

e-Gnosis  
Universidad de Guadalajara  
e-gnosis@cencar.udg.mx  
ISSN (Versión en línea): 1665-5745  
MÉXICO

2003

Antonia Gutiérrez M. / Fernando Santacruz R. / José L. Cabrera P. / Benjamín  
Rodríguez G.

MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL IN VITRO

*e-Gnosis*, año/vol. 1

Universidad de Guadalajara  
Guadalajara, México

# MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL *IN VITRO*

## GENETIC IMPROVEMENT OF PLANTS *IN VITRO*

Antonia Gutiérrez M.<sup>1</sup>, Fernando Santacruz R.<sup>2</sup>, José L. Cabrera P.<sup>3</sup> y Benjamín Rodríguez G.<sup>1</sup>  
[agutierrez@ciatej.net.mx](mailto:agutierrez@ciatej.net.mx) / [srf22191@cucba.udg.mx](mailto:srf22191@cucba.udg.mx) / [jcabrera@cinvestav.ira.mx](mailto:jcabrera@cinvestav.ira.mx) / [brodriguez@ciatej.net.mx](mailto:brodriguez@ciatej.net.mx)

Recibido: noviembre 3, 2002 / Publicado: diciembre 4, 2002

**RESUMEN.** El mejoramiento genético de plantas es una de las hazañas más antiguas del hombre, que inició con la domesticación de las mismas bajo condiciones controladas y la selección de aquellas capaces de proporcionar una mejor fuente de alimentos. Esto marcó una de las fases más importantes en el progreso de la humanidad, al permitirle transitar de una vida nómada e individualista a una sociedad organizada y cooperativista. Dicho mejoramiento fue fortuito y lento y permaneció como un arte y no como una ciencia hasta principios del siglo XX, luego de que las llamadas leyes de Mendel, pioneras en la explicación de los procesos de la herencia, obtuvieron reconocimiento (Briggs y Knowles, 1967). El proceso que emplea fitomejoradores ha creado un sinnúmero de variedades de plantas con el objeto de incrementar su producción, resistencia a plagas y enfermedades, y la adaptación a ambientes específicos, regiones y usos, mediante la selección de variedades cultivadas localmente, cruzadas entre sí o con las de otras áreas, o también con plantas silvestres que tengan los genes deseados. Sin embargo, obtener plantas mejoradas por estos medios resulta difícil en ocasiones por lo que se recurre a otros métodos para producir variantes útiles, tales como la selección celular, la variación somaclonal y las mutaciones inducidas, entre otros.

**PALABRAS CLAVE.** Biotecnología vegetal, métodos biotecnológicos, selección celular, mutaciones inducidas, ingeniería genética.

**ABSTRACT.** The genetic improvement of plants is one of the oldest feats of man, starting with domestication under controlled conditions and selecting those plants that provided a better food source. This marks one of the most important phases of man's progress, passing from a nomadic and individualistic lifestyle to an organized and cooperative society. This improvement was random and slow, remaining as an art and not as a science until the discovery of Mendel's laws, that began the explanation of the processes of heredity at the beginning of the 20th Century. Plant improvers have created an innumerable quantity of varieties with the aim of increasing production yields, resistance to plagues and illnesses and adaptation to specific environments, regions and uses, through selection of locally cultivated varieties, intercrossed or crossed with those of other areas, or indeed even with wild plants that possess the desired genes. However, on occasion it is difficult to obtain improved plants through these means, and one must recur to other methods of producing useful variants, like: cellular selection, somaclonal variation, induced mutation, somatic hybridization, haploid cultivation and genetic engineering, among others.

**KEYWORDS.** Vegetable biotechnology, biotechnical methods, cellular selection, induced mutations, genetic engineering.

---

<sup>1</sup> División de Micropropagación y Mejoramiento Genético Vegetal. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. Av. Normalistas No. 800 Colinas de la Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, México. - [www.ciatej.net.mx](http://www.ciatej.net.mx)

<sup>2</sup> Departamento de Producción Agrícola, CUCBA. Universidad de Guadalajara. Km. 15.5 carretera Guadalajara-Nogales, predio las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México. - [www.cucba.udg.mx](http://www.cucba.udg.mx)

<sup>3</sup> Departamento de Ingeniería Genética, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, I.P.N., Unidad Irapuato. Apartado Postal 629, 36500 Irapuato, Guanajuato, México. - [www.ipn.mx](http://www.ipn.mx)



## Domesticación

Domesticación es el proceso por el cual una planta silvestre se convierte en una planta manejada o cultivada por el hombre. Esta es una definición en extremo sencilla pero que, sin embargo, encierra todo el significado del proceso.

Existen evidencias de que desde hace 5,000-10,000 años ya se practicaba la agricultura. El crecimiento de los primeros núcleos humanos, el fin de la vida nómada y el inicio de la vida sedentaria propiciaron la domesticación de plantas y animales para proveerse de alimentos y otros satisfactores en forma estable.

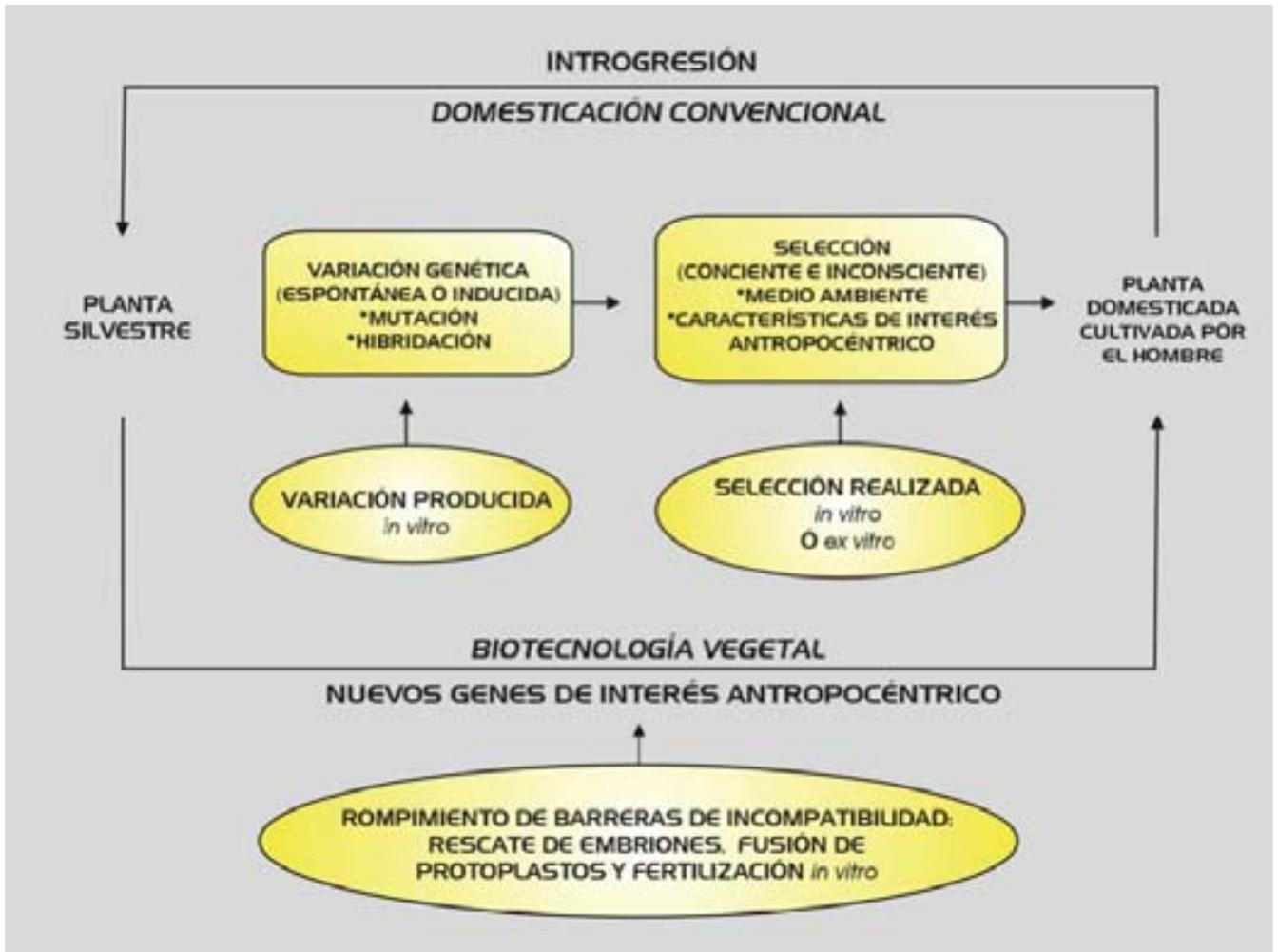
La domesticación del maíz es uno de los ejemplos más ilustrativos de la modificación de una planta silvestre para satisfacer las necesidades del hombre. Algunas de las adaptaciones en este proceso fueron: a) el desarrollo de un raquis de la mazorca menos quebradizo, b) el desarrollo de una cubierta suave de la mazorca para facilitar la extracción de los granos y c) el desarrollo de mazorcas más grandes y con más líneas de granos (Wenke, 1980).

Las principales vías por las cuales se han originado y domesticado las especies cultivadas son las combinaciones de genes por medio de hibridaciones y mutaciones, estas últimas tanto en la estructura (deleciones, inversiones, translocaciones, etc.) como en el número de cromosomas (ploidía), ocurridas en forma natural y/o artificial.

Así, los variantes genéticos producidos han debido ser seleccionados de acuerdo con las necesidades y gustos del hombre a través de los años. A su vez, los individuos seleccionados, eventualmente fueron cultivados cerca de otros originándose cruzamientos naturales y produciendo grandes cantidades de combinaciones génicas resultando a su vez nuevos tipos.

Algunas variantes tuvieron ventajas y otras no. Las más pobremente adaptadas al ambiente y a las circunstancias fueron eliminándose, creándose así una estirpe con características genéticas diferentes a la que les dio origen.

La [Figura 1](#) muestra, en términos generales, el proceso completo de la domesticación que inicia con una especie o planta silvestre y finaliza con una planta cultivada. Se describe el trabajo realizado por el hombre para seleccionar los tipos de planta útiles para él y además mantenerlos y combinarlos por medio de métodos que inicialmente fueron empíricos, los cuales con el tiempo se convirtieron en los grandes desarrollos del mejoramiento genético y que desde hace muchos años le han provisto para solventar sus necesidades, principalmente alimento (Allard,1960).



**Figura 1.** Proceso de domesticación de plantas.

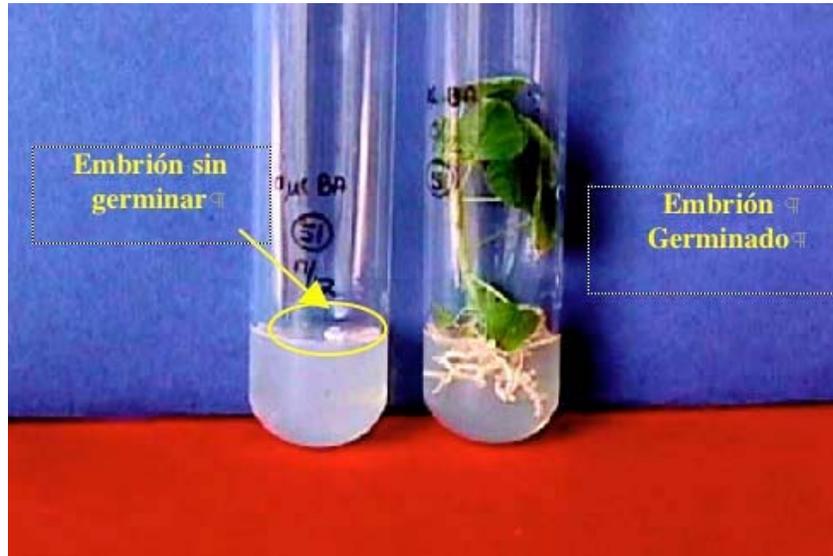
Las estirpes de plantas producto final de la domesticación son entidades genéticas activas que pueden dar y/o recibir genes de sus ancestros silvestres. La introgresión es el flujo de genes de la planta cultivada hacia una planta silvestre y, a su vez, la planta silvestre puede llegar a aportar nuevos genes de interés antropocéntrico a una planta cultivada.

La biotecnología vegetal puede aportar herramientas para lograr una domesticación más rápida y dirigida. La variación somaclonal espontánea y la inducción de mutaciones *in vitro*, son una fuente de variación de la que se pueden seleccionar características agronómicas de interés para el hombre. Esta selección que es factible realizar *in vitro* y/o *ex vitro* puede estar orientada a la adaptación por medio de resistencia o tolerancia a factores ambientales que permitan el cultivo masivo de la especie (Figs. 1 y 2).



**Figura 2.** Proceso de selección *in vitro* / *ex vitro*.

También la biotecnología vegetal aporta herramientas que permiten romper barreras físicas, bioquímicas y genéticas que interrumpen el buen funcionamiento de las hibridaciones normales por vía sexual para la transferencia de genes de las plantas silvestres a las cultivadas. El rescate de embriones es una de las técnicas *in vitro* que más han sido utilizadas cuando por algún problema de incompatibilidad el embrión es abortado y la semilla viable no es desarrollada. En cruces de *Carica papaya* var. Maradol con *Carica* sp. silvestre se realizó rescate de embriones para evitar el aborto, y a la vez acelerar el proceso de germinación de los embriones, ya que no fue necesario esperar a la madurez del embrión en el fruto. Estos embriones cigóticos se germinaron *in vitro* en el medio descrito por Chen y col. (1991), obteniéndose porcentajes de germinación del 75-95% (Gutiérrez-Mora, por publicarse) (Figura 3)



**Figura 3.** Embriones cigóticos producto de cruza de *Carica papaya* X *Carica sp.* rescatados y germinados *in vitro*.

La fertilización *in vitro* también es un método que permite eliminar problemas de incompatibilidad, principalmente el que se da entre el polen, el crecimiento del tubo polínico y el tejido del estilo que conduce los espermias masculinos al óvulo. Estos métodos normalmente evitan el tejido estilar situando al tubo polínico en contacto directo con el óvulo. Los métodos de hibridación por medio de la fusión de protoplastos serán discutidos posteriormente con más amplitud.

### Variación somaclonal

La variación genética constituye la materia prima de los organismos vivos sobre los cuales ha influido la evolución natural y/o la evolución dirigida que el hombre ha realizado para su beneficio (Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992). Este fenómeno ha sido estudiado en un considerable número de especies vegetales cultivables y dependiendo del tejido de origen se denomina: variación gametoclinal (gametos), protoclonal (cloroplastos), mericlinal (meristemas) ó somaclonal (células somáticas) (Hartmann, y Kester, 1989).

La variación somaclonal (VS) es el resultado de diferencias genéticas preexistentes en células somáticas cultivadas *in vitro* o es inducida por componentes del medio de cultivo, posteriormente estas diferencias son reflejadas en las plantas regeneradas. Puede involucrar cromosomas individuales (deleciones, cambios de pares de bases, translocaciones, amplificaciones génicas) y juegos completos de cromosomas (niveles de ploidía) (Evans y Sharp, 1986).

La cantidad de variación puede depender de la fuente del explante, edad del cultivo, el uso de factores hormonales, uso de agentes mutagénicos y presión de selección aplicada a cultivos celulares (Skirvin y col., 1994).

Las causas de la VS aún no son claras, sin embargo, existen evidencias de que tales procesos pueden ocurrir. Skirvin y Janick (1976) fueron de los primeros investigadores que enfatizaron la importancia de la VS en el mejoramiento de especies hortícolas. Shephard y col. (1980), demostraron una extensa variabilidad entre plantas regeneradas a partir de protoplastos (protoclones) de papa (*Solanum tuberosum*). Smith y Drew (1990) reportaron que el 90% de plantas de plátano obtenidas por cultivo de tejidos *in vitro* mostraron

diferencias en el campo presentando enanismo y frutos con características no deseadas, no obstante, se logró rescatar plantas con frutos normales (citados en Skirvin y col., 1994).

Gutiérrez-Mora y Rodríguez-Garay, obtuvieron plantas de alfalfa con tolerancia a salinidad utilizando inhibidores de la biosíntesis de poliaminas para realizar selección celular, regenerando éstas a través de embriogénesis somática (por publicarse).

En resumen, la VS con el apoyo de un sistema de regeneración eficiente, puede ser utilizada para la obtención de plantas con las características deseadas. A la fecha ha sido un proceso azaroso, sin embargo, ha resultado de gran utilidad sobre todo en especies recalcitrantes (Figura 2).

## Inducción de mutaciones

Con la elucidación de consideraciones teóricas de tipo y dosis de mutágeno y la manera de presentarse las mutaciones genéticas, la mutagénesis se convirtió de una excentricidad a una herramienta de mejoramiento.

Los primeros intentos para modificar plantas *in vivo*, se realizaron con rayos X y ultravioleta reportados por Alberto Pirovano en Italia en 1922. A la fecha se conocen otros agentes físicos que inducen mutaciones, entre los cuales se mencionan rayos gama, neutrones, protones y partículas alfa y beta. En general, el efecto ocasionado es proporcional a la energía absorbida por un tejido en particular, el poder de penetración varía para cada uno, desde fracciones de milímetros hasta algunos centímetros. Las mutaciones inducidas por rayos ultravioleta son terminales y las inducidas por rayos X son intersticiales y asociados con el rompimiento de cromosomas (Briggs y Knowles, 1967).

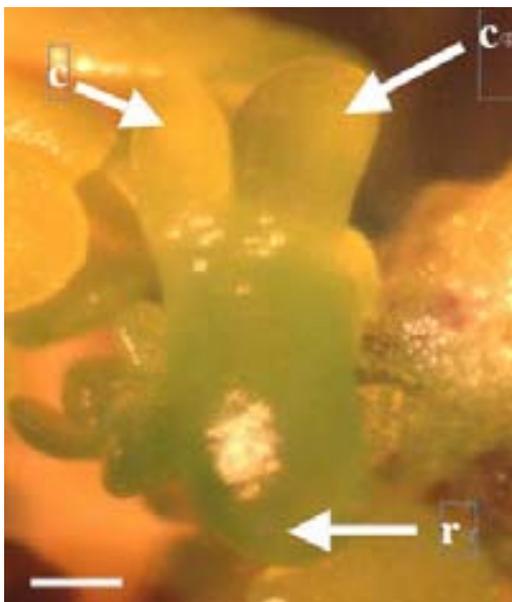
En años recientes se ha mostrado un creciente interés en el uso de agentes químicos, ya que comparado con los agentes físicos, éstos, son en algunas ocasiones más capaces de realizar mutaciones que generalmente son puntuales. Los agentes químicos que se utilizan con mayor frecuencia son: hidroxilamina, agentes quelantes tales como Etil Metanosulfonato (EMS), N-metil-N'-nitrosoguanidina (NG) y N-etil-N-nitrosourea, entre otros.

Cuando en un sistema de mejoramiento *in vitro* se inducen mutaciones se tiene la posibilidad de encontrar de 10 a 20 veces más variantes que en un sistema donde se produce variación somaclonal espontánea, sin embargo, las condiciones óptimas para la mutagénesis pueden variar dependiendo de la especie.

## Selección celular

Al sistema de regeneración que inicia a partir de una sola célula, la cual tiene la capacidad de formar un embrión a partir de tejido somático, con capacidad de regeneración de plantas sin haber ocurrido fertilización de una célula huevo, se denomina embriogénesis somática. Este sistema ayuda a evitar el problema de producción de plantas quiméricas e incrementa la posibilidad de obtener mutantes sólidos (Figura 4).

La variación somaclonal y la inducción de mutaciones, sin un sistema de selección *in vitro* tienen casi las mismas limitaciones que una mutación clásica. Estas variaciones pueden ser superiores a una mutación simple cuando se aplica una presión de selección durante la fase *in vitro*.



**Figura 4.** Embrión somático de alfalfa (*Medicago sativa*). r = radícula, c = cotiledones. Barra = 0.15 mm

Bajo estas condiciones, es posible producir y seleccionar grandes poblaciones de células. El proceso de selección está basado en el uso de metabolitos o de agentes selectivos en el medio de cultivo. El uso de antimetabolitos, tales como análogos de aminoácidos permiten la selección de mutantes sobreproductoras de aminoácidos específicos. De igual manera, el uso de concentraciones específicas de herbicidas ha sido muy efectivo y esto ha permitido la selección *in vitro* de plantas resistentes. Algunos investigadores han empleado estrategias similares aplicadas al aislamiento de mutantes resistentes a enfermedades, este procedimiento está basado en un co-cultivo planta-parásito, filtrado del patógeno o toxinas purificadas adicionadas al medio de cultivo.

Usando estas técnicas se han obtenido mutantes de arroz tolerantes a salinidad y mutantes con alto contenido de proteína y lisina; mutantes resistentes a patógenos de tabaco, arroz, trigo, caña de azúcar y maíz (Skirvin y col., 1994).

Scowcroft y Larkin (1988) reportaron una línea celular de tabaco que produjo grandes cantidades de nicotina, pero las plantas regeneradas no expresaron esta característica. A partir de estas plantas se produjo callo y nuevamente se presentaron altas concentraciones de nicotina. Esta diferencia indicó que el gen responsable sólo se expresó a nivel celular.

## Cultivo de haploides

La producción de plantas haploides ha capturado un gran interés de investigadores en el área de la genética, embriología, fisiología y mejoramiento desde el descubrimiento de la primera planta haploide producida en la especie *Datura stramonium* (Bergner, 1921; citado por Hang y Hongyuan, 1986).

Las bases del cultivo de haploides tienen su fundamento, en que, en un medio de cultivo apropiado las microsporas y/o granos de polen de algunas especies pueden ser inducidas a la formación de células vegetativas a partir de ellas.

Las microsporas cambian el patrón sexual normal (gametofítico) a un patrón vegetativo (esporofítico). El

resultado es que en lugar de tener polen con capacidad para producir gametos y un tubo polínico, la microspora es capaz de producir proembriones o callos haploides. A la formación de plantas a partir de microsporas ó polen se le llama *androgénesis*.

La formación de plantas haploides no sólo se puede dar a partir del gameto masculino, en teoría, otra fuente puede ser la célula huevo que está contenida dentro del saco embrional. Es difícil separar la célula huevo correctamente del saco embrionario, por lo tanto, las plantas haploides pueden ser producidas estimulando el desarrollo de óvulos no fertilizados. A la formación de plantas producidas a partir de células huevo se le denomina *ginogénesis*.

El uso de haploides en estudios genéticos y de mejoramiento está basado en las siguientes características:

- 1) Plantas diploides homocigóticas pueden ser obtenidas en una sólo generación vía doblamiento de cromosomas de la planta haploide. Las progenies serán uniformes y no segregan. En el mejoramiento genético por la ruta convencional se requieren seis o siete generaciones para la producción de homocigotos. Por lo tanto, la utilización de individuos haploides puede ser empleada para acortar el ciclo de mejoramiento, ahorrar tiempo, espacio y labores.
- 2) Caracteres recesivos son fácilmente expresados en haploides ya que no son cubiertos por los dominantes.
- 3) Genotipos son completamente expresados a nivel de plantas en haploides. Tipos gaméticos no son perdidos y la gran cantidad de plantas proveen un amplio espectro para selección en prácticas de mejoramiento y también para facilitar el análisis genético de gametos recombinantes.
- 4) Cerca del 90% de haploides y diploides homocigóticos son producidos vía cultivo de anteras *in vitro* (Gordon-Kamm y col., 1990).

En la inducción de microsporas para la formación de plántulas se deben considerar múltiples factores como lo son: el estado de desarrollo de la célula sexual, el medio de cultivo empleado, condiciones de incubación, estado fisiológico de la planta donadora y genotipo. Asimismo, para mejorar la frecuencia de inducción de callos se han aplicado tratamientos físicos ó químicos en las anteras, de los cuales, la exposición a bajas temperaturas parece ser uno de los más efectivos (Cheng, 1986).

El cultivo de haploides ha sido empleado frecuentemente en especies arbóreas perennes para la producción de plantas homocigóticas diploides en tiempos relativamente cortos (algunos cuantos años), ya que de manera convencional (autofecundaciones sucesivas durante varias generaciones) se requerirían desde varias décadas hasta cientos de años para obtener una línea pura.

En la producción de plantas transgénicas derivadas de microsporas se han realizado diversos procedimientos de transformación, entre los cuales se pueden mencionar: la microinyección de ADN, cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens*, electroporación y biobalística.

Aún cuando la selección de polen no implica la producción de plantas haploides, es una herramienta eficiente en el mejoramiento genético vegetal, la cual requiere que el polen sea expuesto a un tratamiento particular y pueda ser recobrado efectivamente. La selección de polen ha sido llevada a cabo para obtener resistencia a temperaturas, salinidad, metales, herbicidas y otros compuestos tóxicos (Hormaza y Herrero, 1992; Petolino, 1990; Rodríguez-Garay y Barrow, 1988).



## **Cultivo y fusión de protoplastos**

Es el cultivo de células vegetales que han sido aisladas y desprovistas de la pared celular. Un protoplasto es la parte viva de una célula vegetal, conteniendo citoplasma y núcleo. Si estas células son cultivadas en un medio nutritivo adecuado pueden ser inducidas a reformar la pared celular y dividirse.

Los protoplastos pueden ser aislados por tres diferentes vías: por medios mecánicos (cortando ó rompiendo la pared celular), por digestión de la pared celular con enzimas (pectinasas, celulasas, hemicelulasas y mezclas de ellas) y por combinación de una separación mecánica-enzimática.

Para el aislamiento exitoso es necesario contraer la pared celular, plasmolizando las células con soluciones de sales como cloruro de potasio y sulfato de magnesio; con azúcares o alcoholes azucarados como el manitol. La concentración osmótica de las soluciones debe ser suficiente para causar un rompimiento del protoplasma, pero no a una magnitud que cause daño celular. La plasmólisis contribuye en la protección del protoplasto cuando la pared es rota y confiere a la célula resistencia a los efectos tóxicos de la enzima usada en la digestión de la pared celular.

A la fecha, los protoplastos aislados son ampliamente utilizados en investigaciones con infecciones virales en plantas, así como para modificar la información genética de la célula insertando fragmentos de ADN seleccionados.

La habilidad para recobrar plantas de cultivos de protoplastos es de vital importancia en el éxito de proyectos de ingeniería genética.

Para inducir la fusión de protoplastos se han desarrollado diversas técnicas eficientes: la adición de polietilenglicol (PEG) al medio de cultivo en presencia de una alta concentración de iones de calcio en un pH de 8-10 y la aplicación de pulsos cortos de corriente eléctrica directa (electro-fusión) (Lee y col., 1996). Los protoplastos aislados normalmente no se fusionan porque poseen una carga negativa superficial lo cual provoca una repulsión entre ellos.

Al mezclar protoplastos de plantas de dos diferentes especies o géneros, los tipos de fusión que ocurren son: a) Entre protoplastos de la misma planta donde la fusión del núcleo de 2 células formaría un homocarión, b) Entre protoplastos de plantas de la misma especie (fusión intravarietal o intraespecífica) y c) Entre protoplastos de diferente especie o géneros de vegetales (fusión interespecífica o intergenérica).

Las fusiones de los tipos b) y c) pueden resultar en la formación de híbridos genéticos (heterocariocitos) los cuales pueden ser obtenidos raramente a través de cruzamientos sexuales.

Una fusión del citoplasma (cihíbrido) de un tipo de planta con el núcleo de otra es también posible. Algunas plantas cihíbridas pueden ser de utilidad en programas de mejoramiento para la transferencia de genes citoplásmicos.

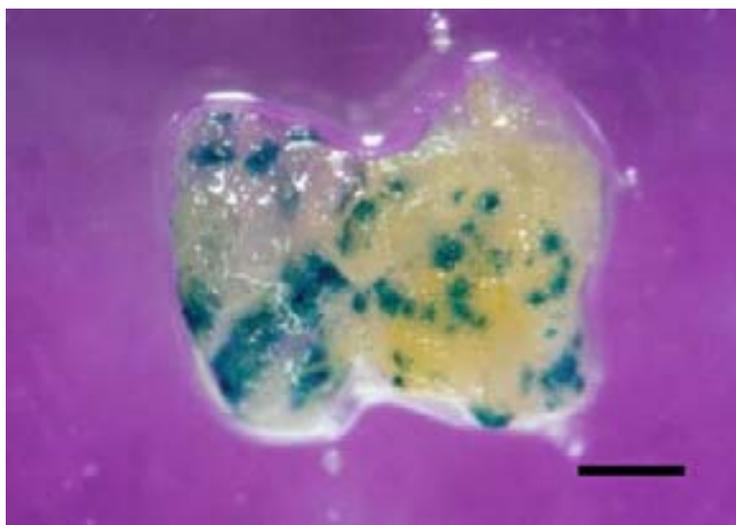
## **Transformación genética**

Transformar genéticamente significa adicionar información genética novedosa a un genoma, lo cual modifica su fisiología original. Esto implica la introducción de genes en una célula o tejido con el uso de un vector (generalmente es un plásmido ó un cósmido), el cual lleva integrado el o los genes que se deseen transferir. Las células o el tejido candidatos a la transformación deben poseer óptimas condiciones para la división celular y la capacidad de regenerar plantas.

En 1983 se inició el desarrollo de protocolos para transformar plantas de interés agronómico (Herrera-Estrella y col., 1983). Estas técnicas incluyen el uso del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, el cual es necesario para promover la formación de plantas fenotípicamente normales a través de dos vías principales, una denominada organogénesis (formación del domo apical del meristemo, posterior crecimiento y diferenciación del mismo y la inducción del sistema radicular; y otra vía de regeneración de plantas denominada embriogénesis somática. Estas metodologías de regeneración son indispensables para introducir los genes de interés que han sido aislados, secuenciados y clonados mediante técnicas de biología molecular. Los métodos rutinariamente utilizados para transformar una gran cantidad de plantas de importancia agronómica son: el sistema natural de *Agrobacterium tumefaciens* y la biobalística.

La selección de clonas transformadas es un punto clave para el éxito de la técnica, por lo que se deben extremar cuidados en la elaboración del sistema de selección. Un agente de selección es aquel que permite diferenciar las células transgénicas de las no transformadas. Puede ser un antibiótico (higromicina, kanamicina, geneticina) o un herbicida (bialafos, glifosato). La actividad de cada uno de ellos está dada por un gen marcador de selección.

Un gen reportero, como su nombre lo indica, informa si el gen de interés transferido se ha integrado o no al genoma tratado. En teoría, el gen reportero se integra de manera conjunta con el gen de interés, ya que ambos forman parte del vector de transformación (Jefferson, 1987). El gen reportero que más se emplea en la transformación es el gen GUS, el cual en contacto con el sustrato -glucuronidasa desarrolla coloración azul (Figura 5).



**Figura 5.** Expresión transitoria del gen GUS en tejido vegetal. Barra = 1 mm

## Métodos de transformación genética

Existen métodos de transformación genética para núcleo, mitocondrias y cloroplastos aplicables a organismos pertenecientes a diferentes *Fila*:

1.- Sistema natural de *Agrobacterium tumefaciens*: Es un método natural que utiliza dicha bacteria como vector biológico ya que posee un megaplásmido del que se transmite un fragmento denominado ADN-T (ADN transferido). En este ADN-T se colocan los genes deseados y mediante un cocultivo con las células candidatas a la transformación, se lleva a cabo la transferencia. El sistema de *Agrobacterium tumefaciens* es

el que más éxito ha tenido, debido a que es posible transformar un gran número de especies de plantas dicotiledóneas, gimnospermas y muy pocas especies monocotiledóneas, así, mediante este sistema no ha sido posible obtener métodos de transformación genética rutinarios para el grupo de plantas más importantes para la alimentación humana y animal, que son los cereales. Ello ha conducido a la implementación de técnicas alternativas para conseguir dicho propósito (Tabla 1).

2.- Transferencia directa de ADN: La transferencia directa de ADN mediante el polietilenglicol (PEG) y el fosfato de calcio, así como la poly-L-ornitina, ayudan a transformar protoplastos al inducir cierta permeabilidad en la membrana y permitir el libre paso de ADN. Esta fue la primera técnica alternativa que se utilizó para transformar gramíneas a mediados de los 80. Al igual que la electroporación, no es muy reproducible y no se ha estandarizado como una metodología rutinaria (Tabla 1).

3.- Electroporación: La electroporación de protoplastos o de células intactas utiliza pulsos de corriente eléctrica para abrir canales en la membrana celular en forma transitoria e introducir el ADN de interés. Esta técnica fue aplicada con mediano éxito en la década de los 80 y principios de los 90 para la obtención de plantas transgénicas de algunos cereales como el arroz y maíz (Tabla 1).

4.-Microinyección de ADN: La microinyección utiliza células inmovilizadas para internalizar el ADN directamente al inyectarlo a cada célula blanco de manera individual. Esta técnica no ha tenido gran aplicación debido al grado de dificultad para cultivar células individuales y su posterior regeneración a plantas (Tabla 1).

5.- Método de las fibras de silicón carbonadas: Las fibras de silicón carbonadas, a las cuales se adhiere el ADN, penetran directamente al interior de la célula, al aplicarles agitación mediante vortex. Esta técnica es de reciente implementación y ha tenido mediano éxito (Tabla 1).

6.- La biobalística: Es un sistema universal, el cual ha tenido una aplicación muy amplia para el desarrollo de la ingeniería genética. Ha permitido el análisis de una gran cantidad de promotores, genes y llevar a cabo la elaboración de protocolos de transformación que no habían sido posibles sin su invención en la década de los 90 (Tabla 1).

La técnica consiste en disparar partículas de metal (oro o tungsteno), recubiertas con el material genético deseado (ADN purificado), impulsadas mediante descargas eléctricas, o presión de aire o gas. Actualmente, el sistema de helio es el mecanismo más utilizado en biobalística y consiste básicamente en una cámara donde son colocados los tejidos vegetales, conectada a una bomba de vacío, que a su vez recibe el gas helio. En el momento del bombardeo de las partículas a los tejidos, se deja entrar el helio a una presión dada por la resistencia de una membrana (membrana de ruptura), al romperse deja pasar el aire a presión e impulsa a la membrana que contiene las micropartículas recubiertas de ADN (membrana acarreadora), de manera que éstas son disparadas a los tejidos sin fricción y al azar, quedando la membrana retenida por una malla (Sanford y col., 1987; Sanford y col., 1991).

Los tejidos u órganos bombardeados son incubados en medios de cultivo para producir plantas completas vía organogénesis o embriogénesis. Posteriormente, mediante pruebas histoquímicas y la incorporación de antibióticos al medio de cultivo, se seleccionan las plantas transgénicas.

La biobalística presenta ventajas con respecto a otras técnicas de transferencia de genes, ya que de manera directa y al azar, se insertan los genes a los núcleos de las células, proceso físico que ocurre debido a la presión empleada y que permite su incorporación al genoma de la planta. En otros sistemas, como es el caso

de las transformaciones hechas con *Agrobacterium tumefaciens* debe existir una relación entre el vector y el tejido de la planta para que funcione, lo que no es necesario cuando se usa la biobalística.

Esta metodología comparte con las otras técnicas de ingeniería genética el ser un evento azaroso, por lo tanto, es impredecible saber el número de copias y la ubicación de los genes extraños dentro del ADN de la planta, lo que hace que cada evento sea diferente y aumente la posibilidad de obtener como resultado plantas genéticamente resistentes pero diferentes unas a otras. Las plantas transgénicas regeneradas pueden cruzarse con otras plantas susceptibles de la misma especie produciéndose una segregación mendeliana, como la obtenida con el mejoramiento convencional.

Una de las desventajas de este sistema es que es costoso y que requiere suministros de alta calidad, y equipos y personal especializado.

El método ha sido exitoso para introducir ADN en bacterias, en el núcleo de hongos, algas, plantas superiores y animales; en mitocondrias de levaduras y algas; cloroplastos de algas y plantas superiores. Hasta hoy, su mayor relevancia ha sido en la agricultura, aunque su aplicación va más allá de este campo. Se ha probado directamente en tejidos como piel, hígado, músculo y páncreas en mamíferos vivos; se discute su aplicación en tratamiento contra el cáncer y algunas enfermedades infecciosas. Asimismo, se ha experimentado su aplicación hacia la inmunización genética en sistemas animales.

**Tabla 1.** Material vegetal y métodos de transformación

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	MÉTODO (S) DE TRANSFORMACIONES	GENES FORÁNEOS INTRODUCIDOS
ANGIOSPERMAS		MONOCOTILEDÓNEAS	
MAÍZ	<i>Zea mays</i>	BIOBALÍSTICA Agrobacterium ELECTROPORACION FIBRAS DE CARBON	BAR, GUS (Fromm y col., 1990; Gordon-Kamm y col., 1990; Ishida y col., 1996), BT (Koziel y col., 1993), ALS (Fromm y col., 1990), HPT (Walters, y col., 1992), MDMV BCCP (Murry y col., 1993) BAR, GUS (Vasil y col., 1992; Yao y col., 1996; Vasil y col., 1993; Khanna y Daggard, 2002) NPT II, GUS (Barcelo y col., 1994) NPT II, GUS (Ritala y col.,
TRIGO	<i>Triticum aestivum</i>	BIOBALÍSTICA Agrobacterium	GUS (Vasil y col., 1992; Yao y col., 1996; Vasil y col., 1993; Khanna y Daggard, 2002) NPT II, GUS (Barcelo y col., 1994) NPT II, GUS (Ritala y col.,
TRITORDEUM	<i>Hordeum X Triticum</i> Anfiploide	BIOBALÍSTICA	GUS (Ritala y col.,
CEBADA	<i>Hordeum vulgare</i>	BIOBALÍSTICA	col.,



ARROZ	Oryza sativa	Agrobacterium BIOBALÍSTICA Agrobacterium ELECTROPORACION MICROINYECCION	1994; Tingay y col., 1997) HPT, GUS (Christou y col., 1992), BAR (Valdez y col., 1998)
AVENA	Avena sativum	BIOBALÍSTICA	BAR, GUS (Somers y col., 1992; Gless y col., 1998) BAR, GUS
CENTENO	Secale cereale	BIOBALÍSTICA	(Castillo y col., 1994) NPT II, GUS (Bower y
CAÑA DE AZÚCAR	Saccharum officinarum Asparagus	BIOBALÍSTICA	Birch, 1992) HPT, NPTII, BAR, GUS
ESPÁRRAGO	officcinalis	BIOBALÍSTICA	(Cabrera- Ponce y col., 1997)
AJO	Allium sativum	Agrobacterium Agrobacterium	NPTII, GUS (Kondo y col., 2000)
CEBOLLA PASTO	Allium cepa Dactylis glomerata	Agrobacterium BIOBALÍSTICA	NPTII, GUS (Eady y col., 2000) BAR, GUS (Denchev y col., 1997)
PASTO	Panicum virgatum	BIOBALÍSTICA	BAR, GUS (Richards y col., 2001)
PASTO BAHIA	<i>Paspalum notatum</i>	<i>BIOBALÍSTICA</i>	BAR, GLUF, GUS (Smith y col., 2002)
PASTO	<i>Agrostis palustris</i>	<i>BIOBALÍSTICA</i>	BAR, GUS (Hartman y col., 1994)
PASTO BANDERA	<i>Bouteloua gracilis</i>	<i>BIOBALÍSTICA</i>	BAR, GUS (Aguado-Santacruz y col., 2002)
ORQUÍDEA	<i>Dendrobium</i>	<i>BIOBALÍSTICA</i>	NPT II , PRV CP (Kuehnle y Sugii, 1992)
PIÑA	<i>Jaquelyn Thomas hybrid</i> Ananas comosus	<i>Agrobacterium</i> <i>BIOBALÍSTICA</i>	BAR, GUS, (Espinosa y col., 2002)
BANANO	Musa spp.	<i>Agrobacterium</i>	HPT, NPTII, GUS (Sági y col., 1995)
CASAVA	<i>Manihot esculenta</i>	BIOBALÍSTICA	HPT, GUS (Zhang y col., 2000)
GINSENG	<i>Panax quinquefolius</i>	<i>Agrobacterium</i>	HPT , QUITINASA (Chen y Punja 2002b)



ANGIOSPERMAS		DICOTILEDÓNEAS	
TABACO	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Agrobacterium BIOBALÍSTICA</i> TRANSFERENCIA DIRECTA DE DNA ELECTROPORACION POLIETILENGLICOL ULTRASONICACION	NPT II, GUS (Tomes y col., 1990)
PAPA	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Agrobacterium BIOBALÍSTICA</i>	NPT II, GUS (De Block, 1988)
JITOMATE	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Agrobacterium BIOBALÍSTICA</i>	NPT II, GUS, YAC (Van Eck y col., 1995) BAR,GUS, (Tjokrokusumo ycol., 2000)
PETUNIA	<i>Petunia hybrida</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPTII, GUS (McCabe y col., 1988)
SOYA	<i>Glycine max</i>	<i>Agrobacterium BIOBALÍSTICA</i>	BAR, BGMV, GUS (Russell y col., 1993)
FRIJOL	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>BIOBALÍSTICA</i>	NPT II,GUS (Pereira yErickson, 1995)
ALFALFA	<i>Medicago sativa</i>	<i>BIOBALÍSTICA</i>	NPTII, GUS (Cheng y Jarret., 1997)
CACAHUATE	<i>Arachis hypogea</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPTII, GUS (Xie y Hong, 2002)
ACACIA	<i>Acacia mangium</i>	<i>Agrobacterium</i>	HPT, GUS (McCabe y Martinell, 1993)
ALGODÓN	<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>BIOBALÍSTICA</i>	NPTII, (Dong y Mc Hughen., 1993)
LINO	<i>Linum usitatissimum</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPTII, GUS (Knittel y col., 1994)
GIRASOL	<i>Helianthus annus</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPT II, GUS, HPT (Seki y col., 1991)
ARABIDOPSIS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Agrobacterium</i>	BAR, HPT, TLP (Chen y Punja, 2002a)
ZANAHORIA	<i>Daucus carota</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPTII, HPT, GUS (Zhang y col., 2000)
REPOLLO CHINO	<i>Brassica campestris</i> <i>L. ssp. pekinensis</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPTII, BT (Halfhill y col., 2001)
CANOLA	<i>Brassica napus</i>	<i>Agrobacterium ELECTROPORACIÓN MICROINYECCIÓN</i>	NPTII, GUS, FERR (Goto y col., 2000)
LECHUGA	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Agrobacterium</i>	BAR, GUS (Ghosh y col., 2002)
JUTE	<i>Corchorus capsularis</i>	<i>BIOBALÍSTICA</i>	NPTII, NtFAD3 (Wakita ycol., 2001)
CAMOTE	<i>Ipomoea batatas</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPT II, BAR (Cabrera-Ponce ycol., 1995; De la Fuente y col., 1995), CS (De la Fuente y col., 1997), ASR2 (Rossi y col., 1998)
PAPAYA	<i>Carica papaya</i>	<i>BIOBALÍSTICA</i>	



MANDARINA	<i>Citrus reticulata</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPT II, BAR, BARNASA, GUS (Li y col., 2002)
TORONJA	<i>Citrus paradisi</i>	<i>Agrobacterium</i>	CTV, GUS (Febres y col., 2002)
LIMA	<i>Citrus aurantifolia</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPTII, GUS (Pena y col., 1997)
PERA	<i>Pyrus communis</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPTII, GUS (Mourgues y col., 1996)
CIRUELO	<i>Prunus domestica</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPTII, GUS, PPV-CP (Scorzay col., 1994)
MANZANO	<i>Malus x domestica</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPTII, GUS (Sriskandarajah y Goodwin, 1998)
ALMENDRO	<i>Prunus dulcis</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPTII, GUS (Miguel yOliveira, 1999)
BERRIES	<i>Rubus ideaus</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPTII, HPT, SAM (Mathewsy col., 1995)
FRAMBUESA	<i>Rubus spp.</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPTII, HPT, SAM (Mathews y col., 1995)
ALERCE EUROPEO	<i>Larix kaempferi</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPTII, GUS (Levee y col., 1997)
PEPINO	<i>Cucumis sativus</i>	BIOBALÍSTICA	NPT II (Chee y Slightom, 1992)
MELÓN	<i>Cucumis melo</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPTII ( Fuchs y col., 1998)
VID	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPTII, GUS (Das y col., 2002)
CAFE	<i>Coffea canephora</i> C. <i>arabica</i>	<i>Agrobacterium</i>	cry1Ac (Leroy y col., 2000)
TE	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPT, GUS (Mondal y col., 2001)
MENTA	<i>Mentha piperita</i> L. var. Black Mitcham	<i>Agrobacterium</i>	NPT, GUS (Niu y col., 2000)
OPIO	<i>Papaver somniferum</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPT, GUS (El-Ahmady y Nessler, 2001)
ÁLAMO BLANCO	<i>Populus alba</i>	<i>Agrobacterium</i> BIOBALÍSTICA	BAR, GUS (Confalonieri ycol., 2000)
NOGAL	<i>Carya illinoensis</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPTII, GUS (McGranahan ycol., 1993)
NUEZ DE LA INDIA	<i>Juglans regia</i>	<i>Agrobacterium</i>	NPTII (McGranahan y col., 1988)
EUCALIPTO	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>  <i>E. globulus</i>	<i>Agrobacterium</i> BIOBALISTICA	NPT II (Ho y col., 1998, GUS Rochange y col., 1995), (Rochange y col., 1995)
ÁRBOL DEL HULE GIMNOSPERMAS	<i>Hevea brasiliensis</i>	BIOBALÍSTICA	
ABETO NORUEGO	<i>Picea abies</i>	BIOBALÍSTICA	NPT, BAR, GUS (Robertson y



			col., 1992, Bishop-Hurley y col., 2002)
ABETO BLANCO	<i>Picea glauca</i>	BIOBALÍSTICA	NPT, GUS, NPT II, BT (Ellis y col., 1993)
PINO	<i>Pinus radiata</i>	BIOBALÍSTICA	BAR, GUS (Bishop-Hurley y col., 2002)

NPT II, GUS (3, 13), BT (13)NPT II: Resistencia a la kanamicina; HPT: Resistencia a la higromicina; GUS:  $\beta$ -glucuronidasa; CAT: Chloramfenicol acetil transferasa; BAR: Resistencia al herbicida BASTA; ALS: Resistencia al Clorosulfuron; BT: Resistencia a Insectos; MDMV-BCCP: Resistencia a los virus del achaparramiento del maíz y del moteado clorótico; PRV CP: Resistencia al virus de la mancha anular de la Papaya; BGMV: Resistencia al virus del mosaico dorado del frijol; CS: Citrato sintasa, confiere resistencia a la acidez provocada por el aluminio; ASR2: Promotor inducido con ácido abscísico; TSWV: Virus del manchado acuoso del jitomate; YAC: Cromosoma artificial de levaduras. BARNASA: Ribonucleasa quimerica, inhibe la formación de semillas. CTV: Gen de resistencia al clostovirus de la tristeza de los cítricos-virus. GLUF: Resistencia al herbicida glufosinato. TLP: Gen que codifica para una proteína similar a la taumatina. *cry1Ac*: Resistencia a insectos. NtFAD3: Gen que desatura ácidos grasos saturados. SAM: Inhibición en la síntesis de etileno. PPV-CP: Resistencia al virus del ciruelo. FERR: Captar fierro, incremento en la fotosíntesis.

## Referencias

- Aguado-Santacruz, G.A., Q. Rascón-Cruz, J.L. Cabrera-Ponce, A. Martínez-Hernández, V. Olalde-Portugal y L. Herrera-Estrella. 2002. Transgenic plants of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. ex Steud., from microprojectile bombardment of highly chlorophyllous embryogenic cells. *Theor. Appl. Genet.* 104: 763-771.
- Allard, R.W. 1960. Principles of plant breeding. John Wiley & Sons. New York.
- Arokiaraj, P., H. Jones, K.F. Cheong, S. Coomber y B.V. Charlwood. 1994. Gene insertion into *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell Rep.* 13: 425-431.
- Barcelo, P., C. Hagel, D. Becker, A. Martín, y H. Lorz. 1994. Transgenic cereal (tritordeum) plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of inflorescence tissue. *The Plant J.* 5.4. 583-592.
- Bishop-Hurley, S.L., R.J. Zabkiewicz, L. Grace, R.C. Gardner, A. Wagner y C. Walter. 2002. Conifer genetic engineering: transgenic *Pinus radiata* (D. Don) and *Picea abies* (Karst) plants are resistant to the herbicide Búster. *Plant Cell Rep.* 20: 235-243.
- Bower, R. y R.G. Birch. 1992. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *Plant J.* 2: 409-416.
- Briggs, F.N. y P.F. Knowles. 1967. Introduction to plant breeding. Reinhold Publishing Corporation.
- Cabrera-Ponce, J.L., A. Vega-García y L. Herrera-Estrella. 1995. Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Rep.* 15:1-7.
- Cabrera-Ponce, J.L., L. López, N. Assad-García, C. Medina-Arévalo, A.M. Bailey y L. Herrera-Estrella. 1997. An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Rep.* 16:255-260.
- Castillo, A.M., V. Vasil y I.K. Vasil. 1994. Rapid production of fertile transgenic plants of rye (*Secale cereale* L.). *Bio/Technology* 12:1366-1371.
- Chen, W.P. y Z.K. Punja. 2002a. Transgenic herbicide- and disease-tolerant carrot (*Daucus carota* L.) plants obtained through *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep.* 20: 929-935.
- Chen, W.P. y Z.K. Punja. 2002b. *Agrobacterium*-mediated transformation of American ginseng with a rice chitinase gene. *Plant Cell Rep.* 20: 1039-1045.
- Cheng, Y. 1986. Anther and pollen culture of rice. *En: Hang, H. y Y. Hongyuan (eds.). Haploids of higher plants in vitro.* Springer-Verlag. Germany.
- Cheng, M., R.L. Jarret, Z. Li y J.W. Demski. 1997. Expression and inheritance of foreign genes in transgenic peanut plants generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep.* 16:541-544.
- Christou, P., T.L. Ford y M. Kofron. 1992. The development of a variety-independent gene-transfer method for rice. *Tibtech.* 10:239-246.
- Chee, P.P. y J.L. Slightom. 1992. Transformation of cucumber tissues by microprojectile bombardment: identification of plants containing functional and non-functional transferred genes. *Gene* 118: 255-260.



- Confalonieri, M., B. Belenghi, A. Balestrazzi, S. Negri, G. Facciotto, G. Schenone y M. Delledonne. 2000. Transformation of elite white poplar (*Populus alba* L.) cv. 'Villafranca' and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Rep.* 19:978-982.
- De Block M. 1988. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor. Appl. Genet.* 76:767-774.
- De la Fuente, J.M., V. Ramírez-Rodríguez, J.L. Cabrera-Ponce y L. Herrera-Estrella. 1997. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276:1566-1568.
- Denchev, P.D., D.D. Songstad, J.K. McDaniel y B.V. Conger. 1997. Transgenic orchardgrass (*Dactylis glomerata*) plants by direct embryogenesis from microprojectile bombarded leaf cells. *Plant Cell Rep.* 16:813-819.
- Dong, J.Z. y A. Mc Hughen. 1993. An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* 88: 61-71.
- Eady, C.C., R.J. Weld y C.E. Lister. 2000. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and transgenic-plant regeneration of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Cell Rep.* 19:376-381.
- El-Ahmady, S.H. y C.L. Nessler. 2001. Cellular localization of tyrosine decarboxylase expression in transgenic opium poppy and tobacco. *Plant Cell Rep.* 20: 313-317.
- Ellis, D.D., D.E. McCabe, S. McInnis, R. Ramachandran, D.R. Russell, K.M. Wallace, B.J. Martinelli, D.R. Roberts, K.F. Raffa y B.H. McCown. 1993. Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. *Bio/Technology* 11:84-89.
- Espinosa, P., J. C. Lorenzo, A. Iglesias, L. Yabor, E. Menendez, J. Borroto, L. Hernandez y A.D. Arencibia. 2002. Production of pineapple transgenic plants assisted by temporary immersion bioreactors. *Plant Cell Rep.* 21: 136-140.
- Evans, D.A. y W.R. Sharp. 1986. Somaclonal and gametoclonal variation. In: Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. (eds). *Handbook of plant cell culture*, vol. 4, Techniques and application. Macmillan, New York, p. 97-132.
- Febres, V.J., C.L. Niblett, R.F. Lee y G.A. Moore. 2002. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. *Plant Cell Rep* (En prensa).
- Fromm, M.E., F. Morrish, C.H. Armstrong, R. Williams, J. Thomas y T.M. Klein. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technology* 8: 833-848.
- Fuchs, M., F.E. Klas, J.R. McFerson y D. Gonsalves. 1998. Transgenic Melon and Squash Expressing Coat Protein Genes of Aphid-borne Viruses do not Assist the Spread of an Aphid Non-transmissible Strain of Cucumber Mosaic Virus in the Field. *Transgenic Research* 7: 449-462.
- Ghosh, M., T. Saha, P. Nayak y S.K. Sen. 2002. Genetic transformation by particle bombardment of cultivated jute, *Corchorus capsularis* L. *Plant Cell Rep.* 20: 936-942.
- Gless, C., H. Lorz y Jaén-Gartner. 1998. Transgenic oat plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of leaf base segments. *J. Plant Physiol.* 152. 151-157.
- Gordon-Kamm, W.J., T.M. Spencer, M.L. Mangano, T.R. Adams, R.J. Daines, W.G. Start, J.V. O'Brien, S.A. Chambers, W.R. Adams Jr., N.G. Willets, T.B. Rice, C.J. Mackey, R.W. Krueger, A.P. Kausch y P.G. Lemaux. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2:603-618.
- Goto, F., T. Yoshihara y H. Saiki. 2000. Iron accumulation and enhanced growth in transgenic lettuce plants expressing the iron-binding protein ferritin. *Theor. Appl. Genet.* 100: 658-664.
- Halfhill, M.D., H.A. Richards, S.A. Mabon y C.N. Stewart. 2001. Expression of GFP and Bt transgenes in *Brassica napus* and hybridization with *Brassica rapa*. *Theor. Appl. Genet.* 103:659-667.
- Hang, H. y Y. Hongyuan. 1986. Haploids of higher plants *in vitro*. Springer-Verlag. Germany.
- Hartmann, H.T. y D.E. Kester. 1989. Propagación de plantas. Ed. CECSA. México, D.F. pp. 618-625.
- Hartman C.L., L. Lee, P.R. Day y N.E. Tumer. 1994. Herbicide resistant turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) by biolistic transformation. *Bio/Technology.* 12. 919-923.
- Herrera-Estrella, L., M. De Block, M. Van Montagu y J. Schell. 1983. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 2:987-990.
- Ho, C.K., S.H. Chang, J.Y. Tsay, C.J. Tsai, V.L. Chiang y Z.Z. Chen. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 17:675-680
- Hormaza, J. I. y M. Herrero. 1992. Pollen selection. *Theor. Appl. Genet.* 83:663-672.
- Ishida, Y., H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei, T. Komari and T. Kamashiro. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* 14: 745-750.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405.
- Khanna, y G.E. Daggard. 2002. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using a superbinary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium. *Plant Cell Rep* (En prensa).
- Knittel, N., V. Gruber, G. Hahne y P. Lenée. 1994. Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): a reliable protocol. *Plant Cell Rep.* 14:81-86.
- Kondo, T., H. Hasegawa y M. Suzuki. 2000. Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Plant Cell Rep.* 19:989-993.
- Koziel, M.G., G.L. Beland, C. Bowman, N. B. Carozzi, R. Crenshaw, L. Crossland, J. Dawson, N. Desai, M. Hill, S. Kadwell, K.



- Launis, K. Lewis, D. Maddox, K. McPherson, M. R. Meghji, E. Merlin, R. Rhodes, G.W. Warren, M. Wright y S.V. Evola. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* 11:194-200.
- Kuehnle, A.R. y N. Sugii. 1992. Transformation of *Dendrobium* orchid using particle bombardment of protocorms. *Plant Cell Rep.* 11: 484-488.
- Lee, L., L. C.L. Laramore, P.R. Day y N.E. Tumer. 1996. Transformation and regeneration of creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) protoplasts. *Crop Sci.* 36: 401-406.
- Leroy, T., A.M. Henry, M. Royer, I. Altosaar, R. Frutos, D. Duris y R. Philippe. 2000. Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Rep.* 19:382-385.
- Levee, V., M.A. Lelu, L. Jouanin, D. Cornu y G. Pilate. 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid larch (*Larix kaempferi* T L. decidua) and transgenic plant regeneration. *Plant Cell Rep.* 10:680-685.
- Li, D.D., W. Shi y X.X. Deng. 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses of Ponkan mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. *Plant Cell Rep.* 21: 153-156.
- Mathews, H., W. Wagoner, C. Cohen, J. Kellog y R. Bestwick. 1995. Efficient genetic transformation of red raspberry, *Rubus ideaus* L. *Plant Cell Rep.* 14:471-476.
- Mathews, H., W. Wagoner, J. Kellog y R. Bestwick. 1995. Genetic transformation of strawberry: stable integration of a gene to control biosynthesis of ethylene. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 31. 36-43.
- McCabe W.E., W.F. Swain, B. J. Martinelli y P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean by particle acceleration. *Biotechnology* 6:923-926.
- McCabe, D. E. y B. J. Martinelli. 1993. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. *Bio/Technology* 11:596-598.
- McGranahan, G.H., C.A. Leslie, S.L. Uratsu, L.A. Martín y A.M. Dandekar. 1988. *Agrobacterium*-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Bio/Technology* 6:800-804.
- McGranahan, G.H., C.A. Leslie, A.M. Dandekar, S.L. Uratsu y I.E. Yates. 1993. Transformation of pecan and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 12:634-638.
- Miguel C.M. y M.M. Oliveira. 1999. Transgenic almond (*Prunus dulcis* Mill.) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf explants. *Plant Cell Rep.* 18:387-393.
- Mondal T.K., A. Bhattacharya, P.S. Ahuja y P.K. Chand. 2001. Transgenic tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. Kangra Jat] plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos *Plant Cell Rep.* 20: 712-720.
- Mourgues, F., E. Chevreau, C. Lambert y A. de Bondt. 1996. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell Rep.* 16:245-249
- Murry, L.E., L.G. Elliot, S.A. Capitant, J.A. West, K.K. Hanson, L. Scarafia, S. Johnston, C. DeLuca-Flaherty, S. Nichols, D. Cunanan, P.S. Dietrich, I.J. Mettler, S. Dewald, D.A. Warnick, C. Rhodes, R.M. Sinibaldi y K.J. Brunke. 1993. Transgenic corn plants expressing MDMV strain B coat protein are resistant to mixed infections of maize dwarf mosaic virus and maize chlorotic mottle virus. *Bio/Technology* 11:1559-1564.
- Niu X., X. Li, P. Veronese, R.A. Bressan, S.C. Weller y P.M. Hasegawa. 2000. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of peppermint. *Plant Cell Rep.* 19: 304-310.
- Pena, L., M. Cervera, J. Juarez, A. Navarro, J.A. Pina y L. Navarro. 1997. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing.): factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep.* 16:731-737.
- Pereira, L.F., y L. Erickson. 1995. Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 14:290-293.
- Petolino, J.F., N.M. Cowen, S.A. Thompson, y J.C. Mitchel. 1990. Gamete selection for heat-stress tolerance in maize. *J. Plant Physiol.* 136: 219-224.
- Richards, H.A., V.A. Rudas, H. Sun, J.K. McDaniel, Z. Tomaszewski y B.V. Conger. 2001. Construction of a GFP-BAR plasmid and its use for switchgrass transformation. *Plant Cell Rep.* 20: 48-54.
- Ritala, A.,K. Aspegren, U. Kurten, M. Salmenkallio-Marttila, L. Mannonen, R. Hannus, V. Kauppinen, T.H. Teeri y E. Tor-Magnus. 1994. Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. *Plant Mol. Biol.* 24:317-325.
- Robertson, D., A.K. Weissinger, R. Ackley, S. Glover y R.R. Sederoff. 1992. Genetic transformation of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst) using somatic embryo explants by microprojectile bombardment. *Plant Mol. Biol.* 19:925-935.
- Rochange, F., L. Serrano, C. Marque Teulieres, y A.M. Boudet. 1995. DNA delivery into Eucalyptus globulus zygotic embryos through biolistics: optimization of the biological and physical parameters of bombardment for two different particle guns. *Plant Cell Rep.* 14: 674-678.
- Rodríguez-Garay, B. y J.R. Barrow. 1988. Pollen selection for heat tolerance in cotton. *Crop Sci.* 28:857-859.
- Rodríguez-Garay, B. y A. Rubluo. 1992. La biotecnología vegetal en el mejoramiento genético. *En: Alvarez de la Cuadra J. J. (ed). Biotecnología HOY. CONACYT-CIATEJ, A.C. pp. 157-172.*
- Rossi, M., F. Carrari, J.L. Cabrera-Ponce, C. Vázquez-Rovere, L. Herrera-Estrella, G. Gudesblat y N.D. Iussem. 1998. Analysis of an abscisic acid (ABA)-responsive gene promoter belonging to the Asr gene family from tomato in homologous and



- heterologous systems. *Mol. Gen. Genet.*, 258:1-8.
- Russell, D.R., K.M. Wallace, J.H. Bathe, B.J. Martinell y D.E. McCabe. 1993. Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Rep.* 12: 165-169.
- Sági, L., B. Panis, S. Remy, H. Schoofs, K. De Smef, R. Swennen y B.P.A. Cammue. 1995. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment. *Bio/Technology.* 13:481-485.
- Sanford, J.C., T.M. Klein, E.D. Wolf y N. Allen. 1987. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J. Part. Sci. Tech.* 5:27-37.
- Sanford, J.C., M.J. DeVit, J.A. Russell, F.D. Smith, P.R. Harpending, M.K. Roy y S.A. Johnston. 1991. An improved helium-driven biolistic device. *Technique.* 3:3-16.
- Scorza, R., M. Ravelonandro, A.M. Callahan, J.M. Cordts, M. Fuchs, J. Dunez y D. Gonsalves. 1994. Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the plum pox virus coat protein gene. *Plant Cell Rep.* 14: 18-22.
- Scowcroft, W.R. y P.J. Larkin. 1988. Somaclonal variation. *En: G. Bock y J. Mash (eds). Applications of plant cell tissue culture.* Ciba Foundation Symp. 137. Wiley, Chichester, U.K. pp. 15-21.
- Seki, M., N. Shigemoto, Y. Komeda, J. Imamura, Y. Yamada, y H. Morikawa. 1991. Transgenic *Arabidopsis thaliana* plants obtained by particle bombardment-mediated transformation. *Applied Microb. Biotech.* 36:228-230.
- Skirvin, R.M., K.D. McPheeters y M. Norton. 1994. Sources and frequency of somaclonal variation. *HortScience* 29:1232-1237.
- Skirvin, R.M. y J. Janick. 1976. "Velvet rose" *Pelargonium*, a scented geranium. *HortScience* 11: 61-62.
- Smith, R.L., M.F. Grando, Y. Y. Li, J.C. Seib y R.G. Shatters. 2002. Transformation of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flugge). *Plant Cell Rep.* 20: 1017-1021.
- Somers, D., H. Rines, W. Gu, H. Kaeppler y W. Bushnell. 1992. Fertile, transgenic oat plants. *Bio/Technology* 10:1589-1594.
- Skiskandarajah S. y P. Goodwin. 1998. Conditioning promotes regeneration and transformation in apple leaf explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 53:1-11.
- Tingay, S., D. McElroy, R. Kalla, S. Fieg, M. Wang, S. Thornton y R. Brettell. 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J.* 11:1369-1376.
- Tjokrokusumo, D., T. Heinrich, S. Wylie, R. Potter y J. McComb. 2000. Vacuum infiltration of *Petunia hybrida* pollen with *Agrobacterium tumefaciens* to achieve plant transformation. *Plant Cell Rep.* 19:792-797.
- Tomes, D.T., A.K. Weissinger, M. Ross, R. Higgins, B. Drummond, S. Schaaf, J. Malone-Schoneberg, M. Staebell, P. Flynn, J. Anderson y J. Howard. 1990. Transgenic tobacco plants and their progeny derived by microprojectile bombardment of tobacco leaves. *Plant Mol. Biol.* 14:261-269.
- Valdez, M., J.L. Cabrera-Ponce, D. Sudhakar, L. Herrera-Estrella, y P. Christou. 1998. Transgenic Central American, West African and Asian elite rice varieties from particle bombardment of foreign DNA into mature seed-derived explants. *Ann. Bot.* 82:795.
- Van Eck, J. M., A.D. Blowers y E.D. Earle. 1995. Stable transformation of tomato cell cultures after bombardment with plasmid and YAC DNA. *Plant Cell Rep.* 14:299-304.
- Vasil, V., A.M. Castillo, M.E. Fromm y I.K. Vasil. 1992. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology* 10: 667-674.
- Vasil, V., V. Srivastava, A.M. Castillo, M.E. Fromm y I.K. Vasil. 1993. Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. *Bio/Technology* 11:1553-1558.
- Wakita, Y., M. Otani, T. Hamada, M. Mori, K. Iba y T. Shimada. 2001. A tobacco microsomal -3 fatty acid desaturase gene increases the linolenic acid content in transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Plant Cell Rep.* 20: 244-249.
- Walters, D.A., C.S. Vetsch, D.E. Potts y R.C. Lundquist. 1992. Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants. *Plant Mol. Biol.* 18:189-200.
- Wenke, J.R. 1980. Patterns in prehistory-man kinds first three million years. Oxford University Press. New York.
- Xie, D.Y. y Y. Hong. 2002. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Acacia mangium*. *Plant Cell Rep.* 20: 917-922.
- Yao, J.L., J.H. Wu, A.P. Gleave y B.A.M. Morris. 1996. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. *Plant Sci.* 113:175-183.
- Zhang, F.L., Y. Takahata, M. Watanabe y J.B. Xu. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep.* 19:569-575.
- Zhang, P., G. Legris, P. Coulin y J. Puonti-Kaerlas. 2000. Production of stably transformed cassava plants via particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 19:939-945.

