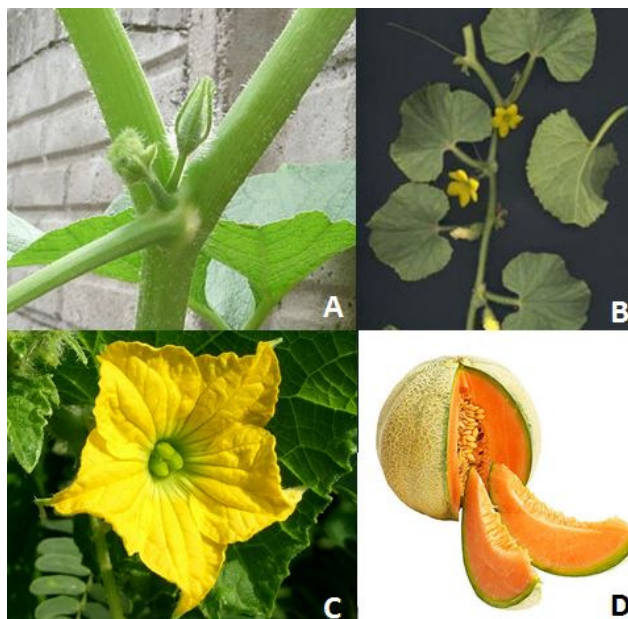


Figura 2. Algunos detalles morfológicos de la planta de melón. A) tallo, B) hoja, C) flor y D) fruto.

1.2. Importancia económica

En España, el pepino es una de las hortalizas más importantes desde un punto de vista económico. Es relevante en varias regiones españolas, siendo una especie cuyo valor agronómico reside en su producción estacional, lo que implica su cultivo protegido. La mayor superficie cultivada de esta especie se encuentra en las regiones de Andalucía, Murcia y Canarias (<http://www.magrama.gob.es>). La producción mundial en 2013 rondó los 71 millones de toneladas. Asia fue el continente con mayor producción (82,5%), siendo China el primer país en el ranking con 29 millones de toneladas. España, que no aparece en el ranking mundial de los 5 países más productores, tiene una producción anual de 754.400 toneladas. En 2013, España superó a México y se colocó como primer país exportador con 545.805 toneladas (<http://www.hortoinfo.es>).

El melón es la segunda especie (hortícola) más cultivada en España después del tomate. Se cultiva principalmente en Murcia, Castilla la Mancha y Andalucía (<http://faostat.fao.org>). En 2013, la producción mundial fue de unos 30 millones de toneladas. Más de la mitad de la producción mundial (sobre el 70%) se generó en Asia, y más concretamente en China, con una producción de en torno a 10,5 millones de toneladas. España ocupa el 5º lugar entre los países productores con 992.439 toneladas cada año. Respecto a las exportaciones, España fue en 2012 el líder en el ranking mundial con 376.103 toneladas. Este dato refleja la importancia económica de esta especie para nuestro país y la enorme demanda por parte del consumidor, tanto nacional como del exterior.

1.3. La regeneración *in vitro* de plantas de pepino y melón

La morfogénesis es un proceso que conduce a la regeneración de plantas a partir de células cultivadas *in vitro*. Fundamentalmente, la morfogénesis es el resultado de la división y diferenciación de células organizadas, con patrones definidos, y, básicamente, depende de la actividad y expresión de determinados genes (Handro & Floch, 1990). La regeneración de plantas *in vitro* se verifica mediante dos vías: la embriogénesis somática, a través de la formación de

estructuras de crecimiento bipolar (Mathews et al, 1993) y la organogénesis, a través de la formación de estructuras de crecimiento unipolar como yemas y brotes (Hossain et al, 1993)

Descrita por primera vez en 1958 en tejidos de zanahoria, la embriogénesis somática puede ser definida como el proceso de desarrollo a partir de células somáticas que conduce a la formación de estructuras de crecimiento bipolar semejantes a los embriones zigóticos. Dependiendo de la especie, se han empleado diversos tipos de explantes para la obtención de embriones somáticos. Así, por ejemplo en melón se han obtenido embriones somáticos a partir de explantes de cotiledón (Moreno et al, 1985; Tabei et al, 1991; Gray et al., 1993; Nuñez-Paleniús et al., 2008; Melara & Gatica Arias, 2009), hipocótilo (Moreno et al, 1985; Tebei et al, 1991), hoja (Tabei et al., 1991) y pecíolo (Tabei et al, 1991), así como a partir de embriones zigóticos (Ezura & Ooswa, 1994) y diversos tipos de protoplastos (García-Sogo, 1990; Li et al, 1990; Debejaujon & Branchard, 1992). En pepino se ha descrito embriogénesis somática a partir de cotiledón (Trulson & Shahin, 1986; Cade et al, 1990; Punja et al, 1990a; Ladyman & Girard, 1992; Lou and Kako, 1994, 1995; Lou et al, 1996; Hassanein, 2003; Mohiuddin et al, 2005; El-Zeiny, 2007; Usman et al, 2011), hipocótilo (Ziv & Gadasi, 1986), raíz (Trulson & Shanin, 1986), hoja (Punja et al., 1990a; Lou & Kako, 1994; Mashayekhi et al, 2008), pecíolo (Punja et al., 1990a; Mashayekhi et al., 2008), segmento internodal (Lou & Kako, 1994) y suspensiones celulares (Bergervoet et al, 1989).

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

En la familia Cucurbitaceae, se ha descrito la regeneración de plantas vía organogénesis a partir de segmentos de cotiledón de melón (Moreno et al, 1985; Orts et al, 1986, 1987; Trulson & Shahin, 1986; Mackay et al, 1989; Niedz et al, 1989; García-Sogo, 1990; Grisvard et al, 1990; Bordas et al, 1991; Chee, 1991a; Tabei et al, 1991; Fassuliotis & Nelson, 1992; Jain & More, 1992; Gray et al, 1993; Adelberg et al, 1994; Ficcadenti & Rotino, 1995; Molina & Nuez, 1995b; Nora et al, 2001; Mohiuddin et al, 2005; Núñez-Paleniús et al, 2006; Núñez-Paleniús et al, 2007; Rhimi et al, 2007; Melara & Gatica, 2009), pepino (Trulson & Shahin, 1986; Cade et al, 1990; Gambley & Dodd, 1990, 1991; Msikita et al, 1990; Punja et al, 1990a; Ali et al, 1991a,c; Colijn-Hooymans et al, 1994; Meng Zhang & Hongwen Cui, 2001; Mohiuddin et al, 2005; Zhu & Chen, 2005; Selvaraj et al, 2006; Selvaraj et al, 2007). También se han descrito organogénesis a partir de segmentos de hipocotilo de melón (Moreno et al, 1985; García-Sogo, 1990; Tabei et al, 1991) y pepino (Pagnussat et al, 2002; Mohiuddin et al, 2005; Tabassum et al, 2010). La organogénesis a partir de

hoja se ha descrito en melón (Orts et al, 1986; García-Sogo, 1990; Punja et al, 1990a; Tabei et al, 1991; Bordas et al, 1991; Molina & Nuez, 1996; Yadav et al, 1996) y en pepino también (Nadolska-Orcyk & Malepszy, 1989; Punja et al, 1990). Se ha publicado también organogénesis a partir de raíces de pepino (Trulson & Shahin, 1986) y melón (Kathal et al, 1994); a partir de pecíolos de melón (Punja et al, 1990a; Tabei et al, 1991) y pepino (Punja et al, 1990a); a partir de suspensiones celulares (Bergervoet et al, 1989) y ejes embriónicos de pepino (Msikita et al, 1990; Ali et al., 1991b), así como a partir de tallos (García-Sogo, 1990), epicotilos (Jain & More, 1992); y ápices caulinares (Adelberg et al, 1994) de melón. Más destacables aún han sido los casos en los que se ha conseguido la regeneración de plantas vía organogénesis a partir de protoplastos de melón (Moreno et al, 1985; García-Sogo, 1990; Li et al, 1990; Debeaujon & Branchard, 1992) y pepino (Trulson & Shahin, 1986; Colijn-Hoymans et al, 1988; García-Sogo et al, 1992).

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

Se han realizado muy pocos estudios sobre la base genética de la morfogénesis *in vitro*. En uno de estos estudios efectuados en melón, Molina & Nuez (1995b) concluyen que la respuesta organogénica podría estar determinada por un sistema oligogénico, posiblemente por dos genes mayores, aparte de otros muchos genes menores que podrían afectar al proceso en menor medida.

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

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

carbohidratos (Kim & Janick, 1989; Lou et al, 1996), la intensidad luminosa (Niedz et al, 1989; Gambley & Dodd, 1991) o la temperatura, (Niedz et al, 1989).

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

2. Antecedentes y Objetivos

Para abordar con éxito las técnicas de cultivo *in vitro* aplicadas a la mejora vegetal es necesario disponer de sistemas eficientes y reproducibles que permitan, en última instancia, la regeneración de plantas a partir del material de partida. Como resultado de los exhaustivos estudios sobre morfogénesis en pepino y melón, nuestro grupo había desarrollado métodos reproducibles que posibilitaban la regeneración de plantas a partir de callos procedentes de explantes primarios de ambas especies (García-Sogo, 1990; García-Sogo et al., 1991, Ellul et al., 1999). En esos estudios se había podido constatar que la adición de sulfato de cobre a concentraciones muy superiores a las habitualmente utilizadas (e.g. 1 mg/l) tiene un efecto muy favorable sobre la morfogénesis que se genera tanto en los explantes de melón (García-Sogo, 1990) como de pepino (García-Sogo et al., 2001). Aunque ya se dispone de sistemas de regeneración de plantas a partir de explantes de melón y pepino, la morfogénesis suele presentar como problema el escaso porcentaje de brotes bien desarrollados a partir de los callos organogénicos, o los cambios indeseables en el nivel de ploidía de los regenerantes. Además, en ocasiones el porcentaje de plántulas de partida de calidad es escaso porque el cultivar en cuestión presenta problemas de germinación o de contaminación endógena. Por estas razones, en este trabajo hemos querido avanzar en el conocimiento de los requerimientos culturales y morfogenéticos de cultivares de pepino y melón en aras de seleccionar los que, por ser más adecuados y eficientes, puedan ser útiles en futuros programas de mejora que precisen la utilización de las técnicas de cultivo *in vitro*.

En este marco general, los objetivos concretos planteados para esta Tesis Final de Máster han sido los siguientes:

1. Evaluar diferentes requerimientos culturales y morfogenéticos relacionados con la inducción de organogénesis adventicia en pepino.
2. Evaluar diferentes requerimientos culturales y morfogenéticos relacionados con la inducción de organogénesis adventicia en melón.
3. Evaluar las mejores condiciones de los distintos experimentos de morfogénesis sobre la eficacia de transformación genética en melón.

3. Materiales y Métodos

3.1. Material vegetal

Como material vegetal de partida se han utilizado semillas comerciales de la empresa Fitó de los cultivares de pepino (*Cucumis sativus* L.) Marketer y Largo Bellpuig (pepino Holandés) y del cultivar de melón (*Cucumis melo* L.) Cantaloup Charentais. Respecto a los cultivares de pepino, los frutos del cultivar Marketer son generalmente cilíndricos y de una longitud media. Su piel es lisa, verde y desprovista de pinchos. Largo Bellpuig es el típico pepino Holandés de frutos alargados que se conservan verdes hasta que se encuentran bien desarrollados. El cultivar de melón Cantalupo (Cantaloup Charentais) se caracteriza por desarrollar frutos redondos, más bien pequeños y de piel ligeramente asurcada.

3.2. Técnicas básicas de cultivo *in vitro*

3.2.1. Esterilización

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

3.2.2. Germinación y obtención de plántulas axénicas

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

las plántulas tiene lugar en una cámara de cultivo en condiciones de luz, temperatura y humedad controladas: fotoperiodo de 16 horas luz con una intensidad luminosa de 2000 luxes - equivalente a $34 \pm E/m^2/s$ - suministrada por una fuente de luz fría y una temperatura / humedad relativa de $26 \pm 2^\circ C / 40\%$ durante el periodo luminoso y $22 \pm 2^\circ C / 70\%$ durante el periodo oscuro.

3.2.3. Extracción y cultivo de explantes primarios

Entre los 2 y 7 días del inicio de la germinación, en función del estadio ontogénico elegido, se procede a la extracción de los explantes de cotiledón o hipocotilo. Típicamente, una vez separados los dos cotiledones de la plántula se eliminan los extremos y se divide en dos partes, la proximal (más cercana al ápice) y la distal (más alejada del ápice), obteniéndose 4 explantes por genotipo individual. En este trabajo hemos empleado también otros sistemas de corte que nos han permitido obtener de cada genotipo 6 explantes (i.e. 4 proximales y 2 distales, ver figura 7 de resultados y discusión, pag. 17), 8 explantes (i.e. 4 proximales y 4 distales, ver figura 10 de resultados y discusión, pag. 20) e incluso 16-20 explantes (ver figura 12 de resultados y discusión, pag. 21). Los explantes de hoja proceden de plantas axénicas de 20-25 días. Para la obtención de las plantas axénicas, el ápice o brote terminal de las plántulas se transfiere a recipientes de vidrio de 105 mm de altura x 95 mm de diámetro que contienen 50 ml de medio de enraizamiento (ver composición en el apartado 3.2.4., enraizamiento de los brotes). A los 20-25 días, las plantas han desarrollado 3-4 hojas verdaderas.

Una vez cortados, los explantes de cotiledón y de hoja se cultivan con el envés en contacto con el medio de cultivo, y las rodajas de hipocotilo manteniendo la polaridad. Para el cultivo de estos explantes se utilizan placas petri (90 mm de diámetro x 30 mm de altura) con 30 ml de medio de cultivo que se sellan con parafilm. Las condiciones de incubación son las descritas en el apartado 3.2.2.

3.2.4. Regeneración de plantas a partir de explantes primarios

a) Inducción de organogénesis

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

b) Enraizamiento de los brotes

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

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

El nivel de ploidía de las plantas se determina en fragmentos de hoja joven. El análisis se realiza mediante la cuantificación del contenido de ADN nuclear de las células según el método de Smulders et al. (1994). El tejido vegetal (un fragmento de cotiledón u hoja de aproximadamente 1 cm²) se trocea finamente con una cuchilla en una placa petri de 50mm de diámetro. Se añaden 2 gotas de tampón de extracción de núcleos (Partec, Münster, Germany) y 800 µL de una solución que contiene 1mg/L de fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2phenyl-indole) (DAPI staining solution, Partec) cuya función es teñir el ADN. Tras resuspender la mezcla, se filtra a través de una malla de nylon de 50 µm. La suspensión de núcleos se hace circular por el circuito de microtubos de un analizador de ploidía (Partec PA-II Ploidy Analyser), equipado con una lámpara de mercurio que emite luz ultravioleta de 366nm. La corriente de núcleos en suspensión pasa por una cámara de cuarzo (conducto de 10 µm que no permite el paso simultáneo de dos unidades), donde es iluminada por una fuente de luz ultravioleta. Como consecuencia, el fluorocromo DAPI fijado al ADN emite una fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN del núcleo, que es reconocida y captada por un fotorreceptor. El sistema informático que lleva incorporado el citómetro convierte cada señal fluorescente en un punto sobre la pantalla que se sitúa en distintas posiciones de acuerdo con su intensidad. El gráfico resultante ordena los datos según el contenido nuclear de ADN en el eje de abscisas y contabiliza el número de núcleos de cada tipo en el eje de ordenadas.

3.3. Nomenclatura y composición de los medios de cultivo

3.3.1. Nomenclatura de los medios de cultivo

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

3.3.2. Composición de los medios de cultivo

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

a) Medios de cultivo para la inducción de morfogénesis en pepino

La evaluación del estadio ontogénico del cotiledón y el tipo de explante se realizó en el medio NB 0.1/2.0, compuesto por el medio MB3 suplementado con 0,1 mg/L de ácido naftalenacético y 2 mg/L de 6-benciladenina.

Para la evaluación de los medios de cultivo se emplearon los medios NT 0.02/2.0, NZ 0.02/2.0, NB0.02/2.0 y NBZ 0.02/1.0/1.0, es decir, medios que contienen MB3 y como reguladores 0,02 mg/L de ácido naftalenacético y 2 mg/L de thidiazuron, 0,02 mg/L de ácido naftalenacético y 2 mg/L de zeatina, 0,02 mg/L de ácido naftalenacético y 2 mg/L de 6-benciladenina o 0,02 mg/L de ácido naftalenacético, 1 mg/L de 6-benciladenina y 1 mg/L de zeatina respectivamente.

Para la evaluación del soporte de cultivo se empleó el medio NB0.02/2.0, es decir, MB3 suplementado con 0,02 mg/L de ácido naftalenacético y 2 mg/L de 6-benciladenina.

Para la evaluación de los medios de cultivo con explantes de hoja se emplearon los medios NB 0.1/2.0 y NB0.02/2.0.

a) Medios de cultivo para la inducción de morfogénesis en melón

La evaluación del estadio ontogénico del cotiledón y el tipo de explante se realizó en el medio IB 0.2/2.0, compuesto por el medio MB3 suplementado con 0,2 mg/L de ácido indolacético y 2 mg/L de 6-benciladenina.

Para la evaluación de los medios de cultivo con explantes de cotiledón se emplearon los medios IT 0.05/2.0, IZ 0.05/2.0, IB 0.05/2.0 e IBZ 0.05/1.0/1.0, es decir, medios que contienen MB3 y como reguladores 0,05 mg/L de ácido indolacético y 2 mg/L de thidiazuron, 0,05 mg/L de ácido indolacético y 2 mg/L de zeatina, 0,05 mg/L de ácido indolacético y 2 mg/L de 6-benciladenina o 0,05 mg/L de ácido indolacético, 1 mg/L de 6-benciladenina y 1 mg/L de zeatina respectivamente.

Para la evaluación del soporte de cultivo se empleó el medio IB 0.05/2.0, es decir, MB3 suplementado con 0,05 mg/L de ácido indolacético.

Para la evaluación de los medios de cultivo con explantes de hoja se emplearon los medios IB 0.05/2.0 e IBZ 0.05/1.0/1.0.

3.4. Variables evaluadas en los experimentos de morfogénesis

En todos los experimentos de morfogénesis se ha evaluado el número de explantes que desarrollan callos con yema, o callos en los que, en el momento de la lectura, habían desarrollado brotes. Para la exposición de los resultados se ha utilizado la fórmula: $[(n^{\circ} \text{ de explantes con yema o brote} / n^{\circ} \text{ explantes totales}) \times 100]$. También se han utilizado dos índices: el índice de crecimiento desorganizado (índice CD) que trata de reflejar mediante un valor numérico el grado de crecimiento de callo desorganizado y el índice de crecimiento organogénico (índice ORG), que también mediante un valor numérico refleja el crecimiento de estructuras organogénicas. La estimación cualitativa de los índices CD y ORG a cada uno de los explantes se resume en la figura 3. Para la exposición de los resultados se ha calculado la media \pm error estándar.



Figura 3. Índices CD y ORG utilizados para estimar el crecimiento desorganizado y organizado de los callos.

Además, en los experimentos relacionados con el efecto del estadio ontogénico y del tipo de explante se ha determinado el peso de los explantes al final del periodo de cultivo, a fin de conocer si se producían diferencias significativas de peso en función del tamaño inicial del explante o de su estadio ontogénico. Los datos se han expresado como la media \pm error estándar.

3.5. Tratamiento estadístico

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

3.6. Transformación genética

El protocolo que se ha empleado para llevar a cabo los experimentos de transformación genética es básicamente el descrito en Atarés et al (2011). Se han utilizado explantes de cotiledón en estadios ontogénicos 2 y 3.

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

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

3.6.2. Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens se cultiva a partir de un inóculo glicerinado (mantenido en congelador a -80° C) en medio sólido selectivo LB (Maniatis et al., 1982) suplementado con 100 mg/L de kanamicina y 40 mg/L de rifampicina. Las colonias que crecen en este medio se utilizan de inóculo para el cultivo en medio LB líquido que se realiza en matraces adecuados para el cultivo de bacterias. Los matraces se tapan con algodón graso (o hidrofóbico) para favorecer la aireación y se incuban en oscuridad a 28° C en agitador orbital a 230 r.p.m. El 'caldo nutritivo' utilizado para el crecimiento bacteriano está suplementado con 100 mg/L de kanamicina y 40 mg/L de rifampicina. El medio líquido para la inoculación de los explantes se suplementa con 200 µM de acetosyringona (3'5'-dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone) esterilizada por microfiltración (Millipore 0,45 µm). La acetosyringona es una sustancia inductora de los genes *vir* en cepas productoras de octopina de *Agrobacterium tumefaciens* (Stachel et al., 1985).

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

Los explantes de cotiledón de plántulas en estadios ontogénicos 2 y 3 se sumergen durante 10 minutos en el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*. Tras la inoculación, los explantes se secan sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de bacterias y, a continuación, se colocan sobre un medio de cocultivo con el envés en contacto con el medio. El medio de cocultivo es el IB 0.05/2.0 (apartado 3.3.2) al que se le añade 200 µM acetosyringona. Las bacterias se incuban con el tejido durante 24-48 horas en oscuridad a 28° C, periodo durante el cual se va a producir la transferencia del T-DNA. Para la eliminación de la bacteria, los explantes se tratan durante 10-12 minutos con una solución líquida ajustada a un pH de 5,7 que contiene solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 20 g/L de sacarosa, 0,1 g/L de inositol, 0,001 g/L de T-CIH y 500 mg/L de cefotaxima (antibiótico utilizado para detener el crecimiento bacteriano). Tras el lavado, los explantes se secan sobre papel de filtro y se colocan sobre el medio IB 0.05/2.0 que contiene, además de los componentes descritos para el medio (apartado 3.3.2), 100 mg/L de kanamicina (antibiótico utilizado para la selección de células transgénicas) y 300 mg/L de cefotaxima (antibiótico utilizado para detener el crecimiento bacteriano). Los medios de cultivo se esterilizan por calor húmedo en autoclave, a 115° C durante 30 minutos. La kanamicina y cefotaxima se esterilizan por microfiltración (Millipore 0.45 µm) y se añaden al medio de cultivo en la cabina de flujo (condiciones de asepsia). Los explantes se cultivan en la cámara de cultivo bajo las condiciones de incubación descritas en el apartado 3.2.2. La combinación de reguladores del

medio IB 0.05/2.0 da lugar a la formación de callos que presentan zonas compactas de color verde en las que se desarrollan yemas, yemas-ápice y brotes. Se precisan varias transferencias al mismo medio selectivo para conseguir el desarrollo de ápices individualizables. Estas transferencias se realizan cada 2-3 semanas.

3.6.4. Enraizamiento de los brotes transgénicos

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

4. Resultados

4.1. Estudios relacionados con la respuesta morfogénica en pepino

4.1.1. Efecto del estadio ontogénico del cotiledón sobre la morfogénesis adventicia en explantes de cotiledón de pepino

El objetivo de este primer experimento era la identificación de los estadios ontogénicos que pudieran ser más adecuados para la morfogénesis en dos variedades de pepino (i.e. Marketer y Holandes). Previamente, habíamos comprobado que los porcentajes de germinación en las dos variedades giraban en torno al 80% y que las semillas no presentaban problemas relacionados con contaminación endógena.

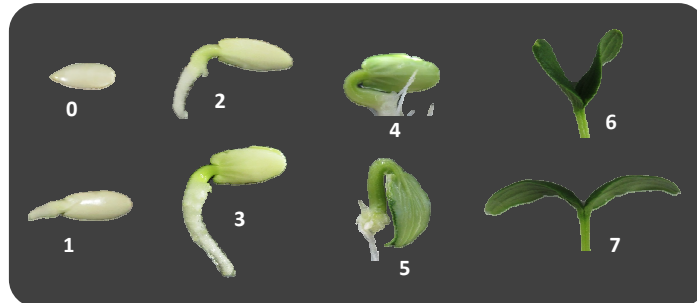


Figura 4. Diferentes estadios ontogénicos del cotiledón.

Para llevar a cabo el experimento, se utilizaron explantes de cotiledón y se estudiaron los siguientes estadios ontogénicos: **estadio 2**, en el cual los cotiledones son aún de color crema; **estadio 3**, los cotiledones comienzan adquirir tonalidades verdosas; **estadio 4**, los cotiledones tienen un color algo más verde pero aún permanecen unidos; y **estadio 5**, los cotiledones son de color verde claro por el envés pero aún se mantienen unidos (ver figura 4). Para el cultivo de los explantes se utilizó el medio de cultivo NB 0.1/2.0 ya empleado previamente en nuestro laboratorio y que está compuesto por la combinación de la auxina ácido naftalen-acético y la citoquinina 6 benciladenina (ver Materiales y Métodos, página 11).

Como se puede ver en la tabla 1, los mejores resultados en Marketer se obtienen empleando cotiledones en el estadio ontogénico 2. En este estadio de desarrollo, los explantes exhiben tanto un mayor índice de callo organogénico como un mayor porcentaje de callos con yema (tabla 1, figura 5). Conviene indicar que en los estadios 3 y 4 también se obtiene una buena respuesta en relación con estas variables. En el estadio 5, por el contrario, la calidad organogénica disminuye

significativamente y tan sólo el 14% de los callos posee yemas. Respecto al porcentaje de explantes con brotes, en el momento en el que se realizó la lectura del experimento, en los estadios 2 y 4 aún no se había producido la conversión de las yemas en estructuras tipo ápice (lo que en nuestro laboratorio denominamos yema-ápice), y por esa razón en estos estadios no aparece ningún valor. En cualquier caso, cabe esperar que, a lo largo del tiempo, el estadio ontogénico 2 proporcione la regeneración de un mayor número de plantas ya que tanto el índice organogénico de los explantes como el porcentaje de explantes con yema son mayores.

Tabla 1. Efecto del estadio ontogénico sobre el crecimiento y la morfogénesis de callos procedentes de explantes de cotiledón de pepino Marketer. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).

Estadio	Peso fresco (g)	Índice CD	Índice ORG	Yemas (%)	Brotes (%)
2	1,11 ± 0,07 ^(a)	1,56 ± 0,17 ^(a)	0,81 ± 0,18 ^(a)	55,55 ± 9,57 ^(a)	-
3	1,12 ± 0,07 ^(a)	1,81 ± 0,15 ^(a)	0,56 ± 0,15 ^(a)	37,04 ± 9,29 ^(ab)	7,41 ± 5,04 ^(a)
4	0,64 ± 0,04 ^(b)	0,75 ± 0,14 ^(b)	0,53 ± 0,11 ^(a)	44,44 ± 8,27 ^(a)	-
5	0,79 ± 0,05 ^(b)	1,04 ± 0,16 ^(b)	0,15 ± 0,07 ^(b)	14,81 ± 6,83 ^(b)	3,07 ± 3,32 ^(a)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de la callo organogénico (0 a 3), ver materiales y Métodos, pág. 12.

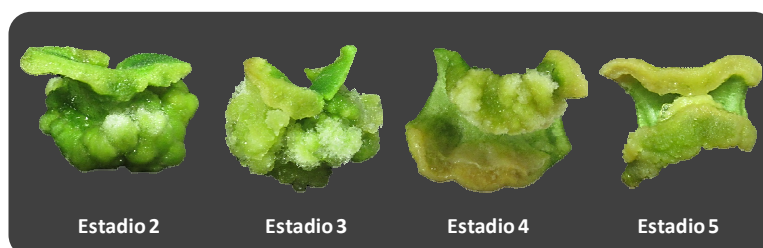


Figura 5. Respuesta morfogénica en explantes de cotiledón de pepino Marketer.

Por lo que respecta al pepino Holandés, los mejores resultados también se obtienen utilizando el estadio ontogénico 2, aunque la calidad organogénica en los explantes de plántulas en estadio ontogénico 3 son muy similares (tabla 2). Sin embargo, el desarrollo de callo desorganizado en los explantes en estadio 3 fue considerablemente mayor que en los explantes en estadio 2, y este tipo de crecimiento afecta negativamente a la regeneración de plantas con el paso del tiempo (ver figura 6).

Tabla 2. Efecto del estadio ontogénico sobre el crecimiento y la morfogénesis de callos procedentes de explantes de cotiledón de pepino Holandés. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).

Estadio	Peso fresco (g)	Índice CD	Índice ORG	Yemas (%)	Brotes (%)
2	0,94 ± 0,13 ^(a)	0,73 ± 0,18 ^(b)	1,18 ± 0,17 ^(a)	86,36 ± 9,29 ^(a)	36,36 ± 6,03 ^(a)
3	1,16 ± 0,11 ^(a)	1,07 ± 0,14 ^(ab)	1,27 ± 0,20 ^(a)	70,00 ± 8,36 ^(ab)	33,33 ± 5,77 ^(ab)
4	0,97 ± 0,11 ^(a)	0,88 ± 0,16 ^(ab)	0,65 ± 0,12 ^(b)	68,18 ± 8,25 ^(b)	11,54 ± 3,39 ^(b)
5	0,98 ± 0,11 ^(a)	1,36 ± 0,27 ^(a)	0,43 ± 0,14 ^(b)	42,85 ± 6,54 ^(b)	7,14 ± 2,67 ^(b)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de la callo organogénico (0 a 3), ver materiales y Métodos, pág. 12.

De nuevo, y tal y como ocurría en pepino Marketer, la calidad de la morfogénesis de explantes procedentes de plántulas en estadio ontogénico 5 disminuye considerablemente. Así, el índice organogénico en el estadio 5 es casi 3 veces menor que en el estadio 2, el porcentaje de explantes con yemas se reduce a la mitad y el porcentaje de explantes con brotes es 5 veces menor (figura 6).

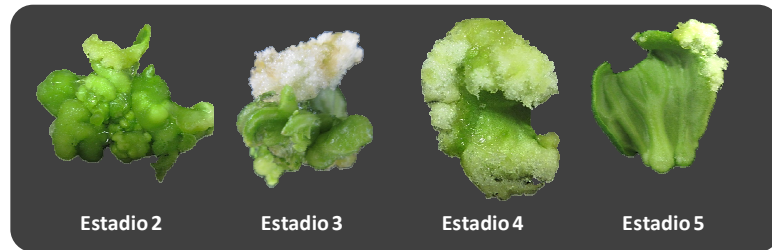


Figura 6. Respuesta morfofenética en explantes de cotiledón de pepino Holandés

Respecto a este primer experimento concluimos que, en explantes de cotiledón, los estadios 2 y 3 son los que proporcionan mayor calidad morfofenética. Además, la calidad morfofenética en explantes de cotiledón de la variedad pepino Holandés es mejor que la que se obtiene a partir de explantes de pepino Marketer.

4.1.2. Efecto del tipo de explante sobre la morfofenesis adventicia de pepino

En el segundo experimento decidimos evaluar la calidad de la morfofenesis en diferentes tipos de explante. En la figura 7 se muestran los explantes que se evaluaron, en concreto explantes de hipocotilo (varias secciones de 1-2 mm), explantes de cotiledón distal y explantes de cotiledón proximal (2 explantes de cada cotiledón seccionado longitudinalmente).

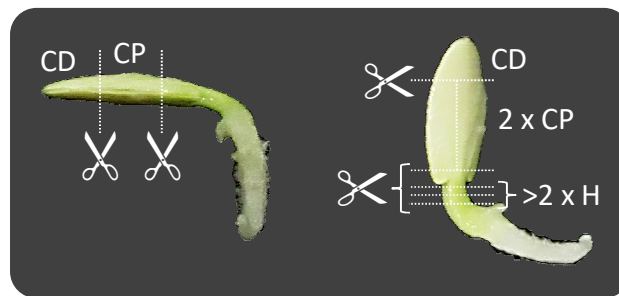


Figura 7. Detalle de los diferentes tipos de explante que se utilizaron en el experimento. De cada planta se podían extraer más de 2 secciones de hipocotilo (H), 2 explantes de cotiledón distal (CD) y 4 (2 de cada cotiledón) explantes de cotiledón proximal (CP).

Sobre la base de los resultados del anterior experimento (apartado 4.1.1.) se utilizaron principalmente cotiledones procedentes de plántulas en estadio ontogénico 2. Con todo, en algún ensayo se utilizaron también explantes de plántulas en estadio ontogénico 1 (ver figura 4). Además, dado el incremento de tamaño que experimentan, los explantes de cotiledón (tanto distal como proximal) se recortaron por zonas que no exhibían respuesta morfofenética a las 72 horas del cultivo. Este mismo procedimiento se llevó a cabo a los 25 días con algunos explantes (explantes B) para comparar su comportamiento en lo que respecta a la calidad morfofenética respecto a los que no se diseccionaban en este momento (explantes A). Para el cultivo de los explantes se utilizó el mismo medio de cultivo del anterior experimento (ver Materiales y Métodos, página 11).

Como se puede ver en la tabla 3, en pepino Marketer los explantes de hipocotilo no desarrollaron estructuras morfofenéticas, tan sólo hubo crecimiento de callo desorganizado. Tampoco generaron morfofenesis los explantes de cotiledón distal que no habían sido recortados a los 25 días de cultivo, tan sólo, al igual que ocurría con los de hipocotilo, generaron crecimiento desorganizado. Sí que desarrollaron estructuras de tipo organogénico los explantes de cotiledón distal que fueron recortados tras 25 días de cultivo, muy probablemente consecuencia de eliminar

las partes del explante que no son las más adecuadas para desarrollar morfogénesis, lo que permite exponer las más adecuadas para este tipo de crecimiento.

Tabla 3. Efecto del tipo de explante sobre el crecimiento y la morfogénesis de callos de pepino Marketer. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).

Morfogénesis en explantes de hipocotilo					
Estadio	Peso fresco (g)	Índice CD	Índice ORG	Yemas (%)	Brotes (%)
1	0,11 ± 0,04 ^(a)	1,00 ± 0,00 ^(a)	0,00 ± 0,00 ⁽⁻⁾	0,00 ± 0,00 ⁽⁻⁾	0,00 ± 0,00 ⁽⁻⁾
2	0,16 ± 0,02 ^(a)	1,08 ± 0,08 ^(a)	0,00 ± 0,00 ⁽⁻⁾	0,00 ± 0,00 ⁽⁻⁾	0,00 ± 0,00 ⁽⁻⁾
Morfogénesis en explantes de cotiledón distal					
Estadio	Peso fresco (g)	Índice CD	Índice ORG	Yemas (%)	Brotes (%)
A 1	0,72 ± 0,06 ^(a)	1,70 ± 0,15 ^(a)	0,00 ± 0,00 ^(b)	0,00 ± 0,00 ^(b)	0,00 ± 0,00 ⁽⁻⁾
A 2	0,62 ± 0,04 ^(a)	1,50 ± 0,11 ^(a)	0,00 ± 0,00 ^(b)	0,00 ± 0,00 ^(b)	0,00 ± 0,00 ⁽⁻⁾
B 2	0,48 ± 0,04 ^(b)	1,57 ± 0,15 ^(a)	0,24 ± 0,10 ^(a)	23,81 ± 9,29 ^(a)	0,00 ± 0,00 ⁽⁻⁾
Morfogénesis en explantes de cotiledón proximal					
Estadio	Peso fresco (g)	Índice CD	Índice ORG	Yemas (%)	Brotes (%)
A 1	0,68 ± 0,05 ^(a)	1,07 ± 0,13 ^(a)	0,36 ± 0,13 ^(b)	42,86 ± 13,23 ^(ab)	21,43 ± 10,97 ^(a)
A 2	0,74 ± 0,05 ^(a)	1,06 ± 0,10 ^(a)	0,45 ± 0,13 ^(b)	35,48 ± 8,59 ^(b)	25,58 ± 7,51 ^(a)
B 1	0,68 ± 0,10 ^(a)	0,94 ± 0,19 ^(a)	0,88 ± 0,18 ^(a)	68,75 ± 11,59 ^(a)	43,75 ± 12,40 ^(a)
B 2	0,69 ± 0,04 ^(a)	0,82 ± 0,09 ^(a)	0,52 ± 0,12 ^(ab)	42,42 ± 8,60 ^(ab)	18,18 ± 6,71 ^(a)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de la callo organogénico (0 a 3), ver materiales y Métodos, pág. 12. Explante A = no se recorta para disminuir su tamaño a los 25 días de cultivo. Explante B = se recorta a los 25 días.

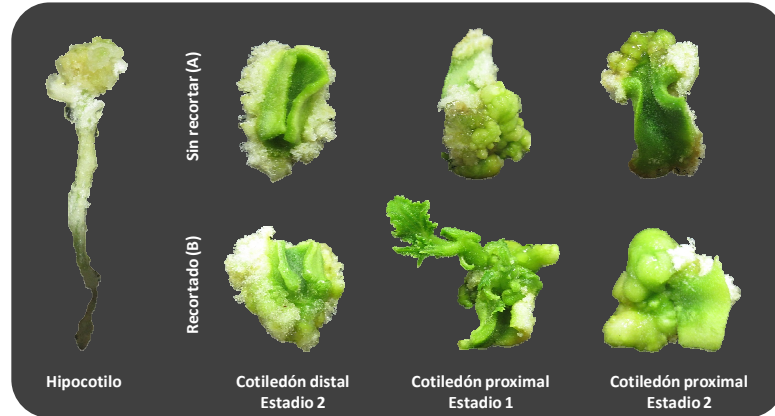


Figura 8. Detalle de la morfogénesis en explantes de hipocotilo o cotiledón de pepino Marketer dependiendo del estadio de desarrollo, el tipo de explante cotiledonario (distal o proximal) y si se han o no recortado.

Sin duda, los explantes más adecuados para fomentar la morfogénesis son los de la zona proximal del cotiledón. En este tipo de explantes se obtiene una adecuada morfogénesis tanto en explantes en estadio ontogénico 1 como en el estadio ontogénico 2, aunque la respuesta fue mayor en el estadio 1 (tabla 3). Asimismo, realizar recortes de las estructuras no morfogenéticas en los explantes a los 25 días de cultivo (explantes B) mejora la aptitud morfogenética. Así, en todos los casos, el índice de callo desorganizado (índice CD) es menor en todos los explantes de tipo B, mientras que el índice de callo organogénico (índice ORG) es mayor en este tipo de explantes en comparación con los de tipo A (tabla 3).

En pepino Holandés los resultados son diferentes. En primer lugar y a diferencia de lo que ocurre en Marketer, los explantes de hipocotilo fueron capaces de desarrollar estructuras organogénicas (tabla 4). También generaron morfogénesis los explantes de cotiledón distal que no se recortaron a los 25 días de cultivo (explantes A). Por otro lado, en pepino Holandés parece que el estadio ontogénico 2 fue más adecuado que el 1. Además, entre explantes de tipo A y B no existen diferencias tan claras con el caso de Marketer. De hecho, se obtuvo mayor morfogénesis en los explantes de cotiledón distal que no fueron recortados (tipo A) respecto a los que sí que lo fueron; y en el caso del cotiledón proximal la morfogénesis fue muy similar en ambos tipos de explantes. En definitiva, en pepino Holandés no es necesario recortar los explantes a los 25 días de cultivo para potenciar la morfogénesis, lo que supone un ahorro de tiempo considerable.

Tabla 4. Efecto del tipo de explante sobre el crecimiento y la morfogénesis de callos de pepino Holandés. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).

Morfogénesis en explantes de hipocotilo					
Estadio	Peso fresco (g)	Índice CD	Índice ORG	Yemas (%)	Brotos (%)
1	0,27 ± 0,04 ^(a)	1,27 ± 0,14 ^(b)	0,00 ± 0,00 ^(b)	0,00 ± 0,00 ^(b)	0,00 ± 0,00 ^(b)
2	0,54 ± 0,13 ^(a)	1,85 ± 0,19 ^(a)	0,31 ± 0,13 ^(a)	30,77 ± 12,80 ^(a)	15,38 ± 10,00 ^(a)
Morfogénesis en explantes de cotiledón distal					
Estadio	Peso fresco (g)	Índice CD	Índice ORG	Yemas (%)	Brotos (%)
A 1	0,90 ± 0,21 ^(ab)	1,17 ± 0,17 ^(a)	0,00 ± 0,00 ^(b)	0,00 ± 0,00 ^(b)	0,00 ± 0,00 ^(b)
A 2	1,00 ± 0,11 ^(a)	1,11 ± 0,16 ^(a)	0,11 ± 0,08 ^(a)	11,11 ± 7,41 ^(a)	11,11 ± 7,41 ^(a)
B 2	0,58 ± 0,06 ^(b)	0,96 ± 0,08 ^(a)	0,04 ± 0,04 ^(a)	4,34 ± 4,25 ^(a)	4,34 ± 4,25 ^(a)
Morfogénesis en explantes de cotiledón proximal					
Estadio	Peso fresco (g)	Índice CD	Índice ORG	Yemas (%)	Brotos (%)
A 2	1,00 ± 0,09 ^(a)	0,97 ± 0,10 ^(a)	0,71 ± 0,11 ^(a)	64,52 ± 8,59 ^(a)	61,29 ± 8,75 ^(a)
B 2	0,91 ± 0,07 ^(a)	1,09 ± 0,15 ^(a)	0,80 ± 0,09 ^(a)	74,29 ± 7,39 ^(a)	71,43 ± 7,64 ^(a)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de la callo organogénico (0 a 3), ver materiales y Métodos, pág. 12. Explante A = no se recorta para disminuir su tamaño a los 25 días de cultivo. Explante B = se recorta a los 25 días.

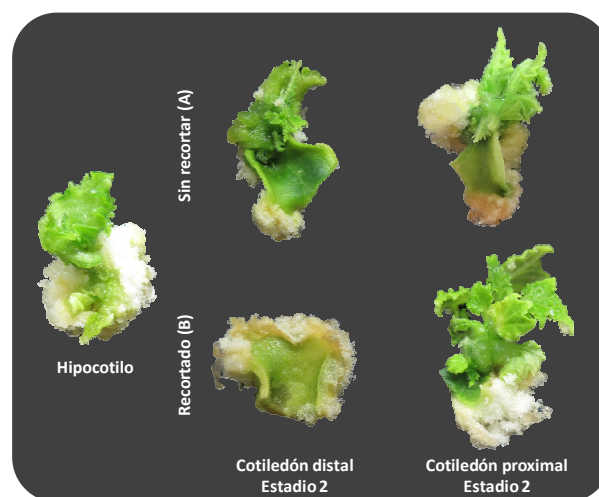


Figura 9. Detalle de la morfogénesis en diferentes tipos de explante de pepino Holandés dependiendo del estadio de desarrollo, el tipo de explantes (distal o proximal) y si se han o no recortado.

Por tanto, y por lo que respecta al segundo experimento, concluimos que los explantes proximales de cotiledón son los más adecuados para inducir estructuras de tipo morfogenético. Respecto a las dos variedades (i.e. Marketer y Holandés), los resultados obtenidos en los dos experimentos (efecto del estadio ontogénico y del tipo de explante) indican que la variedad Holandés es más morfogenética que Marketer. Es por ello que en los siguientes experimentos se empleó sólo la variedad Holandés.

4.1.3. Efecto del medio de cultivo sobre la morfogénesis adventicia en mini-explantes de pepino

El objetivo del tercer experimento fue evaluar el efecto de diferentes combinaciones de regulares del desarrollo sobre la morfogénesis de callos procedentes de explantes de cotiledón de plántulas en estadio ontogénico 2. Habida cuenta de que esta variedad de pepino exhibía respuesta morfogenética en la zona distal del cotiledón, decidimos emplear tanto explantes de cotiledón proximal como de cotiledón distal. Además, como los explantes experimentaban un considerable aumento de tamaño a los pocos días de ser cultivados, lo que obliga a recortarlos (ver apartado 4.1.2), decidimos utilizar explantes de menor calibre. En concreto, de cada plántula podíamos extraer 8 explantes, 4 de la región proximal de los cotiledones y otros 4 de la región distal (figura 10).

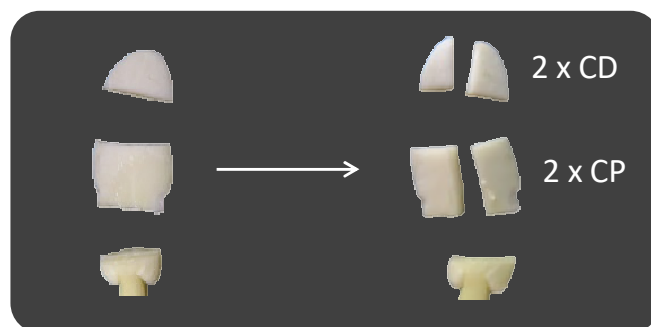


Figura 10. Detalle de los explantes que se utilizaron en el experimento. Cada cotiledón se disecciona en explantes, 2 de la zona proximal (CP) y otros dos de la distal (CD), de manera que de cada plántula se pueden extraer 8 explantes.

Se utilizaron 4 medios de cultivo que combinaban la auxina ácido naftalen-acético (N) con diferentes citoquininas, a saber, thidiazuron (T), zeatina (Z), 6-benciladenina (B). En concreto, los medios empleados fueron: NT, NZ, NB y NBZ. Todos los medios estaban suplementados con la misma concentración de auxina (0.02 mg/l), mientras que por lo que respecta a la citoquinina, los medios NT y NZ llevaban 1 mg/l de citoquinina mientras que en el medio NB llevaba 2 mg/l. El medio NBZ llevaba 1 mg/l de cada citoquininas.

Tabla 5. Efecto del medio de cultivo sobre la morfogénesis de callos procedentes de explantes de cotiledón de pepino Holandés. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).

Estadio	Medio de cultivo	Índice CD	Índice ORG	Yemas (%)
2	NT	0,00 ± 0,00 ^(c)	0,00 ± 0,00 ^(c)	0,00 ± 0,00 ^(c)
2	NZ	0,00 ± 0,00 ^(c)	0,20 ± 0,05 ^(b)	20,31 ± 5,03 ^(b)
2	NB	0,30 ± 0,06 ^(b)	0,86 ± 0,06 ^(a)	81,25 ± 4,88 ^(a)
2	NBZ	0,95 ± 0,07 ^(a)	0,31 ± 0,06 ^(b)	31,25 ± 5,79 ^(b)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de la callo organogénico (0 a 3), ver materiales y Métodos, pág. 12.

Como se puede ver en la tabla 5 y en la figura 11, los mejores resultados se obtuvieron con la combinación de auxina y benciladenina. La combinación de auxina y thidiazuron no dio lugar a ningún tipo de crecimiento y, por lo que respecta a las combinaciones que llevaban zeatina, los resultados indicaban que esta citoquinina no es la más adecuada para generar morfogénesis de calidad en esta variedad de pepino (figura 11). De hecho, la morfogénesis en el medio con la combinación de zeatina y benciladenina es mayor que cuando se emplea sólo zeatina, muy probablemente por el efecto beneficioso de la benciladenina (tabla 5, figura 11).

Conviene indicar que durante la lectura del experimento no se tuvo en cuenta la procedencia del explante (proximal o distal) ya que lo que queríamos ver era qué medio de cultivo podía ser más adecuado. Con todo, pudimos apreciar que, en general, la morfogénesis de los explantes proximales era más profusa y de mayor calidad que la de los distales.



Figura 11. Respuesta morfogénica en explantes de cotiledón de pepino Holandés cultivados en medios que combinan auxina (NAA) con thidiazuron (NT), zeatina (NZ), benciladenina (NB) y benciladenina más zeatina (NBZ).

Este experimento nos permite concluir que la benciladenina parece ser la citoquinina más adecuada para generar morfogénesis en los explantes de cotiledón de la variedad Holandés.

4.1.4. Efecto del soporte de cultivo sobre la morfogénesis adventicia en mini-explantes y micro-explantes de pepino

El objetivo de este experimento fue evaluar qué efecto podría tener otro soporte de cultivo que no fuera agar sobre la respuesta morfogénica en pepino. En algunos experimentos que se habían realizado en el laboratorio con otras especies se había visto que el cultivo de explantes sobre medio líquido proporcionaba unos resultados que había que tener en cuenta. Se había visto también que en este sistema de cultivo (i.e. medio líquido) se podían cultivar explantes de muy pequeño calibre. Por ello, decidimos evaluar la respuesta morfogénica de mini-explantes y de micro-explantes sobre medio líquido. Como medio de cultivo se empleó el suplementado con ácido naftalen-acético y 6-benciladenina (ver apartado 4.1.3). A los 25 días se evaluó el crecimiento y la morfogénesis de los explantes.

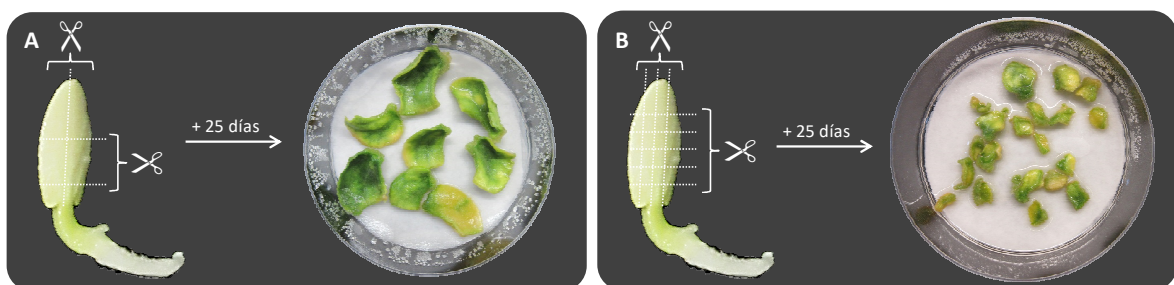


Figura 12. Detalle de la obtención de los miniexplantes (A) y microexplantes (B) y del sistema de cultivo que se empleó. De cada planta se obtienen 8 mini-explantes (A) o 16-20 micro-explantes (B).

A los pocos días se observó que los explantes aumentaban considerablemente de tamaño y adquirirían el color verde característico del cotiledón. Con el paso del tiempo (i.e. 15-25 días), el color de los explantes tornaba a amarillento por algunas zonas del mismo y sufrían procesos de hiperhidratación (figura 12). Salvo en algunos casos, no se observó crecimiento de callo organizado, probablemente consecuencia del proceso de hiperhidratación. Comoquiera que los resultados no fueron realmente los esperados, decidimos no evaluar parámetros relacionados con el crecimiento de callo.

Este experimento nos permite concluir que el medio líquido durante periodos prolongados de cultivo no es adecuado para inducir morfogénesis en explantes de cotiledón de pepino. En nuestra opinión, el principal problema está relacionado con la hiperhidratación de los explantes, que influye de manera negativa sobre la morfogénesis. Sin embargo, pensamos que el uso de micro-explantes mediante este sistema podría ser válido si fuéramos capaces de paliar los problemas de hiperhidratación. Actualmente estamos trabajando en un sistema que combina el cultivo en medio líquido, a lo largo de los primeros días de cultivo de los microexplantes, con el cultivo medio sólido en etapas posteriores.

4.1.4. Efecto del medio de cultivo sobre la morfogénesis adventicia en explantes de hoja de planta axénica de pepino

En este experimento se evaluó la morfogénesis a partir de explantes de hoja en dos medios de cultivo. En concreto, se emplearon dos medios que combinaban 6-benciladenina (B) a la misma concentración (2.0 mg/l) con diferentes concentraciones de la auxina ácido naftalen-acético (N), en concreto 0.1 y 0.02 mg/l. Estos medios se habían empleado previamente en experimentos con explantes de cotiledón y fueron los que mejor respuesta ofrecieron (ver resultados en los apartados 4.1.1 y 4.1.2 para el medio suplementado con 0.1 mg/l de ácido naftalen-acético, y en el apartado 4.1.3 para el medio suplementado con 0.02 mg/l de ácido naftalen-acético). También se comprobó si existían diferencias en cuanto a la calidad de la respuesta morfogénica en función de utilizar la primera hoja verdadera expandida (más cercana al ápice y, por tanto, más joven) o la segunda y tercera hoja (tabla 6, 1ª o 2ª y 3ª) como material de partida.

Tabla 6. Efecto del medio de cultivo sobre la morfogénesis de callos procedentes de explantes de hoja de pepino Holandés. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).

Medio de cultivo	Hoja	Índice CD	Índice ORG	Yemas (%)	Brotes (%)
NB 0.1	1ª	0,61 ± 0,15 ^(a)	0,28 ± 0,14 ^(bc)	27,78 ± 13,51 ^(b)	0,00 ± 0,00 ^(b)
	2ª y 3ª	0,12 ± 0,02 ^(c)	0,10 ± 0,02 ^(c)	10,23 ± 2,07 ^(b)	0,00 ± 0,00 ^(b)
NB 0.02	1ª	0,43 ± 0,11 ^(a)	0,57 ± 0,11 ^(ab)	56,52 ± 10,33 ^(a)	0,00 ± 0,00 ^(b)
	2ª y 3ª	0,21 ± 0,03 ^(b)	0,72 ± 0,06 ^(a)	57,93 ± 4,10 ^(a)	2,07 ± 1,18 ^(a)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de la callo organogénico (0 a 3), ver materiales y Métodos, pág. 12. En la tabla, 0.1 o 0.02 tras la nomenclatura NB indica la concentración de auxina ácido naftalen-acético que diferencia a ambos medios de cultivo.

Como se puede ver tanto en la tabla 6 como en la figura 13, se obtienen mejores resultados en el medio con menor concentración de ácido naftalen-acético (i.e. 0.02 mg/l). Así, tanto la calidad organogénica como el porcentaje de explantes con yema son mayores (ver índice ORG y % yemas en tabla 6). En comparación con los resultados obtenidos con explantes de cotiledón, los explantes de hoja dieron lugar a una similar proliferación de callo desorganizado aunque el porcentaje de explantes con yema fue menor. Aún así, no se puede descartar este tipo de explante para la regeneración de plantas por la vía organogénica ya que los resultados son más que aceptables.

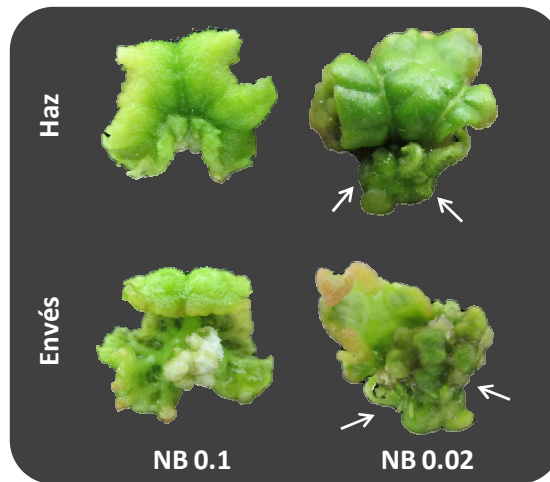


Figura 13. Respuesta morfogénica en explantes de hoja de pepino Holandés cultivados en medios que combinan diferentes concentraciones de ácido naftalen-acético (0.1 mg/l y 0.02 mg/l) con benciladenina (NB). Las flechas indican las zonas de mayor calidad morfogénica.

El experimento nos permite concluir que los explantes de hoja procedentes de plantas axénicas de pepino Holandés generan una respuesta morfogénica aceptable en medios en los que se combina ácido naftalen-acético con benciladenina. En este sentido, menores concentraciones de la auxina parece que favorecen la calidad global de la morfogénesis.

4.2. Estudios relacionados con la respuesta morfogénica en melón

4.2.1. Efecto del estadio ontogénico y del tipo de explante sobre la morfogénesis adventicia en explantes de cotiledón de melón

El primer experimento fue la identificación de los estadios ontogénicos más adecuados para la morfogénesis en tres variedades de melón (i.e. Galia, Piel de Sapo y Cantalupo). Previamente, quisimos saber si los lotes de semilla de estas variedades germinaban adecuadamente y no generaban problemas de contaminación endógena. Pudimos comprobar que la germinación de las variedades Galia y Piel de Sapo, ambas de la casa comercial Rucalba, era deficiente e incluso, en la mayor parte de los casos, anómala (figura 14).



Figura 14. Germinación anómala en semillas de melón Galia y Piel de Sapo

Por tanto, teniendo en cuenta que la germinación de la variedad Cantalupo era de un 60%, decidimos realizar todos experimentos con esta línea ya que era, con diferencia, la mejor de las tres. Para la evaluación de los estadios ontogénicos se utilizaron explantes de hipocotilo, cotiledón distal y cotiledón proximal (ver figura 7 del apartado 4.1.2) de plántulas en **estadio 2** (los cotiledones son de color crema) y **estadio 3** (los cotiledones comienzan adquirir tonalidades verdes). El cultivo de los explantes se realizó en el medio de cultivo IB 0.2/2.0 ya empleado previamente en nuestro laboratorio y que está compuesto por la combinación de la auxina ácido indol-acético y la citoquinina 6 benciladenina (ver Materiales y Métodos, página 12).

Tabla 7. Efecto del estadio ontogénico sobre el crecimiento y la morfogénesis de callos procedentes de explantes de cotiledón de melón Cantalupo. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).

Morfogénesis en explantes de hipocotilo					
Estadio	Peso fresco (g)	Índice CD	Índice ORG	Yemas (%)	Brotes (%)
2	0,48 ± 0,07 ^(a)	1,92 ± 0,21 ^(a)	0,23 ± 0,12 ^(a)	23,08 ± 11,69 ^(a)	7,69 ± 7,39 ^(a)
3	0,66 ± 0,07 ^(a)	1,92 ± 0,18 ^(a)	0,23 ± 0,12 ^(a)	23,08 ± 11,69 ^(a)	0,00 ± 0,00 ^(b)
Morfogénesis en explantes de cotiledón distal					
Estadio	Peso fresco (g)	Índice CD	Índice ORG	Yemas (%)	Brotes (%)
2	1,10 ± 0,11 ^(b)	0,64 ± 0,13 ^(a)	1,32 ± 0,09 ^(a)	100 ± 0,00 ^(a)	75,00 ± 8,18 ^(a)
3	1,74 ± 0,24 ^(a)	0,82 ± 0,16 ^(a)	1,41 ± 0,11 ^(a)	100 ± 0,00 ^(a)	68,18 ± 9,39 ^(a)
Morfogénesis en explantes de cotiledón proximal					
Estadio	Peso fresco (g)	Índice CD	Índice ORG	Yemas (%)	Brotes (%)
2	1,05 ± 0,15 ^(a)	0,23 ± 0,12 ^(a)	1,62 ± 0,20 ^(a)	100 ± 0,00 ^(a)	92,31 ± 7,39 ^(a)
3	1,69 ± 0,30 ^(a)	0,56 ± 0,18 ^(a)	1,44 ± 0,20 ^(a)	100 ± 0,00 ^(a)	77,78 ± 13,86 ^(a)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de la callo organogénico (0 a 3), ver materiales y Métodos, pág. 12.

Los resultados revelaron que la aptitud morfogénica de esta variedad de melón es excelente en los estadios ontogénicos 2 y 3. Incluso en los explantes de hipocotilo se obtiene respuesta a la organogénesis, aunque tal y como sucedía en pepino, no es el mejor tipo de explante para este propósito. De hecho, en este tipo de explante el crecimiento de callo desorganizado es muy alto, lo que va en detrimento del crecimiento de callo organizado (tabla 7, figura 15). Por lo que respecta a los explantes de cotiledón, la capacidad morfogénica tanto de la zona proximal como distal es excepcional. Así, todos los explantes generaron estructuras tipo yema, y 25 días después del cultivo de los explantes, que es cuando se realizó la lectura del experimento, un porcentaje muy elevado de estas se encontraba en un estadio que auguraba la regeneración de brotes (ver % brotes en tabla 7). Con todo, el explante proximal de cotiledón generó menos callo desorganizado y más callo organogénico (ver índices CD y ORG en tabla 7 y figura 15). Por lo que se refiere al estadio ontogénico, no existen claras diferencias entre los dos que se evaluaron, aunque en los explantes en estadio 2 se obtuvo una mejor respuesta, toda vez que los explantes de plántulas en este estadio ontogénico generaban menos callo desorganizado y más callo organogénico (ver índices CD y ORG en tabla 7).



Figura 15. Detalle de la morfogénesis en explantes de hipocotilo o cotiledón de melón cantalupo dependiendo del estadio de desarrollo y el tipo de explante cotiledonario (distal o proximal).

Respecto a este primer experimento se puede concluir que en melón cantalupo se pueden utilizar explantes de cotiledón distal y proximal de plántulas en estadios ontogénicos 2 o 3, ya que la respuesta morfogénica de estos explantes en los estadios citados es excepcional.

4.2.2. Efecto del medio de cultivo sobre la morfogénesis adventicia en mini-explantes de melón

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de diferentes combinaciones de reguladores del desarrollo sobre la morfogénesis de callos procedentes de explantes de cotiledón de plántulas en estadio ontogénico 2. Habida cuenta de los resultados del anterior experimento, decidimos emplear tanto explantes de cotiledón proximal como de cotiledón distal. Al igual que ocurre en pepino, los explantes experimentaban un considerable aumento de tamaño a los pocos días de ser cultivados, obligándonos a recortarlos. Por ello, decidimos utilizar explantes de menor calibre. En concreto, de cada cotiledón se obtuvieron 4 explantes, dos de la zona proximal y dos de la distal (ver figura 10, apartado 4.1.3).

Se utilizaron 4 medios de cultivo que combinaban la auxina ácido indol-acético (I) con diferentes citoquininas, a saber, thidiazuron (T), zeatina (Z) y 6-benciladenina (B). Se emplearon, en concreto, las siguientes combinaciones de auxina y citoquinina: IT, IZ, IB y IBZ. Todos los medios estaban suplementados con la misma concentración de auxina (0.05 mg/l), mientras que

por lo que respecta a la citoquinina, los medios IT y IZ llevaban 1 mg/l de citoquinina mientras que en el medio IB llevaba 2 mg/l. El medio IBZ llevaba 1 mg/l de cada citoquininas.

Tabla 8. Efecto del medio de cultivo sobre la morfogénesis de callos procedentes de explantes de cotiledón de melón Cantalupo. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).

Estadio	Medio de cultivo	Índice CD	Índice ORG	Yemas (%)	Brotos (%)
2	IT	0,52 ± 0,66 ^(a)	0,48 ± 0,06 ^(c)	48,44 ± 28,85 ^(c)	0,00 ± 0,00 ^(d)
2	IZ	0,00 ± 0,00 ^(c)	0,64 ± 0,06 ^(c)	64,06 ± 6,00 ^(b)	1,56 ± 1,55 ^(c)
2	IB	0,13 ± 0,04 ^(b)	1,09 ± 0,07 ^(b)	90,62 ± 3,64 ^(a)	48,44 ± 6,20 ^(b)
2	IBZ	0,00 ± 0,00 ^(b)	1,28 ± 0,06 ^(a)	96,88 ± 2,17 ^(a)	60,06 ± 6,12 ^(a)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de la callo organogénico (0 a 3), ver materiales y Métodos, pág. 12.

Los mejores resultados se obtuvieron en los medios con sólo benciladenina y en los que se combinaba benciladenina y zeatina, aunque se obtuvo una aceptable respuesta morfogénica en el medio que sólo llevaba zeatina. El resultado en el medio con thidiazuron fue el peor aunque casi el 50% de los explantes desarrolló estructuras con yema. A diferencia de lo que ocurría en pepino, en esta variedad de melón parece que la adición de zeatina al medio de cultivo promueve mejor respuesta organogénica y reprime el crecimiento de callo desorganizado. En efecto, en ninguno de los dos medios con zeatina (IZ o IBZ) se produce crecimiento desorganizado de callo (tabla 8). Por otro lado, si se compara la respuesta morfogénica en los medios que sólo llevan una única citoquinina, los resultados indican que la benciladenina es mejor que la zeatina, siendo el thidiazuron la citoquinina que peor resultado proporciona. Sin embargo, parece que la benciladenina y zeatina actúen de forma aditiva induciendo la mayor aptitud morfogénica (figura 16). Conviene en cualquier caso indicar que las diferencias existentes respecto a la morfogénesis en los medios suplementados con sólo benciladenina o con benciladenina y zeatina son escasas, y por tanto, ambos medios son indistintamente útiles para este propósito.

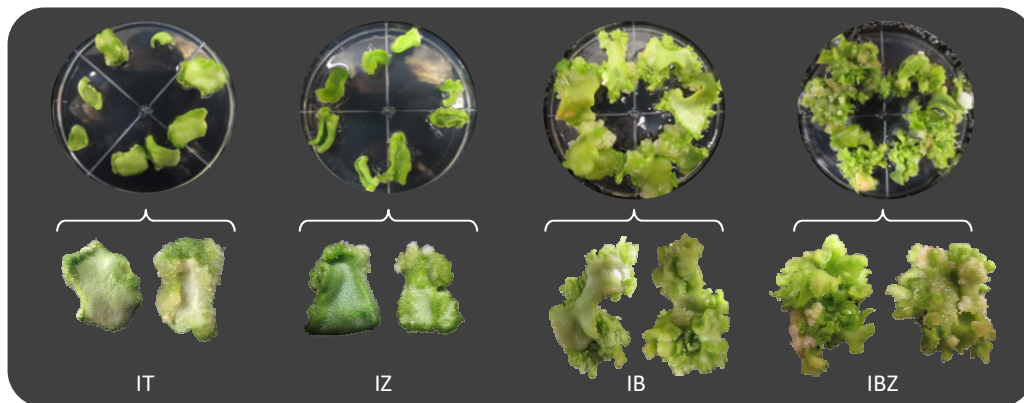


Figura 16. Respuesta morfogénica en explantes de cotiledón de melón Cantalupo cultivados en medios que combinan auxina (IAA) con thidiazuron (IT), zeatina (IZ), benciladenina (IB) y benciladenina más zeatina (IBZ).

Este experimento nos permite concluir que la benciladenina o la combinación de benciladenina y zeatina generan una elevada respuesta morfogénica en mini-explantes de cotiledón procedentes de plántulas en estadio de desarrollo 2 de melón Cantalupo

4.2.3. Efecto del soporte de cultivo sobre la morfogénesis adventicia en mini-explantos y micro-explantos de melón

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto que podría tener el soporte de cultivo sobre la respuesta morfogénica en melón Cantalupo. Para ello, se cultivaron mini-explantos y micro-explantos de melón sobre medio líquido y sólido (gelificado con agar). Como medio de cultivo se empleó el suplementado con ácido indol-acético y 6-benciladenina (ver apartado 4.2.2).

En medio líquido los explantes experimentan un notable incremento de tamaño a lo largo de los primeros 5-7 días de cultivo respecto a lo que ocurría en medio sólido. Asimismo, las estructuras organogénicas aparecieron antes en medio líquido que en medio sólido. Así, se podía ver que la mayor parte de los explantes (tanto los mini-explantos como los micro-explantos) exhibían estructuras tipo yema a los 10-12 días de cultivo en medio líquido, mientras que en medio sólido aún era difícil apreciar ese tipo de estructuras (figura 17). Sin embargo, a partir de los 20 días de cultivo, las estructuras organogénicas que surgían de los explantes cultivados en medio sólido exhibían mayor calidad y ocupaban una mayor extensión a lo largo del explante. Las que habían surgido a partir de los explantes cultivados en medio líquido comenzaban a experimentar procesos de hiperhidratación. En conjunto, los resultados fueron excepcionales ya que prácticamente todos los explantes exhibían estructuras organogénicas, tanto los cultivados en medio sólido como los que se cultivaron en medio líquido, pero como comentábamos antes, la amplitud y calidad de las callos organogénicos que se estaban desarrollando en medio sólido era mayor. Se decidió en ese momento transferir todos los callos organogénicos a medio sólido en aras de individualizar plantas que nos permitieran analizar su nivel de ploidía.



Figura 17. Detalle de los microexplantes sobre medio líquido y sólido a los 12 días de cultivo. Las flechas indican las zonas en las que se produce el rápido desarrollo de estructuras organogénicas (i.e. yemas) a los 12 días de cultivo. En ese periodo, estas estructuras no se han desarrollado completamente en los explantes cultivados sobre medio sólido. Arriba a la derecha se pueden ver explantes con elevada respuesta morfogénica después de transferir a medio sólido los explantes que se encontraban sobre medio líquido.

El experimento nos permitió concluir que el medio líquido puede ser adecuado para inducir el rápido crecimiento y desarrollo de las primeras respuestas organogénicas. Sin embargo, a la hora de obtener callos con mayor capacidad morfogénica, es más conveniente el empleo de medio sólido. Además, el experimento nos ha proporcionado evidencias que indican que el empleo de micro-explantos es adecuado para obtener una respuesta morfogénica de calidad a partir de pocas plantas de partida.

4.2.4. Efecto del medio de cultivo sobre la morfogénesis adventicia en explantes de hoja de planta axénica de melón

En este experimento evaluamos la morfogénesis a partir de explantes de hoja en dos medios de cultivo. En concreto, se emplearon los dos medios que mejor respuesta ofrecieron en el ensayo con mini-explantes de cotiledón (i.e. IB e IBZ, ver apartado 4.2.2). También comprobamos las posibles diferencias en cuanto a la respuesta morfogénica en función del material de partida, es decir, primera hoja verdadera expandida (más cercana al ápice y, por tanto, más joven) o la segunda y tercera hoja (tabla 9, 1ª o 2ª y 3ª).

Tabla 9. Efecto del medio de cultivo sobre la morfogénesis de callos procedentes de explantes de hoja de melón Cantalupo. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).

Medio de cultivo	Hoja	Índice CD	Índice ORG	Yemas (%)	Brotos (%)
IB	1ª	1,11 ± 0,16 ^(b)	0,96 ± 0,04 ^(bc)	96,43 ± 3,51 ^(a)	10,71 ± 5,84 ^(a)
	2ª y 3ª	1,97 ± 0,06 ^(a)	0,95 ± 0,04 ^(c)	84,71 ± 2,87 ^(b)	16,78 ± 2,98 ^(a)
IBZ	1ª	1,43 ± 0,17 ^(b)	1,32 ± 0,08 ^(a)	100,00 ± 0,00 ^(a)	14,28 ± 4,99 ^(a)
	2ª y 3ª	1,82 ± 0,07 ^(a)	1,11 ± 0,03 ^(b)	100,00 ± 0,00 ^(a)	20,83 ± 3,38 ^(a)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de la callo organogénico (0 a 3), ver materiales y Métodos, pág. 12.

Como se puede ver en la tabla 9 y en la figura 18, los mejores resultados se obtuvieron en el medio IBZ, en consonancia con los que se habían obtenido en el experimento con explantes de cotiledón. En comparación con los resultados obtenidos con explantes de cotiledón, pudimos comprobar que los explantes de hoja daban lugar a una mayor proliferación de callo desorganizado y que el porcentaje de explantes con brote durante era menor. En definitiva, al igual que ocurre en otras muchas especies, los resultados obtenidos indican que el explante de cotiledón tiene mayor potencial morfogénico que el de hoja. Con todo, la organogénesis en explantes de hoja que se ha obtenido en este trabajo es muy notable.

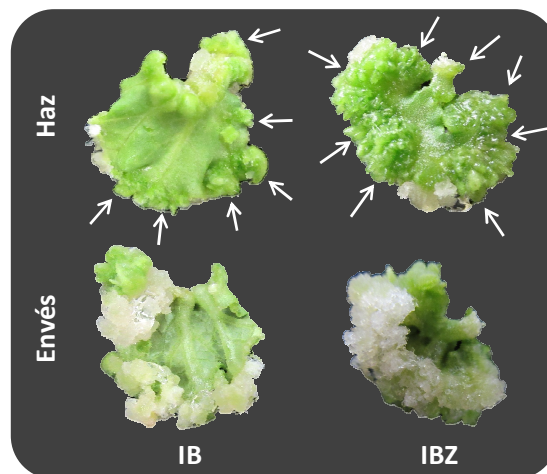


Figura 18. Respuesta morfogénica en explantes de hoja de melón Cantalupo cultivados en medios que combinan ácido indol-acético con benciladenina (IB) y benciladenina más zeatina (IBZ). Las flechas indican la amplitud de la morfogénesis.

También comprobamos que para la obtención de respuesta morfogénica era indiferente emplear la hoja desarrollada más joven (1ª hoja) o las hojas que se habían desarrollado previamente (2ª y 3ª hoja), probablemente porque al ser estas últimas también jóvenes (verdes y

sin síntomas aparentes de senescencia) se encontraban en el estadio ontogénico adecuado para generar morfogénesis.

El experimento nos permite concluir que la benciladenina o la combinación de benciladenina y zeatina junto con el ácido indol-acético generan una elevada respuesta morfogenética en explantes de hoja procedentes de planta axénica de melón Cantalupo.

4.3. Transformación genética de melón cantalupo

El objetivo de este experimento fue testar si las mejores condiciones de los distintos experimentos previos de morfogénesis tenían algún efecto positivo sobre la eficacia de transformación genética en melón cantalupo. Para ello, se realizaron dos transformaciones, una de ellas con la metodología clásica que siempre se ha empleado en el laboratorio, es decir, 1 ò 2 explantes por cotiledón (proximal y distal) y la otra con miniexplantes (4 segmentos, dos proximales y dos distales). Para la transformación con la metodología clásica se utilizaron plántulas en estadio ontogénico 3-4, mientras que para la transformación con miniexplantes se utilizaron plántulas en estadio ontogénico 2. Tras las etapas de inoculación y lavado de los explantes, el cultivo se realizó sobre medio sólido (gelificado con agar), pero en el caso de los miniexplantes, el cultivo se llevó a cabo a lo largo de los primeros 10-12 días sobre medio líquido. El objetivo fue el de favorecer un crecimiento más rápido de esos explantes que, al ser de menor calibre, serían más vulnerables a la presión del agente selectivo. La metodología de transformación genética fue básicamente la que se describe en Atarés et al (2011).

Tabla 10. Eficacias de transformación de melón con explantes y miniexplantes como material de partida.

Tipo de explante	Condiciones de cultivo	Cotiledones de partida	Nº plantas transgénicas	Eficacia transformación
1 x distal + 1 x proximal	Cultivo en medio sólido	132	9	6,82%
2 x distal + 2 x proximal	Cultivo en medio líquido + sólido	90	46	51,11%

Nota: La eficacia de transformación se ha calculado porcentualmente dividiendo el número de plantas transgénicas procedentes de eventos independientes de transformación por el número inicial de cotiledones empleados.

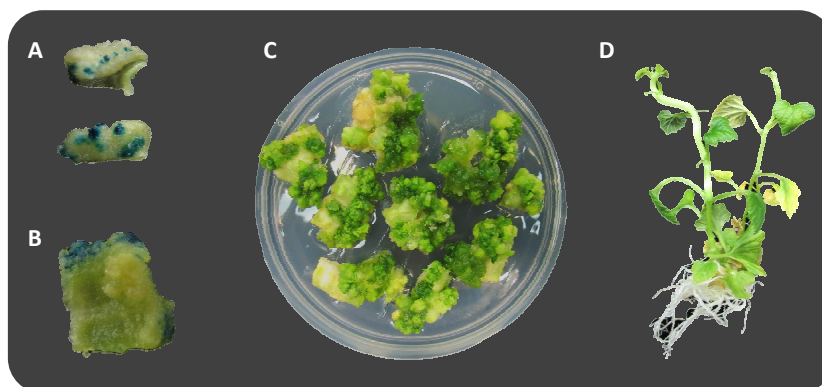


Figura 19. Detalle de algunas de las etapas del proceso de transformación genética. A) Expresión GUS en estructuras organogénicas (i.e. yemas) en miniexplantes a los 20 días de la transformación. B) Expresión GUS en estructuras organogénicas (i.e. yemas) en explantes normales de la zona proximal a los 20 días de la transformación. Se aprecia un mayor número de eventos positivos GUS en los miniexplantes. C) Callos con estructuras organogénicas procedentes de miniexplantes en medio con presión de selección (i.e. 100 mg/l). D) Elongación y enraizamiento de brotes transgénicos en medio selectivo (i.e. 100 mg/l).

En el caso de la transformación con explantes distales y proximales, tras las etapas de inoculación y el lavado, éstos se transfirieron, como se comentaba en el anterior párrafo, al medio de cultivo (IB, apartado 4.2.2.) gelificado con agar y suplementado con 100 mg/l de kanamicina. Utilizando esta metodología, que es básicamente la que se utiliza habitualmente, en este experimento se obtuvo una eficacia de transformación genética cercana al 7% (tabla 10). En realidad, en esta primera transformación se seleccionaron 38 callos organogénicos independientes, lo que supone una eficacia de transformación de en torno al 28%. Sin embargo, por el momento sólo se ha verificado el origen transgénico de las plantas procedentes de 9 callos (sobre la base de ensayos de resistencia a la kanamicina, ver figura 19D). No se puede descartar por tanto que la tasa de transformación aumente a medida que se vayan individualizando más plantas. Con todo, lo más importante de este experimento no fue tanto verificar la eficacia final de transformación con explantes de tamaño normal sino más bien comparar con los resultados que en ese momento se estaban obteniendo con los miniplantes. Así es, durante las primeras etapas del proceso de selección (i.e. 20 días desde la transformación), cuando empezaban a desarrollarse las primeras estructuras organogénicas (i.e. yemas) se realizó una prueba GUS y se pudo constatar que los miniplantes exhibían un mayor número de eventos positivos (figuras 19A vs 19B). De hecho, en la transformación realizada con miniplantes se obtuvieron en el mismo periodo de tiempo 46 plantas resistentes a la kanamicina procedentes de callos independientes, es decir, más de un 50% de eficacia de transformación sobre la base del número inicial de cotiledones de partida (ver tabla 10). Conviene indicar que, al igual que en la otra transformación, se ha seleccionado un mayor número de callos presuntamente transgénicos, lo cual quiere decir que la eficacia podría ser un poco mayor.

El experimento nos ha permitido concluir que, efectivamente, el cultivo en medio líquido al inicio y durante un periodo corto de tiempo puede ser adecuado para inducir un crecimiento más rápido del explante y favorecer la temprana aparición de las estructuras morfogénicas. Además, esta hipótesis que habíamos emitido en un experimento previo (ver apartado 4.2.3) parece corroborarse en este experimento de transformación genética, lo que tiene sin duda más valor. Los próximos experimentos del grupo van a estar relacionados con esta estrategia y, en este sentido, se comprobará si estas eficacias se pueden conseguir también utilizando microexplantes, lo que permitirá iniciar los experimentos partiendo de un menor número de plantas, o eligiendo tan sólo aquellas plántulas que exhiban una notable calidad.

4.4. Análisis del nivel de ploidía en plantas regeneradas a partir de cotiledón de melón cantalupo

Con el objetivo de determinar el porcentaje de plantas que no habían sufrido cambios numéricos como consecuencia del proceso de regeneración *in vitro*, se analizaron mediante citometría de flujo 183 plantas, algunas de las cuales procedían de uno de los experimentos de morfogénesis (apartado 4.2.4) mientras que otras se obtuvieron en el experimento de transformación genética. Evaluamos el porcentaje de plantas diploides y tetraploides, así como el porcentaje de callos que sólo generaban plantas diploides, plantas tetraploides o tanto plantas diploides como tetraploides.

Los resultados obtenidos indican que el porcentaje de callos que generaron sólo plantas diploides es similar con independencia del tipo de experimento a partir del cual se regeneraron las plantas (regeneración o transformación), siendo de en torno al 25-30% (tabla 11). El porcentaje de callos que sólo generaron plantas tetraploides fue, sin embargo, mayor en el experimento de transformación genética respecto al de regeneración. Este resultado podría estar relacionado con el porcentaje de callos que generan tanto plantas diploides como tetraploides,

que fue mucho mayor en el experimento de regeneración. Una posible explicación a este hecho es que en los experimentos de regeneración, además de los procesos típicos de endoreduplicación que pueden acontecer a lo largo de la formación de un callo *in vitro*, pueden también generarse callos quiméricos, que se desarrollan a partir de la unión de células diploides y tetraploides preexistentes en el material de partida. En los experimentos de transformación genética, sólo las células que expresan el marcador (i.e. gen que confiere resistencia a un antibiótico) van a ser capaces de desarrollar callos, de forma que la probabilidad de que dos células muy cercanas hayan sido transformadas y prosperen juntas (i.e. formen un callo quimérico) es menor. En consecuencia, es más probable que los callos que dan lugar a plantas diploides y tetraploides en los experimentos de transformación procedan de eventos de endoreduplicación, toda vez que el porcentaje de callos de este tipo es muy pequeño. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en los experimentos de transformación genética, en los experimentos de regeneración todas las células pueden dividirse y prosperar, y por tanto, la probabilidad de que células diploides y tetraploides que se encuentran muy cercanas desarrollen un callo quimérico es mayor. De hecho, el porcentaje de callos de este tipo en el experimento de regeneración no es en modo alguno nimio.

Tabla 11. Análisis del nivel de ploidía en plantas regeneradas en experimentos de morfogénesis o transformación genética a partir de explantes de cotiledón.

	Experimento de regeneración	Experimento de transformación
% de plantas diploides (2n)	42,61	33,82
% de plantas tetraploides (4n)	57,39	66,18
% callos que dan plantas 2n	25,64	30,77
% callos que dan plantas 4n	43,58	64,62
% callos que dan plantas 2n y 4n	30,76	4,62

El experimento nos ha permitido concluir que, a diferencia de lo que ocurre cuando se utilizan cotiledones en estadios ontogénicos más avanzados (i.e. Nuñez Palenius et al, 2007), la regeneración *in vitro* a través de la ruta organogénica a partir de explantes de cotiledón en un estadio ontogénico 2 permite obtener un adecuado número de plantas diploides. Además, a la hora de recuperar el máximo número de plantas diploides, conviene tener en cuenta que en esta especie muchos callos son citoquiméricos, es decir, callos que generan tanto plantas diploides como tetraploides. En nuestro experimento de regeneración, este tipo de callos representó el 30,76% del total, mientras que en el de transformación genética un 4,62% de los callos fueron de este tipo.

5. Discusión

5.1. Importancia del estadio ontogénico para la obtención de respuesta morfogénica

En cucurbitáceas, el estadio ontogénico del material de partida tiene una influencia determinante sobre la cantidad y calidad de la respuesta morfogénica. Colijn-Hooyman et al (1994) observaron que en explantes de cotiledón de pepino de plántulas de 3 a 7 días se desarrollan con una cierta frecuencia callos organogénicos, pero cuando la de éstos es de 10-13 días la capacidad de regeneración se reduce drásticamente. En otra cucurbitácea cultivada, la sandía, Dong & Jia (1991) observaron diferencias en el número de yemas por explante de cotiledón en función de la edad del mismo. En este trabajo, los autores indican que en explantes de cotiledón de hasta 7 días se diferencian múltiples brotes, pero en los cotiledones de más de 7 días no aparece más de una yema-ápice por explante. Compton & Gray (1994) comprobaron que la capacidad para regenerar brotes a partir de explantes de cotiledón en cuatro genotipos de sandía estaba relacionada con la edad de la plántula. Así, las frecuencias más elevadas de callos con brotes (en torno al 65%) se obtenían con plántulas de dos días.

Para Zhang et al (1994), los cotiledones inmaduros dan mayor respuesta morfogénica *in vitro* que los maduros debido a su activa condición fisiológica. Además de esto, Dong & Jia (1991) indicaron que los cotiledones más jóvenes se ven más fácilmente influidos por factores ambientales tales como los reguladores de crecimiento. En trabajos realizados con explantes de sandía, Compton & Gray (1993) obtuvieron mejores resultados cuando los cotiledones procedían de plántulas jóvenes. Además, reforzaron con sus trabajos una idea que quizás esté relacionada con la edad de los explantes: la tasa de regeneración podría verse afectada por el nivel de ploidía de las células del explante inicial. En este sentido, la mayor tasa de regeneración de los explantes jóvenes de cotiledón podría estar relacionada con un menor número de células poliploides, respecto a los cotiledones viejos que presentan mayor número de células poliploides.

Pérez Sanjuán (1999) evaluó la aptitud organogénica de distintos cultivares de pepino utilizando diferentes tipos de explante de plántulas de 7 días. En ningún caso obtuvo respuesta morfogénica. A la vista de estos resultados, realizó un nuevo experimento utilizando, en este caso, explantes de plántulas de 2-3 días. Utilizando explantes de cotiledón obtuvo unas frecuencias de explantes con yemas que oscilaban entre el 10% y el 70% en función del cultivar utilizado. Pérez Sanjuán (1999) llega a la conclusión de que la edad del explante resulta limitante a la hora de obtener respuesta morfogénica en líneas de pepino.

En melón, el estadio ontológico del explante de partida también tiene efectos negativos sobre su capacidad morfogénica, aunque el efecto no es tan evidente como en el caso de pepino. Por

ejemplo, Soriano (2012) evaluó la organogénesis de diferentes cultivares de melón a partir de explantes de cotiledón procedentes de plántulas de 7 a 18 días en diferentes medios de cultivo. Aunque con la mayor parte de los medios no consigue que los explantes respondan a la morfogénesis, en algunos de los medios ensayados obtiene respuestas que van del 5% al 50% de explantes con estructuras morfogénicas.

Los estudios que nosotros hemos realizado en dos cultivares de pepino (Marketer y Holandés) y uno de melón (cantalupo) indican que la mayor respuesta morfogénica se obtiene a partir de explantes de cotiledón de plántulas en un estadio ontogénico 2 (plántulas de 2-3 días). En este estadio ontogénico, en pepino Marketer obtuvimos una eficacia de explantes con yema del 55% y, en el caso de pepino Holandés, más del 85% de los explantes presentaban estructuras con yemas. Estos resultados evidencian, por otro lado, la importancia del efecto varietal sobre la respuesta morfogénica. En pepino también se obtienen aceptables resultados en explantes de plántulas en estadios ontogénicos 3 y 4 (3-5 días). Así, en torno al 40% de los explantes de pepino Marketer generan estructuras con yema y en el caso de pepino Holandés este valor asciende al 70%. La respuesta morfogénica disminuye drásticamente a partir del estadio 5 (5-7 días) en ambos cultivares respecto a los resultados que se pueden obtener en estadios previos.

En relación con melón, habida cuenta de que ya disponíamos de los datos de pepino y que en el grupo ya se había evaluado previamente la aptitud morfogénica a partir del estadio 4 en varios cultivares de melón (incluido cantalupo), decidimos centrar nuestros esfuerzos en los estadios ontogénicos 2 y 3. En este sentido, conviene indicar que ambos estadios proporcionan resultados excepcionales: el 100% de los explantes generan estructuras organogénicas. Sin embargo, diversas consideraciones sugieren que el estadio 2 puede ser más ventajoso. Así pues, el índice de callo desorganizado (índice CD) es menor en el estadio 2. Si tenemos en cuenta que en desarrollo de callo desorganizado puede interferir negativamente con el de callo organizado, es preferible escoger opciones que favorezcan el desarrollo organogénico, ya que a largo plazo se verá favorecido el número de plantas que se pueden individualizar a partir de cada explante. De hecho, el porcentaje de brotes que se pueden individualizar a partir de explantes es mayor en el estadio 2 respecto al 3. Además, es previsible que en relación con la regeneración de plantas, se obtenga un mayor número de plantas diploides en el estadio 2, toda vez que con el paso de los días aumenta notablemente el número de células poliploides en los explantes de cotiledón (Atarés, comunicación personal).

5.2. Importancia del tipo de explante para la obtención de respuesta morfogénica

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

En experimentos realizados con explantes de distinta procedencia (cotiledón, hoja, hipocotilo y tallo), García-Sogo (1990) comprobó notables diferencias en la capacidad organogénica de estos explantes, siendo siempre los callos derivados de explantes de cotiledón los que exhibían mayor aptitud morfogénica. En los trabajos realizados con los mutantes de melón '*Yellow Green*' y '*Halo*', Orts et al (1986) observaron estructuras organizadas en los explantes de hipocotilo y tallo del cultivar '*Yellow Green*' con una frecuencia muy alta (100%), pero estas estructuras no dieron

lugar en ningún caso a la formación de brotes. Sin embargo, el estudio morfogenético en explantes de cotiledón y hoja reveló la diferenciación de brotes con unas frecuencias del 13,1% y 14,7% respectivamente.

Punja et al (1990) obtuvieron frecuencias de regeneración que oscilaron entre el 0% y el 75% en explantes de cotiledón de melón y entre el 0% y el 38% en explantes de hoja. Da Silva (1999) también comprobó que los callos derivados de cotiledón propiciaban mejor respuesta que los de hoja en los cinco cultivares de melón que estudió. En trabajos más recientes también se ha reportado la misma tendencia. Así, Nuñez Pelanius et al (2007) indicaron que los explantes de cotiledón de melón *Galia* generan mayor morfogénesis que los que derivan de hipocotilo y hoja. En definitiva, son varios los autores que coinciden en que los cotiledones son la mejor fuente de material vegetal para realizar estudios morfogenéticos (Wehner & Locy, 1981; Moreno et al, 1985; Cade et al, 1990). Sin embargo, Yadav (1996) indicó que, posiblemente, la cantidad de brotes que se obtienen a partir de hoja de melón puede ser considerablemente mayor que la que se obtiene a partir de cotiledón; lo que supone una gran ventaja cuando se dispone de poca semilla.

En este trabajo hemos utilizado explantes de distinta procedencia (i.e. cotiledón, hipocotilo u hoja) para evaluar la respuesta morfogenética. Al igual que se ha observado en otros trabajos sobre morfogénesis, nosotros hemos podido comprobar que los explantes de cotiledón son los más adecuados para generar respuesta morfogenética, tanto en melón como en pepino. Observamos que la respuesta morfogenética era dependiente de especie y de cultivar. En efecto, en melón un 23% de los explantes de hipocotilo desarrollaron callos con yema, mientras que en pepino el resultado era dependiente del cultivar. Así, en pepino Holandés el 30% de los explantes desarrollaron callos con yema mientras que en pepino Marketer este tipo de explante tan sólo desarrolló callo de tipo desorganizado.

Respecto a los explantes de cotiledón, en melón todos los explantes fueron capaces de desarrollar callos con yemas, y la mayor parte de ellos eran capaces generar brotes. En pepino, el porcentaje de explantes con yema era sensiblemente menor, en torno a un 70%, y la optimización de la respuesta era dependiente de la manipulación del explante una vez iniciado el proceso organogénico.

Además de lo que normalmente se hace en relación con la elección del tipo de explante, es decir, comparar la respuesta en explantes de diferencia procedencia, nosotros quisimos evaluar la morfogénesis en diferentes tipos de explante de cotiledón, que a la postre es el que habitualmente mejor respuesta genera (Moreno et al, 1985). De esta forma comparamos la respuesta morfogenética en explantes distales (los más alejados del peciolo) respecto a los que ocupan una posición proximal (los más cercanos al peciolo) en el cotiledón. En pepino, Pérez Sanjuán (1999) observó que la única vía para regenerar plantas de pepino era utilizar explantes de la zona proximal del cotiledón. Gambley & Dodd (1990) describieron resultados similares en esta especie. En sandía, Compton & Gray (1993) también reportaron la ausencia absoluta de morfogénesis en las regiones distales del cotiledón. Nosotros pudimos constatar que, en el caso de pepino, la morfogénesis es significativamente menor en explantes distales, siendo más recomendable el empleo de explantes proximales. Sin embargo, en melón, ambos tipos de explantes generan una respuesta satisfactoria; de hecho, el 100% de los explantes, tanto de la región proximal como de la distal, generaron estructuras organogénicas.

También hemos evaluado la respuesta morfogenética en miniexplantes y microexplantes de cotiledón. Habitualmente, de un cotiledón se suelen extraer dos explantes, uno distal y uno proximal. Con miniexplantes, de cada cotiledón se extraen 4 explantes, 2 distales y dos

proximales; mientras que con microexplantes, cada cotiledón se disecciona en 16 a 20 explantes. Este tipo de aproximaciones, si resultan válidas, son especialmente interesantes ya que permiten amplificar la posibilidad de obtener regenerantes a partir de un escaso número de plantas de partida. Los experimentos realizados nos permitieron comprobar que, por lo que respecta a pepino, los miniexplantes de cotiledón se pueden emplear para amplificar la respuesta organogénica. En efecto, en torno al 80% de los explantes dio lugar a estructuras organogénicas, lo que quiere decir que se pueden obtener resultados similares a los que se consiguen de la forma habitual pero con la mitad de plantas de partida. Por lo que respecta al empleo de microexplantes, los experimentos realizados en pepino no nos han permitido por el momento concluir sobre la idoneidad de este tipo de explante a la hora de generar respuesta morfogénica. En el caso de melón, los resultados que obtuvimos fueron excepcionales tanto con miniexplantes como con microexplantes. Por lo que respecta a los miniexplantes, se obtuvieron tasas de regeneración de estructuras organogénicas de en torno al 90-95%. Asimismo, con microexplantes se obtuvieron tasas de regeneración similares, lo que tiene la enorme ventaja de amplificar la capacidad morfogénica a partir de un número reducido de plantas. En efecto, a partir de un cotiledón se pueden extraer 16-20 explantes, lo que implica que a partir de una única planta se pueden conseguir hasta 40 explantes. Si la mayor parte de estos explantes generan estructuras organogénicas se podrían regenerar muchas plantas axénicas a partir de un reducido número de plántulas de partida. Este aspecto tiene un especial interés cuando se dispone de un escaso número de semillas (i.e. semillas de enorme valor) o cuando la calidad de la germinación es deficiente y tan sólo en un porcentaje reducido de las semillas da lugar a plántulas de calidad.

5.3. Importancia de la composición del medio de cultivo para la obtención de respuesta morfogénica

La respuesta morfogénica es consecuencia de la interacción de múltiples factores, siendo la composición del medio de cultivo uno de ellos. En relación con los componentes de medio, el tipo y concentración de los reguladores de crecimiento pueden ser determinantes en la obtención de la respuesta morfogénica. En los trabajos realizados con explantes de cotiledón de pepino por Gambley & Dodd (1990) quedó de manifiesto que las citoquininas quinetina (K; 2 a 5 mg/l), isopenteniladenina (2iP; 1 a 5 mg/l) y benciladenina (BAP; 0,5 a 1 mg/l) daban lugar a altas frecuencias de callos con brotes cuando se utilizaban como únicos reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. Sin embargo, cuando los medios contenían la auxina ácido indolacético (IAA) se inhibía la formación de brotes y aumentaba el crecimiento de callo. En una especie silvestre de la familia de las cucurbitáceas (*Citrullus colocynthis*), Dabauza (1995) observó que la utilización de BA como único regulador de crecimiento era suficiente para estimular la organogénesis en explantes de cotiledón. Posteriormente, comprobaron que la adición de NAA (ácido naftalenacético) al medio de cultivo tenía consecuencias negativas sobre la regeneración de brotes. De forma similar, Srivastava et al (1989) comprobaron el efecto pernicioso de NAA sobre la regeneración de brotes en explantes procedentes de cotiledón de sandía, y concluyeron que la sola presencia de BAP en el medio de cultivo era suficiente para promover la regeneración de brotes.

En pepino, Msikita et al (1990) observaron que la mayor tasa de regeneración a partir de cotiledones ocurría en los medios que contenían o bien 2 mg/l de BAP y 0,3 mg/l de NAA, o bien 4 mg/l de BAP y 0,3 mg/ de NAA. Experimentos similares realizados por Ali et al (1991c) con 6 cultivares de pepino en medios que contenían NAA y BAP indicaron que las frecuencias de regeneración eran variables dependiendo del genotipo en cuestión. Da Silva (1999) también observó que el efecto del medio de cultivo era dependiente del genotipo. Los mejores resultados

en los cultivares 'Amarelo', 'Cantaloup Charentais' y 'Eldorado' se obtuvieron en un medio que contenía 1,5 mg/l de IAA y 6,0 mg/l de K. Sin embargo, para el cultivar 'Melón de Onteniente' resultó más adecuado un medio con tan sólo 1,0 mg/l de BAP. Melara & Gatica (2009) señalaron que con independencia del genotipo estudiado, el porcentaje de brotes regenerados a partir de callos procedentes de explantes de cotiledón de 3 días es mayor en los medios que combinan como reguladores de crecimiento indolacético y benciladenina. En trabajos realizados con cultivares de sandía, Compton & Gray (1993) reportaron que la utilización BAP en los medios de cultivo en un intervalo comprendido entre 5 y 10 μM incrementa hasta en cuatro veces la frecuencia de regeneración en comparación con la que se obtiene en los medios que contienen las concentraciones más adecuadas de K (20 μM) y TDZ (0,1 μM).

Basándonos en la experiencia que tiene el grupo sobre regeneración de plantas *in vitro* de pepino y melón, en este trabajo hemos optado por emplear en la mayor parte de los experimentos medios con NAA y BAP como combinación de reguladores de crecimiento para la regeneración de pepino y con IAA y BAP para melón. En estos medios de cultivo se obtiene una elevada morfogénesis y son otras variables, entre las que destacan la edad ontogénica de la plántula o el cultivar, las que determinan una mayor o menor respuesta. Nosotros hemos seleccionado las condiciones más favorables en relación con las variables citadas anteriormente para evaluar la tasa de morfogénesis de las dos especies en medios que contienen otros reguladores de crecimiento que poco empleados en cucurbitáceas, como el thidiazuron (TDZ) o la zeatina (Z). En este sentido, que nosotros sepamos, el único trabajo en el que se emplea zeatina para la regeneración de plantas a partir de una cucurbitácea es el publicado por Selvaraj et al (2006). Estos autores reportaron que la combinación de benciladenina (8,88 μM) y zeatina (2,5 μM) genera una elevada respuesta morfogenética a partir de explantes de hipocotilo. Sin embargo, los mismos autores señalaron en otro trabajo publicado un año más tarde (Selvaraj et al, 2007) que en explantes de cotiledón, la máxima inducción de callo organogénico se obtiene utilizando una combinación de naftalenacético (2,69 μM) y benciladenina (4,44 μM). Además, estos autores indicaron que la zona proximal del cotiledón es la única que genera una buena respuesta morfogenética. En pepino hemos comparado la respuesta en medio suplementados con NAA y TDZ, Z, BAP y Z + BAP. Hemos podido comprobar que las combinaciones de NAA con TDZ no generan respuesta morfogenética y las de NAA tanto con Z como con BAP + Z no mejoran la respuesta que se obtiene en medio con NAA y BAP. Por ello, hemos podido constatar que, acorde con el resultados de otros investigadores (i.e. Msikita et al, 1990), las combinaciones de NAA con BAP parecen las más adecuadas para generar morfogénesis a partir de explantes de cotiledón del cultivar de pepino Holandés. En melón cantalupo hemos evaluado también estas mismas citoquininas (i.e. TDZ, Z, BAP y Z + BAP) pero hemos empleado el IAA como auxina. A pesar de que se obtuvo una cierta respuesta morfogenética, los peores resultados se obtuvieron en el medio que contenía TDZ, lo que sugiere que esta citoquinina no es la más adecuada para inducir el desarrollo de estructuras organogénicas, al menos en el cultivar que hemos evaluado. Un aspecto interesante es lo que ocurre en los medios que contienen zeatina, puesto que los resultados sugieren que esta citoquinina reprime el crecimiento desorganizado del callo. Por otro lado, el excelente resultado que se obtuvo en el medio suplementado con Z y BAP sugiere que estas dos citoquininas actúan de forma aditiva promoviendo una excelente respuesta morfogenética a través de un escaso desarrollo de callo desorganizado (consecuencia de la zeatina) y una buena inducción de estructuras organizadas (el mayor efecto se debe probablemente a la BAP). Recientemente se ha reportado que los callos de melón con respuesta organogénica (i.e. formación de yemas) contienen mayor nivel de zeatina endógena que los que no generan este tipo de respuesta. No se puede descartar, por tanto, que el aporte suplementario de esta

hormona en los medios de cultivo mejore la organogénesis influyendo sobre el estatus hormonal endógeno del explante.

Los diferentes trabajos publicados en pepino y melón sobre regeneración de plantas *in vitro* invitan a considerar las combinaciones de NAA y BAP como los mejores reguladores para la morfogénesis de pepino, y combinaciones de IAA y BAP o K como los adecuados para obtener respuesta organogénica en melón. Que nosotros sepamos, este es el primer estudio que sugiere que la zeatina podría tener un efecto amplificador de la morfogénesis cuando se combina con otra citoquinina.

5.4. Importancia del soporte de cultivo para la obtención de respuesta morfogenética

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

Teniendo en cuenta la importancia que podría tener la disponibilidad de los componentes del medio de cultivo sobre la prematura inducción de estructuras organogénicas, en este trabajo quisimos evaluar la aptitud morfogenética de explantes de pequeño calibre cultivados sobre medio líquido. En pepino, comprobamos que el cultivo de mini y microexplantes sobre medio líquido impone un rápido proceso de expansión celular, y en un periodo de tiempo muy corto (3-4 días) los explantes adquieren un calibre adecuado, lo que resulta especialmente interesante en el caso de microexplantes toda vez que los explantes de partida son de tamaño muy pequeño. Sin embargo, cuando el cultivo se prolonga en el tiempo, los explantes que se encuentran en medio líquido experimentan fenómenos de hiperhidratación que afectan de manera muy negativa a los procesos de morfogénesis. En melón ocurre algo similar, ya que durante los primeros días de cultivo sobre medio líquido los explantes crecen profusamente. A diferencia de lo que ocurría en los explantes de pepino, en los que, salvo excepciones, no se desarrollaron estructuras morfogenéticas, en melón se observó la formación rápida de estructuras organogénicas tipo yema en la mayoría de los explantes. Sin embargo, con el paso del tiempo estas estructuras empezaron a exhibir fenómenos de hiperhidratación. En el caso de melón, cuando se empezó a observar este fenómeno, los explantes se transfirieron al mismo medio pero gelificado con agar, lo que permitió recuperar estas estructuras para la obtención de plantas axénicas. Así, una opción que podría proporcionar resultados satisfactorios consistiría en cultivar los explantes en medio líquido durante los primeros días (i.e. 5-10 días) y a partir de ese momento, en el que ya se ha producido un rápido crecimiento del explante y han comenzado a aparecer las primeras respuestas de organogénesis, transferir los explantes a medio sólido.

Desde nuestro punto de vista, esta estrategia podría ser especialmente interesante cuando se utilizan microexplantes como fuente de material vegetal. El empleo de micro-explantes como explantes de partida tiene la enorme ventaja de amplificar la capacidad morfogenética a partir de un número reducido de plantas. En efecto, a partir de un cotiledón se pueden extraer 16-20

explantes, lo que implica que a partir de una única planta se pueden conseguir hasta 40 explantes. En cultivo sobre medio sólido una buena parte de estas estructuras podrían no prosperar debido a su escaso calibre. Sin embargo, en nuestros experimentos hemos podido comprobar que tanto en pepino como en melón estas estructuras incrementan su tamaño inicial en pocos días. Es más, en el caso de melón, hemos observado que el cultivo en medio líquido adelanta la inducción de la respuesta organogénica (i.e. las estructuras tipo yema aparecen antes). Así, si la mayor parte de estos explantes generan estructuras organogénicas, se podrían regenerar muchas plantas axénicas a partir de un reducido número de plántulas de partida. Este aspecto tiene un especial interés cuando se dispone de un escaso número de semillas (i.e. se trate de semillas de enorme valor) o cuando la calidad de la germinación es deficiente y tan sólo en un porcentaje reducido de las semillas da lugar a plántulas de calidad.

5.5. Importancia diferentes requerimientos culturales y morfogénicos en los experimentos de transformación genética

Para abordar con éxito la transferencia de genes foráneos a una especie vegetal es necesario disponer de un sistema eficaz y reproducible que permita la regeneración de plantas. Habitualmente, cuando se obtienen buenas eficacias de transformación genética se suelen atribuir los éxitos al protocolo de transformación, cuando lo realmente importante son otros factores. En este sentido, el tipo de explante utilizado, el estado ontogénico del material de partida y el medio de cultivo para generar la morfogénesis juegan un papel determinante a la hora de obtener los resultados deseados. Con todo, la calidad del material de partida es clave a la hora de incrementar la eficacia de los resultados. Especialmente en cucurbitáceas, muchas de las semillas, si no padecen problemas de contaminación endógena, suelen experimentar una germinación anómala (ver figura 14), dando lugar a plántulas cuyos explantes tienen menor potencial morfogénico que los de las plántulas que han germinado adecuadamente. El principal objetivo de los experimentos que se han realizado en este proyecto de investigación ha sido identificar diferentes requerimientos culturales y morfogénicos que permitieran abordar la regeneración de plantas con una elevada eficacia. De esta forma, como se ha comentado en los anteriores apartados de discusión, se han seleccionado las mejores condiciones analizando el origen del explante, el estadio ontogénico de la plántula y estudiando algunas combinaciones de reguladores de crecimiento. Además, hemos realizado estudios tratando de ver si era factible obtener una regeneración de alto rendimiento mediante el empleo de un mayor número de explantes diseccionados a partir de plantas de calidad, y hemos comprobado que, en efecto, es posible amplificar la respuesta morfogénica si son los mejores explantes los que se emplean como material de partida.

En el caso de melón, nuestros experimentos sugerían que los explantes de cotiledón de plántulas en un estadio ontogénico 2 (correspondiente a dos días desde la germinación) cultivados en un medio con indolacético (como auxina) y benciladenina o benciladenina junto con zeatina (como citoquininas) proporcionaban una tasa de regeneración excepcional. Además de todo ello, si se empleaban los explantes de plántulas germinadas adecuadamente, se podían obtener las mismas tasas de regeneración empleando explantes de pequeño calibre (hasta 16 explantes diseccionados a partir de cada cotiledón). Nuestros experimentos también sugerían que en este tipo de explante de pequeño calibre, el medio líquido durante el inicio del cultivo de los explantes podía acelerar la inducción de la morfogénesis.

Para testar la utilidad real de los resultados obtenidos se diseñó un experimento de transformación genética en el que se comparó la metodología clásica respecto a una nueva metodología que incluía algunos cambios basados en los experimentos de morfogénesis que

habíamos realizado. Así y en relación con la metodología clásica de transformación, se utilizaron explantes de plántulas en estadio 3-4, dos explantes por cada cotiledón y los explantes se transfirieron a medio sólido (gelificado con agar) con presión de selección (100 mg/l de kanamicina) tras las etapas de inoculación y eliminación de la bacteria (Atarés et al, 2011). Respecto a la nueva metodología, utilizamos explantes de plántulas en estadio 2, miniexplantes (4 explantes por cada cotiledón) y, un aspecto importante, los explantes se transfirieron a medio líquido con presión de selección durante los primeros 10-12 días de cultivo. El resultado fue mejor de lo esperado, ya que utilizando la metodología clásica se obtuvo una eficacia de transformación genética cercana al 7%, mientras que los cambios en el protocolo clásico permitieron incrementar la eficacia de transformación genética al 51%.

A pesar de que se han desarrollado numerosos protocolos de transformación en los últimos 20 años, las eficiencias de transformación genética en melón ha sido en general muy bajas (Nuñez-Palenius et al, 2006; 2008; Ren et al, 2012). Además, suelen ser muy dependientes de genotipo (Guis et al, 1998; Galperin et al, 2003; Akasaka-Kennedy et al, 2004; Rhimi et al, 2006) y del material de partida (Fang & Grumer, 1990; Guis et al, 2000). Que nosotros sepamos, los mejores resultados en la literatura han sido los obtenidos en el cultivar Galia por Galperin et al (2003) y Núñez Palenius et al (2006, 2007), con eficacias de transformación que van del 7,5 al 12,5%. Rhimi et al (2006) emplearon cotiledones de plántulas de 10 días de un cultivar de melón de Túnez (maazoun), obteniendo una eficacia de transformación del 6,6%. Sin embargo, en general, la mayor parte de los trabajos de transformación genética de melón describen eficacias de entre el 0,7 y el 3% (ver Fang & Grumet, 1990; Gaba et al, 1992; Bordas, 1994; Guis et al, 2000; Akasaka-Kennedy et al, 2004; Yalcin-Mendi et al, 2004; Curuk et al, 2005; Castelblanque et al, 2008). Según Hellens & Mullineaux (2000), otros factores tales como la cepa de *Agrobacterium*, el marcador de selección y las construcciones usadas pueden determinar la eficacia final de transformación genética. También se ha descrito que el periodo de precultivo de los explantes, previo a la inoculación con *Agrobacterium*, y las condiciones de cocultivo de los explantes con la bacteria (i.e. tiempo y/o temperatura) pueden determinar diferencias en la eficacia de transformación (Valle's & Lasa, 1994; Ayub et al, 1996; Guis et al, 2000; Fullner & Nester, 1996; Yasmin & Debener, 2010; Sharma et al, 2011).

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

requerimientos que son necesarios para abordar con éxito experimentos de transformación genética. En este sentido, la combinación de una serie de factores, entre los que destacaríamos la edad ontogénica del explante, el tipo de explante y las condiciones de cultivo, que han hecho factible una regeneración de plantas de alto rendimiento, han proporcionado eficacias de transformación genética en melón del 50%. La identificación de este tipo de requerimientos en otras especies (i.e. sandía) podría permitir un incremento en el número de transgénicos por experimento. Actualmente estamos tratando de ajustar este tipo de factores culturales para llevar a cabo la transformación genética de pepino. Asimismo, se están iniciando experimentos con microexplantes que podrían incrementar aún más, si cabe, las eficacias de transformación genética que se describen en este trabajo.

6. Conclusiones

1. La evaluación de diferentes requerimientos culturales y morfogénéticos relacionados con la inducción de organogénesis adventicia en pepino ha revelado lo siguiente: i) en explantes de cotiledón, los estadios ontogénicos 2 y 3 son los que proporcionan mayor calidad morfogénética. Además, los estudios realizados con dos cultivares de pepino indican diferencias varietales en relación con la calidad y la cantidad de las estructuras organogénicas, ii) los explantes más adecuados para fomentar la morfogénesis son los de la zona proximal del cotiledón, pudiendo resultar positivo en algunos cultivares eliminar del explante las zonas no morfogénicas una vez se han inducido las estructuras organogénicas, iii) la benciladenina parece ser la citoquinina más adecuada para generar morfogénesis en los explantes de cotiledón de pepino, respecto al empleo de thidiazuron o zeatina, al menos cuando se combina con la auxina ácido naftalen-acético, iv) el cultivo continuado sobre medio líquido no es adecuado para inducir morfogénesis en explantes de cotiledón de pepino debido a que promueve fenómenos de hiperhidratación y v) la morfogénesis en explantes de hoja procedente de planta axénica es de menor calidad que la que se obtiene a partir de cotiledón. Con todo, se obtienen resultados satisfactorios cuando se combina benciladenina con bajas concentraciones de ácido naftalen-acético.
2. La evaluación de diferentes requerimientos culturales y morfogénéticos relacionados con la inducción de organogénesis adventicia en melón ha revelado lo siguiente: i) en explantes de cotiledón del cultivar cantalupo, la calidad de la respuesta morfogénética es excepcional cuando se emplean plántulas en estadios ontogénicos 2 o 3, ii) aunque los explantes proximales generan mayor morfogénesis, los de la zona distal resultan también adecuados para este propósito, iii) la benciladenina, y especialmente su combinación con zeatina, generan una elevada respuesta morfogénética en mini-explantes de cotiledón procedentes de plántulas en estadio de desarrollo 2. Además, la zeatina parece reprimir el crecimiento desorganizado, favoreciendo el desarrollo de las estructuras organogénicas, iv) las tres primeras hojas desarrolladas de plantas axénicas dan lugar a una buena respuesta morfogénética en medios suplementados con indol-acético y benciladenina, o con indol-acético y una combinación de benciladenina y zeatina, y v) el soporte líquido induce un rápido desarrollo de estructuras organogénicas en explantes de pequeño calibre, aunque el cultivo continuado promueve fenómenos de hiperhidratación.

3. Basándonos en los resultados obtenidos a partir de los experimentos de morfogénesis, se ha diseñado una metodología eficiente y de alto rendimiento para la regeneración de plantas de melón. Su puesta en práctica para la obtención de plantas transgénicas se ha traducido en una eficacia de transformación genética mayor del 50%. Además, más del 30% de las plantas transgénicas obtenidas, capaces de enraizar en medio selectivo, son de naturaleza diploide, lo que permitirá aplicar con éxito en el laboratorio las diferentes estrategias de transferencia génica mediante transformación genética en esta especie.

7. Bibliografía

- Adelberg JW, Rhodes BB, Skorupska HT & Brifges WC; 1994. Explant origin affects the frequency of tetraploid plants from tissue cultures of melon. *HortScience*, 29(6): 689-692.
- Akasaka-Kennedy Y, Tomita K & Ezura H; 2004. Efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation via somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Science* V. 166, (3): 763-769.
- Ali N, Skirvin RM & Splittstoesser; 1991c. Regeneration of *Cucumis sativus* from cotyledons of small explants. *HortScience*, 26 (7): 925.
- Ali N, Skirvin RM, Splittstoesser WE & George WL; 1991a. Germination and regeneration of plants from old cucumber seed. *HortScience*, 26(7): 917-918.
- Ali N, Skirvin RM, Splittstoesser WE, Harry DE & George WL; 1991b. Genetic factors and *in vitro* manipulations influence seed dormancy in cucumber. *HortScience*, 26 (8): 1076-1077.
- Arce-Ochoa JP, Dainello F, Pike LM & Drews D; 1995. Field performance comparison of two transgenics summer squash hybrids to their parental hybrid line. *HortScience*, 30 (3): 492-493.
- Atarés A, Moyano E, Morales B, Schleicher P, García-Abellán JO, Antón T, García-Sogo B, Perez-Martin F, Lozano R, Flores FB, Moreno V, Bolarin MC & 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* 30: 1865-1879.
- Ayub R, Guis M, Amor MB, Gillot L, Roustan JP, Latché A, Bouzayen M & Pech JC; 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature Biotechnology*, 14 (1996), pp. 862–866.
- Bergevoet JHW, Mark F & Custers JBM; 1989. Organogenesis versus embryogenesis from long-term suspension cultures of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Report*, 8(2): 116-119.
- Bordas M, 1994. Ingeniería Genética en Melón (*Cucumis melo* L.): Transferencia, Integración y Expresión de Genes Foráneos. 483 ff. Tesis (Doctorado en Ingeniería Agronómica) - E.T.S.I.A. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Bordas M, Montesinos C, Dabauza M, Salvador A, Roig LA, Serrano R & Moreno V; 1997. Transfer of the yeast salt tolerance gene HAL1 to *Cucumis melo* L. cultivars and *in vitro* evaluation of salt tolerance. *Transgenic Research* 6: 41-50.

- Bordas M, Moreno V & Roig LA; 1991. Organogenic and embryogenic potential of several commercial lines of *Cucumis melo* L. Cucurbit Genetics Cooperative, (14): 71-73.
- Burza W, Zuzga S, Tin Z & Malepszy S. Cucumber (*Cucumis sativus* L.). Cucumber transformation. Methods in Molecular Biology, vol. 343: Agrobacterium Protocols, 2/e, volume 1.
- Cade RM, Wehner TC & Blazich FA; 1990. Effect of explant age and growth regulator concentration on adventitious shoot formation from cucumber cotyledonary tissue. Cucurbit Genetics Cooperative, (13): 14-17.
- Castelblanque L, Marfa V, Claveria E, Martinez I, Perez-Grau L, Dolcet-Sanjuan R & Pitrat M; 2008. Improving the genetic transformation efficiency of *Cucumis melo* subsp. *melo* 'Piel de Sapo' via *Agrobacterium*. Pitrat M. (ed): *Cucurbitaceae*, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of *Cucurbitaceae*, Avignon (France), May 21-24th, 2008, pp. 627-631.
- Chee PP, 1991a. Plant regeneration from cotyledons of *Cucumis melo* 'Topmark'. HortScience, 26 (7): 908-910.
- Colijn-Hooymans CM, Bouwer R, Orczyk W & Dons JJM; 1988. Plant regeneration from cucumber (*Cucumis sativus*) protoplasts. Plant Science, 57 (1): 63-71.
- Colijn-Hooymans CM, Harkkert JC, Jansen J & Custers JBM; 1994. Competence for regeneration of cucumber cotyledons is restricted to specific developmental stages. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 39(3): 211-217.
- Compton ME & Gray DJ, 1993. Shoot Organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid and tetraploid watermelon. J. Amer. Society Hort. Science 118(1): 151-157.
- Compton ME & Gray DJ, 1994. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of tetraploid watermelon. HortScience, 29 (3): 211-213.
- Curuk S, Centiner S, Elman C, Xia X, Wang Y, Yeheskel A, Zilberstein L, Perl-Treves R, Watad A & Gaba V; 2005. Transformation of recalcitrant melon (*Cucumis melo* L.) cultivars is facilitated by wounding with carborundum. Eng Life Sci 5:169-177.
- Da Silva Souza A, 1999. Respuesta cultural y orfogenética de explantes y protoplastos de diversos cultivares de melón y primeros resultados en torno a la hibridación somática. *Cucumis melo* L., *Citrullus lanatus*. Thunberg Matsumura & Nakai. Tesis doctoral Universidad politécnica de Valencia, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos.
- Dabauza M, 1995. Selección y caracterización de híbridos somáticos *Cucumis melo* L.(+) *Cucumis anguria* L. var. *Longipes*, *Cucumis melo* L. (+) *Cucumis myriocarpus* Naud. Y *Cucumis melo* L. (+) *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. 272p.
- Debeaujon I & Branchard M; 1992. Induction of somatic embryogenesis and caulogenesis from cotyledon and leaf protoplast-derived colonies of melon (*Cucumis melo* L.). Plant Cell Reports, 12 (1): 37-40.
- Diario digital de actualidad hortofrutícola (www.hortoinfo.es).
- Dong JZ & Jia SR; 1991. High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.). Plant Cell Reports, v.9, p.559-562.
- Ellul P, Rios G, Atares A, Roig L, Serrano R & Moreno V; 2003. The expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HAL1 gene increases salt tolerance in transgenic watermelon

- [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsun. & Nakai.] Theor. Appl. Genet., 107 (3) (2003), pp. 462–469.
- El-Zeiny OAH, 2007. The highest population of plantlets from somatic embryogenesis and economical evaluation of Cucumber plant (*Cucumis sativus* L.) *in vitro*. Journal of Applied Science Research, 3(11): 1460-1471.
- Esquinas-Alcazar, Gulick JT & Gulick JP; 1983. Genetic resources of *Cucurbitaceae*: a global report. International Board for Plants Genetic Resources, Rome.
- Ezura H & Oosawa K; 1994. Ploidy of somatic embryos and the ability to regenerate plantlets in melon (*Cucumis melo* L.). Plant Cell Reports, 14 (2/3): 107-111.
- Ezura H, Amagai H, Yoshioka K & Oosawa K; 1992. Highly frequent appearance of tetraploidy in regenerated plants, a universal phenomenon, in tissue cultures of melon (*Cucumis melo* L.). Plant Science, 85 (2): 209-213
- Fakhrai H & Fakhrai F, 1991. Hormonal control of growth and development. En: Pollard JW; Walker JM (eds.). Plant Cell and Tissue Culture. The Humana Press Inc., Clifton, USA, pp: 49-56.
- Fang G & Grumet R, 1990. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants. Plant Cell Reports, 9 (3): 160-164.
- Fassuliotis G & Nelson BV, 1992. Regeneration of tetraploid muskmelons from cotyledons and their morphological differences from two diploid muskmelon genotypes. Journal of the American Society for Horticultural Science, 117 (5): p. 863-866.
- Ficcadenti N & Rotino GL, 1995. Genotype and medium affect shoot regeneration of melon. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 40 (3): 293-295.
- Fullner KJ & Nester EW; 1996. Temperature effects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol (178): 1498–1504.
- Gaba V & Antignus Y, 1992. An *in vitro* selection method for a melon variety which regenerates by direct organogenesis. Cucurbit Genetics Cooperative, (15): 65-66.
- Gaba V, Kless H & Antignus Y; 1992. Transformation of melon by particle acceleration. Plant Physiology. (Suppl.), 99, p. 137.
- Galperin M, Patlis L, Ovadia A, Wolf D, Zelcer A & Kenigsbuch D; 2003. A melon genotype with superior competence for regeneration and transformation. Plant Breeding 122, 66-69.
- Gambley RL & Dodd WA, 1990. An *in vitro* technique for the production de novo of multiple shoots in cotyledon explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 20(3): 177-183.
- Gambley RL & Dodd WA, 1991. The influence of cotyledons in axillary and adventitious shoot production from cotyledonary nodes of *Cucumis sativus* L. (cucumber). Journal of Experimental Botany, 42 (242): 1131-1135.
- García-Sogo B, Dabauza M, Roig LA & Moreno V; 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon protoplasts of *Cucumis sativus* 'Wisconsin 2843'. Cucurbit Genetics Cooperative, (15): 40-44.
- García-Sogo B, Pineda B, Castelblanque L, Antón T, Medina Mn Roque E, Torresi C, Pío J, Moreno V & Cañas LA; 2010. Efficient transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* and production of male-sterile plants by engineered anther ablation. Plant Cell Report, 29: 61-77.

- García-Sogo B, Pineda B, Roque E, Antón T, Atarés A, Borja M, Pío J, Moreno V & Cañas LA; 2012. Production of engineered long-life and male sterile *Pelargonium* plants. *BMC Plant Biology* 2012, 12:156.
- García-Sogo B, Roig LA & Moreno V; 1991. Enhancement of morphogenetic response in cotyledon-derived explants of *cucumis melo* induced by copper ion. *Acta Horticulturae* 289:56.
- García-Sogo B; 1990. Morfogénesis en cultivo *in vitro* de melón; regeneración de plantas con alta eficacia a partir de células y protoplastos. Tesis Doctoral. Valencia, España: Universidad de Valencia. Facultad de Ciencias Biológicas. 337p.
- Goergen G, 2016. Generación de líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), identificación de mutantes de inserción afectados en caracteres del desarrollo y caracterización de mutantes de fruto partenocárpico. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Biotecnología, (IBMCP), Valencia, España.
- Gonsalves C, Xue B, Yepes M, Fuchs M, Ling K, Namba S, Chee P, Slightom L & Gonsalves D; 1994. Transferring cucumber mosaic virus-white leaf strain coat protein gene into *Cucumis melo* L. and evaluating transgenic plants for protection against infections. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119 (2): 345-355.
- Gray DJ, McColley DW & Compton ME; 1993. High-frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118 (3): 425-432.
- Grisvard J, Seignac M, Chateau M & Branchard M; 1990. Changes in a repetitive DNA sequence during callus culture of *Cucumis melo*. *Plant Science*, 72(1): 81-91.
- Guis M, Amor MB, Latché A, Pech JC & Roustan JP; 2000. A reliable system for the transformation of cantaloupe charentais melon (*Cucumis melo* L. var. *cantalupensis*) leading to a majority of diploid regenerants. *Scientia Horticulturae*, Vol. 84 (1-2): 91-99.
- Guis M, Roustan JP, Dogimont C, Pitrat M & Pech JC; 1998. Melon Biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 15:1, 289-312.
- Handro W & Floch EIS; 1990. A organização de um laboratório de cultura de recidos de plantas. Torres AC & Caldas LD (eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas*. ABCTP/EMBRAPA-CNPH, Brasília, Brasil, parte II, pp: 29-36.
- Hassanein AM; 2003. Somatic embryogenesis of Cucumber (*Cucumis sativus* L) Using seed cutings obtained from pre-mature fruit. *Plant Biotechnology*, 20(4): 275-281.
- Hellens R & Mullineaux P; 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Science* (5): 446-451.
- Hossain M, Rahman SM, Islam R & Joarder OI; 1993. High efficiency plant regeneration from petiole explants of *Carica papaya* L. through organogenesis. *Plant Cell Reports*, 13: 99-102.
- Jain K & More TA, 1992. *In vitro* regeneration in *Cucumis melo* cv. Pusa Madhuras. *Cucurbit Genetics Cooperative*, (15): 62-64.
- Jeffrey C; 1990. Systematic of the *Cucurbitaceae*: An overview. In Bates DM, Robinson RW & Jeffrey C (eds) *Biology and utilization of the Cucurbitaceae*. Comstock Publication Associates, Cornell University Press, Ithaca, USA.
- Kathal R, Bhatnagar SP & Bhojwani SS; 1994. Plant regeneration from the callus derived from root explants of *Cucumis melo* L. cv. Pusa Sharbati. *Plant Science*, 98(1/2): 137-142.

- Kim YH & Janick K, 1989. Somatic embryogenesis and organogenesis in cucumber. *HortScience*, 24 (4): 702.
- Ladyman JAR & Girard B; 1992. Cucumber somatic embryo development on various gelling agents and carbohydrate sources. *HortScience*, 27 (2): 164-165.
- Li R, Sun Y, Zhang L & Li X; 1990. Plant regeneration from cotyledon protoplasts of Xinjiang muskmelon. *Plant Cell Reports*, 9 (4): 199-203-
- Litz RE & Jarret RL, 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca WM; Mroginski LA (eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, parte A, cap. 7, pp: 143-172
- Lou H & Kako S, 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cucumber. *HortScience*, 29(8): 906-909.
- Lou H & Kako S; 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cucumber. *HortScience*, 29 (8): 906-909
- Lou H & Kako S; 1995. Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. *Scientia Horticulturae*, 64: 11-20.
- Lou H, Obara-Okeyo P, Tamaki M & Kako S; 1996. Influence of sucrose concentration on *in vitro* morphogenesis cultured cucumber cotyledon explants. *Journal of Horticultural Science*, 71 (3): 497-502.
- Mackay WA, NG TJ & Hammerschlag FA; 1989. Direct and indirect regeneration of *Cucumis melo* L. from cotyledon culture. *Cucurbit Genetics Cooperative*, (12): 55-57.
- Maniatis T, Fritsch EF & Sambrook J; 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Mármol J; 2008. *Cultivo intensivo del melón*. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación.
- Mármol J; 2011. *Cultivo del pepino en invernadero*. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación).
- 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(2) ISSN: 1735-8043.
- Mathews H, Schopke C, Carcamo R, Chavarriaga P, Fauquet C & Beachy RN; 1993. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. *Plant Cell Reports*, 13: 328-333.
- Melara MV & Gatica Arias AM; 2009. Effect of BAP and IAA on shoot regeneration in cotyledonary explants of Costa rica melon genotypes. *Agronomía Costarricense* 33(1): 125-131. ISSN: 0377-9424.
- Ministerio de agricultura, pesca y alimentación (www.magrama.gob.es).
- Mohiuddin AKM, Abdullah ZC, Chowdhury MKU & Suhaimi Napis; 2005. Enhancement of adventitious shoot regeneration in *Cucumis sativus* L. using AgNO₃. *Plant Tissue Cult.* 15(1): 15-23, 2005 (June).
- Molina RV & Nuez F, 1995b. Correlated response of *in vitro* regeneration capacity from different source of explants in *Cucumis melo*. *Plant Cell Reports*, 15, (1/2): 129-132.
- Molina RV & Nuez F, 1996. The inheritance of organogenic response in melon. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46 (3): 251-256.

- Moreno V & Roig LA, 1990. Somaclonal variation in cucurbits. En BAJAJ y PS (ed.). *Biotechnology in agricultura and forestry*. Vol. 11. Somaclonal variation in crop improvement I. Springer Verlag Heidelberg, Berlin, p: 435-464.
- Moreno V, M, Granell I, García-Sogo B & Roig LA; 1985. Plant regeneration from calli of melon (*Cucumis melo* L. cv. 'Amarillo oro'). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5: 139-146.
- Msikita W, Skirivin RM, Juvik JA, Splittstoesser WE & Ali N; 1990. Regeneration and flowering *in vitro* of 'Burpless Hybrid' cucumber cultured from excised seed. *HortScience*, 25 (4): 474-477.
- Nadolska-Orczyk A & Malepszy S, 1989. *In vitro* culture of *Cucumis sativus* L. 7. Genes controlling plant regeneration. *Theoretical and Applied Genetics*, 78 (6): 836-840.
- Nanasato Y, Konogaya K, Okuzaki A, Tsuda M & Tabei Y; 2012. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by combination of vacuum infiltration and co-cultivation on filter paper wicks. *Plant Biotechnol Rep*. DOI 10.1007/s11816-012-0260-1.
- Niedz RP, Smith SS, Dumbar KB, Stephens CT & Musakishi HH; 1989. Factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 18 (3): 313-319.
- Nora FR, Peters JA, Schuch MW, Lucchetta L, Marini L, Silva JA & Rombaldi CV; 2001. Melon regeneration and transformation using an apple ACC oxidase antisense gene. *Rev. Bras. De Agrociência*, v.7 n 3, p.201-204.
- Nuñez-Palenius HG, Cantliffe DJ, Huber DJ, Ciardi J & Klee H; 2006. Transformation of muskmelon 'Galia' hybrid parental line (*Cucumis melo* L. var. *reticulatos* Ser.) with an antisense ACC oxidase gene. *Plant Cell Rep*, 25: 198-205.
- Nuñez-Palenius HG, Febres VJ, Ochoa-Alejo N, Klee HJ, & Cantliffe DJ; 2007. Effect of explant source on refeneration and genetic transformation efficiency in Galia melon (*Cucumis melo* L.) male and female parental lines. Horticultural Sciences Department. IFAS. University of Florida, Gainesville, FL 32611, USA.
- Nuñez-Palenius HG, Gomez-Lim M, Ochoa-Alejo N, Gumet R, Lester G & Cantliffe DJ; 2008. Melon Fruits: Genetic Diversity, Physiology, and Biotechnology Features. *Journal Critical Reviews in Biotechnology*, Volume 28.
- Orts MC, García-Sogo B, Roche MV, Roig LA & Moreno V; 1987. Morphogenetic response of calli derived from primary explants of diverse cultivars of melón. *HortScience*, 22(4): 666.
- Orts MC, Roche MV, Salvador A, García-Sogo B, Roig LA & Moreno V; 1986. Características culturales y morfogenéticas de dos mutantes recesivos de melón: 'Yellos-Green' y 'Halo'. *Actas de II Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas*, vol. II, pp: 861-869. Córdoba, España.
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S & Lamattina L; 2002. Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology* Vol. 129.
- Punja ZK, Abbas N, Sarmento GG & Tang FA; 1990a. Regeneration of *Cucumis sativus* var. *sativus* and *C. sativus* var. *hardwickii*, *C. melo*, and *C. metuliferus* from explants through somatic embryogenesis and organogenesis. Influence of explant source, growth regulator regime and genotype. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21 (2): 93-102.
- Punja ZK, Abbas N, Sarmento GG & Tang FA; 1990a. Regeneration of *Cucumis sativus* var. *sativus* and *C. sativus* var. *hardwickii*, *C melo*, and *C. metuliferus* from explants through somatic

- embryogenesis and organogenesis. Influence of explant source, growth regulator regime and genotype. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21 (2): 93-102.
- Ren Y, Bang H, Curtis IS, Gould J, Patil BS & Crosby KM; 2012. *Agrobacterium*-mediated transformation and shoot regeneration in elite breeding lines of western shipper cantaloupe and honeydew melons (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 108:147–158.
- Rhimi A, Fadhel NB & Boussaid M; 2006. Plant regeneration via somatic embryogenesis from *in vitro* tissue culture in two Tunisian *Cucumis melo* cultivars Maazoun and Beji. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Volume 84 (2): 239-243.
- Rhimi A, Hernould M & Boussaid M; 2007. *Agrobacterium* mediated transformation of Tunisian *Cucumis melo* cv. Maazoun. *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (18), pp. 2162-2165.
- Sanchez S, 2016. Generación de mutantes de inserción de tomate cultivado y Silvestre e identificación de genes implicados en procesos de desarrollo y tolerancia a estrés abiótico. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Biotecnología, (IBMCP), Valencia, España.
- Selvaraj N, Vasudevan A, Manickavasagam M & Ganapathi A; 2006. *In vitro* organogenesis and plant formation in cucumber. *Biologia Plantarum* 50(1): 123-126.
- Selvaraj N, Vasudevan A, Manickavasagam M, Kasthuthitengan S & Ganapathi A; 2007. High frequency shoot regeneration from cotyledon explants of cucumber via organogenesis. *Scientia Horticulture* 112 (2007) 2-8.
- Sharma M, Kothari-Chajer A, Jagga-Chug S & Kothari SL; 2010. Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Eleusine coracana* L. Gaertn. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* Vol. 105: 93-104.
- Sistema estadístico descentralizado de la FAO (www.faostat.fao.org.com).
- Soriano B, 2012. Morfogénesis *in vitro* y obtención de plantas transgénicas de melón (*Cucumis melo* L.). Universidad de Almería, Escuela Superior de Ingeniería, departamento de biología vegetal y ecología.
- Srivastava DR, Andrianov VM & Piruzian ES; 1989. Tissue culture and plant regeneration of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad. cv. Melitopolski). *Plant Cell Rep.* 83300-302.
- Stachel SE, Messens E, Montagu M & Zambryski P; 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, Volume 318, Issue 6047, pp. 624-629.
- Tabassum B, Nasir IA, Farooq AM, Rehman Z, Latif Z & Husnain T; 2010. Viability assessment of *in vitro* produced synthetic seeds of cucumber. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(42), pp. 7026-7032.
- Tabei Y, Kanno T & Nishio T; 1991. Regulation of organogenesis and somatic embryogenesis by auxin in melon, *Cucumis melo* L. *Plant Cell Reports*, 10 (5): 225-229.
- Truslon AJ & Shahin EA; 1986. *In vitro* plant regeneration in the genus *Cucumis*. *Plant Science*, 47 (1): 35-43.
- Usman M, Hussain Z & Fatima B; 2011. Somatic embryogenesis and shoot regeneration induced in cucumber leaves. *Pak. J. Bot.*, 43(2): 1283-1293.
- Vallés MP & Lasa JM; 1993. *Agrobacterium*-mediated transformation of commercial melon (*Cucumis melo* L., cv. Amarillo oro). *Plant Cell Reports* Vol. 13 (3): 145-148.

- Vasudevan A, Ganapathi A, Selvaraj N, Muruganatham M & Vengadesan G; 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). Cucurbit Genetics Cooperative Report 25: 14-16.
- Vasudevan A, Selvaraj N, Ganapathi A & Choi CW; 2007. *Agrobacterium*-mediated Genetic transformation in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). American Journal of Biotechnology and Biochemistry 3 (1): 24-32, 2007.
- Whener TC & Locy RD; 1981. *In vitro* adventitious shoot and root formation of cultivars and lines of *Cucumis sativus*. HortScience 16: 759.
- Yadav RC, Saleh MT & Grumet R; 1996. High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 45(3): 207-214.
- Yalcin-Mendi NY, Ipek M, Serbest-Kobaner S, Curuk S, Aka Kacar Y, Cetiner S, Gaba V & Grumet R; 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation of Kirkagac 637 a recalcitrant melon (*Cucumis melo*) cultivar with ZYMV coat protein encoding gene. Europ J Hort Sci 69: 258-262.
- Yamazaki S, Fuji N & Takahashi H; 2003. Characterization of ethylene effects on sex determination in cucumber plants. Sex. Plant. Reprod.16: 103-111.
- Yasmin A & Debener T; 2010. Transient gene expression in rose petals via *Agrobacterium* infiltration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 102 (2): 245-250.
- Yin Z, Szwacka M, Malinowski R & Malepszy S; 2004. Differences in the inheritance stability of kanamycin resistance between transgenic cucumbers (*Cucumis sativus* L.) containing two constructs. Journal Apply Genetics 45(3): 307–313.
- Zhang M & Cui H, 2001. Stimulatory effects of different Cytokinin on direct plant regeneration from cotyledon explants in *Cucumis sativus* L. Cucurbit Genetics Cooperative Report 24: 13-16.
- Zhang XP, Rhodes BB & Adelberg JW; 1994. Shoot regeneration from immature cotyledons of watermelon. Cucurbit Genetics Cooperative Report, (17): 111-115.
- Zhu C & Chen Z, 2005. Role of polyamines in adventitious shoot morphogenesis from cotyledons of cucumber *in vitro*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 81: 45-53.
- 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 Science, 47 (2): 115-122.