

**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA**

**TITULACIÓN DE INGENIERÍA TÉCNICA AGRÍCOLA
HORTOFRUTICULTURA Y JARDINERÍA**

**MORFOGÉNESIS *IN VITRO* Y
OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE
MELÓN (*Cucumis melo* L.)**

ALUMNA:

Beatriz Soriano Vicente

TUTORA:

Dra. María Trinidad Angosto Trillo

ALMERIA, MAYO DE 2012

ÍNDICE

1.INTERÉS Y OBJETIVOS.....	2
2.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1.EL MELÓN (<i>Cucumis melo</i> L.).....	6
2.1.1.DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y ORIGEN.....	6
2.1.2.DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA.....	7
2.1.3.TIPOS VARIETALES.....	8
2.2.CULTIVO DEL MELÓN.....	11
2.3.COMERCIALIZACIÓN E IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CULTIVO DEL MELÓN.....	12
2.4.MEJORA GENÉTICA DEL MELÓN.....	18
2.4.1.EL CARÁCTER “LARGA VIDA” EN MELÓN.....	18
2.4.2.RESISTENCIAS A ESTRESSES BIÓTICOS.....	21
2.4.3.RESISTENCIAS A ESTRESSES ABIÓTICOS.....	22
2.4.4.OBTENCIÓN DE HAPLOIDES (H) Y DOBLE HAPLOIDES (DH).....	23
2.5.CULTIVO <i>IN VITRO</i> Y ALTERNATIVAS BIOTECNOLÓGICAS EN LA MEJORA DEL MELÓN.....	24
2.5.1.REGENERACIÓN DE PLANTAS MEDIANTE CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES.....	24
• Regeneración <i>in vitro</i> a partir de yemas preexistentes	
• Regeneración adventicia mediante cultivo de explantes primarios	
2.5.2.TRANSFORMACIÓN GENÉTICA.....	25
• Estructura y mecanismo de infección de <i>Agrobacterium</i> .	

• Transformación genética de plantas mediada por <i>Agrobacterium</i>	
• Estrategias de transferencia de genes en Cucurbitáceas	
• Transformación genética y mejora en melón	
3.MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
3.1.MATERIAL VEGETAL.....	40
3.2.SOLUCIONES MINERALES Y MEDIOS DE CULTIVO.....	41
• Solución mineral MS (Murashige y Skoog, 1962)	
• Medio de germinación (MG)	
• Medios de inducción de organogénesis (MIO)	
• Medio de crecimiento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (LB)	
• Medio de lavado (ML)	
• Medio de enraizamiento (ME)	
3.3.TÉCNICAS BÁSICAS DE CULTIVO.....	42
3.3.1. ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS.....	42
3.3.2. OBTENCIÓN DE PLANTAS AXÉNICAS.....	42
3.3.3. OBTENCIÓN DE EXPLANTES DE COTILEDÓN A PARTIR DE PLÁNTULAS AXÉNICAS.....	42
3.3.4. CULTIVO DE EXPLANTES PRIMARIOS.....	43
3.3.5. OBTENCIÓN DE PLANTAS AXÉNICAS POR CULTIVO DE ÁPICES MERISTEMÁTICOS.....	43
3.3.6. REGENERACIÓN DE PLANTAS A PARTIR DE EXPLANTES.....	43
3.3.7. PROPAGACIÓN CLONAL DE PLANTAS.....	44
3.4. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA.....	45
3.4.1. PREPARACIÓN DEL CULTIVO BACTERIANO PARA LA TRANSFORMACIÓN.....	45

3.4.2.MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN: SELECCIÓN Y REGENERACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.....	46
3.5.ANÁLISIS DEL NIVEL DE PLOIDIA.....	47
3.6.ANÁLISIS DEL NIVEL DE RESISTENCIA A KANAMICINA EN TRANSFORMANTES PRIMARIOS.....	48
3.7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DELATOR <i>Uida</i>	48
4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
4.1.CRECIMIENTO Y APTITUD ORGANOGÉNICA EN EXPLANTES PRIMARIOS DE MELÓN.....	50
4.1.1.EFECTO DEL CULTIVAR Y DEL MEDIO DE INDUCCIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO EN EXPLANTES PRIMARIOS.....	51
4.1.2.EFECTO DEL CULTIVAR Y DEL MEDIO DE INDUCCIÓN SOBRE LA RESPUESTA ORGANOGÉNICA EN EXPLANTES PRIMARIOS.....	60
4.2.TRANSFORMACIÓN GENÉTICA CON LOS GENES <i>NPT-II</i> Y <i>GUS</i>	65
4.3.EVALUACIÓN DEL NIVEL DE PLOIDIA DE LOS TRANSFORMANTES PRIMARIOS (tg1).....	71
4.4.ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>GUS</i> EN CALLOS ORGANOGÉNICOS.....	73
5.CONCLUSIONES.....	76
6. BIBLIOGRAFIA.....	78

1. INTERÉS Y OBJETIVOS

1. INTERÉS Y OBJETIVOS

El melón (*Cucumis melo* L.) pertenece a la familia Cucurbitaceae y presenta unos fruto clasificados como climatéricos, altamente perecederos en función de una elevada proporción de agua y de la producción de etileno, baja acidez y de una estructura celular con grandes vacuolas (Pech y col., 1994). A su vez, el melón constituye una de las frutas más consumidas ya que ocupa el cuarto lugar en todo el mundo y entre sus principales productores a nivel mundial destaca España. La mayor parte del melón producido en España se destina a mercados del norte y el centro de Europa (Deulofeu, 1997). Por ello, las empresas distribuidoras solicitan al productor como parámetro de calidad tener el menor número posible de mermas durante el transporte. Para controlar la baja durabilidad, la asociación de técnicas bioquímicas, moleculares y de cultivos *in vitro* ha posibilitado la mejora genética buscando y/o controlando la expresión de genes implicados en la biosíntesis de etileno, posibilitando la obtención de frutos con maduración retardada tras la recolección (Silva y col., 2004). En este contexto apareció el melón tipo Galia, procedente de un tipo Zuila (muy común en la ribera sur del Mediterráneo pero que presenta una conservación muy limitada pero una gran calidad interna) mejorado con un melón que le aporta una mayor transportabilidad.

Además, el melón es un cultivo que presenta un gran número de enfermedades y plagas que causan grandes pérdidas en la productividad de los cultivos. De ahí que uno de los principales objetivos de mejora sea la introducción de genes de resistencia. La falta de fuentes de resistencia entre las líneas y cultivares de *C. melo* ha dificultado la utilización de las técnicas clásicas de mejora. Sin embargo, si se han utilizado otras especies silvestres relacionadas para introducir resistencias tales como *C. anguria* var. *longipes* (De Ponti, 1978; Kroon y col., 1979; Lebeda, 1984; Esteva y col., 1988; Thomas y More, 1990). El uso de esta y otras variedades silvestres de *Cucumis* como donadoras de resistencia ha sido un hándicap por los problemas de incompatibilidad sexual con *C. melo* lo que limita la hibridación interespecífica. Por ello, se están desarrollando técnicas de cultivos *in Vitro*

que incrementen la regeneración y organogénesis y así permitir la obtención de híbridos somáticos y la hibridación molecular. Se ha descrito métodos de regeneración de callos de protoplastos obtenidos en experimentos de hibridación en el tipo Charentais y otras líneas de melón (Moreno y col., 1985; Tabei y col., 1987; Ooasawa y col., 1989; García-Sogo, 1990; Li y col., 1990; Yamanaka y col., 1990; Bokelmann y col., 1991; Toyoda y col., 1991; Debeaujon y Branchard, 1992; Jarl y col., 1995).

El cultivo de tejidos *in vitro* encaminado a la regeneración de plantas engloba un grupo de técnicas mediante las cuales un explante se cultiva en un medio de composición química definida y bajo condiciones de incubación controladas. Sin embargo, la expresión *in vitro* de una determinada respuesta morfogénica, caracterizada por la aparición de nuevos órganos, es la consecuencia de la interacción de procesos de inducción, competencia, determinación y diferenciación celular, los cuales están influenciados por numerosos factores, tales como el genotipo de la planta donante y su desarrollo, el tipo de explante, la composición del medio nutritivo y el ambiente físico de cultivo (Ammirato, 1986; Liu y Pijut, 2008). La elección del material vegetal de partida está determinada por la facilidad de regenerar plantas a partir de células somáticas de distinto origen, como pueden ser explantes primarios de raíz, hipocotilo, peciolo, hoja o cotiledón ya que la capacidad de regeneración varía por la propia naturaleza del explante.

La transformación genética se puede definir como la transferencia de genes foráneos aislados a partir de diferentes organismos (virus, bacterias, plantas o animales) a un nuevo contexto genético. En la transformación genética de plantas se persigue como objetivo la integración cromosómica, expresión heredabilidad estable del transgén de interés. La transferencia de ADN foráneo se puede realizar también aprovechando las propiedades biológicas de las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes*. Este vector biológico es altamente eficiente para la transferencia de genes.

El objetivo central de este Proyecto Final de Carrera es el desarrollo de métodos que permitan la introducción de genes foráneos en el acervo

genético del melón mediante transformación genética. Lo que se ha pretendido es abrir un camino que permita la aplicación de estrategias basadas en la ingeniería genética para abordar objetivos de mejora en esta importante especie hortícola.

En concreto los objetivos de este proyecto fin de carrera son:

PRIMERO.- Poner a punto un sistema para la regeneración *in Vitro* de plantas de melón de diferentes tipos varietales a partir de distintos tipos de explantes primarios.

SEGUNDO.- Desarrollar un método de transformación genética mediante co-cultivo de explantes de melón con *Agrobacterium tumefaciens*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. EL MELÓN (*Cucumis melo* L.)

2.1.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y ORIGEN

A nivel taxonómico la familia *Cucurbitaceae* comprende dos subfamilias (*Zanonioiceae* y *Cucurbitaceae*), 8 tribus, 118 géneros y 825 especies (Jeffrey, 1990). Entre ellas se encuentran el melón (*Cucumis melo* L.), el pepino (*Cucumis sativus* L.), la calabaza (*Cucúrbita pepo* L.), la sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.), que son las de mayor relevancia económica, y más de 40 especies silvestres (Esquinas-Alcázar y Gulick, 1983).

El origen del melón se sitúa en el sur de Asia donde se pueden encontrar especies silvestres. Parece ser que procede exactamente de Irán, desde donde se extendió hacia Egipto. El melón se cultiva prácticamente en todos los lugares del mundo que posean un clima cálido y poco lluvioso. Los principales productores mundiales son China, España e Irán, entre los numerosos países que cultivan la especie. El melón constituye una de las frutas más consumidas ya que ocupa el cuarto lugar entre las frutas consumidas en todo el mundo, después de las naranjas, los plátanos y las uvas.

A nivel botánico, el melón fue descrito por primera vez por Linneo en su obra *Species plantarum* con el nombre de *Cucumis melo* (Linnaeus, 1753) y hasta hoy se clasifica con el mismo nombre. Entre las Angiospermas, el melón se encuentra dentro de los siguientes taxones (Jeffrey, 1990):

Clase: *Dicotyledoneae*

Subclase: *Dilleiniideae*

Superorden: *Violanae*

Orden: *Cucurbitales*

Familia: *Cucurbitaceae*

Subfamilia: *Cucurbitoidae*

Género: *Cucumis*

Especie: *Cucumis melo* L.

2.1.2. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

El melón es una planta anual herbácea, de porte rastrero o trepador (si se le facilita un entutorado apropiado), propio de cultivos intensivos de secano y regadío. El tallo principal está recubierto de formaciones pilosas y presentan nudos en los que se desarrollan hojas, zarcillos y flores, brotando nuevos tallos de las axilas de las hojas. El tallo puede llegar a medir hasta 5 metros.

Las hojas tienen el limbo orbicular aovado, reniforme o pentagonal, dividido en 3-7 lóbulos con los márgenes dentados y son vellosas por el envés.

Las flores son solitarias, de color amarillo 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, aunque siempre junto a las masculinas. (Maroto 2002). El nivel de elementos fertilizantes influye en gran medida sobre el número de flores masculinas, femeninas y hermafroditas así como sobre el momento de su aparición. En la regulación genética de la expresión de la sexualidad del melón están implicados tres genes, A/a, G/g y M/m, cuyas combinaciones alélicas permiten explicar 5 fenotipos diferentes (Kenisgbuch y Cohen, 1990):

A _ G _ _ _ monoico, con flores femeninas y masculinas

A _ g g m m ginoico, con flores femeninas

a a G _ _ _ andromonoico, con flores masculinas y hermafroditas

a a g g _ _ hermafrodita

A A g g M _ ginomonoica, con flores hermafroditas y femeninas

Los genotipos monoico y andromonoico son los más comunes y la polinización es entomófila.

La forma del fruto es variable (esférica, elíptica, aovada, etc.). La corteza de color verde, amarillo, anaranjado, blanco, etc., puede ser lisa, reticulada o estriada. La pulpa puede ser blanca, amarilla, cremosa, anaranjada, asalmonada o verdosa. La placenta contiene las semillas y puede ser seca, gelatinosa o acuosa, en función de su consistencia. Las semillas se

presentan en un número que varía de 200 a 600 unidades por fruto. La viabilidad o capacidad germinativa media de las semillas de melón suele ser de unos 5 años, siempre y cuando las condiciones de conservación sean óptimas (Maroto, 2002). Resulta importante que la placenta sea pequeña para que no reste pulpa al fruto y que las semillas estén bien situadas en la misma para que no se muevan durante el transporte.

2.1.3. TIPOS VARIETALES

Durante muchos años se ha buscado clarificar la clasificación botánica de la especie *Cucumis melo* L. a nivel subespecífico, pero ninguna recogía satisfactoriamente todos los tipos varietales y sus hibridaciones. La más aceptada es la propuesta por Naudin (1859), que se basa en un sistema multinivel asentado en la idea de series homólogas. Se compone de cuatro variedades y cada una está dividida en dos subespecies, *cultus* (tipos cultivados) y *agreste* (tipos salvajes), que a su vez se dividen en diferentes tipos. La mayoría de las clasificaciones interespecíficas de melón son revisiones y modificaciones de la propuesta por Naudin (1859) (Nuez y col., 1996; Robinson y Deckeer-Walters, 1997; Pitrat y col., 2000). A continuación se detallan los tipos varietales de melón de que se compone este sistema de clasificación:

1. *C. melo* var. *cantalupensis* Naud. Melones “cantalitos”. Se caracterizan por frutos de tamaño medio, escriturados, aromáticos y con la carne color naranja aunque algunas la presentan verde. Comprende los tipos varietales:

- Cantalupo (Fig. 1). Frutos redondos o elípticos. Piel lisa o reticulada con los meridianos bien marcados en color verde y el casco en verde grisáceo. La carne es de color anaranjado, dulce y de aroma característico.
- Galia (Fig. 1). Fruto esférico con escriturado fino y denso. La corteza en la madurez es de color amarillo-anaranjado. La carne es verdosa, con un contenido en azúcares elevado.
- Ogen. Fruto redondeado con corteza verde oscuro, escriturada y apostillada. La carne es de color verde claro.

2. *C. melo* var. *reticulatus* Naud. En este grupo se encuentran los melones “italianos” o “muskmelon” (Fig. 1). El tamaño del fruto es medio, de forma elíptica o redondeada y con la corteza muy escriturada. Tiene la carne de color verde o salmón, bastante aromática y de consistencia suave.



Figura 1.- Muestra de diferentes tipos varietales de melón. De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo: Melón Amarillo, Melón Cantalupo, Melón Charentais, Melón Galia, Melón Honey Dew, Melón Muskmelon, Melón Piel de Sapo, Melón Rochet y Melón Tendral.

3. *C. melo* var. *saccharinus* Naud. Frutos de tamaño medio muy resistentes al transporte debido a su piel gruesa, que puede ser lisa o moteada. La componen los tipos:

- Ananas. Frutos grandes de forma globosa u ovalada con corteza con un reticulado fino y color anaranjado. Su carne es de color amarillento, de agradable sabor y alto contenido en azúcares.

- Mallorquín. Frutos redondeados y de reticulado manifiesto. La carne es de color amarillento, de agradable sabor y alto contenido en azúcares.

4. *C. melo* var. *inodorus* Naud. En este grupo se encuentran los melones de invierno. Se cultivan en climas cálidos y secos. La forma del fruto es alargada y no son dehiscentes al madurar. Su maduración es tardía, con buenas cualidades para la conservación durante largos periodos. Los tipos más conocidos dentro de este grupo varietal son:

- Honey Dew (Fig. 1). Son frutos de piel y carne de color blanco y no presenta manchas ni reticulado. La forma suele ser redondeada o ligeramente elíptica.

- Piel de Sapo o Pinyonet (Fig. 1). Los frutos son ovalados y ligeramente asurcados. La piel es de color verde con manchas en tonalidades más oscuras. Algunos cultivares presentan escriturado en la madurez. La carne es de color blanco, crujiente y tiene un alto contenido en azúcar.

- Rochet (Fig. 1). Sus frutos ovalados, con la piel verde clara sin manchas lisa o con muy escasa rugosidad. La carne es blanca, crujiente y muy dulce.

- Tendral (Fig. 1). Frutos ovalados con la piel asurcada, rugosa y de un grosor destacable, lo que le hace muy apto para la conservación y el transporte. La carne es blanca y crujiente con un contenido en azúcares medio-alto.

- Amarillo (Fig. 1). Los frutos son ovalados o redondos, con la corteza lisa y de color amarillo al madurar, sin escriturado ni manchas. La carne es blanca, de textura crujiente y dulce.

Estos cuatro tipos se suelen encontrar agrupados bajo el epígrafe “tipo Español”.

4. *C. melo* var. *flexuosus* Naud. Los frutos son delgados y largos, pueden ser rectos o curvados. Se les llama melones “serpientes”. Se clasifican como pepino porque se suelen utilizar en ensaladas.

5. *C. melo* var. *conomon* Makino. Melón de encurtido. Presenta frutos pequeños con piel lisa. Su carne es blanca, blanda y con muchos azúcares.

6. *C. melo* var. *chito* Naud. Frutos lisos del tamaño de una naranja y de sabor ácido. Se emplean para conservas y encurtidos y también se cultivan como ornamentales.
7. *C. melo* var. *dudaim* Naud. Los frutos son aplastados, del tamaño de media naranja, con la piel de color amarillento jaspeada de tono oscuro y pubescente incluso en la madurez. Se utilizan como ornamentales.
8. *C. melo* var. *acidulus* Naud. Melones ácidos. Aquí se agrupan varios cultivares monoicos caracterizados por tener frutos pequeños de consistencia firme, de piel lisa y carne crujiente. Se suelen comer cocinados.
9. *C. melo* var. *agrestes* Naud. Son los conocidos como “melones silvestres”. Este tipo varietal se caracteriza porque tienen frutos pequeños e incomedibles.

2.2. CULTIVO DEL MELÓN

Los diferentes ciclos de cultivo de melón en España son (Cantón, 1999):

- Ciclo extratemprano. La siembra en semilleros se hace en diciembre, el transplante a invernaderos se realiza en febrero y la recolección suele iniciarse a finales del mes de abril. Este ciclo se sigue cuando se utilizan modernos híbridos, principalmente Cantalupos y Galia, en el cultivo para la exportación más precoz del litoral mediterráneo español (principalmente en Almería y Murcia).
- Ciclo temprano. La siembra se realiza entre mediados de marzo y abril y la recolección comienza a mediados de junio. Este ciclo es característico de determinadas zonas del litoral mediterráneo en la producción de melones precoces. La siembra suele ser directa, aunque también se puede hacer en semilleros.
- Ciclo normal-tardío. La siembra se efectúa en abril o mayo (en la época libre de heladas), mediante siembra directa, iniciándose la recolección a partir de mediados de julio. Con variedades tardías y en secano la recolección se prolonga hasta el mes de septiembre. Este es un ciclo típico de las regiones del interior peninsular.

Dependiendo del ciclo de cultivo que se adopte se utilizarán las variedades más apropiadas y se le realizarán las labores que correspondan.

El melón es una planta muy exigente en temperatura, de tal forma que detiene su crecimiento por debajo de los 12°C y es sensible a las heladas. La temperatura óptima del crecimiento vegetativo, aunque es variable según los cultivares, se sitúa entre 18 y 24°C, siendo fundamental la temperatura del suelo a nivel radicular, para que haya una adecuada absorción del agua. Para que haya una buena polinización se requiere que la temperatura no descienda de 18°C, alcanzando unos valores óptimos entre 20-22°C. La maduración del fruto requiere un óptimo térmico de 25-30°C. Temperaturas excesivamente altas (superiores a 40°C) pueden producir quemaduras en los frutos, así como afectar de forma negativa a la calidad de la producción. Llegando incluso a descomponer la carne del fruto.

Es resistente a la sequía y muy exigente en cuanto a la iluminación, favoreciendo ésta su desarrollo en todos los sentidos. En cuanto al suelo, prefiere los suelos ricos, profundos y mullidos, bien aireados y sin encharcamiento. No le conviene los suelos ácidos, adaptándose bien a suelos con pH neutros o ligeramente alcalinos. Está considerado como un cultivo moderadamente resistente a la salinidad.

2.3. COMERCIALIZACIÓN E IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL MELÓN

La gran diversidad que presenta el melón ha contribuido a la obtención de multitud de cultivares/variedades adaptadas perfectamente a determinadas zonas de producción, y especialmente, a diferentes hábitos de consumo. La constante ha sido el consumo local, utilizando las variedades propias de esa zona de producción ya que, aún contando con cierto potencial de conservación, no era suficiente para comercializar a grandes distancias.

Con la internacionalización del comercio y la mejora de la logística en los mercados europeos y de EEUU, comenzaron a conocer el melón, y actualmente forma parte de sus hábitos alimenticios. Esto hizo que dejara de ser un producto de consumo local para pasar a ser un fruto conocido y cotizado.

El primer problema que se planteó fue encontrar un melón con la suficiente conservación para ser transportado desde las zonas de producción hasta las de consumo. En principio, esto se solucionó utilizando variedades con adecuada conservación natural como es el caso de los melones Tendrales y Amarillos en Europa, y Cantalupo, Amarillos y Honey Dew en EEUU. Sin embargo, estas variedades no son las más apreciadas, puesto que su calidad organoléptica es inferior a otras variedades de consumo local de mala conservación. Este es el caso del tipo Piel de Sapo, el cual tiene suficiente transportabilidad como para ser consumido en el norte de Europa, pero a consecuencia de que no muestra un signo exterior de madurez, no es apreciado en estos mercados.

Actualmente, gran parte del melón de este tipo que se cultiva en España se destina a mercados del norte y el centro de Europa, con más poder adquisitivo (Deulofeu, 1997). En concreto, prácticamente el 99% de estos melones se exportan a Alemania, Reino Unido y Países Nórdicos (Cantón, 1999).

Las empresas distribuidoras solicitan al productor una calidad tal que se tengan el menor número posible de mermas durante el transporte y en sus estanterías. La calidad es un carácter variable que está en función de la demanda (Cubero, 2003). Lo que se persigue es un melón de calidad uniforme, con un signo externo de madurez y con una adecuada conservación (Navarro, 1997).

Actualmente el melón se recolecta antes de llegara su madurez comercial, para que cuando llegue al mercado de destino haya alcanzado la madurez. El momento de corte depende del tiempo que se tardará en consumir y de las condiciones en las que se mantenga. Con lo que el corte del fruto se debe anticipar bastante con respecto al momento óptimo de cosecha. El fruto de melón se debería recolectar cuando alcanza el contenido máximo de azúcar, dentro de su madurez fisiológica, ya que una vez cortado no es capaz de aumentar el contenido en sacarosa, puesto que ello depende, principalmente, del transporte desde la parte vegetativa de la planta (Serrano, 1996). Esta diferencia de tiempo entre el momento de corte real y

el momento de corte teórico ocasiona una paridad de calidad del fruto, puesto que no se alcanzan ni el aroma ni el sabor óptimo.

En los últimos años la superficie de melón ha ido disminuyendo, aunque la producción se ha ido manteniendo prácticamente igual. Esto indica la utilización de variedades híbridas de mayor rendimiento y una mejora y especialización del cultivo.

Para abastecer el mercado de melón, Europa realiza importaciones procedentes principalmente de Brasil (41.8%), Costa Rica (22.2%), Israel (13.5%), Marruecos (11.1%), Honduras (3.6%), Ecuador (1.4%), Guatemala (1.2%), África Del Sur (1.1%), República Dominicana (0.7%), Venezuela (0.6%) y el resto de las exportaciones son cubiertas por otros países (2.9%) (Fig. 2).

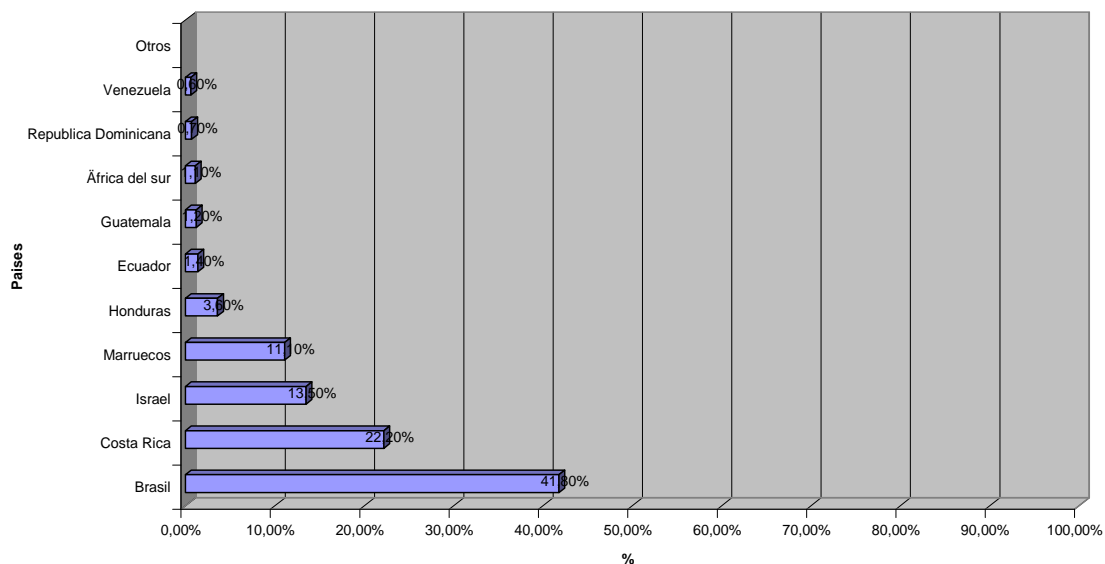


Figura 2.- Principales países importadores: Principales países importadores del mundo expresado en tanto por ciento. Fuente: Infoagro (2011).

La producción española de melón se sitúa en torno a las 1.000.000 toneladas con una superficie sembrada que gira en torno a las 29.500 hectáreas. Se concentra en la mitad sur de la Península siendo Castilla-La Mancha la primera región en superficie y producción con el 35% del total nacional (Fig. 3).

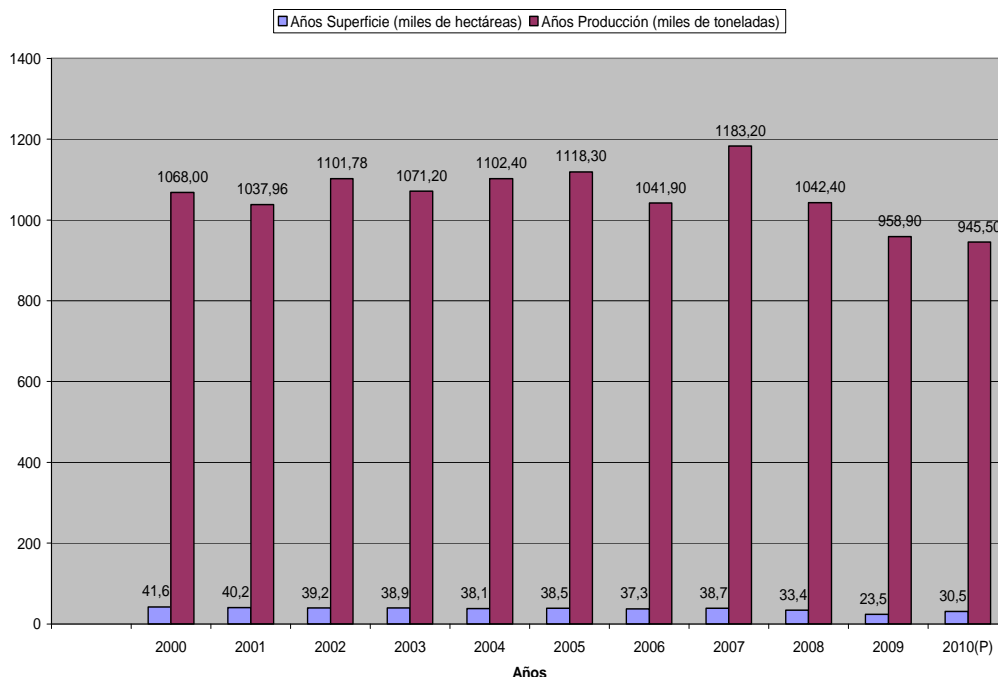


Figura 3.- Evolución de la superficie de melón cultivada en España (en miles de hectáreas) y evolución de su producción (en miles de toneladas). Fuente: M.A.R.M. (2011).

Ciudad Real aporta el grueso productivo con unas 8.400 hectáreas y un volumen comercial que supera las 297.000 toneladas. Tras esta región, le siguen en importancia Andalucía, Murcia, Extremadura y Comunidad Valenciana.

Murcia ocupa un lugar de referencia en el negocio de las cucurbitáceas y su producción supera las 227.000 toneladas (Fig. 4).

Almería es la provincia tercera en producción y la más precoz siendo la que marca el inicio de la campaña. En el año 2009 puso en el mercado un grueso de 166.660 toneladas (Fig. 4).

Del resto de provincias productoras, Sevilla llega a producir hasta 33.000 toneladas de melón. Alicante supera el umbral de las 31.000 toneladas. La provincia mantiene esta tendencia alcista desde principios de esta década. Badajoz aporta 65.000 toneladas de melón verde piel de sapo y blanco, destinadas al consumo local y Portugal (Fig. 4).

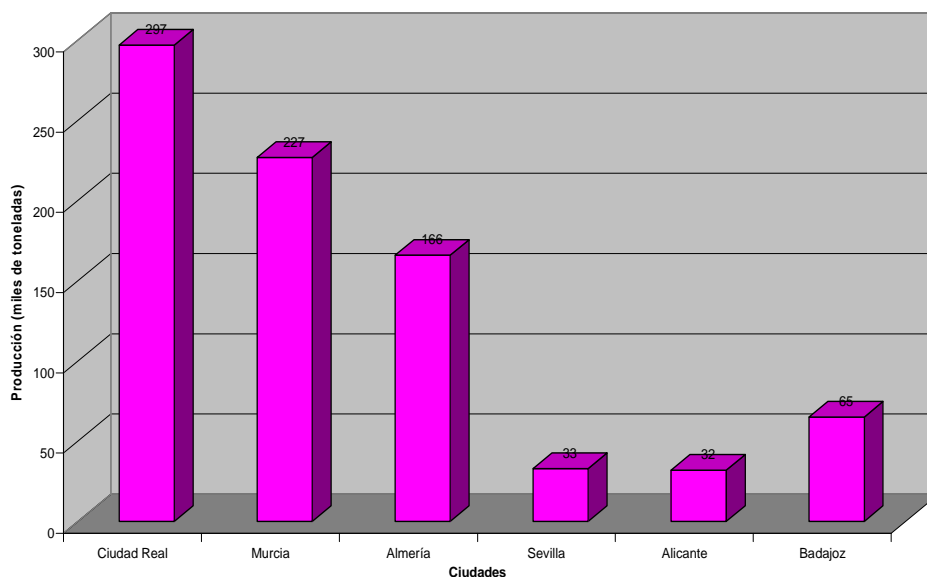


Figura 4.- Principales provincias productoras de melón en España, expresado en miles de toneladas. Fuente: M.A.R.M. (2011).

Como ya hemos comentado, Almería ocupa uno de los primeros puestos en producción. La evolución en el número de hectáreas dedicadas a melón en la provincia de Almería ha sido ascendente hasta el año 1998, que marcó un record de producción con 266.500 toneladas. En años posteriores, el número de hectáreas y, por tanto, la producción han entrado en una línea descendente (Fig. 5).

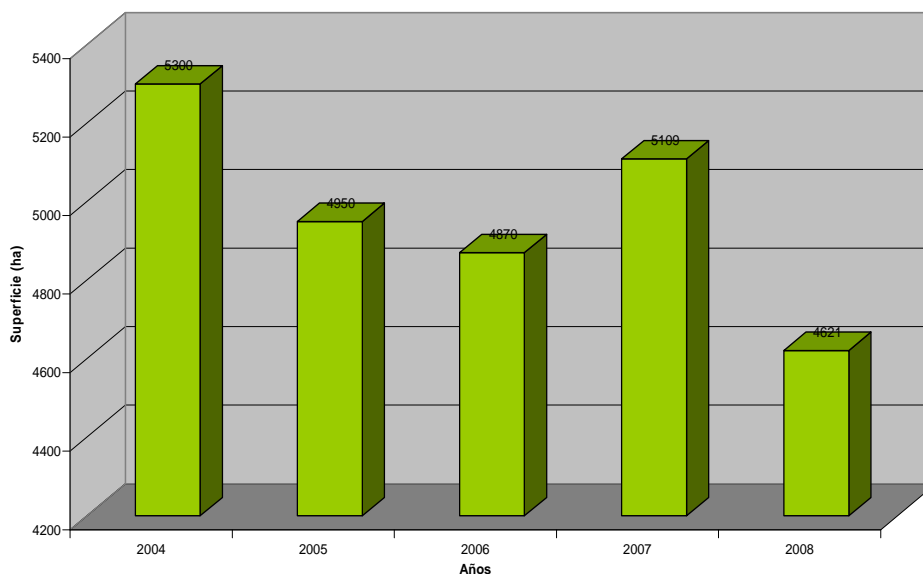


Figura 5.- Evolución de la superficie (expresada en hectáreas) de melón cultivada en Almería desde 2004 hasta 2008. Fuente: Consejería de Agricultura de la Junta de Andalucía (2011).

La campaña 2008 supuso una producción total de melón de 186.620 toneladas con una disminución de la superficie cultivada respecto al año 2007 de 488 hectáreas. Esta disminución en superficie no lleva consigo implícita una disminución en la producción, si no que se mantuvo. La superficie total alcanzó las 4.621 hectáreas (Fig. 5).

En cuanto a la exportación, decir que España es el primer exportador del mundo del melón y dentro de este negocio, Almería ocupa un lugar de privilegio en el universo hortícola. En la campaña 2008, Almería exportó un total de 181.152 toneladas de melón. Las exportaciones de melón supusieron un 6% de las exportaciones almerienses durante la campaña 2008. Estos datos dan una idea del marcado carácter exportador de la producción almeriense.

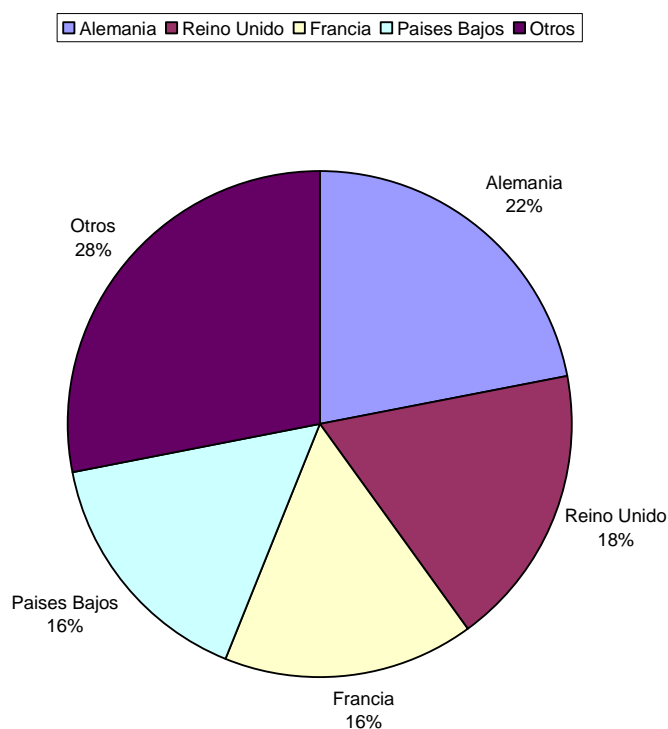


Figura 6.- Principales destinos de las toneladas exportadas de melón en Almería expresado en tanto por ciento. Fuente: Fepex (2011).

De los diferentes tipos varietales, el melón Galia es el que más se produce en la región andaluza, debido a que las plantaciones son de fácil manejo. Tras el melón Galia, los tipos Cantalupo y Charentais son los más

importantes, dedicándose, principalmente, al mercado francés y a Reino Unido, Alemania y Países Bajos (Fig. 6).

2.4. MEJORA GENÉTICA DEL MELÓN

2.4.1. EL CARÁCTER “LARGA VIDA” EN MELÓN

Con la internacionalización del comercio y la mejora de la logística los mercados consumidores de frutos y hortalizas del Norte de Europa y EEUU comenzaron a conocer el melón y ha incluirlo en sus hábitos alimenticios; deja de ser un producto de consumo local en las áreas de producción para pasar a ser un fruto conocido y cotizado en el mundo desarrollado.

El primer problema fue encontrar un melón con la suficiente conservación para poder ser transportado desde sus zonas de producción en el Sur de Europa y EEUU hasta las de consumo en el Norte de Europa y costa Este de los EEUU. El problema se resolvió utilizando variedades con suficiente transportabilidad natural como es el caso de los melones Tendrales y Amarillos y Honey Dew en EEUU. Curiosamente, no se trataba de las variedades más apreciadas en sus mercados de origen, ya que tenían una calidad organoléptica inferior a aquellas que seguían consumiéndose en sus zonas de producción (caso del Charentais en Francia).

Incluso con estas variedades la transportabilidad no es la suficiente en los mercados más alejados de los centros de producción; tal es el caso de los Cantalupo producidos en América Central y en California, que deben ser recolectados hasta dos veces al día, transportados a temperaturas de 2°C, con preenfriamiento y en algunos casos con atmósfera controlada. Mención especial merece el melón Piel de Sapo, ya que si bien tiene la suficiente transportabilidad natural como para ser consumido en el Norte de Europa, su aspecto exterior supone un *handicap* en estos mercados que precisan de un signo de madurez externo.

La gran apreciación que tienen los melones tipos Charentais ha incentivado su producción en cultivo de contraestación o extraprecoces; no obstante los resultados han sido descorazonadores y sólo una minoría de

especialistas han sido capaces de producirlos en el Caribe, Norte de África y España con un gran esfuerzo y costes en la recolección y el transporte.

En este contexto apareció el melón Galia, fruto de la genética israelita, procede sin duda de un tipo Zuila (muy común en la ribera sur del Mediterráneo pero que presenta una conservación muy limitada pero una gran calidad interna) mejorado con un melón que le aporta la transportabilidad. El Galia supuso el primer ejemplo del papel de la distribución en el comercio del melón. Los hábitos de consumo están cambiando; en determinados países del Norte de Europa hasta el 80% de las frutas y hortalizas se venden en las grandes superficies y, lo que éstas piden, aparte de la calidad al mejor precio, es tener el menor número de posible de mermas en sus estanterías.

En otras palabras, no se buscaba el mejor melón del mundo, sino un melón de calidad uniforme, con un signo externo de madurez y con el menor número posible de mermas en estanterías. De lo anteriormente expuesto se deduce que el camino estaba abonado para la introducción de la larga vida en la especie.

La larga vida es un concepto que está de moda y como tal es utilizado erróneamente en muchos casos. Conceptos como la larga vida, larga conservación, lenta evolución, larga transportabilidad se usan a menudo y, a menudo, también incorrectamente.

La larga vida es un concepto genético y, por lo tanto, se posee o no se posee. Otra cosa es que queramos llamar “larga vida” a mejoras de genéticas tradicionales para la transportabilidad/conservación. En adelante, cuando nos refiramos a larga vida, estaremos hablando de una característica aportada a la planta por un complejo genético concreto.

Sin ánimo de entrar a definir las implicaciones fisiológicas que este carácter incorpora a las plantas, sí podemos decir que, en definitiva, consiste en la producción de etileno en el fruto. Biológicamente el melón posee un reloj interno que le indica en que fase de su ciclo se encuentra en cada momento; la producción de etileno avisa al melón que ha llegado el momento de desprenderse del fruto, de no seguir acumulando azúcares prepararse para servir de vehículo para la difusión de las semillas. Con el gen de larga vida se

inhibe pues el desprendimiento de etileno, el despertador no suena para el melón, de forma que este sigue acumulando azúcares en tanto en cuanto siga unido a la planta.

Las ventajas que el gen larga vida aporta a la planta son:

- Mejora del contenido en azúcar. Las plantas que incorporan el gen larga vida no sufren el proceso de senescencia de los frutos en los mismos términos que las otras y siguen recibiendo energía solar y acumulando azúcares en sus frutos durante más tiempo. La consecuencia práctica es que podemos recolectar sus frutos con un alto grado de seguridad sobre su contenido en azúcares, si bien sacrificando precocidad respecto a las variedades tradicionales.

- Buena tolerancia a la vitrescencia. Esta aparece por muy diversas razones y se traduce en una fermentación alcohólica de los azúcares del fruto (avinado), que afecta al sabor y aroma. Las variedades larga vida no producen etileno o no lo perciben, por lo que la planta retrasa la maduración y elimina la vitrescencia.

- Incremento en la producción. La mayor capacidad de las plantas poseedoras del gen larga vida para asimilar la energía que reciben en forma de azúcares, hace que sus frutos posean una mayor densidad en comparación con las variedades tradicionales, lo que se traduce en una mayor producción.

Sin embargo la larga vida también lleva unido una serie de efectos secundarios que pueden disminuir la calidad:

- Disminución del aroma, puesto que no liberan las sustancias responsables del aroma en el fruto maduro por la ausencia de etileno.

- Falta de virado o virado irregular, ya que la señal viene marcada por el desprendimiento de etileno en el fruto.

- Disminución de la precocidad, pues para acumular más azúcares se deben mantener los frutos más tiempo en la planta.

2.4.2. RESISTENCIAS A ESTRESSES BIÓTICOS

El oídio en melón es una enfermedad de importancia en todas las zonas de cultivo de la especie. Los trabajos de búsqueda de resistencia genética en melón comenzaron ya en los años 50, y condujeron a la obtención en USA de algunos cultivares (PMR 45) con resistencia a una serie de aislados del hongo que se agruparon en la raza 1. Sin embargo, hay otros aislados que pueden ser patógenos en las variedades resistentes a la raza 1; estos aislados se agrupan en la raza 2, frente a la cual los mejoradores norteamericanos desarrollaron algunas variedades resistentes (PMR 5, PMR 6). Posteriormente, han ido apareciendo nuevos genes de resistencia a oídio, la mayoría de material de origen hindú. También se han encontrado resistencias a *S. fuliginea*, tanto a la raza 1 como a raza 2, en material autóctono español, lo que puede resultar de interés para la introducción de resistencias a la enfermedad en estos tipos, ya que hasta ahora las resistencias procedían del material hindú de características bastante alejadas de nuestras variedades. Además, en el estado homocigoto, la resistencia a la raza 2 presente en ese material suele estar ligada a necrosis foliares, que aparecen en condiciones no determinadas, y que dificultan el cultivo de estas líneas (Floris y Álvarez, 1995).

La fusariosis está causada por una forma patogénicamente especializada del hongo del suelo *Fusarium oxysporum f. sp. Melonis*. La protección más práctica y económicamente eficaz se consigue mediante la utilización de cultivares resistentes al hongo. Se han descrito cuatro razas fisiológicas de hongo (razas 0, 1, 2 y 1-2) todas identificadas en España. Por ello, los mejoradores intentan combinar en un genotipo adecuado dos genes dominantes independientes *Fom-1*, que confiere resistencia a las razas 0 y 2, y *Fom-2* para resistencia a las razas 0 y 1, con una resistencia a las cepas, es decir, que proporciona resistencia a las cepas no muy agresivas de *Fusarium oxysporum f. sp. Melonis* de todas las razas fisiológicas (Risser et al., 1976). En material autóctono español se han encontrado resistencia a las razas fisiológicas 0, 1 y 2, lo que puede resultar de gran utilidad a la hora de introducir esta resistencia en cultivares del tipo español.

Las enfermedades causadas por virus no tienen tratamiento curativo y son de difícil prevención, por lo que la resistencia genética es con frecuencia el mejor medio de lucha. Más de 25 virus han sido señalados como causantes de enfermedades en especies de la familia de las cucurbitáceas. De entre ellos sólo cinco tienen un impacto económico importante sobre los cultivos de melón en el mundo.

2.4.3. RESISTENCIAS A ESTRESSES ABIÓTICOS

En el caso de las plantas, se considera como estrés cualquier factor externo que ejerce una influencia inhibidora sobre el desarrollo vegetal. Los efectos producidos por un factor estresante se miden en relación al crecimiento (acumulación de biomasa) o a los procesos de asimilación primaria (absorción de CO₂ y minerales), relacionados a su vez con el crecimiento en general (Taiz y Zeiger, 1991). A nivel mundial, varios factores como la salinidad, la sequía, el exceso de agua en los suelos, el pH, las temperaturas extremas, las carencias minerales y la toxicidad por los metales se describen como estreses abióticos frecuentes (Ashraf, 1994).

En general, las respuestas o adaptaciones específicas a un determinado factor ambiental constituyen un pequeño porcentaje frente al gran número de repuestas comunes. Así, casi todas las condiciones de estrés modifican el patrón de crecimiento de la planta, estimulan la senescencia y la abscisión de los órganos deteriorados, alteran el funcionamiento de las rutas más eficaces de producción de energía metabólica, activan la degradación y la reparación de las proteínas desnaturalizadas y refuerzan los mecanismos de eliminación de las especies reactivas de oxígeno, que son tóxicas para las células. Estas observaciones sugieren que los estímulos deben activar rutas de transducción de la señal idénticas o convergentes hacia un mismo abanico de respuestas defensivas. Los estreses primarios, tales como la sequía, salinidad, frío, calor y contaminantes químicos, están interconectados y causan estreses secundarios, tal como el estrés osmótico y oxidativo (Vinocur y Altman, 2005)

En el caso particular de las Cucurbitáceas, la sensibilidad de la zona pedicular a bajas temperaturas es un aspecto a tener en cuenta ya que, temperaturas inferiores a 15°C limitan la absorción de agua y causan la

muerte de la planta por estrés hídrico aunque el suelo esté húmedo. Junto a esto, también se produce una disminución cuantitativa en la producción comercial del cultivo a nivel de cuajado y del tamaño del fruto (Wang y Adams, 1982).

2.4.4. OBTENCIÓN DE HAPLOIDES (H) Y DOBLE HAPLOIDES (DH)

Un organismo haploide es aquel que presenta en sus células somáticas un complemento cromosómico gamético característico de su especie (n). Debido a la presencia de un sólo juego cromosómico, las mutaciones recesivas serán perfectamente identificables y, debido a la ausencia de dominancia entre alelos, el fenotipo de una planta haploide se corresponde con su genotipo. La obtención de haploides ofrece por tanto la posibilidad única de evaluar la variación que surge en una población de gametos, como consecuencia de los procesos de segregación y recombinación a lo largo de la meiosis. En este sentido, la población de plantas haploides derivadas por ejemplo de un híbrido F1 debería ser representativa de la población de gametos que surge a partir de la planta original.

Debido al desequilibrio en su complemento cromosómico, las plantas haploides son estériles. La duplicación del complemento cromosómico (n) de la planta haploide estéril permitirá la obtención de una planta doble haploide (planta $2n$ con el complemento cromosómico gamético duplicado), completamente homocigoto y, generalmente, fértil. La obtención de dobles haploides (DHs) a partir de las plantas haploides por diploidización inducida con antimicóticos, como la colchicina, es un método frecuentemente utilizado en mejora. Las líneas obtenidas, completamente homocigotas, y por tanto puras, pueden ser utilizadas como parentales para la producción de híbridos F1.

2.5. CULTIVO *IN VITRO*. ALTERNATIVAS BIOTECNOLÓGICAS EN LA MEJORA DE MELÓN

2.5.1. REGENERACIÓN DE PLANTAS MEDIANTE CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES

El cultivo de tejidos *in vitro* encaminado a la regeneración de plantas engloba un grupo de técnicas mediante las cuales un explante (fragmento de órgano separado de un organismo vegetal) se cultiva en un medio de composición química definida y bajo condiciones de incubación controladas. Sin embargo, la expresión *in vitro* de una determinada respuesta morfogénica es la consecuencia de la interacción de numerosos factores, tales como el genotipo de la planta donante y su desarrollo, el tipo de explante, la composición del medio nutritivo y el ambiente físico de cultivo (Ammirato, 1986).

La elección del material vegetal de partida está determinada por la facilidad de regenerar plantas a partir de células somáticas de distinto origen, como pueden ser explantes primarios de raíz, hipocotilo, peciolo, hoja o cotiledón. La capacidad de regeneración varía por la propia naturaleza del explante ya que éste es, usualmente, heterogéneo por definición con respecto a los tipos de células que lo componen. En un material así es de esperar que las células del explante respondan de modo diferente a los estímulos a los que se hallan expuestos *in vitro*. El cultivo se puede iniciar también a partir de callos, células en suspensión o protoplastos.

Regeneración *in vitro* a partir de yemas preexistentes

En melón, como en otras plantas, el desarrollo vegetativo es altamente repetitivo. En la parte apical de la planta, la actividad meristemática del tallo principal conduce a la formación de una unidad modular que incluye una hoja, un meristemo caulinar en la axila de la hoja y un segmento de tallo donde se inserta la hoja. El conjunto de estas estructuras se denomina fitómero (Fosket, 1994; Lyndon, 1998).

Una de las técnicas de micropropagación consiste básicamente en aprovechar estas estructuras organizadas para mantenerlas y/o reproducirlas vegetativamente mediante multiplicación de meristemas caulinares axilares y terminales. Estas estructuras, cultivadas en condiciones adecuadas, dan lugar

a plantas enteras en las cuales se volverá a reproducir la misma organización repetitiva en fitómeros. Esta técnica, debido a la ausencia de una fase de crecimiento desorganizado, favorece una cierta estabilidad genética del material y limita la posible aparición de variantes somaclones en la población de regenerantes.

Regeneración adventicia mediante cultivo de explantes primarios

Las células en cultivo pueden regenerar estructuras adventicias (ápices o embriones) y plantas completas siguiendo dos rutas alternativas:

- *Organogénesis*, que conduce a la diferenciación de meristemos caulinares y/o radicales (que originan tallos o raíces adventicias, respectivamente).
- *Embriogénesis somática*, que lleva a la formación de embriones somáticos adventicios siguiendo las fases del embrión zigótico (globular, corazón, torpedo, cotiledonario), aunque obviamente sin fecundación.

En las dos rutas siempre es posible distinguir dos modelos de desarrollo morfogénico:

- *Morfogénesis directa*: cuando los órganos (o embriones) se originan directamente del explante en ausencia de proliferación de callo (masa celular sin diferenciación aparente, producida originariamente como un tejido en respuesta a una lesión, pero mantenida en un medio nutritivo artificial).
- *Morfogénesis indirecta*: en la que la formación de callo es previa al desarrollo de estructuras organizadas, de manera que una fase de proliferación de células desdiferenciadas y teóricamente idénticas unas de otras, da lugar a otra con células altamente diferenciadas y especializadas tanto morfológica como fisiológicamente.

2.5.2. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS

La transformación genética se puede definir como la transferencia de genes foráneos aislados a partir de diferentes organismos- virus, bacterias, plantas o animales- a un nuevo contexto genético. En la transformación

genética de plantas se persigue como objetivo la integración cromosómica, expresión heredabilidad estable del transgén de interés.

Algunos de los requerimientos prácticos para aplicar la transformación genética a la mejora de una planta hortícola son los siguientes:

- Disponibilidad de genes y/o promotores de interés para la mejora.
- Fácil acceso a un tejido con células competentes para la regeneración y la transformación.
- Capacidad para obtener plantas transgénicas a partir de genotipos de interés para la mejora.
- Selección inequívoca de las células transgénicas.
- Obtención de un número suficiente de transformantes primarios (TG1) independientes para seleccionar las líneas adecuadas y evitar el manejo de genotipos con expresión alterada del transgén (varias copias integradas, efecto posicional, disrupción genética, silenciamiento génico, etc).
- Método de regeneración limitando la variación somaclonal con el fin de evitar los cambios numéricos (aneuploidia, poliploidia), estructurales (deleciones, translocaciones, duplicaciones e inversiones) y/o puntuales (mutación génica) en el genoma de la planta transformada.
- Herencia y expresión estable de los transgenes a lo largo de las generaciones siguientes (TG2 y TG3).

Actualmente, existen dos formas básicas de introducir genes foráneos en el genoma de las plantas. La primera consiste en un método directo de transferencia sin necesidad de vectores biológicos. Entre las distintas técnicas empleadas destaca el bombardeo de microproyectiles (sobre meristemos, tejidos, callos o protoplastos), la transferencia de ADN a protoplastos mediante tratamientos químicos (quimioporación) o eléctricos (electroporación), la transferencia de ADN vía liposomas, la microinyección de ADN a células y protoplastos, las sonicación, la transferencia de ADN aprovechando el crecimiento del tubo polínico o la transformación de células madre del polen (método MAGELITR, Touarev et al., 1997).

La transferencia de ADN foráneo se puede realizar también aprovechando las propiedades biológicas de las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes*. Este vector biológico es altamente eficiente para la transferencia de genes siempre y cuando existan garantías de que la célula transformada sea apta para la regeneración o que la célula que regenera sea competente para la integración de transgenes (Potrykus, 1991).

Estructura y mecanismo de infección de *Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens y *A. rhizogenes* son bacterias del suelo capaces de infectar a las plantas en lugares donde hay heridas, la primera produce la enfermedad de las agallas de la corona y la segunda la enfermedad de las raíces en “cabellera”. Dentro de las especies vegetales susceptibles a *Agrobacterium* se incluyen la mayoría de las dicotiledóneas, algunas gimnospermas (De cleene y De Ley, 1976; 1981) y algunas plantas monocotiledóneas (Suseelan y col., 1987).

El material genético de *Agrobacterium* se encuentra localizado en su cromosoma y en varios plásmidos (molécula de ADN circular, no ligada al cromosoma) (Fig. 7). Uno de estos plásmidos es el responsable de la inducción de tumores (denominado plásmido Ti). Durante el proceso de infección, *Agrobacterium* transfiere una porción bien definida de ese plásmido, llamada T-DNA (ADN de transferencia), al genoma de las células vegetales (Fig. 7).

La integración y expresión de ciertos genes del T-DNA (oncogenes) hace que las células transformadas se dividan y proliferen sin control y se formen los tumores. Estos oncogenes codifican la síntesis de fitohormonas, auxinas y citoquininas. Además, el T-DNA contiene otros genes que codifican en la planta la síntesis de metabolitos denominados opinas, que nunca se producen en las células de no infectadas, que son aminoácidos particulares que la bacteria aprovecha como fuente de carbono y nitrógeno (Tempé y Casse-Delbert, 1989). De este modo, *Agrobacterium* actúa como un parásito molecular de las células vegetales infectadas, haciéndolas tumorales y convirtiéndolas en fábricas de opinas. Estas se vierten al suelo circundante y sirven de alimento a las agrobacterias que se encuentran en él.

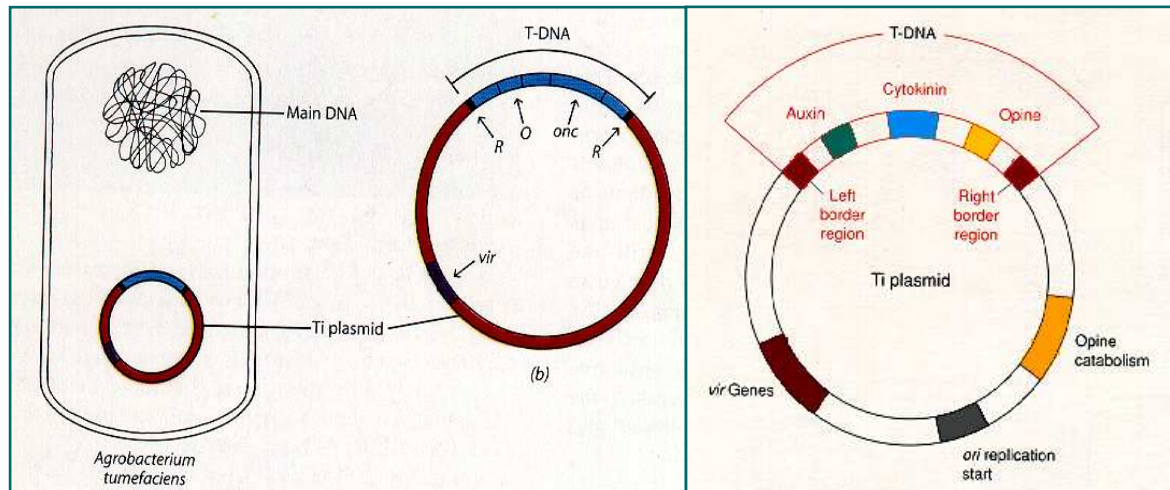


Figura 7.- Representación esquemática de *Agrobacterium tumefaciens* y del plásmido Ti. La expresión de los genes del T-DNA conlleva a la producción de fitohormonas y de opinas.

Los genes procariontes y eucariontes presentan diferencias importantes. Básicamente, el ADN eucariótico se encuentra unido a proteínas, sus genes se encuentran interrumpidos por secuencias que no se expresan y que se pierden al transcribirse el ADN en ARN mensajero (intrones), sus genes tienen señales promotoras particulares de la transcripción de ADN a ARN mensajero, y los mecanismos de regulación de la expresión de los genes son complejos. En los procariontes, el ADN se encuentra desnudo, sus genes no tienen intrones, tienen sus propias señales promotoras de la transcripción y los mecanismos para la activación y desactivación de genes son muchos más simples. Las señales promotoras de la transcripción, o promotores, son regiones de ADN que preceden a la región codificadora del gen (la que se transcribe y traduce) y que actúa como un interruptor que regula la transcripción del gen.

En este sentido, *Agrobacterium* presenta tres particularidades que la convierten en un caso único entre los procariontes. La primera es que, además de ser capaz de transferir un fragmento de ADN a las células vegetales, es capaz de integrarlo en el genoma de las mismas. La segunda es que los genes de ese ADN, aun procediendo de una bacteria, son reconocidos por la célula vegetal y se expresan. La tercera es que posee los genes codificadores de las enzimas necesarias para metabolizar las opinas.

Los componentes genéticos de *Agrobacterium* necesarios para la infección y transferencia de ADN a las células vegetales son tres: el T-DNA y la

región de virulencia (*vir*), ambos incluidos en el plásmido Ti (Fig. 7), y los genes de virulencia *chv*, localizados en el cromosoma. Los oncogenes y los genes productores de opinas no son necesarios para la transferencia del T-DNA ni para su mantenimiento estable en el genoma de la planta.

Transformación genética de plantas mediada por *Agrobacterium*

En 1983, tres grupos de investigadores, trabajando independientemente, fueron capaces de desarmar el plásmido Ti de *Agrobacterium*, sustituyendo los genes del T-DNA por un gen de resistencia al antibiótico kanamicina. Entonces infectaron protoplastos de tabaco con estas agrobacterias modificadas y los cultivaron *in vitro* en medios conteniendo kanamicina y los nutrientes necesarios para regenerar plantas enteras. Sólo las células que tenían integrado el gen de resistencia a kanamicina y que lo expresaban, es decir las células transformadas, eran capaces de vivir y dividirse en ese medio de cultivo. A partir de algunas de ellas, se regeneraron plantas enteras transgénicas. Con estos experimentos, se demostró que genes foráneos (o transgenes) se podían transferir, integrar y expresar en plantas utilizando *Agrobacterium* como vector (Peña, 2000).

En definitiva, utilizando técnicas de ingeniería genética se puede conseguir un plásmido Ti no oncogénico, eliminando los genes del T-DNA y sustituyéndolos por genes foráneos. Sin embargo, el gran tamaño del plásmido Ti hace difícil su manipulación. Por eso, ha habido que sintetizar vectores de transformación de mucho menor tamaño, que sólo conservan las regiones esenciales del plásmido Ti para la transformación. Se llama vector de transformación al plásmido o plásmidos que tienen la información necesaria para poder replicarse y transferir, integrar y hacer posible la expresión de un segmento de ADN foráneo en el genoma de las células vegetales.

Para que el transgén se exprese en las células vegetales debe poseer secuencias reguladoras promotoras y terminadoras de la transcripción. Los promotores determinan la cantidad de ARN mensajero que se va a producir a partir de la región codificadora del gen. Pero no sólo eso, también determinan cuándo y dónde se expresará el gen foráneo. Los terminadores portan la señal que indica donde termina la transcripción del gen. A la región codificadora del

gen foráneo clonada bajo secuencias de ADN con funciones promotoras y terminadoras procedentes de otro gen o de otros genes se le llama módulo de expresión o, también, gen quimérico. Los promotores más comunes en los módulos de expresión son el promotor 35S procedentes del virus del mosaico de la coliflor y el promotor NOS del gen de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium*.

Agrobacterium no es capaz de infectar todas las células de un cultivo, por tanto es necesario disponer de métodos que permitan identificar las células transgénicas. Esto se consigue mediante la utilización de genes marcadores que confieren a la célula transgénica una característica nueva que la distingue de las no transformadas. Estos genes marcadores se introducen entre los bordes del T-DNA de *Agrobacterium*. Podemos distinguir dos tipos de genes marcadores, de selección e informadores (Peña, 2000).

- Marcadores de selección. Permiten a la célula transformada vivir en presencia de un agente selectivo, que suele ser un antibiótico o un herbicida. Dicho agente, añadido al medio de cultivo, impide el desarrollo de las células no transformadas. El gen marcador de selección más utilizado hoy en día es también el primero que se utilizó para transformar plantas. El gen de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) confiere resistencia a antibióticos aminoglucósidos, como la kanamicina. El enzima desactiva a la sustancia antibiótica mediante fosforilación.

- Marcadores informadores. Confieren a la célula transformada una característica física nueva que la hace distinguible de las no transformadas. Generalmente, los genes marcadores informadores codifican enzimas, de manera que cuando, el sustrato apropiado se añade al medio, se produce una reacción en las células transformadas que permite identificarlas. El más utilizado ha sido el gen de la β -glucuronidasa (*uidA*), aislado de *E. coli*, que hidroliza β -glucurónidos, de forma que en presencia de un sustrato apropiado se forma un producto que tiñe las células transformadas de color azul (X-Gluc) o se forma un producto fluorescente (MUG). El gen de la fluorescencia verde (*gfp*), procedente de la medusa *Aequorea victoria*, codifica una proteína que genera un cromóforo en presencia de oxígeno, el cual emite fluorescencia

verde cuando se excita con luz azul o a luz ultravioleta, podemos identificar las que son transgénicas, ya que emitirá fluorescencia verde.

Un avance fundamental en el desarrollo de la tecnología transgénica se produjo en 1985, cuando Horsch y col. publicaron el procedimiento de transformación de discos de hoja con *Agrobacterium*. Con ello consiguieron regenerar eficazmente plantas transgénicas enteras a partir de explantes previamente cultivados con la bacteria. Con anterioridad sólo se había utilizado la técnica de cocultivo de protoplastos.

El procedimiento es básicamente el descrito en la Figura 8:

- 1.- Se parte de un tipo de explante que es un disco de hoja.
- 2.- Se inocula con *Agrobacterium* desarmada que contenga un vector de transformación. Entre los bordes del T-DNA se encuentra un módulo de expresión con el gen de resistencia a kanamicina. La inoculación se realiza sumergiendo los explantes en el cultivo bacteriano.
- 3.- Tras unos minutos, se extraen los explantes, se secan sobre papel de filtro y se transfieren a un medio de cultivo de tejidos vegetales durante varios días. A esta fase se le llama cocultivo (cultivo de los explantes con la bacteria).
- 4.- Posteriormente, se pasan los explantes a un medio de regeneración de brotes. A este medio se le ha añadido las hormonas adecuadas para inducir la formación de dichos brotes (auxinas y citoquininas), un antibiótico para controlar el crecimiento de *Agrobacterium*, y un antibiótico de selección, kanamicina, que permite regenerar plántulas enteras sólo a partir de las células transformadas.
- 5.- Las plántulas regeneradas se escinden de los explantes y se transfieren a otro medio de cultivo con el fin de inducir enraizamiento.
- 6.- Cuando las plantas desarrollan raíces, se cultivan en macetas y aclimatan.

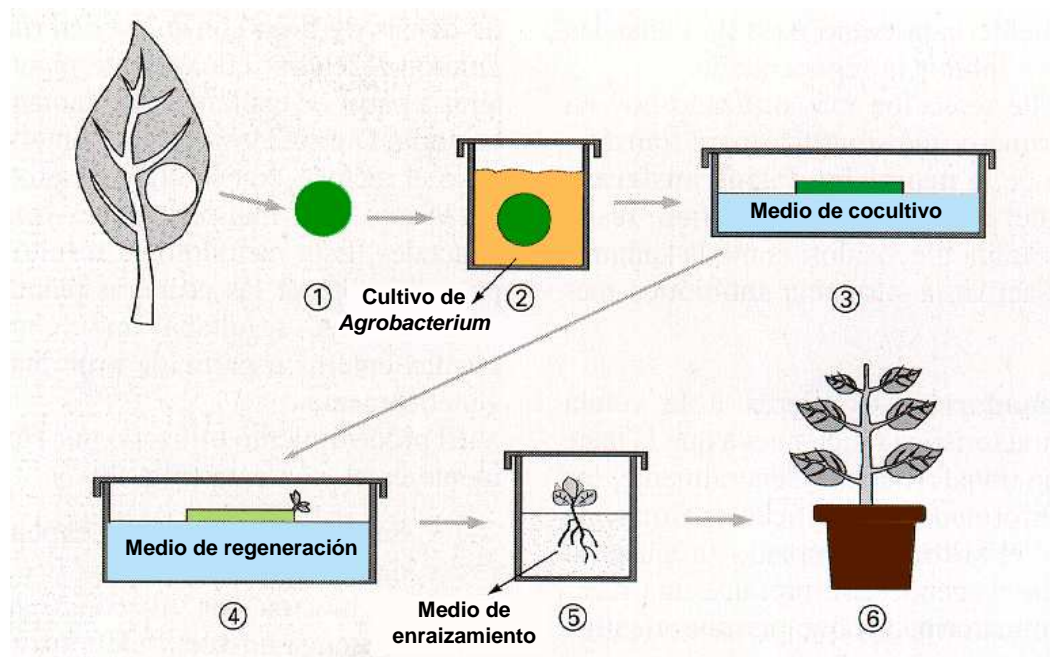


Figura 8.- Procedimiento de transformación de discos de hoja con *Agrobacterium tumefaciens*.

El principal inconveniente es que se ha descrito en muchas especies, y asociada a diferentes tipos de explantes, la regeneración de plantas no transgénicas junto a las que sí lo son. A estas plantas capaces de regenerarse en un medio de cultivo que contiene un agente de selección pese a no ser resistentes a dicho agente, se les llama escape. Se producen por ineficacia del agente de selección o porque las células transgénicas detoxifican su entorno y protegen a las células no transgénicas de alrededor del agente de selección.

Este procedimiento se utilizó originalmente para transformar plantas de tabaco, tomate y petunia, posteriormente ha servido para transformar una amplia gama de especies vegetales (Peña, 2000). Es importante considerar que los procedimientos de transformación, de regeneración y de selección de cada especie vegetal e, incluso, de cada variedad son generalmente específicos. De manera que es necesario establecer las condiciones concretas de transformación de la especie o variedad que se quiere transformar.

Estrategias de transferencia de genes en cucurbitáceas

La mayoría de los trabajos publicados hasta la fecha sobre transformación genética en Cucurbitáceas se resumen en las tablas 1 y 2.

Tabla 1.- Trabajos de transformación genética en melón (*Cucumis melo* L.)

Especie	Método de Transformación	Genes transferidos	Referencia
<i>Cucumis melo</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, GUS</i>	Ben Tahar y De Both., 1988
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII</i>	Fang & Grumet, 1990
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, DFHR, GUS</i>	Dong et al., 1991
	<i>A. rhizogenes</i>	<i>nptII</i>	Toyoda et al. (1991)
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, CMV-CP</i>	Yoshioka et al., 1992, 1993
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, ZYMV-CP</i>	Fang & Grumet, 1993
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, GUS</i>	Bordás et al., 1993
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, GUS</i>	Vallés & Lasa, 1994
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, GUS, CMV-WL CP</i>	Gonsalves et al., 1994
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, ACO antisentido</i>	Ayub et al., 1996
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>proPR1:GUS</i>	Shetty et al., 1997
	<i>A. rhizogenes</i>	<i>Ri-DNA</i>	Hosoi et al., 1997
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, GUS, HAL1</i>	Bordás et al., 1997
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>CMV, ZYMV, WMV-2</i>	Fuchs et al., 1997
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, ACO antisentido</i>	Bauchot et al., 1998
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>CMV-WL CP</i>	Fuchs et al., 1998
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>Ribozimas/WMV2, ZYMV</i>	Huttner et al., 1999
	<i>A. rhizogenes</i>	<i>Ri-DNA</i>	Matsuda et al., 2000
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>GUS</i>	Ezura et al., 2000
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, ACO antisentido</i>	Guis et al., 2000
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>TMV-MP</i>	Shalitin et al., 2000
	Biolístico	<i>ZYMV-AG1</i>	Gal et al., 2000
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, TAS 14, TSW 12</i>	Roig C., 2001
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>HAL1, TAS14, TSW12</i>	Roig C., 2001
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>Chit42, bgn16.1</i>	Vidigal F., 2001
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>gfp, nptII</i>	Atares A., 2003
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>replicasa</i>	Naval M., 2005
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>GUS, GFP</i>	Nuñez-Palenius et al., 2007
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>LOX</i>	Uribe, Nuñez & Gómez, 2010

Teniendo en cuenta el gran interés comercial del melón y del pepino podemos observar que, lógicamente, la mayoría de los trabajos se han realizado en estas dos hortícolas, lo que explica la escasez de información sobre la transformación genética de las otras especies.

Los primeros trabajos que abordan el estudio de la susceptibilidad de las Cucurbitáceas a la infección por distintas cepas de *A. tumefaciens* indican claras diferencias entre especies en la respuesta a la infección (Unger et al., 1985) y distintos grados de infectividad de las distintas cepas de *Agrobacterium* (Smarelli et al., 1986).

Tabla 2.- Trabajos de transformación genética en pepino (*Cucumis sativus* L.), sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsun & Nakai), calabaza (*Cucurbita pepo* L.) y otras Cucurbitáceas.

Especie	Método de transformación	Genes transferidos	Referencia
<i>Cucumis sativus</i>	<i>A.rhizogenes</i>	<i>nptII</i>	Trulson et al., 1986
	<i>A.rhizogenes</i>	<i>T-DNA</i>	Van der Mark et al., 1989
	<i>A.tumefaciens</i>	<i>nptII</i>	Chee, 1990
	<i>A.rhizogenes</i>	<i>T-DNA</i>	Mc Innes et al., 1991
	<i>A.tumefaciens</i>	<i>nptII, GUS, CMV-CP</i>	Chee & Slightom, 1991
	<i>A.rhizogenes</i>	<i>rol A, B, C (TL) y AUX (TR)</i>	Amselem & Tepfer, 1992
	Biolística	<i>nptII</i>	Chee & Slightom, 1992
			Gonsalves et al., 1994
	<i>A.tumefaciens</i>	<i>nptII</i>	Sarmento et al., 1992
	Biolístico	<i>nptII, uidA</i>	Schulze et al., 1995
	<i>A.tumefaciens</i>	<i>nptII, GUS, CMV-O CP, hph</i>	Nishibayashi et al., 1996a
<i>A.tumefaciens</i>	<i>nptII, GUS, CMV-O CP, hph</i>	Nishibayashi et al., 1996b	
<i>A.tumefaciens</i>	<i>nptII, RCC2</i>	Tabei et al., 1997	
<i>Citrullus lanatus</i>	<i>A.tumefaciens</i>	<i>nptII</i>	Srivastava et al., 1991
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, GUS</i>	Choi et al., 1994
<i>Cucurbita pepo</i>	<i>A.rhizogenes</i>	<i>T-DNA</i>	Katavic et al., 1991
	<i>A.tumefaciens</i>	<i>ZYMV</i>	Gonsalves et al., 1994
	<i>A.tumefaciens</i>	<i>ZYMV, WMV-2</i>	Arce-Ochoa et al., 1995
	<i>A.tumefaciens</i>	<i>CMV, ZYMV, WMV-2</i>	Fuchs & Gonsalves, 1995
	<i>A.tumefaciens</i>	<i>CMV, ZYMV, WMV-2</i>	Tricoli et al., 1995
	<i>A.tumefaciens</i>	<i>ZYMV</i>	Rowel et al., 1999
	<i>A.tumefaciens</i>	<i>CMV-WL CP</i>	Fuchs et al., 1999
<i>Citrullus colocynthis</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, GUS</i>	Dabauza et al., 1997
<i>Cucumis anguria</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, GUS</i>	Santana et al., 1991
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, GUS</i>	Santana M., 1995

En el primer trabajo de ingeniería genética descrito en Cucurbitáceas, Trulson et al. (1986) transforman pepino con *A. Rhizogenes* mediante la inoculación de hipocotilos con la cepa bacteriana A4 portadora de un plásmido

con el gen de resistencia a la kanamicina (*nptII*). Los autores describen la regeneración de 22 plantas a partir de 64 raíces adventicias independientes.

Sin embargo, este método se aplica posteriormente en varios trabajos de transformación genética en pepino y no se consiguen plantas (Van der Mark et al., 1989; Mc Innes et al., 1991; Amselem y Tepfer, 1992). La transferencia directa de genes mediante bombardeo de microproyectiles en callos embriogénicos de pepino permite a Chee y Slightom (1992) regenerar más de 100 plantas con una tasa de escapes (falsos transformantes) relativamente alta (84%). De las plantas que han integrado el gen *nptII* (análisis Southern) solamente un 25% expresan el transgén, debido probablemente a la transferencia de varias copias del gen *nptII* en un mismo genoma. Pocos años más tarde Schulze et al. (1995) emplean también el método biolístico en un cultivo en suspensión de células embriogénicas de pepino. Los autores demuestran la expresión funcional de los genes en 12 plantas transgénicas TG1. La transformación genética de pepino con *A. tumefaciens* permite también regenerar plantas transgénicas vía embriogénesis somática a partir de cotiledones inoculados (Chee, 1990).

En sandía, la susceptibilidad de las células cotiledonarias a *Agrobacterium* spp. ha sido descrita en dos trabajos de transformación genética (Srivastava et al., 1991; Choi et al., 1994); sin embargo ninguno de los dos trabajos menciona la tasa de transformación, parámetro clave para evaluar la eficacia del método. Además en estos dos únicos trabajos, no se determina el nivel de expresión de los transgenes ni su modo de herencia en las progenies.

En melón, Ben Tahar y De Both (1988) utilizan el sistema de regeneración publicado por Moreno et al. (1985) para introducir el gen marcador de selección *nptII* y el gen informador *uidA* mediante cocultivo de explantes con *A. Tumefaciens*. Posteriormente Toyoda et al. (1991) consiguen la primera transferencia de genes mediada por *A. Rhizogenes*; sin embargo este método no se volvió a utilizar hasta 1997 (Hosoi et al) ya que *A. tumefaciens* parece un vector mucho más eficiente para introducir genes foráneos en melón.

A nivel metodológico, la técnica utilizada mayoritariamente para transformar las Cucurbitáceas es el cocultivo de explantes cotiledonarios con *A. tumefaciens*, lo que indica una susceptibilidad relativamente generalizada de las células de Cucurbitáceas a la infección por esta bacteria. Al examinar las tablas podemos observar también que en la mayoría de los trabajos con Cucurbitáceas, la selección de las células transformadas se realiza en base a la resistencia al antibiótico kanamicina. Este dato indica que, en la mayoría de los casos, el uso del gen marcador *nptII* permite seleccionar de manera adecuada las células competentes para regenerar plantas resistentes al agente selectivo. Existen pocos trabajos en los cuales se utilizan marcadores seleccionables distintos: en melón, Dong et al. (1991) selecciona las células transformadas con un transgén que codifica para la dihidrofolato reductasa (DHFR), que confiere resistencia a metotrexato. Más recientemente, Nishibayashi et al. (1996a; 1996b) demuestran en unos experimentos de transformación de hipocotilos de pepino, la idoneidad de la higromicina B para mejorar la selección de las células transformadas.

Transformación genética y mejora en melón

- **Resistencia a plagas y enfermedades**

Después de una fase de puesta a punto de los métodos de transformación genética con genes marcadores de resistencia a antibióticos y genes informadores, los primeros trabajos aplicados se plantean con el fin de obtener plantas transgénicas de melón (Yoshioka et al., 1992; 1993; Fang y Grumet, 1993) y pepino (Chee y Slightom, 1991) resistentes a distintos virus.

La estrategia utilizada consiste en transferir y expresar genes que codifican para proteínas de cubierta (CP) de los virus mosaico del pepino (CMV) y del calabacín (ZYMV), agentes responsables de las infecciones más severas en Cucurbitáceas. Chee y Slightom, (1992) consiguen introducir un gen de proteína de la cubierta del CMV-O en plantas transgénicas de pepino y muestran la resistencia al CMV en las progenies TG2. La “estrategia CP” se utiliza también en melón con el fin de obtener plantas transgénicas resistentes al CMV-WL (Fang y Grumet, 1993; Gonsalves et al. 1994; Fuchs et al. 1997) o al CMV, ZYMV y WMV-2 (raza 2 del virus del mosaico de la sandía)

(Fuchs et al. 1998). En calabaza, mediante transferencia de una construcción génica doble (genes CP del ZYMV y del WMV-2), se ha conseguido mantener la producción y la calidad comercial de los frutos en plantas resistentes a ambos potyvirus (Tricoli et al., 1995; Fuchs y Gonsalves, 1995).

Shalitin et al. (2000) plantean una estrategia relativamente distinta y logran bloquear la infección y la diseminación viral en plantas transgénicas de melón que sobreexpresan la proteína de movimiento (MP) del TMV.

- **Resistencia a hongos**

En pepino, Tabei et al. (1997) regeneran más de 60 plantas TG1 que incorporan el gen RCC2, responsable de la síntesis de una quinasa en arroz. De los 20 genotipos independientes evaluados para su resistencia a *Botrytis cinerea*, los autores describen tres líneas de alta resistencia frente al hongo.

- **Frutos de larga vida post-cosecha**

En las Cucurbitáceas, como en las hortalizas, uno de los principales problemas es el de la pérdida de frutos por sobremaduración durante el almacenaje o el transporte a los lugares de consumo. En frutos climatéricos como el melón el incremento de la síntesis del etileno tiene un papel clave en la maduración del fruto. El etileno se sintetiza en dos pasos: primero, a partir de S-adenosilmetionina (SAM) mediante una ACC sintetasa (ACS) se forma el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC); en un segundo paso el ACC se convierte en etileno mediante la intervención de una ACC oxidasa (ACO).

En melón se ha clonado un ADNc que codifica para la ACO (Balagué et al., 1993) y se ha introducido una construcción con el ADNc antisentido de este ACO en el cultivar *Cantaloup Charentais*. La sobreexpresión de esta construcción provoca un gen de la síntesis del etileno y bloquea por tanto la maduración del fruto (Ayub et al., 1996; Bauchot et al., 1998; Guis et al., 2000). La gran ventaja del sistema radica en la posibilidad de revertir el fenotipo con la aplicación de etileno exógeno. Mediante el control de la producción de etileno se pueden aminorar las pérdidas ocasionadas por la maduración prematura o reblandecimiento de los frutos y permitir el almacenaje a largo plazo como el transporte a larga distancia de los frutos.

- **Mejora de la tolerancia ala salinidad y/o sequía**

En los últimos años se han hecho grandes esfuerzos para comprender las bases moleculares de la halotolerancia y hoy día se han aislado y clonado varios genes relacionados con la componente osmótica o la toxicidad iónica del estrés salino. El grupo del Dr. Ramón Serrano (I.B.M.C.P.) ha logrado introducir varios genes de halotolerancia, procedentes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en plantas de melón.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Para la realización de este proyecto se han utilizado tres tipos y 6 líneas de mejora de melón (*Cucumis melo* L.) que manifiestan diferentes hábitos de crecimiento y morfología de fruto:

- Amarillo Oro (ginomonoico): variedad de frutos amarillos de piel lisa con algunos surcos y corteza semidura. Forma alargada con un peso medio de 2800 g y contenido en azúcares del 13,9 %.
- Amarillo Canario (ginoico): características similares al anterior pero la forma de los frutos es algo alargada y presenta un peso medio un poco mayor.
- Piel de Sapo (ginomonoico): presenta rayas de color verde oscuro sobre un fondo más claro.
- MR1 (monoico): tipo Charentais, de color verde claro con líneas un poco más oscuras, presenta una carne de color amarillo, dulce y aromático.
- C940 y C943 (monoicos): tipo Cantalupo, se caracteriza por su piel con marcas en forma de red y su pulpa blanco amarillenta. La piel esta llena de rugosidades

Los cultivos se han iniciado con la germinación *in vitro* de semillas de estas tres líneas para la obtención de plántulas, las cuales se utilizaron como fuente de explantes para los experimentos de transformación. Las plantas obtenidas por regeneración *in vitro* se clonaron, y algunas copias se trasplantaron y aclimataron para ser caracterizadas en campo. Como plantas control, se han utilizado plantas obtenidas de semillas *in vitro* mantenidas en las mismas condiciones que las plantas transformadas.

3.2. SOLUCIONES MINERALES Y MEDIOS DE CULTIVO

Solución mineral MS (Murashige y Skoog, 1962)		(mg/l)
MSI	NH ₄ NO ₃	1650
Macronutrientes	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
	MSII	KI
Micronutrientes	H ₃ BO ₃	6,2
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
	MSIII	FeSO ₄ ·7H ₂ O
Micronutrientes	EDTA-Na ₂	37,3
Medio de germinación (MG)		(g/l)
Solución mineral (MS I, II, III)		100%
Sacarosa		10
Agar industrial		8
Medio de inducción de organogénesis (MIO)		(g/l)
Solución mineral (MS I, II, III)		100%
Sacarosa		30
Myo-inositol		0,1
Tiamina		0,001
CuSO ₄ ·5H ₂ O		0,001
Reguladores de crecimiento		variable
Agar industrial		8
Medio de crecimiento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (LB)		(g/l)
Tryptona		10
NaCl		10
Extracto de levadura		5
Medio de lavado (ML)		(g/l)
Solución mineral (MS I, II, III)		100%
Myo-inositol		0,1
Sacarosa		30
Tiamina		0,001
MES		0,1

Medio de enraizamiento (ME)	(g/l)
Solución mineral (MSI, II, III)	100%
Sacarosa	30
Myo-inositol	0,1
Tiamina	0,001
IBA	0,0001
Agar industrial	8

3.3. TÉCNICAS BÁSICAS DE CULTIVO

3.3.1. Esterilización de semillas

Las semillas, una vez eliminada la cubierta, se desinfectan superficialmente por inmersión durante 30 minutos en una solución diluida al 50% de lejía comercial (equivalente a 50 g.l⁻¹ de cloro activo), que contiene además un 0.1% de detergente (Tritón X-100) que ayuda a disminuir la tensión superficial de los tejidos, mejorando así el contacto entre el tejido y la solución desinfectante. Seguidamente, se elimina la solución desinfectante mediante tres lavados sucesivos con agua destilada estéril en fases de 5, 10 y 15 minutos.

3.3.2. Obtención de plántulas axénicas

Una vez desinfectadas, las semillas se siembran en tubos de vidrio (30 mm de diámetro y 200 mm de altura) que contienen 15 ml de medio de germinación (MG). Los tubos se tapan con algodón graso. La incubación se lleva a cabo en oscuridad a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 horas, hasta que se produce la emergencia de la radícula y penetra en el medio de germinación. Posteriormente, las plántulas se pasan a condiciones de fotoperiodo: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. La temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) y la humedad (70% de HR. durante el periodo oscuro y 45% durante el periodo luminoso) están también controladas.

3.3.3. Obtención de explantes a partir de plántulas axénicas

Transcurridos entre 14 y 16 días de la siembra, la plántula ha alcanzado un crecimiento óptimo con el desarrollo las primeras hojas y el tallo más el hipocotilo miden más de 15 cm.

La preparación de los explantes se realiza sacando la plántula del tubo de germinación; a continuación se corta transversalmente cada cotiledón en

dos trozos aproximadamente iguales y se elimina la punta distal (con referencia a la posición del ápice). De esta forma, se obtienen cuatro explantes (2 distales y 2 proximales) de tamaño variable según la edad de la plántula y el genotipo varietal. Para la obtención de los hipocótilos se corta la zona más próxima a la raíz, con una longitud de unos 0.5 cm. Y finalmente para la obtención de explantes de hoja se cortan trozos de 1cm² que provienen de las hojas más jóvenes.

3.3.4. Cultivo de explantes primarios

Los explantes se siembran con el envés en contacto con el medio de cultivo sólido en el caso de cotiledones y hojas, y en posición horizontal para el caso de los hipocótilos. Para el cultivo, se emplean botes de vidrio de 275 ml, con tapa de plástico y con unos 40 ml de medio de cultivo. El número de explantes por recipiente es normalmente de 7 segmentos aunque pueda variar posteriormente según la fase de cultivo.

3.3.5. Obtención de plantas axénicas por cultivo de ápices meristemáticos

Una vez eliminados los cotiledones de las plántulas, se corta el ápice caulinar con una porción de hipocotilo de 1 cm, y se siembra en el medio de enraizamiento (ME), manteniendo la polaridad. El cultivo de los ápices se realiza en botes de vidrio de 400 ml cubiertos con una tapa de aluminio y que contienen unos 40 ml de medio. En cada bote se siembra 1 ápice. La incubación se lleva a cabo en condiciones de luz y temperatura controladas (Fotoperiodo: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad; Temperatura: 24 ± 2°C; Humedad: 70% de HR. durante el periodo oscuro y 45% durante el periodo luminoso).

3.3.6. Regeneración de plantas a partir de explantes

El estudio de la diferenciación de estructuras organogénicas a partir de los distintos explantes de melón se llevó a cabo en distintos medios, con diferentes balances hormonales.

Básicamente se pretende regenerar estructuras adventicias en dos pasos: inducción de organogénesis y crecimiento de ápices y enraizamiento.

En la primera fase se pretende inducir el crecimiento celular (formación de callo). Los explantes, sembrados con el envés en contacto con el medio, aumentan rápidamente su tamaño (2-3 veces). Entre lo 20-30 días se forma un callo noduloso, compacto de color verde o blanquecino en la zona de corte.

En la segunda fase se busca la diferenciación de las primeras estructuras adventicias organizadas (yemas de ápice) se producen en el haz del explante, o en el callo.

Los medios de cultivo empleados para inducir la formación de meristemas caulinares adventicios, provocar el crecimiento del ápice y el enraizamiento del brote individualizable, son los siguientes:

Medios de inducción de organogénesis (MIO)

IK1560Cu	MSI + MSII + MSIII + 1.5 mg/l de AIA + 6.0 mg/l de Kinetina
NB0550Cu	MSI + MSII + MSIII + 0.5 mg/l de NAA + 5.0 mg/l de BA
IB0510Cu	MSI + MSII + MSIII + 0.5 mg/l de AIA + 1.0mg/l de BA
IB1510Cu	MSI + MSII + MSIII + 1.5 mg/l de AIA + 1.0 mg/l de BA
IB0525Cu	MSI + MSII + MSIII + 1.5 mg/l de AIA + 2.5 mg/l de BA
IB0550Cu	MSI + MSII + MSIII + 0.5 mg/l de AIA + 5.0 mg/l de BA

3.3.7. Propagación clonal de plantas

Esta fase tiene como objetivo la obtención de genotipos teóricamente idénticos al original a través de la multiplicación vegetativa de estructuras meristemáticas caulinares de las yemas axilares. Se subcultivan estas estructuras a partir de plantas de 30 días cultivadas en un medio de enraizamiento (ME). Se extraen explantes de aproximadamente 1-1.5 cm de longitud que contienen el meristemo caulinar apical y segmentos el tallo con yemas axilares. En condiciones estándar de incubación, las yemas axilares adquieren la función de meristemo caulinar que conduce también a la formación de plántulas con raíz. Este procedimiento de propagación permite la multiplicación teóricamente de manera indefinida, lo cual permite

mantener la colección de plantas regeneradas así como aclimatar de modo periódico para su trasplante a invernadero.

Los recipientes empleados para la propagación clonal de las plantas *in vitro* son botes de vidrio de 600 ml de capacidad que contienen unos 50 ml de medio nutritivo, cubiertos con tapas de aluminio.

3.4. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

La técnica de transformación genética de melón utilizada se basó en el co-cultivo de explantes con *Agrobacterium tumefaciens* y posterior regeneración *in vitro* de plantas transgénicas, adaptado del método descrito por Ellul y col. (2003).

En los experimentos de transformación genética se emplea un sistema de vector binario que contiene dos plásmidos: el Ti desarmado y un plásmido de menor tamaño con la construcción de interés. Además, este mini-plásmido es portador de un gen que confiere resistencia a kanamicina en bacterias (Kan^R), lo cual permite seleccionar las bacterias genéticamente modificadas portadoras de la construcción de interés.

3.4.1. Preparación del cultivo bacteriano para la transformación

Agrobacterium tumefaciens se cultiva a partir de un inóculo glicerado (mantenido a -20°C) en medio LB sólido selectivo (Maniatis et. al., 1982) suplementado con 100 mg/l de kanamicina (evitando así el crecimiento de bacterias que no contengan el plásmido) y 40 mg/l de rifampicina (selección de la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*). Las colonias que crecen en este medio se utilizan como inóculo para el cultivo en medio líquido de la misma composición. El primer cultivo se realiza en matraces de 100 ml de capacidad con 10 ml de medio nutritivo: en los posteriores subcultivos, se emplean matraces de crecimiento bacteriano de 250 ml. Los matraces se tapan con algodón graso (hidrofóbico) para favorecer la aireación y se incuban en oscuridad a 28°C en agitador orbital a 250r.p.m. A las 24 horas después de la siembra se toma una alícuota de 2.5 ml del cultivo bacteriano y se transfiere de nuevo a matraces de 250 ml con 25 ml de medio LB fresco.

En todos los subcultivos, el medio nutritivo utilizado para el crecimiento bacteriano es suplementado con kanamicina (50 ó 100 mg/l). Además, se siembran placas control en medio LB sólido sin antibióticos, para detectar posibles contaminaciones exógenas.

Para la transformación de las plantas hemos utilizado la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con las diferentes construcciones en orientación sentido del gen *Npt-II* y *uidA*, con el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) en el vector binario pROKII (Baulcome y col., 1986). Las construcciones adecuadamente caracterizadas se conservaron en un “stock” con DMSO a -80 °C hasta su utilización.

Una alícuota del “stock” de bacterias transformadas se creció en un medio líquido LB suplementado con kanamicina 100 mg/l y fue incubado en oscuridad a 28°C, con agitación orbital a 240 rpm durante 48 h. 6 ml de este cultivo se tomaron para inocular un matraz con 300 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó en las mismas condiciones ya descritas durante 3-4 horas hasta obtener un valor de DO a 600 nm comprendido entre 0,2-0,4.

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

La transformación genética se realizó siguiendo el método descrito por Horsh *et al.*, (1984) con las modificaciones propuestas por Fischer y Gultinan (1995) y Ellul y col. (2003). En nuestro trabajo se han utilizado plántulas de melón del tipo MR1, obtenidas a partir de cultivo *in vitro* en un medio de germinación (MG). Los explantes aislados dispuestos en placas con medio de inducción organogénico (IK) se inocularon sumergiéndolos en el cultivo de *Agrobacterium* (DO₆₀₀ de 0,2-0,4) durante 6 min. Tras la inoculación, los explantes se transfirieron a un medio de cocultivo, similar al de inducción suplementado con acetosiringona (3'5-dimethoxy-4'-hidroxyacetophenona) a una concentración final de 200 µM. Este es un compuesto fenólico inductor de los genes de virulencia (*VIR*) de las cepas de *A. tumefaciens* (Stachel y col., 1985).

Los explantes infectados se incubaron durante un periodo de 1-2 días, en oscuridad, a 28°C. Pasado este tiempo, se procede al lavado del material sumergiéndolo en un medio de lavado (MB), suplementado con 500 mg/l de cefotaxima durante 10 minutos, con el fin de limitar el crecimiento bacteriano. Una vez lavados los explantes se transfieren al medio de regeneración selectivo (IKCK), con kanamicina (para seleccionar las células transformadas) y cefotaxima (para controlar el crecimiento de *Agrobacterium*). Los cultivos se incubaron en cámaras de crecimiento a 25°C, bajo condiciones de fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad).

Los brotes regenerados que iban apareciendo se cortaban evitando el callo y se transferían a frascos con medio de enraizamiento (ME) selectivo con 50 µg/ml de kanamicina. Con los brotes enraizados podemos obtener nuevas plantas mediante la propagación clonal. La propagación se lleva a cabo por multiplicación de meristemas caulinares y yemas axilares. A partir de plantas crecidas durante 15-20 días en ME se aíslan segmentos que contienen el meristemo caulinar o segmentos de tallo con yemas axilares, y se subcultivan en el mismo medio. El procedimiento de propagación, multiplicación puede continuar indefinidamente.

3.5. ANALISIS DEL NIVEL DE PLOIDIA

El nivel de ploídia de las plantas control y transgénicas se determinó mediante citometría de flujo (Smulders y col., 1995) con algunas modificaciones (Ellul y col., 2003).

Las hojas jóvenes procedentes de las plantas aclimatadas y cultivadas en el invernadero, fueron utilizadas para el aislamiento de núcleos. Fragmentos de tejido de aproximadamente 1 cm² fueron troceados individualmente con una cuchilla en una placa de petri de 50 mm con 200 µl de tampón de aislamiento de núcleos (Partec). Después de cortadas, las muestras se filtraron a través de un filtro de nylon (Nybolt) de 50 µm, y se les añadió 800 µl de una solución colorante (Partec) conteniendo 1 mg/l de DAPI (4,6-diamino-2-phenyl-indole) para la tinción fluorescente del ADN. El contenido de ADN en los núcleos aislados se midió usando un citómetro de

flujo (Partec PAS-II), equipado con una lámpara de mercurio. El resultado aparece trazado sobre una escala semilogarítmica, representado en un histograma.

3.6. ANALISIS DEL NIVEL DE RESISTENCIA A KANAMICINA EN TRANSFORMANTES PRIMARIOS

El gen bacteriano *Npt-II* codifica el encima Neomicina fosfotransferasa que inactiva por fosforilación a antibióticos aminoglicósidos como kanamicina. La expresión de este gen confiere resistencia a este antibiótico que es tóxico para las células vegetales y, al transferirse a la planta, hace que sea un método eficaz de selección.

La evaluación del grado de inhibición del enraizamiento de los ápices transgénicos se realizó a una concentración del 100 mg/l de kanamicina en el medio de enraizamiento (ME).

3.7. ANALISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DELATOR *Uida*

El ensayo histoquímico con X.Gluc (Jefferson *et al.*, 1987) se realizó en plantas que previamente habían enraizado en medio con kanamicina. Para ello, la sección del tejido se incubó durante 24 h a 37°C en solución del sustrato 1 mM en 50 mM NaH₂PO₄ a pH 7,0. Después de la tinción, las secciones fueron aclaradas en etanol al 70% durante 5-10 minutos, para eliminar las clorofilas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CRECIMIENTO Y APTITUD ORGANOGÉNICA EN EXPLANTES PRIMARIOS DE MELÓN

Un requisito fundamental a la hora de aplicar las técnicas de cultivo *in vitro* de células y tejidos a la mejora es la disponibilidad de métodos de regeneración en el material de partida.

El primer objetivo de este Proyecto Fin de Carrera consistió en desarrollar un sistema de regeneración de plantas a partir de explantes primarios de distintos genotipos de melón. Para ello, se planteó un experimento en el cual se ensayaron seis medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) con diferentes concentraciones de compuestos y reguladores del crecimiento (Tabla 3). Todos los medios han sido suplementados con sulfato de cobre, puesto que se ha demostrado que la adición de concentraciones elevadas de este compuesto, mayores a las utilizadas en las soluciones minerales habituales, incrementa significativamente la respuesta organogénica en diferentes cultivares de melón (García-Sogo y *col.*, 1991).

Tabla 3.- Composición de los medios de cultivo empleados utilizando como base la composición de sales MS suplementado con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, vitaminas (mio-inositol y tiamina), auxinas (IAA y NAA) y citoquininas (BA y Kinetina) a diferentes concentraciones.

	Mio-Inositol 0,1 g/l			
	CuSO ₄ ·5H ₂ O 0,001 g/l			
	Tiamina 0,001 g/l			
	BA 1 mg/l	BA 2,5 mg/l	BA 5,0 mg/l	Kinetina 6,0 mg/l
IAA 0,5 mg/l	IB0510Cu	IB0525Cu	IB0550Cu	
IAA 1,5 mg/l	IB1510Cu			IK1560Cu
NAA 0,5 mg/l			NB0550Cu	

Estos medios se ensayaron tres cultivares comerciales y tres líneas de mejora descritos en el apartado 1.1 del capítulo *Material y Métodos*.

4.1.1. Efecto del cultivar y del medio de inducción sobre el crecimiento en explantes primarios

En este primer experimento empleamos como explantes primarios segmentos de cotiledón, hipocótilo y hojas de plántulas de 5 a 20 días obtenidas por germinación en condiciones axénicas. En concreto se han utilizado cotiledones e hipocótilos de 13 días y hojas de 24 días en los genotipos Amarillo Oro y Amarillo Canario, cotiledones e hipocótilos de 7 y 10 días y hojas de 24 días en el genotipo MR1, cotiledones e hipocótilos de 7 y 10 días y hojas de 18 días para el genotipo Piel de Sapo, cotiledones e hipocótilos de 10 y 14 días y hojas de 18 días para la línea de mejora C943 y cotiledones e hipocótilos de 18 días y hojas de 22 días para la línea de mejora C943. Esta diferencia de días entre un genotipo y otro viene determinado por el vigor y la heterogeneidad en la germinación.

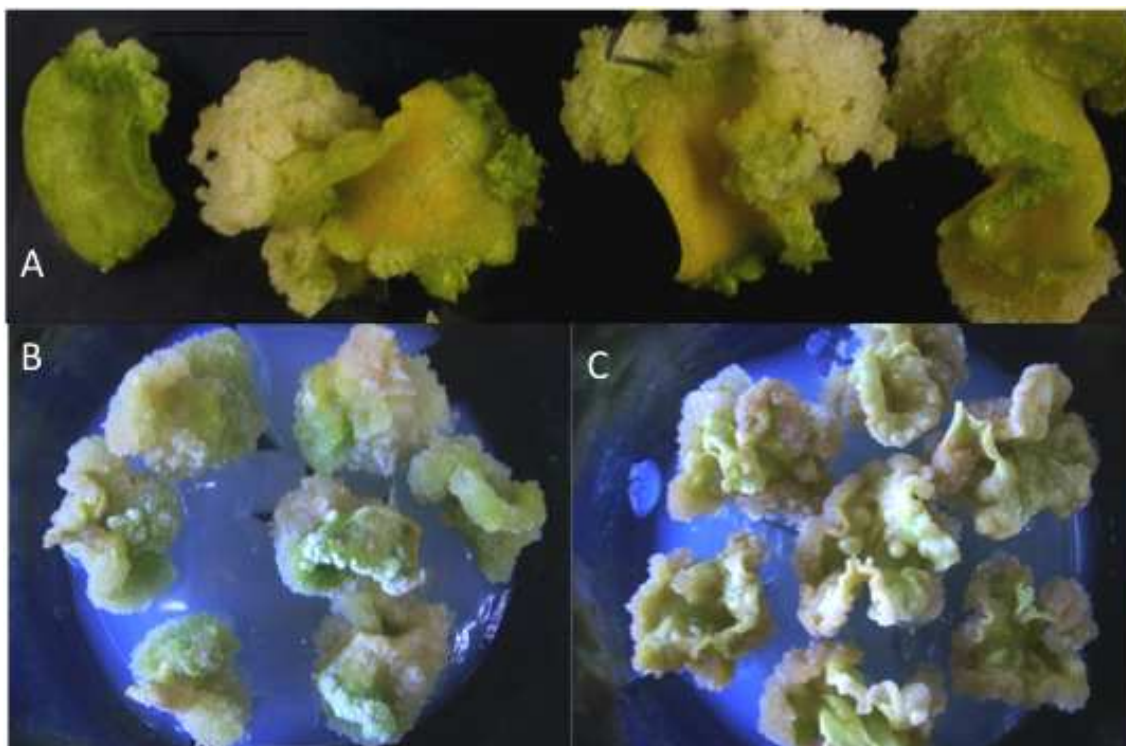


Figura 9.- Organogénesis y crecimiento en explantes primarios de melón. A. Formación progresiva de callos compacto, noduloso, de color verde en la zona de corte y formación de yemas-ápices en cotiledones. B. Formación de callo friable, inicialmente verde y posteriormente blanquecino en explantes de hipocótilo. C. Formación de callos de bajo crecimiento y blanquecinos en explantes de hoja.

Con los seis medios utilizados y en los seis genotipos, a los 25-30 días de cultivo en medio de inducción la mayoría de los explantes se mantuvieron

verdes y, en algunos, se pudo observar la formación de callos compactos nodulosos de color verde, que se originan en la zona de corte de la parte basal del cotiledón (Fig. 9A). En algunos medios de inducción, a las 4 semanas de cultivo aparecieron unas estructuras puntiagudas de unos 2-3 mm y de un verde mucho más intenso y brillante que el callo del que surgen yemas-ápices (Fig. 9A).

El proceso de desarrollo que nos ha aparecido más comúnmente ha sido el cambio progresivo del color verde inicial a otro con tonalidades blanquecinas por la generación de callos friables (disgregables). En estas zonas, el tejido pierde su compacidad y nunca forma estructuras organogénicas (Fig. 9B y C).

En algunas ocasiones se produjo una degeneración del tejido, con la aparición de tonalidades marrones, lo que desembocó en senescencia y muerte celular. Cuando esto sucedió suele extenderse a toda la superficie del explante e impide cualquier crecimiento celular en las zonas afectadas. En estos casos los explantes se descartaron.

Para determinar el efecto del medio de cultivo y/o de la línea o cultivar utilizado se ha cuantificado el porcentaje de explantes que han desarrollado callos desorganizados. En la Figura 10 se muestran los porcentajes de explantes de cotiledones de los seis cultivares que forman callos a los 45-60 días de cultivo en los diferentes medios de cultivo. Con este tejido se ha conseguido valores altos de inducción de crecimiento (formación de callo), con máximos por genotipo entre el 100% (Amarillo oro y Piel de sapo) y el 77% (MR1)

El comportamiento respecto a la inducción del crecimiento y la generación de callos en explantes de cotiledón ha sido variable a las diferentes concentraciones de hormonas utilizadas y en los genotipos.

La utilización en el medio de Kinetina (medio IKCu) provoca un descenso muy acusado en la formación de callos en los genotipos C943 (32%), Amarillo canario (32%) y C940 (40%). Por su parte, el aporte de NAA (medio

NBCu) inhibe totalmente el crecimiento en C943 y Amarillo canario y lo disminuye considerablemente en MR1 (30%) y Amarillo oro (43%). Cabe destacar que este medio fue el que dio mejores resultados en C940 (90%).

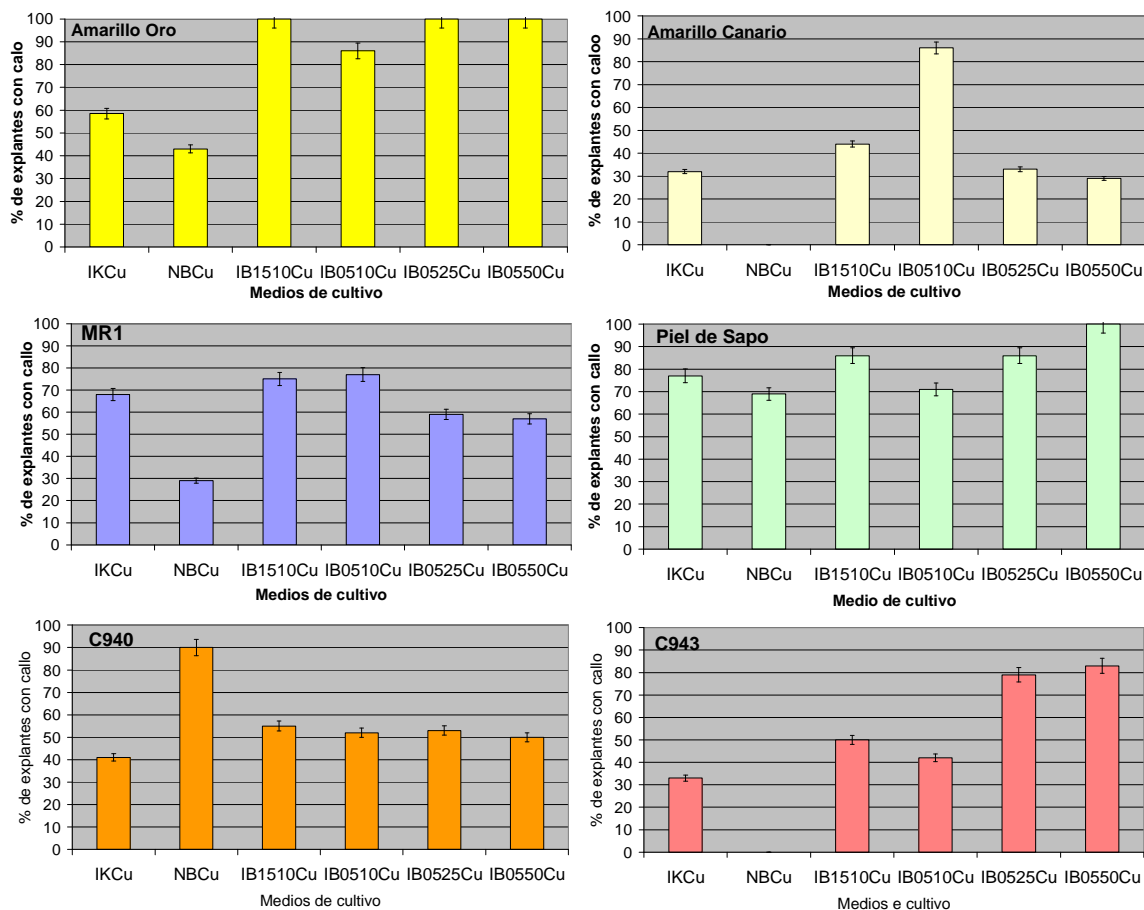


Figura 10.- Frecuencia de explantes de cotiledón de los seis genotipos (Amarillo oro, Amarillo canario, MR1, Piel de sapo, C940 y C943) que forman callo a los 45-60 días de cultivo en los diferentes medios de inducción.

Del conjunto de medios ensayados con diferentes concentraciones de IAA y BA (medios IB) se ha observado tres tipos de respuestas. La respuesta 1, que consiste en un crecimiento medio o alto a alta concentración de IAA y baja de BA (medio IB1510Cu), un descenso en el crecimiento cuando se disminuye la concentración de IAA (medio IB0510Cu) y un incremento acusado en el crecimiento, alcanzando los valores máximos, conforme se incrementa el contenido de BA (medio IB0510Cu < IB0525Cu < IB0550Cu); genotipos Amarillo oro, Piel de sapo y C943. La respuesta 2, que consiste en un crecimiento medio o bajo a alta concentración de IAA y baja de BA (medio

IB1510Cu), un incremento en el crecimiento, alcanzando los valores máximos, cuando se disminuye la concentración de IAA (medio IB0510Cu) y un descenso acusado en el crecimiento, conforme se incrementa el contenido de BA (medio IB0510Cu > IB0525Cu > IB0550Cu); genotipos Amarillo canario y MR1. Respuesta 3, el crecimiento es independiente de las concentraciones de estas hormonas, con una respuesta similar en todos los medios (medio IB1510Cu = IB0510Cu = IB0525Cu = IB0550Cu) para C940.

Con estos resultados, junto a los valores efectivos de formación de callos, podemos establecer cuatro agrupaciones de genotipos y medios más adecuados para utilizar con explantes de cotiledón. El primero de estos grupos estaría formado por Amarillo canario y MR1 con el medio con bajo contenido de IAA y BA (IB0510Cu). El grupo segundo sería Piel de sapo y C943 con el medio de baja concentración de IAA y alta de BA (IB0550Cu). El genotipo Amarillo oro crece bien en varios medios, pero considerando utilizar la menor cantidad de reguladores del crecimiento, el medio más efectivo es el que tiene un contenido medio de IAA y bajo de BA (medio IB1510Cu). Por último, mencionar por separado al genotipo C940, con un comportamiento muy diferente al resto y al que se asociaría el medio con bajo contenido en NAA y alto en BA (medio NB0550Cu).

Para determinar el efecto de otros explantes en la formación de callo hemos realizado estos experimentos de inducción del crecimiento en explantes de hipocótilo. En la Figura 11 se muestran los porcentajes de explantes de hipocótilo de los seis cultivares que forman callos a los 45-60 días de cultivo en los diferentes medios de cultivo. Con este tejido se han conseguido valores muy bajos de inducción de crecimiento (formación de callo), con un descenso muy considerable comparado con los resultados en cotiledón, con máximos por genotipo entre el 69% (Piel de sapo) y el 17% (C940).

La adición en el medio de Kinetina (medio IKCu) para explantes de hipocótilos ha provocado tres tipos de respuesta. La más drástica es la observada en Amarillo oro, donde no se ha observado ninguna inducción en el

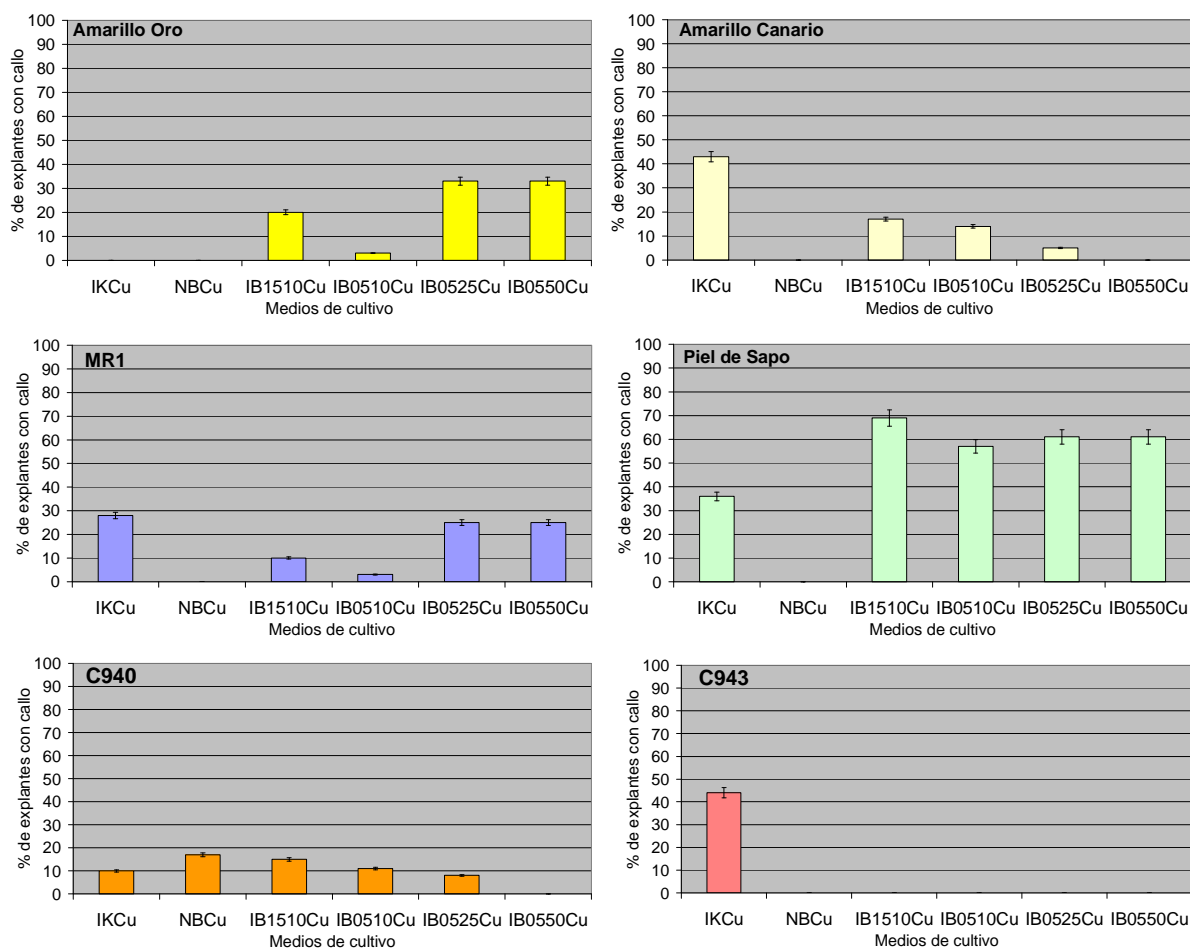


Figura 11.- Frecuencia de explantes de hipocótilo de los seis genotipos (Amarillo oro, Amarillo canario, MR1, Piel de sapo, C940 y C943) que forman callo a los 45-60 días de cultivo en los diferentes medios de inducción.

crecimiento. Los hipocótilos de C940 han crecido un poco, pero solo se ha alcanzado un 10% en la formación de callos; con valores igual de bajos en el resto de medios utilizados. En tres genotipos, Amarillo canario, MR1 y C943, se ha obtenido su valor máximo de regeneración. Por último, el genotipo Piel de sapo ha tenido una respuesta media e inferior a la obtenida en otros medios. Por su parte, el aporte de NAA (medio NBCu) ha provocado la completa inhibición en el crecimiento y en la formación de callos en todos los genotipos, a excepción del C940 en el que se ha observado una mínima regeneración (17%), siendo este su valor máximo.

Con respecto a los medios en los que se ha utilizado IAA en combinación con BA (medios IB), hemos observado dos respuestas diferenciadas. La

respuesta 1, que consiste en un crecimiento medio-bajo a alta concentración de IAA y baja de BA (medio IB1510Cu) y un descenso en el crecimiento en el crecimiento conforme se incrementa el contenido de BA (medio IB0510Cu > IB0525Cu), llegando a la inhibición completa cuando la concentración de BA es más alta (IB0550Cu); genotipos Amarillo canario y C943. La respuesta 2, que consiste en un crecimiento medio-bajo o alto a alta concentración de IAA y baja de BA (medio IB1510Cu), un descenso significativo cuando se disminuye la concentración de IAA (medio IB0510Cu) y un incremento cuando se aumenta el contenido de BA, no observándose diferencia entre las concentraciones más altas (medio IB0510Cu < IB0525Cu = IB0550Cu); genotipos Amarillo oro, MR1 y Piel de sapo. Cabe señalar que el genotipo C943 sólo regeneró con el medio IKCu y con ningún otro.

Con estos resultados de hipocótilo, podemos establecer las siguientes recomendaciones de medios por genotipos. Para los genotipos Amarillo canario, MR1 y C943 el medio que mejores resultados ha dado es el que tiene la combinación de IAA y Kinetina (IKCu). Para Amarillo oro el mejor medio es el que tiene baja cantidad de IAA y media de BA (IB0525Cu) mientras que para Piel de sapo el medio más recomendable sería el que tiene un contenido medio de IAA y bajo de BA (medio IB1510Cu). Por último, C940 que requiere un medio con bajo contenido en NAA y alto en BA (medio NB0550Cu).

Por último, hemos ensayado el tejido de hoja que por sus características citológicas se preve que de menores porcentajes de poliploidía. En la Figura 12 se muestran los porcentajes de explantes de hoja que han formado callo organogénico, en los seis cultivares a los 45-60 días de cultivo y en los diferentes medios de cultivo. Con este tejido se han conseguido unos valores medios de inducción de crecimiento (formación de callo), con valores menores a los conseguidos en cotiledón, con máximos por genotipo entre el 89% (Piel de sapo) y el 5% (C943).

La utilización en el medio de Kinetina (medio IKCu) provoca una respuesta organogénica alta-media en todos los genotipos, a excepción de C943 en cuyos explantes no se indujo el crecimiento. Sin embargo, la aplicación de NAA (medio NBCu) inhibe totalmente el crecimiento en C943,

MR1 y Amarillo oro, se obtuvo un valor bajo en Amarillo canario (37%) y dio los mejores porcentajes en Piel de sapo (89%) y C940 (73%).

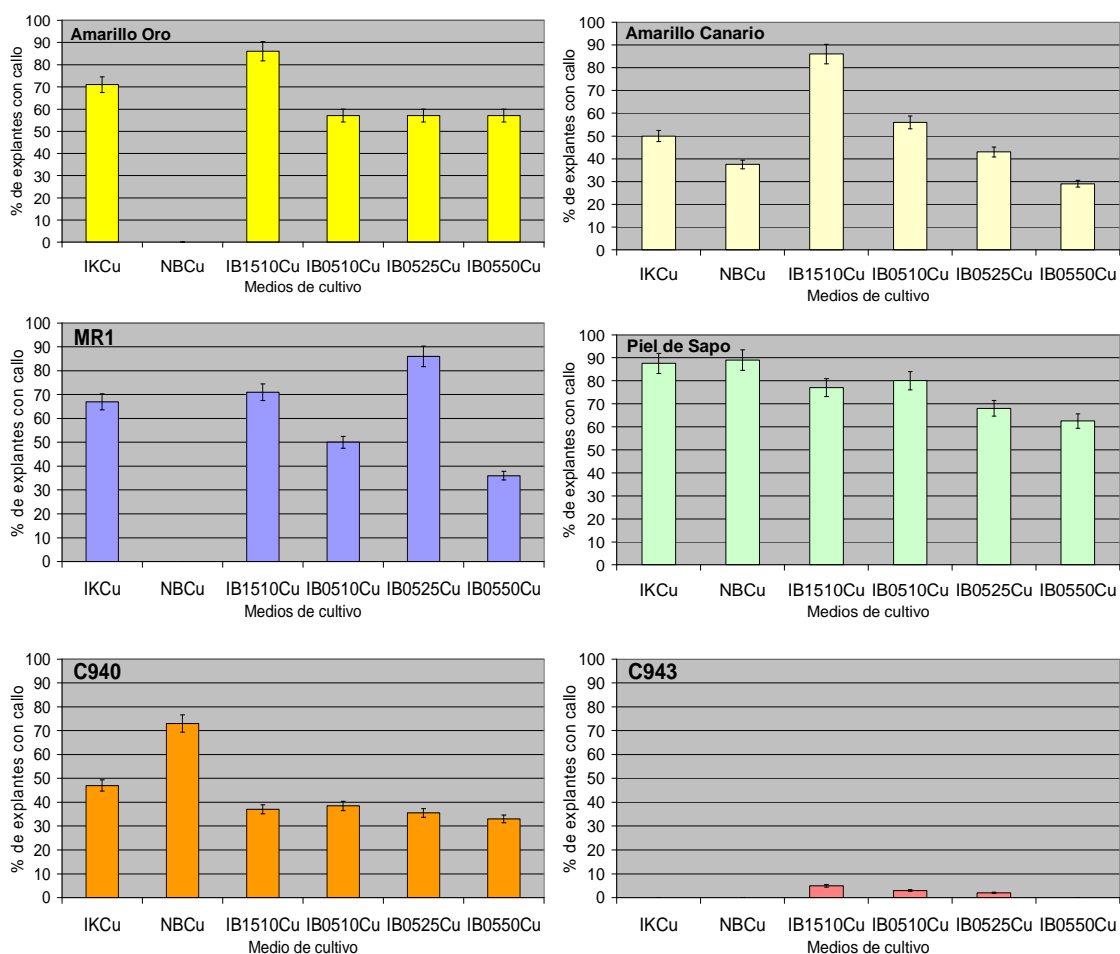


Figura 12: Frecuencia de explantes de hojas de los seis genotipos (Amarillo oro, Amarillo canario, MR1, Piel de sapo, C940 y C943) que forman callo a los 45-60 días de cultivo en los diferentes medios de inducción.

Cuando se han utilizado medios con IAA en combinación con BA (medios IB), hemos observado respuestas muy diferentes según los genotipos. En Amarillo oro se produce su máximo crecimiento a alta concentración de IAA y baja de BA (medio IB1510Cu) y una menos respuesta sin diferencias significativas conforme se incrementa el contenido de BA (medio IB1510Cu > IB0510Cu = IB0525Cu = IB0550Cu). En Amarillo canario también se observa la mayor inducción en la formación de callos a alta concentración de IAA y baja de BA (medio IB1510Cu) y un descenso acusado en el crecimiento conforme se incrementa el contenido de BA (medio IB0510Cu > IB0525Cu > IB0550Cu). En

MR1 se ha observado una respuesta muy irregular de tal forma que se ha observado un crecimiento medio-alto con una concentración alta de IAA y baja de BA (medio IB1510Cu), un descenso acusado cuando se disminuye la concentración de IAA (medio IB0510Cu), un fuerte incremento cuando se aumenta el contenido de BA (medio IB0525Cu) con los valores máximos (86%) y un descenso al aumentar el contenido de BA (medio IB0550Cu) (medio IB1510Cu > medio IB0510Cu < IB0525Cu > IB0550Cu). En Piel de sapo y C940 se observa una respuesta muy parecida, en los que se ha obtenido unos porcentajes altos (Piel de sapo) y medios (C940) y sin diferencias significativas entre estos medios (medio IB1510Cu = medio IB0510Cu = IB0525Cu = IB0550Cu). Destacar la baja organogénesis obtenida en el genotipo C943 en todos estos medios.

Según los resultados obtenidos con explantes de hojas podemos recomendar las siguientes medios para los genotipos utilizados. Para los genotipos Amarillo oro y Amarillo canario el medio que mejores resultados ha dado es el que tiene una concentración media de IAA y baja de BA (IB1510Cu). En MR1 el medio que produce un mayor porcentaje de inducción es el que tiene una concentración baja de IAA y media de BA (IB0525Cu). En C940 y Piel de sapo ha funcionado mejor la combinación de NAA y BA (NBCu), si bien los explantes de hoja de Piel de sapo han regenerado bastante bien en todos los medios ensayados. Por lo contrario, en C943 no han funcionado bien ninguno de ellos.

A modo de resumen del comportamiento de los explantes de cada genotipo en los medios utilizados presentamos la Tabla 3, en la que se agrupan los datos en cuatro categorías por porcentajes de formación de callos.

Ante estos resultados cabe llegar a varias valoraciones. La primera es que en los genotipos estudiados el tejido de hipocótilo tiene una menor capacidad para la formación de callos que las hojas y estos a su vez que los cotiledones en los medios ensayados. Este resultado es contradictorio con lo obtenido en calabaza por Pal y col. (2007), donde obtuvieron que los

explantes de hipocotilo presentaron mayor índice de formación de callos que los explantes de cotiledón en un medio MS que contenía 2,5 mg/l de 2.4-D.

Tabla 3- Porcentajes de inducción de crecimiento y formación de callo organogénico en explantes de cotiledones, hipocótilos y hojas de seis genotipos en seis medios de cultivo con distintos contenidos de auxinas y citoquininas. (*) Medio de cultivo recomendado.

AMARILLO ORO	IKCu	NBCu	IB1510Cu	IB0510Cu	IB0525Cu	IB0550Cu
Cotiledones	17%	43%	100% *	86%	100%	100%
Hipocotilo	0%	0%	20%	3%	33% *	33%
Hoja	71%	0%	86% *	57%	57%	57%
AMARILLO CANARIO	IKCu	NBCu	IB1510Cu	IB0510Cu	IB0525Cu	IB0550Cu
Cotiledones	32%	0%	44%	86% *	33%	29%
Hipocotilo	43% *	0%	17%	14%	5%	0%
Hoja	50%	37,50%	86% *	56%	43%	29%
MR1	IKCu	NBCu	IB1510Cu	IB0510Cu	IB0525Cu	IB0550Cu
Cotiledones	69%	29%	75%	77% *	59%	57%
Hipocotilo	28% *	0%	10%	3%	25%	25%
Hoja	67%	0%	71%	50%	86% *	36%
PIEL DE SAPO	IKCu	NBCu	IB1510Cu	IB0510Cu	IB0525Cu	IB0550Cu
Cotiledones	77%	69%	86%	71%	86%	100% *
Hipocotilo	36%	0%	69% *	57%	61%	61%
Hoja	87,50%	89% *	77%	80%	68%	62,50%
C940	IKCu	NBCu	IB1510Cu	IB0510Cu	IB0525Cu	IB0550Cu
Cotiledones	41%	90% *	55%	52%	53%	50%
Hipocotilo	10%	17% *	15%	11%	8%	0%
Hoja	47%	73% *	37%	38,50%	35,50%	33%
C943	IKCu	NBCu	IB1510Cu	IB0510Cu	IB0525Cu	IB0550Cu
Cotiledones	33%	0%	50%	42%	79%	83% *
Hipocotilo	44% *	0%	0%	0%	0%	0%
Hoja	0%	0%	5%	3%	2%	0%

Muy alto o máximo	85-100%
Alto	70-84%
Medio	40-69%
Nulo o bajo	0-40%

Claramente, se requiere el ensayo de nuevos medios con la utilización de otros tipos de auxinas y citoquininas y/u otras combinaciones hormonales, puesto que resultados de organogénesis inferiores al 70% no son aceptables para iniciar un programa de propagación o experimentos de transformación. Esto sucede prácticamente con explantes de hipocótilo de todos los genotipos y también en explantes de hoja de C943.

A su vez, los resultados muestran una diferencia sustancial entre diferentes tejidos dentro de un mismo genotipo. Ello es muy evidente en los

genotipos en los que se recomienda medios distintos para cada uno de los tejidos, como sucede en Amarillo canario, Piel de sapo y C943. En Amarillo oro, MR1 y C940 si existe mayor homogeneidad de respuesta y se han obtenidos los mejores resultados en los distintos tejidos en el mismo medio, aunque hay que resaltar que los porcentajes de organogénesis muy bajos en hipocótilos y se requeriría una modificación en este medio para mejorar la eficacia; Amarillo oro (medio IB1510Cu), MR1 (medio IB0510Cu) y C940 (medio NBCu).

4.1.2. Efecto del cultivar y del medio de inducción sobre la respuesta organogénica en explantes primarios

Un objetivo de los cultivos de tejidos *in vitro* es la regeneración de plantas. Los explantes primarios cultivados *in vitro* pueden regenerar plantas completas siguiendo una ruta embriogénica (que lleva a la formación de embriones somáticos) u organogénica, que conduce a la diferenciación de meristemas caulinares y/o radicales que originan ápices y/o raíces adventicias. En el cultivo de explantes primarios de melón hemos observado que, independientemente del cultivar, en nuestras condiciones de cultivo los explantes forman yemas adventicias características de una respuesta de tipo organogénico (Fig. 13). Estas estructuras se originan en la zona de las heridas, a partir del tejido de callo, por lo tanto por morfogénesis indirecta. Una respuesta similar se ha observado en trabajos previos de diferentes variedades de melón (García-Sogo y col., 1991; Bordás, 1994), en pepino (Miguel y col. 1993) y tomate (Ellul y col. 1999).

A las 4 semanas de cultivo en el medio de inducción se desarrollan callos más o menos desorganizados en los que son perfectamente identificables yemas adventicias incipientes (Fig. 13A y B). A las 5-6 semanas de cultivo, estas estructuras organogénicas se hacen más patentes y en este momento se aíslan y se introducen en un medio de enraizamiento para que elonguen, se inicie el crecimiento del ápice con la formación de las primeras hojas y enraícen (Fig. 13C, D y F). El siguiente paso es la clonación y la regeneración de plantas enteras (calliclones). Este tipo de desarrollo no implica la necesidad del aislamiento previo del callo organogénico del resto

del explante, como se ha indicado en otros trabajos en melón (Dirks y van Buggenum, 1989), aunque es probable que la separación del callo organogénico pudiera mejorar los resultados obtenidos.

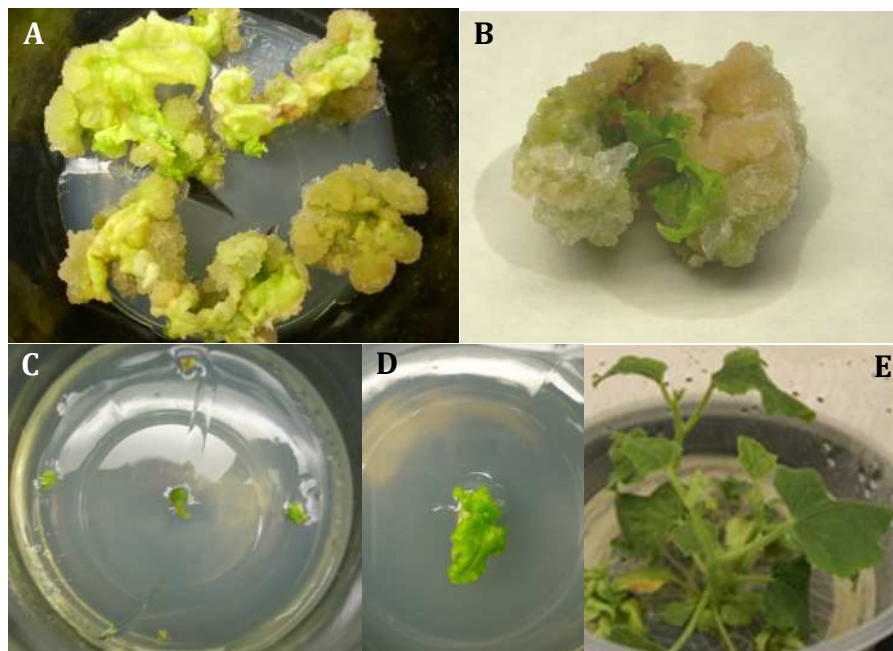


Figura 13.- Respuesta organogénica de explantes primarios. A) Callos con aparición de estructuras organogénicas de color verde. B) Detalle de la formación de yemas-ápices. C) Aislamiento e inoculación de estructuras yemas-ápices en medio de elongación y enraizamiento. D) Detalle del desarrollo de los ápices. E) Planta enraizada.

En relación con la polaridad, cuando el explante cultivado presenta una respuesta organogénica, ésta se localiza generalmente en el callo formado en la parte proximal del explante, la que se encuentra más cerca del hipocótilo o del peciolo. La respuesta se manifiesta con la formación de yemas-ápice y se hace patente a los 45-60 días de cultivo en zonas situadas en el haz del explante, al límite entre el callo noduloso y el tejido cotiledonario (Fig. 13).

El análisis de los resultados correspondientes a la frecuencia de desarrollo de yemas-ápices en diferentes tejidos, cultivares y medios (Figs. 14 y 15), indica que los seis cultivares presentan muy baja respuesta organogénica, además de tener una respuesta muy variable y limitada. En ningún caso se han desarrollado estructuras organogénicas cuando se han utilizado como explantes primarios hipocótilos; en ninguno de los seis cultivares en los medios utilizados. Claramente se descarta este tipo de explante con fines de regeneración.

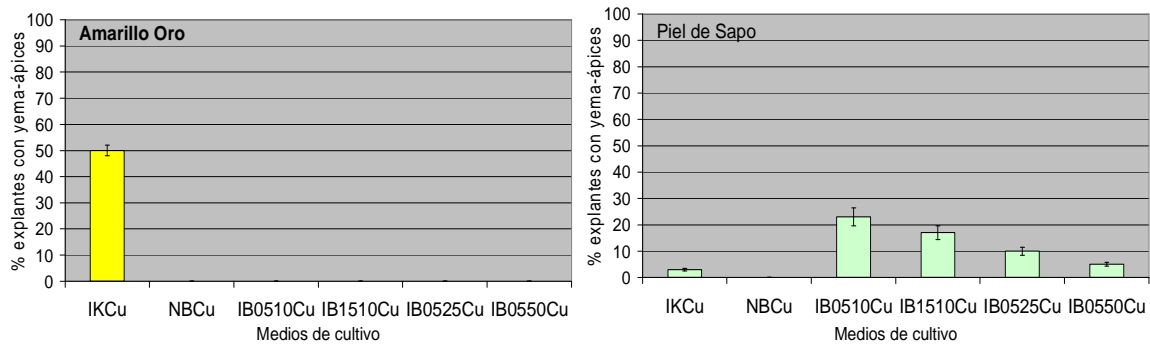


Figura 14.- Frecuencia de explantes de cotiledón (Amarillo oro y Piel de sapo) que forman yema-ápices a los 45-60 días de cultivo en los medios organogénicos.

Sólo los genotipos Amarillo oro y Piel de sapo han presentado organogénesis en explantes de cotiledones (Fig. 14), con muy bajos y máximos por genotipo entre el 50% (Amarillo oro) y el 23% (Piel de sapo).

Los explantes de cotiledón del cultivar Amarillo oro sólo ha presentado respuesta y formación de yemas-ápices en el medio base con concentración media de IAA y alta de Kinetina (medio IKCu), con un porcentaje de explantes que han desarrollado ápices del 50%. Por su parte, el cultivar Piel de sapo, aunque también ha presentado formación de yemas-ápices en este medio (medio IKCu), lo ha hecho en menor medida (3%). Su respuesta ha sido más efectiva cuando se ha utilizado BA y a igual concentración de esta citoquinina se obtienen mejores resultados a menor concentración de IAA (IB0510Cu > IB1510Cu), con un valor máximo de organogénesis de un 23%. De hecho, al aumentar la concentración de BA se produce una inhibición de la organogénesis (IB1510Cu > IB0525Cu > IB0550Cu). La sustitución de IAA por NAA (medio NBCu) anula por completo la formación de yemas-ápices.

Con estos resultados, y considerando que en ambos casos hay que modificar los medios para obtener valores más convenientes de organogénesis, podemos indicar que el medio más recomendado para la inducción de organogénesis en explantes de cotiledón es el que tiene una menor concentración de IAA y de BA (medio IB0510Cu) en Piel de sapo y una concentración media de IAA y alta de Kinetina (medio IKCu) en Amarillo oro.

Cuando hemos utilizado explantes de hoja, los genotipos que han presentado formación de yemas-ápices han sido MR1 y Piel de sapo (Fig. 15), el resto no ha mostrado ningún indicio de organogénesis.

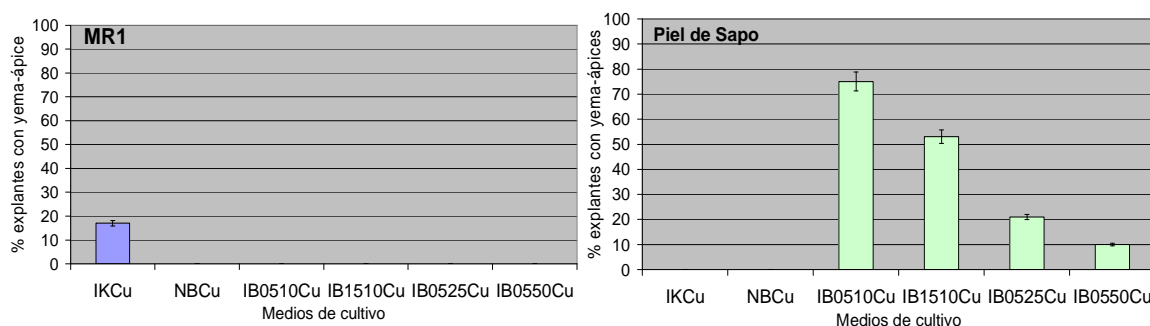


Figura 15.- Frecuencia de explantes de hoja (MR1 y Piel de sapo) que forman yema-ápices a los 45-60 días de cultivo en los medios organogénicos.

La respuesta de los explantes de hoja de la línea MR1 ha sido muy baja y sólo se ha hecho evidente mediante la formación de yemas-ápice en el medio con concentración media de IAA y alta de Kinetina (medio IKCu), con un valor máximo de 17%. Sin embargo, la respuesta ha sido mayor, con valores aceptables, en el caso del cultivar Piel de sapo; ha desarrollado estructuras organogénicas en los medios que contienen IAA y BA, con el valor máximo (75%) cuando el medio tiene de la concentración más baja de ambas hormonas (medios IB0510Cu). Conforme se incrementan las concentraciones hormonales de produce una disminución progresiva en la formación de yemas-ápice, lo que se hace muy evidente al aumentar la concentración de BA (medios IB0510Cu > IB1510Cu > IB0525Cu > IB0550Cu). Los otros medios ensayados, que llevan Kinetina (IKCu) y NAA (NBCu) no han sido efectivos.

Ante estos resultados, y con limitaciones, podemos recomendar para la inducción de organogénesis el medio con Kinetina (medio IKCu) para el genotipo MR1 y para el cultivar Piel de sapo (al igual que con explantes de cotiledón) un medio que tenga una la menor concentración de IAA y de BA (medio IB0510Cu).

Para evidenciar la respuesta de cada genotipo y de los diferentes explantes a los medios de cultivo hemos elaborado la Tabla 5, en la que se agrupan los datos en porcentajes.

Tabla 5- Porcentajes de formación de yemas-ápice comparando de cada genotipo los distintos tipos de explantes ante las mismas concentraciones. (*) Medio de cultivo recomendado.

AMARILLO ORO	IKCu	NBCu	IB1510Cu	IB0510Cu	IB0525Cu	IB0550Cu
Cotiledones	50%*	0%	0%	0%	0%	0%
MR1	IKCu	NBCu	IB1510Cu	IB0510Cu	IB0525Cu	IB0550Cu
Hoja	17%*	0%	0%	0%	0%	0%
PIEL DE SAPO	IKCu	NBCu	IB1510Cu	IB0510Cu	IB0525Cu	IB0550Cu
Cotiledones	3%	0%	17%	23%*	10%	5%
Hoja	0%	0%	53%	75%*	21%	10%

Muy alto o máximo	85-100%
Alto	70-84%
Medio	40-69%
Nulo o bajo	0-40%

Los resultados demuestran que no se han obtenido, en ningún caso, valores muy altos de organogénesis y sólo para un genotipo (Piel de sapo) y un tipo de explante (hoja), en uno de los medios (IB0510Cu) hemos obtenido un valor alto, adecuado para iniciar un protocolo de regeneración. Parece claro que la utilización de NAA (medio NBCu) inhibe por completo la formación de yemas-ápice para cualquier tipo de explante y de genotipo. En los cultivares Amarillo oro y MR1 se requiere Kinetina (medio IKCu) para la formación de yemas-ápices, ya que para el resto medios no han presentado morfogénesis, obteniendo valores máximos del 50% (Amarillo oro) y del 17% (MR1). Estos resultados denotan que se debe modificar la composición del medio en aras de mejorar la respuesta. Por lo que respecta a Piel de sapo la presencia de IAA y BA es fundamental en ambos tipos de explantes siempre a las concentraciones más bajas.

De todo lo expuesto anteriormente podemos concluir que:

1) Independientemente del tipo de medio, los explantes de hoja poseen mayor capacidad de regeneración que los de cotiledón y, claro está, que los de hipocótilo. Esta respuesta organogénica es diferente a la encontrada en el melón tipo Galia donde el cotiledón fue el mejor explante para regenerar plantas completas a partir de líneas parentales masculina y femenina, comparado a los explantes de hipocotilo y (Núñez-Palenius y *col.*, 2007).

2) El medio que ha presentado mayor porcentaje de morfogénesis ha sido el IB0510Cu (0,5 mg/l de IAA y 1 mg/l de BA), lo que nos conduce a pensar que a mayor concentración hormonal, tanto de IAA como de BA, disminuye la regeneración aunque se produzca un mayor desarrollo de callos. Resultados similares en el cultivar “Gaucho”, donde los explantes cultivados en medios con bajas concentraciones de BA presentan mejores respuestas de regeneración (Pinho y col., 2010). En calabaza se demostró que en el medio sin BA no se produce crecimiento y que por encima de 1 mg/l se producía inhibición (Yalçın Mendi y col., 2008). Sin embargo, se han encontrado mejores tasas de regeneración cuando el medio contenía NAA en lugar de IAA en diferentes cultivares de melón (Pinho y col. 2010), pepino (Selvaraj y col., 2007) y calabaza (Yalçın Mendi y col., 2008). Además, en calabaza se demostró que en medio sin BA no se produce crecimiento y presenta su máximo a una concentración de 1mg/l y que a partir de esta cantidad disminuía. También que a mayor concentración de IAA disminuía la capacidad de regeneración.

3) El genotipo que ha presentando mayor porcentaje de morfogénesis ha sido el cultivar Piel de sapo. No obstante, la gran variabilidad en melón es el factor más importante que determina el potencial de regeneración y los resultados obtenidos con diferentes cultivares y líneas confirman la necesidad de adaptar el protocolo de regeneración a cada genotipo de melón.

4.2. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA CON LOS GENES *NPT-II* Y *GUS*

El melón es un cultivo de alto valor agronómico y que a pesar del amplio desarrollo de protocolos de transformación en los últimos 20 años, su transformación sigue siendo muy dependiente del genotipo y con eficiencias relativamente bajas (0-12,5%) (Nuñez-Paleniús y col., 2006; 2008; Ren y col., 2012).

La introducción, mediante transformación genética, de genes de función desconocida en melón, nos puede resultar de gran utilidad para esclarecer el papel funcional de estos genes en melón. Es por ello que en este trabajo nos propusimos poner a punto un método de transformación en melón. Nuestra finalidad última es poder obtener líneas transgénicas en las que se

sobreexpresen o en las que se inhiben, por diferentes técnicas, los genes de interés. Como un primer paso, hemos utilizado un plásmido binario pROKII en el que se ha introducido el gen de resistencia a kanamicina (*Npt-II*) como gen de selección o/y el gen *uid A* (GUS) que codifica para la β -glucuronidasa como gen delator de la expresión del transgén, ambos bajo el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico del tabaco (Fig. 16). Ambos genes son marcadores y nos permitirán calcular la eficiencia de la técnica de transformación utilizada y si las plantas transformadas expresan los genes incluidos en el T-DNA.

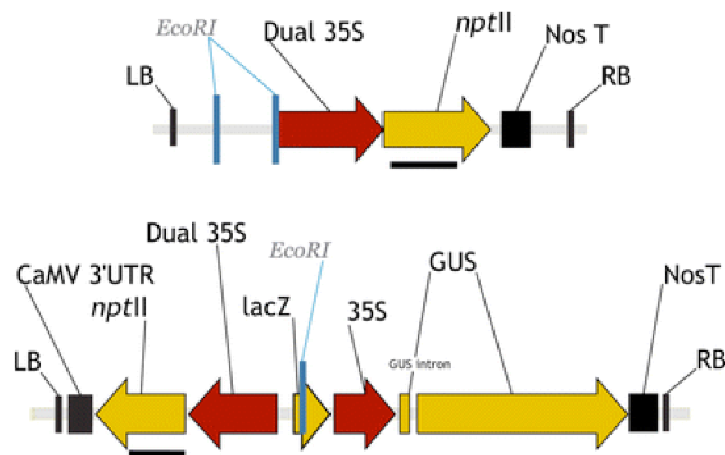


Figura 16.- Esquema de las construcciones en pROKII; pRIINptII y pRIIGUS-NptII.

El método de transformación más eficaz, el que ha permitido la modificación genética de más de 130 especies vegetales pertenecientes a 35 familias botánicas, ha sido el cocultivo de explantes primarios con *Agrobacterium tumefaciens* como vector biológico (Birch, 1997). En *Arabidopsis* se ha desarrollado un sistema de transformación genética *in planta* mediante inoculación e infiltración por vacío con *Agrobacterium* (Bouchez y col., 1993; Bechtold y col., 1993; Katavic y col., 1994; Chang y col., 1994). A pesar de su eficacia en esta crucífera modelo, este sistema está limitado a plantas de pequeño tamaño y con características vegetativas y reproductivas muy concretas, lo que hace que el cultivo de tejidos siga siendo la técnica más empleada para obtener plantas modificadas genéticamente de especies de interés agronómico.

Para muchos cultivares de melón, el desarrollo de un sistema de transformación efectivo es crucial para la mejora por herramientas de ingeniería genética. El melón es susceptible a la infección por *Agrobacterium* y responde a la regeneración de explantes de cotiledón (Dirks y van Buggenum, 1989), de callo (Moreno y col., 1985) y hoja (Kathal y col., 1988). La frecuencia de transformación/regeneración varía ampliamente entre cultivares (Guis y col., 1998; Galperin y col., 2003; Akasaka-Kennedy y col., 2004; Rhimi y col., 2006) y de la fuente de explantes (Fang y Grumer, 1990; Guis y col., 2000). Igual sucede en tomate, donde se ha demostrado que la transformación genética vía *Agrobacterium* depende en buena medida del genotipo (Ellul y col., 2003). No obstante, el método de transformación mediada por *Agrobacterium* ha sido el más utilizado en melón y con buenos resultados (Nuñez-Palenius y col., 2008; Wu y col., 2009; Ren y col., 2012). Nosotros hemos optado por este método por estar puesto a punto en el laboratorio y porque está descrito que es el que menos copias de genes transfiere, lo cual ayuda a reducir las posibilidades de genes múltiples que desencadenen el silenciamiento génico en las plantas transgénicas.

Para los experimentos de transformación genética hemos utilizado la línea Piel de sapo de melón seleccionada por ser la que mejores resultados ha dado en los experimentos de inducción del crecimiento y regeneración *in vitro*. Aunque nuestro principal interés en las líneas objeto de estudio se basaba en las diferencias en el hábito de crecimiento y en el tipo de fruto, la selección de la línea Piel de sapo, ginomonoica, se ha hecho por ser la que ha presentado mayor aptitud organogénica en los medios que hemos ensayado. Como explantes primarios hemos utilizado secciones de cotiledones, con los que habíamos obtenido los mejores resultados de regeneración *in vitro* y de hojas, por ser los que normalmente dan menos problemas de poliploidía. Se han utilizado plántulas de 14-16 días y en la inoculación con *Agrobacterium* se ha utilizado acetosiringona, para activar a los genes de virulencia (genes *vir*) del plásmido Ti (Hooykaas y Schilperoort, 1984; Stachel y col., 1986).

Cuando los ápices alcanzaron un desarrollo suficiente para su individualización (0,5-1cm), se cortaron del callo y se transfieren a un medio de enraizamiento con antibiótico de selección (test de enraizamiento con

kanamicina), que nos demuestra la presencia y expresión del gen *NptII*, que es un componente de la construcción génica introducida en el plásmido pROKII. El gen de la neomicina fosfotransferasa (*NptII*) confiere resistencia a antibióticos aminoglucósidos, como la kanamicina, de tal forma que el enzima desactiva al antibiótico mediante fosforilación (Peña, 2000). Los ápices que enraizaron en estas condiciones mostraron resistencia al antibiótico y por lo tanto, se consideraron, en un principio, como transgénicos, pues al menos se ha introducido el gen *NptII*. Una vez que las plantas están enraizadas, cada planta individual (supuesto genotipo independiente) se propaga *in vitro* hasta obtener un número suficiente de clones.

Hemos realizado un total de cuatro experimentos de transformación en el cultivar Piel de sapo, usando las construcciones pRII*NptII* y pRIIGUS-*NptII* (Fig. 16) en *Agrobacterium* (LBA4404) y explantes de cotiledón y hoja (Tabla 6). Se han inoculado un total de 753 explantes primarios, 357 con pRII*NptII* y 396 con pRIIGUS-*NptII*. Las eficacias de este método de transformación, medidas como número de callos resistentes a kanamicina respecto al número total de explantes inoculados (EET ó eficacia estricta de transformación) y el número de plantas obtenidas en relación al número de explantes utilizados (ET o eficacia de transformación), se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de las transformaciones genéticas. EET (eficacia estricta de transformación) = número de callos resistentes a kanamicina que producen al menos una planta transgénica respecto al número total de explantes inoculados; ET (eficacia de transformación) = número de plantas resistentes a kanamicina en relación al número total de explantes inoculados.

Experimentos de transformación	N° explantes inocul.	N° de callos organog.	N° de callos (plántulas)	EET (%)	Plantas transformadas	
					N	ET(%)
<i>Npt-II</i> cotiledones	145	8	3	2,07	4	2,76
<i>Npt-II</i> hojas	212	5	5	2,36	8	3,77
<i>Npt-II::GUS</i> cotiledones	156	10	4	2,56	4	2,56
<i>Npt-II::GUS</i> hojas	240	4	2	0,83	2	0,83
Totales:	753	27	14	1,86	18	2,39

Las EET fueron de 2,07% en cotiledones y 2,36% en hojas en la transformación con el gen *Npt-II* y de 2,56% en cotiledones y 0,83% en hojas en la transformación con el gen *Npt-II::GUS*, con un valor total de 1,86% (Tabla 6). En los cuatro experimentos realizados se han obtenido plantas resistentes a kanamicina pero con una eficiencia muy baja considerando el número de explantes utilizados, de tal forma que en algunos casos sólo se han obtenido 2 plantas transformadas (Tabla 6).

Otra estima de la eficacia de transformación vendría determinada por la proporción del número total de plantas resistentes a kanamicina (caracterizadas mediante el test de enraizamiento en medio selectivo) respecto al total de explantes inoculados (ET o eficacia de transformación). La ET general ha sido de 2,39% (Tabla 6). Los valores más altos del número de callos que producen plántulas resistentes a kanamicina, los hemos encontrado cuando hemos utilizado hojas con la construcción *pRIINptII* (ET= 3,77%). Los resultados con cotiledones con ambas construcciones da valores muy próximos (ET= 2,76% y 2,56%). Sin embargo, en explantes de hoja, con la construcción *pRIIGUS-NptII* sólo se han obtenido 4 callos de los cuales sólo 2 han regenerado plántulas (ET= 0,83%).

Estos resultados distan mucho de ser satisfactorios en protocolos actuales de transformación y de hecho son muy inferiores a los obtenidos en el cultivar *Galia* por Nuñez-Palenius y *col.* (2006), con frecuencias de transformación entre 7,5-12,5%, o en la línea de mejora BU-21 (Galperin y *col.*, 2003). Los resultados están más próximos a los obtenidos por la mayoría de los autores en diferentes variedades y con distintas construcciones, con valores de eficiencia de transformación entre 0,7 y 3% (Fang y Grumet, 1990; Gaba y *col.*, 1992; Bordas y *col.*, 1994; Guis y *col.*, 2000; Akasaka-Kennedy y *col.*, 2004; Yalcin-Mendi y *col.*, 2004; Curuk y *col.*, 2005; Castelblanque y *col.*, 2008) y pueden alcanzar el 7% (Fang y Grumet, 1990). Estos resultados demuestran la baja capacidad de regeneración de las células transformadas, lo que sugiere la incapacidad de las células de melón para ser competentes para la transformación y regeneración. Las observaciones citológicas de las células epidérmicas y subepidérmicas, que son la fuente de organogénesis, muestran una desorganización de las áreas meristemáticas transformadas, lo

cual podría explicar las dificultades encontradas para regenerar plantas de melón después de la transformación genética (Chovelon y col., 2011), en sandía (Yalcin-Mendi y col., 2003) y pimiento (Wolf y col., 2001).

Además, las diferencias en la eficiencia de transformación pueden ser debidas a que en parte está condicionada por una combinación de factores tales como la cepa de *Agrobacterium*, el marcador de selección y las construcciones usadas (Hellens y Mullineaux, 2000); en todos los casos difieren las construcciones empleadas y en algunos de ellos también la cepa y el compuesto de selección. También se ve fuertemente influenciada la ET por el genotipo (Guis y col., 1998; Galperin y col., 2003; Akasaka-Kennedy y col., 2004; Rhimi y col., 2006) y la fuente del explante (Fang y Grumet, 1990; Guis y col., 2000). Las eficiencias de transformación pueden diferenciarse puesto que en todos los trabajos descritos se utilizan variedades y/o líneas diferentes a la utilizada por nosotros.

Trabajos anteriores de transformación de melón indicaron que el tiempo óptimo de inoculación en el medio de infección está comprendido entre 20 segundos y 30 minutos (Valle's y Lasa, 1994; Ayub y col., 1996; Guis y col., 2000), dependiendo de la cepa de *Agrobacterium* utilizada, la concentración de bacterias en suspensión, la especie vegetal y el tamaño del explante. Nosotros hemos empleado 10 minutos de inoculación de los explantes en un medio de infección con una DO a 600 nm, como indicador de la concentración de bacterias, de 0,2-0,4. Ren y col. (2012) demostraron que este era el tiempo más adecuado cuando utilizaban DO_{600} entre 0,7 y 1,0, ya que el incremento en 5 y 10 minutos producía un cambio a color marrón y necrosis de algunos de los explantes.

El cocultivo es una de las etapas más importantes en el procedimiento de transformación. Las condiciones del cocultivo puede aumentar la eficiencia de transformación, como por ejemplo la temperatura (Fullner y Nester, 1996; Yasmin y Debener, 2010; Sharma y col., 2011) y el periodo de cocultivo (Fang y Grumet, 1990; Shilpa y col., 2010; Seo y col., 2011). Se ha descrito que periodos de cocultivo de 2-6 días resultaron ser los más óptimos para melón (Valle's y Lasa, 1994; Galperin y col., 2003; Akasaka-Kennedy y col., 2004;

Ren y col., 2012), mientras que temperaturas de 19 a 22°C se han descrito como críticas para obtener una alta eficiencia de transformación por *Agrobacterium* y temperaturas superiores disminuyen drásticamente esta capacidad (Fullner y Nester, 1996). Nosotros hemos utilizado una temperatura de 28°C y un periodo de 2 días de cocultivo.

Por todo lo descrito podemos concluir que hemos obtenido 18 plantas transformadas (12 con pRIINptII y 6 con pRIIGUS-NptII), de 4 experimentos de transformación independientes. Por el número de explantes utilizados (753) se deduce que la eficiencia de transformación ha sido muy baja posiblemente debido a la baja capacidad de las células de melón para ser competentes para la regeneración y la transformación. Algunos autores han desarrollado protocolos con mejores resultados en transformación lo que determina que en nuestro caso podría ser mejorada. Para ello podríamos actuar sobre algunas condiciones variables dentro del protocolo de transformación, como el tiempo de inoculación y la concentración del cultivo bacteriano, de tal forma que si mantenemos los 10 minutos de inoculación de los explantes en el cultivo bacteriano deberíamos incrementar la DO₆₀₀ a 0,7. Otros factores a modificar serían las condiciones del cocultivo utilizando una temperatura más baja, a 22°C, y probando incrementar el tiempo a 3-4 días. También podríamos probar otra cepa de *Agrobacterium* que tenga mayor habilidad de transformación. La cepa EHA105 ha demostrado ser más eficiente en la producción de transformantes estables que la cepa LBA4404 (Galperin y col., 2003).

4.3. EVALUACIÓN DEL NIVEL DE PLOIDÍA DE LOS TRANSFORMANTES PRIMARIOS (TG1)

Normalmente, los análisis fenotípicos de plantas en las que se sobreexpresa o inactiva un transcrito, como método para dilucidar la función del gen correspondiente, no tienen en cuenta la posibilidad de que parte de los efectos anormales observados puedan deberse a la aparición de fenómenos de poliploidía durante el proceso de transformación genética. Plantas de melón regeneradas por técnicas de cultivo *in vitro* son muy susceptibles de incrementar la ploidía en estas condiciones (Bouabdallah y Branchard, 1986; Debeaujon y Branchard, 1992; Kathal y col., 1992; Ezura y col., 1992; 1994;

Guis y col., 1998). Además, un fenómeno común en la transformación del melón, es la alta frecuencia de producción de plantas tetraploides y de regenerantes falsos positivos (Guis y col., 2000; Wu y col., 2009). Así, se ha analizado el nivel de ploidía en las plantas transformadas (TG1) mediante citometría de flujo. Para ello se han utilizado secciones de 1 cm² de hojas jóvenes (3^a hoja más próxima al ápice) procedentes de plantas aclimatadas y crecidas en invernadero.

Las plantas diploides (2n) se identificaron por la presencia mayoritaria de núcleos con contenido 2C, si bien el análisis también detecta un bajo porcentaje de núcleos 4C. Por el contrario, en las plantas tetraploides (4n) no aparecen núcleos 2C distribuyéndose estos entre un alto porcentaje con contenido 4C y una baja proporción de núcleos 8C (Fig. 17).

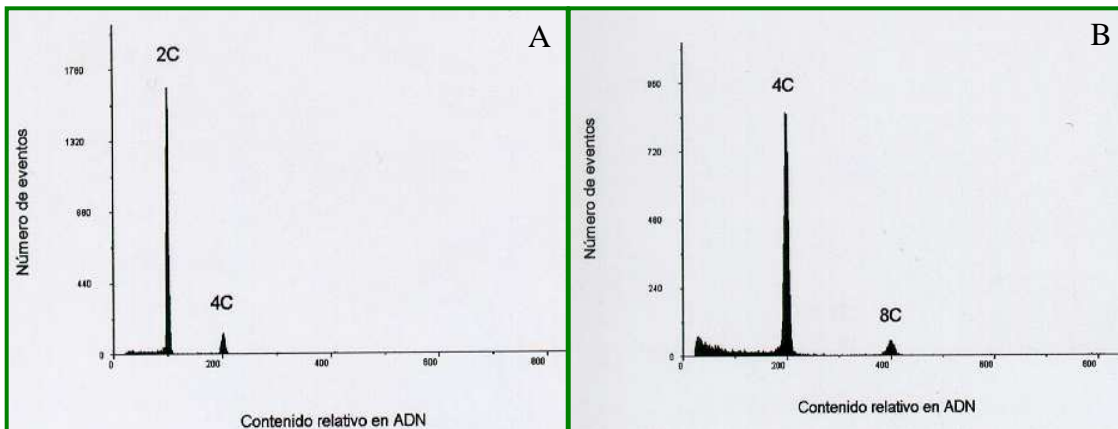


Figura 17.- Diagramas de distribución del contenido en ADN de los núcleos de las plantas obtenidas a partir de callos de cotiledón y hoja de melón. (A) Planta diploide; (B) Planta tetraploide.

Como se muestra en la Tabla 2, hemos analizado las 18 plantas TG1 obtenidas. El porcentaje de plantas transgénicas diploides obtenidas fue del 66,7% (12 plantas), con un porcentaje del 93,75% (9 plantas) cuando los explantes fueron hojas y del 37,5% (3 plantas) con cotiledones. Estos resultados demuestran que la naturaleza del explante afecta a la ploidía de las plantas de melón regeneradas. La citometría de flujo realizada en explantes de tejidos sugiere que el 90% de las células de los cotiledones maduros y cerca del 100% de las células de hojas jóvenes fueron diploides mientras que más del 80% de las células de cotiledones de dos días de germinación fueron tetraploides (Guis y col., 2000). Estos resultados están de

acuerdo con las observaciones de Gilissen *y col.* (1993) y Colijn-Hooymans *y col.* (1994) que encontraron que en pepino el porcentaje de células tetraploides incrementaba durante el desarrollo del cotiledón. Este fenómeno ha sido descrito también en *Arabidopsis*, donde se observa frecuentemente la endoduplicación de las células del cotiledón lo que conduce a poliploidía, mientras que en hojas ocurre con muy baja frecuencia (Galbraith *y col.*, 1991). Por lo tanto, los niveles de ploidía de las plantas de melón regeneradas pueden correlacionarse con el nivel de ploidía del tejido de explante.

Tabla 7. Análisis del nivel de ploidía de las plantas de melón transformadas, resistentes a kanamicina, mediante citometría de flujo. Los porcentajes se han calculado como el número de plantas diploides o tetraploides/mixoploides respecto al número total de plantas transgénicas analizadas.

Experimentos de transformación	Nº plantas transform	Diploides		Tetraploides/Mixoploides	
		Nº	%	Nº	%
<i>Npt-II</i> cotiledones	4	2	50	2	50
<i>Npt-II</i> hojas	8	7	87,5	1	22,5
<i>Npt-II::GUS</i> cotiledones	4	1	25	3	75
<i>Npt-II::GUS</i> hojas	2	2	100	0	0
Totales:	18	12	66,7	6	33,3

La aparición espontánea de morfogénesis anormal es frecuente en cultivos de tejidos de melón (Ezura *y col.*, 1992) y estos individuos producen frutos de inferior calidad. La aparición de estas características aberrantes es típica de individuos tetraploides (Nugent y Ray, 1992). En nuestras líneas TG1 hemos encontrado un 33,3% (6 plantas) de tetraploides o mixoploides, de las que el 83,3% (5 plantas) provienen de cotiledones y el 16,7% de hojas. Estas plantas las desechamos para continuar los trabajos de caracterización.

4.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN **GUS** EN CALLOS ORGANOGÉNICOS

El ensayo de expresión del gen GUS en líneas TG1 permite detectar no sólo la integración del gen sino también su funcionalidad. Transformar las plantas con la construcción *pRIIGUS-NptII* buscaba demostrar que la integración del gen, que seleccionamos como primer paso por su desarrollo en

medio selectivo con Kanamicina, y si la integración es funcional, por el análisis de la expresión del gen GUS.

El ensayo histoquímico con X-Gluc se realizó en un total de 12 fragmentos de tejido de callo, 2 de cada uno de los 6 callos en los que se desarrollaron yemas-ápices. En todos los casos obtuvimos un resultado positivo como se muestra en la Figura 18.

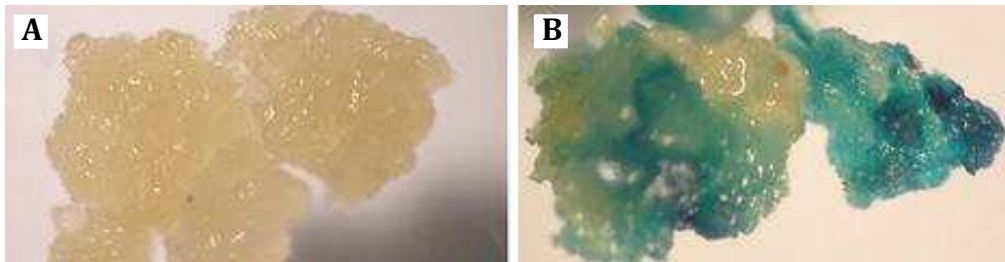


Figura 18.- Tinción histoquímica GUS en callos de Piel de sapo. A. Callos generados en las plantas control crecidas en medio no selectivo (medio IB0510Cu). B. Callos generados en medio de selección (medio IB0510Cu con Kanamicina).

El porcentaje de eventos positivos ha sido del 100%, lo que podríamos esperar considerando que hemos utilizado un promotor constitutivo (promotor 35S), que hace que se exprese el gen en todas las células y, como se ha demostrado, este porcentaje es bastante alto cuando se utilizan inóculos de callo, mayor al observado cuando se analiza la expresión diferencial de planta *in vivo* e *in vitro*. De hecho, Wu y col., (2003) analizaron la expresión de GUS en callos de una colección de plantas de arroz transformadas y detectaron un 84% de eventos positivos.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que aunque la eficiencia de transformación ha sido baja, las plantas TG1 obtenidas tienen integrado el transgén en su genoma y este es funcional.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Los experimentos realizados para la optimización de las condiciones de inducción del crecimiento y organogénesis y de transformación genética en melón nos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

PRIMERA- El comportamiento en la inducción del crecimiento y generación de callos ha sido muy variable entre los genotipos y los tejidos utilizados. El genotipo que ha presentado una mayor respuesta en los tres tejidos utilizados (cotiledón, hipocótilo y hoja) ha sido Piel de Sapo.

SEGUNDA- La selección del medio más adecuado para inducir el crecimiento y organogénesis en explantes de melón es difícil debido a la variabilidad de resultados obtenidos. En general, independientemente de que sean morfogenéticos o no, del genotipo y del tipo de explante, se ha obtenido mayor formación de callo con el medio IB0550Cu (0,5 mg/l IAA y 5 mg/l de BA), de tal forma que a medida que incrementamos la concentración de BA se produce un mayor número de callos. Sin embargo, el medio que ha presentado mayor respuesta organogénica ha sido el IB0510Cu (0,5 mg/l de IAA y 1 mg/l de BA), con baja concentración de IAA y BA.

TERCERA- Los explantes que han desarrollado mayor número y tamaño de callos ha sido los de cotiledón. Sin embargo, han sido los explantes de hoja los ha presentado mayor organogénesis por la formación de mayor número yemas-ápices, siendo fenómenos independientes. Por lo tanto, no existe relación directa entre la formación de callos y la organogénesis.

CUARTA- La eficiencia de transformación ha sido muy baja, similar a la encontrada por otros autores en esta especie pero mucho menor que la encontrada en otras especies y en alguna variedad de melón. Esto demuestra

la baja capacidad de las células de melón para ser competentes para la regeneración y la transformación.

QUINTA- En los cuatro experimentos de transformación realizado con cotiledones y hojas de la variedad Piel de Sapo hemos obtenido 18 plantas transformadas (12 con el gen *NptII* y 6 con los genes *NptII* y *GUS*), lo que demuestra que el protocolo de transformación y regeneración funciona, si bien es necesario la optimización de las condiciones para mejorar los resultados

SEXTA- La naturaleza del explante afecta a la ploidía de las plantas de melón regeneradas y los niveles de ploidía pueden correlacionarse, a su vez, con el nivel de ploidía del tejido de explante. En nuestras líneas TG1 hemos encontrado un mayor número de plantas tetraploides o mixoploides proviene de explantes de cotiledón.

SEPTIMA- En el ensayo de expresión del gen *GUS* en líneas TG1, en todos los casos obtuvimos un resultado positivo. Estos resultados demuestran que aunque la eficiencia de transformación ha sido baja, las plantas TG1 obtenidas tienen integrado el transgén en su genoma y este es funcional.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Akasaka-Kennedy Y, Tomita K, Ezura H. (2004). Efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation via somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Sci* 166:763-769.
- Ammirato PV (1986). Control and expression of morphogenesis in culture. *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*. L.A. Withers. Y.P.G. Alderson (eds.). Butterworths, 23-45.
- Amselem J, Tepfer M (1992). Molecular basis for novel root phenotypes induced by *Agrobacterium Rhizogenes* A4 on cucumber. *Plant Molecular Biology*, 19: 421-432.
- Ashraf M (1994). Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13(1): 17-42.
- Ayub R, Guis M, Ben-Amor M, Guillot L, Roustan J.P, Latche A, Bouzayen M, Pech JC (1996). Expression of a ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature Biotechnology*, 14: 7, 862-866.
- Balagué C, Watson CF, Turner AJ, Rougé P, Picton S, Pech JC, Grierson D (1993). Isolation of a ripening and wound-induced cDNA from *Cucumis melo* L., with homology to the ethylene-forming enzyme. *Eur.J.Biochem.* 212: 27-34.
- Bauchot AD, Mottram DS, Dodson AT, John P (1998). Effect of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase antisense gene on the formation of volatile esters in *Cantaloupe Charentais* melon (cv. Vedrantaïs). *Journal-of-Agricultural-and-Food-Chemistry*, 46: 11, 4787-4792.
- Baulcome DC, Saunders GR, Bevan MB y Harrison BD (1986). Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* 321: 446-449.

- Ben Tahar S, De Both MTJ (1988). Introduction of foreign genes into melon (*Cucumis melo* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. En: Cucurbitaceae 88, *Proc. Eucarpia Cucurbit Genetics and Breeding*. Avignon-Montfavet, Francia, pp. 209-216.
- Bechtold N, Ellis J, Pelletier G. (1993). *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*, 316:1194-1199.
- Birch NS. (1997). Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:297-326.
- Bokelmann GS, Jarl CI, Kool AJ. (1991). Plant regeneration from different cultivars of melon (*Cucumis melo*). *Cucurbit Genetic Cooperative Report* 14:78-79.
- Bordás, M. (1994). Ingeniería genética en melón (*Cucumis melo*L.): Transferencia, integración y expresión de genes foráneos. 483 ff. Tesis (Doctorado en Ingeniería Agronómica)- E. T. S. I. A. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Bouabdallah y Branchard (1986). Regeneration of plants from callus cultures of *Cucumis melo* L. *Zeitschrift Fur Pflanzenzuchtung (J Plant Breed)* 96:82-85.
- Bouchez D, Camilleri C, Caboche M. (1993). A binary vector based on Basta resistance for *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*. 316:1188-1193.
- Cantón JM (1999). El cultivo del melón en el poniente almeriense. En: *Técnicas de Producción de frutas y hortalizas en los Cultivos Protegidos*. Camacho, F. (Ed.). Mundi-Prensa Libros, pp.169-163.
- Castelblanque L, Marfa V, Claveria E, Martinez I, Perez-Grau L, Dolcet-Sanjuan R. (2008). Improving the genetic transformation efficiency of *Cucumis melo* Subsp. *Melo* "Piel de Sapo" via *Agrobacterium*. In: Pitrat M (ed) *Cucurbitaceae 2008. Proceeding of Cucurbitaceae*, INRA, Avignon (France), May 21-24th 2008, pp 627-631.

- Chang SS, Park SK, Kim BC, Kang BJ, Kim DU, Nam HG. (1994). Stable genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium* inoculation in planta. *Plant Journal*. 5: 551-558.
- Chee PP (1990). Transformation of *Cucumis sativus* tissue by *Agrobacterium tumefaciens* and the regeneration of transformed plants. *Plants Cell Reports*, 9: 245-248.
- Chee PP, Slightom JL (1991). Transfer and expression of cucumber mosaic virus coat protein gene in the genome of *Cucumis sativus*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116: 1098-1102.
- Chee PP, Slightom JL (1992). Transformation of cucumber tissues by microprojectile bombardment: identification of plants containing functional and non-functional transferred genes. *Gene*, 118; 255-260.
- Choi PS, Soh WY, Kim YS, Yoo OJ, Liu JR (1994). Genetic transformation and plant regeneration of watermelon using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 13: 6, 344-348.
- Chovelon V, Restier V, Giovinazzo N, Dogimont C, Aarrouf J. (2011). Histological study of organogenesis in *Cucumis melo* L. after genetic transformation: Why is it difficult to obtain transgenic plants?. *Plant Cell Rep*. 30:2001-2011.
- Colijn-Hooymans CM, Hakkert JC, Jansen J, Custers JBM. (1994). Competence for regeneration of cucumber cotyledons is restricted to specific developmental stages. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 39:211-217.
- Cubero JI (2003). Introducción a la mejora genética vegetal. Mundi Prensa. Madrid. 365pp.
- Curuk S, Cetiner S, Elman C, Xia X, Wang Y, Yeheskel A, Zilberstein L, Perl´Treves R, Watad AA, Gaba V (2005). Transformation of recalcitrant melon (*Cucumis melo* L.) cultivars is facilitated by wounding with carborundum. *Eng. Life Sci* 5:169-177.

- Debeaujon I, Branchard M (1992). Induction of somatic embryogenesis and caulogénesis from cotyledon and leaf protoplast-derived colonies of melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Reports*, 12: 37-40.
- De Clene M, De Ley J (1976). The host range of crown gall. *Botanical Review* 42: 398-466.
- De Clene M, De Ley J (1981). The host range of crown gall. *Botanical Review* 47: 147-194.
- Deulofeu C (1997). Situación y perspectivas del melón en le mundo. En: Melones. Colección compendio de horticultura, 10. Namesny, A. (Ed.). Barcelona.
- Dirks R, Buggenum MV. (1989). In Vitro regeneration from leaf and cotyledon explants of *Cucumis melo* L. *Plant Cell Reports*, New York, v.7, p.626-2627.
- De Ponti OMB (1978) Resistance in *Cucumis sativus* L. to *Tetranychus urticae* Koch. 3. Search for sources of resistance. *Euphytica* 71: 1-14
- Dong JZ, Yang MZ, Jia SR, Chua NH (1991). Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. *Bio-Technology*, 9: 9, 858-863.
- Ellul P, Atarés A, Ramón-Pons P, Roig LA, Moreno V. (1999). Análisis del nivel de ploídia en somaclones y plantas transgénicas de sandía mediante evidencias morfológicas y citometría de flujo. III Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, Málaga:66.
- Ellul P, Moreno V (2003). Morfogénesis *in vitro* y obtención de plantas transgénicas de sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsun. & Nakai). Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Esquinas-Alcázar JT, Gulick PJ (1983). Genetic Resources of Cucurbitaceae. AGPGR: IBPGR/83/84:20, Rome

- Esteva J, Nuez F & Cuartero J (1988) Resistance to yellowing disease in wild relatives of muskmelon. *Cucurb. Genet. Coop. Rep.* 11: 52-53
- 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 Sci* 85:209-213.
- Ezura H, Oosawa K. (1994). Production of aneuploid melon plants following *in vitro* culture of seeds from a triploid cross. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 38:61-63.
- Fang GW, Grumer R (1990). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants. *Plant Cell Rep* 9:160-164.
- Fang GW, Grumet R (1993). Genetic engineering of potyvirus resistance using constructs derived from the zucchini yellow mosaic virus coat protein gene. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 6: 3, 358-367.
- Fisher DK, Gultinan J (1995). Rapid efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: a seed to seed protocol. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13: 278-289.
- Floris E, Álvarez J (1995). Genetic analysis of resistance of three melon lines to *Sphaerotheca fuliginea*. *Euphytica* 81: 181-186.
- Fosket DE (1994). *Plant growth and development: a molecular approach*. Ed. Academia Press.
- Fuchs M, Gonsalves D (1995). Resistance of transgenic hybrid squash ZW-20 expressing the coat protein genes of zucchini yellow mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 to mixed infection by both potyviruses. *Bio-Technology*, 13: 13, 1466-1473.
- Fuchs M, McFerson JR, Tricoli DM, McMaster JR, Deng RZ, Boeshore ML, Reynolds JF, Russell PP, Quemada HD, Gonsalves D (1997). Cantaloupe line CZW-30 containing coat protein genes of cucumber mosaic virus, Zucchini Yellow mosaic virus, and Watermelon mosaic virus-2 is resistant to these three viruses in the field. *Molecular Breeding*, 3:4, 279-290.

- Fuchs M, Klas FE, McFerson JR, Gonsalves D (1998). Transgenic melon and squash expressing coat protein genes of aphid non-transmissible strain of cucumber mosaic virus in the field. *Transgenic-Research*, 7:245-249.
- Fullner KJ, Nester EW (1996). Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 178:1498-1504
- Gaba V, Kless H. (1992). Transformation of melon by particle acceleration. *Suppl Plant Physiol* 99:137.
- Galbraith DW, Harkins K, Knapp S. (1991). Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 96:985-989.
- Galperin M, Patlis L, Ovadia A, Wolf D, Zelcer A, Kenigsbuch D. (2003). A melon genotype with a superior competence for regeneration and transformation. *Plant Breed* 122:66-69.
- García-Sogo B. (1990). Morfogénesis en cultivo *in vitro* de melón: regeneración de plantas con alta eficacia a partir de células y protoplastos. 337 ff. Tesis (Doctorado en Ciencias Biológicas) Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, España.
- Galperin M, Patlis L, Ovadia A, Wolf D, Zelcer A, Kenigsbuch D. (2003). A melon genotype with a superior competence for regeneration and transformation. *Plant Breed* 122:66-69.
- Gilissen LJW, van Staveren MJ, Creemers-Molenaar J, Verhoeven HA, (1993). Development of polysomy in seedlings and plants of *Cucumis sativus* L. *Plant Science* 91, 171±179.
- Gonsalves C, Xue B, Yepes M, Fuchs M, Ling K, Namba S, Chee P, Slighton JL, 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: 345-355.
- Guis M, Roustan JP, Dogimont C, Pitrat M, Pech JC . (1998). Melon biotechnology. *Biotechnol. Genet. Engin. Rev.* 15:289-311.

- Guis M, Amor MB, Latche 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*, 84 (1-2): 91-99.
- Hellens R, Mullineaux P. (2000). A guide to *Agrobacterium* binary Ti Vectors. *Trends Plant Sci* 5:446-451.
- Hooykaas PJJ, Schilperoort RA. (1984). The molecular genetics of crown gall tumorigenesis. *Advanced in genetics* 22. Molecular genetics of plants. Eds. JG Scandalios, EW. Caspari, pp:209-283.
- Horsch RB, Fraley RT, Rogers SG, Sanders PR, Lloyd A y Hoffmann N (1984). Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science* 223:496-498.
- Horst RB, Rogers SG, Fraley RT (1985). Transgenic plants. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 50.
- Hosoi Y, Toyoda H, Kakutani K, Matsuda Y, Higashiura M, Nishimura T, Yamamoto A, Ouchi S (1997). Biological purification of eutrophied water by transformed higher plants. I. Screening of rapid-growth hairy root lines of melon and their consumption of phosphate in medium. *Bulletin of the Institute for Comprehensive Agricultural Sciences, Kinki University* No. 5, 131-136.
- Jarl CI, Bokelmann GS & De Haas JM (1995) Protoplast regeneration and fusion in *Cucumis*: melon x cucumber. *Plant Cell Tiss.Org. Cult.* 43: 259-265
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. (1987). GUS fusions: β -glucoronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901-3907.
- Jeffrey C (1990). *Systematic of the Cucurbitaceae: An overview in biology and utilization of the Cucurbitaceae* (DM Bates, RW Robinson y C Jeffrey, eds.) Cornell University Press, Ithaca, USA
- Kathal R, BhatnagarSP, Bhojwani SS. (1988). Regeneration of plants from leaf explants of *Cucumis melo* cv. Pusa Sharbati. *Plants Cell. Rep.* 7: 449-451.

- Kathal R, Bhatnagar SP, Bhojwani SS. (1992). Chromosome variations in the plants regenerated from leaf explants of *Cucumis melo* L. Cv. Pusa Sharbati. *Caryologia* 45:51-56.
- Katavic V, Haughn GW, Reed D, Martin M, Kunst L. (1994). In planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics*, 245:363-370.
- Kenisgbuch D, Cohen Y. (1990). The inheritance of gynoecey in muskmelon. *Genome* 33:317-320.
- Kroon GH, Custers JBM, Kho YO, Den Nijs APM & Varekamp HQ (1979). Interspecific hybridization in *Cucumis* (L.). 1. Need for genetic variation, biosystematic relations and possibilities to overcome crossability barriers. *Euphytica* 28: 723-728
- Lebeda A (1984) Screening of wild *Cucumis* species for resistance to cucumber powdery mildew (*Erysiphe cichoraerum*) and *Sphaeroteca fuliginea*. *Scientia Horticulturae* 24: 241-249
- Li R, Sun Y, Zhang L & Li X (1990) Plant regeneration from cotyledon protoplasts of Xinjiang muskmelon. *Plant Cell. Rep.*9: 199-203
- Linnaeus, C. (1753). *Species plantarum*. Imprensis Laurentii Salvii, Estocolmo, Suecia.
- Liu X, Pijut PM, (2008). Plant regeneration from *in vitro* leaves of mature black cherry (*Prunus serotina*). *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, v.94, p.113-123.
- Lyndon RF (1998). The shoot apical meristem: its growth and development. *Development and Cell Biology Series*.
- Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Maroto JV (2002). *Horticultura herbácea especial*. 5ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

- Mc Innes E, Morgan A.J, Mulligan BJ, Davey MR (1991). Roots induced on cucumber cotyledons by the atropines Ri plasmid TR-DNA exhibit the transformed phenotype. *Plant Cell Reports*, 9: 647-650.
- Miguel J, Ellul P Moreno V. (1993). Regeneración de plantas vía organogénesis y obtención de plantas transgénicas de pepino (*Cucumis sativus* L.). II Reunión de la SECIVTV. Barcelona.
- Moreno V, García-Sogo 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.
- Murashige T, Skoog F, (1962). A revised médium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Naudin CV (1859). Essais d'une monographie des espèces et des variétés du gene Cucumis. *Ann. Sci. Nat. Bot.* 11:5-87
- Navarro Cortés V (1997). La búsqueda de la larga vida en melón. En: Melones. Colección compendio de horticultura, 10. Namesny, A. (Ed.). Barcelona.
- Nishibayashi S, Hayakana T, Nakajima T, Suzuki M, Kaneko H (1996a). CMV protection in transgenic cucumber plants with an introduced CMV-O cp gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 672-678.
- Nishibayashi S, Kanako H, Hayakawa T (1996b). Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants using *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration from hypocotyls explants. *Plant Cell Reports*, 15: 809-814.
- Nuez F (1996). Catálogo de semillas de melón. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Instituto Nacional de investigación y tecnología agraria y alimentaria.
- Nugent PE, Ray DT, (1992). Spontaneous tetraploid melons. *Hort-Science* 27:47-50.

- Núñez-Palenius H, Cantliffe DJ, Klee HJ, (2006). Transformation of a muskmelon “Galia” hybrid parental line (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Ser.) with an antisense ACC oxidase gene. *Plant Cell Rep* 25:198-205.
- Núñez-Palenius HG, Febres VJ, OchoaÁlejo N, Klee HJ, Cantliffe DJ, (2007). Effect of explant source on regeneration and genetic transformation efficiency in Galia melon (*Cucumis melo* L.) male and female parental lines. *Agrociencia*. 41: 853-861.
- Núñez-Palenius HG, Gomez-Lim M, Ochoa-Alejo N, Grumet R, Lester G, (2008). Melon fruits. Genetic diversity, physiology and biotechnology features. *Biotechnology* 28:13-55.
- Oosawa E, Yoshioka K, Nomura Y, Asano Y & Oosawa K (1989). Plant regeneration from hypocotyl protoplast of melon. *Jpn. J. Breed.* 39: 24-25
- Pal SP, Alam I, Anisuzzaman M, Sarker KK, Sharmin SA, Alam MF, (2007). Indirect organogénesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). *Turk J Agric For*, 31: 63-70.
- Pech JC, y col. (1994). Physiologie des fruits a noyau lors du development et de la maturation sur l´arbre. In. SEMINARIO CELEBRADO EN LA FIRA DE LLEIDA, 1994, Lleida-España. Actas...IRTA: Ciheal y Ajuntament de Lleida, p.17-35.
- Peña L (2000). *Biología Vegetal: Transformación Genética de plantas*. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Azcon-Bieto J y Talón M (eds.) Mc Graw-Hill, Interamericana.
- Pinho DS, Rey MS, Vieira A, Danielwski R, Braga EJB, Peters JA, (2010). In Vitro regeneration of melon, cv. “Gaucho”. *Ciencia rural, santa Maria*, v.40, n.5, p. 1083-1089.
- Pitrat M, Hamelt P y Hammer K (2000). Some comments on intraespecific classification of cultivars of melons. En: Katzir, n. y Paris, H. S. (eds.). *Cucurbitaceae 2000*. Israel. *Acta Hort.* 510.

- Potrykus I (1991). Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:205-225.
- Rhimi A, Ben Fadhel N, 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 Organ Cult.* 84:239-243.
- Risser G, Banihashemi Z (1976). A proposed nomenclature of *Fusarium oxysporum f. sp. Melonis* races and resistance genes in *Cucumis melo*. *Phytopathology* 66: 1105-1106.
- Robinson RW, Decker-Walters DS (1997). Cucurbits. CAB International. New York.
- Schulze J, Balko C, Zellner B, Koprek T, Hansch R, Nerlich A, Mendel RR (1995). Biolistic transformation of cucumber using embryogenic suspension cultures: long-term expression of reporter genes. *Plant Science Limerick*, 112: 197-206.
- Selvaraj N, Vasudevam A, Manickavasagam M, Kasthuriengan S, Ganapathi A, (2007). High frequency shoot regeneration from cotyledon explants of cucumber via organogenesis. *Scientia Horticulturae* 112: 2-8.
- Seo MS, Takahashi S, Kadowaki K, Kawamukai M, Takahara M, Takamizo T (2011). Expression of CoQ10-producing *ddsA* transgene by efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in *Panicum meyerianum*. *Plant Cell Tissue Organ Cult Online First*. 10 June 2011
- Serrano Z (1996). Veinte cultivos de hortalizas en invernadero. Serrano, Z. (ed.). Sevilla.
- Shalitin D, Shamay K, Katzir N (ed.), Paris HS (2000). Cucumber mosaic virus movement protein modifies plasmodesmal function in transgenic melon plants. *Cucurbitaceae 2000. Proceedings of the 7TH EUCARPIA meeting on cucurbit breeding and genetics. Ma'ale Ha Hamisha, Israel., Acta-horticulturae.*, 510: 335-341.

- Sharma M, Kothari-Chajer A, Jagga-Chugh S, Kothari SL (2011). Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 105:93-104
- Shilpa KS, Kumar VD, Sujatha M (2010) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 103:387-401
- Silva JA, da Costa TS, Lucchetta L, Marini LJ, Zanuzo MR, Nora L, Nora FR, Twyman RM, Rombaldi CV, (2004). Characterization of ripening behavior in transgenic melons expressing an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene from apple. *Postharvest Biol Tex* 32:263-268.
- Smarrelli JR, Watters MT, Diba LH (1986). Response of various cucurbits to infection by plasmid-harboring strains of *Agrobacterium*. *Plant Physiology*, 82: 622-624.
- Smulders MJM, Rus-Kortekaas W, Gilisen LJW (1995). Natural variation in patterns of polysomaty among individual tomato plants and their regenerated progeny. *Plant Science Limerick*, 97:53-60.
- Srivastava DK, Andrianov VM, Piruzian ES (1991). Regeneration and genetic transformation studies in watermelon (*Citrullus vulgaris* L. cv. Melitopolski). En *Horticulture-New Technologies and Applications*. Eds. J. Prakash, R.L.M. Pierik. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 127-130.
- Stachel SE, Nester EW, Zambryski P (1986). A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression. *Proceedings of the National Academy of sciences USA*. 83:379-383.
- Suseelan KN, Bhagwat A, Mathews H, Bhatia CR (1987). *Agrobacterium tumefaciens*-induced tumor formation on some tropical dicot and monocot plants. *Current Science* 56:888-889.

- Tabei Y, Kanno A, Igarashi I & Nishio T (1987) Plant regeneration from cotyledon protoplast of *Cucumis melo* L. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 56 (2): 236-237
- Tabei Y, Kitade S, Nishizawa Y, Kikuchi N, Kayano T, Hibi T, Akutsu K (1997). Transgenic cucumber plants harbouring chitinase gene exhibit enhanced resistance to Gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Cell Reports*, 17: 159-164.
- Taiz L, Zeiger E (1991). *Plant physiology*, 2ª Edición. Ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Tempé J, Casse-Delbert F (1989). Plant gene vectors and genetic transformation: Agrobacterium Ri Plasmids. En: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant*, vol.6. Academic Press, London, pp.25-49.
- Thomas P, More TA (1990) Screening wild *Cucumis* spp. In the field and with artificial seed inoculation against *Fusarium oxysporum* sp. melonis. *Cucurb. Genet. Coop. Rep.* 13: 18-19
- Touarev A, Stoger E, Voronin V, Heberle-Boro E (1997). Plant male germ line transformation. *Plant. J. Oxford.* Blackwell Sciences Ltd, 12(4): 949-956.
- Toyoda H, Hosoi Y, Yamamoto A, Nishiguchi T, Maeda K, Takebayashi T, Shiomi T, Ouchi S (1991). Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Tissue Culture Letters*, 8: 21-27.
- Tricoli DM, Carney KJ, Russell PF, Mc Master JR, Groff DW Hadden KC, Himmel PT, Hubbard JP, Boeshore ML, Quemada HD (1995). Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to cucumber mosaic virus, watermelon mosaic virus 2, and zucchini yellow mosaic virus. *Bio-Technology*, 13:13, 1458-1465.

- Trulson AJ, Simpson RB, Shahin EA (1986). Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium Rhizogenes*. *Theoretical and Applied Genetics*, 73: 11-15.
- Unger L, Ziegler SF, Huffman GA, Knouf VC, Peet R, Moore LW, Gordon MP, Nester EW (1995). New class of limited-host-range *Agrobacterium* mega-tumor-inducing plasmids locking homology to the transferred DNA of a wide-host-range, tumor-inducing plasmid. *Journal of Bacteriology*, 164:723-730.
- Valles MP, Lasa JM, (1994). *Agrobacterium*-mediated transformation of commercial melon (*Cucumis melo* L., cv. Amarillo Oro). *Plant Cell Rep.* 13:145-148.
- Van der Mark F, Bergervoet JHW, Custers JBM (1989). Transformation of cucumber with *Agrobacterium Rhizogenes*. *Cucurbit Genetics Cooperative*, 12: 35-36.
- Vinocur, Altman (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations Basia Vinocur and Arie Altman *Current Opinion in Biotechnology* 2005, 16:123-132
- Wang CY, Adams DO (1982). Chilling-induced ethylene production in cucumbers (*Cucumis sativus* L.). *Plant physiology*, Volume:69, Issue:2, pages:424-427
- Wolf D, Matzevitch T, Steinitz B, Zelcer A, (2001). Why is it difficult to obtain transgenic pepper plants?. In: Sorvari S et al (eds) *Proc.IV IS on In Vitro Cult. & Hort Breeding ISHS*, Leuven, pp 229-233.
- Wu C, Li X, Yuan W, Chen G, Kilian A, Li J, Xu C, Li X, Zhong D, Wang S, Zhang Q (2003). Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *Plant J.* 35(3):418-427.
- Wu HW, Yu TA, Raja JAJ, Wang HC, Yeh SD (2009) Generation of transgenic oriental melon resistant to Zucchini yellow mosaic virus by an improved cotyledon-cutting method. *Plant Cell Rep* 28:1053-1064

- Yalcin-Mendi NY, Ipek M, Kacan H, Curul S, Sari N, Cetiner S, Gaba V, (2003). A histological análisis of regeneration in watermelon. *J Plant Biochem Biotechnol* 12:147-150.
- Yalcin-Mendi NY, Ipek M, Serbest-Kobaner S, Curuk S, Aka C, Kacar Y, Cetiner S, Gaba V, Grumet R, (2004). *Agrobacterium*-mediated transformation of Kirkagac 637 a recalcitrant melon (*Cucumis melo* L.) cultivar with ZYMV coat protein encoding gene. *Eur J Hortiv Sci* 69:258-262.
- Yalcin Mendi NY, Ipek M, Buscan N, Aka kacar Y, Curul S, (2009). Regeneration and histological analysis of regeneration in bottle Gourd (*Lagenaria siceraria* (Molina) Stand.). *Turk J Agric For.* 33: 165-172.
- Yamanaka H, Amagasa K & Yoshida H (1990) Plant regeneration from cotyledon protoplasts of *Cucumis melo* L. *Plant Tiss. Cult. Lett.* 7: 103-107
- Yasmin A, Debener T (2010) Transient gene expression in rose petals via *Agrobacterium* infiltration. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 102:245-250
- Yoshioka K, Hanada K, Nakazaki Y, Minobe Y, Yakuwa T, Oosawa K (1992). Sucesssful transfer of the cucumber mosaic virus coat protein gene to *Cucumis melo* L. *Japanese Journal of Breeding*, 42: 277-285.
- Yoshioka K, Hanada K, Harada T, Minobe Y, Oosawa K (1993). Virus resistance in transgenic melon plants that express the cucumber mosaic virus coat protein gene and their progeny. *Japanese Journal of Breeding* 43: 629-634.

<http://www.marm.es>

<http://www.juntadeandalucia/consejeriadeagricultura>

<http://www.infoagro.com>

<http://www.fepex.es>