
EXPRESIÓN TRANSIENTE DEL GEN REPORTERO β GLUCORONIDASA EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE *Heliconia stricta* TRANSFORMADOS CON *Agrobacterium tumefaciens*

TRANSIENT EXPRESSION OF THE β GLUCURONIDASA GENE ON SOMATIC EMBRYOS OF *Heliconia stricta* BY *Agrobacterium tumefaciens* MEDIATED TRANSFORMATION

Esther Julia Naranjo¹, Paúl Chavarriaga² y Lucía Atehortúa³

Resumen

Factores tales como la cepa bacteriana, el tiempo de precultivo de los embriones y el tiempo de cocultivo con la bacteria fueron evaluados en términos de la expresión transiente del gen *Gus* en embriones somáticos de *Heliconia stricta*. Los resultados mostraron que la cepa bacteriana y el tiempo de cocultivo tienen efecto significativo en el porcentaje de embriones con expresión transiente, lo que no ocurre con el tiempo de precultivo. La cepa LBA4404, que porta el plásmido pBI121, con tres días de cocultivo mostró el mejor resultado en la expresión transitoria de *Gus*. Sin embargo, el efecto de algunos antibióticos y tiempos de cocultivo prolongados sobre procesos posteriores a la transformación deben ser evaluados con el fin de optimizar un protocolo que permita la transformación estable de los embriones somáticos de esta especie.

En este estudio se reporta por primera vez la transformación genética en una especie del género *Heliconia*, aunque inicialmente en forma transitoria.

Palabras clave: *H. stricta*, transformación genética, *A. tumefaciens*, expresión transiente, β glucuronidasa

Abstract

Factors such as the bacterial strain preculture time and coculture time with the bacteria were evaluated in terms of the transient expression of gene *Gus* on somatic embryos of *Heliconia stricta*. The results showed that the bacteria strain and coculture time had significant effects on the percentage of embryos with transient expression, but not the preculture time. The strain LBA4404 with the plasmid pBI121, with three days of coculture, showed the best transient expression of the gene *Gus* in this specie. However, it will be necessary to evaluate the effect of certain antibiotics and longer coculture times on the process after transformation, in order to optimize a protocol that allows for the stable transformation of the embryos.

Key words: *H. stricta*, genetic transformation, *A. tumefaciens*, transient expression, β glucuronidasa.

INTRODUCCIÓN

Heliconia stricta es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia Heliconiaceae, la cual agrupa alrededor de 250 especies conocidas como “platanillos” (Berry y Kress, 1991). *H. stricta* se cultiva como especie ornamental para la producción de flores de corte, debido a que

produce una inflorescencia bracteal erecta de color rojo a anaranjado con márgenes amarillos o verdes, bastante atractivas (Kress *et al.*, 1999). En la actualidad existe un mercado discretamente creciente para estas plantas ornamentales tropicales. A pesar de que Colombia es el segundo

Recibido: septiembre de 2001; aprobado para publicación: julio de 2002.

¹ Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, apartado 1226, Medellín. E-mail: enaranjo@matematicas.udea.edu.co.

² Unidad de Biotecnología, Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, apartado 6713, Cali. E-mail: p.chavarriaga@cgiar.org.

³ Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, apartado 1226, Medellín. E-mail: latehor@quimbaya.udea.edu.co.

exportador mundial de flores de corte y el centro de biodiversidad de este género, el mercado de exportación de este tipo de flor es todavía incipiente. De otro lado, siendo flores ornamentales bastante atractivas, las heliconias son hierbas con crecimiento erecto medio a alto (la mayoría de las especies alcanzan varios metros de altura) y con un crecimiento rizomatoso bastante extenso, características que, además del peso, tamaño, baja durabilidad en florero, estacionalidad y sensibilidad a bajas temperaturas, entre otras, han hecho su proceso de comercialización algo lento y difícil.

Se ha identificado que variaciones en la morfología de la planta y nuevas características florales son prerequisites importantes para la expansión de la industria de plantas ornamentales (Krishna Raj *et al.*, 1997), por lo que el desarrollo de nuevos fenotipos de plantas, incluyendo variaciones en la altura, el tamaño, la forma, el color de la flor, el ciclo de floración, el color de las hojas y la resistencia a enfermedades, podrían beneficiar ampliamente su proceso de comercialización (Deroles *et al.*, 1997; Zuker *et al.*, 1998).

El mejoramiento tradicional continúa siendo la principal fuente de nuevos cultivos y variedades para el mercado de ornamentales, pero éste presenta varias limitaciones tales como el limitado "pool génico" contenido en una especie y la necesidad de sucesivos y largos cruces para fijar la característica de interés. Este proceso puede tomar muchos años y frecuentemente el producto final es una combinación de características deseables e indeseables (Deroles *et al.*, 1997; Zuker *et al.*, 1998). La transgénesis vence estas limitaciones debido a que el DNA utilizado en el proceso de transformación puede ser aislado de cualquier organismo y la transferencia a la planta huésped sólo involucra unos pocos genes, dando como resultado una progenie idéntica a su parental pero con una o dos características nuevas, es decir, no codificadas previamente en su genoma.

Aunque hasta ahora no se conoce mucho sobre el mejoramiento de las heliconias por métodos tradicionales, existen algunas limitaciones para su desarrollo debido a que la propagación sexual

presenta problemas como estacionalidad en la producción de flores, además de la variabilidad genética de las especies que puede llevar a la obtención de características hortícolas no deseables, así como la lenta germinación de las semillas (Berry y Kress, 1991; Kress *et al.*, 1999). Por lo anterior, resulta fundamental el desarrollo de técnicas alternativas de mejoramiento genético que permitan resolver algunos problemas inherentes que dificultan la comercialización de esta especie promisoría.

La biología molecular ha permitido a los investigadores alterar características individuales en especies de importancia ornamental y agronómica (Gasser y Fraley, 1989; Glick y Thompson, 1993; Murray, 1993; McElroy, 1996; Deroles *et al.*, 1997). Actualmente existen varios protocolos para el mejoramiento de flores de corte en rosas, tulipanes, gladiolos, crisantemos y orquídeas, entre otras (Deroles *et al.*, 1997; Kamo, 1997; Krishna Raj *et al.*, 1997; Zuker *et al.*, 1998). La efectividad de la ingeniería genética se basa en un buen sistema de regeneración, un sistema de transformación eficiente y la disponibilidad de genes para la transferencia (Hutchinson *et al.*, 1992; Zuker *et al.*, 1998). En este momento se cuenta con varios protocolos de regeneración vía embriogénesis somática para este género (Valencia y Atehortúa, 1999), y el grupo de genes disponibles para utilizar con miras a mejorar algunas características agronómicas es cada vez mayor, gracias al aislamiento e identificación de nuevos genes en diferentes especies (Hutchinson *et al.*, 1992; Murray, 1993; Winter y Kahl, 1995; Deroles *et al.*, 1997; Curtis *et al.*, 1999).

Agrobacterium tumefaciens es el vehículo de transferencia genética más utilizado para la transformación de varias especies monocotiledóneas que incluyen arroz (Aldemita y Hodges, 1996; Dong *et al.*, 1996; Hiei *et al.*, 1997), espárrago (Byt-bier *et al.*, 1987) y banano (May *et al.*, 1995), además de varias flores de corte, mencionadas anteriormente (Hutchinson *et al.*, 1992; Gutter-son *et al.*, 1994; Kamo, 1997; Zuker *et al.*, 1998; Curtis *et al.*, 1999).

A la fecha se han publicado varias revisiones sobre la transformación genética de especies ornamentales por esta técnica (Pellegrineschi *et al.*, 1994; Deroles *et al.*, 1997; Kamo, 1997; Curtis *et al.*, 1999; Giovannini *et al.*, 1999). La mayoría de las especies ornamentales transformadas han sido flores de corte, lo que refleja la dominancia que este sector tiene dentro del mercado global de ornamentales (Hutchinson *et al.*, 1992; Mol *et al.*, 1995; Rosati *et al.*, 1996; Deroles *et al.*, 1997; Kamo, 1997; Zuker *et al.*, 1998; Mol, 2000). Es claro que la transferencia mediada por *A. tumefaciens* es la técnica de transformación preferida en el área de los ornamentales ya que su baja eficiencia para infectar especies monocotiledóneas ha sido superada en muchos casos.

Debido a la biodiversidad de *heliconias* presentes en Colombia y el potencial ornamental que éstas tienen, el presente trabajo tuvo como objetivo general la evaluación de un sistema de transformación transitoria que facilitará la posibilidad de transferir genes foráneos de interés en embriones somáticos de *H. stricta*.

Materiales y métodos

Material vegetal. Todos los ensayos fueron realizados empleando embriones somáticos en estado globular de *H. stricta* obtenidos de acuerdo con la metodología planteada por Valencia y Atehortúa (1999). Los meristemos florales fueron extraídos y puestos en medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado para inducir la formación de embriones somáticos (Valencia y Atehortúa, 1999).

Cepas bacterianas y plásmidos. Con el fin de mirar la influencia de factores como la cepa bacteriana, el tiempo de precultivo con acetosiringona y el tiempo de cocultivo con la cepa bacteriana sobre la eficiencia de la transferencia del T-DNA mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en embriones somáticos de *H. stricta*, se evaluó la eficiencia de transformación midiendo la expresión transitoria del gen *Gus*.

La cepa bacteriana LBA4404 (Hoekema *et al.*, 1983) con el plásmido pBI121 (Jefferson, 1987), vector binario que contiene los genes *nptII* bajo

el control del promotor y terminador de la nopalina sintetasa, *nos*, el cual codifica para una enzima cuyo producto génico confiere resistencia a la kanamicina, y el gen *uidA* bajo el promotor del virus del mosaico de la coliflor, *CaMV35S*, y el terminador *nos*, que codifica para la enzima β glucuronidasa (GUS) (Krishna Raj *et al.*, 1997), fue suministrada por la Corporación para las Investigaciones Biológicas (CIB). Las cepas bacterianas Agl-1 y C58C1 (Wordragen y Dons, 1992; Kamo, 1997), con el plásmido pBIG101, que contiene los genes *nptII* bajo el promotor y terminador *nos*, y *Gus-intron* (May *et al.*, 1995; Ohta *et al.*, 1990) bajo el promotor y terminador *CaMV35S*, fueron suministradas por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

La selección de estas cepas en la presente investigación se debió a que éstas han sido utilizadas con éxito para la obtención de plantas transgénicas en varias especies monocotiledóneas (Martín *et al.*, 1992; May *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 1996; Ishida *et al.*, 1996; Kamo, 1997; Krisnah Raj *et al.*, 1997; Zuker *et al.*, 1998; Curtis *et al.*, 1999; Kuvshinov *et al.*, 1999; Belarmino y Mii, 2000; Tang *et al.*, 2000).

Las cepas bacterianas fueron mantenidas en medio LB sólido, suplementado con los respectivos antibióticos. Una colonia fue usada en cada caso para inocular 100 ml de caldo LB suplementado con los respectivos antibióticos y con 100 μ M de acetosiringona (AS) (Sheng y Citovsky, 1996). Las células se pusieron sobre un agitador a 150 rpm a 28 °C y bajo condiciones de oscuridad durante 24 horas. A la mañana siguiente los cultivos fueron centrifugados a 3.000 rpm durante 10 minutos y resuspendidos en medio mínimo AB modificado, suplementado con 100 μ M de AS y 0.5% de glucosa durante 4 horas, para la inducción de los genes *vir*. Finalmente, este cultivo se usó para la inoculación.

Transformación genética, cocultivo de *A. tumefaciens* con embriones somáticos. Se precultivaron embriones somáticos en estado globular de *H. stricta* en medio MSm (MS de multiplicación) suplementado con 200 μ M de AS por periodos

de uno, dos y tres días, antes de realizar la inoculación. Los embriones se inocularon por aplicación de gotas de la suspensión bacteriana sobre ellos. El cocultivo con las diferentes cepas de *A. tumefaciens* se realizó en la oscuridad, durante uno, dos y tres días sobre medio de multiplicación a pH 5.75.

Después de los diferentes tiempos de cocultivo, los embriones se lavaron durante cinco o seis días con medio basal MS líquido suplementado con cefotaxime (250 mg/l) y carbenicilina (300 mg/l) (Shackelford y Chlan, 1996) y finalmente fueron transferidos a medio MSm sólido suplementado con estos mismos antibióticos y con kanamicina 200 mg/l para la selección. Después de este procedimiento fue realizada la prueba de expresión de *Gus*.

Tinción histoquímica (expresión de *Gus*). Se tomaron embriones somáticos de los diferentes ensayos con las cepas para determinar el nivel de expresión del gen *Gus* en ellos después de la transformación. El sustrato 5 bromo-4 cloro-3indolyl- β -D-glucuronide (x-gluc) fue solubilizado en formamida y llevado a una concentración final de 0.5 mg/ml con buffer fosfato y adicionado directamente a los embriones en tubos eppendorf. Los embriones se incubaron a 37 °C durante 16 a 18 horas para permitir la reacción enzimática de la β glucuronidasa con el sustrato (Jefferson, 1987). Embriones somáticos sometidos a las mismas condiciones, pero sin la bacteria, fueron usados como control para la evaluación de la expresión endógena de la enzima en los embriones. La expresión del gen *Gus* fue determinada como el porcentaje de embriones somáticos que presentaron coloración azul al ser sumergidos en el sustrato x-gluc.

Sensibilidad a la kanamicina. Se estableció la sensibilidad de los embriones a la kanamicina con relación al control (medio sin kanamicina) para determinar la máxima concentración de kanamicina que permite la multiplicación de los embriones transformados, eliminando o inhibiendo la multiplicación de los no transformados. Se pusieron seis grupos de embriones somáticos en una

caja de petri con 25 ml de medio de inducción, suplementado con diferentes concentraciones de kanamicina: 0, 100, 150, 180, 200, 220, 250 y 300 mg/l. Dos réplicas fueron utilizadas para cada nivel de kanamicina. Las réplicas se evaluaron durante cuatro semanas en su apariencia general, color y porcentaje de multiplicación del callo de acuerdo con la escala de Santana (1982).

Análisis estadístico. Los resultados se analizaron por medio del programa STATISTICA. Se realizó un análisis multifactorial MANOVA de tres factores con interacción, para evaluar los efectos de los diferentes factores sobre la variable de respuesta, porcentaje de embriones transformados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transformación genética. El éxito de la transformación mediada por *A. tumefaciens* depende no sólo de la eficiencia en la transferencia del DNA y del sistema de regeneración, sino también de la subsecuente eliminación de esta bacteria de las células transformadas (Tang *et al.*, 2000). En nuestro caso, la combinación de los antibióticos carbenicilina y cefotaxime, usados para la eliminación de la bacteria después del tiempo de cocultivo, fueron efectivos en las condiciones mencionadas anteriormente. Sin embargo, el efecto de éstos sobre el proceso de multiplicación de los embriones y su capacidad de regeneración aún no ha sido evaluado para el caso de *H. stricta*. Algunos autores han reportado el efecto deletéreo de éstos y otros antibióticos sobre la capacidad embriogénica y de regeneración de los explantes en especies como *Brassica*, *Phalaenopsis* y *Juglans*, entre otras (Nakamura *et al.*, 1998; Kuvshinov *et al.*, 1999; Belarmino y Mii, 2000; Tang *et al.*, 2000; Santarém *et al.*, 1998).

Con estos antecedentes, es clara la importancia de una selección y evaluación de antibióticos eficientes para la eliminación de la bacteria después del proceso de transformación. Aunque los antibióticos fueron efectivos para la eliminación de la bacteria, es necesario evaluar sus efectos en procesos posteriores a la transformación en embriones somáticos de heliconia.

Efecto de la cepa bacteriana, el tiempo de precultivo y el tiempo de cocultivo. El análisis multifactorial realizado a los resultados del porcentaje de expresión transitoria del gen *Gus* dio como resultado significancia estadística, únicamente para la interacción entre los factores cepa bacteriana y tiempo de cocultivo ($p = 0.000417$), lo que sugiere el efecto de estos dos factores sobre la expresión transitoria del gen *Gus*.

En cuanto a la cepa bacteriana (figuras 1, 2 y 3), se encontró que en el cultivo con *A. tumefaciens* LBA4404 se obtuvo el mayor porcentaje de expresión transitoria del gen *Gus*. Este resultado no sorprende, ya que esta cepa bacteriana ha sido frecuentemente usada para la transformación de varias especies monocotiledóneas con bastante éxito y calificada como altamente agresiva (Belarmino y Mii, 2000; Bond y Roose, 1998; Cao *et al.*, 1998; Curtis *et al.*, 1999; Hiei *et al.*, 1994; Ishida *et al.*, 1996; Kuvshinov *et al.*, 1999; Miguel y Oliveira, 1999; Seabra y Pais, 1998).



Figura 1. Influencia del tiempo de precultivo y el tiempo de cocultivo sobre la eficiencia de transformación de embriones somáticos de *H. stricta* transformados con *A. tumefaciens* cepa LBA4404 pBI121. La eficiencia se presenta en medida de la expresión del gen *Gus* sobre los embriones somáticos que crecen en medio de selección con 200 mg/l de Kan, dos semanas después de la transformación

El efecto del tiempo de cocultivo produjo un incremento en el porcentaje de expresión transitoria del gen *Gus* en la transformación con la cepa LBA4404 y un decrecimiento en la transformación con las cepas C58C1 y Agl-1. Este resultado sugiere que el factor tiempo de cocultivo debe ser evaluado en función de la(s) cepa(s)

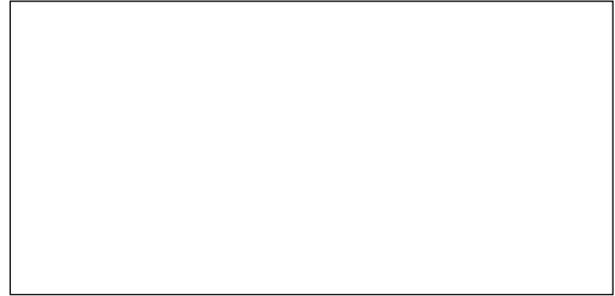


Figura 2. Influencia del tiempo de precultivo y el tiempo de cocultivo sobre la eficiencia de transformación de embriones somáticos de *H. stricta* transformados con *A. tumefaciens* cepa C58C1 pBIG101. La eficiencia se presenta en medida de la expresión del gen *Gus* sobre los embriones somáticos que crecen en medio de selección que contiene 200 mg/l de Kan, dos semanas después de la transformación



Figura 3. Influencia del tiempo de precultivo y el tiempo de cocultivo sobre la eficiencia de transformación de embriones somáticos de *H. stricta* transformados con *A. tumefaciens* cepa Agl-1 pBIG101. La eficiencia se presenta en medida de la expresión del gen *Gus* sobre los embriones somáticos que crecen en medio de selección que contiene 200 mg/l de Kan, dos semanas después de la transformación

bacteriana(s) que se seleccionen para llevar a cabo el proceso de transformación.

En trabajos anteriores realizados con otras especies se reporta que el tiempo de cocultivo con la bacteria provoca un incremento en la eficiencia de transformación, pero con disminución en la supervivencia del explante y otros procesos posteriores a la transformación (Cao *et al.*, 1998; Cervera *et al.*, 1998; Belarmino y Mii, 2000; Yan *et al.*, 2000). En nuestro caso, estos efectos aún no han sido evaluados.

El tratamiento de un periodo de precultivo en un medio suplementado con acetosiringona antes de

la inoculación con la bacteria no tuvo efecto claro sobre la eficiencia de transformación (figuras 1, 2 y 3). La no significancia estadística de este factor sobre la eficiencia de transformación permite sugerir su eliminación en experimentos posteriores de transformación con el género *Heliconia*. Es de anotar que aunque el tiempo de precultivo no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la expresión del gen *Gus*, los embriones sometidos a tres días de precultivo y tres de cocultivo con la cepa LBA4404 fueron los que presentaron mayor porcentaje de expresión transitoria del gen *Gus*, observándose 48% de expresión. En trabajos realizados con otras especies se ha reportado que tiempos de precultivo extensos pueden ser deletéreos para los explantes y en otros casos han afectado negativamente la expresión transitoria del gen *Gus* (De Bondt et al., 1994; Aldemita y Hodges, 1996; Miguel y Oliveira, 1999).

Expresión de *Gus*. La actividad de *Gus* se evidenció claramente en los embriones inoculados con las diferentes cepas de *A. tumefaciens* (resultados no mostrados). La coloración azul observada demuestra que la incorporación y expresión del gen *uidA* tuvo lugar en los embriones somáticos de *H. stricta*. Los embriones control (no inoculados con la bacteria) no mostraron actividad de *Gus*, lo que descarta su expresión endógena.

Sensibilidad a la kanamicina. Los datos presentados en la tabla 1 muestran que la concentración de kanamicina de 200 mg/l en el medio inhibe por completo la multiplicación de los embriones

no transformados, por lo cual fue elegida como la concentración de antibiótico para el proceso de selección. La resistencia de los embriones somáticos de *H. stricta* a la kanamicina es bastante alta cuando se compara con resultados obtenidos con tejidos de otras especies tales como banano, arroz, maíz, soya y algunas flores de corte, entre otros (May et al., 1995; Aldemita y Hodges, 1996; Hiei et al., 1997; Krishnah Raj et al., 1997; Pyne y Lloyd, 1998; Bi et al., 1999; Giovannini et al., 1999). Varios trabajos han sido publicados acerca del efecto de diferentes concentraciones de este antibiótico sobre los procesos de organogénesis, potencial embriogénico, regeneración y otros, posteriores al proceso de transformación (Bond y Roose, 1998; Eady y Lister, 1998; Haymes y Davis, 1998; Kokko y Karenlampi, 1998; Seabra y Pais, 1998; Chauvin et al., 1999; Kuvshinov et al., 1999; Miguel y Oliveira, 1999). Por esta razón puede ser recomendable evaluar otra clase de genes que confieran resistencia a otros antibióticos, con el fin de evitar el uso de concentraciones tan altas en el proceso de selección y que podrían en algún momento afectar procesos posteriores a la transformación del tejido vegetal. En esta investigación el proceso de regeneración de plantas transformadas se encuentra todavía en proceso de selección de los embriones transformados. Se sabe que los niveles de expresión transiente no necesariamente reflejan los resultados de la expresión estable de los genes insertados. A pesar de lo anterior, sirven de guía para futuros estudios, máxime teniendo en cuenta que este es el primer reporte de transformación genética en el género *Heliconia*.

Tabla 1. Efecto de las diferentes concentraciones de kanamicina sobre la multiplicación de embriones somáticos no transformados de *H. stricta*

Concentración de kanamicina (mg/l)	0 (control)	100	150	180	200	220	250	300
Grado de multiplicación (Santana, 1982)	4-5	2-3	1-2	1-2	1-1	0-1	0-1	0-0

0: callo muerto; 1: callo sin multiplicación; 2: 25% de multiplicación; 3: 50% de multiplicación; 4: 75% de multiplicación; 5: 100% de multiplicación.

CONCLUSIÓN

En esta investigación se reporta por primera vez la transformación en forma transitoria de una especie del género *Heliconia*. Debido a que se cuenta con protocolos de regeneración bien establecidos, el desarrollo de un método de transformación relativamente eficiente fue el principal objetivo del presente trabajo. Factores como la cepa bacteriana, el tiempo de precultivo con acetosiringona y el tiempo de cocultivo con la cepa bacteriana fueron evaluados y otros deben ser tenidos en cuenta para trabajos futuros. La meta final es disponer

de este sistema no convencional para mejorar esta u otras especies del género, con el fin de transferir genes de importancia. Algunas de las características que pueden ser mejoradas en el género son la disminución del peso, el tamaño, la sensibilidad a las bajas temperaturas y la introducción de nuevos colores, además de modificar la estacionalidad de la flor, que puedan darle mayor valor agregado y competitividad en el mercado internacional.

REFERENCIAS

- Aldemita L, Hodges T.** 1996. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Japonica and Indica rice varieties. *Planta* 199:612-617.
- Belarmino M, Mii M.** 2000. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis orquid*. *Plant Cell Reports* 19:435-442.
- Berry F, Kress J.** 1991. *Heliconia: an identification guide*. Smithsonian Institution Press. Hong Kong, China. 334 p.
- Bi Y, Cammue B, Krisnah Raj S, Saxena P.** 1999. Resistance to *Botrytis cinerea* in scented *Geranium* transformed with a gene encoding the antimicrobial protein Ace-AMP1. *Plant Cell Reports* 18:835-840.
- Bytebier B, Deboeck F, Debreve H, Van Montagu M, Hernalsteens JP.** 1987. T-DNA Organization in Tumor Cultures and Transgenic Plants of the Monocotyledon *Asparagus officinalis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5.345-5.349.
- Cao X, Liu Q, Rowland LJ, Hammerschlag FA.** 1998. *Gus* expression in blueberry factors influencing *Agrobacterium*-mediated gene transfer efficiency. *Plant Cell Reports* 18:266-270.
- Cervera M, Pina JA, Juárez J, Navarro L, Peña L.** 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Reports* 18(3-4):271-278.
- Curtis L, Power J, Heoden P, Phillips A.** 1999. A stable transformation system for de ornamental plant, *Datura meteloides* D C. *Plant Cell Reports* 18:554-560.
- Chauvin J, Marhadour S, Cohat J, Le Nard M.** 1999. Effects of gelling agents on in vitro regeneration and kanamycin efficiency as selective agent in plant transformation procedures. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 58:213-217.
- De Bondt A, Eggermont, K, Druart P, De Vil M.** 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple: an assesment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Reports* 13:587-593.
- Deroles S, Boase M, Konczak L.** 1997. Transformation protocols for ornamental plants. In: Geneve RL, Preece JE, Merkle S (eds.). *Biotechnology of ornamental plants*. CAB INTERNATIONAL. Canadá, pp. 87-118.
- Dong J, Teng W, Bucholz W, Hall T.** 1996. *Agrobacterium* mediated transformation of Javanica rice. *Mol Breeding* 2:267-276.
- Eady C, Lister C.** 1998. A comparison of four selective agents for use with *Allium cepa* L. immature embryos and immature embryos derived cultures. *Plant Cell Reports* 18:117-121.
- Gasser CS, Fraley R.** 1989. Genetically engineering plants for Crop Improvement. *Science* 244:1.293-1.299.
- Giovannini A, Zottini M, Morreale G, Spena A, Allavena A.** 1999. Ornamental traits modification by rol genes in *Osteospermum ecklonis* transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 35:70-75.
- Glick BR, Thompson JE.** 1993. *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. CRC Press, Inc. United States.
- Gutterson NC, Napoli C, Morgan A.** 1994. Modification of flower color in florist Chrysanthemum: production of a white flowering variety through molecular genetics. *Biotechnology* 12:268-271.
- Haymes K, Davis T.** 1998. *Agrobacterium* mediated transformation of 'Alpine' *Fragaria vesca* and transmission of transgenes to R1 progeny. *Plant Cell Reports* 17:279-283.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T.** 1994. Efficient transformation fo rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of T-DNA. *Plant Journal* 6(2):271-282.
- Hiei Y, Komari T, Kubo T.** 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* 35:205-218.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJ, Schilperoort RA.** 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir and Ti region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303:179-180.
- Hutchinson JF, Kaul V, Maheswaran G, Moran JR, Graham M, Richards D.** 1992. Genetic improvement of floricultural crops using biotechnology. *Aust J Bot* 40:765-787.
- Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T.** 1996. High efficiency transformation of maize mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol* 14:745-750.
- Jefferson RA.** 1987. Assaying chimeric genes in plants: the gene fusion systems. *Plant Mol Biol Reporter* 5(4):384-405.

- Kamo K.** 1997. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated *Gus* expression and opine synthesis in gladiolus. *Plant Cell Reports* 16:389-392.
- Kokko H, Karemlamp S.** 1998. Transformation of *Artic bramble* by *A. tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 17:822-826.
- Kress J, Betancur J, Echeverry B.** 1999. *Heliconias, llamaradas de la selva colombiana*. Cristina Uribe Editores, Ltda. 1ª ed. Bogotá, Colombia. 200 p.
- Krishna Raj S, Bi YM, Saxena PK.** 1997. Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation system for scented geraniums (*Pelargonium* sp. "Frensham"). *Planta* 201:434-440.
- Kuvshinov V, Koivu K, Kanerva K, Pehu E.** 1999. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of greenhouse-grown *Brassica rapa* ssp. *oleifeira*. *Plant Cell Reports* 18:773-777.
- May GD, Afza R, Mason HS, Wiecko A, Novak FJ, Arntzen CJ.** 1995. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biotechnology* 13:486-492.
- McElroy D.** 1996. The industrialization of plant transformation. *Nature Biotechnol* 14(6):715-76.
- Miguel C, Oliveira M.** 1999. Transgenic almond plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf explants. *Plant Cell Reports* 18:387-393.
- Mol JN, Holton TA, Koes R.** 1995. Floriculture: genetic engineering of commercial traits. *Trends Biotechnol* 13:350-355.
- Mol J.** 2000. Biotechnological production of novel flower colors; current status and future prospects. Abstracts of Congress "Perspectives and Limitations of Biotechnology in Developing Countries". San José, Costa Rica.
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Murray D.** 1993. *Biotechnology in agriculture N°. 4. Advanced methods in plant breeding and biotechnology*. CAB International. Australia. 335 p.
- Nakamura Y, Kobayashi S, Nakajima Y.** 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration from hypocotyl segments of *Japanese persimmon*. *Plant Cell Reports* 17:435-440.
- Ohta S, Mita S, Hattori T, Nakamura K.** 1990. Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase (*Gus*) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol* 31(6):805-813.
- Payne T, Lloyd A.** 1998. Transformation and regeneration of *Lobelia erinus* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 18:308-311.
- Pellegrineschi A, Damon JP, Valtorna N, Paillard N, Tepfer D.** 1994. Improvement of ornamental characters and fragrance production in *Lemond-scented geranium* through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Biotechnology* 12:64-68.
- Rosati C, Cadic A, Renou JP, Duron M.** 1996. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Forsythia x Intermedia* "Spring Glory". *Plant Cell Reports* 16:114-117.
- Santana N.** 1982. Determinación de un medio adecuado para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Sacharum* sp híbrido) in vitro. *Cultivos Tropicales* 4(3):12-15.
- Seabra R, Pais M.** 1998. Genetic transformation of european chestnut. *Plant Cell Reports* 17:177-182.
- Shackelford N, Chlan C.** 1996. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol Reporter* 14(1):50-57.
- Sheng J, Citovsky V.** 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *Plant Cell* 8(10):1.699-1.710.
- Sunilkumar G, Vijayachandra K, Veluthambi K.** 1999. Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing vir gene induction. *Plant Sci* 141:51-58.
- Tang H, Ren Z, Krezal G.** 2000. An evaluation of antibiotics for the elimination of *A. tumefaciens* from walnut somatic embryos and for the effects on the proliferation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 19:881-887.
- Valencia C, Atehortúa L.** 1999. Somatic embryogenesis in *Heliconia stricta*. *HSI Bull*14:14.
- Van Wordragen M, Dons H.** 1992. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of recalcitrant crops. *Plant Mol Biol Reporter* 10(1):12-36.
- Winter P, Kahl G.** 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World J Microbiol Biotechnol* 11:438-448.
- Wordragen MF, Dons JM.** 1992. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of recalcitrant crops. *Plant Mol Biol Reporter* 10(1):12-36.
- Yan B, Srinivasa R, Collins G, Dinkins R.** 2000. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean using immature zygotic cotyledon explants. *Plant Cell Reports* 19:1.090-1.097.
- Zuker A, Tzfira Y, Vainstein A.** 1998. Genetic engineering for cut flower improvement. *Biotechnol Adv* 16(1):33-79.