

**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL**



**APROXIMACIONES BIOTECNOLÓGICAS  
TENDENTES A LA MEJORA DEL CÁÑAMO  
(*Cannabis sativa* L.): OBTENCIÓN Y CULTIVO DE  
RAÍCES TRANSFORMADAS, TRANSFORMACIÓN  
GENÉTICA Y REGENERACIÓN *IN VITRO*.**

**TESIS DOCTORAL  
IMANE WAHBY  
2007**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL**

---



**APROXIMACIONES BIOTECNOLÓGICAS TENDENTES A LA  
MEJORA DEL CÁÑAMO (*Cannabis sativa* L.): OBTENCIÓN Y  
CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS,  
TRANSFORMACIÓN GENÉTICA Y  
REGENERACIÓN *IN VITRO*.**

**Tesis doctoral**

presentada por

**IMANE WAHBY**

**DIRECTOR:**

**Dr. FRANCISCO LIGERO LIGERO**

---

**Julio de 2007.**



**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL  
FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**APROXIMACIONES BIOTECNOLÓGICAS TENDENTES A LA  
MEJORA DEL CÁÑAMO (*Cannabis sativa* L.): OBTENCIÓN Y  
CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS,  
TRANSFORMACIÓN GENÉTICA Y  
REGENERACIÓN *IN VITRO*.**

**Memoria presentada para aspirar al Grado  
de Doctora por la Licenciada en Biología  
Doña Imane Wahby**

**Vº Bº  
El Director:**

**Fdo: Dr. Francisco Ligero Ligero  
Profesor Titular de Fisiología Vegetal.  
Facultad de Farmacia.  
Universidad de Granada.**

**El presente trabajo ha sido financiado por el proyecto  
A42/00 (Consejería de Presidencia, Junta de  
Andalucía) y por el Plan Andaluz de  
Investigación Grupo AGR 205**

*A mis queridos padres  
A mis adorables hermanos*

*A Mohamed, por todos los momentos  
que estas tesis nos ha privada  
de compartir*

# **AGRADECIMIENTOS**



*...he aprendido que un resultado negativo es siempre un resultado...he aprendido a ser paciente...muy paciente...a insistir, a saber trabajar y esperar...gracias "tesis".*

*...en estos días que estoy ultimando los últimos detalles no puedo creer que por fin haya terminado. Hoy he llegado a un punto final de mi vida, pero también a un punto y seguido (o eso quiero pensar). He cerrado una puerta que llevaba abierta unos cuantos años, pero abro una nueva con mucha ilusión...esperanza...y ganas de experimentar el mañana.*

*...en este momento, probablemente, uno de los más difíciles que se plantean a la hora de escribir una tesis doctoral, tengo que redactar los agradecimientos. Pero es algo que hago con gusto, porque no se puede obviar que una tesis doctoral es el reflejo de una parte del trabajo que se ha llevado a cabo durante una serie de años en un grupo de investigación, pero este trabajo no es el fruto del esfuerzo de una única persona sino que muchas otras han influido de una forma más o menos directa. Justo es que a la hora de plasmar lo realizado por escrito se tenga presente a todos aquellos que nos ayudaron en el camino.*

*...en primer lugar quiero dar las gracias al Dr. Francisco Liger Liger, director de esta tesis, que ha contribuido de forma fundamental a hacer realidad lo que durante años ha sido un trabajo inacabado. Me considero afortunada por haber tenido un jefe como él. Le agradezco por acogerme y confiar en mí desde mi llegada al Departamento y por su permanente disponibilidad y cualidades personales y profesionales.*

*...un recuerdo especial para el Dr. Juan Manuel Caba barrientos que aun estando continuamente ocupado en mil cosas siempre encontraba tiempo para ayudarme y orientarme en todo momento de la tesis. He aprendido mucho con él y ha estado presente siempre que lo necesitaba. Le agradezco su constancia y su paciencia en la lectura de los interminables borradores, gracias Juanma.*

*...Al Departamento de química analítica de la facultad de Ciencias por haberme ayudado en una parte importante del trabajo realizado. Especialmente al Dr. Antonio Segura carretero y a David Arráz Román por su inestimable ayuda en la puesta a punto de la metodología de separación de alcaloides, gracias David por todas las horas que me has dedicado, y por los valiosos conocimientos que me has transmitido.*

*...Al profesor D. Rafael Salto González y a Natalia sevillano del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, por su inestimable ayuda con los análisis de PCR y la electroforesis en geles de agarosa.*

*...Al profesor D. Antonio Plá Martínez, del Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Psiquiatría, Facultad de Medicina, por su eficaz colaboración y ayuda poniendo a nuestra disposición su laboratorio para determinación de cannabinoides.*

*...a Adelina García Martín secretaria del Departamento de Fisiología Vegetal, por escucharme siempre amistosamente y compartir conmigo mis buenos y malos momentos, eres una persona maravillosa de verdad. A la profesora Inmaculada López Cantarero que ha sido para mí más que amiga, no olvidaré nuestras divertidas charlas y nuestras comidas juntas en el laboratorio. También le doy las gracias a la profesora Isabel María Sánchez Calle que siempre estaba allí dispuesta a ayudarme, por su amabilidad y simpatía conmigo, por su interés en que esto acabara lo antes posible. Una de las recompensas de esta tesis es haber podido conocer a personas tan especiales como vosotras. Al Dr. Luís Recalde Manrique que cada vez que me veía me preguntaba: “¿que, como va todo?”, y finalmente a Pedro por estar siempre dispuesto a ayudarme. Todos me habéis hecho sentir como en casa. Gracias.*

*...a mis padres. Todo se lo debo a ellos. Os agradezco los esfuerzos que habéis tenido que hacer para que ésta tesis se convierta en realidad. Primero habéis insistido tanto en que siguiera con los estudios de Doctorado, y luego habéis conseguido con vuestro apoyo continuo que llegara a culminar este trabajo incluso cuando a veces he tenido ganas de tirarlo todo por la borda. Ahora me doy cuenta de lo importante que es llegar hasta aquí. Gracias por sentirnos tan orgullosos de mí. Os quiero muchísimo.*

*... a mis hermanos, Anass, Yassine y Zineb, por ser mis mejores amigos, por la relación tan bonita que tenemos, sois muy especiales para mí, gracias por apoyarme y animarme cuando los experimentos me salían fatal. Veis, todo se termina, así queeee; ánimo! que todo vuestro esfuerzo y las eternas horas que echáis en el laboratorio se acabaran dando a luz a esta bonita criatura...”la tesis”.*

*...a la memoria de mis abuelos, especialmente a la última que me quedaba...y a quien quería muchísimo...te hecho de menos.*

*...a mi amiga Fátima y a mi prima Aitidal y al resto de la familia que han escuchado hablar de la “TESIS”, han visto años de lucha y de espera, y que por fin ven culminado este largo camino.*

*...no quiero olvidar los amigos que conocí en Granada y que han sido (algunos lo siguen siendo) para mi una importante fuente de apoyo y alegría, me hicieron la vida más alegre (espero que yo también a ellos!!) y siempre han estado allí cuando los necesitaba, a Jawad, Samir, Nawal, Sayf-Eddin (te deseo mucha suerte), Mari,*

*Isabel, Ikram, Eduardo, Lourdes (mi vecina), Ángela, Nuria (la rebelde), Ihsan, Marina y Antonio (a ver si aprendes que la mejor terapia es la risa!!!!).*

*...soy inmensamente agradecida a ti...Mohamed...por animarme, apoyarme y no dejarme tirar la toalla en los momentos difíciles...no hay palabras que agradezcan todo tu esfuerzo...jamás has limitado mi formación aunque hemos tenido que estar separados durante años. Sabías que era bueno para mí y siempre he contado con tu apoyo. Gracias por iluminar mi camino, por el amor y la paciencia, por estar allí y aguantarme cuando las cosas me salían mal...este trabajo es mérito de los dos. Tengo mucha suerte al tenerte a mi lado...*

*Gracias a todos por allanar mi camino*

## **ABREVIATURAS**

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ACBC	Ácido cannabicroménico
ACBD	Ácido cannabidiólico
ACBG	Ácido cannabigerólico
AIA	Ácido indol-3-acético
ANA	Ácido naftalenacético
aux	Gen para la formación de auxinas
A $\Delta^9$ -THC	Ácido $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinólico
B5	Medio de cultivo Gamborg
B5 ½	Medio de cultivo Gamborg con la concentración de sales reducida a la mitad
BA	6-bencilaminopurina
CBC	Cannabicromeno
CBD	Cannabidiol
CBE	Cannabielsoina
CBG	Cannabiegerol
CBL	Cannabiciclol
CBN	Cannabinol

CE-ESI-MS	Electroforesis capilar-Interfase de ionización por electroespray–Espectrometría de masa
DNA	Ácido desoxyribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EE	Error estándar
EN	Entrenado
FM	Filtrado de medio
GC-NPD	Cromatografía de gases con detector de nitrógeno/fósforo
gus	Gen de la $\beta$ -glucuronidasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
iaaH (o tms2)	Gen de la indol-3-acetamida hidrolasa
iaaM (o tms1)	Gen de la triptófano monoxigenasa
Ic	Índice de crecimiento
ipt (o tmr)	Gen de la isopentenil transferasa
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
M	Marcador de peso molecular
MB	Medio de cultivo con sales del medio MS y vitaminas del B5
MDS	Mínima diferencia significativa
MeJa	Metiljasmonato
MHR	Memoria hairy root
MI	Medio de inducción
MME-ACBG	Éter monometílico del ácido cannabigerólico

MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog
MS ½	Medio de cultivo Murashige y Skoog con la concentración de sales reducida a la mitad
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido reducido
NNEDA	Solución de N-naftilendiamina
nptII	Gen de la neomicina fisfotransferasa
NR	Nitrato reductasa
ORF	Regiones codificadoras (open reading frames)
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volumen
pb	Pares de bases
PCIB	Ácido p-clorofenoxiisobutírico
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PDA	Medio para cultivo Patata Dextrosa Agar
PF	Peso fresco
pRi	Plásmido inductor de raíces
PS	Peso seco
pTi	Plásmido inductor de tumores
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
rol	Genes inductores de raíces
rpm	Revoluciones por minuto
TAE	Tampón Tris-ácido acético-EDTA
T-DNA	ADN transferido

TDZ	N-fenil-N'-1,2,3-tiadizol-5ylurea (Tidiazurón)
THC	Tetrahidrocannabinol
TLC	Cromatografía de capa fina
TNE	Tampón Tris-cloruro sódico-EDTA
v/v	Volumen/volumen
V <sub>c</sub>	Velocidad de crecimiento
VE	Velocidad de crecimiento del entrenado
vir	Genes de virulencia
x-Glu	Sustrato cromogénico (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucorónido)



# ÍNDICE

---

Capítulo.1. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
I. EL GÉNERO <i>Cannabis</i> .....	3
I.1. Caracterización botánica .....	3
I.2. Domesticación y usos del cáñamo .....	4
I.2.1. Historia de repartición del cultivo .....	4
I.2.2. Productos de la planta.....	6
I.3. Perfiles de metabolitos secundarios .....	7
I.4. Criterios de clasificación de las variedades .....	12
I.5. Situación actual del cultivo del cáñamo.....	15
I.6. Estrategias adoptadas para la mejora del cultivo del cáñamo.....	18
I.6.1. Objetivos específicos de los programas de mejora.....	18
I.6.2. Mejora tradicional .....	19
I.6.3. Métodos bioquímicos .....	20
II- BIOTECNOLOGÍA VEGETAL: APLICACIONES Y PERSPECTIVAS EN LA MEJORA DE LOS CULTIVOS.....	21
II.1. Cultivo <i>in vitro</i> de células, tejidos y órganos vegetales .....	21
II.1.1. Definición y conceptos generales.....	21
II.1.2. Aplicaciones del cultivo <i>in vitro</i> .....	24
II.1.3. Situación del cultivo <i>in vitro</i> del cáñamo.....	25
II.2. Transformación genética mediada por <i>Agrobacterium</i> .....	26
II.2.1. Características generales de la bacteria.....	27
II.2.2. Etapas de la infección.....	31
II.2.3. Iniciación y desarrollo de los tejidos transformados .....	36
II.2.4. Uso de <i>Agrobacterium</i> como vector de genes.....	37
II.2.5. Propiedades de las raíces transformadas .....	38
II.2.6. Aplicaciones del cultivo de raíces transformadas .....	41
II.2.6.1. Producción de metabolitos secundarios de interés.....	41
II.2.6.2. Obtención de plantas transgénicas .....	45
II.2.6.3. Otras aplicaciones de las raíces transformadas .....	47
II.2.7. Aplicación de la transformación en <i>C. sativa</i> .....	48
Capítulo.2. <b>INTERÉS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO</b> .....	49
Capítulo.3. <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	53
I. MATERIAL BIOLÓGICO.....	55
I.1. Material vegetal .....	55
I.2. Microorganismos .....	55

II. MEDIOS DE CULTIVO.....	58
II.1. Medios para plantas.....	58
II.2. Medios para <i>Agrobacterium</i> .....	60
II.3. Medios para <i>Fusarium oxysporum</i> .....	61
III. CULTIVO DE PLANTAS.....	62
III.1. Esterilización y germinación de semillas.....	62
III.2. Cultivo hidropónico de plantas sobre soporte inerte.....	63
III.3. Cultivo <i>in vitro</i> de plántulas.....	63
III.4. Condiciones de la cámara de cultivo.....	64
IV. EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	64
IV.1. Estudio del crecimiento y morfología de las plantas de cáñamo cultivadas <i>in vivo</i> .....	64
IV.2. Estudio de la susceptibilidad de <i>C. sativa</i> a la infección con <i>Agrobacterium rhizogenes</i> y <i>A. tumefaciens</i> .....	67
IV.2.1. Optimización del protocolo para la inoculación y la infección.....	67
IV.2.2. Infectividad de cepas de <i>Agrobacterium</i> inductoras de raíces.....	70
IV.2.3. Influencia del genotipo y fenotipo de cáñamo sobre la respuesta a <i>Agrobacterium rhizogenes</i> y <i>A. tumefaciens</i> .....	71
IV.2.4. Determinaciones realizadas para evaluar la respuesta de <i>C. sativa</i> a la infección con <i>Agrobacterium</i> .....	72
IV.2.5. Realización de cultivos axénicos de raíces y tumores.....	73
IV.2.6. Determinación de la naturaleza transformada de las raíces y tumores.....	74
IV.2.6.1. Crecimiento en medio sin fitohormonas.....	74
IV.2.6.2. Detección y evaluación del gen <i>gusA</i> .....	74
IV.2.6.3. Detección de los genes bacterianos mediante PCR.....	75
IV.3. Cultivo y determinaciones realizadas para las raíces transformadas.....	75
IV.3.1. Determinaciones realizadas en medio sólido.....	76
IV.3.1.1. Cultivo.....	76
IV.3.1.2. Efecto de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento y la morfología de las raíces.....	76
IV.3.1.3. Cinética de crecimiento de las raíces en medio sólido.....	77
IV.3.1.4. Determinación del crecimiento.....	78
IV.3.2. Determinaciones realizadas en medio líquido.....	78
IV.3.2.1. Cultivo.....	79
IV.3.2.2. Efecto de la concentración y fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y la morfología de las raíces.....	79
IV.3.2.3. Cinética de crecimiento de las raíces en medio líquido.....	80
IV.3.2.4. Determinación del crecimiento.....	80
IV.3.2.5. Determinaciones fisiológicas y bioquímicas.....	80
IV.4. Análisis de los metabolitos secundarios en las raíces transformadas.....	82
IV.4.1. Cultivo de raíces para obtención de biomasa.....	82
IV.4.2. Aplicación de elicitores para incrementar la producción de alcaloides.....	83
IV.4.2.1. Preparación de los elicitores.....	83
IV.4.2.2. Adición de los elicitores.....	84

IV.5. Estudio de la capacidad de regeneración a partir de tejidos transformados y no transformados de <i>Cannabis</i> .....	85
IV.5.1. Regeneración a partir de raíces transformadas .....	85
IV.4.2. Efecto del antiauxinas sobre la organogénesis .....	86
IV.5.3. Regeneración a partir de explantos de hipocotilo transformados con <i>A. tumefaciens</i> .....	88
IV.5.3.1. Cocultivo e inducción de calogénesis.....	88
IV.5.3.2. Determinación de la naturaleza transformada de los callos .....	91
IV.5.4. Regeneración a partir de tejidos no transformado .....	92
IV.5.4.1. Inducción de calogénesis y organogénesis .....	92
IV.5.4.2. Elongación y enraizamiento de los tallos regenerados .....	94
IV.5.4.3. Aclimatación .....	94
V. METODOLOGÍA EMPLEADA.....	94
V.1. Determinación de la actividad <i>GUS</i> .....	94
V.2. Reacción en cadena de polimerasa.....	95
V.2.1. Extracción del ADN genómico .....	95
V.2.2. Cuantificación del ADN.....	96
V.2.3. Amplificación por PCR.....	96
V.3. Medida de etileno mediante cromatografía de gases .....	97
V.4. Medida de la actividad nitrato reductasa.....	98
V.4.1. Extracción .....	99
V.4.2. Medida de la actividad .....	99
V.4.3. Valoración del nitrito formado.....	100
V.5. Determinación de cannabinoides mediante HPLC y GC/NPD .....	101
V.5.1. Estándares y soluciones de trabajo.....	101
V.5.2. Extracción .....	101
V.5.3. Análisis .....	101
V.6. Análisis de alcaloides mediante electroforesis capilar .....	102
V.6.1. Extracción .....	102
V.6.2. Separación por electroforesis capilar .....	104
V.6.2.1. Instrumentación .....	104
V.6.2.2. Estándares y soluciones de trabajo.....	105
V.6.2.3. Optimización de las condiciones experimentales .....	105
V.6.2.4. Análisis de alcaloides.....	106
Capítulo.4. RESULTADOS.....	107
I. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO <i>IN VIVO</i> DEL CÁÑAMO.....	109
I.1. Crecimiento y morfología de las plantas .....	109
I.2. Estudio de algunos parámetros de la cinética de desarrollo de la planta.....	112
II. ESTUDIO DE LA RESPUESTA DEL CÁÑAMO A LA INOCULACIÓN CON <i>Agrobacterium</i> .....	119
II.1. Optimización de las condiciones experimentales.....	119
II.2. Respuesta del cáñamo a diferentes cepas de <i>A. rhizogenes</i> .....	125
II.3. Variabilidad genotípica del cáñamo a la infección por <i>Agrobacterium</i> .....	128
II.4. Comparación de la respuesta de <i>C. sativa</i> y <i>N. tabacum</i> .....	134

II.5. Obtención de cultivos estabilizados de raíces .....	135
II.6. Análisis de la transformación.....	136
<b>III. CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS RAÍCES</b>	
TRANSFORMADAS DE <i>C. sativa</i> .....	139
III.1. Características de las raíces transformadas .....	139
III.2. Influencia de algunos factores del medio de cultivo sobre el crecimiento de las raíces transformadas .....	141
III.2.1. Efecto de la concentración de sales .....	141
III.2.2. Efecto de la concentración de sacarosa.....	144
III.2.3. Efecto del tipo de medio .....	146
III.2.4. Efecto de la concentración y fuente de nitrógeno sobre la morfología y el crecimiento de las raíces .....	151
III.3. Estudios fisiológicos a nivel de las raíces transgénicas .....	153
III.3.1. Producción de etileno .....	153
III.3.2. Actividad nitrato reductasa NR.....	155
III.4. Niveles de metabolitos secundarios en las raíces transformadas de cáñamo .....	156
III.4.1. Cannabinoides.....	156
III.4.2. Alcaloides .....	156
III.4.2.1. Optimización del método analítico .....	157
III.4.2.2. Niveles de colina, atropina y muscarina en las raíces transgénicas.....	167
III.4.2.3. Efecto de los elicitores sobre la producción de alcaloides .....	170
III.4.2.4. Relación de la producción de etileno y actividad NR con el contenido de alcaloides en las raíces transformadas .....	173
<b>IV. ESTUDIO DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA, MEDIADA POR <i>Agrobacterium</i> Y REGENERACIÓN EN CÁÑAMO</b> .....	
IV.1. Calogénesis y regeneración en raíces transformadas .....	174
IV.2. Efecto del antiauxinas sobre la expresión de la rizogénesis en los callos inducidos a partir de raíces transgénicas.....	182
IV.3. Obtención de callos transformados con <i>A. tumefaciens</i> .....	182
IV.4. Calogénesis y regeneración de plantas <i>in vitro</i> a partir de tejidos no transformados .....	189
Capítulo.5. <b>DISCUSIÓN</b> .....	201
Capítulo.6. <b>CONCLUSIONES</b> .....	225
Capítulo.7. <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	229

**Capítulo 1**

# **INTRODUCCIÓN**

## **I. EL GÉNERO *Cannabis***

### **I.1. Caracterización botánica**

*Cannabis sativa* L. (Linné, 1753), llamado comúnmente cáñamo, es una herbácea anual con tallo erguido no trepador, cuyo tamaño oscila entre 50 cm y 6 m de altura a madurez (Clarke, 1981). Las hojas son palmeadas y constituidas por foliolos dentados en forma de abanico, con un limbo dividido casi hasta el mismo pecíolo, el primer par de hoja es unifoliado, el segundo trifoliado y el número va subiendo en las hojas posteriores hasta llegar a 11 foliolos en algunos casos. Al principio del estadio vegetativo, la planta crece lentamente, formando entre 5 o 6 pares de hojas verdaderas opuestas y 4 a 6 entrenudos cortos. A finales de este estadio, la planta, que posee entre 7 y 12 pares de hojas, se prepara para florecer notándose una importante aceleración del crecimiento, aparición de filotaxia alterna, y estiramiento del tallo (Clarke, 1997).

Se trata de una planta dioica con flores unisexuales estaminadas o pistiladas desarrolladas sobre individuos diferentes. En comparación con el macho, la hembra es generalmente más frondosa, menos alta, florece más tarde y su ciclo vital se extiende hasta madurez de las semillas. En cambio, el macho se marchita una vez liberado el polen. Las flores masculinas se disponen en panículas terminales con un periantio constituido por cinco piezas y un androceo de cinco estambres mientras que las flores femeninas aparecen en grupos de 2 a 6 en las axilas de brácteas reunidas en glomérulos sentados y presentan un periantio integrado por cinco tépalos libres y un ovario súpero y unilocular con dos estigmas. En cuanto se refiere a la floración, las flores masculinas aparecen una semana antes que las femeninas formándose, tras la fecundación, el fruto que es un aquenio que contiene en su interior una semilla que

alcanza la madurez tres a cuatro semanas después de la fecundación (Clarke, 1997; Mediavilla *et al.*, 1998).



**Figura 1.** Plantas de cáñamo de la accesión CAN0221 cultivadas en el campo (Norte de Marruecos). Las fotos se realizaron a finales de Junio teniendo las plantas una edad aproximativa de 2 meses.

A pesar de ser dioico, existen cultivares de cáñamo monoicos creados para la producción de fibra (De Meijer y Van Soest, 1992). Estos cultivares suelen componerse del 50 al 70% de plantas monoicas y del 30 al 50% de plantas hembra, con sólo un número escaso de plantas masculinas (Forapani *et al.*, 2001). En cambio, las variedades de droga son dioicas y suelen componerse de una proporción equitativa de plantas pistiladas y estaminadas (Mandolino *et al.*, 2002).

## **I.2. Domesticación y usos del cáñamo**

### **I.2.1. Historia de repartición del cultivo**

El legendario y polémico *Cannabis* es probablemente originario de Asia central (Schultes, 1970). Sus múltiples usos, habiendo acompañado la historia de la



humanidad, hacen que el entendimiento de la evolución de sus diferentes “tipos” implica una consideración histórica de los usos de esta planta.

Indudablemente, el cáñamo fue cultivado desde la antigüedad y era usado tanto en rituales sagrados como en la vida cotidiana. Su uso para la fabricación de ropa, que data de más de 6000 años (Small *et al.*, 1975), es el mejor ejemplo de ello. La ausencia de referencias sobre el *Cannabis* en los textos hieroglíficos, nos conduce a pensar que la planta fue desconocida por los antiguos egipcios y hebreos (Small *et al.*, 1975). La primera referencia escrita parece ser un trabajo chino que data del año 2737 A.C. donde se mencionaron propiedades farmacológicas del *Cannabis*. Curiosamente, los griegos y romanos utilizaban las fibras de cáñamo sin conocer, aparentemente, las propiedades psicotrópicas de la planta. En cambio, en la India por ejemplo, las propiedades alucinógenas del *Cannabis* fueron bien conocidas y explotadas antes de Cristo según relatos religiosos antiguos (Small *et al.*, 1975).

Durante el primer milenio la Era Cristiana, el uso del *Cannabis* como droga llegó a varios círculos del mediterráneo y a África. En cambio, en Europa la planta siguió conociéndose por su fibra hasta el siglo XVI, a partir del cual, y con la Era de las exploraciones, el uso del *Cannabis* como droga se introdujo en este continente. No obstante, esta última aplicación no tuvo mucha fama y la planta siguió cultivándose en Europa básicamente para la obtención de fibra (Small *et al.*, 1975). Desde allí, el *Cannabis* fue llevado entonces a Chile en 1545 (Dewey, 1914; Kalant, 1968), y tras casi un centenar (año 1632) se introdujo en el norte de América (Small *et al.*, 1975). De este modo, la importancia económica que tuvo el cultivo del cáñamo junto a su uso como droga favorecieron su expansión por el planeta, por lo que nos encontramos hoy con una inmensa variedad de formas domesticadas junto con la variedad silvestre encontrada en muchas regiones (Small *et al.*, 1975).

### **I.2.2. Productos de la planta**

El cáñamo se conoce principalmente por tres productos con relevancia económica variable según la variedad usada y la región donde se cultiva:

#### ***Fibra***

Según lo que se conoce, el cáñamo es la planta más antigua que se cultivó para la obtención de fibra (Small *et al.*, 1975). La fibra obtenida a partir del periciclo del tallo de la planta, siendo de gran resistencia y durabilidad, constituye el producto de mayor importancia agronómica de este cultivo. Las fibras del cáñamo pueden superar los 4 metros de largo, principalmente en los pies masculinos, y muestran una alta calidad siendo compuestas de hasta más del 70% de celulosa, lo que les permite ser una excelente materia prima para la industria textil así como para la producción de pulpa para papel (De Meijer, 1994; De Meijer y Keizer, 1994).

#### ***Semillas***

El fruto del cáñamo es un aquenio denominado comúnmente semilla que se destina mayoritariamente a la alimentación de aves y fabricación de jabones, barnices, etc. y minoritariamente al consumo humano en forma de aceite o semillas. Por otra parte, estas semillas representan una importante fuente de aceite de alta calidad (Jonson, 1999) con un contenido de aceite que alcanza el 30% en la mayoría de las variedades de cáñamo y hasta el 40% en la variedad “Oleífera” (Small *et al.*, 1975).

#### ***Resina***

La resina, producto polémico del cáñamo, se secreta por las glándulas epidérmicas en forma de exudado resinoso, pudiendo alcanzar hasta un 20% del peso de la planta (Fujita *et al.*, 1967; Small *et al.*, 1975). Es característica de la parte aérea, particularmente la superficie de las hojas y brácteas, y se le atribuye un papel de adaptación y aclimatación que consiste en proteger las hojas y brácteas que envuelven a las semillas en desarrollo, frente a la alta temperatura y a la sequedad (Schultes, 1970; Small *et al.*, 1975). A parte del uso ilícito de la resina obtenida a

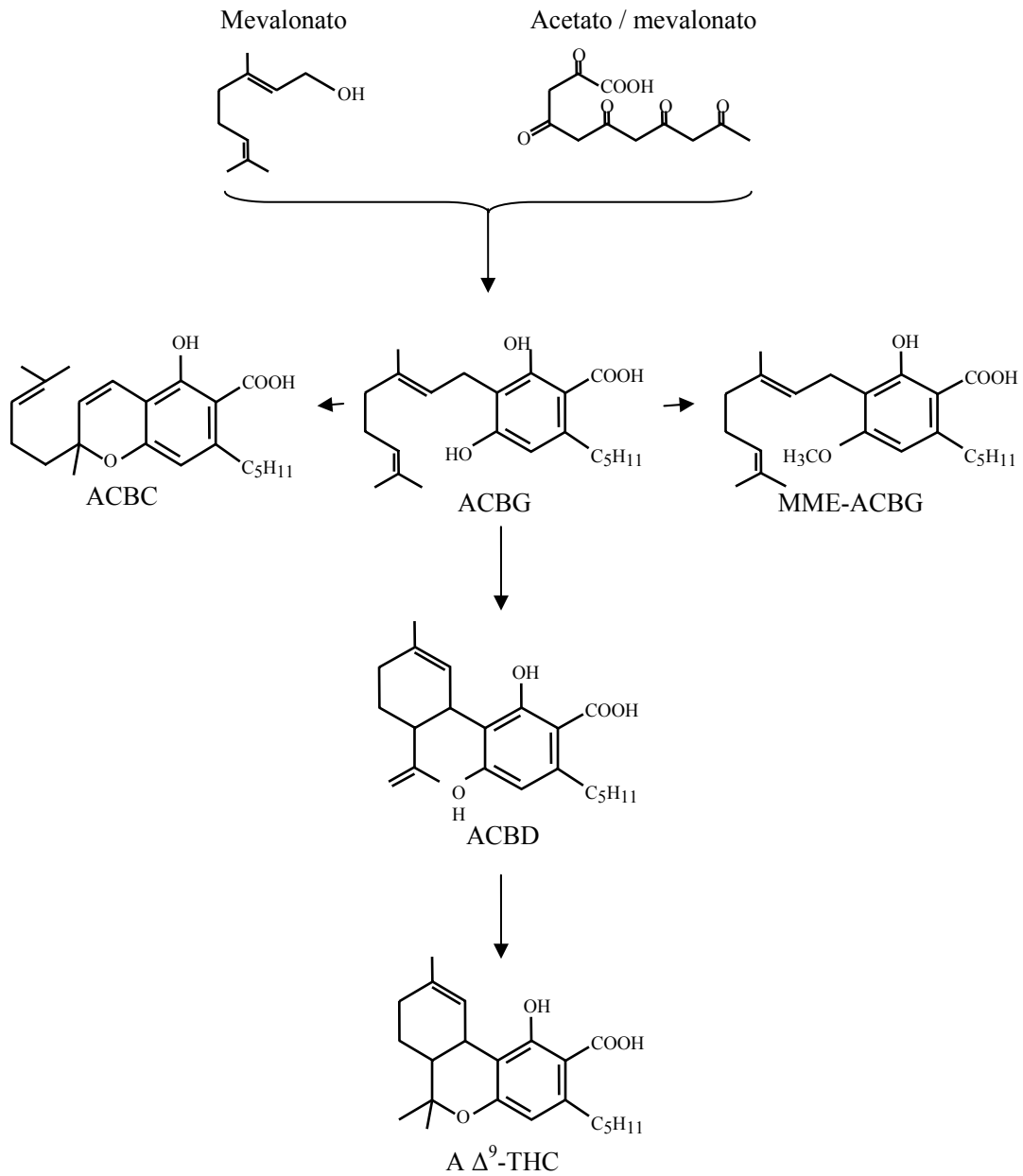
partir de las variedades psicotrópicas, ésta representa una importante fuente de metabolitos secundarios de interés farmacéutico principalmente los cannabinoides (Fairbain, 1972; Hammond y Mahlberg, 1973; Malingre *et al.*, 1975; Lanyon *et al.*, 1981).

### **I.3. Perfiles de metabolitos secundarios**

*Cannabis* representa una importante fuente de metabolitos secundarios (Pate, 1994) con más de 400 compuestos encontrados en las diferentes partes de la planta (Turner *et al.*, 1980). Las aplicaciones de estos metabolitos irían desde las propiedades farmacéuticas que posee la mayoría de ellos, hasta su uso en los estudios quimiotaxonómicos. Así, junto con otros grupos, se encuentra el grupo de los cannabinoides y el de los compuestos nitrogenados ambos considerados en el presente trabajo.

#### ***Cannabinoides***

Los cannabinoides son terpenofenoles definidos como un grupo de compuestos de 21 carbonos característicos del género *Cannabis* (Mechoulam y Gaoni, 1967). Se conocen más 60 cannabinoides entre los cuales figura el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC o THC), cannabinol (CBN) y cannabidiol (CBD) siendo los principales, junto con otros que aparecen en cantidades menores y variables según la variedad de *Cannabis* valorada, tal y como el cannabicromeno (CBC), cannabiciolol (CBL), cannabigerol (CBG), cannabielsoina (CBE), etcétera (Turner *et al.*, 1980). El mayor responsable de la actividad psicotrópica de la planta es el  $\Delta^9$ -THC que existe con abundancia en las variedades de droga (Small *et al.*, 1975; Turner *et al.*, 1980), junto con el CBN que posee una ligera actividad psicoactiva estimada a ser la décima parte de la actividad del  $\Delta^9$ -THC (González *et al.*, 2002). Por lo visto, los demás cannabinoides como el CBD (importante constituyente del cáñamo de fibra) están desprovistos de todo efecto psicotrópico (Turner *et al.*, 1980). La Figura 2 recoge la cadena de biosíntesis de algunos de los cannabinoides principales.



**Figura 2.** Ruta biosintética de los cannabinoides principales propuesta por Shoyama *et al.* (1970). ACBC: ácido cannabicitrónico, ACBG: ácido cannabigerónico, MME-ACBG: éter monometílico del ácido cannabigerónico, ACBD: ácido cannabidiólico, A  $\Delta^9$ -THC: ácido  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinólico.

Generalmente los cannabinoides se encuentran en la planta en forma de ácidos carboxílicos, probablemente no psicomiméticos (Small *et al.*, 1975), cuya descarboxilación (forma activa) ocurre durante el almacenamiento (Masoud y Doorenbos, 1973; Turner *et al.*, 1973), con el calentamiento (Kimura y Okamoto, 1970; De Zeeuw *et al.*, 1972) o en condiciones alcalinas (Grlic y Andrec 1961; Masoud y Doorenbos, 1973). Varias teorías han sido elaboradas sobre el papel biológico de los cannabinoides en la planta, siendo la mejor apoyada su actividad antibiótica (Krejci, 1970) y su contribución a la tolerancia a la sequía y a las altas temperaturas (Schultes, 1970). Así pues, se admite generalmente que en zonas secas y calientes, aumenta la densidad de las glándulas epidérmicas donde ocurre la síntesis de cannabinoides. A este respecto, Murari *et al.* (1983) estimaron un alto contenido de cannabinoides en las variedades que crecen en clima continental en comparación con las cultivadas en clima marítimo.

### ***Compuestos nitrogenados***

Representan el grupo de metabolitos llamados igualmente alcaloides que son compuestos básicos, nitrogenados, estando en la mayoría de los casos el nitrógeno formando parte de un heterociclo y en algunas ocasiones formando parte de una cadena abierta. La mayor parte de los alcaloides conocidos son de origen vegetal y su importancia reside en que incluyen principios activos dotados de actividades marcadas y/o de toxicidad.

En el cáñamo, y como lo indican los trabajos publicados por varios investigadores (Dragendorff, 1876; Preobraschensy, 1876; Siebold y Bradbury, 1881; Hay, 1883 y Kennedy, 1886), el estudio de los alcaloides empezó mucho antes que el de los cannabinoides. No obstante, estos, al ser los compuestos característicos del género *Cannabis* atrajeron la mayoría de la atención y esfuerzos científicos, lo que podría justificar el limitado número de trabajos realizados sobre los alcaloides en esta planta. Hoy en día se conocen en el género *Cannabis* veinte compuestos nitrogenados distribuidos, según el tipo de metabolito, en las diferentes partes de la planta y dividiéndose en cuatro grupos principales: bases cuaternarias, amidas,

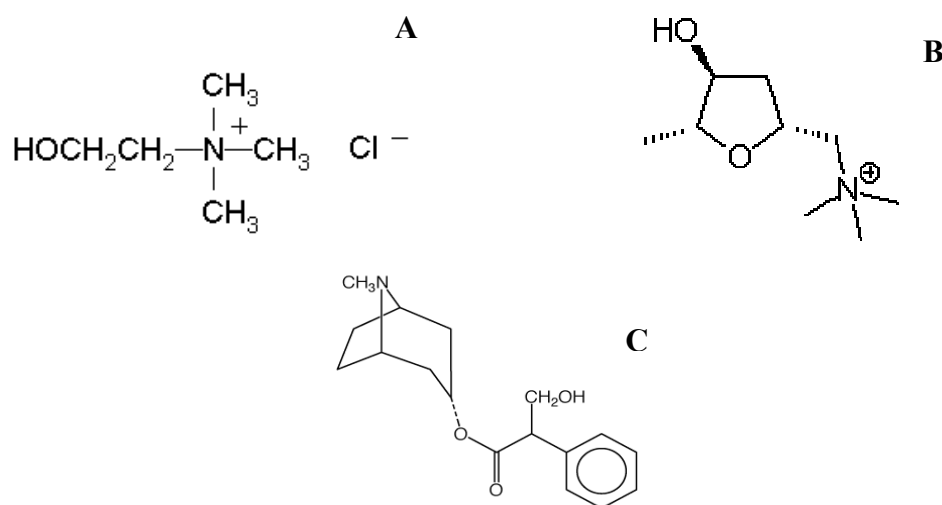
aminas y alcaloides derivados de espermidina (Turner *et al.*, 1980). Nuestro interés se ha centrado, por una parte, en la colina (Jahns, 1887) y la muscarina (Kwasniewski, 1954), encajados en el grupo de las bases cuaternarias; y por otra en la atropina que, pese a ser un alcaloide tropánico y no perteneciente a los grupos principales previamente mencionado, podría estar presente en el género *Cannabis* (Gill *et al.*, 1970).

**Colina**: (Figura 3A) es una base cuaternaria que pertenece al grupo de las betaínas y que está presente en todas las plantas por estar implicada, en forma de fosfatidilcolina, en la formación de las membranas celulares (Rhores y Hanson, 1993). Sin embargo, varias especies vegetales como la espinaca *Spinacia oleracea*, tabaco *Nicotiana tabacum*, zanahoria *Daucus carota* y soja *Glicina maxima* se consideran productoras por tener niveles considerables de este metabolito (Bligny *et al.*, 1989; Mudd y Datko, 1989; Weretilnyk *et al.*, 1995; Nuccio *et al.*, 1998) el cual posee una función regulatoria del sistema nervioso periférico y central como precursor principal de la acetilcolina (Zhang *et al.*, 2004).

**Muscarina**: (Figura 3B) es también una base cuaternaria, con alta toxicidad, encontrada en algunas especies de setas de los géneros *Clitocybe* e *Inocybe* (Bollinger y Eugster, 1971; Nitta *et al.*, 1971; Floersheim, 1987), y aunque la muscarina le debe su nombre a *Amanita muscaria*, a partir de la cual se aisló inicialmente, se ha demostrado que esta especie posee únicamente cantidades tracas de este alcaloide (Wieland, 1968). Algunos estudios sugirieron también la existencia de muscarina en plantas como *Trophis racemosa* (Gossell-Williams *et al.*, 1997; Wynter-Adams *et al.*, 1999) y *Thalictrum dasycarpum* (Hogg *et al.*, 1961). El efecto biológico de la muscarina es parecido al de la acetilcolina teniendo actividades anticolinérgicas y parasimpatomiméticas debidos a la profunda activación del sistema nervioso periférico (Waser, 1961; Wilkinson, 1961). Lo que hace que tenga importantes aplicaciones farmacológicas (Mooney *et al.*, 1995; Calabresi *et al.*, 1998). A pesar de los estudios realizados respecto de la síntesis química de la muscarina, se sigue dependiendo para su obtención de las fuentes naturales debido a

la complejidad de las etapas de síntesis química y al bajo rendimiento conseguido (Mudryi *et al.*, 1970; Kang *et al.*, 2000).

***Atropina***: (Figura 3C) pertenece al grupo de los alcaloides tropánicos y se encuentra principalmente en algunos géneros de *Solanáceas* como *Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, *Hyoscyamus* y *Scopolia* (Kitamura *et al.*, 2004; Dimitrov *et al.*, 2005) aunque se encuentra a mayor concentración en *Atropa belladonna* (Dhar y Bhat, 1982; Ylinen *et al.*, 1986). Un estudio reciente relató la detección de atropina en la seta *Amanita muscaria* (TsujiKawa *et al.*, 2006) pero las concentraciones encontradas no fueron cuantificadas. La atropina posee una acción antagonista de la acetilcolina y es probablemente la más interesante de los tres compuestos mencionados debido a sus propiedades parasimpatorlíticas, anticolinérgicas, espasmolíticas y antieméticas (Eeva *et al.*, 1998; Ye *et al.*, 2001). Lo que hace que tenga importantes aplicaciones farmacológicas.



**Figura 3.** Estructuras químicas de colina (A), muscarina (B) y atropina (C).

Varios trabajos habían sugerido que la actividad del *Cannabis* no se debe únicamente a los cannabinoides y que la planta contiene otros compuestos potencialmente activos (Yamamoto *et al.*, 1988; Yamamoto *et al.*, 1991; Williamson

y Evans, 2000). En este aspecto se puede notar que la intoxicación con especies ricas en atropina como es el caso de *Datura stramonium* o setas con alto contenido en muscarina provoca síntomas parecidos a los notados tras la ingestión del *Cannabis* (Stark *et al.*, 2003). Estos síntomas suelen ser alucinaciones, taquicardia, modificación de las secreciones salivarias, sudorales y lacrimales junto con dilatación de la pupila que es un efecto particularmente inducido por la atropina (Guharoy y Barajas, 1991; Roblot *et al.*, 1995; Desachy *et al.*, 1997). Este último efecto podría explicar la mejora de la visión nocturna observada tras el consumo del *Cannabis* (Fraunfelder y Meyer, 1989; West, 1991).

La presencia de sustancias con las actividades farmacológicas de la atropina y muscarina en extractos de hojas y flores de *Cannabis* ha sido previamente mencionada, sin haberse publicado datos relativos a las concentraciones encontradas (Gill *et al.*, 1970). En cuanto a la colina, su presencia ha sido demostrada por Veliky y Genest (1972) y Mole y Turner (1973) mediante cromatografía en capa fina (TLC), estando presente en las raíces y callos procedentes de las mismas en cantidades ocho veces superiores a las encontradas en las hojas de la planta. No obstante, el limitado poder de resolución de la técnica de separación usada fue probablemente la causa de las bajas concentraciones encontradas. Sin duda el uso de técnicas de mayor poder de resolución mejorará la detección de estos, y otros compuestos, en diversos tejidos y variedades de *Cannabis*.

#### **I.4. Criterios de clasificación de las variedades**

##### ***Clasificación biosistemática***

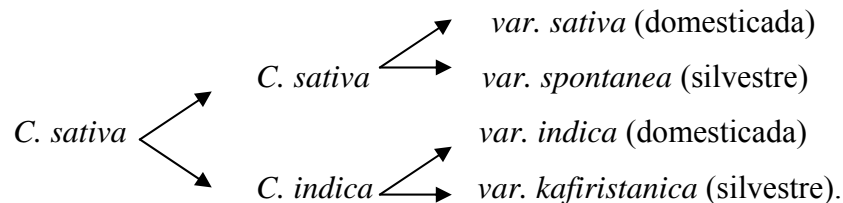
*Cannabis* pertenece al orden de los *Urticales* y a la familia de las *Cannabaceae* o *Cannabinaceae* que incluye sólo dos géneros; *Humulus*, llamado comúnmente lúpulo, y *Cannabis* (Schultes, 1970; Quimby, 1974). No existe un acuerdo total sobre la taxonomía infragenérica del género *Cannabis*. Así, basándose sobre criterios morfológicos como la altura de las plantas, grado de ramificación y



morfología de los aquenios, Schultes *et al.* (1970) hablaron de tres especies diferentes dentro del género:

- C. sativa* (Linné, 1753)
- C. indica* (Lamarck, 1785)
- C. ruderalis* (Janischevsky, 1924).

Previamente, otros autores como Hoffman (1961) hicieron referencia a estos taxones pero únicamente a nivel subespecífico, dentro de la única especie *C. sativa*. Más tarde, Small y Cronquist (1976), dividieron la única especie *C. sativa* en dos subespecies, a su vez subdivididas en dos variedades cada una, usando básicamente la capacidad intoxicante y el estado de domesticación de las variedades. De esta forma, propusieron la siguiente clasificación:



### ***Contenido de cannabinoides***

Varios sistemas de clasificación no-biosistemáticos han sido desarrollados para discriminar entre las variedades de *Cannabis* y sobre todo entre las de droga y las de fibra. De ellos, puede destacarse principalmente la clasificación basada sobre la concentración de los cannabinoides, encontrados mayoritariamente en las hojas e inflorescencias de la planta, y es lo que se conoce bajo el nombre de fenotipos químicos o “quemotipos”. Ésta técnica ha sido la más usada debido a que la concentración de cannabinoides es característica del fenotipo (Small *et al.*, 1975). La primera clasificación conocida es la de Fetterman *et al.* (1971) que usaron la relación  $([THC] + [CBN])/[CBD]$  para discriminar entre los fenotipos “droga” y “fibra”. Más tarde, Small y Beckstead (1973) usaron los niveles de THC y CBD encontrados en las plantas para distinguir entre los quemotipos (Tabla 1). Lo que les permitió definir

la psicoactividad de una variedad con un contenido de THC superior al 0.3%, criterio que sigue usándose hasta la fecha. En cambio, hay otros autores como Fournier y Paris (1979) que optaron por usar niveles más altos de THC para la discriminación entre las variedades de droga y las de fibra (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de fenotipos químicos según Small y Beckstead (1973) y Fournier y Paris (1979).

Fenotipos	[THC]%	[CBD]%	[THC]/[CBD]	Referencias
<i>Droga</i>	> 0.3	< 0.5	-	
<i>Intermedio</i>	> 0.3	> 0.5	-	Small y Beckstead (1973)
<i>No-Droga</i>	< 0.3	> 0.5	-	
<i>Fibra</i>	< 0.5	> 0.5	< 1	Fournier y Paris (1979)
<i>Droga</i>	> 0.5	< 0.5	> 1	

### ***Características morfológicas y tipo de uso***

Varios criterios no relacionados con la concentración de cannabinoides han sido también usados para reconocer visualmente diferencias entre las poblaciones de cáñamo. Asimismo, hay quienes dividieron el cáñamo domesticado en tres grupos bien demarcados morfológica y fisiológicamente como resultado de la domesticación y la adaptación a las condiciones climáticas (Bredemann *et al.* 1957; De Meijer y Van Soest, 1992):

- “Cáñamo de fibra”: plantas altas, poco ramificadas y con una baja producción de semillas.
- “Cáñamo para obtención de semillas”: plantas cortas, de maduración rápida y abundantes semillas.
- “Cáñamo de droga”: plantas cortas, muy ramificadas con hojas de color verde oscuro.

Otros sistemas de clasificación como aquellos basados sobre el contenido de proteínas de las semillas (Lawi-Berger *et al.*, 1982) o los marcadores moleculares RAPD (Faeti *et al.*, 1996; Jagadish *et al.*, 1996; Siniscalco, 2001; Mandolino *et al.*, 2002) han sido también investigados. No obstante, hasta la fecha, no se han concretado criterios fijos para la discriminación entre las variedades de droga y las de fibra a nivel molecular. Por lo que, y pese a que hay quienes consideran que la clasificación basada sobre el contenido de cannabinoides queda insatisfactoria y carece de fiabilidad debido a la posible variabilidad del contenido y tipo de los mismos en la planta según las condiciones de cultivo (Jagadish *et al.*, 1996), esta metodología sigue siendo, hasta la fecha, la técnica adoptada para el reconocimiento oficial de las variedades.

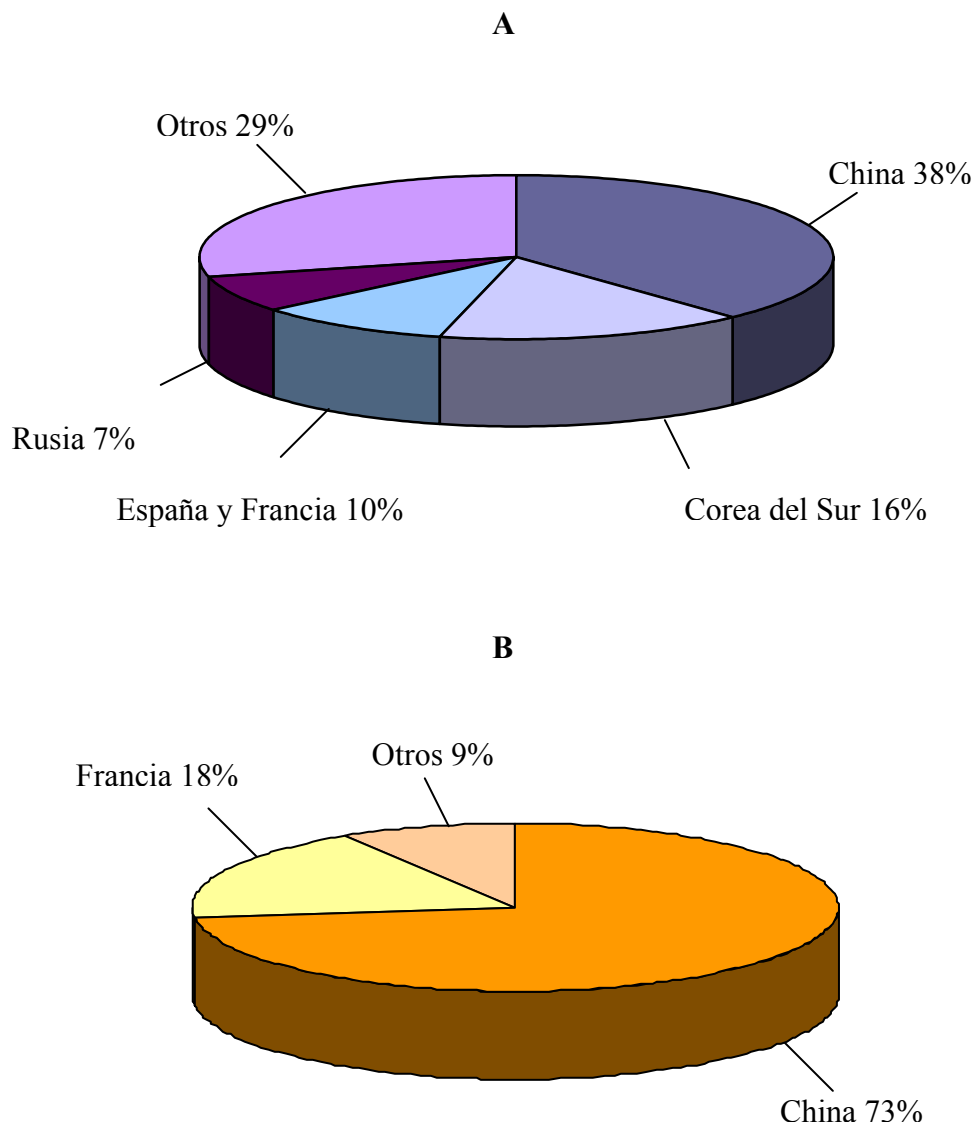
### **I.5. Situación actual del cultivo del cáñamo en el mundo**

No se puede hablar de la situación actual del cultivo del cáñamo en el mundo sin mencionar el año 1925, fecha en la que, a raíz del Convenio Internacional del Opio celebrado en Ginebra (Suiza), se colocó por primera vez el cáñamo en la lista de drogas ya establecidas. El convenio en el cual fueron signatarios 34 estados de los diferentes continentes, España inclusive, no prohibía el empleo del cáñamo sino restringirlo a fines médicos, científicos y terapéuticos. Hasta entonces, Sassman (1938) había registrado la existencia de al menos treinta preparados farmacéuticos con *Cannabis* promocionados por laboratorios conocidos en la época (Observatorio Vasco de drogodependencias, 2002). En 1937, el Congreso Americano aprobó la “Marihuana Tax Act”, con lo que quedó penalizada la posesión, compra-venta, importación y hasta cultivo del cáñamo en Estados Unidos, Colombia, Alaska, Hawai y muchas colonias estadounidenses. Esta penalización se refería a todas las partes de la planta, la resina y los productos derivados. Aun así, cabe señalar que excepto en Estados Unidos donde sigue sin autorizarse el cultivo del cáñamo industrial por la dificultad de diferenciar entre los cultivares, tanto el uso de la fibra como el de las semillas no han sido prohibidos en los convenios, por lo que el cultivo del cáñamo para fibra no ha sido penalizado siempre y cuando las variedades no son

psicoactivas. Es más, este cultivo ha sido desarrollado en muchos países Europeos y contemplado en la política agraria común (PAC).

La superficie total consagrada al cultivo del cáñamo industrial no está bien documentada, sin embargo hemos podido encontrar que, por ejemplo, en España y Francia esta superficie fue de 12000 hectáreas en 1996 según un informe de la Unión Europea para el cultivo del cáñamo. Los datos publicados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) indican que la superficie dedicada al cultivo del cáñamo para fibra en el año 1998 fue de 66.842 hectáreas con una producción de 69.398 toneladas de fibra, mientras que sólo 36.116 hectáreas han sido cultivadas con cáñamo para la obtención de semillas, con una producción de 36.846 toneladas. La Figura 4 muestra la repartición mundial de la producción de fibras (A) y semillas (B) de cáñamo en el año 1998.

Resultados más recientes (2001-2002) presentados por la “European Industrial Hemp Association” (EIHA) indican que en la Unión Europea existen actualmente entre 15 y 20 compañías que aseguran el procesamiento primario del cáñamo junto con otras 5 a 10 situadas en Europa del Este (Karus, 2002; Karus y Kamp, 2002). En los últimos años la cantidad de las fibras del cáñamo producida por la Unión Europea aumentó de forma continua, estimándose en el 2001 de 20,000 a 25,000 toneladas de las cuales del 70 al 80% se destina a la fabricación de pulpa para papel de cigarrillos, el 14-17% a la industria del automóvil, el 6.5% se usa en el sector de la construcción y entorno al 1% se destina a los agro y geotextiles, fabricación de colchones, suelas de zapatos, etc. Por lo tanto, aplicaciones tradicionales de la fibra del cáñamo como el uso en la industria textil y la fabricación de cuerdas no juegan actualmente ningún papel en la fibra producida por la Unión Europea (Karus, 2002; Karus y Kaup, 2002). En cuanto a la producción de semillas de cáñamo, la Unión Europea produjo 4,300 toneladas en el año 2001, de las cuales el 95% ha sido destinado a la alimentación animal, principalmente los pájaros, mientras que sólo el 5% se destinó a consumo humano (alimentación y cosmética) en forma de aceite o de semillas (Karus, 2002; Karus y Kaup, 2002).



**Figura 4.** Repartición de la producción mundial del cáñamo de fibra (**A**) y de semillas (**B**) en el año 1998 según la FAO.

En la actualidad, el Estado Español autoriza según el Real decreto 1729/1999 el cultivo de variedades registradas de cáñamo con los niveles de THC determinados por la Unión Europea. Aun así, y pese a que el cultivo del cáñamo fue importante en España en los años 50 con amplias zonas cultivadas en los valles del Ebro, Segre y Segura, llegando a ser el décimo productor del mundo, hoy se cultiva fundamentalmente en Cataluña procesando la producción para obtener diversos tipos

de papel y no cubriéndose la demanda interna debido a los bajos beneficios existentes en la actualidad para los productores y a la complejidad de las normativas y controles impuestos a los cultivadores. Esto, junto con la alta competitividad del algodón *Gossypium hirsutum* L. y de las fibras sintéticas, han causado una bajada drástica del cultivo del cáñamo en los años sesenta del pasado siglo, no sólo en España sino que en la mayoría de los países productores (Forapani *et al.*, 2001). Así pues, la industria del cáñamo ha logrado sobrevivir únicamente en Francia, republicas de la Ex Unión Soviética, Este de Europa y China donde se sigue manteniendo el cultivo de las variedades certificadas cuyos niveles de THC son inferiores al 0.3% (De Meijer *et al.*, 1992; Fournier *et al.*, 2001).

No obstante, en las últimas décadas del pasado siglo, varios programas de investigación empezaron a desarrollarse en diversos países del Oeste de Europa, Australia, Estados Unidos, Holanda y Canadá (De Meijer y Van Soest, 1992; Small y Marcus, 2000) con el propósito de estudiar la posibilidad del uso del cáñamo como materia prima para producir pulpa para papel y obtener aceite a partir de las semillas. Estos esfuerzos se están concentrando para revalorar y reintroducir el cultivo del cáñamo en muchos países debido a varios factores como: i) el bajo requerimiento en agroquímicos como fertilizantes y herbicidas, ii) la excepcional resistencia a las enfermedades iii) y el aumento de la percepción pública sobre el valor de las fibras naturales comparadas con las sintéticas (Montford y Small, 1999). Por otra parte, el valor y la variedad de los metabolitos secundarios de interés farmacéutico, encontrados en la planta, representan otro motivo de interés de cada vez más científicos.

## **I.6. Estrategias adoptadas para la mejora del cultivo del cáñamo**

### **I.6.1. Objetivos específicos de los programas de mejora**

Como ha sido mencionado anteriormente (I.2.2), las posibilidades del uso del cáñamo para la obtención de fibra industrial de alta calidad y de aceite de semillas, junto con el creciente éxito que está teniendo la aplicación de sus

metabolitos secundarios en el área medicinal, están propiciando un renovado interés por este cultivo en países de la comunidad Europea, Estados Unidos, Australia y Canadá (De Meijer, 1995; De Meijer y Keizer, 1996; Small y Marcus, 2000). En este contexto la mejora de los cultivares de cáñamo para incrementar la productividad y calidad de fibra, la resistencia a plagas y enfermedades y reducir su potencial de droga a niveles aceptables, es el principal objetivo de los programas de mejora desarrollados en estos países (De Meijer *et al.* 1992; De Meijer, 1995; Small y Marcus, 2000).

### **I.6.2. Mejora tradicional**

La selección de cultivares y variedades en base a la productividad y calidad de fibra o contenido de aceite y proteínas de las semillas (Small *et al.*, 1975; De Meijer y Keizer, 1996) fue la metodología más empleada para la mejora genética de los cultivares de cáñamo. En este aspecto, las variedades de fibra se seleccionaron en función de la longitud del tallo (Hoffmann, 1961; Muchow, 1979) y la composición de la fibra del mismo (Horn, 1973; De Meijer, 1994). Para la producción de aceite se seleccionaron variedades con alto contenido de aceite y alta productividad de semillas (Small *et al.*, 1975). Otro aspecto de las prácticas empleadas para la mejora genética de las variedades de cáñamo fue la creación de los cultivares monoicos que se seleccionaron a partir de variedades dioicas para remediar al problema del dimorfismo sexual (Feaster, 1956) con el fin de aumentar la producción y calidad de la fibra obtenida. Esto se explica sabiendo que las plantas macho poseen entrenudos más largos y producen, gracias a ello, fibra de mejor calidad con respecto a las hembras (Small *et al.*, 1975) y que en los cultivares monoicos las plantas poseen la calidad de fibra de la planta macho y llevan los dos tipos de flores en el mismo pie. Por otra parte, la preservación de las características agronómicas fijadas, especialmente el monoismo, requiere una continua selección durante la multiplicación de las semillas (De Meijer, 1995). Desafortunadamente, el uso de las mismas prácticas culturales para el desarrollo paralelo de un gran número de

variedades altamente psicotrópicas es una evidencia que no se puede subestimar (De Meijer *et al.*, 1992).

Como consecuencia de estas presiones de selección, se creó una gran variedad de cultivos en todo el planeta para distintos usos y aplicaciones, lo que hizo necesario desarrollar métodos más precisos para la diferenciación y selección de los cultivares.

### **I.6.3. Métodos bioquímicos**

Varios métodos analíticos han sido desarrollados y aplicados para la selección de los cultivares en función del contenido de cannabinoides, distinguiendo claramente entre variedades psicotrópicas con alto contenido de THC y otras que poseen, en cambio, altos niveles de cannabinoides no psicotrópicos como el CBD. Los resultados obtenidos se usaron entonces para seleccionar cultivares con alta calidad de fibra o aceite y baja acción psicotrópica para introducirlas en varios países (De Meijer *et al.*, 1992). No obstante, los investigadores se enfrentaron al problema de la gran influencia de las condiciones climáticas sobre la composición química de la planta, precisamente los cannabinoides (De Meijer *et al.*, 1992), de modo que los cultivares seleccionados e introducidos podrían cambiar de perfil y niveles de cannabinoides después de tres generaciones (Murari *et al.*, 1983; Hakim *et al.*, 1986; De Meijer *et al.*, 1992).

Como remedio a estos problemas e intentando limitar la influencia de los factores climáticos sobre los programas de selección y mejora de los cultivos, se desarrollaron protocolos de cultivo *in vitro* de tejidos y células de cáñamo. Estos estudios tenían como objetivo por una parte realizar la multiplicación clonal de plantas con características seleccionadas, y por otra, el desarrollo de una herramienta para la obtención de metabolitos secundarios característicos del cáñamo, sin tener que recorrer al cultivo de la planta entera. A tal fin se desarrollaron varios métodos de mejora mediante técnicas biotecnológicas.



## **II- BIOTECNOLOGÍA VEGETAL: APLICACIONES Y PERSPECTIVAS EN LA MEJORA DE LOS CULTIVOS.**

La biotecnología es una ciencia pluridisciplinar que usa organismos vivos o compuestos obtenidos de los mismos para obtener productos beneficiosos para el ser humano (Barz y Oksman-Caldentey, 2002). En el mundo de las plantas, el principal objetivo de la biotecnología es crear, por ingeniería genética, nuevas variedades de plantas que presentan algunas características que mejoren su valor sobre las existentes (resistencia a patógenos y herbicidas, tolerancia a estrés ambiental, incremento del valor organoléptico y nutricional del fruto, etc.). La biotecnología vegetal también ha dedicado parte importante de sus esfuerzos a incrementar el beneficio que se le puede sacar a un cultivo sin tener que recorrer a cultivar grandes superficies de terrenos y recortando el periodo de cultivo. En este aspecto entra la producción de metabolitos secundarios a partir de cultivos *in vitro* de células y tejidos.

### **II.1. Cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos vegetales**

#### **II.1.1. Definición y conceptos generales**

El cultivo *in vitro* de plantas se define como el cultivo de plantas o partes de ellas (órganos, tejidos, células y protoplastos) en medio nutritivo bajo condiciones estériles y controladas (Pierik, 1987). Los principales fundamentos del cultivo *in vitro* de células, órganos y tejidos, sobre todo para la micropropagación, se basan sobre dos características clave de la célula vegetal que son la totipotencia y la desdiferenciación. Así, al contrario de lo que ocurre en los animales, donde la diferenciación celular es generalmente irreversible, en plantas, incluso en células maduras y diferenciadas, se retiene la capacidad para volver al estado meristemático, lo que se define como desdiferenciación. Por otra parte, la capacidad inherente de una célula vegetal para dar una planta completa es conocida como totipotencia celular. Para que una célula diferenciada exprese su totipotencia es necesario que primero experimente una desdiferenciación y luego una nueva diferenciación que la

capacita para responder a ciertos estímulos del cultivo o ambientales. Esto puede inducirse si se colocan porciones de tejidos (explantos) en un medio de cultivo apropiado que contenga nutrientes y aditivos adecuados junto con reguladores de crecimiento (principalmente auxinas y citoquininas), los cuales manipulando su proporción se pueden obtener varios tipos de respuesta. Por una parte se obtienen callos (tejidos no organizados) que pueden usarse para la obtención de suspensiones celulares o bien para la inducción de yemas o embriones, y por otra se pueden desarrollar yemas o embriones directamente a partir del explantos sin formación de callo (Skoog y Miller, 1957; Tran Thanh Van, 1981; Flick *et al.*, 1983).

La inducción de la formación de yemas en tejidos somáticos se denomina regeneración somática o adventicia u organogénesis somática, y generalmente se considera que puede ser indirecta si existe formación de callo o directa si ocurre sin callogénesis. En el primer caso, los callos organogénicos se inician por división celular de las capas celulares del mesófilo, especialmente alrededor del tejido vascular. A continuación las células comienzan a dividirse al azar y se forman grupos pequeños y densos de centros meristemáticos (meristemoides) (Thorpe, 1982). En el medio de inducción, estos meristemoides se agrupan y cada uno de ellos forma eventualmente un montículo en la superficie del explanto, formándose yemas foliares o radicales. La propagación vía regeneración indirecta conlleva el riesgo de que las plantas regeneradas difieran genéticamente de la planta madre por que incluye un paso en el que el tejido está desdiferenciado y consecuentemente menos estable, lo que se denomina variación somaclonal. Debido a esto, el uso de callos para su posterior propagación no es recomendado a menos que tengan una naturaleza altamente organizada. La organogénesis somática puede ocurrir también directamente desde el explanto sin la formación de callos. Esta forma de regeneración ha sido observada raramente o es desconocida en algunas especies (Litz y Gray, 1992).

La regeneración depende, además de los factores genéticos y epigenéticos del propio material en uso, de los constituyentes del medio de cultivo, principalmente las proporciones de los reguladores de crecimiento que pueden dividirse en hormonas,

compuestos orgánicos sintetizados por las plantas y otros productos sintéticos que actúan de forma similar. Generalmente, los reguladores de crecimiento son responsables de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza y que determinan el crecimiento activo de todos los órganos. *In vitro*, los reguladores de crecimiento controlan la diferenciación de tejidos interviniendo en actividades principales como el crecimiento y el control del ciclo celular. No obstante la aclaración de la acción de las hormonas esta intrincada debido a que la diferenciación es una respuesta compleja a varios componentes como la mitosis, polarización, formación de los primordios y desarrollo de los meristemas (Reinert, 1958; Thorpe, 1980).

Los principales reguladores son las auxinas, citoquininas, giberelinas y otros reguladores como las oligosacarinas, ácido abscísico y etileno. Las auxinas más importantes son el ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Esta clase de fitohormonas se conoce por su acción sobre la elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias. En cuanto a las citoquininas, las más comunes son la kinetina, N<sup>6</sup>-bencilaminopurina (BA), zeatina y 6-( $\gamma,\gamma$ -dimetilamino) purina (2iP). Las citoquininas se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y desarrollo, disminuyen la dominancia apical por lo que promueven la formación de brotes axilares, retardan el envejecimiento y, en concentraciones elevadas, pueden inducir la formación de brotes adventicios e inhibir la formación de raíces.

En general, en tejidos cultivados *in vitro* una alta concentración de citoquinina con respecto a la de auxina induce la formación de tallo mientras que lo contrario favorece la formación de raíces. No obstante esta acción depende estrictamente de cada paso del cultivo de tejidos, tipo de explanto usado, especie vegetal y de las pretensiones del investigador. A todo ello, se suma la tendencia del propio tejido cultivado a formar órganos, embriones, a desarrollar callos no organogénicos o a ser completamente recalcitrante (no responder a los estímulos hormonales exógenos adicionados). Como ejemplo de ello la alta tendencia de

formación de órganos en *Nicotiana tabacum*, siendo una especie en la que se consiguen raramente la formación de embriones. En cambio, *Daucus carota* es una especie con más agilidad para formar embriones (Thorpe, 1994).

### **II.1.2. Aplicaciones del cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* con sus aspectos previamente mencionados, constituye una tecnología ampliamente desarrollada y con importantes aplicaciones. Quizás una de las más destacadas sea la micropropagación, que permite la producción masiva de plantas, teóricamente idénticas a la planta madre, en espacios y periodos de cultivo reducidos. Además, las plantas se pueden producir a lo largo de todo el año ya que el proceso es independiente de los efectos ambientales y el material producido puede ser almacenado durante largos periodos de tiempo. Las plantas, además no requieren excesivas atenciones entre los subcultivos y no se necesario realizar tratamientos fitosanitarios. Sin embargo, la aplicación de la micropropagación tiene algunas limitaciones, principalmente cuando se trata de cultivos mayoritarios, debido a su relativo alto coste de producción. Además, se necesita disponer de tecnología avanzada y se necesitan métodos específicos para obtener resultados óptimos para cada especie y variedad. Por otra parte, las variaciones somaclonales que pueden producirse pueden ser no deseables y normalmente no se detectan hasta estadios muy tardíos por lo que se aumentan las posibilidades de transmitir las variaciones a gran escala.

El cultivo *in vitro* se aplica también en el ámbito de la sanidad vegetal ya que, a partir de cultivos de meristemas y/o termoterapia, se pueden obtener plantas libres de patógenos (Nehra y Kartha, 1994). Lo que permite la producción de plantas certificadas. También es de destacar los importantes avances que ha logrado conseguir el cultivo *in vitro* de tejidos y células vegetales como alternativa al cultivo de plantas para la obtención de metabolitos secundarios de interés farmacéutico, alimentario o industrial (Kamada *et al.*, 1986; Fujita y Tabata, 1987; Parr *et al.*, 1988; Fujita *et al.*, 1990; Toivonen, 1993; Piñol *et al.*, 1996; Palazón *et al.*, 1997a).

A parte de ello, el cultivo *in vitro* es aplicado en la mejora agronómica, para realizar estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica, para la conservación de germoplasmas, para la selección *in vitro* o hibridación somática, o para la introducción de nuevas características en las plantas mediante ingeniería genética (transformación genética). Finalmente, cabe mencionar que la importancia de disponer de un protocolo de cultivo y regeneración *in vitro* reside, igualmente, en su indispensabilidad como paso previo a la transformación de modo que a partir de una o varias células transformadas sea posible obtener un individuo con las características deseadas

### **II.1.3. Situación del cultivo *in vitro* del cáñamo**

Son muy escasos los estudios referentes al cultivo *in vitro* del cáñamo. Los primeros trabajos realizados se centraron principalmente en las potencialidades bioquímicas de callos derivados de varios tejidos y suspensiones celulares obtenidas a partir de ellos, planteándose como objetivo principal desarrollar sistemas que permitan el estudio de la biosíntesis y biotransformación de los cannabinoides (Veliky and Genest, 1972; Hemphill *et al.*, 1978; Turner *et al.*, 1980 y Braemer y Paris, 1987). La primera publicación sobre el cultivo de tejidos del cáñamo para la regeneración *in vitro*, data de 1981, donde Fisse *et al.* realizaron varios experimentos con la intención de establecer un eficiente protocolo para la micropropagación. Sin embargo, estos autores no fueron capaces de inducir la neoformación de yemas *in vitro* mediante regeneración directa o indirecta concluyendo sobre la necesidad de la presencia de yemas preexistentes en los explantos de tallo para el desarrollo de plántulas enteras. Lo que les llevó a caracterizar el cáñamo como poco susceptible a la organogénesis *in vitro*. Semejantes conclusiones se publicaron por Richez-Dumanois *et al.* en el año 1986. Estos resultados incitaron a varios investigadores a estudiar las condiciones influyentes sobre la callogénesis en el cáñamo (Zottini *et al.*, 1996) y concluir sobre la influencia del genotipo y explanto usado sobre la abundancia y tipo de los callos obtenidos. Desafortunadamente, no se pudo desarrollar protocolo ninguno para la organogénesis a partir de dichos callos. Más

tarde, Mandolino y Ranalli (1999) reanudaron estos estudios usando varias concentraciones de 2,4-D y de BA. Como resultado de esas investigaciones, algunos callos derivados de hojas mostraron ser caulogénicos. Sin embargo, la regeneración fue muy ocasional, juzgando por ello, que el cáñamo está aun lejos de borrarse de la lista de las especies recalcitrantes a las técnicas “*in vitro*”. Hay que señalar también que en todos los estudios realizados, se resaltó la tendencia de los callos formados, en las distintas condiciones de cultivo, a desarrollar raíces frente a su poca receptividad a la formación de hojas y tallos.

Recientemente, Ślusarkiewicz-Jarzina *et al.* (2005) consiguieron inducir la formación de tallos en callos derivados de pecíolos, entrenudos y yemas axilares. No obstante, el porcentaje de regeneración obtenido fue muy bajo (1.35%). Por lo que, como se puede ver, no se han descrito hasta la fecha protocolos eficientes y reproducibles para la regeneración *in vitro* del cáñamo.

## **II.2. Transformación genética mediada por *Agrobacterium***

Las técnicas de transformación de células vegetales recorren en la mayoría de los pasos del proceso al cultivo *in vitro*. Existen varias técnicas de transformación que se dividen en directas, induciendo la permeabilidad de la célula al ADN (mediante electroporación, agentes químicos, microinyección, bombardeo, etc.), e indirectas basadas en el uso de vectores que pueden ser biológicos (*Agrobacterium*, virus) o no biológicos (liposomas). La primera clase de técnicas tiene la limitación de requerir un elevado grado de manipulación y la transformación se realiza a células individuales, lo que la convierte en un proceso muy laborioso que requiere alta especialización y largos periodos de trabajo. Además cuando el tejido bombardeado es totipotente (excepto el polen) los individuos regenerados suelen ser quiméricos (Sandford, 1990). Esto ha hecho que las técnicas indirectas, principalmente las que usan microorganismos fitopatógenos para la introducción del ADN en la célula vegetal, sean las más utilizadas.

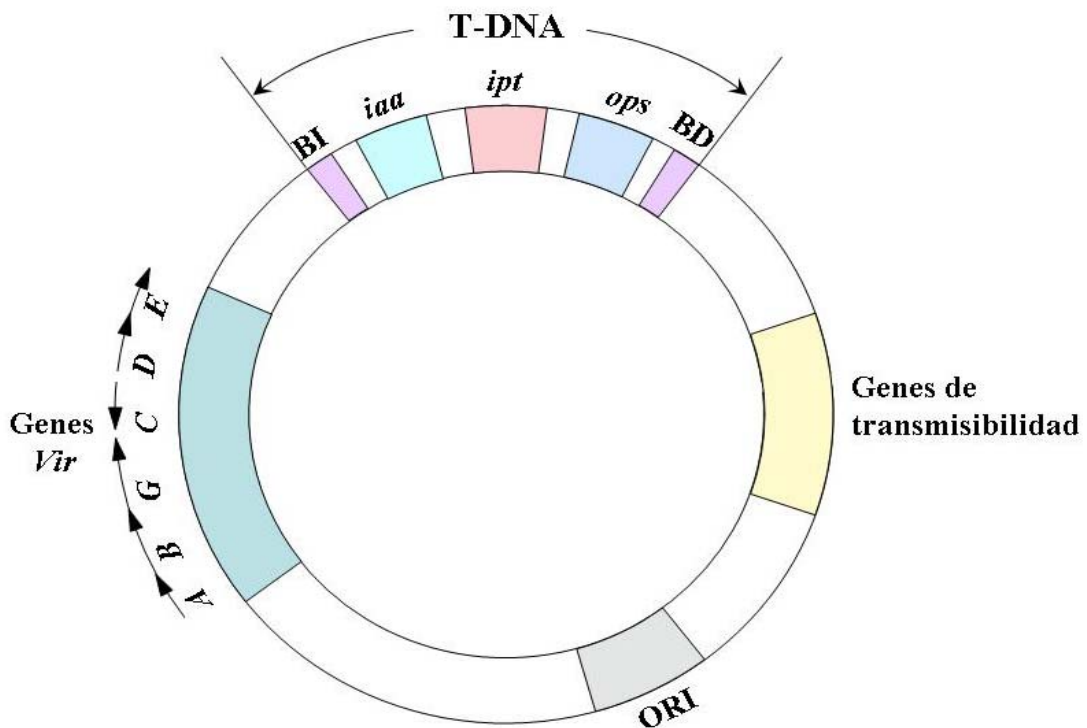
Dentro de todas las técnicas previamente citadas, quizás la más versátil y ampliamente utilizada sea la transformación mediada por *Agrobacterium* (Gheysen *et al.*, 1998). El descubrimiento de la capacidad de esta bacteria de introducir ADN en células vegetales supuso una revolución en la transformación ya que constituye uno de los sistemas más efectivos para introducir material genético en las células vegetales e insertarlo en el genoma. Además, esta técnica es relativamente fácil y se aplica a un amplio rango de organismos incluyendo numerosas especies dicotiledóneas y monocotiledóneas (De Cleene y De Ley, 1981; Tepfer, 1989; Porter, 1991; van Wordragen y Dons, 1992), gimnospermas (Morris y Morris, 1990; McAfee *et al.*, 1993; Levee *et al.*, 1999), junto con algunos hongos (Bundock *et al.*, 1995; De Groot *et al.*, 1998; Abuodeh *et al.*, 2000). Recientemente, se ha demostrado la capacidad de *Agrobacterium* de transferir el T-DNA a células humanas (Kunik *et al.*, 2001).

### II.2.1. Características generales de la bacteria

El género *Agrobacterium* pertenece a la familia *Rhizobiaceae*. Se trata de una bacteria del suelo, Gram negativa (Chriqui *et al.*, 1996) móvil mediante 2 a 3 flagelos y que alberga un megaplásmido de más de 200 kpb (Figura 5) llamado “Ri” (inductor de raíces) o “Ti” (inductor de tumores) en el caso de *Agrobacterium rhizogenes* y *A. tumefaciens* respectivamente (Zaenen *et al.*, 1974; Costantino *et al.*, 1981). Las cepas de *Agrobacterium* se clasifican en función del tipo de opinas (agrocinopinas, manitol opinas, octopina, nopalina, succinamopina y cucumopina) que son aminoácidos codificados por genes bacterianos y que tienen la función de alimento para la bacteria.

El plásmido de *Agrobacterium* (sea el Ri o Ti) contiene una secuencia llamada ADN transferido, o T-DNA, que es el único fragmento de ADN bacteriano que se transfiere a la célula vegetal a lo largo de la infección. En algunos plásmidos (Ti tipo octopina y Ri tipo agropina) el T-DNA está constituido por dos piezas llamadas borde izquierdo y borde derecho (T<sub>L</sub>-DNA y T<sub>R</sub>-DNA respectivamente), mientras que en otros casos, (Ri tipo manopina y cucumopina y Ti tipo nopalina), el

T-DNA es un único y largo fragmento que muestra un alto grado de homología con el T<sub>L</sub>-DNA. El T-DNA contiene los genes responsables de la oncogénesis u oncogenes, que son los responsables del desarrollo de la enfermedad en las plantas infectadas, y se demostró que sus productos de expresión alteran los niveles y la percepción de las fitohormonas por las células transformadas (Willmitzer *et al.*, 1982; Akiyoshi *et al.*, 1984; Inzé *et al.*, 1984). Así pues, la integración del T-DNA en el genoma huésped resulta en el desarrollo anárquico y neoplásico de células transformadas en el sitio de infección, dando lugar a tejidos transformados con crecimiento ilimitado (ver apartado II.2.3). En la mayoría de los casos *A. tumefaciens* induce un tejido inorganizado llamado “agalla del corona” o tumor, mientras que la infección con *A. rhizogenes* resulta en la proliferación de raíces en el sitio de infección que se conocen bajo el nombre de raíces en cabellera, raíces transformadas, “hairy roots”, o raíces pilosas.



**Figura 5.** Estructura del plásmido Ti. T-DNA: región que se transfiere a la planta, *vir*: genes de virulencia, *iaa*, *ipt*: oncogenes, *ops*: genes de síntesis de opinas, *ori*: origen de replicación, BD: borde derecho, BI: borde izquierdo. Las flechas indican la dirección de la transcripción de cada gen.



### ***Genes de oncogénesis “oncogenes”***

Los dos oncogenes del plásmido Ti responsables de la producción de auxina, denominados *iaaM* (o *tms1*: “tumor morphology shooty”) y *iaaH* (o *tms2*), codifican las dos etapas de biosíntesis de esta fitohormona. El gen *iaaM* tiene como producto la triptófano monooxigenasa que convierte el triptófano en indol-3-acetamida (IAM) (Thomashow *et al.*, 1986). Este último se convierte, a su vez, en ácido indol-3-acético (AIA) mediante la indol-3-acetamida hidrolasa que es el producto del gen *iaaH* (Inzé *et al.*, 1984; Schröder *et al.*, 1984; Thomashow *et al.*, 1984). El T-DNA del plásmido Ti se encuentra también otro oncogén denominado *ipt* o *tmr* “tumor morphology rooty” que codifica por una enzima que cataliza la primera etapa de biosíntesis de citoquininas. El producto de este gen es una dimetilalil-pirofosfato (DMAPP) transferasa o isopentenil transferasa que convierte el DMAPP y el AMP en isopentenil-AMP. Este último se transforma rápidamente en citoquinina por las enzimas vegetales (Akiyoshi *et al.*, 1984; Barry *et al.*, 1984; Buchmann *et al.*, 1985).

En cuanto al T-DNA del plásmido Ri, los verdaderos protagonistas de la oncogénesis son cuatro *loci* localizados en el T<sub>L</sub>-DNA (borde izquierdo del T-DNA) y que protagonizan la inducción y el crecimiento de las “hairy roots” o raíces transformadas y por ello se llaman *rol* (*loci* inductores de raíces). Estos *loci*, denominados *rolA*, *rolB*, *rolC* y *rolD*, corresponden a las regiones codificadoras ORF “open-reading frames”: ORF 10, 11, 12 y 15 del T-DNA (Slightom *et al.*, 1986) y son capaces, por si solos, de inducir raíces transformadas de la misma manera que el T-DNA entero (Capone *et al.*, 1989). Varios trabajos han mostrado que la acción sinérgica de los tres primeros genes *rolA*, *rolB* y *rolC* es esencial para el desarrollo y mantenimiento del fenotipo de las raíces transformadas (Cardarelli *et al.*, 1987; Altabella *et al.*, 1995; Palazón *et al.*, 1997b). Los genes *rol* difieren en su capacidad para estimular la formación de raíces, siendo el gen *rolB* más eficiente que *rolA* y *rolC*. En cambio, *rolD* sólo no es capaz de inducir desarrollo ninguno (Mauro *et al.*, 1996). Por otra parte, raíces transformadas de tabaco que expresan únicamente el gen *rolC* presentaron una mayor ramificación en comparación con las raíces para los

genes *rolA* y *rolB*. Este último resultó en raíces más gruesas mientras que *rolA* dio raíces con crecimiento limitado (Palazón *et al.*, 1997 b).

La acción bioquímica de los genes *rol* se explicó a principios de la década de los 90, con su implicación en la liberación de auxinas y citoquininas activas a partir de formas inactivas (Estruch *et al.*, 1991a, b; Hamill, 1993). Sin embargo estudios posteriores han sugerido que la expresión de los genes *rol* influencia la sensibilidad a los reguladores de crecimiento, y probablemente también el metabolismo hormonal en las células transformadas (Schmülling *et al.*, 1993; Delbarre *et al.*, 1994; Filippini *et al.*, 1996). El producto del gen *rolB* posee una actividad tirosín fosfatasa (Filippini *et al.*, 1996) y está implicado en la señal de transducción de auxinas, por lo que incrementa la sensibilidad de las células que lo expresan a las auxinas (Spanó *et al.*, 1988 y Shen *et al.*, 1990; Maurel *et al.*, 1994). La función del gen *rolC* es probablemente la mejor conocida, teniendo el producto de dicho gen una actividad enzimática capaz de hidrolizar N- y O- glucósidos de citoquininas y liberar por consiguiente citoquininas activas (Estruch *et al.*, 1991b). Sin embargo, esta función no ha podido ser demostrada *in vivo*. Al mismo tiempo la función del gen *rolA* sigue siendo desconocida. La reducción del contenido del ácido giberélico en plantas que expresan dicho gen deja sugerir que está involucrado en la alteración fenotípica de las plantas transformadas actuando sobre la síntesis o la actividad de esta fitohormona (Dehio *et al.*, 1993). Se desconoce también la función del *rolD* (presente exclusivamente en el T-DNA de las cepas tipo agropina), aunque en plantas transgénicas de tabaco se ha demostrado que el producto de este gen mostró ser responsable de una aceleración dramática entre la fase vegetativa y la fase reproductora estimulando la aparición de las flores (Mauro *et al.*, 1996).

Además de los genes *rol*, en el borde derecho del T-DNA de algunas cepas de *A. rhizogenes* (tipo agropina), se encuentran genes cuya secuencia es similar a la de los genes *iaaM* y *iaaH* del plásmido Ti. Estos genes denominados genes *aux* codifican las dos etapas de biosíntesis del ácido 3-indolacético (Huffman *et al.*, 1984; De Paolis *et al.*, 1985; Depicker *et al.*, 1988), pero es evidente que no son esenciales para la formación y el mantenimiento de las raíces transformadas puesto que incluso

las cepas que carecen del T<sub>R</sub>-DNA son efectivas en la inducción de raíces transformadas. Otros segmentos presentes en el T-DNA del plásmido Ri como las regiones codificadoras ORF8, ORF13 y ORF 14 (plástimos tipo agropina, manopina y cucumopina) están también implicados en la inducción de las raíces (Spena *et al.*, 1987). Hasta el momento, y pese a los grandes esfuerzos para estudiar los oncogenes del plásmido Ri, poco se conoce acerca de las funciones y efectos de los genes *rol* así como los ORF8, ORF13 y ORF14.

### ***Genes de virulencia “genes vir”***

En todas las cepas de *Agrobacterium* los genes esenciales para la transferencia del T-DNA están codificados por una secuencia adyacente al borde izquierdo del T-DNA y que está constituida por unas 40 kb. Esta secuencia, denominada región de virulencia o región *vir*, está formada por seis u ocho operones que codifican por 22 a 27 proteínas y su emplazamiento fuera del T-DNA hace que no se transfiera a la célula vegetal (Garfinkel y Nester, 1980; Ooms *et al.*, 1980). Los genes *vir* actúan en cascada cuando se detectan lesiones en las células vegetales siendo los *loci virA*, *virB*, *virD* y *virG* esenciales para la virulencia mientras que los demás *loci* parecen tener un papel accesorio (Stachel y Nester, 1986) pudiendo ser ausentes en algunas cepas.

### **II.2.2. Etapas de la infección**

La respuesta de una planta a *Agrobacterium* ocurre en varias etapas (Figura 6) y depende de distintos parámetros relacionados con la propia planta (susceptibilidad del genotipo, estado de desarrollo y tipo de tejido infectado, ect.), factores ambientales como el pH y temperatura y también de la cepa bacteriana usada para la infección (Chriqui *et al.*, 1996). Los principales pasos de la interacción planta/*Agrobacterium* son:

### 1) Reconocimiento planta-*Agrobacterium*

Durante el ciclo de vida de las agrobacterias, muchas se localizan en la superficie del tejido vegetal. Tras producirse una lesión en la planta, las células comienzan un proceso de reparación del tejido dañado mediante la producción de lignina. Los precursores de la lignina son compuestos fenólicos que, junto con otras sustancias encontradas en la zona herida como azúcares y aminoácidos, atraen a las agrobacterias por quimiotactismo (Stachel *et al.*, 1985; Bolton *et al.*, 1986; Delay *et al.*, 1992).

### 2) Adhesión de *Agrobacterium* a la célula vegetal

Una vez dentro de la herida, *Agrobacterium* se une ligeramente a la superficie de la célula vegetal mediante polisacáridos, y seguidamente la síntesis de celulosa fortalece esta unión y la hace irreversible. Estos procesos están codificados por los *locus attR* y *celABCDE*, respectivamente, localizados en el cromosoma de la bacteria (Matthysse, 1983, Matthysse, 1986; Matthysse *et al.*, 1995). La celulosa formada por las agrobacterias adheridas es pegajosa, por lo que las bacterias libres también quedan atrapadas en las fibrillas de celulosa, lo que hace que se formen agregados bacterianos en la superficie vegetal (Matthysse, 1983). Otros genes, denominados genes de virulencia cromosómica “*chv*” están también involucrados en la adhesión de la bacteria a la célula vegetal, y codifican para factores que permiten reconocer la proximidad de un posible huésped y su infección.

### 3) Activación de los genes de virulencia y producción de la hebra-T

Simultáneamente a la unión de *Agrobacterium* a las células vegetales en el sitio de la herida, está ocurriendo la activación de los genes de virulencia bacterianos, “genes *vir*”, por varias condiciones inductivas comúnmente encontradas en las heridas de la planta. Estas condiciones engloban sustancias fenólicas como la acetosiringona o la  $\alpha$ -hidroxi acetosiringona, pH ácido (5-5.8) y azúcares (Binns y Thomashow, 1988). La percepción de estas condiciones de inducción activa, directa o indirectamente, el producto génico de *virA* que es una proteína sensora localizada

en la membrana de *Agrobacterium*. Esta proteína tiene actividad autoquinasa, y luego transfiere el fosfato a la proteína *virG* que resulta así activada. La proteína *virG* tiene una localización citoplasmática y actúa activando la transcripción de todos los genes *vir*. El procesamiento del T-DNA, resultado directo de esta activación, comienza con sendos cortes en los extremos repetidos de los bordes derecho e izquierdo del mismo. La formación de esta cadena sencilla es posible gracias a la actuación del operón *virD*, del cual cabe destacar el papel de dos proteínas *virD1* y *virD2*, que actúan como endonucleasas y cortan en los bordes del T-DNA en presencia de  $Mg^{2+}$ . Después, *virD2* se une al extremo 5' del T-DNA y parece guiarlo primero hacia la membrana bacteriana y luego hacia la célula vegetal (Ward y Barnes, 1988; Young y Nester, 1988).

#### 4) *Transferencia del T-DNA a la célula vegetal*

El complejo T-DNA/*virD2*, junto a otras proteínas *vir*, atraviesan la membrana plasmática vegetal a través de una estructura de transporte, o canal, formado por las proteínas codificadas por el operón *virB* (Fullner *et al.*, 1996; Lessi y Lanka, 1994). Una vez en el citoplasma de la célula vegetal la proteína *virE2* cubre el T-DNA y lo protege de las endonucleasas. Esta proteína junto con la *virD2* posee secuencias llamadas secuencias de localización nuclear por lo que ambas están implicadas en la transferencia del T-DNA hacia el núcleo. Además la proteína *virE2* confiere al complejo T-DNA/*virD2* la conformación adecuada para que pueda atravesar la envoltura del poro nuclear.

#### 5) *Integración del T-DNA en el cromosoma vegetal*

Cuando el T-DNA, llega al núcleo de la célula huésped, la proteína *virE2* le dirige hacia la cromatina y probablemente inicia su integración en el genoma vegetal. En este proceso participan también enzimas vegetales, y la proteína *virD2* (Tinland, 1995). La integración del T-DNA en el ADN del huésped es aleatoria, aunque se ha descrito que ocurre preferentemente en secuencias transcripcionalmente activas (Herman *et al.*, 1990). La recombinación ocurre según el modo llamado “ilegítimo”

que, a diferencia de la recombinación homóloga, no depende de una región de extensa similitud de secuencia (Chilton *et al.*, 1977; 1982).

#### 6) *Expresión del T-DNA en la célula vegetal*

Como último paso, el T-DNA insertado en el genoma de la célula vegetal se expresa de forma estable y su transmisión a las siguientes generaciones se hace según las leyes Mendelianas (Stouggard *et al.*, 1987; Zambryski *et al.*, 1989). La expresión del T-DNA en la célula vegetal transformada conlleva la expresión de los oncogenes albergados en el mismo y quienes alteran el balance hormonal de dicha célula, lo que resulta en los eventos de crecimiento asociados a estos cambios (Akiyoshi *et al.*, 1983; Binns y Thomashow, 1988). Por otra parte la expresión del T-DNA en la célula vegetal se acompaña con la expresión de genes que codifican para enzimas de biosíntesis de opinas (genes *ops*). Dichas opinas representan la fuente de carbono y nitrógeno que soportan el crecimiento de la bacteria, y que solo pueden ser metabolizados por ella (Tempé *et al.*, 1984).

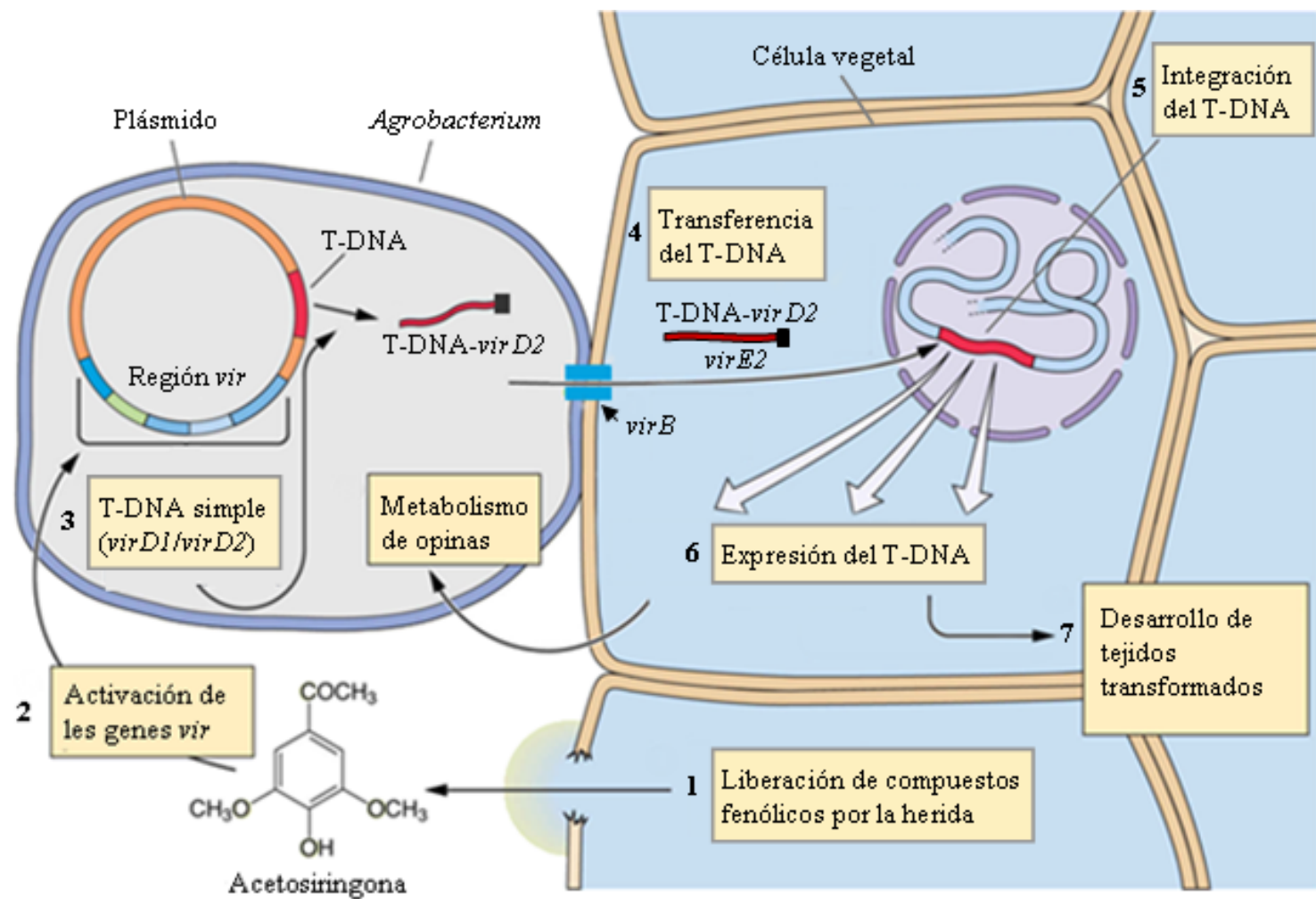


Figura 6. Esquema del mecanismo de transferencia e integración del T-DNA en el genoma vegetal.

### II.2.3. Iniciación y desarrollo de los tejidos transformados

#### *Raíces en cabellera*

Como se ha explicado anteriormente, la expresión de los oncogenes en la célula vegetal altera tanto los niveles de las hormonas endógenas como su percepción por la célula vegetal. Como resultado, lo primero que se observa, en caso de la infección con *Agrobacterium rhizogenes*, es el desarrollo de una masa de células prerizogénicas en el sitio de infección, a partir de las cuales se organizan los primordios radicales que se desarrollan para formar raíces (Bercetche *et al.*, 1987; Grima-Pettenati *et al.*, 1989; Chriqui *et al.*, 1996). El potencial de crecimiento de estas raíces depende del propio genotipo del huésped y de los eventos de transformación como la secuencia transferida, número de copias y localización del T-DNA en el cromosoma vegetal (Chriqui *et al.*, 1996, Bourgaud *et al.*, 1997). Las raíces formadas tienen un origen clónico; cada raíz se desarrolla generalmente a partir de una única célula vegetal transformada (Tempé y Casse-Delbart, 1989). Esto hace que los clones de raíces transformadas iniciados usando el mismo material y tecnología, en distintos sitios de infección presenten diferencias en su morfología, en la tasa de crecimiento y hasta en los perfiles y concentraciones de metabolitos secundarios (Mano *et al.*, 1989; Bourgaud *et al.*, 1997). Esta variabilidad estaría debida a diferencias en los niveles de expresión de los genes del T-DNA (Amselem y Tepfer, 1992), por ejemplo, en raíces transformadas de *Catharanthus roseus* las variaciones observadas en la tasa de crecimiento, niveles de alcaloides, morfología y producción de etileno se correlacionaron con los niveles de expresión del gen *rolC* (Palazón *et al.*, 1998).

#### *Agallas de cuello o tumores*

La respuesta de la célula a *A. tumefaciens* es probablemente mucho menos compleja que en el caso de *A. rhizogenes*, aunque las principales etapas para la inducción del tejido transformado tienen grandes similitudes. La expresión del T-DNA del plásmido Ti resulta en niveles incrementados de auxina y citoquinina en la célula transformada, lo que induce el desarrollo de un tejido con crecimiento



anárquico e incontrolado y que no está diferenciado. A nivel celular esta es la principal diferencia que este tejido tiene respecto de las raíces transformadas, y es la misma limitación que tiene el uso de cepas de *A. tumefaciens* completas (no desarmadas) para la transformación.

#### **II.2.4. Uso de *Agrobacterium* como vector de genes**

Ya sabemos ahora que todo gen insertado entre las secuencias bordes de los plásmidos Ri o Ti será reconocido y transferido al genoma vegetal. En algunos casos la inserción del gen (o genes) foráneo (s) en el T-DNA se hace en presencia de los oncogenes del propio plásmido, principalmente en caso de *A. rhizogenes*, lo que da lugar al desarrollo de raíces transformadas que expresan el gen introducido, y que obviamente se expresará también en las plantas regeneradas a partir de dichas raíces. Otra forma también de usar *Agrobacterium* como vector de genes es el empleo de cepas desarmadas, las cuales carecen del T-DNA y por ello de los oncogenes, sin prescindir de la región de virulencia que asegura la transferencia del ADN foráneo a la célula vegetal, siempre que esté situado entre las secuencias bordes. En este caso el ADN foráneo se expresa en la célula vegetal sin que haya desarrollo de tejidos transformados. Esto dio lugar a lo que se denomina vectores cointegrativos o que actúan en *cis* (Zambryski *et al.*, 1983). La transferencia del T-DNA (y genes foráneos insertados entre las secuencias bordes), puede ocurrir también en *trans*, lo cual quiere decir que los genes de virulencia y el T-DNA están portados por plásmidos diferentes, lo que se conoce como sistema binario.

En cualquier caso, en un proceso de transformación no todas las células llegan a ser transformadas. Para la selección de los transformantes se recurre al uso de genes marcadores, que se introducen junto al gen foráneo que queremos expresar en la planta, y que permiten reconocer y seleccionar las células que han sido transformadas (Miki y McHugh, 2004). Existen dos tipos de marcadores, de selección e informadores. Los marcadores de selección confieren ventaja a las células transformadas frente a las no transformadas en un medio selectivo, usando

habitualmente como agente selectivo un antibiótico o un herbicida. Se utiliza con más frecuencia el gen de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) que confiere resistencia frente a antibióticos de la familia de los aminoglicósidos, como la Kanamicina, mediante la fosforilación del antibiótico. Teóricamente, la adición al medio de la sustancia tóxica es suficiente para la selección de las células transformadas, estableciendo previamente la concentración de dicha sustancia que inhibe la regeneración para cada una de las especies, variedades y tipo de explanto utilizado.

En cuanto a los marcadores de información o “genes chivatos” dan a la célula que lo ha incorporado, una característica que la distingue de las demás. Suelen ser genes que codifican para enzimas que actúan sobre sustratos cromogénicos, fluorogénicos, emisores de iones o radioactivos, de tal manera que cuando se añade el sustrato al medio se identifican las células transformadas visualmente. El más usado es el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (*uidA* o *gusA*), aislado de *E. coli*, que hidroliza  $\beta$ -glucurónidos (Vancanneyt *et al.*, 1990). Si se incuban las células con el sustrato incoloro 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido (X-Glu) aparece una coloración azul en las células transformadas.

Aunque los marcadores genéticos permiten la selección de las células e individuos transformados, disponer de una prueba definitiva de la integración de los transgenes requiere utilizar técnicas moleculares como la PCR (reacción en cadena de polimerasa) o la prueba de hibridación molecular Southern (Southern, 1975). Si estas pruebas dan positivo es irrefutable que la integración de los transgenes en el genoma de la planta se ha producido.

### **II.2.5. Propiedades de las raíces transformadas**

Durante más de 25 años, las raíces transformadas estuvieron involucradas en un amplio rango de estudios fundamentales, fisiológicos y bioquímicos de las plantas. Sin embargo, en los últimos años, este material ha ido remplazando

rápida a los sistemas clásicos de cultivo de tejidos y cultivos celulares que se empleaban tanto en los estudios de las rutas biosintéticas y producción de metabolitos secundarios con propiedades farmacológicas, cosméticas o alimentarias, como en los procesos de obtención de plantas genéticamente transformadas (Hu y Du, 2006). El progreso que ha conocido este tipo de cultivos se debe en gran medida a algunas características que favorecen su uso frente a otros tejidos y que se detallan a continuación:

### ***Estabilidad fenotípica y genotípica***

La estabilidad en el genoma y en la expresión del mismo son requisitos principales para la tecnología de cultivo de tejidos vegetales sea para la micropropagación, obtención de plantas genéticamente transformadas, producción de metabolitos secundarios a escala industrial u otras aplicaciones experimentales. Numerosos estudios citológicos que incluyen variaciones en la estructura y en el número de cromosomas (Aird *et al.*, 1988; Ramsay y Kumar, 1990; Ermayanti *et al.*, 1993) han mostrado que las raíces transformadas, como la mayoría de los tejidos vegetales diferenciados, presentan un alto grado de estabilidad cromosómica, incluso durante periodos de cultivo prolongados. Esto se ha traducido en una estabilidad en el crecimiento (morfología y velocidad de crecimiento) y en niveles de metabolitos secundarios, más o menos estables, incluso durante periodos de cultivo prolongados (Flores, 1987; Ciau-Uitz *et al.*, 1994). Maldonado-Mendoza *et al.* (1993) observaron que después de cinco años de cultivo algunas líneas de raíces transformadas de *Datura stramonium* mantuvieron los mismos niveles de alcaloides tropánicos encontrados inicialmente.

### ***Autotrofia a las hormonas exógenas***

Un cultivo de fácil obtención y mantenimiento y que además requiere menores aditivos para ello, siempre es preferido para todo proceso experimental. Como se ha explicado en el apartado II.1.1, los cultivos de tejidos y células vegetales necesitan, aportes regulares de estrictas combinaciones y concentraciones de

reguladores de crecimiento durante todo el periodo de cultivo. Algunos de estos reguladores mostraron tener un efecto inhibitor sobre la producción de metabolitos secundarios en varios cultivos celulares (Mantell y Smith, 1984; Bohm y Rink, 1988; Seitz y Hinder, 1988). Las raíces transformadas tienen la ventaja, por haber integrado y expresado los oncogenes del T-DNA del plásmido Ri (principalmente los genes *rol*) de dispensar del aporte exógeno de reguladores de crecimiento. Por lo que no se requiere, generalmente, su adición en ningún paso durante la inducción o cultivo de raíces transformadas aun durante periodos prolongados.

### ***Rapidez de crecimiento***

Los cultivos de raíces transformadas muestran, generalmente, un crecimiento muy activo con tiempo medio de doblamiento de biomasa de 1 a 2 días (Maldonado-Mendoza *et al.*, 1993; Kanokwaree y Doran, 1997; Wongsamuth y Doran, 1997), característica que es estable a lo largo del tiempo. Esta tasa de crecimiento es parecida a la observada en las suspensiones celulares y es mucho mayor respecto de las raíces no transformadas cultivadas *in vitro*. La alta capacidad de crecimiento que tienen las raíces transformadas frente a las normales se debe a la gran capacidad de ramificación observada en estas raíces. En otros casos se han descrito tiempos de doblamiento de biomasa mayores, que llegaron hasta una semana (Arellano *et al.*, 1996; Shiao y Doran, 2000; Nedelkoska y Doran, 2000).

Muchos investigadores dedicaron grandes esfuerzos y recursos a la optimización de las condiciones de cultivo de las raíces transformadas con el propósito de mejorar el rendimiento experimental. Las raíces transformadas han mostrado una gran sensibilidad a las condiciones de cultivo, en términos de biomasa y producción de metabolitos secundarios que, pese a estar bajo control genético, se ha visto significativamente influida por factores nutricionales y medioambientales (Giri *et al.*, 1997; Nussbbaumer *et al.*, 1998). Generalmente, entre las condiciones más influyentes se destacan la concentración de sacarosa y sales en el medio de cultivo, el nivel y fuente de nitrógeno empleados (Bensaddek *et al.*, 2001; Lourenco *et al.*, 2002), además de la temperatura e iluminación (Jaziri *et al.*, 1995; Schumacher

*et al.*, 1995). Por otra parte, los cultivos de raíces transformadas se realizan habitualmente en medios líquidos, por lo visto, el crecimiento plagiotrópico que tienen las raíces en este medio favorece su aeración y lleva a una mayor acumulación de biomasa. (Giri y Narasu, 2000). En cambio la selección y mantenimiento de las líneas suele hacerse en medio sólido o semi sólido.

## **II.2.6. Aplicaciones del cultivo de raíces transformadas**

### **II.2.6.1. Producción de metabolitos secundarios de interés**

#### ***Capacidad biosintética***

Las plantas representan una fuente importante para un amplio rango de metabolitos secundarios con aplicaciones farmacéuticas, agroquímicas o alimentarias, y otros que se usan como colorantes o biopesticidas. Entorno del 80% de los 30,000 productos naturales conocidos son de origen vegetal (Balandrin y Klocke, 1988; Phillipson, 1990). No obstante, la obtención de dichos compuestos a partir de cultivos de plantas se enfrenta generalmente a varios problemas principalmente de tipo medioambiental. Por otra parte, a pesar de los avances logrados en la química sintética, seguimos dependiendo de las fuentes biológicas para la obtención de un gran número de metabolitos secundarios, incluyendo los que tienen aplicaciones farmacéuticas (Pezzuto, 1995), debido a la complejidad de la estructura de algunos y que hace imposible su síntesis industrial a precio competitivo.

Como remedio a estas limitaciones se han desarrollado sistemas alternativos para la producción de metabolitos secundarios de interés, usando cultivos de células vegetales. Existen numerosos trabajos de revisión que abordaron las potencialidades y posibilidades que ofrecen los cultivos de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios (Alfermann y Peterson, 1995; Dornenburg y Knorr, 1997; Scragg, 1997; Ravishankar *et al.*, 1999; Ramachandra y Ravishankar, 2002). Estos trabajos mencionaron también las principales limitaciones del uso de este tipo de

cultivos, como la difícil aplicabilidad para una producción a escala industrial debido al bajo rendimiento y a los elevados costes de producción. Además, limitaciones de tipo fisiológico del propio tejido como la inestabilidad de las líneas celulares o disminución de la productividad complicaron más el uso de este tipo de cultivos para la obtención de metabolitos secundarios. Todo esto incitó los científicos a investigar la posibilidad de usar tejidos diferenciados como alternativa a los cultivos celulares. Tales tejidos son genéticamente más estables y presentan generalmente mayores niveles de metabolitos secundarios, pero hasta el momento estos cultivos no han podido aplicarse a escala industrial (Ramachandra y Ravishankar, 2002). El descubrimiento de las potencialidades de las raíces transformadas, obtenidas tras la infección con *Agrobacterium rhizogenes*, como el rápido crecimiento, estabilidad genética y altas tasas de producción desviaron el interés de los científicos hacia el estudio de las posibilidades que ofrecen como alternativa para la producción de metabolitos secundarios a nivel industrial.

Estudios realizados en los años 80 indicaron que los perfiles de metabolitos secundarios encontrados en las raíces transformadas son muy parecidos a los presentes en la raíz normal de la planta de origen (Flores y Filner, 1985; Parr y Hamill, 1987), siendo éste el lugar de acumulación de muchos metabolitos secundarios con aplicaciones farmacéuticas (Guillon *et al.*, 2006). Este hecho aumentó el interés por desarrollar cultivos de raíces transformadas en muchas plantas medicinales.

Los niveles de metabolitos secundarios sintetizados por las raíces transformadas varían según el propio metabolito, especie de origen y muchas veces depende de las condiciones del medio de cultivo. Shimomura *et al.* (1991) demostraron que la cepa de *A. rhizogenes*, usada para la inducción de raíces, puede también afectar la concentración final de metabolitos secundarios. Estos niveles pueden ser mayores que los encontrados en las raíces de la planta madre (Payne *et al.*, 1987; Shanks y Morgan, 1999). Además, raíces transformadas de algunas especies mostraron la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios característicos de la parte aérea de la planta, y que están normalmente ausentes en las raíces. Por

ejemplo raíces transformadas de *Lawsonia inermis* sintetizaron niveles significativos de lawsona (Bakkali *et al.*, 1997). También se detectó la presencia de artemisinina, en cultivos de raíces transformadas de *Artemisia annua* L. (Jasiri *et al.*, 1995).

Otros estudios descubrieron la capacidad de las raíces transformadas de algunas especies de sintetizar nuevos productos naturales. Así, cuatro análogos de poliacetileno, con actividad acilCoA-colesterol-acil transferasa, se identificaron y se aislaron a partir de raíces transformadas de *Panax ginseng* (Kwon *et al.*, 1977). Al igual que ello, dos nuevos flavonoides con actividades antimicrobiana y antioxidante se detectaron en raíces transformadas de *Glycyrrhia glabra* (Asada *et al.*, 1998). No obstante, mayores niveles de estos metabolitos secundarios pueden obtenerse a partir de cultivos de tejidos procedentes de la parte aérea de la planta (Endo *et al.*, 1987).

En conclusión, a menos que se sepa con certeza que un determinado compuesto no puede ser sintetizado en las raíces, el desarrollo de cultivos de raíces transformadas de especies productoras de metabolitos con aplicaciones industriales representa una buena vía para la obtención de dichos metabolitos. En la actualidad se conocen más de 450 especies, pertenecientes a diferentes géneros y familias, susceptibles a la infección por *A. rhizogenes* (Porter, 1991), de las cuales cultivos de raíces transformadas de más de 80 especies mostraron ser capaces de sintetizar metabolitos secundarios de interés farmacéutico (Giri y Narasu, 2000).

### ***Elicitación***

Como se ha comentado en el apartado anterior la producción de metabolitos secundarios es una de las aplicaciones más destacadas del cultivo de raíces transgénicas. Desafortunadamente, la mayor limitación a la que se enfrenta es la baja productividad de estas raíces en comparación con la propia planta, por lo que, se desarrollaron varias técnicas encaminadas a la mejora de la producción de metabolitos secundarios de interés en los cultivos de raíces transformadas. Así, basándose sobre la capacidad de *Agrobacterium* de transferir cualquier gen foráneo insertado entre los bordes del T-DNA, se investigó la posibilidad de introducir, en

células vegetales, genes que codifican por enzimas relevantes en la ruta biosintética de ciertos metabolitos secundarios. El uso de esta técnica se enfrentó a la falta de información detallada sobre los genes biosintéticos y su regulación, por lo que hasta el momento, sólo existen pocos experimentos realizados con el propósito de alterar los niveles de algunos metabolitos secundario en raíces transformadas. De forma que los avances logrados en el tema representan solo el inicio de la aplicación de la ingeniería metabólica para la obtención de raíces transformadas más productivas (Hamill *et al.*, 1990; Hashimoto *et al.*, 1993; Jouhikainen *et al.*, 1999). Otras técnicas mucho más fáciles y eficientes están adoptadas y ampliamente estudiadas para mejorar la productividad de las raíces transformadas en un gran número de especies vegetales. Dichas técnicas se basan principalmente en la implicación del metabolismo secundario en el proceso de defensa de la planta.

Se conoce ahora que el principal papel que juegan los metabolitos secundarios en la planta es el de defensa, protegiéndola frente a ataques de insectos, herbívoros y patógenos. También actúan ayudándola a afrontar otras condiciones adversas como situaciones de estrés abiótico (rayos UV, cambios bruscos de temperatura, metales pesados, etc.). Algunas estrategias usaron este principio y lo desarrollaron para mejorar la producción de metabolitos secundarios en los cultivos *in vitro*. Estas estrategias incluyen la aplicación de moléculas señales, estrés abiótico o tratamientos con elicitores (Yukimune *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2000; 2001; Zhang *et al.*, 2004). El término “elictor” se utiliza comúnmente para denominar aquellas moléculas naturales (bióticas), sean procedentes de la planta (elicitores endógenos) o del fitopatógeno (elicitores exógenos), o químicas (abióticas) que son capaces de inducir respuestas estructurales y/o bioquímicas asociadas a la resistencia de la planta frente al organismo que la ataca (Ebel y Mithöfer, 1997; Radman *et al.*, 2003). Asimismo, los elicitores, son capaces de desencadenan la respuesta de hipersensibilidad de la planta, que se acompaña con un incremento en la producción de compuestos implicados en la defensa (Robbins *et al.*, 1985; Singh, 1999). Lo que da lugar, no solamente a la formación *de novo* de fitoalexinas, sino también la inducción de la biosíntesis de varios metabolitos secundarios.



Generalmente, el uso de hongos para la elicitación ha mostrado una alta eficiencia siendo capaz de provocar un aumento considerable en los niveles de metabolitos secundarios en muchas especies (Eilert *et al.*, 1986). La mayoría de las estrategias empleadas en este aspecto usan homogenados autoclavados del cultivo del hongo (Yoshikawa *et al.*, 1993), o filtrados de cultivos del mismo (Pasquali *et al.*, 1992; Ciddi *et al.*, 1995). Por otra parte el uso de elicitores abióticos como el metiljasmonato (MeJa), molécula que provoca la producción de fitoalexinas tras la exposición a patógenos o herbívoros (Hashimoto y Yamada, 1994; Reibotho *et al.*, 1994; Szabo *et al.*, 1999), puede incrementar significativamente la producción de varias clases de metabolitos, principalmente los alcaloides, en un amplio rango de especies vegetales (Zabetakis *et al.*, 1999).

El éxito de la elicitación depende principalmente de la interacción del tejido vegetal tratado con el elicitor elegido. Por otra parte, el uso de una combinación inapropiada del medio con el elicitor, junto con la aplicación de concentraciones o duraciones de tratamiento inadecuadas del mismo, pueden resultar en una elicitación ineficiente (Savitha *et al.*, 2005). Por lo que han de probarse, para desarrollar un protocolo eficiente para la elicitación de un metabolito secundario concreto en una determinada especie, varios tipos y concentraciones de elicitores y distintas duraciones de tratamientos. Hoy en día existe un gran número de trabajos donde se comentaron significativos aumentos en la producción de metabolitos secundarios en cultivos de raíces transformadas tras aplicar tratamientos de elicitación (Bais *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2003; Komaraiah *et al.*, 2003; Palazón *et al.*, 2003; Staniszewska *et al.*, 2003; Yaoya *et al.*, 2004; Ge y Wu, 2005; Yan *et al.*, 2005). No obstante estos resultados, como se ha dicho previamente, dependen de cada metabolito y de la especie de donde proceden las raíces.

#### **II.2.6.2. Obtención de plantas transgénicas**

Las raíces transformadas han mostrado ser capaces de regenerar plantas viables, fértiles y genéticamente estables en periodos significativamente más

reducidos en comparación con otros sistemas de transformación. El origen clónico de estas raíces hace que todas las plantas regeneradas a partir un cultivo procedente de una única raíz sean genéticamente idénticas, por lo que, el uso de raíces transformadas para la micropropagación de plantas de interés económico, agronómico o medicinal presenta un gran interés sobre todo para las especies difíciles de manejar (Gutierrez-Pesce *et al.*, 1998; Perez-Molphe y Ochoa-Alejo, 1998). En general, la regeneración a partir de raíces transformadas requiere la adición de adecuadas combinaciones hormonales, al igual que todos los tejidos vegetales. No obstante, en varias especies se observó regeneración espontánea de parte aérea en cultivos de raíces transformadas, debido al alterado metabolismo hormonal que tienen (Celma *et al.*, 2000; Subroto *et al.*, 2001). Este fenómeno de regeneración directa no requiere una etapa intermedia de formación de callo, con lo que se evita la aparición de variación somaclonal. Por otra parte, vista la naturaleza organizada y estabilidad genética de las raíces transformadas todas las plantas regeneradas a partir de ellas son establemente transformadas, lo cual no requiere, a diferencia de las demás técnicas usadas para la obtención de plantas transgénicas, el uso de agentes químicos para la selección de transformantes. Dichos agentes de selección pueden ser perjudiciales para los tejidos vegetales, además se evita el desarrollo de plantas quiméricas (Subroto *et al.*, 2001).

Por otra parte, genes foráneos incorporados en plásmido Ri pueden introducirse de forma eficiente en el genoma de la célula transformada y expresarse, por ello, en la planta regenerada (Schell, 1995a y 1995b; Miranda y Campos, 1998). No obstante, debido a la expresión de los genes *rol* y *aux*, las plantas regeneradas a partir de raíces transgénicas muestran frecuentemente anomalías que se conocen bajo el nombre del “síndrome de las raíces en cabellera” (Christey, 1997) y que representan el principal problema del uso de este material para la regeneración en algunas especies. Estas anomalías varían según la especie y suelen ser: enanismo, estimulación de la producción de raíces, disminución de la dominancia apical, flores con alteraciones fenotípicas, disminución del número de flores y hojas pequeñas y rugosas (Hamamoto *et al.*, 1990; Handa, 1992). Sin embargo, en algunas especies como *Medicago sativa* y *Lotus corniculatus* estas alteraciones no fueron

problemáticas y no aparecieron modificaciones morfológicas en la parte aérea de la planta regenerada (Sukhapinda *et al.*, 1987; Spanó *et al.*, 1987). Así, pese al problema del fenotipo alterado de las plantas transformadas con *A. rhizogenes*, éste permanece un sistema muy usado para la obtención de plantas transgénicas, habiéndose utilizado cultivos de raíces transformadas para la regeneración de plantas en más de 62 taxones diferentes representando 53 especies repartidas en 24 familias (Christey, 1997).

### II.2.6.3. Otras aplicaciones de las raíces transformadas

Además de las aplicaciones anteriormente mencionadas, existe un interés creciente para estudiar la posibilidad de introducción y expresión de proteínas foráneas de interés en las raíces transformadas para producciones industriales. Por ejemplo, en raíces transformadas de *Nicotiana tabacum*, se ha introducido y expresado con éxito el gen de biosíntesis de la proteína IgG1 (anticuerpo monoclonal) (Wongsamuth y Doran, 1997; Sharp y Doran, 1999). Las concentraciones de anticuerpo sintetizadas en dichas raíces transformadas fueron mayores que las obtenidas en suspensiones celulares de la misma especie. No obstante, se ha visto que estas raíces tienden a retener la proteína en el tejido, lo que complica el proceso de purificación y hace necesaria la destrucción de las raíces para extraer la proteína sintetizada. De esta forma, la capacidad biosintética del tejido no podrá aprovecharse durante ciclos sucesivos y esto representa, hasta ahora, la mayor limitación del uso de las raíces transformadas para esta finalidad.

Por otra parte, incrementan los estudios que investigan la capacidad de las raíces transformadas de descontaminar el medio de cultivo de sustancias tóxicas (agentes químicos, metales pesados, etc) con el fin de aplicarlas en la fitoremediación. Así, cultivos de raíces transformadas de *Catharanthus roseus* mostraron ser capaces de eliminar el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) del medio de cultivo mediante su biotransformación (Hughes *et al.*, 1997). Esta capacidad de descontaminación por biotransformación fue también observada en raíces

transformadas de otras especies como *Armoracia rusticana*, *Atropa belladonna*, *Solanum aviculare* y *S. nigrum* (Mackova *et al.*, 1997). Además se demostró la capacidad de las raíces transformadas de detoxificar el medio de algunos metales pesados (Metzger *et al.*, 1992; Macek *et al.*, 1994; Maitani *et al.*, 1996; Sanitá *et al.*, 1999). No obstante, en este caso, queda por resolver el problema de las altas concentraciones de metales pesados acumulados en el tejido vegetal de la planta usada para la fitoremediación.

### II.2.7. Aplicación de la transformación en *C. sativa*

Según las referencias bibliográficas que hemos podido encontrar, existen únicamente dos estudios que hablan de la transformación genética del cáñamo, en los cuales se usó *Agrobacterium* para la transformación. Así pues, en el año 2000, MacKinnon *et al.* llevaron a cabo experimentos preliminares para transformar ápices de tallos de cáñamo con *A. tumefaciens* que lleva un gen que confiere resistencia al patógeno *Botrytis cinerea*. No obstante, no se presentaron datos cuantitativos ni se publicaron más datos al respecto. Más tarde Feeney y Punja (2003) transformaron, usando *A. tumefaciens*, suspensiones celulares derivadas de callos obtenidos a partir de varios tipos de tejidos, y pese a la eficiencia mostrada del protocolo de transformación usado (31.23 % de transformantes), los callos transformados no llegaron a desarrollar embriogénesis ni organogénesis somática y no se dieron datos cuantitativos, en cuanto a crecimiento, de los callos transformados obtenidos. De este modo podemos constatar que en los estudios anteriores, no ha sido posible regenerar plantas a partir de callos transformados con *A. tumefaciens*. Además, es de destacar que no existen trabajos publicados donde se hayan utilizado cepas de *A. rhizogenes* para la transformación del cáñamo.

**Capítulo 2**

**INTERÉS Y OBJETIVOS  
DEL TRABAJO**

El cultivo del cáñamo conoce un interés creciente en los últimos años en numerosos países del mundo, incluyendo muchos de la Unión Europea, debido al reanudado interés en la obtención de fibras naturales de alta calidad a partir del tallo de esta planta. Por otra parte el valor y variedad de metabolitos secundarios de interés farmacéutico encontrados en esta planta representan otro motivo de interés de cada vez más científicos. Desafortunadamente el uso ilícito de la droga obtenida a partir de las variedades ricas en THC junto con la dificultad de controlar y restringir el cultivo de dichas variedades representa las principales causas que limitan la mejora y desarrollo de este cultivo. Por lo que la aplicación de técnicas biotecnológicas podría ser de gran utilidad para un mejor y controlado aprovechamiento del cáñamo.

En la actualidad se están produciendo cambios importantes en las tecnologías utilizadas para la mejora de los cultivos, citando principalmente aquellas basadas en la transformación mediada por *Agrobacterium* y que ofrecen la posibilidad de varias aplicaciones. Púes se pueden obtener tejidos transformados, principalmente raíces transgénicas obtenidas tras la infección con *A. rhizogenes*, que poseen un gran número de aplicaciones encaminadas a la mejora biotecnológica de los cultivos. En este aspecto entra la producción de metabolitos secundarios de interés industrial y la obtención, a partir de estas raíces, de plantas transgénicas con relativa facilidad en muchas especies susceptibles a este patógeno. No obstante, pese a los avances logrados en los últimos años en la mejora de muchas especies vegetales usando herramientas biotecnológicas los trabajos realizados, en este aspecto, sobre la planta de cáñamo quedan muy limitados. Por lo que hemos querido, con el presente trabajo, contribuir al desarrollo y mejora de dicho cultivo planteándonos como

objetivo general realizar un estudio biotecnológico del cáñamo enfocando principalmente la transformación genética mediada por *Agrobacterium*. A partir de allí varios objetivos específicos han sido planteados:

- Caracterización de las condiciones óptimas para el establecimiento de cultivos de cáñamo en condiciones controladas.
- Estudio de la susceptibilidad del cáñamo a la infección con *Agrobacterium rhizogenes* y *A. tumefaciens* usando distintas cepas bacterianas y genotipos de cáñamo (cultivares de fibra y accesiones de droga) y optimizando los factores de mayor influencia sobre la respuesta de la planta a este patógeno.
- Establecimiento de varias líneas de raíces transformadas, elegidas como principal material de trabajo, y estudio de las condiciones de cultivo óptimas para obtener el mejor crecimiento y estabilidad fenotípica de las raíces.
- Desarrollo de metodologías apropiadas que nos permitan analizar por una parte el contenido de los cannabinoides principales en las raíces transformadas y por otra, investigar la presencia de algunos alcaloides con actividades farmacológicas como la atropina, colina y muscarina.
- Estudio de la posibilidad de incrementar la producción de los metabolitos encontrados en las raíces transformadas mediante la aplicación de tratamientos de elicitación.
- Establecimiento de un protocolo eficiente para la obtención de plantas de cáñamo transformadas con *Agrobacterium* y estudio de la capacidad de regeneración *in vitro* de esta planta.

## **Capítulo 3**

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **I. MATERIAL BIOLÓGICO**

### **I.1. Material vegetal**

Para el estudio, en el presente trabajo, de algunos aspectos fisiológicos y biotecnológicos del cáñamo (*Cannabis sativa* L.), se utilizaron diversos genotipos que se recogen en la Tabla 2 junto con las características que de ellas se han podido recopilar, como el estado de domesticación, origen geográfico y genético, uso al que se destinan (fenotipo) y procedencia. Como planta control, en algunos experimentos, se ha utilizado el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivar BURLEY F. 13119.

### **I.2. Microorganismos**

#### ***Bacterias***

Para la inoculación de las plantas y explantos de cáñamo, se utilizaron las cepas de *Agrobacterium rhizogenes* y *A. tumefaciens* que figuran en la Tabla 3.

#### ***Hongos***

Los experimentos de elicitación fueron llevados a cabo usando el patógeno *Fusarium oxysporum* que nos ha sido suministrado por la Dra. Concha Azcón (Estación Experimental del Zaidín, Granada, España).

**Tabla 2.** Denominación y algunas características de los genotipos de *C. sativa* utilizados en el presente trabajo.

Nº de entrada en la colección <sup>a</sup>	Nombre botánico <sup>b</sup>	Cultivar <sup>c</sup> /Accesión <sup>d</sup>	Procedencia <sup>e</sup>	Utilización <sup>f</sup>	Donación
0111	<i>Cannabis sativa</i>	Accesión CAN0111	Norte de Marruecos	Droga	Recolectada por autores
0114	<i>Cannabis indica</i>	Accesión 229	Republica checa	Droga	Dr. Merzouki
0115	<i>Cannabis sativa</i>	Accesión 168	Polonia (jardín botánico de Ógrod)	Droga	Dr. Merzouki
0116	<i>Cannabis sativa</i>	Accesión 169	Polonia (jardín botánico de Ógrod)	Droga	Dr. Merzouki
0117	<i>Cannabis sativa</i>	Accesión CAN0117	Francia	Droga	Dr. Merzouki
0120	<i>Cannabis ruderalis</i>	Accesión CAN0120	Europa del Este	Silvestre	Dr. Merzouki
0221	<i>Cannabis sativa</i>	Accesión CAN0221	Norte de Marruecos	Droga	Recolectada por autores
0122	<i>Cannabis sativa</i>	Accesión CAN0122	Alemania	Droga	Recolectada por autores
0123	<i>Cannabis sativa</i>	Uniko B	Hungría	Fibra	Celulosa y Textiles S.A. Jdraque, Guadalajara.
0124	<i>Cannabis sativa</i>	Kompolti híbrido TC	Hungría	Fibra	Celulosa y Textiles S.A. Jdraque, Guadalajara.
0125	<i>Cannabis sativa</i>	Fedora 19	Francia	Fibra	Celulosa y Textiles S.A. Jdraque, Guadalajara.
0126	<i>Cannabis sativa</i>	Felina 34	Francia	Fibra	Celulosa y Textiles S.A. Jdraque, Guadalajara.
0227	<i>Cannabis sativa</i>	Delta-405	Francia	Fibra	Celulosa del levante S.A. Delta del Ebro, Tarragona
0228	<i>Cannabis sativa</i>	Futura77	Francia	Fibra	Celulosa del levante S.A. Delta del Ebro, Tarragona
0229	<i>Cannabis sativa</i>	Delta-Ilosa	Francia	Fibra	Celulosa del levante S.A. Delta del Ebro, Tarragona
0237	<i>Cannabis sativa</i>	Accesión CAN0237	Norte de Marruecos	Droga	Recolectada por autores

<sup>a</sup> Cada número identifica una accesión, los dos primeros dígitos indican el año de recepción.

<sup>b</sup> Caracterización infragénérica (en caso de afirmación por el donante).

<sup>c</sup> Nombre del cultivar (información cedida por el donante).

<sup>d</sup> Entradas sin una caracterización genotípica y fenotípica (cultivar, variedad) conocida.

<sup>e</sup> Región donde los cultivares y accesiones han sido adaptados.

<sup>f</sup> Tipo de uso de las accesiones domesticadas

**Tabla 3.** Cepas de *Agrobacterium* utilizadas para la infección.

<i>Agrobacterium ssp.</i>	Nombre	Características relevantes	Fuente/Referencias
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>			
477	Ar77	Silvestre	M.Chamber, Sevilla.
478	Ar78	Silvestre	R. Ordás, Univ. Oviedo.
476	Ar76	Silvestre	R. Ordás, Univ. Oviedo.
A4Ti24	A424	Silvestre	M.Chamber, Sevilla
A4 (Alain) Wt (pRiA4b)	A4	Rif <sup>r</sup>	M.T. Piñol, Univ. Barcelona / White <i>et al.</i> (1985)
R1601 (pRiA4b, pTUK291)	R16	Kan <sup>r</sup> , Carb <sup>r</sup>	M.T. Piñol, Univ. Barcelona / Phythoud <i>et al.</i> (1987)
C58C1 (pRi15834b)	AR10	His <sup>-</sup> , Rif <sup>r</sup>	J. Stiller. Knoxville / Stiller <i>et al.</i> (1997)
C58C1(pRi15834b, p35S:: <i>gus</i> )	AR10GUS	His <sup>-</sup> , Rif <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	J. Stiller. Knoxville / Stiller <i>et al.</i> (1997)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>			
C58	C58	Silvestre	M.M. López, IVIA, Valencia.
IVIA 251-21	I-251	Silvestre	M.M. López, IVIA, Valencia.
GV3101(pCV002-ABC)	GV3101	Kan <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	M.T. Piñol, Univ. Barcelona / Koncz y Schell (1986)
LBA4404(pAL4404-pBin19: ORF 10)	LBA-rolA	Kan <sup>r</sup>	Dr. Marioti (Italia)
LBA4404 (pAL4404-pBin19: ORF 11)	LBA-rolB	Kan <sup>r</sup>	Dr. Marioti (Italia)
LBA4404 (pAL4404-pBin19: ORF 12)	LBA-rolC	Kan <sup>r</sup>	Dr. Marioti (Italia)
LBA4404 (pAL4404-pBin19: ORF 15)	LBA-rolD	Kan <sup>r</sup>	Dr. Marioti (Italia)
LBA4404(pAL4404-pBin19: ORF10-11)	LBA-rolAB	Kan <sup>r</sup>	Dr. Marioti (Italia)
LBA4404(pAL4404-pBin19: ORF10-11-12)	LBA-rolABC	Kan <sup>r</sup>	Dr. Marioti (Italia)
EHA105 (pTiBo542-pMOG410)	EHA105	Kan <sup>r</sup>	Hood <i>et al.</i> (1993)

## II. MEDIOS DE CULTIVO

### II.1. Medios para plantas

#### *Solución mineral para plantas*

Para el cultivo hidropónico de plantas se utilizó la solución nutritiva de Rigaud y Puppo (1975) modificada, cuya composición es la que sigue:

Macronutrientes:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.200 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0.200 g
KCl.....	0.200 g
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0.120 g
Na <sub>2</sub> FeEDTA (Secuestrene).....	0.025 g
KNO <sub>3</sub> .....	5 mM

Micronutrientes:

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0.004 g
MnSO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O .....	0.002 g
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O .....	0.002 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0.003 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0.018 g
CoCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O .....	0.12 g
Agua destilada.....	1000 mL

El pH de la solución nutritiva se ajustó a 6.5±0.1 con KOH previo a su esterilización en autoclave a 117°C durante 30 minutos.

#### *Medios para cultivo in vitro de plántulas*

El cultivo *in vitro* de plántulas se llevó a cabo usando las sales del medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) diluidas a la mitad y las vitaminas del medio B5 básico (Tabla 4). El pH del medio se ajustó a 5.8 usando NaOH antes de añadirle 0.6% de agar (DIFCO) y esterilizarlo en autoclave a 117°C durante 20 min. Las vitaminas se incorporaban, entonces, al medio de cultivo después de esterilizarlas por filtración (filtros de nitrocelulosa de 0.22 µm).

**Tabla 4.** Medios de cultivo utilizados para el cultivo de plantas y tejidos de cáñamo *in vitro*.

	<b>Medio MS (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Medio B5 (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
<b><i>Macronutrientes</i></b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-
KNO <sub>3</sub>	1900	2500
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	332.2	150
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	250
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	150
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	134
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-
<b><i>Micronutrientes</i></b>		
KI	0.830	0.750
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200	3.000
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.90	10.00
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.600	2.000
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.250	0.250
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.80	27.80
Na <sub>2</sub> .EDTA	37.30	37.30
<b><i>Vitaminas</i></b>		
Ácido nicotínico	0.5	1.0
Piridoxina HCl	0.5	1.0
Tiamina HCl	1.0	10
Glicina	2.0	-
Ácido ascórbico	-	500
Polivinil-pirrolidona	-	500
Mioinositol	100	100
<b><i>pH</i></b>	5.8	5.8

### ***Medios para cultivo in vitro de explantos***

Todos los experimentos de cultivo *in vitro* de explantos (utilizados para la infección con *Agrobacterium* o en los experimentos de regeneración) fueron llevados a cabo en medios B5 o MS (Murashige y Skoog, 1962) cuyas composiciones se recogen en la Tabla 4.

## **II.2. Medios para *Agrobacterium***

### ***Medios para el cultivo bacteriano y preparación de los inóculos***

Como medio de cultivo rutinario de las cepas de *Agrobacterium* se ha utilizado el medio YEM (Vincent, 1970) cuya composición se detalla a continuación. Este medio se usó igualmente para la preparación de los inóculos.

#### **YEM**

NaCl.....	0.1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0.2 g
Manitol.....	10 g
Extracto de levadura .....	1 g
Agar (DIFCO).....	15 g
Agua destilada.....	1000 mL

Para la preparación de los inóculos, el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) ha sido también usado:

#### **LB**

Triptona .....	10 g
Extracto de levadura .....	5 g
NaCl.....	10 g
Agua destilada.....	1000 mL

Se ajustó el pH de los medios a 7.0 con NaOH y se esterilizaron a 117°C durante 20 min.

### ***Medios de conservación***

Las cepas de uso rutinario se conservaron manteniéndose en cultivo realizado en placas de Petri sobre medio YEM a 4°C y resembrándose cada 2 o 3 meses a medio fresco de composición igual. En cambio, para la conservación prolongada, los cultivos bacterianos en fase logarítmica de crecimiento se guardaron en glicerol al 20% (v/v) a una temperatura de -40°C.

### ***Antibióticos***

La adición de los antibióticos a los medios de cultivo se hizo a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua desionizada o en mezclas agua/metanol al 50% (v/v), dependiendo del tipo de antibiótico utilizado, que fueron esterilizadas por filtración (filtros de nitrocelulosa de 0.22 µm). La concentración final en los medios de cultivo fue 100 mg.L<sup>-1</sup> para los siguientes antibióticos: Carbenicilina (Sigma); Kanamicina (Sigma) y Rifampicina (Sigma).

### **II.3. Medios para *Fusarium oxysporum***

El medio utilizado para el mantenimiento del hongo *F. oxysporum* fue el medio PDA “Patata Dextrosa Agar” cuya composición es la siguiente:

#### **PDA**

Peptona de patata .....	4 g
Glucosa.....	20 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 mL

El pH del medio se ajustó a 5.5 con ácido tartárico al 10% (v/v) previo a su esterilización a 121°C durante 15 min.

El crecimiento y multiplicación del hongo para los experimentos de elicitación, se llevó a cabo utilizando el caldo de CZAPEK-DOX (Thom y Raper, 1945) de la siguiente composición:

**CZAPEK-DOX**

NaNO <sub>3</sub> .....	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0.5 g
KCl.....	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0.01 g
Sacarosa.....	30 g
Agua destilada.....	1000 mL

El pH se ajustó a 6.5 usando ácido clorhídrico (HCl) 1N y el medio se autoclavó a 120°C durante 15 min.

### **III. CULTIVO DE PLANTAS**

#### **III.1. Esterilización y germinación de semillas**

Semillas seleccionadas de los diferentes genotipos utilizados se sometieron a una desinfección superficial mediante hipoclorito sódico comercial (35 g.L<sup>-1</sup> de cloro activo) al 20% (v/v) durante 15 minutos. A partir de este momento, todo el proceso se realizó bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar horizontal. Para eliminar el exceso de hipoclorito sódico el material desinfectado se aclaró 5 veces con agua destilada estéril. A continuación las semillas se pusieron a germinar en placas de Petri sobre una pila de papel de filtro humedecido con agua destilada estéril y se trasladaron a una estufa de germinación dónde permanecieron en oscuridad a 25°C durante un periodo de 2 a 5 días (según la variedad de *C. sativa* usada).



### **III.2. Cultivo hidropónico de plantas sobre soporte inerte**

#### ***En jarras Magenta***

Las semillas pregerminadas (radícula de 1-2 cm) se plantaron en jarras Magenta, de 300 mL de capacidad (Sigma), llenas de vermiculita lavada y esterilizada como sustrato inerte. Dos semillas fueron cultivadas en cada una de las jarras que se distribuyeron al azar en la cámara de cultivo y recibieron, cada dos días, un volumen adecuado de solución nutritiva diluida a la mitad con agua destilada estéril. Dependiendo de las necesidades del cultivo, una alternación con agua destilada estéril fue llevada a cabo por subirrigación.

#### ***En tubos de ensayo***

De la misma manera descrita anteriormente, las semillas se colocaron en tubos de ensayo de 24x150 mm (una por tubo) llenos de vermiculita y envueltos con una funda de papel opaco para proteger las raíces de la luz. El sistema de riego y condiciones de cultivo fueron los descritos para los cultivos realizados en jarras Magenta.

### **III.3. Cultivo *in vitro* de plántulas**

El cultivo *in vitro* de plántulas de cáñamo para la infección con *Agrobacterium* se llevó a cabo en placas de Petri de agar inclinado utilizando el medio B5½ (aproximadamente 20 mL/ placa). Las semillas germinadas se transfirieron (tres por placa) al borde superior del agar quedando la radícula incrustada en el mismo y la plántulas crecen convenientemente ancladas (Stiller *et al.*, 1997). Las placas se sellaron parcialmente con Parafilm®, se dispusieron verticalmente en bateas de polietileno apropiadas y se distribuyeron aleatoriamente en la cámara de cultivo.

### III.4. Condiciones de la cámara de cultivo

Todos los cultivos se realizaron en una cámara de cultivo que reúne las siguientes condiciones ambientales:

- Fotoperiodo: 16 h luz / 8 h oscuridad
- Temperatura: 25°C día / 20°C noche
- Humedad relativa: 60% día / 75% noche
- Intensidad luminosa: 350  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$  (400-700 nm) suministrada por fluorescentes Philips Cool White y Sylvania Gro-lux (65/35% respectivamente).

## IV. EXPERIMENTOS REALIZADOS

El presente estudio se ha estructurado en cinco bloques de experimentos:

- 1) Estudio del crecimiento y morfología de plantas de cáñamo cultivadas *in vivo* en condiciones controladas.
- 2) Estudio de la susceptibilidad de *C. sativa* a la infección con varias cepas de *Agrobacterium rhizogenes* y *A. tumefaciens*.
- 3) Cultivo y determinaciones realizadas para las raíces transformadas.
- 4) Análisis de los metabolitos secundarios en las raíces transformadas.
- 5) Estudio de la regeneración a partir de explantos de tejidos transformados y no transformados de *C. sativa*.

### IV.1. Estudio del crecimiento y morfología de plantas de cáñamo cultivadas *in vivo*

Previo a los experimentos donde se requirió el cultivo *in vitro* de plántulas de cáñamo tanto para la infección con *Agrobacterium* como para la regeneración, se procedió a evaluar la influencia de las condiciones de cultivo (temperatura,

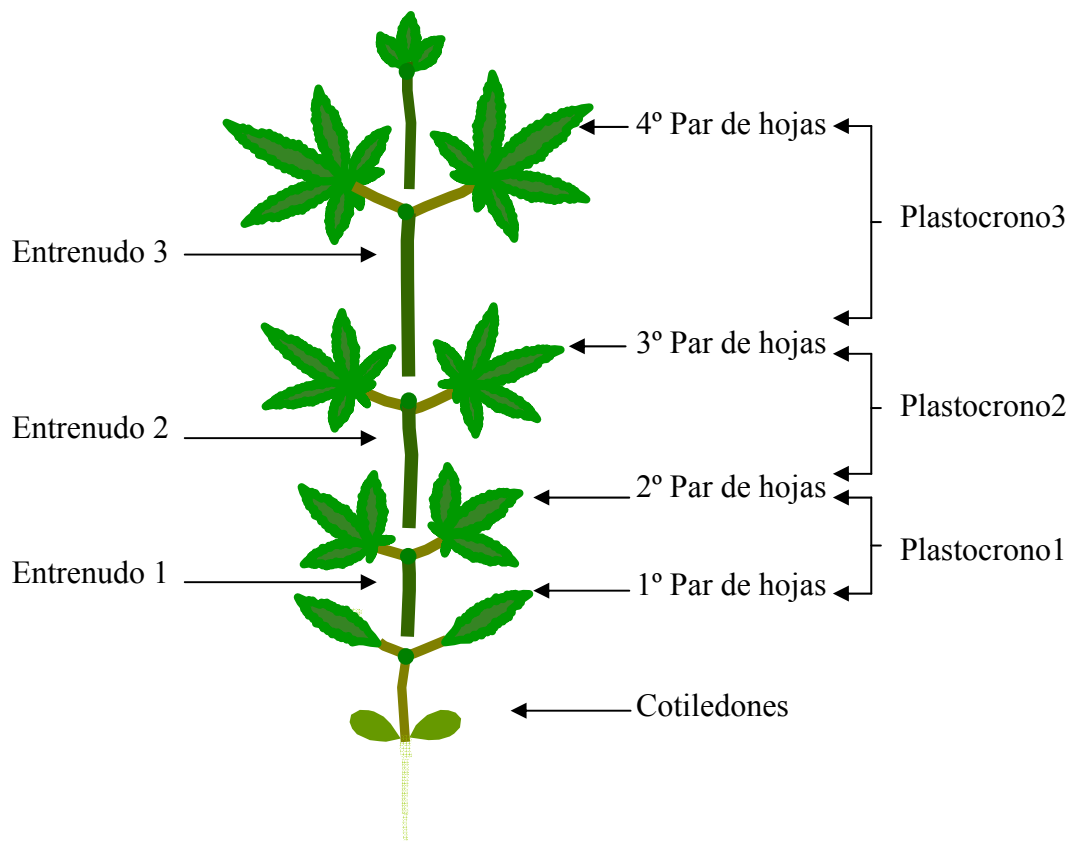
intensidad de luz y fotoperiodo elegidos) sobre el desarrollo de las plantas de cáñamo *in vivo*. Para ello se usaron 12 genotipos de cáñamo (Tabla 2) que incluyeron 7 accesiones con fenotipo droga (CAN0111, CAN0114, CAN0115, CAN0116, CAN0117, CAN0221, CAN0122), una accesión silvestre (CAN0120) y 4 cultivares destinados a la obtención de fibra (Uniko B, Kompolti híbrido TC, Fedora 19 y Felina 34). El estudio se organizó para evaluar el comportamiento de las plantas en las condiciones experimentales establecidas tanto en términos de morfología como de crecimiento comparando la velocidad de crecimiento de las plantas durante su ciclo vital y estimando la influencia del genotipo, fenotipo y sexo sobre el desarrollo de la planta.

Para ello el inicio del seguimiento de las plantas se consideró al aparecer el primer par de hojas verdaderas (hojas unifoliadas desplegadas  $\approx 5$  mm) y se extendió hasta el reconocimiento del sexo de la planta. De este modo, sólo las plantas dioicas fueron consideradas para este estudio mientras que los pies monoicos y aquellos con formas intersexuales fueron descartados, quedando con 8 a 12 plantas uniformes para cada genotipo. El experimento se repitió cuatro veces y cada dos días se determinaron, en plantas individuales, los parámetros que siguen (Figura 7):

- Número de hojas (hojas desplegadas de aproximadamente 5 mm de longitud).
- Tamaño de las hojas (cm) midiendo el foliolo central longitudinalmente.
- Número de folíolos en cada hoja.
- Tipo de filotaxia (alterna u opuesta).
- Medida del plastocrono siendo el tiempo transcurrido entre la aparición de dos pares de hojas consecutivos (Duarte *et al.*, 1994) e indicando la cinética de la filogénesis. Se han incluido en el estudio los cuatro primeros plastocronos empezando por las primeras hojas verdaderas.
- Número de entrenudos.
- Tamaño (cm) del entrenudo a madurez tomando la medida al estabilizarse el crecimiento del mismo (cuando la longitud es constante durante 3 medidas consecutivas).

- Tiempo de estabilización del crecimiento del entrenudo expresado con respecto a la edad de la planta y considerando los tres primeros entrenudos.
- Velocidad de crecimiento de los entrenudos durante el ciclo vegetativo.
- Tiempo para la aparición de yemas florales (floración).
- Tiempo para la discriminación del sexo de las flores.
- Longitud final de la planta medida al discriminarse el sexo de la misma

El análisis multifactorial de la varianza se realizó para los parámetros de crecimiento evaluados usando el STATGRAPHICS Plus 4.1.



**Figura 7.** Despiece y fracciones de una planta de *Cannabis sativa* cultivada *in vivo*.

## **IV.2. Estudio de la susceptibilidad de *C. sativa* a la infección con *Agrobacterium rhizogenes* y *A. tumefaciens***

En el presente bloque de experimentos, se usaron cinco genotipos de cáñamo (Tabla 2); dos accesiones con fenotipo droga: CAN0111 y CAN0221 y tres cultivares de fibra: Futura77, Delta-405 y Delta-llosa. Para la inoculación se usaron, dependiendo del experimento, las cepas de *Agrobacterium* recopiladas en la Tabla 3 organizándose el trabajo como se describe a continuación:

### **IV.2.1. Optimización del protocolo para la inoculación y la infección**

Debido a la casi total ausencia de información previa respecto de las condiciones experimentales usadas para la infección de *C. sativa* con *Agrobacterium*, nos hemos planteado, como primer e imprescindible paso en el presente trabajo, estudiar algunos factores determinantes en la interacción planta-bacteria con el fin de encontrar las condiciones experimentales óptimas. Dichos factores fueron principalmente el tipo de material a infectar (tipo de planta y órganos), protocolo de infección, junto con factores relacionados con la propia bacteria como la cepa usada para la infección, efecto de la activación de los genes de virulencia y tipo de inoculo usado. Así pues, en esta primera parte del trabajo hemos optado por usar por una parte la cepa súper virulenta de *A. rhizogenes* R1601 (R1500/pTVK291) de Pythoud *et al.* (1987), escogida debido a su alta virulencia contemplada en otras especies vegetales como *Solanum lycopersium* (João y Brown., 1994), *Paulownia elongata* (Bergmann *et al.*, 2004) y *Centranthus ruber* DC. (Granicher *et al.*, 1995), y por otra el genotipo CAN0221 de cáñamo elegido inicialmente por la disponibilidad de sus semillas, para realizar las siguientes pruebas:

#### ***Efecto del medio de inducción de los genes de virulencia “genes vir”***

En este experimento se usaron plántulas de 5 a 7 días (primer par de hojas verdaderas en desarrollo y segundo apareciendo) crecidas axénicamente en placas de Petri como se describe en la sección III.3. Para la inoculación se emplearon cultivos

bacterianos frescos, crecidos en medio YEM durante 48 horas a una temperatura de 27°C. La estimulación de los genes de virulencia de *Agrobacterium* se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Bond *et al.* (1996), de este modo, 1 mL de medio de inducción previamente preparado y esterilizado por filtración (0.22  $\mu\text{m}$ ) se adicionó a cada placa de cultivo 5 horas antes de la inoculación. Como control, el medio de inducción fue sustituido por agua destilada estéril. Al cabo del tiempo de incubación del cultivo bacteriano con el medio de inducción, los cultivos se resuspendieron en alícuotas de 1 mL de agua destilada estéril y se usaron para inocular las plántulas en dos sitios distintos en el hipocotilo mediante una jeringa, de 1 mL, estéril. Se ensayaron cinco medios de inducción distintos, tres medios simples y dos complejos, todos a base de acetosiringona:

- 1 Acetosiringona 20  $\mu\text{M}$  (Guivarc'h *et al.*, 1993).
- 2 Acetosiringona 100  $\mu\text{M}$ .
- 3 Acetosiringona 200  $\mu\text{M}$  (Bond *et al.*, 1996).
- 4 Medio de inducción MI1 de Gelvin y Liu (1994): acetosiringona 100  $\mu\text{M}$ , sacarosa 0.5% (p/v) y tampón MES 30 mM, pH 5.6.
- 5 Medio de inducción MI2: acetosiringona 200  $\mu\text{M}$ , sacarosa 2% (p/v) y citrato sódico 20 mM, pH 5.5 (Alt-Mörbe *et al.*, 1989).

En cada uno de los tratamientos ensayados se utilizó un número total de 30 a 45 plántulas y los experimentos se hicieron por duplicado.

### ***Efecto del tipo de inóculo***

Para ver el efecto de la preparación del inóculo sobre la respuesta de *C. sativa* a *Agrobacterium*, varios medios se emplearon para elaborar inóculos a partir de cultivos bacterianos de 48 h, realizados de la manera descrita en el apartado anterior. Así, tras activar los genes de virulencia usando acetosiringona (20  $\mu\text{M}$ ), las células bacterianas se resuspendieron en alícuotas de 1 mL de los diferentes medios ensayados (YEM, LB y B5) hasta conseguir un aspecto lechoso (Stiller *et al.*, 1997),

sustituyendo el medio utilizado para preparar el inóculo con agua destilada estéril en el caso del control. Los diferentes inóculos preparados se usaron para infectar plántulas crecidas axénicamente de la misma manera descrita en el apartado anterior. En otro experimento, las células bacterianas se depositaron, mediante una jeringa, directamente en la herida producida en la superficie vegetal sin haber usado medios para la preparación del inóculo. Para cada tratamiento se usaron 30 a 45 plántulas (inoculadas en dos sitios distintos del hipocotilo) y los experimentos se realizaron por duplicado.

### ***Influencia del tejido inoculado sobre la respuesta***

La influencia del tejido vegetal sobre la determinación de la respuesta se estudió inoculando plántulas de 5 a 7 días, crecidas axénicamente, con un cultivo bacteriano de 48 h. los genes de virulencia bacterianos se estimularon, previo a la infección, con acetosiringona 20  $\mu$ M y los inóculos fueron suspensiones celulares preparadas en agua estéril. Se inocularon hojas, cotiledones, hipocotilo y nudos cotiledonares utilizando, para cada tipo de tejido, 180 plántulas distribuidas en tres experimentos independientes. Así, las hojas se inocularon en la zona vascular central y los cotiledones en la cara inferior creando dos arañazos finos, de aproximadamente 5 mm, en la superficie mediante una jeringa estéril de 1 mL. Las heridas fueron paralelas a la vena central dejando en cada una un pequeño volumen del inóculo como fue descrito por Owens y Cress (1985). El hipocotilo y nudo cotiledonar se inocularon dejando un pequeño volumen de inóculo ( $\approx 10\mu$ L) en una fina herida provocada en la superficie del tejido vegetal tal y como fue descrito por Morgan *et al.* (1987) y Gold *et al.* (1991).

En otro experimento se usaron, al igual que el apartado anterior, plántulas de 5 a 7 días crecidas axénicamente para obtener explantos de hoja, cotiledón e hipocotilo. Los explantos de aproximadamente 1 cm para el hipocotilo y 0.5 cm<sup>2</sup> en caso de hojas y cotiledones se inocularon con un cultivo de *Agrobacterium* (R1601) preparado de la misma manera descrita para la inoculación de órganos *in vivo*. A continuación los tejidos inoculados se transfirieron a medio B5½ adicionado con

1.2% de agar (Sigma) y 3% de sacarosa donde permanecieron en cocultivo durante 48 h. Tras este periodo, los explantos se transfirieron a medio fresco de igual composición adicionado con 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de Cefotaxima (Sigma) para eliminar las agrobacterias. Para cada tipo de órgano se usaron 60 explantos y se realizaron tres repeticiones independientes.

Cabe mencionar que en todos los experimentos de inoculación, se procedió a la deposición de las placas que contienen plántulas o explantos inoculados en una cámara oscura, durante una noche, a una temperatura de 25°C (Stiller *et al.*, 1997) antes de trasladarlos a la cámara de cultivo.

#### **IV.2.2. Infectividad de cepas de *Agrobacterium* inductoras de raíces**

Se eligió probar la infectividad de las 8 cepas de *Agrobacterium rhizogenes* (Ar77, Ar78, Ar76, A424, A4 y R16, AR10 y AR10GUS) que figuran en la Tabla 3. La inoculación se llevó a cabo utilizando plántulas de cáñamo (procedentes del genotipo CAN0221) cultivadas *in vitro* durante 5 a 7 días que se infectaron, en dos sitios distintos en el hipocotilo, con cultivos bacterianos de 48 h activados con acetosiringona 20  $\mu\text{M}$  cinco horas antes de la inoculación. A partir de dichos cultivos, los inóculos se prepararon de la misma manera descrita anteriormente usando agua destilada estéril. Treinta a 45 plántulas se consideraron por cada cepa, y el experimento se realizó por duplicado.

Por otra parte, con el propósito de estudiar la capacidad de los genes *rol* por separado de inducir respuesta en plántulas de *C. sativa*, se utilizaron cepas de *A. tumefaciens* LBA4404 desarmadas portadoras de los genes *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*, *rolA+rolB* y *rolA+rolB+rolC* del pRi clonados dentro del vector de expresión pBin19, bajo control de sus propios promotores. Para cada cepa 90 plántulas fueron infectadas en dos sitios distintos en el hipocotilo siguiendo la metodología previamente descrita y los experimentos se realizaron por duplicado.



### IV.2.3. Influencia del genotipo y fenotipo de cáñamo sobre la respuesta a *Agrobacterium rhizogenes* y *A. tumefaciens*

Después de establecer las condiciones experimentales óptimas para la infección del cáñamo con *Agrobacterium* y seleccionar las cepas más virulentas de *A. rhizogenes*, se procedió a estudiar la influencia del genotipo y fenotipo de cáñamo usado sobre la respuesta de esta planta a la infección. Sólo las cepas A4 y AR10 han sido empleadas en el presente experimento, incluyendo también dos cepas silvestres de *A. tumefaciens*: C58 y I251 que nos han sido proporcionadas por el IVIA (Instituto Valenciano de Investigación Agraria, Valencia) y que fueron caracterizadas como muy virulentas. Así, plántulas de 5 a 7 días cultivadas *in vitro* y procedentes de cinco genotipos de cáñamo distintos (accesiones con fenotipo droga: CAN0111 y CAN0221, cultivares de fibra: Futura77, Delta-405 y Delta-Ilosa) se inocularon en dos sitios distintos en el hipocotilo siguiendo la metodología y condiciones previamente seleccionados para la inoculación (inducción de genes de virulencia con acetosiringona 20  $\mu\text{M}$ , inóculos preparados en agua estéril). Para cada genotipo y cepa, se usaron 30 a 45 plántulas y los experimentos se hicieron por duplicado.

Una vez finalizados los experimentos de evaluación de la susceptibilidad del cáñamo (distintos genotipos) a *Agrobacterium* (diferentes cepas), se planteó comparar la respuesta global de este genotipo con la de *Nicotiana tabacum*, que es una especie altamente susceptible a este patógeno. A este propósito se usaron plántulas de tabaco crecidas axénicamente durante 3 semanas realizándose el cultivo de la misma manera descrita para las plántulas de cáñamo. Las plántulas de tabaco se inocularon en el hipocotilo con las cepas Ar76, Ar77, Ar78, A424, AA, R16, AR10 y AR10GUS de *A. rhizogenes* y C58 y I251 de *A. tumefaciens* usando las mismas condiciones establecidas para la infección del cáñamo. Para cada tratamiento (cepa) y especie (cáñamo y tabaco) se usaron 30 a 45 plántulas y el experimento se repitió dos veces.

#### **IV.2.4. Determinaciones realizadas para evaluar la respuesta de *C. sativa* a la infección con *Agrobacterium***

Para cada uno de los experimentos realizados en este apartado, la respuesta de las plántulas (u órganos) de cáñamo a la inoculación con *Agrobacterium* se evaluó llevándose a cabo las determinaciones que siguen:

##### ***Determinaciones para A. rhizogenes***

- Frecuencia de respuesta (o frecuencia de inducción de raíces), expresada como porcentaje de sitios inoculados que han desarrollado respuesta positiva.
- Tiempo transcurrido entre la inoculación y la aparición de raíces en los sitios de inoculación con respuesta positiva. Este parámetro se consideró desde la aparición de la primera raíz en el sitio de infección.
- Número de raíces en cada sistema de raíces en cabellera (conjunto de raíces salientes de un sitio de infección) contabilizado justo antes de la muerte del sistema.
- Tamaño del sistema de raíces en cabellera midiendo la longitud media del conjunto de raíces.
- Vida media del sistema de raíces; contada desde la aparición de la primera raíz en el sitio de infección hasta la muerte del sistema (considerado senescente tras la muerte de más de la mitad de las raíces).

##### ***Determinaciones para A. tumefaciens***

- Frecuencia de respuesta expresada como porcentaje de sitios inoculados que han desarrollado tumores.
- Tiempo transcurrido entre la inoculación y aparición del tumor.
- Peso fresco y seco del tumor 10 días después de su aparición.
- Tamaño medio del tumor 10 días después de su aparición.

#### **IV.2.5. Realización de cultivos axénicos de raíces y tumores**

##### ***Cultivo de raíces***

El establecimiento de cultivos axénicos de raíces transformadas de *C. sativa* consistió en la eliminación de *Agrobacterium* de dichos cultivos. Para ello raíces adventicias emergentes de los sitios de infección se aislaron cuidadosamente y se cultivaron en medio MS adicionado con 3% de sacarosa, 0.6% de agar y 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de Cefotaxima (para eliminar la bacteria) incorporada al medio durante las dos primeras semanas de cultivo. Esta concentración se bajó a 300 y 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  consecutivamente cada dos semanas. Para los subcultivos a medio fresco se usaron fragmentos de raíces de 1 a 2 cm de longitud, uno por clon, que se cogieron de las zonas recién formadas y con crecimiento activo. De esta manera, al cabo de 6 semanas, los cultivos establecidos fueron totalmente axénicos de forma que no se notó ningún desarrollo bacteriano cuando se cesó el uso del antibiótico. Durante todo el proceso los cultivos se mantuvieron en oscuridad a una temperatura de 25°C.

##### ***Cultivo de tumores***

En lo que respecta a los tumores, una primera descontaminación en medio MS líquido (3% de sacarosa) adicionado con 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de Cefotaxima fue necesaria para conseguir la eliminación de la bacteria. Así, los tumores separados de las plántulas se cultivaron en matraces de 100 mL con 30 mL de medio (a razón de 10 tumores por matraz), los cuales se colocaron en un agitador orbital a una velocidad de agitación de 100 rpm a una temperatura de 25°C. Los cultivos se mantuvieron en este medio durante 48 h antes de transferirlos a medio MS fresco adicionado con 0.6% de agar y 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de Cefotaxima. A partir de allí, se subcultivaron fragmentos de aproximadamente 5 mm cogidos de las zonas con crecimiento activo siguiendo el mismo procedimiento de descontaminación utilizado para las raíces, con la única diferencia de que los cultivos de tumores se realizaron en la cámara de cultivo en presencia de la luz.

## **IV.2.6. Determinación de la naturaleza transformada de las raíces y tumores**

### **IV.2.6.1. Crecimiento en medio sin fitohormonas**

A partir de cultivos axénicos previamente establecidos de raíces y tumores se cortaron, respectivamente, fragmentos de 10 y 5 mm de zonas con crecimiento activo y se cultivaron en medio MS adicionado con 3% de sacarosa y 0.6% de agar. El medio fue libre de todo tipo de reguladores de crecimiento deduciendo que, en estas condiciones, el crecimiento del tejido vegetal se debe a la expresión de los oncogenes que se le transfirieron en el T-DNA bacteriano. Por otra parte, a partir de plántulas de cáñamo de 7 a 10 días (genotipo CAN0221), procedentes de un cultivo axénico y no inoculadas, se cortaron explantos de 1 cm de raíz e hipocotilo y se cultivaron en medio de cultivo de composición igual, para usarse como controles para las raíces y tumores respectivamente. Los cultivos se realizaron durante un mínimo de cuatro semanas en oscuridad y a una temperatura de 25°C para las raíces y bajo iluminación (cámara de cultivo) para los tumores y los esquejes de hipocotilo. Se usaron 6 placas Petri, cada una con 10 explantos, para cada tipo de tejido y el experimento se realizó en duplicado.

### **IV.2.6.2. Detección y evaluación del gen *gusA***

Este gen, procedente de *E. coli*, codifica por la enzima  $\beta$ -glucuronidasa que cataliza la reacción de hidrólisis de los  $\beta$ -D-glucuronidos. La hidrólisis del sustrato incoloro produce un precipitado de color, detectable visualmente (Jefferson *et al.*, 1987). La actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa en las raíces transformadas de cáñamo se demostró mediante tinción histoquímica siguiendo el protocolo de Jefferson (1987). Para ello se utilizaron raíces transformadas inducidas por la cepa AR10GUS (Tabla 3) de *A. rhizogenes* portadora de gen *gusA*. Así, fragmentos de 1 a 2 cm cortados a partir de un cultivo axénico de la línea de raíces AR10 junto con sistemas completos de raíces en cabellera, separados directamente de la planta infectada, se incubaron con el sustrato cromogénico X-Glu durante una noche a una

temperatura de 37°C como se describe en V.I. Como control negativo se usaron fragmentos de raíces de 1 cm procedentes de plántulas de cáñamo, CAN0221, de 7 a 10 días cultivadas axénicamente.

#### **IV.2.6.3. Detección de los genes bacterianos mediante PCR**

La presencia de los genes estudiados en este trabajo: genes *rolB*, *rolC* e *ipt* en el ADN de las diferentes raíces transformadas y tumores respectivamente, se analizó mediante reacción en cadena de polimerasa “PCR” (V.2. apartado de Metodología). Para ello diez líneas de raíces transformadas establecidas (C55, C70, CABC, CAR10, C1601 y C1602, C1701, C1801, C1901 y C2701) procedentes de varias combinaciones cepa bacteriana/genotipo de planta se eligieron para este análisis y fueron las usadas en los experimentos realizados posteriormente. En cambio, sólo dos líneas de tumores procedentes de la inoculación del genotipo CAN0221 de cáñamo con las cepas C58 y I251 fueron consideradas debido a que el presente trabajo estuvo enfocado principalmente sobre las raíces transgénicas. La ausencia de contaminación con *Agrobacterium* en los tejidos analizados se comprobó mediante amplificación del gen *virG*, exclusivamente bacteriano.

Como control negativo se consideraron raíces y hojas (para raíces transformadas y tumores respectivamente) procedentes de plantas de *C. sativa* (genotipo CAN0221) crecidas durante 15 días en cultivo hidropónico en tubos de ensayo como se describe en III.2, mientras que el control positivo consistió en una dilución (preparada en agua) de un cultivo fresco de 48 h de la misma cepa inductora de los tejidos transformados.

#### **IV.3. Cultivo y determinaciones realizadas para las raíces transformadas**

Como se mencionó anteriormente, los experimentos realizados en este apartado se enfocaron exclusivamente sobre las raíces transformadas que

representaron el material objeto de este estudio. Para ello se realizaron los experimentos y determinaciones que se detallan a continuación:

### **IV.3.1. Determinaciones realizadas en medio sólido**

#### **IV.3.1.1. Cultivo**

Todos los cultivos realizados en medio de cultivo sólido se llevaron a cabo cultivando, en placas Petri con 20 mL de medio solidificado con 0.6% de agar, fragmentos terminales de raíces transformadas de 1 cm de longitud procedentes de cultivos axénicos previamente establecidos. Se eligió usar fragmentos de raíces que llevaron 3 a 6 ramificaciones y que tuvieron aproximadamente 3 mg de peso fresco (lo que corresponde a 0.3 mg de peso seco). Una vez realizados los cultivos, las placas fueron selladas parcialmente con Parafilm<sup>®</sup> y trasladadas a una estufa de cultivo donde permanecieron a 25°C en oscuridad. En todos los experimentos las raíces se subcultivaron semanalmente a medio fresco de igual composición.

#### **IV.3.1.2. Efecto de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento y la morfología de las raíces**

En este experimento se usaron 60 clones de raíces transformadas distintos, elegidos al azar, que fueron procedentes de varias combinaciones cepa/genotipo y cultivados durante más de seis semanas en medio sin fitohormonas en presencia de Cefotaxima. Así, a partir de los citados clones, se cogieron explantos de raíces de 1 cm y se cultivaron en los medios apropiados. Se eligió estudiar, en el presente experimento, el efecto de las concentraciones de sales y de sacarosa sobre la morfología y el crecimiento de las raíces. Para cada tratamiento se utilizaron 40 explantos (10 explantos por placa de cultivo) y los experimentos se repitieron cuatro veces. La evaluación del crecimiento de las raíces expresado como biomasa acumulada (peso fresco y peso seco acumulados por cultivo) se llevó a cabo semanalmente durante un periodo de cultivo de 5 semanas.

### ***Efecto de la concentración de sales***

Primero se estudió la influencia de la concentración de sales en el medio de cultivo sobre el crecimiento y la morfología de las raíces transformadas de cáñamo eligiendo ensayar cuatro medios diferentes: MS, MS $\frac{1}{2}$  (sales del medio MS diluidas a la mitad y vitaminas a concentración normal), B5 y B5 $\frac{1}{2}$  que fueron adicionados con el 3% de sacarosa.

### ***Efecto de la concentración de sacarosa***

En otro experimento se analizó el crecimiento y la morfología de las raíces transformadas en presencia de 4 concentraciones distintas de sacarosa 1, 3, 5 y 7% (p/v) usando el MS como medio base. El medio MS sin sacarosa sirvió de control.

#### **IV.3.1.3. Cinética de crecimiento de las raíces en medio sólido**

Una vez determinadas las concentraciones óptimas de sales y de sacarosa en el medio de cultivo, se seleccionaron dos líneas de raíces transformadas de *C. sativa* para estudiar su cinética de crecimiento en las condiciones de cultivo fijadas. Así pues, se eligió la línea C55 inducida usando el genotipo CAN0221 de cáñamo y la cepa A4 de *A. rhizogenes* (plásmido pRiA4), y la línea CABc inducida en el mismo genotipo con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 desarmada, portadora de los genes *rolA*, *rolB* y *rolC* del pRiA4 clonados dentro del vector de expresión pBin19, bajo control de sus propios promotores (Tabla 3). El motivo de selección de estas líneas se basó por una parte sobre su buen crecimiento durante la fase de estabilización y por otra sobre el uso, para su inducción, de una cepa bacteriana completa y otra con de solo 3 genes *rol*. Los cultivos se iniciaron cultivando fragmentos de raíces de 1 cm (procedentes de cultivos axénicos) en medio MS adicionado con 3% de sacarosa, para cada línea se usaron 40 explantos y los experimentos se repitieron cuatro veces. La biomasa acumulada en cada cultivo se evaluó periódicamente cada 7 días durante un periodo de 4 semanas.

#### IV.3.1.4. Determinación del crecimiento

Con el fin de evaluar el crecimiento de las raíces a lo largo de todos los experimentos realizados en este apartado, cada semana y durante el periodo previsto para el cultivo, el crecimiento de las raíces se cuantificó en términos de peso fresco y peso seco:

- Peso fresco (PF): para ello las raíces se despegaron cuidadosamente del medio de cultivo para determinar su peso.
- Peso seco (PS): las raíces se mantuvieron a 70°C durante 24 h en una estufa de secado.
- Morfología de las raíces: se determinó visualmente utilizando una lupa binocular.

A partir de los datos de PF y PS obtenidos se calcularon dos parámetros de crecimiento de las raíces que fueron la tasa de crecimiento (Tc) y el índice de crecimiento (Ic):

- Tc (mg/días):  $P_f - P_i / T_f - T_i$ , siendo el  $T_f - T_i$  el tiempo que limita dos medidas consecutivas, en nuestro caso ha sido siempre 7 días.
- Ic:  $P_f / P_i$ : donde  $P_f$  corresponde al peso final y  $P_i$  al peso inicial del inóculo.

#### IV.3.2. Determinaciones realizadas en medio líquido

En este bloque de experimentos se utilizaron, en un primer tiempo, las líneas de raíces transformadas C55 y CABC con el fin de optimizar el cultivo en medio líquido para la obtención de biomasa. A continuación, las condiciones optimizadas se emplearon para cultivar otras líneas de raíces con el fin de realizar las determinaciones previstas en el presente trabajo.



#### **IV.3.2.1. Cultivo**

El cultivo en medio líquido se inició inoculando fragmentos terminales de 1 cm de longitud con 3 a 6 ramificaciones (3 mg PF/0.3 mg PS), cortados a partir de cultivos estabilizados de raíces, en 30 mL de medio de cultivo sin agente solidificante (agar) usando matraces de 100 mL. A continuación los matraces se colocaron en un agitador orbital a una velocidad de 110 rpm, una temperatura de 25°C y en oscuridad. La evaporación del agua durante los 7 días que duraban los ciclos de subcultivo ha sido mínima (menor al 5%) lo que no implicó la adición de agua destilada estéril a los matraces para corregir este factor.

#### **IV.3.2.2. Efecto de la concentración y fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y la morfología de las raíces**

Las líneas C55 y CABC fueron cultivadas en medio MS reconstituido llevando las concentraciones de nitrato y amonio requeridas para cada tratamiento. Así, primero se fijó el amonio a 20.5 mM variando la concentración del nitrato (0, 15, 39.5 y 98.75 mM) y después se varió el amonio (0, 8, 20.5 y 51.25 mM) usando 39.5 mM de nitrato. Las concentraciones fueron seleccionadas según un análisis factorial eligiendo probar las concentraciones superiores e inferiores 2.5 veces a las del medio MS, juzgando que puedan así, permitir ver diferencias significativas sin inducir la muerte celular por exceso o carencia de nitrógeno (Bensaddek *et al.*, 2001). Para ello se preparó el medio MS sin nitrógeno y se le añadió, según las combinaciones requeridas, nitrato potásico  $\text{KNO}_3$  como fuente de nitrato y sulfato amónico  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de amonio. Los valores 39.5 mM y 20.5 mM representan respectivamente las concentraciones de nitrato y amonio presentes en el medio MS utilizado como control. La evaluación de la morfología y crecimiento de las raíces se realizó después de 3 semanas de cultivo al cabo de las cuales las raíces de cada matraz se recuperaron para determinar su peso fresco y peso seco. Para cada tratamiento y línea se consideraron 10 matraces, llevando cada uno un cultivo independiente, y el experimento se repitió cuatro veces.

#### **IV.3.2.3. Cinética de crecimiento de las raíces en medio líquido**

Para estudiar el crecimiento de las raíces transformadas de cáñamo en medio líquido se cultivaron raíces procedentes de las líneas C55 y CABC en medio MS adicionado con el 3% (p/v) de sacarosa, siguiendo el protocolo previamente descrito (IV.3.2.1). Las determinaciones del peso fresco y del peso seco se realizaron semanalmente durante un periodo de 4 semanas y los valores definitivos fueron, para cada línea, la media de 160 repeticiones repartidas en cuatro experimentos independientes.

#### **IV.3.2.4. Determinación del crecimiento**

Las determinaciones realizadas en estos experimentos fueron las mismas descritas para los cultivos en medio sólido (Sección IV.3.1.4) evaluando para cada cultivo:

- **Peso fresco:** en este tipo de medio las raíces recuperadas de cada cultivo se secaron entre varias capas de papel de filtro para eliminar el exceso de medio antes de registrar su peso fresco.
- **Peso seco.**
- **Morfología de las raíces.**
- **Velocidad de crecimiento.**
- **Índice de crecimiento.**

#### **IV.3.2.5. Determinaciones fisiológicas y bioquímicas**

Se eligieron realizar algunas determinaciones que pudieran estar relacionadas con el metabolismo nitrogenado como la producción de etileno y la actividad de la enzima nitrato reductasa. Para ello se emplearon 10 líneas estabilizadas de raíces transformadas de *C. sativa* (C55, C70, C1601, C1602, CAR10, CABC, C1801, C1901, C1701 y C2701) con diferentes morfologías y

procedencias (cepa/genotipo) realizando los cultivos en las condiciones previamente optimizadas. Así, fragmentos de raíces de 1 cm ( $\approx$ 3 mg PF/ 0.3 mg PS) se cultivaron en medio MS líquido adicionado con 3% de sacarosa en un agitador orbital a una velocidad de 110 rpm, en oscuridad y a 25°C. Los subcultivos a medio fresco se realizaban cada 7 días durante un periodo de 3 semanas. Al cabo del periodo de cultivo se realizaron las determinaciones que siguen:

- Producción de etileno en las raíces transformadas

El etileno ( $C_2H_4$ ) es una hormona vegetal en estado gaseoso, que regula un amplio rango de procesos vegetales, que van desde el propio crecimiento y desarrollo hasta la respuesta de defensa de la planta (Mattoo y Sutte, 1991; Abeles *et al.*, 1992). La producción de etileno puede ser inducida por varios factores de estrés, tanto bióticos como abióticos (Wang *et al.*, 2002), razón por la cual, muchos investigadores la relacionaron con la producción de metabolitos secundarios en muchas especies (Fan *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2001; El-Kereamy *et al.*, 2003). No obstante, otros científicos demostraron el efecto inhibitorio del etileno sobre la acumulación de metabolitos secundarios en cultivos celulares (Shibli *et al.*, 1997) al igual que en cultivos de raíces transformadas (Pitta-Alvarez *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004).

A raíz de lo que se ha comentado, se determinó la producción de etileno en las raíces transformadas de *C. sativa* para evaluar posteriormente su relación con los metabolitos secundarios en este material. Así, previo a la determinación del etileno en las diferentes líneas de raíces, se estableció una curva de producción de etileno en este material durante el periodo de cultivo. Para ello la producción de etileno en la línea C55, elegida al azar, se determinó semanalmente durante un periodo de 4 semanas. Después, en base a los resultados obtenidos, se usaron cultivos de raíces de 3 semanas para determinar etileno. Como control se usaron raíces procedentes de plantas de *C. sativa* (genotipo CAN0221), crecidas en cultivo hidropónico en tubos de ensayo durante 3 semanas. La producción de etileno se cuantificó mediante

cromatografía de gases como se describe en el apartado V.3. de Metodología. Para cada línea se consideraron 12 repeticiones y el experimento se hizo por duplicado.

▪ Actividad de la enzima nitrato reductasa

La nitrato reductasa (NR) es la primera enzima que interviene en la asimilación del nitrato por las plantas (Chopra, 1983), siendo éste la principal fuente de nitrógeno para muchas especies vegetales. La NR es una enzima clave en el metabolismo nitrogenado (Tischner, 2000) por lo que estaría estrechamente relacionada con la biosíntesis de compuestos nitrogenados como es el caso de los alcaloides. Además NR parece jugar un importante papel importante durante la interacción planta patógeno (Modolo *et al.*, 2006). La actividad nitrato reductasa en las raíces transformadas de *C. sativa* se determinó mediante el ensayo *in vitro* (V.4) usando 4 repeticiones para cada línea y repitiendo el experimento 4 veces. Como control se usaron raíces procedentes de plantas no transformadas como se describe para la determinación de etileno.

#### **IV.4. Análisis de los metabolitos secundarios en las raíces transformadas**

##### **IV.4.1. Cultivo de raíces para obtención de biomasa**

El análisis del contenido de metabolitos secundarios en las raíces transformadas de *C. sativa* se llevó a cabo usando las diez líneas de raíces estabilizadas (C55, C70, CABC, CAR10, C1601, C1602, C1701, C1801, C1901 y C2701) que se emplearon para las determinaciones fisiológicas y bioquímicas. Para ello, cultivos de raíces transformadas de cada línea se cultivaron de la misma manera descrita en el apartado anterior durante 3 semanas. Al cabo de este tiempo, se recuperaron las raíces de 6 matraces, para cada línea, se lavaron con agua destilada y se secaron con papel de filtro y se determinó el peso fresco. Finalmente las raíces de cada línea se mezclaron homogéneamente, se congelaron en nitrógeno líquido durante 5 a 10 min, se liofilizaron durante 24 horas y se guardaron a -20°C hasta su análisis. Por otra parte, muestras de raíces y hojas de plantas de cáñamo del genotipo

CAN0221 (fenotipo droga) y del cultivar Delta-Ilosa (fenotipo fibra), crecidas durante 3 semanas en cultivo hidropónico en tubos de ensayo sirvieron como controles. Las hojas y raíces (lavadas abundantemente con agua destilada para eliminar los restos de vermiculita) se prepararon de la misma manera descrita para las raíces transformadas. El experimento se repitió al menos una vez, llevándose a cabo las determinaciones que siguen:

- Determinación de cannabinoides: THC, CBD y CBN
- Determinación de alcaloides: atropina, colina y muscarina.

#### **IV.4.2 Aplicación de elicitores para incrementar la producción de alcaloides**

En base a los resultados previamente obtenidos en la primera fase del trabajo (apartado anterior), las líneas C1801 y CABC de raíces transformadas se seleccionaron para llevar a cabo los experimentos de elicitación. Los elicitores ensayados en el presente estudio se eligieron en base a su eficiencia en incrementar la producción de varias clases de alcaloides en un gran rango de especies vegetales. Asimismo se optó por usar el metiljasmonato (MeJa) como elicitor abiótico y como elicitor biótico el hongo *Fusarium oxysporum* conocido por su alta virulencia frente a las raíces de *C. sativa* (McPartland, 1996).

##### **IV.4.2.1. Preparación de los elicitores**

###### ***Preparación del metiljasmonato***

Una solución concentrada de MeJa (Aldrich Chemical Co.) se preparó en etanol absoluto (grado analítico) y se usó para preparar las diluciones requeridas de manera a suministrar, a todos los cultivos, volúmenes mínimos e iguales de etanol (7 µL a cada matraz). Finalmente las soluciones de MeJa preparadas se esterilizaron por filtración a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.22 µm (Millipore) y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

### ***Preparación del filtrado del hongo***

Los cultivos de *Fusarium oxysporum* se mantuvieron en medio PDA sólido a temperatura ambiente y sirvieron para iniciar nuevos cultivos utilizados en los tratamientos de elicitación. Así, 4 a 6 fragmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de micelio se transfirieron a matraces de 250 mL con 100 mL de caldo de CZAPEK-DOX y los cultivos se mantuvieron a 25°C sin agitación durante 20 días. Al cabo de este periodo, que se corresponde con la fase de crecimiento estacionaria del hongo, los cultivos se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 min, se filtró el medio de cultivo con el hongo a través de papel de Wattman y finalmente el filtrado recuperado asépticamente se guardó a 4 °C hasta su uso.

#### **IV.4.2.2. Adición de elicitores**

Se usaron raíces cultivadas, durante 3 semanas, en las condiciones descritas en el apartado V.4.1 (final de la fase de crecimiento lineal). Tras este periodo las raíces se subcultivaron a medio fresco adicionado con las concentraciones apropiadas de cada elicitor y se mantuvieron en incubación en el mismo durante 96 h. El filtrado del medio (FM) de *Fusarium oxysporum* se adicionó al medio a las concentraciones 1, 3 y 5% (v/v) las cuales se eligieron a base de trabajos realizados anteriormente sobre material parecido de otras especies (Bais *et al.*, 2000; Savitha *et al.*, 2005). De la misma manera, se eligieron las concentraciones 1 y 10 µM de MeJa (Zabetakis *et al.*, 1999; Bais *et al.*, 2002). Para ambas líneas de raíces, se recuperaron cultivos de raíces no elicidadas al mismo tiempo que las raíces tratadas (24 días) y se usaron como control. Al cabo del periodo de incubación los cultivos de raíces procedentes de un mínimo de 6 matraces por tratamiento y línea se recuperaron, se lavaron abundantemente con agua destilada y se secaron con papel de filtro para determinar su peso fresco. Finalmente las raíces de cada tratamiento se mezclaron y se congelaron en nitrógeno líquido antes de su liofilización. La extracción y análisis de alcaloides mediante electroforesis capilar se llevó a cabo como se describe en la sección V.5. Para cada tratamiento y línea 6 (biomasa) y 3 (contenido en alcaloides) repeticiones procedentes de dos experimentos independientes.

## **IV.5. Estudio de la capacidad de regeneración a partir de tejidos transformados y no transformados de *C. sativa***

### **IV.5.1. Regeneración a partir de raíces transformadas**

Por falta de información relacionada con la regeneración a partir de raíces transformadas de *C. sativa* los estudios de callogénesis y organogénesis, en este material, se llevaron a cabo usando una serie de combinaciones hormonales elegidas inicialmente en base a trabajos realizados en raíces transformadas de *Lotus japonicus* (Stiller *et al.*, 1997), *Catharanthus roseus* (Choi *et al.*, 2004) y *Populus deltoides* (Han *et al.*, 1997) o en tejidos no transformados de cáñamo (Hemphill *et al.*, 1978; Mandolino y Ranalli, 1999). A partir de allí se variaron las concentraciones de las fitohormonas usando como auxinas el ANA, AIA y 2,4-D y como citoquininas la BA y la Kinetina, a las concentraciones que figuran en la Tabla 5. Como medios base se usaron el B5 y el MB (macro y micronutrientes del medio MS y vitaminas del B<sub>5</sub>) solidificados con 0.6% (p/v) de agar. En un primer tiempo se estudió la respuesta de varias líneas de raíces transformadas procedentes de diferentes combinaciones cepa/genotipo (A4/CAN0221, AR10/CAN0221, R16/CAN0221, LBA-rolABC/CAN0221, A4/Futura77 y AR10/Futura77), con distintas morfologías, en el medio de regeneración n° 1 (Tabla 5) usando un número total de 60 explantos por tratamiento y línea y los experimentos se repitieron 4 veces. Para ello fragmentos terminales de raíces de 1 cm se cortaron cuidadosamente a partir de cultivos axénicos de 3 semanas, realizados en medio MS sólido (3% de sacarosa y 0.6% de agar, pH 5.8), y se cultivaron en el medio n° 1. En base a los resultados obtenidos se seleccionó la línea procedente de la combinación A4/CAN0221 para estudiar el efecto de los demás medios de regeneración. Así, los explantos se cultivaron en los distintos medios de regeneración presentes en la Tabla 5 a razón de 10 por placa usando 6 placas para cada tratamiento. Las placas se mantuvieron en las condiciones de la cámara de cultivo y se subcultivaron a medio fresco de igual composición cada 15 días. Los experimentos se repitieron al menos 4 veces realizando, al cabo de 6 semanas de cultivo, las determinaciones que se describen a continuación:

- Frecuencia de callogénesis (número de explantos que forman callos)
- Frecuencia de callos con “Memoria hairy roots” (MHR) que representa el número de callos que exhiben una proliferación incontrolada de raíces plagiotrópicas
- Frecuencia de caulogénesis que representa el número de callos que desarrollan yemas o tallos
- Tamaño del callo (midiendo el diámetro medio del callo)
- Peso fresco y peso seco.

En otro experimento, al objeto de investigar el efecto del cambio de la composición hormonal del medio y de los sucesivos subcultivos sobre la habilidad organogénica de los callos, fragmentos de 0.5 cm de callos no rizogénicos, inducidos a partir de explantos de raíces transformadas en el medio nº 3 (Tabla 5) y cultivados en el mismo durante 6 semanas, se subcultivaron al mismo medio y a los medios nº 7, 16 y 17 (Tabla 5) en los cuales se mantuvieron durante 12 semanas. A cada medio se subcultivaron 60 fragmentos de callo (10/placa) los cuales se mantuvieron en las condiciones de la cámara de cultivo realizando, cada 15 días, subcultivos a medio fresco de igual composición. Finalmente el experimento se repitió 3 veces.

#### **IV.5.2. Efecto del antiauxinas sobre la organogénesis**

Para investigar las causas de la excesiva formación de raíces en los callos procedentes de raíces transformadas, se incorporó el inhibidor de la acción de auxinas ácido p-clorofenoxiisobutírico (PCIB) (Aldrich), desde el principio del cultivo, al medio de regeneración nº 2 (Tabla 5) libre de auxinas. En este medio se cultivaron explantos terminales de 1 cm de raíces, procedentes de un cultivo axénico de 3 semanas de la línea C55, en presencia de varias concentraciones de PCIB: 0, 10, 20, 40, 70 y 100  $\mu$ M. Los cultivos se mantuvieron durante 6 semanas en la cámara de cultivo realizándose subcultivos a medio fresco de igual composición cada 15 días. En cada tratamiento se usaron 60 explantos y el experimento se repitió 4 veces. Al cabo del periodo de cultivo, los parámetros determinados fueron:



- Frecuencia de callogénesis (número de explantos que forman callos)
- Frecuencia de callos con “Memoria hairy roots” (MHR)
- Frecuencia de callos que forman yemas o tallos
- Tamaño de los callos formados
- Número y tamaño de raíces formadas en cada callo.

**Tabla 5.** Combinaciones y concentraciones de fitohormonas utilizadas para la inducción de callos y la regeneración a partir de raíces transformadas de *C. sativa*. Kin: Kinetina.

Nº de medio	Medio base	Sacarosa (%)	pH	Fitohormonas ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	
1	B5	2	5.5	BA 0.5	ANA 0.05
2	B5	2	5.5	BA 1.0	ANA 0.05
3	B5	2	5.5	BA 1.5	ANA 0.05
4	B5	2	5.5	BA 2.0	ANA 0.05
5	B5	2	5.5	BA 4.0	ANA 0.05
6	B5	2	5.5	BA 0.5	ANA 0.0
7	B5	2	5.5	BA 0.5	ANA 0.025
8	B5	2	5.5	BA 0.5	ANA 0.1
9	B5	2	5.5	BA 0.5	ANA 0.2
10	B5	2	5.5	BA 0.5	ANA 0.5
11	B5	2	5.5	BA 0.5	ANA 1.0
12	B5	2	5.5	BA 0.5	ANA 3.0
13	B5	2	5.5	Kin 0.5	ANA 0.025
14	B5	2	5.5	Kin 1.0	ANA 0.05
15	B5	2	5.5	Kin 1.5	ANA 0.05
16	MB	3	5.8	BA 0.1	2,4-D 3.0
17	MB	3	5.8	BA 0.1	2,4-D 5.0
18	MB	3	5.8	Kin 1.0	AIA 1.0
19	MB	3	5.8	Kin 1.0	AIA 0.25
					ANA 0.25
					2,4-D 0.2

### **IV.5.3. Regeneración a partir de explantos de hipocotilo transformados con *A. tumefaciens***

#### **IV.5.3.1. Cocultivo e inducción de callogénesis**

Para la transformación se utilizó la cepa EHA105 (Hood *et al.*, 1993) de *A. tumefaciens* (Tabla 3) que lleva como vector auxiliar el plásmido pTiBo542, y como vector binario pMOG410 que porta el gen quimérico *nos.nptII* que confiere resistencia a kanamicina, y como gen informador, el gen CaMV35S*gus.INT*. Como material vegetal se usaron explantos de hipocotilo procedentes de plántulas de cáñamo del genotipo CAN0221 cultivadas *in vitro* durante 7 a 10, y se siguió, para la transformación, el protocolo descrito por Horlemann *et al.* (2003) para transformar el lúpulo (*Humulus Lupulus*, *Cannabáceas*). Así, a partir de una colonia bacteriana individual, se inició un nuevo cultivo de la cepa EHA105 en medio YEM adicionado con Kanamicina<sup>100</sup> y Rifampicina<sup>100</sup> y se permaneció a 27° C durante 48 h. Los genes de virulencia se activaron con acetosiringona 20 µM 5 horas antes del cocultivo, y entonces las agrobacterias se resuspendieron en el medio de cultivo nº 5 líquido (Tabla 6) y se diluyeron en el mismo hasta una densidad óptica DO<sub>600</sub> de 0.5. Este medio se repartió en placas de Petri de 9 cm y se usó para cultivar fragmentos de hipocotilo de 1 cm cortados a partir de las plántulas en condiciones asépticas. Los cultivos se mantuvieron primero en agitación suave a temperatura ambiente durante 30 min y se subcultivaron a continuación al medio nº 5 solidificado con el 0.6% (p/v) de agar para el cocultivo durante 48 h en las condiciones de la cámara de cultivo (Figura 8). Tras este tiempo, los explantos se recolectaron y se lavaron 5 veces con agua destilada estéril incorporando en los 2 últimos lavados 500 µg.mL<sup>-1</sup> de Cefotaxima y después se cultivaron (a razón de diez explantos por placa) en placas de Petri con diferentes medios para la inducción del tallo (Tabla 6). Como medio base se usó el medio MB (pH 5.8) adicionado con 2% de glucosa, 0.6% de agar, 50 mg.L<sup>-1</sup> de Kanamicina y 500 mg.L<sup>-1</sup> de Cefotaxima que se eliminó del medio en el segundo subcultivo (después de 4 semanas del inicio del cultivo).

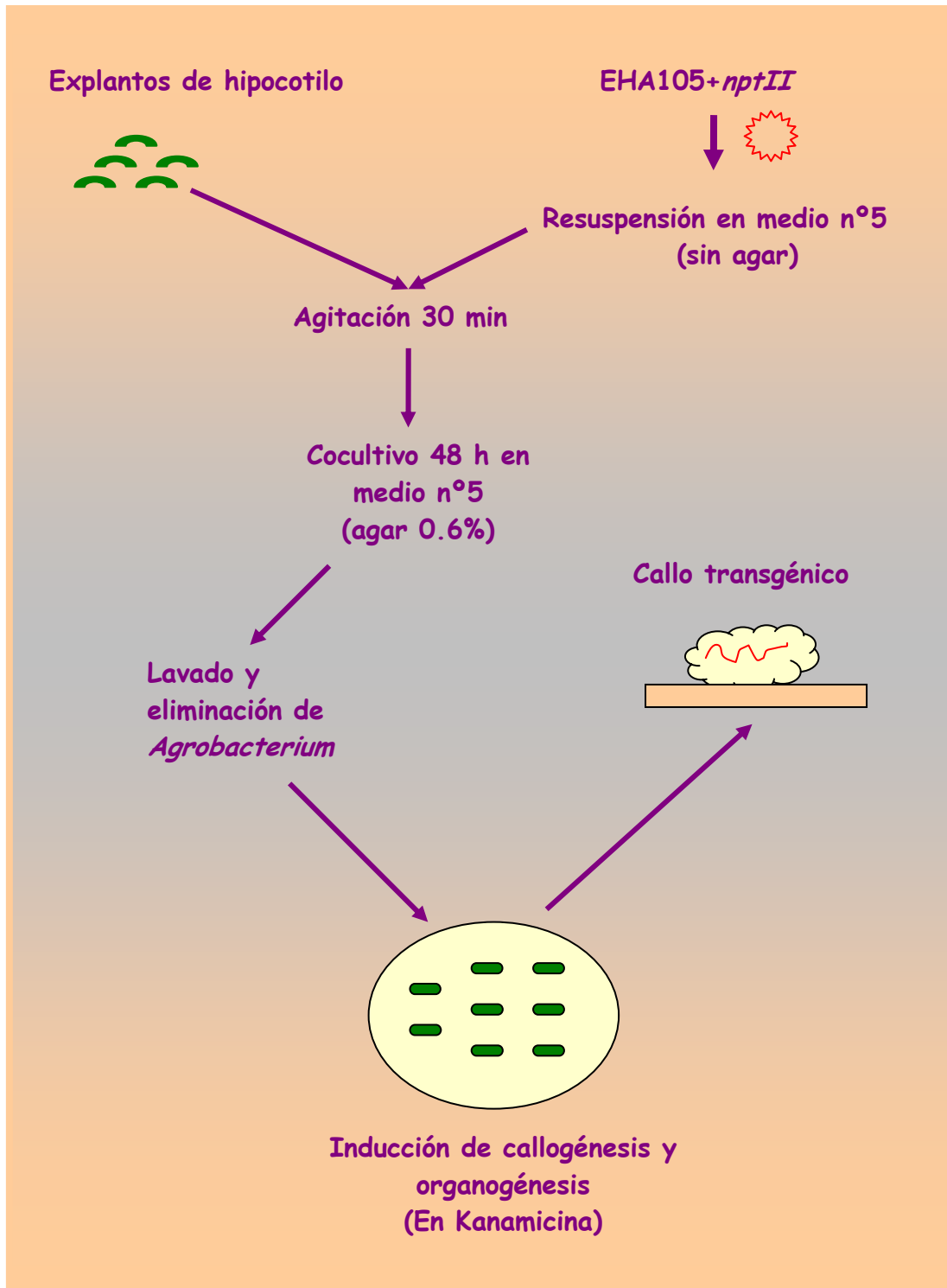
Como citoquinina se utilizó el Tidiazurón (conocido por su acción inhibidora de la rizogénesis) y como auxina el ácido indolacético AIA, a las

concentraciones que figuran en la Tabla 6. Para cada tratamiento se usaron 60 explantos de hipocotilo transformados y como control se cultivaron explantos de hipocotilo no transformados (60 explantos) en medio n° 5. Los subcultivos a medio fresco se realizaron cada 15 días y los experimentos se repitieron al menos 4 veces.

**Tabla 6.** Concentraciones de fitohormonas utilizadas para la regeneración a partir de explantos de hipocotilo de *C. sativa* transformados con la cepa EHA105 de *A. tumefaciens*. TDZ: Tiazurón.

Nº de medio	Fitohormonas ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	
<i>1</i>	TDZ 0.99	AIA 0.00
<i>2</i>	TDZ 0.99	AIA 0.15
<i>3</i>	TDZ 0.99	AIA 0.25
<i>4</i>	TDZ 1.50	AIA 0.12
<i>5</i>	TDZ 1.90	AIA 0.25

Para determinar la concentración de Kanamicina que asegura una selección fiable de los explantos transformados sin inducir la muerte celular, se ensayaron varias concentraciones del antibiótico: 0, 25, 50 y 75  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en el medio de cultivo n° 5 (Tabla 6). Para cada tratamiento se usaron 60 explantos de hipocotilo inoculados con la cepa EHA105 de *A. tumefaciens* y 60 explantos de hipocotilo no tratados, usados como control. Los experimentos se repitieron 4 veces y al cabo del periodo de cultivo (4 semanas) se determinó la frecuencia de formación de callos en cada tratamiento.



**Figura 8.** Etapas desde la infección de los explantos de hipocotilo de *C. sativa* con la cepa EHA105 de *A. tumefaciens* portadora del gen de resistencia a la Kanamicina, hasta la obtención de los callos transformados.

La evaluación de la respuesta de los explantos al método de transformación y regeneración empleado se basó sobre las siguientes determinaciones:

- Frecuencia de transformación (numero de explantos que desarrollan callos en presencia de Kanamicina)
- Frecuencia de callos que desarrollan raíces
- Frecuencia de callos que desarrollan yemas o tallos
- Tamaño de los callos.

#### **IV.5.3.2. Determinación de la naturaleza transformada de los callos**

##### ***Amplificación del gen *gusA* por PCR***

La presencia del gen *gusA* en los callos se determinó mediante PCR como se describe en el apartado V.2. Para ello se usaron callos desarrollados en explantos de hipocotilo cocultivados con *A. tumefaciens* EHA105, los cuales se cultivaron durante más de 4 semanas en los distintos medios de regeneración en presencia de Kanamicina. Como controles se usaron callos desarrollados en explantos de hipocotilo no tratados

##### ***Tinción histoquímica GUS***

La expresión del gen *gusA* en los callos transformados se averiguó incubando fragmentos de aproximadamente 5 mm aislados a partir de 6 callos de 4 semanas (escogidos al azar) en el sustrato cromogénico X-glu siguiendo la metodología descrita en la sección V.1. Como controles negativos se usaron fragmentos (de 5 mm) procedentes, por una parte de callos no transformados desarrollados en explantos de hipocotilo en el medio nº 5, y por otra de tumores, procedentes de un cultivo axénico, inducidos con la cepa C58 de *A. tumefaciens*. Para cada tipo de tejido se consideraron 10 repeticiones.

#### **IV.5.4. Regeneración a partir de tejidos no transformados**

##### **IV.5.4.1. Inducción de callogénesis y organogénesis**

Esta parte del trabajo se llevó a cabo basándonos sobre los datos de la literatura relativa a los programas de morfogénesis *in vitro* para varias especies vegetales (Han *et al.*, 1997; Stiller *et al.*, 1997; Horlemann *et al.*, 2003) dado que la información disponible para el caso del cáñamo era muy limitada y poco relevante (Fisse *et al.*, 1981; Mandolino y Ranalli, 1999; Feeney y Punja, 2003). Así pues, se usaron fragmentos de hipocotilo y de raíz de aproximadamente 1 cm procedentes de plántulas de cáñamo, genotipo CAN0221, crecidas axénicamente durante 7 a 10 días. Los explantos se cultivaron en los distintos medios de regeneración que se recogen en la Tabla 7, adicionados con el 1% (p/v) de agar. Los cultivos se mantuvieron en la cámara de cultivo en las condiciones previamente descritas (III.4). Todos los experimentos se repitieron al menos 4 veces utilizando en cada uno entre 40 y 60 explantos por tratamiento y tipo de explanto. Tras cinco semanas de cultivo se registró:

- Frecuencia de formación de callos
- Frecuencia de formación de raíces
- Frecuencia de formación de yemas o tallos
- Tamaño de los callos.

En otro experimento con el propósito de mejorar la frecuencia de regeneración se planteó estudiar el efecto del cambio de la composición y concentración hormonal sobre la frecuencia de obtención de callos caulogénicos. Para ello se indujeron, a partir de explantos de hipocotilo, callos en medio nº 10 (Tabla 7) y tras 15 días de cultivo se subcultivaron al mismo medio o a los medios nº 4 y 5 (Tabla 7). En el medio nº 4 se eligió probar una relación auxina/citoquinina  $<1$  usando la misma concentración de BA y bajando 10 veces la del ANA, mientras que en el medio nº 5 se usó una relación auxina/citoquinina  $>1$  incluyendo el 2,4-D como auxina (Tabla 7). Los callos se subcultivaron periódicamente, cada 2 semanas, a

medio fresco de igual composición. Para cada medio se usaron 60 explantos y el experimento se repitió 4 veces. Al cabo de los periodos de cultivo, las determinaciones realizadas fueron las siguientes:

- Número de callos que forman raíces
- Número de callos que forman hojas o tallo
- Tamaño de los callos
- Peso fresco de los callos.

**Tabla 7.** Combinaciones y concentraciones de fitohormonas utilizadas para inducir callogénesis y organogénesis en explantos de hipocotilo y raíz de *C. sativa*. El pH de los medios se ajustó a 5.8.

Tipo de medio	Nº de medio	Medio base	Sacarosa (%)	Fitohormonas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	
<i>Medios para callogénesis y organogénesis</i>	<i>1</i>	B5	2	BA 0.5	ANA 0.05
	<i>2</i>	B5	2	BA 1.0	ANA 0.05
	<i>3</i>	B5	2	BA 1.0	ANA 1.0
	<i>4</i>	B5	2	BA 2.0	ANA 0.05
	<i>5</i>	MB	2	BA 0.1	2,4-D 3.0
	<i>6</i>	MB	2	BA 0.1	2,4-D 5.0
	<i>7</i>	MB	2	BA 0.1	2,4-D 10
	<i>8</i>	MS	3	BA 1.0	ANA 1.0
	<i>9</i>	MS	3	BA 1.0	ANA 2.0
	<i>10</i>	MS	3	BA 2.0	ANA 0.5
	<i>11</i>	MS	3	BA 3.0	ANA 0.5
	<i>12</i>	MS	3	BA 1.0	2,4-D 1.0
	<i>13</i>	MS	3	BA 1.0	2,4-D 2.0
	<i>14</i>	MS	3	TDZ 1.9	AIA 0.25
<i>Medio para elongación de tallo</i>	<i>15</i>	B5	2	BA 0.5	ANA 0.025

#### **IV.5.4.2. Elongación y enraizamiento de los tallos regenerados**

Los tallos regenerados de aproximadamente 1 cm se transfirieron, con un pequeño fragmento de tejido organogenico basal, a Jarras Magenta con 50 mL de medio n° 15 (Tabla 7) para elongación del tallo (Stiller *et al.*, 1997), solidificado con 0.6% (p/v) de agar. Después de 1 semana, se eliminaron los restos de callo y se subcultivaron sólo los tallos a medio fresco de composición igual donde permanecieron durante 3 semanas. Cabe mencionar que la aparición y elongación de las raíces en el medio n° 15 no hizo necesario el uso de medio apropiado para ello.

#### **IV.5.4.3. Aclimatación**

Los tallos enraizados (4 semanas tras su aparición), se arrancaron cuidadosamente del medio de cultivo y las raíces se sumergieron durante unos minutos en agua estéril templada para la descomposición del agar. A continuación las raíces se enjuagaron con agua destilada estéril antes de transferir las plántulas a jarras Magenta con vermiculita esterilizada y humedecida con solución nutritiva estéril. Las jarras se taparon con una película de plástico perforada y se dispusieron en la cámara de cultivo durante 1 semana. Finalmente las plántulas se traspararon a macetas con turba/perlita humedecida para seguir su desarrollo.

### **V. METODOLOGÍA EMPLEADA**

#### **V.1. Determinación de la actividad *GUS***

La actividad de la enzima  $\beta$ -glucoronidasa se demostró mediante tinción histoquímica siguiendo el protocolo de Jefferson (1987) y usando el sustrato cromogénico X-Glu (5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-glucorónido) que, al hidrolizarse, produce un precipitado de color azul. Así, 5 mg de X-Glu se disolvieron en 50  $\mu$ L de dimetilformamida (Sigma) y se llevaron a 50 mL con tampón fosfato sódico  $\text{NaPO}_4$  100 mM, pH 7.0. Los fragmentos de tejidos transformados y no



transformados (controles) se sumergieron en la mezcla de tinción en recipientes de 300  $\mu$ L de capacidad (placa ELISA) durante 12 h a una temperatura de 37°C. Finalmente los tejidos se lavaron con etanol 70% (v/v).

## **V.2. Reacción en cadena de polimerasa**

### **V.2.1. Extracción del ADN genómico**

El protocolo de extracción usado fue el descrito en el Kit de purificación de ADN (PUREGENE, Gentra Systems, Inc.) con algunas modificaciones seleccionadas durante la fase de optimización del método. Así pues, se trituraron muestras de tejidos de 80 mg de peso fresco, en morteros de porcelana esterilizados, en presencia de nitrógeno líquido y de 40 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) para eliminar los fenoles vegetales. A continuación se adicionaron 600  $\mu$ L del tampón de lisis celular (PUREGENE, Gentra Systems, Inc.) a los extractos antes de congelarlos a -40°C y descongelarlos, a temperatura ambiente, dos veces. Los extractos se cargaron entonces en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se les adicionaron 200  $\mu$ L del tampón para la precipitación de proteínas (PUREGENE, Gentra Systems, Inc.), se agitaron bien en un vórtex y se incubaron en hielo durante 10 min. Al cabo de este tiempo, los tubos se centrifugaron a 13.000 g durante 3 min y el sobrenadante se recuperó cuidadosamente en un nuevo tubo con 600  $\mu$ L de isopropanol (2-propanol) al 100% para precipitar el ADN. Para ello los tubos se agitaron 50 veces por inversión suave y se guardaron a -20 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, los tubos se volvieron a centrifugar durante 1 min (13.000 g) y el sedimento se lavó despegándolo suavemente de la pared del tubo y agitándolo en 600  $\mu$ L de etanol 70% (v/v) con el cuidado de no disolverlo. Después los tubos se centrifugaron durante 2 min (13.000 g) y el sedimento se dejó a temperatura ambiente durante 45-60 min para que se seque. Una vez secado, el ADN se rehidrató con 50  $\mu$ L de agua bidestilada esterilizada y se calentó en un baño maría a 65°C durante 2 min para facilitar su disolución. Finalmente las muestras de ADN se guardaron durante una noche a 4°C. Al día siguiente los tubos se centrifugaron durante 3 min (13.000 g) para precipitar las impurezas que puedan haber quedado en el extracto y el ADN

extraído se recuperó en un tubo Eppendorf de 0.5 mL pipeteando cuidadosamente el sobrenadante, para no romper las cadenas de ADN. El ADN extraído se almacenó a 4°C hasta su análisis.

### **V.2.2. Cuantificación del ADN**

La determinación de la concentración del ADN por fluorimetría se llevó a cabo usando un fluorímetro Hoefer<sup>®</sup> DyNA Quant<sup>®</sup> 200 de Amersham, Pharmacia Biotech. Para ello, se preparó el tampón TNE 1 x (0.2 M NaCl, 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.4) y se guardó a 4 °C. En este tampón se preparó una solución estock de 1mg/mL del colorante Hoechst dye H33258 (Pharmacia Biotech.) y se almacenó a 4°C en oscuridad. Para la calibración del fluorímetro se usó una dilución 1:10 (100 µg/mL) de una solución estock 1 mg/mL de ADN de Calf Thymus (Pharmacia Biotech.) preparada en tampón TNE 10 x. Justo antes de la cuantificación el ADN templado se agitó y se centrifugó durante 2 min a 13.000 x g y entonces se adicionaron 2 µL del templado a 2 mL de la solución de ensayo preparada diariamente y que consistió en 10 µL de la solución estock del H33258, 10 mL de TNE 10 x y 90 mL de agua destilada filtrada.

### **V.2.3. Amplificación por PCR**

Se utilizaron unos 100 ng de ADN templado, 50 pmol de cada cebador, 0.2 mM de dNTPs y 0.5 U de Taq ADN polimerasa (Amersham Biosciences) en un volumen final de 50 mM del tampón de reacción (50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0).

Las condiciones de la reacción, en un termociclador GeneAmp 2400 (Applied Biosystem) fueron: precalentamiento 95°C (5 min), adición de la Taq-polimerasa, 35 ciclos a 94°C (30s), 55°C (1 min) y 72°C (1 min). Los cebadores

utilizados para la amplificación de los diferentes fragmentos de ADN se describen en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Cebadores utilizados para la amplificación de fragmentos de los genes analizados por PCR.

Genes	Cebadores	(pb)	Referencias
<i>rolB</i>	<i>rolB</i> -1: 5' AGTTCAAGTCGGCTTTAGGC 3'	780	Celma <i>et al.</i> , 2000
	<i>rolB</i> -2: 5' TCCACGATTTCAACCAG TAG3'		
<i>rolC</i>	<i>rolC</i> -1: 5' TAACATGGCTGAAGACGACC 3'	540	Celma <i>et al.</i> , 2000
	<i>rolC</i> -2: 5' AAACCTTGCACTCGCCATGCC 3'		
<i>ipt</i>	CYT-5' GATCG(G/C)GTCCAATG(C/T)TGT 3'	427	Haas <i>et al.</i> , 1995
	CYT-2: 5' GATATCCATCGATC(T/C)CTT 3'		
<i>virG</i>	<i>virG1</i> : 5' CGATGACGATGTCGCTATGC 3'	690	Stiller <i>et al.</i> , 1997
	<i>virG2</i> : 5' CAGCACCTCTTGCAGTCTTG 3'		
<i>gusA</i>	<i>gus</i> 5: 5' CCATCGCAGCGTAATGCTCT 3'	570	Stiller <i>et al.</i> , 1997
	<i>gus</i> 6: 5' GCCGACAGCAGCAGTTTCAT 3'.		

Los productos de la PCR se analizaron en geles de agarosa al 2%, en tampón TAE 1x (0.04 M Tris/acetato, 0.001 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8.3), conteniendo 0.5 µg.mL<sup>-1</sup> de bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta.

### V.3. Medida de etileno mediante cromatografía de gases

La tasa de producción de etileno por las raíces se determinó siguiendo la metodología habitualmente usada en nuestro laboratorio (Caba *et al.*, 1999 y Ligeró *et al.*, 1999), realizando ensayos previos para optimizar varios parámetros como el tiempo de incubación y las condiciones del cromatógrafo. Finalmente se han usado las condiciones descritas a continuación. Raíces transformadas recuperadas de 4

matraces para cada línea se mezclaron suavemente y se repartieron en cantidades aproximadamente iguales en viales herméticos de 9 mL de capacidad con tapón perforable (vacutainers, Becton-Dikinson). Dentro de los tubos se colocó un trozo de papel de filtro como soporte para las raíces y se añadió 1 mL de medio de MS líquido (para las raíces control se adicionó 1 mL de solución nutritiva). Una vez tapados herméticamente, los tubos se incubaron 2h30' a 25°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo se extrajeron de los viales, con jeringas de gases, alícuotas de 1 mL de la atmósfera interna, que posteriormente se inyectaron en el cromatógrafo de gases para determinar el etileno librado por el material vegetal. A continuación se midió el volumen libre de cada vial por desplazamiento con agua y se pesaron las raíces después de secarlas durante 24 horas a 75°C en estufa con corriente forzada de aire. En este trabajo la producción de etileno se expresa en  $\text{pmol C}_2\text{H}_4 (\text{g PS})^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Para la cuantificación de etileno se utilizó un patrón preparado a partir de etileno puro (AirLiquide) por dilución hasta una concentración de  $100 \text{ pmol.mL}^{-1}$ .

Las medidas se realizaron en un cromatógrafo Perkin Elmer, modelo Autosystem XL, equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna de acero inoxidable (2 m x 2 mm) rellena con un polímero poroso (Porapak R, 80-100 mesh). Se utilizó el nitrógeno como gas portador (fase móvil) con un flujo de  $33 \text{ mL.min}^{-1}$ . Para la llama, el flujo del hidrógeno y aire se mantuvo a 30 y  $300 \text{ mL.min}^{-1}$ , respectivamente.

#### **V.4. Medida de la actividad nitrato reductasa**

La determinación de la actividad nitrato reductasa en las raíces transformadas de *C. sativa* se llevó a cabo siguiendo la metodología habitualmente usada por nuestro grupo de investigación para diversas leguminosas (Ligero *et al.*, 1987; Caba *et al.*, 1990, 1991; Hervás *et al.*, 1991) habiéndose optimizado, para el presente estudio, varios parámetros como la concentración de NADH (0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mM), volumen del extracto (0.2-0.6 mL) así como el tiempo de incubación

del extracto con el sustrato (20, 40, 60, 80, 100 y 120 min). Finalmente se usó el procedimiento descrito a continuación.

#### **V.4.1. Extracción**

El medio de extracción estuvo basado en el propuesto por Kaiser y Lewis (1984), con algunas modificaciones y consta de tampón fosfato 50 mM pH 7.5, Na<sub>2</sub>-EDTA 2 Mm, DTT (dietilaminoetil) 2 mM y caseína soluble 1.5% (p/v). Para cada línea, se emplearon raíces de cuatro cultivos independientes, las cuales fueron recuperadas al cabo del periodo de cultivo, lavadas con agua destilada, mezcladas y secadas con papel de filtro. Dos g de raíces se extrajeron en un mortero sobre baño de hielo picado utilizando una relación peso de muestra: volumen de medio de 1:5. Entodos los casos, al objeto de eliminar fenoles, se adicionó PVPP insoluble inmediatamente antes de la extracción, en una cantidad equivalente a la mitad del peso de la muestra de raíces utilizada. Tras la maceración, el homogenizado se filtró a través de 4 capas de gasa y se centrifugó a 25.000 g 5 min (4°C) para eliminar los residuos celulares. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 30000 g durante 20 min, utilizando este nuevo sobrenadante para la determinación de la actividad. La centrífuga utilizada fue una Sorvall Superspeed RC-5B (Du Pont Instrument) refrigerada.

#### **V.4.2. Medida de la actividad**

La nitrato reductasa (EC 1.6.6.1) se valoró siguiendo la aparición de nitrito en el medio de reacción, según la técnica empleada por Kaiser y Lewis (1984) y Caba *et al.* (1990). La mezcla de reacción contenía, en un volumen total de 2 mL, tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.5, KNO<sub>3</sub> 10 mM, cisteína 1 Mm, NADH 0.2 mM y 0.4 mL del extracto. La reacción se inicia con la adición del extracto, manteniéndose en baño termostatizado a 30 °C durante 30 min, y se detiene por la adición de 0.1 mL de acetato de zinc 1 M y posterior agitación para asegurar la

completa oxidación del NADH residual. Tras centrifugar las mezclas a 35.000 g durante 5 min se procedió a valorar el nitrito formado en alícuotas del sobrenadante.

Para corregir la actividad se emplearon dos controles: un blanco, en el que se sustituye la enzima por medio de extracción y un control a tiempo cero, obtenido deteniendo la reacción inmediatamente antes de la incubación. Finalmente la actividad se expresó en  $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

#### **V.4.3. Valoración del nitrito formado**

Para la valoración de los nitritos se empleó la reacción de diazotación de Griess-Ylosway, según el método descrito por Snell y Snell (1949) y por Hageman y Hucklesby (1971). Así, a alícuotas de 1 mL, diluidas en caso necesario, se les añadió 1 mL de reactivo de sulfanilamida y 1 mL de NNEDA. La mezcla se completa con 2 mL de agua destilada y tras agitar se dejó desarrollar el color durante 20 min. Finalmente se midió la absorbancia debida al color desarrollado a 540 nm en un espectrofotómetro (Hitachi 100-80 o Beckman DU-70). Para la cuantificación del nitrito se confeccionó una curva patrón con concentraciones conocidas de  $\text{KNO}_2$  en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.5.

El reactivo de sulfanilamida se preparó disolviendo 5 g de sulfanilamida en 100 mL de HCl concentrado en caliente, diluyendo posteriormente hasta 500 mL con agua destilada. El NNEDA se preparó disolviendo 100 mg de este producto en 500 mL de agua destilada. Ambas soluciones deben mantenerse refrigeradas y en frascos topacio protegidas de la luz.

## **V.5. Determinación de cannabinoides mediante HPLC y GC/NPD**

### **V.5.1. Estándares y soluciones de trabajo**

El metanol de grado HPLC fue suministrado por Merck (Damstadt, Alemania). Los demás reactivos fueron de grado analítico. Como patrones se usaron muestras de Tetrahidrocannabinol (THC), Cannabinol (CBN) y Cannabidiol (CBD) obtenidos a partir de resina de haschis.

### **V.5.2. Extracción**

El análisis de THC, CBD y CBN se llevaron a cabo en el laboratorio de Toxicología (Departamento de Medicina Legal de la facultad de Medicina, Universidad de Granada) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases con detector nitrógeno/fósforo (GC/NPD), siguiendo el protocolo que rutinariamente se usa para la detección y cuantificación de cannabinoides, en dicho laboratorio. Así, muestras de 1 a 3 g de raíces liofilizadas se extrajeron con 20 mL de éter de petróleo, en tubo de vidrio de 25 mL con tapón de rosca, manteniéndolas en agitación durante 15 min en agitador rotatorio. Tras centrifugar a 1000-1500 rpm durante 10 min se filtró el sobrenadante sobre sulfato sódico anhidro recogiendo el filtrado en un tubo de vidrio de fondo cónico y se evaporó a sequedad en baño de agua a 40 °C, en corriente de nitrógeno. Finalmente el residuo seco se redisolvió en 0.5 mL de etanol. En ambos análisis se consideraron 3 repeticiones procedentes de 2 experimentos independientes.

### **V.5.3. Análisis**

#### ***Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)***

El sistema usado consistió en una bomba binaria modelo LC-250 Perkin Elmer, con un detector de diodo a array (LC-235 Perkin Elmer) y un integrador-registrador (LCI-100, Perkin Elmer) conectado con un computador Epson PC AX2 para el manejo y almacenamiento de los espectros. Se uso una columna de fase

reversa modelo RP-8 LiChrocart 125-4 (Merck). La fase móvil consistió en una solución de acetonitrilo (ACN)/acético 2% la cual fue desgasificada pasándola por un papel de filtro orgánico:acuoso (Millipore FH VP 04700) primado con metanol. El tiempo total de corrida fue 20 min y la tasa de flujo se fijó en 1.0 mL/min. El eluente fue monitorizado a 240 nm. Las muestras se prepararon en metanol y se inyectaron volúmenes de 10 µL.

### ***Cromatografía de gases con detector nitrógeno/fósforo (GC/NPD)***

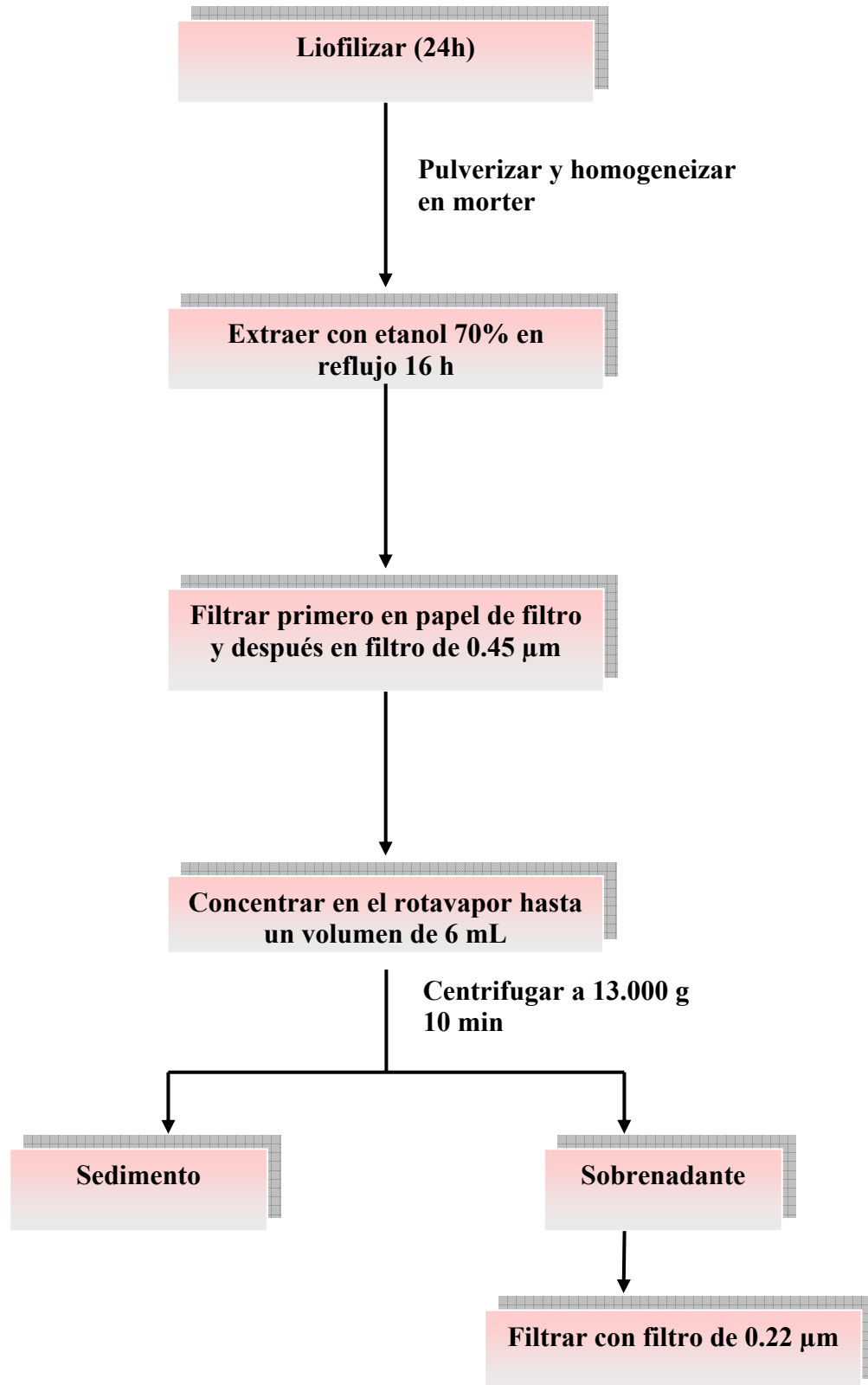
Se usó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer 8310 equipado con un detector de nitrógeno/fósforo (sistema GH de Clarke, 1986), y una columna capilar SPB1 (15 m x 0.53 mm) de sílice fundida (película de 0.5 µm) y una fase estacionaria de dimetilpolisiloxano. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 270 y 300 °C respectivamente mientras que la del horno de 210°C. Para la inyección de las muestras se utilizó un sistema split-splitless seleccionando el modo split (1:25). Como gas portador se usó helio a un flujo de 1 mL/min. Las muestras fueron preparadas en metanol y el volumen de inyección fue 1 µL.

## **V.6. Análisis de alcaloides mediante electroforesis capilar**

### **V.6.1. Extracción**

La extracción de los alcaloides se llevó a cabo siguiendo básicamente el método de Zhang *et al.* (2004) con algunas modificaciones (Figura 9). Muestras de 1 g de muestras liofilizadas y pulverizadas, en un mortero de porcelana, se extrajeron en un sistema de reflujo en 150 mL de etanol 70% (v/v) durante 16 horas. El sistema de reflujo se montó sobre una fuente de calor plana poniendo en cada matraz 20 bolitas de vidrio para homogeneizar la ebullición del alcohol. Después de enfriarse, el extracto se filtró al vacío, primero a través de un disco de papel de filtro y a continuación con filtro de nitrocelulosa de 0.45 µm. El residuo se lavó dos veces con 10 mL de etanol 70% (v/v) y las soluciones de lavado se filtraron y se mezclaron con





**Figura 9.** Proceso de extracción de alcaloides a partir de raíces transformadas, raíces no transformadas y hojas de *C. sativa*.

el extracto. Posteriormente las fracciones resultantes se concentraron en un rotavapor (BÜCHI R 110) hasta un volumen de 6 mL. Finalmente los extractos se centrifugaron durante 5 min a 13.000 g, se filtraron a través de filtros de nitrocelulosa (0.22  $\mu\text{m}$ ) y se guardaron en congelador (-20°C) hasta su análisis.

## **V.6.2. Separación por electroforesis capilar**

### **V.6.2.1. Instrumentación**

Los análisis se llevaron a cabo mediante CE-ESI-MS utilizando un equipo de electroforesis capilar P/ACE™ System MDQ (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) equipado con un detector de luz ultravioleta visible (UV-Vis), que trabaja a 200 nm y acoplado mediante, una interfase ortogonal de ionización por electroespray o electronebulización (ESI) (G1607A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), a un espectrómetro de masas con analizador de iones (Burker Daltonik Esquire 2000™ Bremen, Alemania), usando una interfase coaxial con flujo adicional. El capilar de sílice fundida sin recubrimiento con 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno fue suministrado por Composite Metal Services (Worcester, Inglaterra), usando una longitud total de 100 cm. El contacto eléctrico en el extremo de la aguja del electroespray se estableció mediante un líquido adicional suministrado con una bomba Cole Palmer 74900-00-05 (Vernon Hills, Illinois, USA). El espectrómetro de masa trabajó a una polaridad positiva empleando un voltaje del capilar de -4000V. La trampa de iones escaneó a un rango de 50-350 m/z a 13000 u/s durante la separación y la detección.

El acondicionamiento del capilar se llevó a cabo mediante un lavado de las columnas primero con agua durante 2 min y después con el tampón de separación durante 5 min. Antes del primer uso, los capilares sin recubrimiento se acondicionaron usando un lavado con NaOH (Panreac, Barcelona, España) 0.1 M durante 20 min seguido por un aclarado con agua durante 10 min. Al final del día, el capilar se enjuagó pasándole un flujo de agua durante 10 min y de aire durante 5 min.

El acoplamiento de un detector tan selectivo como el MS a una técnica analítica tan versátil y que proporciona eficacias tan elevadas como CE da como resultado una potente herramienta de análisis. La CE-MS proporciona, de este modo, una elevada rapidez de análisis, altas eficacias, es aplicable a un amplio intervalo de compuestos, requiere volúmenes de muestra pequeños y permite la determinación estructural de los compuestos de estudio mediante MS.

#### **V.6.2.2. Estándares y soluciones de trabajo**

Todos los reactivos fueron de grado analítico y las soluciones estándares de colina (choline chloride), atropina y muscarina (Sigma, St. Louis, MO, USA) se prepararon con agua bidestilada Milli-Q (Millipore, MA, USA). Los tampones de corrida se prepararon con acetato amónico (Panreac, Barcelona, España) usando el hidróxido de amonio 0.5 M (Merck, Darmsadt, Alemania) para ajustar el pH. Una vez preparados, los tampones se almacenaron a 4°C, y antes de su uso se sacaron para que alcancen la temperatura ambiente. El líquido adicional se preparó con ácido fórmico (Aldrich, Steinheim, Alemania), 2-propanol ambos de grado HPLC y agua bidestilada. Todas las soluciones se filtraron a través de filtros Millipore de 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$  (Bedford, MA, USA) antes de su inyección en el capilar.

Las soluciones madre de los estándares, para cada compuesto, se prepararon en agua (1000 mg/L) y se diluyeron con la misma hasta las concentraciones requeridas, preparando las soluciones de trabajo diariamente.

#### **V.6.2.3. Optimización de las condiciones experimentales**

Previo a los análisis, las condiciones electroforéticas se optimizaron para la separación de los tres compuestos analizados en base al comportamiento de las moléculas a lo largo de la migración, sensibilidad, tiempo de análisis y forma de los picos. Así pues, en un primer paso se estudió el efecto del tipo de tampón de corrida (ácido fórmico, ácido acético y acetato amónico) a varias concentraciones (10-60

mM) y pHs (8-11 en incrementos de 0.5 unidades) sobre la separación. El voltaje aplicado fue, a su vez, variado entre 10 y 30 kV. Finalmente las inyecciones se hicieron en la extremidad anódica usando N<sub>2</sub> a una presión de 0.5 psi. durante 10 s (1 psi.=6894.76 Pa).

Por otra parte, se optimizaron varios parámetros de la ESI-MS como el tipo y concentración del líquido adicional, presión de nebulización junto con la velocidad de emisión del gas de secado.

#### **V.6.2.4. Análisis de alcaloides**

Para la separación simultánea de colina, atropina y muscarina, se usaron las condiciones óptimas de CE-ESI-MS, que se describen a continuación: acetato de amonio 20 mM, pH 8.5 como tampón de corrida, voltaje 30 kV, tiempo de inyección de 10 s, mezcla de 2-propanol/agua 50:50 con 0.5 % (v/v) de ácido fórmico como líquido adicional liberado con un flujo de 0.18 mL/h, el gas de secado a un flujo de 6 L/min a 350 °C y una presión del gas nebulizador de 4 psi. La longitud del capilar fue 100 cm. El espectrómetro de masas fue llevado a polaridad positiva y el voltaje del capilar se fijó a -4000 kV. El tiempo de acumulación máximo para la trampa de iones se fijó a 5.00 ms y el nivel de impulsión de la trampa al 100%. Para cada línea se consideraron tres repeticiones procedentes de dos experimentos independientes.

## **Capítulo 4**

# **RESULTADOS**

## **I. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO *IN VIVO* DEL CÁÑAMO**

El primer punto del trabajo fue la caracterización del crecimiento de las plantas de los diferentes genotipos de *Cannabis sativa* reunidos, al objeto de tener un cierto conocimiento previo de su comportamiento en las condiciones experimentales disponibles en nuestro laboratorio, necesario para la realización de los diferentes experimentos y determinaciones programadas a lo largo del presente trabajo. A tal fin hemos establecido un seguimiento, por planta y genotipo, para evaluar la morfología de las plantas desarrolladas en las condiciones de cultivo seleccionadas junto con algunos parámetros relacionados con el crecimiento. Pues por una parte se estudiaron parámetros relacionados con la fase vegetativa como la cinética de aparición de los cuatro primeros pares de hojas (hojas opuestas) y el tamaño y velocidad de desarrollo de los tres primeros entrenudos, y por otra, parámetros asociados con la fase reproductora como la floración.

### **I.1. Crecimiento y morfología de las plantas**

El estudio del crecimiento y morfología de las plantas de cáñamo cultivadas *in vivo* en las condiciones de la cámara de cultivo mostró que, al igual a lo que se describe para el cultivo de cáñamo realizado en el campo (Clarke, 1997; Mediavilla *et al.*, 1998), las plantas tuvieron una primera fase de crecimiento vegetativo cuya duración varió generalmente entre 20 y 30 días y que se caracterizó por crecimiento lento y presencia de 4 a 5 pares de hojas con filotaxia opuesta. A partir del estadio vegetativo III (crecimiento del tercer entrenudo estabilizado), se notó una apreciable

aceleración del crecimiento acompañada con el paso a la filotaxia alterna, lo que indica el inicio de la fase reproductora de acuerdo con la descripción de Bócsa y Karus (1997). En este estadio las plantas presentaban entre 7 y 9 entrenudos desiguales en longitud (Figura 10) tal y como fue descrito para las plantas crecidas en el campo (Mediavilla *et al.*, 1998).



**Figura 10.** Plantas de cáñamo del genotipo CAN0221 en fase de floración después de 25 días de crecimiento en las condiciones de la cámara de cultivo.

El tamaño de las hojas formadas aumentaba rápidamente alcanzando la longitud máxima (12 cm) entre el cuarto y sexto par de hojas y volvía a disminuir hasta llegar a menos de 1 cm en las inflorescencias. El primer par de hojas era unifoliar y en los siguientes pares de hojas el número de folíolos subía de forma impar hasta llegar a 9 folíolos en las octavas hojas de algunos genotipos. Es importante mencionar que las plantas procedentes de las accesiones de droga exhibieron una velocidad de crecimiento mayor con respecto a aquellas

pertenecientes a los cultivares de fibra o a la accesión silvestre como se va a ver más adelante (Tabla 11).

La morfología de las plantas fue otro indicador del desarrollo normal que tuvieron en las condiciones elegidas, así de acuerdo con lo sabido, las accesiones con fenotipo droga se caracterizaron con hojas de color verde intenso, foliolos estrechos y olor característico del género (debido a los terpenofenoles), mientras que en los cultivares de fibra las hojas, distribuidas en un tallo notablemente más grueso, tuvieron un olor menos intenso y foliolos más anchos. En cuanto a la accesión silvestre, las plantas fueron mucho más cortas que aquellas pertenecientes a los demás fenotipos y se caracterizaron con hojas pequeñas (longitud máxima de 5 a 6 cm) formadas por 3 a 5 foliolos que carecían del olor característico del género.

Como es sabido, el cáñamo es una planta de día corto cuyo ciclo de vida está fuertemente controlado por el fotoperiodo. Por lo que pueden notarse cambios fenológicos en la planta en función de la longitud de día de la zona donde crece (Huhnke *et al.*, 1951; Bredemann *et al.*, 1957; Hoffmann, 1961; Dempsey, 1975; Lisson *et al.*, 2000). Dichos cambios afectan, entre otros parámetros de crecimiento de la planta, a la floración que ocurre generalmente entre 50 y 90 días tras la germinación, pero este periodo puede extenderse hasta 270 días dependiendo principalmente de las condiciones de cultivo, como temperatura y fotoperiodo (Small *et al.*, 1975; de Meijer y Keiser, 1994; Moliterni *et al.*, 2004). En el sistema de cultivo elegido para el presente trabajo, pese al corto ciclo de vida notado (floración entre 21 y 33 días), las plantas obtenidas coincidieron en términos de crecimiento y morfología con aquellas crecidas en otras condiciones de cultivo.



## I.2. Estudio de algunos parámetros de la cinética de desarrollo de la planta

### *Aparición de hojas*

Como se ha descrito previamente en el apartado IV.1 de Material y Métodos la aparición del primer par de hojas verdaderas se consideró el tiempo de inicio de todas las medidas relacionadas con la cinética de crecimiento de las plantas. Así, el estudio de los cuatro primeros plastocronos (tiempo que separa la aparición de dos pares de hojas consecutivos) permitió ver que en las hembras el P1 fue un 26% mayor con respecto a las plantas que expresaron el sexo masculino al llegar al estadio reproductor (Tabla 9), siendo la diferencia significativa ( $p < 0.05$ , análisis de la varianza). Lo que indica que el segundo par de hojas apareció en los machos antes que en las hembras. Por otra parte, el P1 estuvo significativamente determinado por el fenotipo ( $p < 0.05$ , análisis de la varianza) siendo un 33% mayor en los cultivares de fibra con respecto a las accesiones de droga (Tabla 9). El análisis multifactorial de la varianza (Tabla 10) reveló que el P1 estuvo más influido por el sexo (62%) que por el fenotipo de la planta (30%).

En cuanto al P2 que delimita el segundo y tercer par de hojas, no se notaron diferencias significativas entre los dos sexos, mientras que los cultivares de fibra siguieron mostrando un plastocrono significativamente mayor (24%,  $p < 0.05$ , análisis de la varianza) respecto de las accesiones de droga (Tabla 9). Esto se reflejó también en los resultados de la Tabla 10 que muestran que el P2 estuvo mayoritariamente influido por el fenotipo (76%), con sólo una influencia mínima (2%) del sexo de la planta.

A nivel del P3, que refleja la velocidad de aparición del cuarto par de hojas, la influencia del sexo (57%) fue ligeramente mayor frente al fenotipo (39%) como muestra la Tabla 10. Este parámetro fue un 19% mayor en los machos respecto de las hembras, lo que indica que estas últimas formaron el cuarto par de hojas antes que los machos (Tabla 9). En lo que se refiere a la comparación de los fenotipos, el P3 no mostró diferencias significativas entre los cultivares de fibra y las accesiones de

droga. Por último, llegando al quinto par de hojas no se notaron diferencias significativas en el P4 registrado en hembras y machos ni entre los fenotipos fibra y droga (Tabla 9).

El análisis de la varianza resaltó una adecuada influencia de los plastocronos P1 y P3 sobre la determinación del sexo (89 y 82% respectivamente,  $p < 0.05$ ) apuntando a su posible uso en el reconocimiento del sexo de las plantas a un estadio de crecimiento precoz. Por otra parte, los plastocronos P1 y P2 estuvieron influidos al 90 y 82% (análisis de la varianza,  $p < 0.05$ ), respectivamente, por el fenotipo de la planta por lo que podrían usarse para la diferenciación entre los cultivares establecidos para la producción de fibra y las accesiones destinadas a la obtención ilícita de la droga del *Cannabis*.

**Tabla 9.** Velocidad de aparición de los cinco primeros pares de hojas expresada como longitud del plastocrono y evaluada en función del sexo y fenotipo de la planta en 12 genotipos de cáñamo.

	<b>P1 (días)</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>
<b>Hembra</b>	3.4	4.1	3.2	3.3
<b>Macho</b>	2.7	4.1	3.8	3.2
<b>Droga</b>	2.7	3.8	3.3	3.5
<b>Fibra</b>	3.6	4.7	3.7	3.0
<b>Silvestre</b>	3.0	4.1	4.1	2.0
<i>MDS</i> <sub>0.05</sub>	0.3	0.3	0.2	0.5

**Tabla 10.** Análisis multifactorial de la varianza del impacto de los factores “sexo” y “fenotipo” sobre los diferentes parámetros de crecimiento evaluados.

<b>Parámetro</b>	<b>Influencia del Sexo (%)</b>	<b>Influencia del Fenotipo (%)</b>
<b>P1</b>	62	30
<b>P2</b>	2	76
<b>P3</b>	57	39
<b>P4</b>	1	57
<b>EN1</b>	15	72
<b>EN2</b>	41	51
<b>EN3</b>	5	67
<b>VE1</b>	12	68
<b>VE2</b>	52	38
<b>VE3</b>	36	59
<b>Estabilización del EN3</b>	6	74
<b>Floración</b>	78	20
<b>Aparición del sexo</b>	70	27

### *Desarrollo de los entrenudos*

Como primer entrenudo, se consideró aquel que delimita el primer y segundo par de hojas verdaderas. Así, el estudio del crecimiento de los tres primeros entrenudos, que marcan a madurez el fin de la fase vegetativa (Merzouki *et al.*, 1997), mostró que la longitud del EN1 (a madurez) no varió significativamente entre plantas de los dos sexos, mientras que los EN2 y EN3 fueron más largos (13 y 22% respectivamente) en los machos que en las hembras (Tabla 11). Por otra parte, se puede apreciar que la longitud de los mencionados entrenudos fue significativamente mayor en las accesiones de droga en comparación con los cultivares de fibra (92, 46 y 26%, respectivamente). Las plantas con fenotipo silvestre tuvieron también entrenudos notablemente menos largos que las plantas de droga pero parecidos, en

cuando a longitud, a los desarrollados en los cultivares de fibra (Tabla 11). La Tabla 10 muestra que la longitud de los tres primeros entrenudos estuvo más determinada por el fenotipo que por el sexo de la planta.

Los resultados de la Tabla 11 indican también que la velocidad de crecimiento de los entrenudos de los machos fue aproximadamente un 23% mayor que las hembras. En cuanto a la comparación de la VE entre los diferentes fenotipos, se puede ver que las plantas con fenotipo droga tuvieron un crecimiento más acelerado (VE), durante la fase vegetativa, con respecto a las plantas para fibra (64, 53 y 42% mayor para VE1, VE2 y VE3 respectivamente). Estas últimas mostraron velocidades de crecimiento de los entrenudos parecidas a las plantas de la variedad silvestre. El análisis multifactorial de la varianza (Tabla 10) reveló que el fenotipo de la planta ha tenido generalmente más influencia, que el sexo de la misma, sobre la velocidad de desarrollo de los tres primeros entrenudos y por ello sobre la velocidad de crecimiento de la planta durante la fase vegetativa.

**Tabla 11.** Tamaño (cm) y velocidad de crecimiento (cm./día) de los tres primeros entrenudos, en función del sexo y fenotipo de la planta, en 12 genotipos de cáñamo.

	<b>EN1(cm.)</b>	<b>EN2</b>	<b>EN3</b>	<b>VE1 (cm./día)</b>	<b>VE2</b>	<b>VE3</b>
<b>Hembra</b>	1.9	3.2	3.2	0.13	0.23	0.29
<b>Macho</b>	2.1	3.6	3.9	0.16	0.28	0.36
<b>Droga</b>	2.5	3.8	3.9	0.18	0.29	0.37
<b>Fibra</b>	1.3	2.6	3.1	0.11	0.19	0.26
<b>Silvestre</b>	1.2	2.2	2.9	0.09	0.16	0.28
<b>MDS<sub>0.05</sub></b>	0.2	0.3	0.4	0.02	0.03	0.03

## **Floración**

En las condiciones de cultivo elegidas, las yemas florales aparecieron a partir del cuarto nudo distribuyéndose en los subsiguientes nudos hasta alcanzar la densidad máxima en la zona apical. Resultados parecidos se relataron por Moliterni *et al.* (2004) quienes mediante análisis microscópico encontraron que, en fotoperiodos largos (16h de luz), la formación de meristemas florales en *C. sativa* empieza en el cuarto nudo. Hemos visto que la floración ocurría entre el día 21 y 33 del ciclo vital de la planta según el genotipo y sexo de la misma, teniendo algunos genotipos un tiempo de floración más corto que otros. Los machos florecían 2 a 7 días antes que las hembras (Tabla 12), este intervalo es menor respecto del notado en otras condiciones de cultivo, por ejemplo, Clarke (1997) describió un periodo de aproximadamente 2 semanas entre la floración de los machos y de las hembras. Por otra parte, la Tabla 10 muestra que el tiempo de floración está mayoritariamente determinado por el sexo de la planta.

La estabilización del tercer entrenudo (EN3), se utilizó previamente en plantas de cáñamo como indicador del inicio de la fase reproductora, y por ello la floración (Merzouki *et al.*, 1997). En nuestras condiciones de cultivo, el EN3 se estabilizó entre el día 26 y 28 del ciclo de vida de la planta independientemente del sexo de la misma, en cambio las plantas con fenotipo fibra mostraron un tiempo de estabilización del EN3 algo mayor que los fenotipos droga y silvestre (Tabla 12). El análisis por regresión simple ( $p < 0.01$ ) reveló la existencia de una relación estadísticamente significativa entre la floración y la estabilización del EN3 con un coeficiente de correlación de 0.5.

El sexo de las yemas florales se diferenciaba 3 a 7 días tras la aparición de las mismas, diferenciando plantas hembra y macho junto a pies monoicos muy frecuentes en los cultivares de fibra, y no observadas en el fenotipo silvestre y droga. A madurez, las plantas estaminadas fueron más largas y delgadas que las carpeladas, siendo estas más frondosas.

**Tabla 12.** Relación entre algunos parámetros asociados con la fase reproductora como la estabilización del EN3 y la floración. Los datos son la media obtenida en plantas de 12 genotipos de cáñamo.

	<b>Estabilización del EN3 (días)</b>	<b>Floración (días)</b>	<b>Discriminación del sexo (días)</b>
<b>Hembra</b>	27	27	32
<b>Macho</b>	27	24	30
<b>Droga</b>	26	25	31
<b>Fibra</b>	28	27	32
<b>Silvestre</b>	26	25	29
<i>MDS</i> <sub>0.05</sub>	0.9	0.7	0.8

Las flores estaminadas se disponían en panículas terminales mostrando un periantio constituido por 5 piezas y un androceo de 3 estambres mientras que las flores femeninas aparecieron en glómulo sentado y presentaron un periantio integrado por 6 tépalos libres y un ovario súpero y unilocular con 2 estigmas. La inflorescencia macho fue muy ramificada con un gran número de flores en diferentes estadios de maduración, mientras que la inflorescencia hembra fue frondosa y no ramificada coincidiendo con las descripciones existentes, de esta planta, en otras condiciones de cultivo (Clarke, 1997; Mediavilla *et al.*, 1998). Finalmente, tras la fecundación se formó el fruto que es un aquenio llevando en su interior una semilla que maduró 3 a 4 semanas después de la fecundación. En lo que respecta a la senescencia, los machos se marchitaron poco tiempo tras soltar el polen mientras que las hembras sobrevivieron hasta la madurez de las semillas. Las semillas o frutos (aquenios) fueron morfológicamente diferentes según el fenotipo; de 2 a 3 mm de color marrón o gris oscuro en las accesiones con fenotipo droga, grandes (3 a 5 mm) de color marrón oscuro en los cultivares para fibra y pequeñas (1mm) de color gris oscuro en el fenotipo silvestre.

Por último cabe señalar que, en las condiciones de cultivo elegidas para el presente trabajo, las plantas superaron 1 m de altura a madurez cumpliendo la descripción existente para plantas cultivadas en el campo (Breedman, 1957; Cherniak, 1982; Small y Marcus, 2000) e indicando un crecimiento normal de las mismas. Todos estos resultados nos llevaron a concluir que las condiciones experimentales elegidas no influyeron sobre la morfología y el desarrollo de las plantas. Además, el estudio realizado nos permitió evaluar el vigor de las plántulas cultivadas *in vitro* para la infección con *Agrobacterium* tanto como aquellas obtenidas en los experimentos de regeneración.

## II. ESTUDIO DE LA RESPUESTA DEL CÁÑAMO A LA INOCULACIÓN CON *Agrobacterium*

### II.1. Optimización de las condiciones experimentales

Al abordar este estudio nos encontramos con la casi total ausencia de información previa, al respecto, para el caso del cáñamo al menos hasta donde hemos podido comprobar. Factores como el crecimiento y desarrollo de las plantas a infectar, sitio u órgano a infectar (inoculación *in vivo* de plantas), tipo de explanto (inoculación *in vitro*), protocolo de infección, tipo de inóculo usado, virulencia y cepas bacterianas etc., que son determinantes en una interacción compatible planta-*Agrobacterium* no han sido estudiados aun en *C. sativa* y obviamente encontrar las condiciones experimentales idóneas para estos factores en nuestro material de estudio era el primer paso.

#### *Inoculación in vivo de plántulas de cáñamo*

El cultivo axénico de plántulas de cáñamo se llevó a cabo en placas de agar inclinado usando medio B5, elegido tras ensayar tres medios (MS, B5 ½ y B5) sin grandes diferencias, en cuanto a crecimiento, entre ellos. En este sistema las plántulas de cáñamo crecieron rápidamente mostrando un aspecto y desarrollo muy adecuados a los fines perseguidos (Figura 10), inoculación *in vivo* de plántulas (Figura 10A) u obtención de explantos para infección *in vitro*. Asimismo el sistema permite mantener las plantas en buen estado por un periodo superior a 30 días, más que suficiente para obtener un buen desarrollo de raíces transformadas (*A. rhizogenes*) o tumores (*A. tumefaciens*). Diferencias entre genotipos de cáñamo en



cuanto a viabilidad y vigor de las semillas y plántulas, contaminación endógena de semillas (responsable de la pérdida por muerte de muchas plántulas) además de en la respuesta a la infección fueron también patentes en el germoplasma de nuestra colección.

Para el cultivo de *Agrobacterium* se usó el medio YEM sólido, en placa Petri, que resultó óptimo tanto para el mantenimiento rutinario de las diferentes cepas usadas en este trabajo como para su reactivación (cultivo de 48 horas) antes de la inoculación. Las plántulas se inocularon en hipocotilo mediante punción (dos sitios) con jeringuilla estéril como se describe en Material y Métodos.



**Figura 10.** Plántulas de cáñamo (genotipo CAN0221) de 12 días crecidas axénicamente en placas Petri de agar inclinado con medio B5, inoculada en hipocotilo con la cepa R1601 de *A. rhizogenes* (A) o no inoculada (B).

La mejor respuesta a la inoculación con *Agrobacterium* se obtuvo en plántulas de 5-7 días, hojas cotiledonares y primer par de hojas expandidos pero aun en desarrollo (Figura 10A). Plántulas más pequeñas (3-4 días) morían rápidamente posiblemente por el mayor daño impuesto en proporción a la planta, mientras que las plantas de más edad no mejoraron la respuesta. En cambio en plántulas inoculadas de

igual forma pero con agua estéril (usadas como control) no se observó ningún tipo de respuesta. Una secuencia común en la respuesta de las plántulas de cáñamo a la inoculación con *A. rhizogenes* fue como sigue, hinchazón del hipocotilo entorno al sitio de infección (3 días después de la inoculación), proliferación, en la herida, de un pequeño callo blanco (2-5 mm) de células prerizogénicas (4-5 días tras inoculación) como se describe en varios trabajos (Bercetche *et al.*, 1987; Grima-Pettenati *et al.*, 1989; Chriqui *et al.*, 1996) y emergencia de raíces abundantes a partir del callo entre 7 y 9 días después de la inoculación (Figura 11).



**Figura 11.** Plántulas de cáñamo, accesión CAN0221, crecidas axénicamente en placa de agar inclinado con medio B5 17 días después de la inoculación en hipocotilo (dos sitios) con la cepa R1601 de *A. rhizogenes* mostrando abundantes raíces emergiendo de los sitios de infección.

### ***Estimulación de la virulencia de las agrobacterias***

Diversos tratamientos han sido ensayados para aumentar la virulencia en cepas de *Agrobacterium* y mejorar la respuesta (número y tamaño de las raíces y tumores formados) de la planta a la infección en diversas especies (Alt-Mörbe *et al.*, 1989; Ankenbauer y Nester, 1990) incluyendo el uso de cepas supervirulentas portadoras o no de genes de virulencia duplicados (Jin *et al.*, 1987). En el presente

trabajo esto se ha llevado a cabo mediante el precultivo de *Agrobacterium* en diferentes medios de inducción como se explicó en Material y Métodos. Los resultados para la cepa R1601 de *A. rhizogenes* se recogen en la Tabla 13. Aunque la cepa R1601 es una cepa supervirulenta (Pythoud *et al.*, 1987), el preculvito de la misma durante 5 horas en los diferentes medios de inducción incrementó la frecuencia media (un 23%) con la que las plantas inoculadas respondieron con el característico síndrome de raíces pilosas o en cabellera, es decir pequeñas raíces emergiendo de las heridas. El menor efecto se obtuvo con el medio MI1 (10%) y el mayor con acetosiringona 20  $\mu\text{M}$  (28%) comparado con el agua estéril (control). De los otros parámetros de respuesta estudiados (Tabla 13) solo el tamaño de las raíces resultó afectado el cual incrementó con la concentración de acetosiringona (solución acuosa) en cambio en medios complejos (MI1 y MI2) el mismo nivel de acetosiringona no afectó el tamaño de las raíces. De acuerdo con estos resultados se eligió acetosiringona 20  $\mu\text{M}$  para inducción de las agrobacterias en los restantes experimentos.

**Tabla 13.** Respuesta de plántulas de cáñamo, CAN0221, a la inoculación con *A. rhizogenes* R1601. Efecto del pretratamiento de la bacteria con diferentes medios de inducción, 5 horas antes de la inoculación. Los resultados son la media  $\pm$  EE de 2 experimentos independientes. AS: acetosiringona. EE: Error Estándar, MI1 y MI2: medios de inducción complejos.

Tratamiento		Frecuencia <sup>a</sup> (%)	Tiempo <sup>b</sup> (días)	Raíces <sup>c</sup> (número)	Tamaño <sup>d</sup> (mm)	Vida media <sup>e</sup>
<b>Agua estéril (control)</b>		70 $\pm$ 3	9.1 $\pm$ 0.4	8.8 $\pm$ 1.4	7 $\pm$ 0.6	8.8 $\pm$ 0.4
	20	98 $\pm$ 2	9.1 $\pm$ 0.4	10.3 $\pm$ 1.8	8 $\pm$ 0.7	9.3 $\pm$ 0.5
<b>AS (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	100	90 $\pm$ 2	9.7 $\pm$ 0.4	9.1 $\pm$ 0.3	10 $\pm$ 0.8	8.5 $\pm$ 0.5
	200	93 $\pm$ 3	9.1 $\pm$ 0.3	8.6 $\pm$ 0.5	12 $\pm$ 0.9	9.3 $\pm$ 0.3
<b>MI1</b>		80 $\pm$ 5	9.7 $\pm$ 0.4	7.8 $\pm$ 0.7	8 $\pm$ 0.5	9.0 $\pm$ 0.2
<b>MI2</b>		92 $\pm$ 4	9.4 $\pm$ 0.5	7.9 $\pm$ 0.6	8 $\pm$ 0.2	8.7 $\pm$ 0.5

<sup>a</sup> Porcentaje de sitios inoculados (dos sitios por plántula, 30 a 45 plántulas) que han desarrollado respuesta positiva.

<sup>b</sup> Tiempo desde la inoculación hasta la aparición de raíces en los sitios de infección.

<sup>c</sup> Número de raíces emergentes por sitio infectado.

<sup>d</sup> Longitud media del conjunto de raíces emergentes en un sitio de infección.

<sup>e</sup> Tiempo (días) desde la aparición de las raíces en el sitio de infección hasta la muerte de las mismas.

### ***Tipo de inóculo***

La influencia que sobre la frecuencia de respuesta podía tener el tipo de inóculo aplicado se estudió ensayando diferentes inóculos: inóculo sólido (directamente de la placa de cultivo después del periodo de inducción) vs suspensiones celulares en diferentes medios. La Tabla 14 muestra que suspensiones celulares preparadas en agua o medio YEM a partir de cultivos frescos (48h) en medio sólido dieron las mayores frecuencias ( $97\pm 5\%$  y  $92\pm 2\%$  respectivamente) de inducción de raíces en hipocotilos de las plántulas de cáñamo seguidas del inóculo sólido y las suspensiones celulares en medios LB o B5. En consecuencia en este trabajo se ha usado el procedimiento más simple: suspensiones celulares en agua obtenidas tras la inducción del *Agrobacterium* por arrastre y dilución, con agua estéril, del cultivo hasta apariencia lechosa de la suspensión bacteriana.

**Tabla 14.** Efecto del tipo de inóculo sobre la frecuencia de inducción de raíces en hipocotilos de plántulas de cáñamo CAN0221 infectadas con la cepa R1601 de *A. rhizogenes*. Los resultados son la media $\pm$ EE de 2 experimentos independientes. Otros detalles como en la Tabla 13.

<b>Tipo de inóculo</b>	<b>Medio usado</b>	<b>Frecuencia (%)</b>	<b>Tiempo (días)</b>	<b>Raíces (número)</b>	<b>Tamaño (mm)</b>	<b>Vida media</b>
<b>Líquido</b>	H <sub>2</sub> O	97 $\pm$ 5	10.2 $\pm$ 0.5	6.5 $\pm$ 0.9	8 $\pm$ 1.1	7.2 $\pm$ 0.5
	LB	78 $\pm$ 3	10.2 $\pm$ 0.4	9.0 $\pm$ 1.8	8 $\pm$ 0.6	8.2 $\pm$ 0.4
	B5	77 $\pm$ 7	10.3 $\pm$ 0.6	5.6 $\pm$ 0.6	6 $\pm$ 0.7	7.4 $\pm$ 0.4
	YEM	92 $\pm$ 2	9.4 $\pm$ 0.5	7.9 $\pm$ 0.6	8 $\pm$ 0.2	8.7 $\pm$ 0.5
<b>Sólido</b>		82 $\pm$ 5	10.2 $\pm$ 0.3	8.7 $\pm$ 0.8	8 $\pm$ 0.9	7.4 $\pm$ 0.3

### ***Respuesta de diferentes órganos/tejidos a la inoculación in vivo e in vitro***

Para estudiar la respuesta de diferentes órganos/tejidos de plántulas de cáñamo a la inoculación *in vivo* con *A. rhizogenes* cada órgano/tejido se inocula por separado (evitando así un excesivo estrés por daños) como se describe en Material y Métodos. De los cuatro órganos inoculados, hipocotilo, nudo cotiledonar, cotiledón y

hoja, los dos primeros mostraron respuesta variable a *Agrobacterium* mientras que en los dos últimos no se observó ninguna respuesta (Tabla 15). El hipocotilo con una frecuencia del  $98\pm 5\%$  (porcentaje de sitios inoculados que desarrollaron raíces) resultó ser el más susceptible a la infección seguido del nudo cotiledonar con una frecuencia del  $57\pm 2\%$ . Los cotiledones (hojas cotiledonares) y hojas (primer par de hojas) infectados en la zona vascular central, no desarrollaron ningún tipo de respuesta (hinchazón, callo o raíces) como se ha dicho anteriormente.

**Tabla 15.** Respuesta (Porcentaje de sitios inoculados que dieron respuesta positiva) de diferentes órganos/tejidos de plántulas de cáñamo, CAN0221, a la infección con *A. rhizogenes* R1601. Los resultados son media de 3 experimentos independientes. (+++): Frecuencia de respuesta mayor del 80%, (++) : entre 50 y 80% y (-): ausencia de respuesta.

Órgano inoculado	Respuesta
Hipocotilo	+++
Nudo cotiledonar	++
Cotiledón	-
Hoja	-

Para la inoculación *in vitro*, segmentos de hipocotilo ( $\approx 1$ cm), hojas ( $\approx 0.5$  cm<sup>2</sup>) y cotiledones (hojas cotiledonares) cortados fueron cocultivados con la cepa R1601 y subcultivados en medio B5½ con Cefotaxima. Como se muestra en la Tabla 16, los explantos de hipocotilo fueron los únicos que desarrollaron raíces, con una frecuencia del  $77\pm 5\%$ , las hojas y cotiledones tampoco respondieron a la inoculación *in vitro*. La respuesta de los segmentos de hipocotilo (aparición de raíces en los extremos cortados) fue algo más rápida comparada con la inoculación *in vivo*, posiblemente porque no se observó la fase de formación de callo previa a la aparición de raíces en estos explantos. El número de raíces (1-3 por explanto) y el tamaño medio de las mismas (1-4 mm) fueron sin embargo apreciablemente menores que los obtenidos para la inoculación *in vivo* de explantos. En consecuencia, para el posterior estudio de susceptibilidad del cáñamo a la infección por cepas de

*Agrobacterium* se adoptó el protocolo de inoculación *in vivo*, en hipocotilo (dos sitios), de plántulas axénicas de 5-7 días en placas de agar inclinado.

**Tabla 16.** Respuesta (Porcentaje de sitios inoculados que dieron respuesta positiva) de explantos de cáñamo, CAN0221, al cocultivo con *A. rhizogenes* R1601. Los resultados son media de 3 experimentos independientes. Otros detalles como el Tabla 15.

<b>Explanto</b>	<b>Respuesta</b>
<b>Hipocotilo</b>	+++
<b>Cotiledón</b>	-
<b>Hoja</b>	-

## II.2. Respuesta del cáñamo a diferentes cepas de *A. rhizogenes*

### *Efecto de diferentes cepas en la inducción de raíces*

Se ensayó la virulencia de ocho cepas de *A. rhizogenes* en plántulas de cáñamo de la accesión CAN0221, crecidas axénicamente, mediante inoculación en hipocotilo (dos sitios por planta) y usando las condiciones experimentales previamente optimizadas. En la Tabla 17 se muestran los datos de virulencia o infectividad (como frecuencia de inducción de raíces) de las distintas cepas usadas, en plántulas de la accesión CAN0221 de cáñamo junto a otros parámetros de intensidad de respuesta. Todas las cepas usadas fueron capaces de inducir raíces adventicias en los sitios de infección en un corto periodo de tiempo (9-11 días), elevado número (ca 7-10 por sitio o sistema de raíces), de tamaño considerable (ca 6.7-9 mm), alta viabilidad en el sistema de raíces en cabellera (ca 9-14 días) y con un patrón de respuesta similar al descrito para la cepa R1601 en los experimentos de optimización.

La variabilidad entre las diferentes cepas fue patente no solo en la magnitud sino también en el patrón de respuesta, pues para cada parámetro considerado (Tabla 17) las distintas cepas se pueden agrupar de forma diferente. La mayor variabilidad entre cepas se observó para la frecuencia de inducción de raíces (hasta un 50% entre

la máxima y la mínima) y la viabilidad de los sistemas de raíces en cabellera (hasta un 40%) con una cierta relación inversa entre ambos parámetros. Así la cepa R1601 inducía formación de raíces con mayor frecuencia ( $98\pm 5\%$  de los sitios infectados) pero estas tenían una vida media, en la planta, más corta en comparación con las demás cepas (Tabla 17). Por el contrario, las cepas A424, AR10 y AR10GUS inducen raíces en los sitios de infección con una frecuencia media de tan solo un  $49\pm 7\%$  pero estas raíces se mantenían activas por un periodo de tiempo mayor ( $\approx 14$  días). Por otra parte también se puede observar que la presencia del plásmido p35S::gus en la cepa AR10GUS no afectó significativamente su virulencia, al menos en plántulas de cáñamo.

En conjunto los datos de la Tabla 17 muestran que *C. sativa* es una especie con una susceptibilidad media alta a la infección con *A. rhizogenes* y desarrollo del síndrome de raíces en cabellera.

**Tabla 17.** Inducción de raíces en hipocotilo de plántulas cáñamo, CAN0221, crecidas axénicamente por diferentes cepas de *A. rhizogenes*. Los resultados son la media $\pm$ EE de 2 experimentos independientes. EE: Error Estándar.

Cepa de <i>Agrobacterium</i>	Frecuencia <sup>a</sup>	Tiempo <sup>b</sup> (días)	Raíces <sup>c</sup> (número)	Tamaño <sup>d</sup> (mm)	Vida media <sup>e</sup>
Ar77	64 $\pm$ 8	8.8 $\pm$ 0.4	8.8 $\pm$ 0.7	8.0 $\pm$ 0.7	12.9 $\pm$ 0.8
Ar76	60 $\pm$ 8	10.4 $\pm$ 0.4	7.3 $\pm$ 0.7	6.4 $\pm$ 0.7	10.2 $\pm$ 0.7
A424	52 $\pm$ 9	11.3 $\pm$ 0.4	6.7 $\pm$ 0.7	6.9 $\pm$ 0.7	13.4 $\pm$ 0.8
AR10GUS	43 $\pm$ 8	10.6 $\pm$ 0.5	7.6 $\pm$ 1.0	7.4 $\pm$ 1.0	13.3 $\pm$ 1.0
A4	63 $\pm$ 3	9.8 $\pm$ 0.3	8.6 $\pm$ 0.7	9.0 $\pm$ 0.5	13.4 $\pm$ 0.7
Ar78	67 $\pm$ 8	9.4 $\pm$ 0.3	9.7 $\pm$ 1.0	8.5 $\pm$ 0.7	14.0 $\pm$ 0.8
AR10	53 $\pm$ 4	10.3 $\pm$ 0.4	9.1 $\pm$ 0.9	7.8 $\pm$ 0.5	14.9 $\pm$ 0.8
R1601	98 $\pm$ 5	9.4 $\pm$ 0.5	7.9 $\pm$ 0.6	7.9 $\pm$ 0.2	8.7 $\pm$ 0.5

<sup>a</sup> Porcentaje de sitios inoculados que han desarrollado respuesta positiva.

<sup>b</sup> Tiempo desde la inoculación hasta la aparición de raíces en los sitios de infección.

<sup>c</sup> Número de raíces emergentes por sitio infectado.

<sup>d</sup> Longitud media del conjunto de raíces emergentes en un sitio de infección.

<sup>e</sup> Tiempo (días) desde la aparición de las raíces en el sitio de infección hasta la muerte de las mismas.

### ***Efecto de los genes rol en la inducción de raíces***

Cuando se usaron para la infección cepas de *Agrobacterium tumefaciens* desarmadas llevando los diferentes genes *rol* por separado (*rolA*, *rolB*, *rolA+rolB*, *rolC*, *rolA+rolB+rolC* y *rolD*), hemos visto que 15 días después de la inoculación, el *rolC* fue el único capaz de inducir el desarrollo de un pequeño callo en la mayoría de los sitios de infección seguido por la aparición de 2 a 3 raíces en cada sitio infectado con respuesta positiva. Con los demás genes *rol* (*A*, *B*, *AB* y *D*) una a 2 raíces muy finas se formaron directamente en el sitio de inoculación, mientras que la combinación de los tres genes *rolA*, *rolB* y *rolC* restableció la respuesta normal de las plántulas dando lugar al desarrollo de callos prerizogénicos en la mayoría de los sitios infectados y aparición de 6 a 8 raíces por sitio infectado después de 7 a 10 días tras la inoculación. Hay que mencionar que todos los genes *rol* utilizados por separado dieron una frecuencia de respuesta muy baja (Tabla 18), al mismo tiempo la combinación de los genes *rolA*, *B* y *C* resultó en un porcentaje de respuesta del  $73.5\pm 5\%$  el cual fue parecido al encontrado en la mayoría de las cepas de *Agrobacterium* usadas (Tabla 17) e incluso mayor.

**Tabla 18.** Frecuencia de respuesta de plántulas de cáñamo de la accesión CAN0221 a la infección con cepas de *A. tumefaciens* desarmadas llevando diferentes combinaciones de genes *rol*. Los resultados se expresan como porcentaje de sitios inoculados que han desarrollado respuesta positiva y son la media $\pm$ EE de 2 experimentos independientes.

<b>Genes <i>rol</i></b>	<b>Frecuencia (%)</b>
<i>rolA</i>	6.4 $\pm$ 0.4
<i>rolB</i>	7.5 $\pm$ 0.3
<i>rolC</i>	3.4 $\pm$ 0.4
<i>rolD</i>	6.8 $\pm$ 0.1
<i>rolA+rolB</i>	9.2 $\pm$ 1.5
<i>rolA+rolB+rolC</i>	73.5 $\pm$ 4.5



Todas las raíces emergentes de los sitios de infección se aislaron y se cultivaron en medio MS sólido sin fitohormonas de la misma manera que se describe para las demás raíces transformadas. Desafortunadamente, solo algunas raíces inducidas por la cepa portadora del gen *rolB* fueron capaces de desarrollarse durante 4 semanas en este medio. Estas raíces eran muy finas y murieron después de este periodo de cultivo mientras que los demás clones murieron después de la segunda semana de cultivo. Cuando las raíces procedentes de la infección con la cepa portadora los tres genes *rol* (*A*, *B* y *C*) se cultivaron en medio MS sin fitohormonas, mostraron un desarrollo satisfactorio siguiendo un patrón de crecimiento parecido al notado para las raíces transformadas con cepas completas y se usaron para seleccionar líneas de raíces transformadas que llevan sólo los tres genes *rol ABC*.

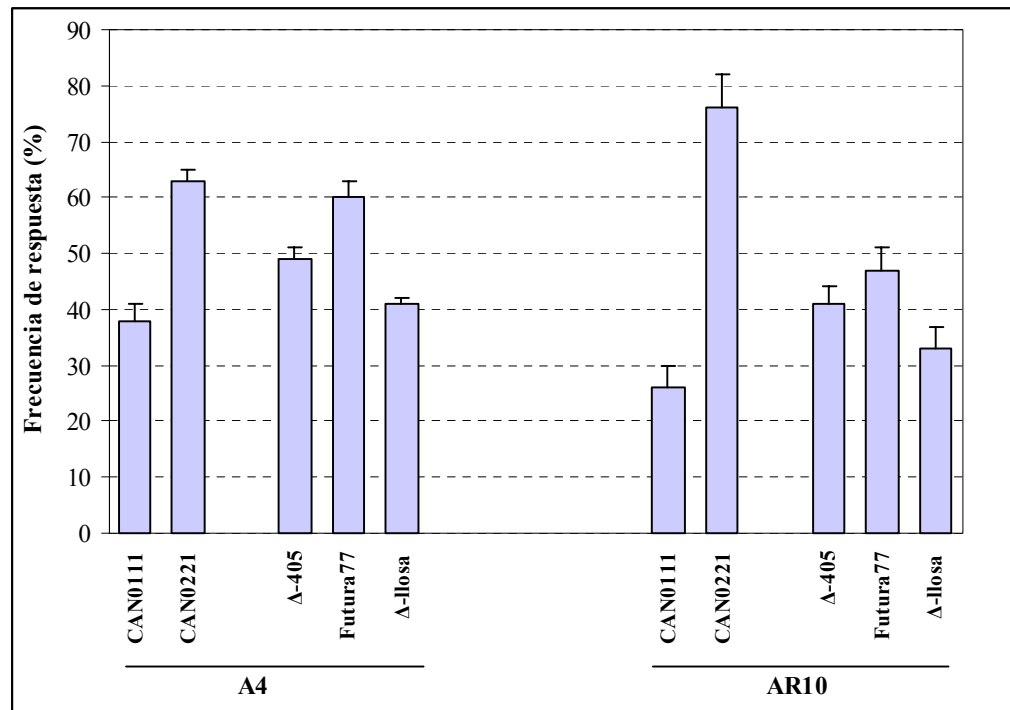
### **II.3. Variabilidad genotípica del cáñamo a la infección por *Agrobacterium***

La infección con cepas de *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens* se utilizó para estudiar la respuesta de varios genotipos de cáñamo incluyendo cultivares de fibra (Futura77, Delta-Ilosa y Delta 405) y accesiones de droga (CAN0111 y CAN0221) a este patógeno, lo que permitió ver una apreciable variabilidad en la respuesta tanto a nivel intra como interfenotípico.

#### ***Infección con diferentes cepas de A. rhizogenes***

En base a los estudios de la infectividad de distintas cepas de *A. rhizogenes* en plántulas de cáñamo (Tabla 17), se eligieron usar las cepas A4 y AR10 debido al alto vigor de las raíces que inducen. La comparación de las frecuencias de respuesta (porcentaje de sitios inoculados que han desarrollado respuesta positiva) inducidas por la cepa A4 en los diferentes genotipos ha mostrado que dentro de los cultivares de fibra, Futura77 fue el más susceptible a la infección con una frecuencia de respuesta del 60% en comparación con los otros genotipos (49% y 41% para los cultivares Delta-405 y Delta-Ilosa respectivamente). En cambio, el uso de la cepa AR10 no produjo diferencias apreciables en la respuesta de estos tres genotipos. En lo que respecta a las accesiones de droga, la accesión CAN0221 (con frecuencias de

respuesta del 63 y 76% con las cepas A4 y AR10 respectivamente) se mostró mucho más susceptible a las dos cepas respecto de la accesión CAN0111 (con frecuencias de respuesta del 38 y 26% con la A4 y AR10 respectivamente) (Figura 12).



**Figura 12.** Respuesta (expresada en porcentaje de sitios inoculados que han desarrollado raíces) de cinco genotipos de cáñamo (tres cultivares de fibra: Futura77, Δ-Ilosa y Δ-405 y dos accesiones de droga: CAN0111 y CAN0221) a la inoculación con las cepas A4 y AR10 de *A. rhizogenes*. Los datos son la media de 2 experimentos independientes y las barras verticales representan el Error Estándar.

La evaluación de los parámetros de respuesta fijados en el presente estudio (Tabla 19) no mostró diferencias apreciables en el tiempo de aparición de respuesta ni el número de raíces entre los diferentes cultivares de fibra cuando la infección se hizo con la cepa A4, mientras que el tamaño de las raíces y la vida media de las mismas fueron significativamente mayores en plántulas del cultivar Futura77. Con la cepa AR10 no se notaron mayores diferencias entre estos cultivares, lo que viene a apoyar los resultados de las frecuencias de respuesta expuestos en la Figura 13. En lo que respecta a las accesiones de droga, a parte de la vida media de las raíces inducidas por la cepa A4 que fue mayor en la accesión CAN0111, los demás

parámetros de respuesta no variaron significativamente (Tabla 19). Este genotipo presentó una respuesta más intensa frente a la accesión CAN0221 en respuesta a la cepa AR10, desarrollando los sitios de infección mayor número de raíces que además tuvieron una vida media más larga. Estos resultados muestran la influencia tanto de la frecuencia de respuesta como de la intensidad de la misma (número, tamaño y vida media de las raíces) sobre la evaluación de la susceptibilidad a la infección. Por otra parte, vemos que la respuesta estuvo principalmente determinada, al menos en nuestras condiciones experimentales, por la cepa de *A. rhizogenes* usada para la infección y por el genotipo de la planta. En cambio no se pudieron destacar diferencias atribuibles al fenotipo.

**Tabla 19.** Evaluación de la variabilidad genotípica en la respuesta de plántulas de cáñamo de cinco genotipos con fenotipo fibra (Futura77,  $\Delta$ -llosa y  $\Delta$ -405) y droga (CAN0111 y CAN0221) a las cepas AR10 y A4 de *A. rhizogenes*. Los resultados son la media $\pm$ EE de 2 experimentos independientes. EE: Error Estándar.

Cepas de <i>A. rhizogenes</i>	Genotipos de cáñamo	Tiempo <sup>a</sup> (días)	Raíces <sup>b</sup> (número)	Tamaño <sup>c</sup> (mm)	Vida media <sup>d</sup>
<b>A4</b>	<i>CAN0111</i>	10.0 $\pm$ 0.8	9.2 $\pm$ 1.1	9.1 $\pm$ 0.8	15.7 $\pm$ 0.8
	<i>CAN0221</i>	9.8 $\pm$ 0.3	8.6 $\pm$ 0.7	9.0 $\pm$ 0.5	11.4 $\pm$ 0.7
	<i>Futura77</i>	11.1 $\pm$ 0.6	8.5 $\pm$ 0.8	10.2 $\pm$ 0.8	16.4 $\pm$ 0.8
	<i>Delta-405</i>	9.2 $\pm$ 0.3	7.2 $\pm$ 1.0	8.1 $\pm$ 1.0	9.0 $\pm$ 0.6
	<i>Delta-llosa</i>	10.1 $\pm$ 0.4	6.8 $\pm$ 0.7	6.8 $\pm$ 0.3	11.4 $\pm$ 0.4
<b>AR10</b>	<i>CAN0111</i>	10.3 $\pm$ 0.4	9.1 $\pm$ 0.9	7.8 $\pm$ 0.5	14.9 $\pm$ 0.8
	<i>CAN0221</i>	11.7 $\pm$ 0.5	6.2 $\pm$ 0.8	6.7 $\pm$ 0.7	11.7 $\pm$ 0.7
	<i>Futura77</i>	11.2 $\pm$ 0.5	7.2 $\pm$ 0.6	13.4 $\pm$ 1.6	13.2 $\pm$ 0.6
	<i>Delta-405</i>	11.7 $\pm$ 0.5	6.4 $\pm$ 0.8	10.8 $\pm$ 0.9	13.0 $\pm$ 0.5
	<i>Delta-llosa</i>	11.8 $\pm$ 0.5	5.9 $\pm$ 1.1	5.9 $\pm$ 0.7	11.2 $\pm$ 0.7

<sup>a</sup> Tiempo desde la inoculación hasta la aparición de raíces en los sitios con respuesta positiva.

<sup>b</sup> Número de raíces emergentes por sitio infectado.

<sup>c</sup> Longitud media del conjunto de raíces emergentes en un sitio de infección.

<sup>d</sup> Tiempo (días) desde la aparición de las raíces en el sitio de infección hasta la muerte de las mismas.

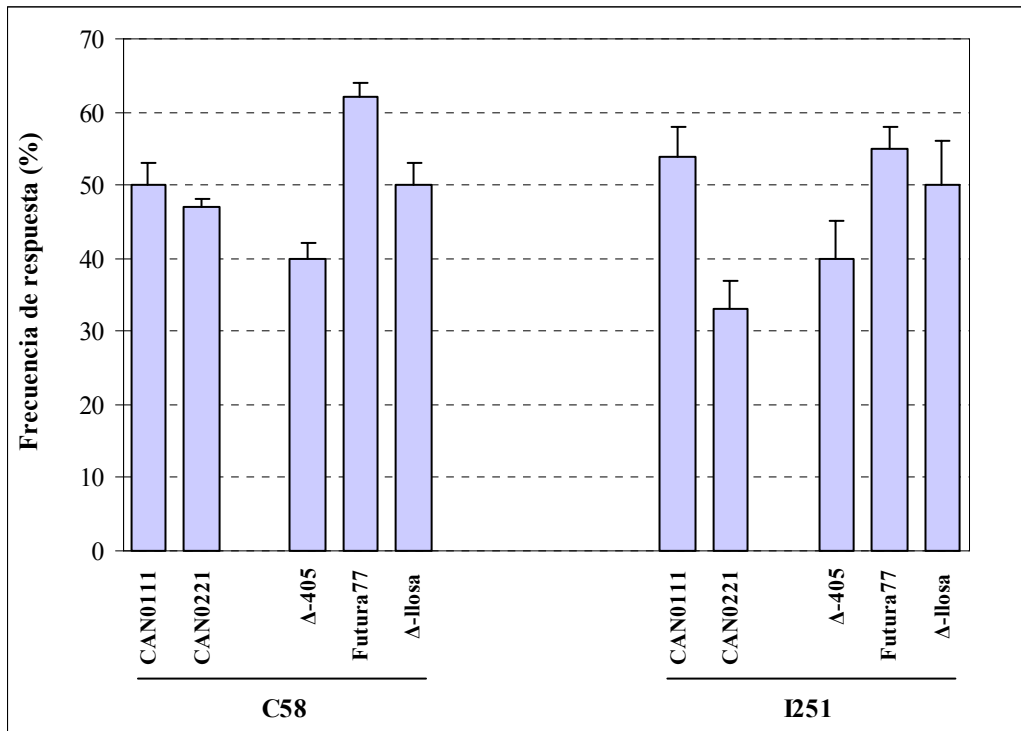
### ***Infección con diferentes cepas de A. tumefaciens***

La infección con cepas de *Agrobacterium* llevando el plásmido Ti resultó en la formación, entre 4 a 7 días tras la inoculación, de agallas o tumores de color verde y textura compacta en el sitio de infección (Figura 13). Por cada sitio inoculado se desarrolló un tumor único cuyo tamaño osciló entre 3 y 10 mm y que exhibió. Contrariamente a las raíces en cabellera, los tumores presentaron una vida media larga y permanecieron activos (buena apariencia ) durante todo el periodo de cultivo de las plantas.



**Figura 13.** Tumores de 10 días desarrollados en los sitios de infección de plántulas de cáñamo, CAN0221, inoculadas con la cepa C58 de *A. tumefaciens*.

La frecuencia de respuesta de los cinco genotipos de cáñamo a las dos cepas de *A. tumefaciens* fue muy variable, de manera que dentro del fenotipo droga, ambas accesiones tuvieron frecuencias de respuestas parecidas cuando se usó la cepa C58 para la infección (Figura 14) mientras que en los cultivares de fibra la Futura77 fue la más sensible a esta cepa. En cambio, el uso de la cepa I251 resultó en una variabilidad de la respuesta dentro del fenotipo droga siendo la CAN0111 la más sensible mientras que los cultivares de fibra respondieron de manera semejante.



**Figura 14.** Respuesta (expresada como porcentaje de sitios infectados que han desarrollado tumores) de 5 genotipos de cáñamo (tres cultivares de fibra: Futura77, Δ-llosa y Δ-405 y dos accesiones de droga: CAN0111 y CAN0221) a la infección con las cepas C58 y I251 de *A. tumefaciens*. Los resultados, expresados como porcentaje de sitios inoculados que han desarrollado tumores, son la media de 2 experimentos. Las barras verticales representan el Error Estándar.

En la Tabla 20 se observa que el tiempo requerido para la aparición de los tumores dependió del genotipo más que de la cepa bacteriana usada para la infección, siendo el cultivar Futura77 el primero en desarrollar respuesta con respecto a los demás genotipos. También es importante resaltar que el uso de la cepa I251 para la infección, indujo tumores con mayor peso en las plántulas de las accesiones de droga respecto del cáñamo industrial (Figura 15). Este parámetro fue el único, dentro de todos los estudiados, que permitió ver variabilidad a nivel fenotípico en los genotipos de cáñamo estudiados. Cabe mencionar, por último, que algunos tumores procedentes de la infección de plántulas de cáñamo, CAN0221, con las cepas C58 e I251 de *A. tumefaciens* se cultivaron en medio MS sin fitohormonas en presencia de Cefotaxima durante 6 semanas con el fin de establecer cultivos axénicos. Todos los

tumores cultivados en dicho medio mostraron buen crecimiento, y se establecieron 2 líneas de tumores, una por cepa, para determinación de su naturaleza transformada.

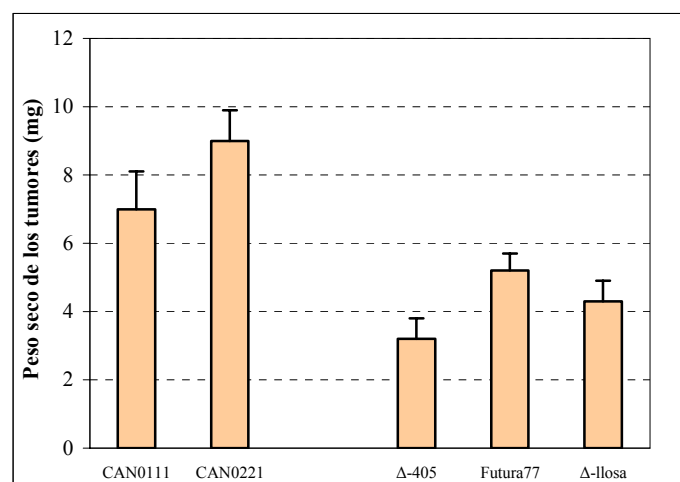
**Tabla 20.** Evaluación de la variabilidad genotípica en la respuesta de cinco genotipos de cáñamo a las cepas C58 y I251 de *A. tumefaciens*. Los datos representan la media $\pm$ EE de 2 experimentos independientes. EE: Error Estándar.

Cepas de <i>A. tumefaciens</i>	Genotipo de cáñamo	Tiempo <sup>a</sup> (días)	PF <sup>b</sup> (mg)	PS <sup>c</sup> (mg)	Tamaño <sup>d</sup> (mm)
<b>C58</b>	<i>CAN0111</i>	7.4 $\pm$ 0.2	65.4 $\pm$ 7.9	6.2 $\pm$ 0.8	5.5 $\pm$ 0.4
	<i>CAN0221</i>	5.9 $\pm$ 0.2	60.5 $\pm$ 5.2	4.9 $\pm$ 0.5	5.8 $\pm$ 0.3
	<i>Futura77</i>	5.1 $\pm$ 0.1	60.5 $\pm$ 5.3	4.5 $\pm$ 0.4	4.5 $\pm$ 0.3
	<i>Delta-405</i>	6.7 $\pm$ 0.3	25.4 $\pm$ 3.3	2.1 $\pm$ 0.3	3.9 $\pm$ 0.4
	<i>Delta-llosa</i>	7.3 $\pm$ 1.4	49.9 $\pm$ 6.9	4.3 $\pm$ 0.6	5.4 $\pm$ 0.4
<b>I251</b>	<i>CAN0111</i>	7.9 $\pm$ 0.2	76.4 $\pm$ 11.7	6.9 $\pm$ 1.1	5.9 $\pm$ 0.6
	<i>CAN0221</i>	6.5 $\pm$ 0.5	90.0 $\pm$ 20.7	9.4 $\pm$ 1.9	6.4 $\pm$ 0.6
	<i>Futura77</i>	5.6 $\pm$ 0.2	63.1 $\pm$ 7.1	5.2 $\pm$ 0.5	4.7 $\pm$ 0.3
	<i>Delta-405</i>	6.7 $\pm$ 0.4	27.4 $\pm$ 5.7	3.2 $\pm$ 0.6	4.1 $\pm$ 0.5
	<i>Delta-llosa</i>	7.1 $\pm$ 0.2	41.3 $\pm$ 4.4	4.1 $\pm$ 0.5	4.6 $\pm$ 0.4

<sup>a</sup> Tiempo entre la inoculación y la aparición del tumor.

<sup>b,c</sup> Peso fresco y peso seco de los tumores 10 días después de su aparición.

<sup>d</sup> Tamaño del tumor 10 días después de su aparición.



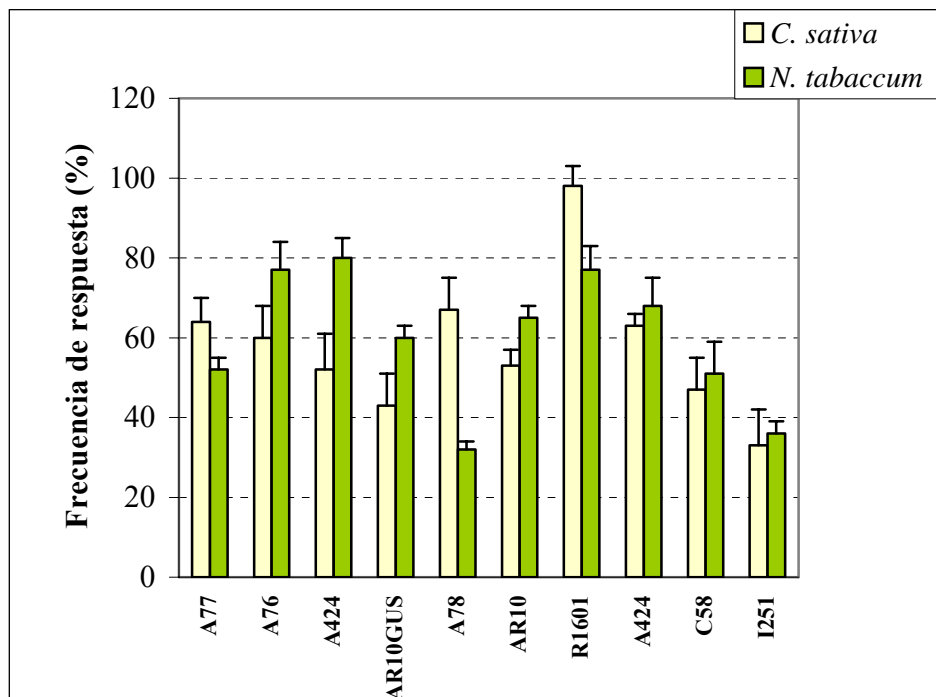
**Figura 15.** Peso seco (mg) de tumores inducidos en plántulas de cáñamo de cinco genotipos con la cepa I251 de *A. tumefaciens*, 10 días después de su aparición. Las barras verticales representan el Error Estándar.

#### II.4. Comparación de la respuesta de *C. sativa* y *N. tabacum*

Después de estudiar de respuesta de *C. sativa* a la infección con *Agrobacterium*, se planteó comparar dicha respuesta con una especie conocida por su alta susceptibilidad a este patógeno, como es el caso del tabaco (*Nicotiana tabacum*, Clemente, 2006). A tal fin se inocularon plántulas de cáñamo y tabaco con 10 de las cepas de *Agrobacterium* incluidas en el presente trabajo. La respuesta de las plántulas de cáñamo a la infección fue más rápida (9 a 11 días entre la inoculación y la aparición de respuesta) respecto de las plántulas de tabaco (2 a 3 semanas). Además las raíces formadas en tabaco eran pequeñas (en la mayoría de los casos no superaban 1 cm de longitud) y menos abundantes (5 a 10 raíces por sitio infectado) en comparación con las raíces desarrolladas en cáñamo (Figura 16A). Como se puede desprender de la Figura 17, el 38% de las cepas de *A. rhizogenes* ensayadas indujeron mayor frecuencia de respuesta en plántulas de cáñamo frente a un 50% de las cepas que dieron mayor frecuencia de respuesta en tabaco, las cepas restantes (12%) indujeron respuestas parecidas en ambas cepas. Con cepas de *A. tumefaciens* las frecuencias de respuesta de las dos especies fueron parecidas (Figura 17), no obstante, los tumores formados en plántulas de tabaco eran más pequeños ( $\approx 4$  mm) como muestra la Figura 16B.



**Figura 16.** Respuesta de plántulas de *C. sativa* y *N. tabacum* a *Agrobacterium*. **(A)** Inducción de raíces por *A. rhizogenes* A4. **(B)** Inducción de tumores por *A. tumefaciens* C58.



**Figura 17.** Respuesta de plántulas de *C. sativa* y *N. tabacum* a ocho cepas de *A. rhizogenes* y dos de *A. tumefaciens*. Los resultados se expresan en porcentaje de sitios inoculados que han desarrollado respuesta positiva, y las barras verticales representan el Error Estándar.

## II.5. Obtención de cultivos estabilizados de raíces

Cuando las raíces emergentes en los sitios de infección se transfirieron a medio de cultivo, sin aporte exógeno de reguladores de crecimiento, el 90% siguieron desarrollándose mostrando crecimiento rápido, geotropismo alterado (plagiotropismo) e intensa ramificación cumpliendo con la descripción que generalmente se conoce para las raíces transformada (David *et al.*, 1984; Tepfer, 1984; Cardarelli *et al.*, 1987). Previo a la selección de los clones de raíces, se procedió a la eliminación de *Agrobacterium* de las raíces para la obtención de cultivos axénicos. Asimismo las concentraciones de Cefotaxima empleadas resultaron eficientes y se obtuvieron cultivos totalmente libres de *Agrobacterium* tras 6 semanas de cultivo en presencia del antibiótico.

A lo largo de los experimentos realizados en esta parte del trabajo, un gran número de clones de raíces con diferentes procedencias (combinación genotipo de



cáñamo/cepa de *Agrobacterium*), morfologías y potencial de crecimiento han sido obtenidos. A partir de dichos clones varias líneas de de raíces se han estabilizado, principalmente en cuanto a características morfológicas, durante más de 4 meses, periodo tras el cual las líneas de raíces establecidas mostraron alta estabilidad fenotípica que permaneció durante más de 5 años.

## II.6. Análisis de la transformación

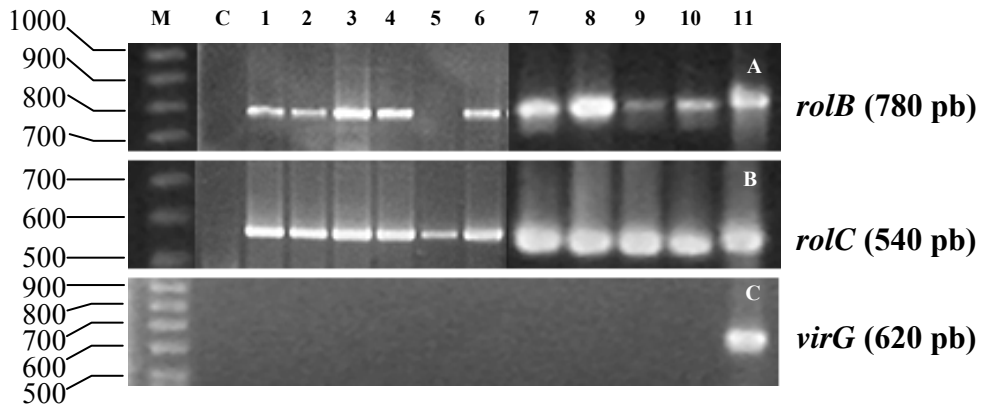
El crecimiento de los diferentes clones y líneas de raíces en medio sin fitohormonas fue la primera evidencia de su carácter transformado. Estos tejidos por haber insertado los oncogenes situados en el T-DNA: *aux* y *rol* (Akiyoshi *et al.*, 1984; Thomashow *et al.*, 1986, Depicker *et al.*, 1988; Capone *et al.*, 1989) no requirieron ningún aporte exógeno de reguladores del crecimiento durante todo el periodo de cultivo y mantenimiento.

La incorporación y expresión del gen quimérico *gus*, como indicador de la transformación, se comprobó en raíces inducidas con la cepa AR10GUS de *A. rhizogenes* portadora de dicho gen. Una de las líneas de raíces estabilizadas (AR10) se obtuvo tras la infección de plántulas de *C. sativa* con la cepa AR10GUS, esta línea de raíces mostró una coloración azul intensa principalmente en las regiones con crecimiento activo. Por otra parte, en raíces emergentes del sitio de infección, inducidas con la misma cepa, se notó coloración azul en el cilindro central y las regiones apicales, ambas caracterizadas por la existencia de un meristema con células en división activa (Figura 18). En cambio, en raíces no transformadas usadas como control no se desarrolló coloración ninguna.

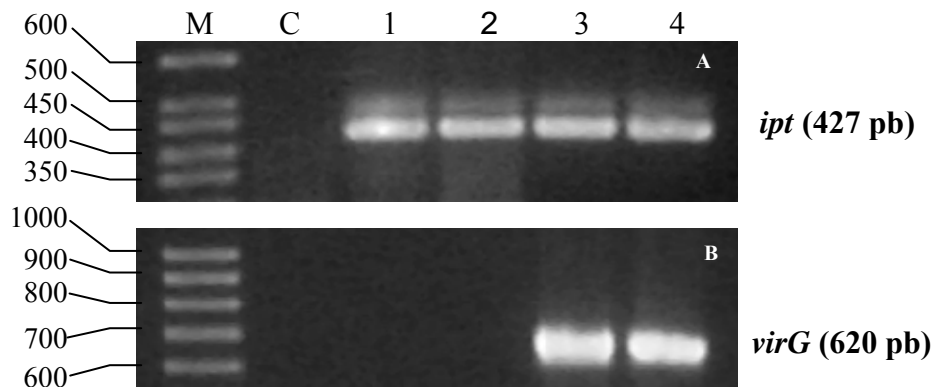


**Figura 18.** Tinción histoquímica GUS de raíces transformadas emergentes del sitio de infección de una plántula de cáñamo perteneciente al genotipo CAN0221 e inoculada con la cepa AR10GUS de *A. rhizogenes*.

Por otra parte, para su funcionalidad, el cultivo transgénico debe incorporar en su genoma el transgen y posteriormente expresarlo. Para verificar estos requerimientos, se estudió por PCR, a partir de un extracto de ADN genómico, la presencia de los genes *rolB* y *rolC* en 10 líneas de raíces, y del gen *ipt* en dos líneas de tumores. El análisis demostró la integración del T-DNA en el genoma de los tejidos transformados mediante la amplificación de dos fragmentos de 780 pb y 540 pb con los cebadores *rolB* y *rolC* respectivamente (Figura 19A, B). El cebador del gen *ipt* generó a su vez un fragmento de 427 pb determinado en el genoma de las dos líneas de tumores (Figura 20A). La ausencia de la banda del gen *virG* de unos 620 pb en todos los tejidos transformados incluidos en este estudio descartó la posibilidad de contaminación bacteriana (Figura 19C, 20B).



**Figura 19.** Análisis por PCR del ADN genómico de raíces transgénicas de *C. sativa*. Detección de los genes *rolB* de 780 pb (A) y *rolC* de 540 pb (B) en todas las líneas de raíces transformadas ensayadas (carriles 1-10: C55, C70, CAB3, CAR10, C1601, C1602, C1701, C1801, C1901 y C2701 respectivamente), estos genes fueron ausentes en las raíces no transformadas usadas como control negativo (C). El carril 11 representa el ADN bacteriano usado como control positivo. La presencia de la banda del *virG* (C) de 620 pb en las raíces transformadas indicaría la contaminación de estos tejidos con *Agrobacterium*.



**Figura 20.** Análisis por PCR del ADN de tumores inducidos con *A. tumefaciens*. (A) La amplificación de una secuencia de 427 pb correspondiente al gen *ipt* en ambas líneas de tumores procedentes de la infección con las cepas C58 y I251 (carriles 1 y 2 respectivamente) confirma la transformación de estos tejidos. La misma banda fue ausente en el ADN de hojas de cáñamo usadas como control negativo (C). Los carriles 3 y 4 representan los controles positivos (ADN de las cepas C58 y I251 respectivamente). (B) Ausencia del gen *virG* en los tejidos transformados.

### III. CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS RAÍCES TRANSFORMADAS DE *C. sativa*

El presente estudio se centró en las raíces transformadas de *C. sativa* como material de trabajo y se estructuró en dos bloques de experimentos principales: primero se determinaron las condiciones óptimas para el crecimiento de las raíces y la obtención de biomasa y a continuación se llevaron a cabo algunas determinaciones fisiológicas y bioquímicas a nivel de estas raíces.

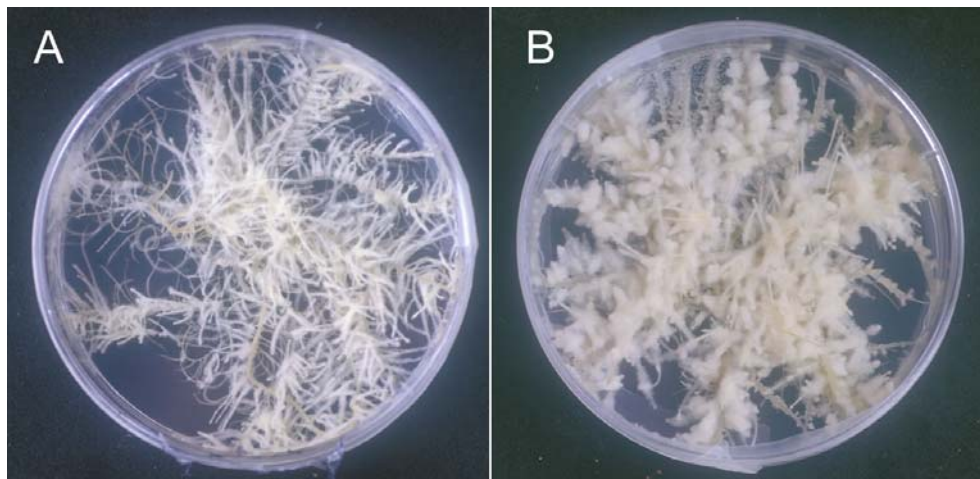
#### III.1. Características de las raíces transformadas

Como se ha mencionado anteriormente, varios clones y líneas de raíces transformadas de *C. sativa* se han podido seleccionar a lo largo de los experimentos anteriores. A partir de esta colección de raíces se eligieron 10 líneas (las mismas usadas para el análisis de la transformación), debido a su alto crecimiento y estabilidad fenotípica, para llevar a cabo las determinaciones programadas en la mayoría de los experimentos del presente estudio. Las líneas seleccionadas fueron procedentes de los dos fenotipos de cáñamo; fibra (tres cultivares) y droga (dos accesiones), cuatro cepas de *A. rhizogenes* y las dos morfologías que, a lo largo de la fase de estabilización, se han podido diferenciar (Tabla 21). Las dos morfologías, identificadas tras mantenerse estables en varios subcultivos durante más de 4 meses, consistieron en líneas con raíces finas y otras con raíces gruesas. En el primer caso las raíces fueron finas, largas y muy ramificadas presentando la morfología típica de las raíces transformadas con *A. rhizogenes* (Figura 21A), mientras que la otra morfología consistió en raíces más gruesas, menos largas y con abundantes pelos

radicales (Figura 21B). Es importante señalar que las líneas de raíces con morfología fina fueron más frecuentes en todas las combinaciones planta-bacteria ensayadas, en cambio, sólo pocas líneas con morfología gruesa pudieron ser seleccionadas. Los resultados del estudio del crecimiento de estas líneas, mostraron que la biomasa acumulada, expresada en peso fresco de las raíces después de 4 semanas de cultivo en medio MS sólido, fue 2 veces mayor en líneas de raíces gruesas con respecto a aquellas con morfología fina: 403 y 214 mg ( $p < 0.01$ ) respectivamente, notando un incremento del peso fresco con un factor de 100 y 53 para las raíces con morfología gruesa y fina respectivamente.

**Tabla 21.** Raíces transformadas de cáñamo (*C. sativa*) inducidas en plántulas de 5 genotipos (incluyendo variedades de fibra y de droga) con diferentes cepas de *A. rhizogenes*.

Fenotipo de la planta	Genotipo de la planta	Cepas de <i>Agrobacterium</i>	Líneas de raíces	Morfología de raíces		
<b>Droga</b>	<i>CAN0221</i>	A4	C55	Fina		
			C70	Gruesa		
		R1601	C1601	Gruesa		
			C1602	Fina		
			CAR10	Gruesa		
		LBA4404	CABC	Fina		
		<i>CAN0237</i>	A4	C2701	Gruesa	
		<b>Fibra</b>	<i>Futura77</i>		C1801	Fina
			<i>Delta-405</i>	A4	C1701	Gruesa
			<i>Delta-llosa</i>		C1901	Fina



**Figura 21.** Raíces transformadas de cáñamo cultivadas en medio MS sólido durante cuatro semanas. (A) raíces con morfología fina, (B) raíces con morfología gruesa.

### **III.2. Influencia de algunos factores del medio de cultivo sobre el crecimiento de las raíces transformadas**

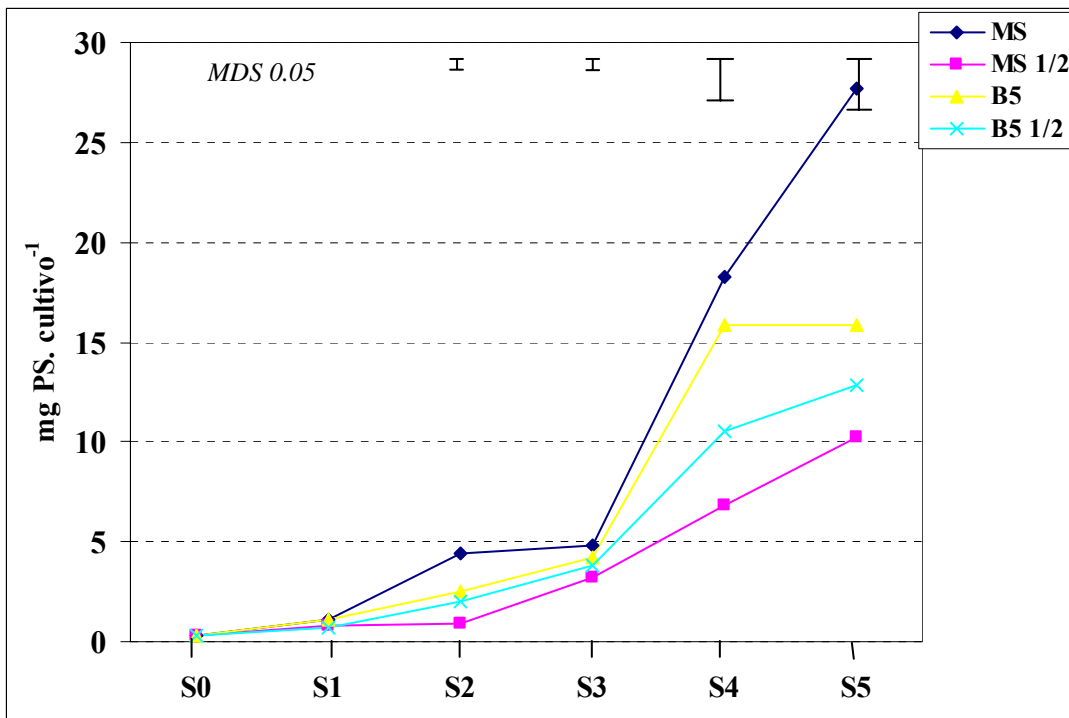
El hecho conocido de que, en los cultivos *in vitro* de células y tejidos vegetales, el crecimiento se ve afectado por la composición del medio de cultivo (Constabel y Shyluk, 1994), llevó a realizar un estudio del efecto de la concentración de sales y de sacarosa en el medio sobre el crecimiento de las raíces transformadas cultivadas en medio sólido. Para ello se cultivaron explantos de raíces obtenidos de 60 clones distintos, procedentes de varias combinaciones cepa/genotipo, primero en medio con distintas concentraciones de sales y luego se ensayaron varias concentraciones de sacarosa.

#### **III.2.1. Efecto de la concentración de sales**

Los resultados obtenidos (expresados en peso seco de las raíces en cada semana durante 5 semanas de cultivo) indican poca diferencia en la cinética de crecimiento de las raíces en las distintas concentraciones de sales ensayadas durante las tres primeras semanas de cultivo (Figura 22). Sin embargo, a partir de allí se notó un mejor crecimiento de las raíces en medios con altas concentraciones de sales (MS y B5) obteniéndose, al cabo del periodo de cultivo, la máxima biomasa (28 mg) en

la mayor concentración de sales ensayada siendo la correspondiente al medio MS (según la composición de los medios presente en la Tabla 4 de Material y Métodos el orden de los medios del más al menos concentrado es MS, B5, MS ½ y B5 ½). En los demás medios, el crecimiento de las raíces se vio significativamente reducido con la disminución de la concentración de sales en el medio (Figura 22).

En las condiciones de cultivo elegidas, el cultivo de raíces transformadas de cáñamo pasó por una fase de adaptación al medio de cultivo o fase de latencia que duró generalmente una semana, extendiéndose hasta 2 semanas en la menor concentración de sales ensayada (MS ½). En este medio se inició a continuación una fase de crecimiento lineal que duró hasta la quinta semana de cultivo. En cambio, en los demás medios se observó, al final de la tercera semana de cultivo, una fase de crecimiento acelerado cuya intensidad estuvo proporcional a la concentración de sales usada. Sin embargo esta fase no duró más de una semana empezándose a ralentizar el crecimiento de las raíces después de cuatro semanas de cultivo.



**Figura 22.** Crecimiento de raíces transformadas de cáñamo en cuatro concentraciones de sales durante cinco semanas. Los datos se expresan en mg de peso seco (PS) por cultivo.

A partir de los datos de biomasa obtenidos se calcularon dos parámetros de crecimiento que son el índice de crecimiento (Ic) que representa el aumento total de la biomasa final con respecto a la inicial después de cinco semanas de cultivo, y la tasa de crecimiento que indica la velocidad de acumulación de la biomasa a lo largo el periodo de cultivo ( $T_c = \frac{PS_f - PS_i}{T_f - T_i}$ ). Esto permitió ver que el máximo Ic se alcanzó en presencia de la mayor concentración de sales ensayada (medio MS), con un descenso del 43, 63 y 54% en los medio B5, MS ½ y B5 ½ respectivamente con respecto al medio MS (Tabla 22).

**Tabla 22.** Índice de crecimiento (Ic) de raíces transformadas de cáñamo después de cinco semanas de cultivo en diferentes concentraciones de sales.  $PS_i$  (peso seco del inóculo) = 0.3 mg.

Medio	Ic
MS	93
B5	53
MS ½	34
B5 ½	43

La Figura 23 muestra que la máxima tasa de crecimiento durante la fase de crecimiento acelerado (entre la tercera y cuarta semana de cultivo) se observó cuando las raíces se cultivaron en medio MS, con una disminución de la  $T_c$  proporcional a la concentración de sales en el medio. También es de destacar el drástico descenso en la velocidad de crecimiento de las raíces en los medios MS, B5 y B5 ½ después de cuatro semanas, lo que indica el inicio de la fase estacionaria. En cambio, en medio MS ½ no se notó descenso de la  $T_c$  quizás debido al bajo ritmo de crecimiento que han tenido las raíces en este medio causando menor agotamiento del medio. Debido a todo esto, no se consideraron periodos de cultivo superiores a 5 semanas en los subsiguientes experimentos.





**Figura 23.** Tasa de crecimiento de raíces transformadas de cáñamo cultivadas en diferentes concentraciones de sales durante cinco semanas. Los datos se expresan en mg de PS acumulado semanalmente por cultivo.

### III.2.2. Efecto de la concentración de sacarosa

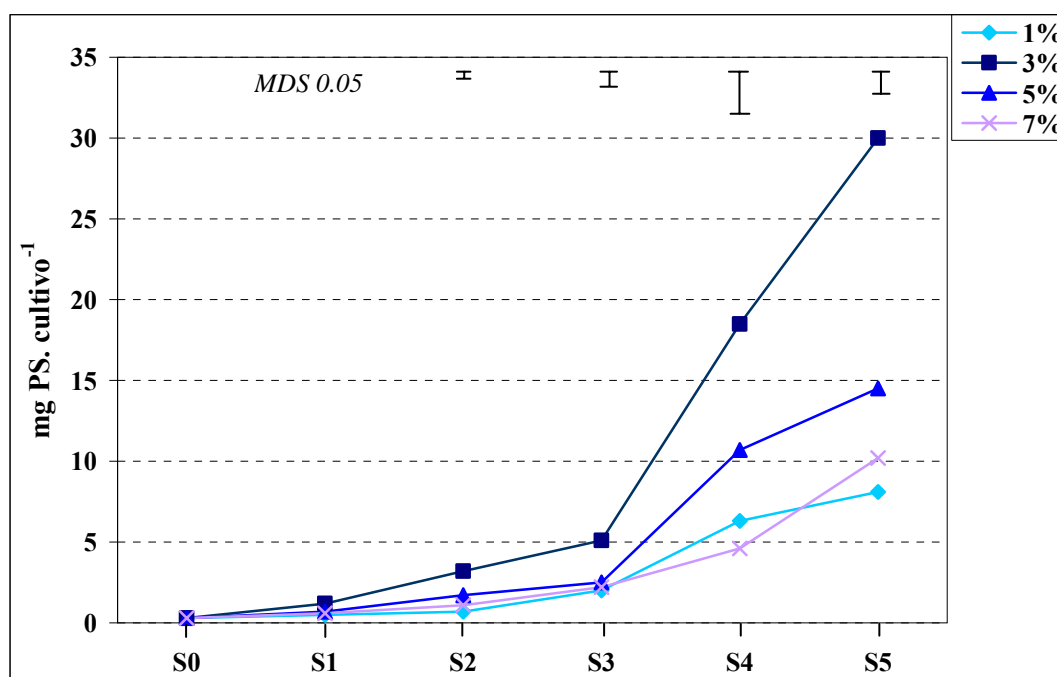
La concentración de sacarosa, usada como fuente de carbono en el medio de cultivo, afectó también el crecimiento de las raíces transformadas de modo que en presencia de la mínima concentración ensayada (1% p/v) la biomasa acumulada no excedió los 8 mg de PS tras cinco semanas de cultivo (Figura 24). En cambio, en medio sin sacarosa las raíces no mostraron crecimiento ninguno, y tras 5 a 10 días de cultivo, en dicho medio, empezó a notarse oscurecimiento del tejido indicando la senescencia del mismo.

Los resultados de la biomasa acumulada y de la tasa de crecimiento (Figuras 24, 25) indican la ausencia de diferencias significativas en el crecimiento de las raíces en las distintas concentraciones de sacarosa en la primera semana de cultivo. A partir de allí se notó un mejor crecimiento en presencia del 3% de sacarosa llevando a la mayor biomasa al cabo del periodo de cultivo. Las demás concentraciones de sacarosa inhibieron significativamente el crecimiento de las

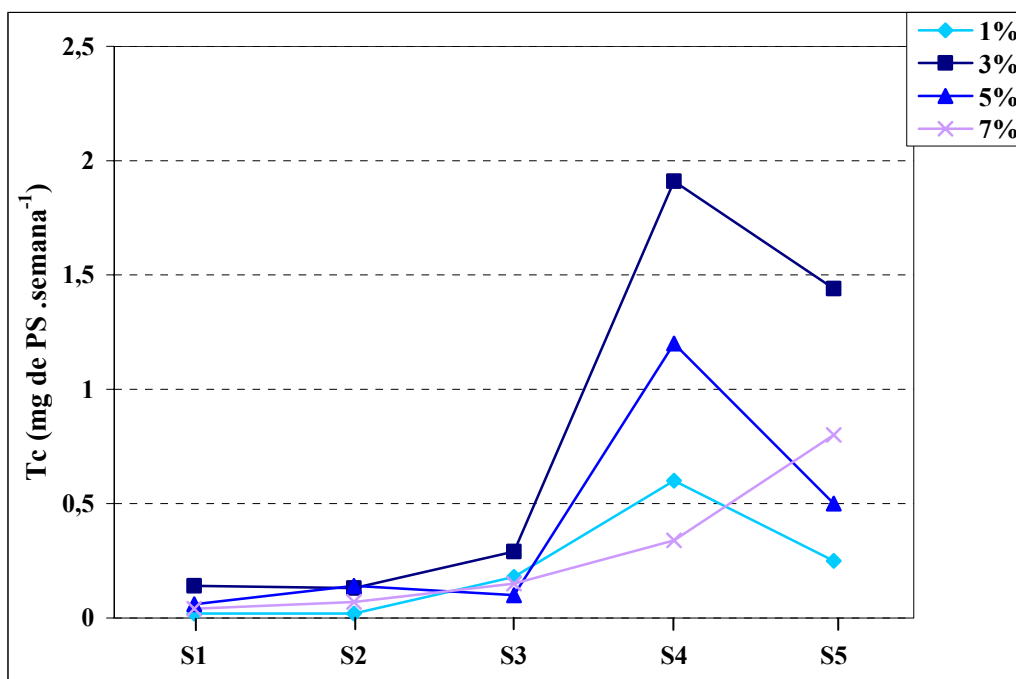
raíces resultando en biomasa 2 (con 5% de sacarosa) y 3 veces (con 1 y 7%) menores respecto del 3% de sacarosa (Figura 24). Esto mismo se tradujo en índices de crecimiento 72, 50 y 62% menores en presencia de 1, 5 y 7% de sacarosa (Tabla 23).

**Tabla 23.** Índice de crecimiento (Ic) de las raíces transformadas de cañamo en cuatro concentraciones de sacarosa después de cinco semanas de cultivo.  $PS_i = 0.3$  mg.

Concentración de sacarosa (%)	Ic
1	27
3	95
5	48
7	34



**Figura 24.** Crecimiento de raíces transformadas de cañamo en medio MS en presencia de cuatro concentraciones de sacarosa durante cinco semanas. Los datos se expresan en mg de PS por cultivo.



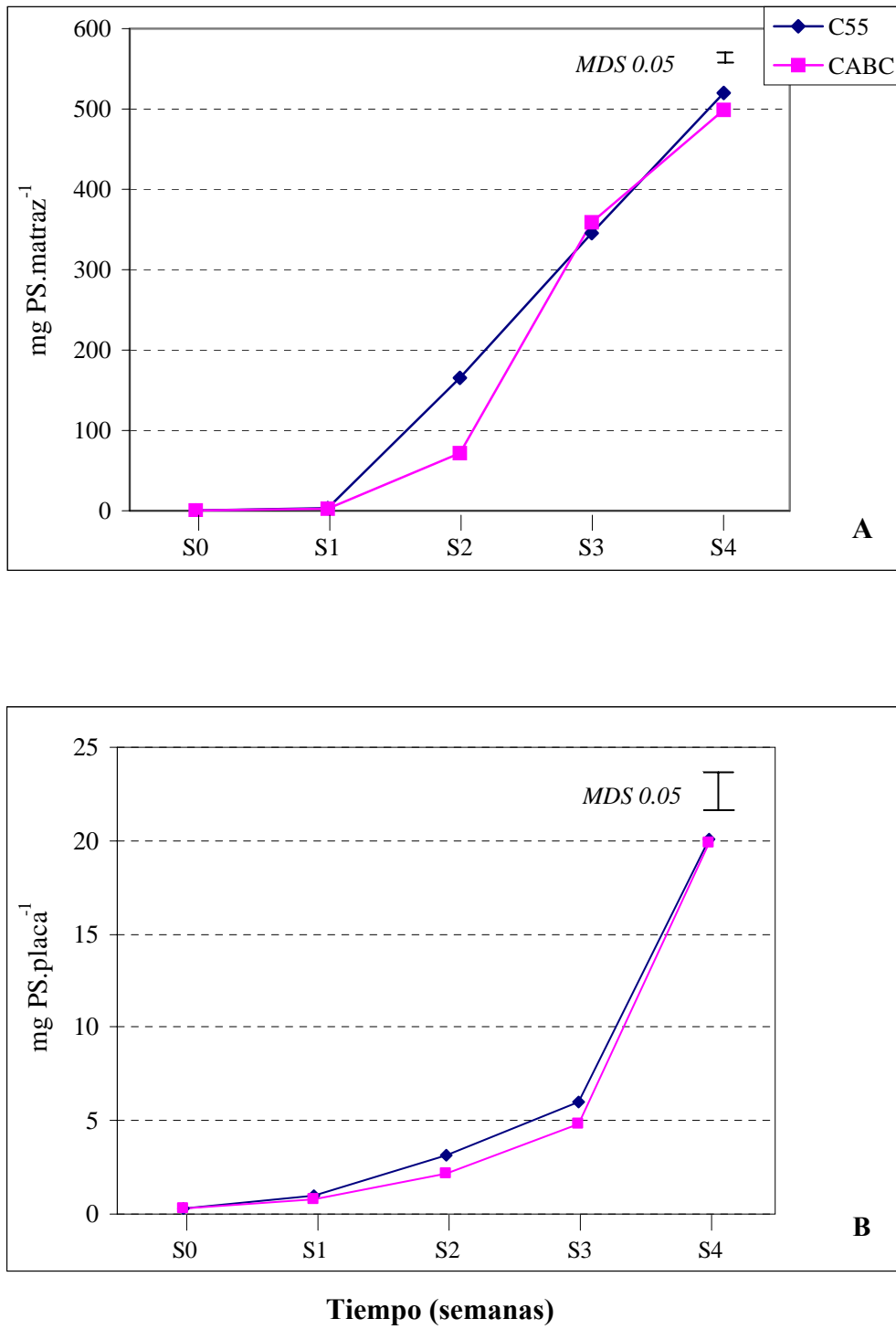
**Figura 25.** Tasa de crecimiento de raíces transformadas de cáñamo en presencia de cuatro concentraciones de sacarosa durante cinco semanas. Los datos se expresan en mg de PS acumulado por cultivo semanalmente.

### III.2.3. Efecto del tipo de medio

El efecto del tipo de medio de cultivo utilizado (solidificado, o no, con agar) se investigó eligiendo usar las concentraciones de sales y sacarosa que resultaron óptimas para el crecimiento de las raíces, esto es medio MS adicionado con 3% de sacarosa. El presente experimento se realizó con dos líneas de raíces transformadas estabilizadas, que mostraron buen crecimiento y que fueron procedentes de la infección de plántulas de cáñamo del genotipo CAN0221 con una cepa de *Agrobacterium silvestre* (línea C55) o con cepa que lleva únicamente los genes *rolA*, *rolB* y *rolC* (línea CABC), siendo las dos líneas de morfología fina. La Figura 26A muestra en medio líquido una fase de latencia de 1 semana seguida por una notable aceleración del crecimiento que duró todo el periodo de cultivo. En cambio, los cultivos realizados en medio sólido mostraron un crecimiento más lento durante las tres primeras semanas, no acelerándose el crecimiento hasta la cuarta semana de cultivo (Figura 26B). Así pues, al cabo del periodo de cultivo, la biomasa

acumulada en medio líquido fue 26 y 25 veces mayor respecto del medio sólido para las líneas C55 y CABC respectivamente. De ello se derivó un índice de crecimiento de las raíces 96% más elevado en medio líquido (Tabla 24, Figura 27).

A partir de los datos de la tasa de crecimiento expuestos en la Figura 28 se puede ver una actividad de crecimiento notablemente más alta en medio líquido durante todo el periodo de cultivo. En medio sólido la Tc permaneció baja hasta la cuarta semana de cultivo cuando se notó una aceleración del crecimiento. A diferencia de ello los cultivos realizados en medio líquido mostraron un crecimiento acelerado desde la primera semana alcanzándose la máxima Tc después de tres semanas de cultivo, periodo tras el cual se registró un descenso de la Tc indicando el comienzo de la fase estacionaria. Por lo tanto, se fijaron periodos de cultivo de 3 semanas, en medio líquido, para el resto de las determinaciones realizadas. Cabe mencionar también, la ausencia de diferencias apreciables en el crecimiento de las raíces de ambas líneas, deduciendo que la combinación de los genes *rolA*, *rolB* y *rolC* fue capaz de inducir raíces con crecimiento parecido al obtenido en raíces obtenidas con una cepa de *A. rhizogenes* silvestre.



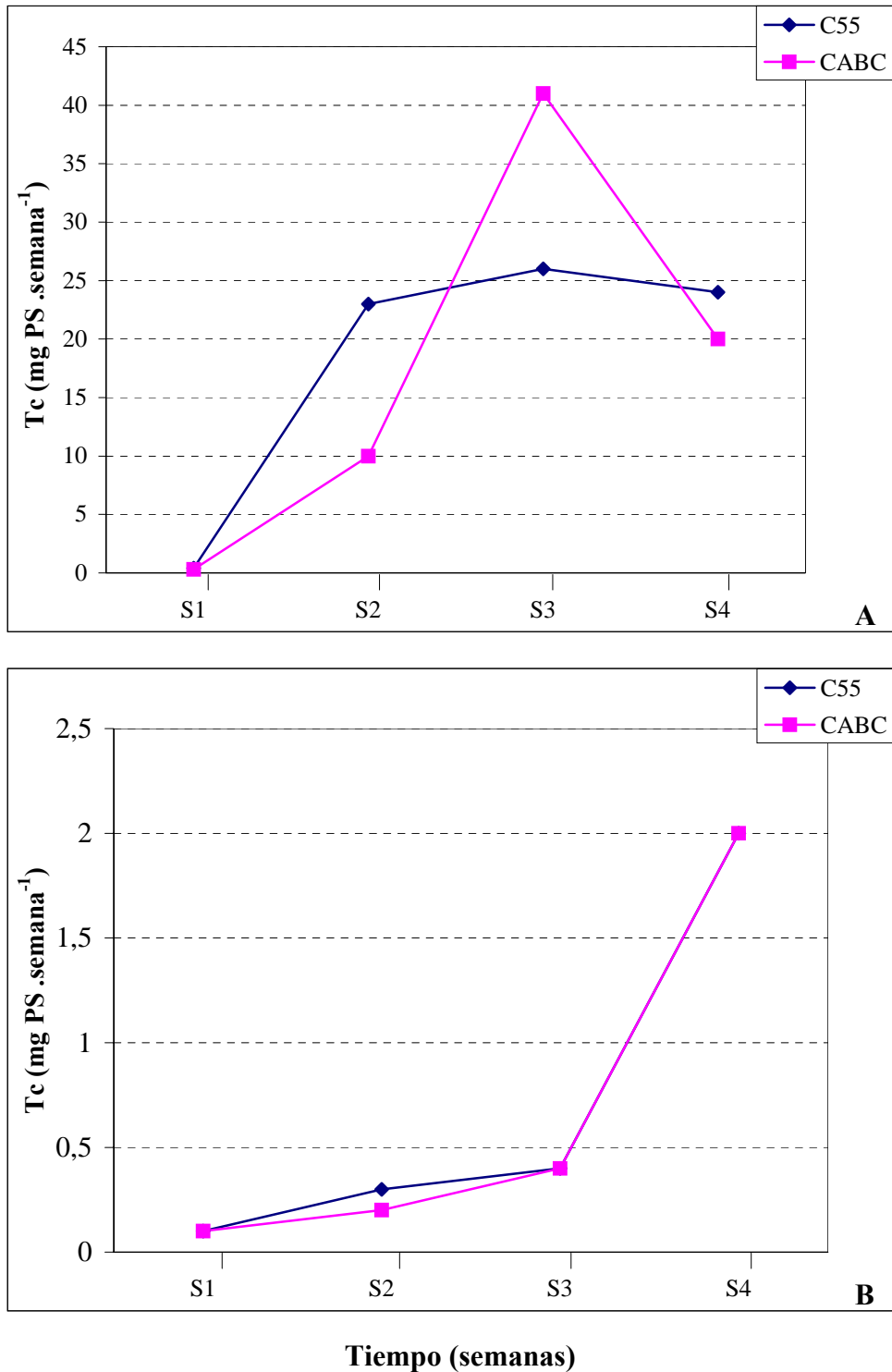
**Figura 26.** Crecimiento de las líneas C55 y CABC de raíces transformadas de cáñamo, en medio MS líquido (A) y sólido (B) durante cuatro semanas. Los datos se expresan en mg de PS acumulado por cultivo.

**Tabla 24.** Índice de crecimiento de las líneas C55 y CABC de raíces transformadas de cañamo en medio MS líquido y sólido después de 4 semanas de cultivo.  $PS_i=0.3$  mg.

Línea de raíces	Medio de cultivo	Ic
C55	Líquido	1733
	Sólido	67
CABC	Líquido	1663
	Sólido	66



**Figura 27.** Cultivo de raíces transformadas pertenecientes a la línea C55 realizado en medio MS líquido (sacarosa 3%) durante 4 semanas.



**Figura 28.** Tasa de crecimiento de dos líneas de raíces transformadas de cáñamo (C55 y CABC), cultivadas en medio MS líquido (A) y sólido (B) durante cuatro semanas. Los datos se expresan en mg de PS acumulado semanalmente por cultivo.

### III.2.4. Efecto de la concentración y fuente de nitrógeno sobre la morfología y el crecimiento de las raíces

Para evaluar el efecto del nitrógeno del medio (forma y concentración) sobre el desarrollo (crecimiento y morfología) de cultivos de raíces transformadas de cañamo, dos líneas de raíces fueron cultivadas en medio líquido con varias relaciones amonio: nitrato (sulfato amónico y nitrato potásico) que representan desviaciones respecto de sus concentraciones en el medio MS estándar (20.5 mM  $\text{NH}_4^+$  y 39.5 mM  $\text{NO}_3^-$ , Murashige y Skoog, 1962) tomado como referencia. Tras tres semanas de cultivo los efectos del amonio y del nitrato sobre el desarrollo de las raíces fueron claramente visibles aun antes de pasarlas. En medio MS estándar (20.5 mM  $\text{NH}_4^+$  y 39.5 mM  $\text{NO}_3^-$ ) las dos líneas de raíces alcanzaron los mayores valores de peso fresco (4.26 y 3.75 g) y peso seco (0.34 y 0.36 g), líneas C55 y CABC respectivamente, con diferencias cuantitativas respecto de los demás tratamientos (Tabla 25) manteniendo su morfología típica descrita como morfología fina previamente. Sin embargo una fuerte caída de aproximadamente entre un 48 (peso fresco) y un 45% (peso seco) fue observada para las dos líneas de raíces al aumentar (2.5 veces) la concentración del nitrato hasta 98.75 mM manteniendo el amonio al nivel estándar (Tabla 25). Esto se acompañó de un cambio en la morfología de las dos líneas consistente en un aumento del diámetro medio de las raíces y disminución del número y longitud de las ramificaciones (morfología gruesa). En cambio una disminución, en la misma proporción, del nivel de  $\text{NO}_3^-$  en el medio (15.8 mM) sólo disminuyó ligeramente, aunque de forma significativa (Tabla 25) el crecimiento de las dos líneas de raíces siendo la línea CABC, con una disminución del 18% de su peso seco, algo más sensible a este cambio respecto de la línea C55.

El amonio como única fuente de nitrógeno, aun a la concentración presente en el medio estándar no promovió ningún desarrollo apreciable de estas raíces, en las tres semanas que duró el cultivo como se deduce de los datos de peso fresco y peso seco obtenidos por ambas líneas (Tabla 25). Los inóculos formaron algunas raíces que se caracterizaron a parte de por su pequeño número y tamaño, por ser extremadamente finas. Por el contrario el nitrato como única fuente de nitrógeno soportó un desarrollo significativo en ambas líneas de raíces, sin cambio aparente en



su morfología, si bien este solo representó entre un 33 y 36% (líneas CABC y C55 respectivamente) de la biomasa máxima acumulada cuando se cultivaron con los niveles de amonio y nitrato del medio MS estándar. Desviaciones en la concentración de amonio del medio (2.5 veces por encima o por debajo) respecto de la del medio estándar de referencia (20.5 mM) afectaron el crecimiento de las dos líneas de raíces con un patrón similar, aunque con alguna mayor intensidad, a lo descrito para el nitrato. Nuevamente la línea CABC resultó más afectada que la línea C55 por estos cambios como se puede deducir de la Tabla 25. Los resultados ponen de manifiesto que el medio MS estándar adicionado de sacarosa al 3% resultó óptimo para el cultivo de raíces transformadas de cáñamo permitiendo la expresión de un elevado potencial para la acumulación de biomasa en estas raíces como se deduce del elevado índice de crecimiento (peso seco final/peso seco del inóculo) obtenido (1200 y 1130, CABC y C55 respectivamente) en las tres semanas que duró el cultivo.

**Tabla 25.** Crecimiento (g de peso fresco y peso seco por matraz de cultivo) y morfología de líneas de raíces transformadas de cáñamo, cultivadas durante tres semanas, en medio líquido con distintas relaciones amonio ( $\text{NH}_4^+$ )/nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ).

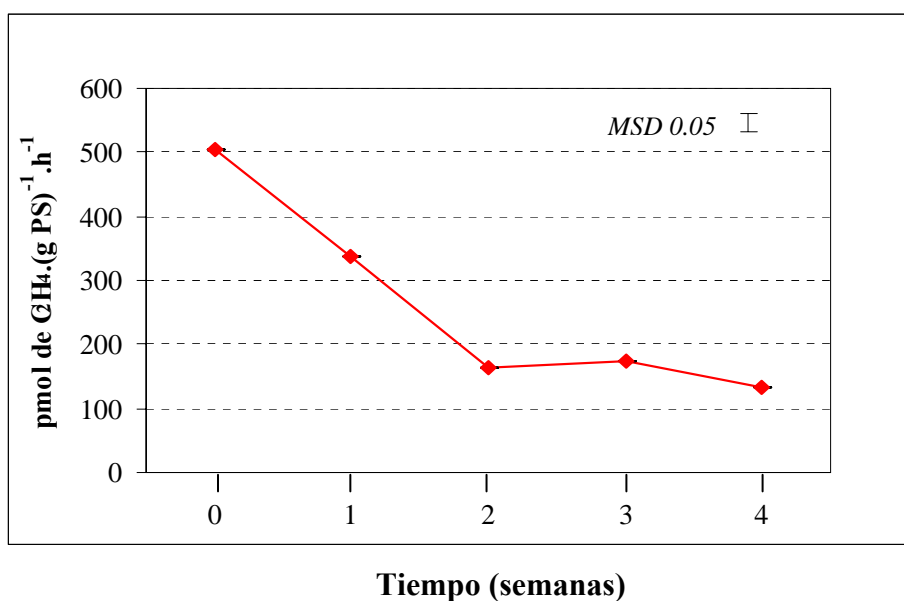
Línea de raíces	$\text{NO}_3^-$ (mM)	$\text{NH}_4^+$ (mM)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Morfología	
C55	00.0	20.5	0.09	0.01	Muy finas	
	15.8		3.66	0.32	Finas	
	39.5		4.29	0.34	Finas	
	98.75		2.14	0.19	Gruesas	
	39.5	00.0	1.53	0.12	Finas	
		08.2	3.12	0.26	Finas	
		20.5	4.22	0.34	Finas	
		51.5	2.05	0.20	Finas	
	CABC	00.0	20.5	0.07	0.01	Muy finas
		15.8		3.27	0.30	Finas
39.5		3.74		0.36	Finas	
98.75		2.01		0.19	Gruesas	
39.5		00.0	1.21	0.12	Finas	
		08.2	2.75	0.24	Finas	
		20.5	3.75	0.36	Finas	
		51.5	1.98	0.18	Finas	
<i>MDS</i> <sub>0.05</sub>				0.15	0.02	

### III.3. Estudios fisiológicos a nivel de las raíces transgénicas

Previo a los estudios llevados a cabo para evaluar la producción de metabolitos secundarios en las raíces transgénicas de *C. sativa*, se procedió al estudio de la producción de etileno pudiendo estar relacionado con la producción de alcaloides (Palazón *et al.*, 1998) en material parecido. La determinación de la actividad nitrato reductasa en las diez líneas de raíces transgénicas, previamente mencionadas, se llevó también a cabo con el fin de evaluar el funcionamiento del metabolismo nitrogenado de este tejido.

#### III.3.1. Producción de etileno

El seguimiento de la producción de etileno en las raíces transformadas de la línea C55 reveló una disminución importante de la producción en las dos primeras semanas de cultivo, tiempo a partir del cual los niveles de etileno se vieron estabilizados para el resto del periodo de estudio considerado (Figura 29). Asimismo, se eligió la semana 3 para evaluar la producción de etileno en todas las líneas de raíces transformadas.



**Figura 29.** Producción de etileno en raíces transformadas de cañamo (línea C55) durante 4 semanas de cultivo. Los datos se expresan en pmol de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> por g de PS y por hora.

Los resultados mostrados en la Tabla 26, indican que el etileno producido por las diferentes líneas de raíces transgénicas fue muy variable siendo las líneas C1701 y C55 las más productivas mientras que las menos productivas fueron la C1601, C1602 y C1801. Las demás líneas mostraron niveles intermedios. Las diferencias encontradas no han podido ser relacionadas con la morfología de las raíces, no obstante, el fenotipo de las plantas utilizadas para la inducción de raíces ha mostrado un efecto moderado sobre los niveles de etileno, siendo las líneas procedentes de plantas con fenotipo fibra 1.54 veces más productivas que las que provienen de los genotipos de droga (314 y 204 pmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (gPS)<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> en media respectivamente). Cabe mencionar que las raíces transformadas tuvieron una producción de etileno significativamente menor en comparación con las raíces no transformadas usadas como control.

**Tabla 26.** Producción de etileno en diez líneas de raíces transformadas de cáñamo procedentes de plantas con fenotipo droga (D) y fibra (F). Los datos, tomados tras 20 días de cultivo, se expresan en pmol de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> por g de PS y por hora.

Líneas de raíces	pmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (gPS) <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Morfología de raíces	Fenotipo
<b>C55</b>	<b>563</b>	Finas	D
<b>C70</b>	158	Gruesas	D
<b>C1601</b>	70	Gruesas	D
<b>C1602</b>	81	Finas	D
<b>C1701</b>	<b>637</b>	Gruesas	F
<b>C1801</b>	82	Finas	F
<b>C1901</b>	225	Finas	F
<b>C2701</b>	135	Gruesas	D
<b>CABC</b>	179	Finas	D
<b>CAR10</b>	242	Gruesas	D
<b>Control</b>	880	-	D
<b>MDS</b> <i>0.05</i>	54		

### III.3.2. Actividad nitrato reductasa NR

La actividad nitrato reductasa en las raíces transformadas presentó una alta variabilidad entre las líneas utilizadas (Tabla 27). Así, en las líneas C1801 y C1901 la actividad NR llegó a  $1 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  indicando por tanto un metabolismo nitrogenado muy activo mientras que las líneas C1602, C1701, C2701 y CABC presentaron niveles bajos. Generalmente las líneas de raíces con morfología fina mostraron tener niveles de nitrato reductasa 1.28 veces mayores con respecto a las raíces con morfología gruesa. Una influencia parecida fue, por otro lado, debida al fenotipo siendo la actividad de la NR 1.23 veces mayor en las raíces procedentes de plantas con fenotipo fibra (Tabla 27). En comparación con las raíces normales usadas como control, la actividad NR fue mayor en todas las líneas de raíces transgénicas incluidas en el trabajo. Lo cual indica que el metabolismo nitrogenado podría haberse acelerado con la transformación.

**Tabla 27.** Medida de la actividad nitrato reductasa (NR) en diez líneas de raíces transformadas de cáñamo tras 20 días de cultivo. Los resultados se expresan en  $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Líneas de raíces	Actividad NR ( $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot (\text{gPF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	Morfología de las raíces
<b>C55</b>	0.79	Finas
<b>C70</b>	0.71	Gruesas
<b>C1601</b>	0.77	Gruesas
<b>C1602</b>	0.36	Finas
<b>C1701</b>	0.21	Gruesas
<b>C1801</b>	<b>1.01</b>	Finas
<b>C1901</b>	<b>1.01</b>	Finas
<b>C2701</b>	0.22	Gruesas
<b>CABC</b>	0.45	Finas
<b>CAR10</b>	0.92	Gruesas
<b>Control</b>	0.17	
<b>MDS</b> <i>0.05</i>	0.08	

### **III.4. Niveles de metabolitos secundarios en las raíces transformadas de cáñamo**

Concluido el trabajo previsto para una caracterización preliminar de las raíces transformadas de *C. sativa* y optimización de algunos factores relevantes para su cultivo *in vitro*, se ha abordado el estudio de la capacidad de estas raíces en cuanto a síntesis y/o producción de metabolitos secundarios con implicaciones farmacéuticas. El trabajo se ha centrado en dos de los grupos de metabolitos, cannabinoides y alcaloides incluidos en una excelente revisión publicada por Turner *et al.* (1980) sobre constituyentes químicos de *C. sativa*.

#### **III.4.1. Cannabinoides**

Los cannabinoides, compuestos terpenofenólicos únicos de *C. sativa*, son característicos de los órganos aéreos de la planta. En las raíces solo se encontrarían cantidades trazas. Dada la elevada actividad biosintética que presentan las raíces transformadas por *A. rhizogenes*, en numerosas especies vegetales se investigó la posible presencia de cannabinoides (los más comunes) en cultivos de raíces transformadas de *C. sativa*. Extractos realizados en éter de petróleo de material liofilizado fueron analizados mediante cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta precisión usando como patrones soluciones estándar de THC, CBD y CBN (Dr. A. Plá, Departamento de Medicina Legal, Universidad de Granada). En ninguno de los análisis se detectó señal alguna que correspondiera a los patrones utilizados o estructuras químicas similares por lo que en raíces transformadas de *C. sativa* no existen niveles detectables de cannabinoides, al menos con las técnicas analíticas utilizadas.

#### **III.4.2. Alcaloides**

En cuanto a los alcaloides, segundo grupo de constituyentes químicos del cáñamo (Turner *et al.*, 1980), la colina, neurina (forma deshidratada de la colina) y

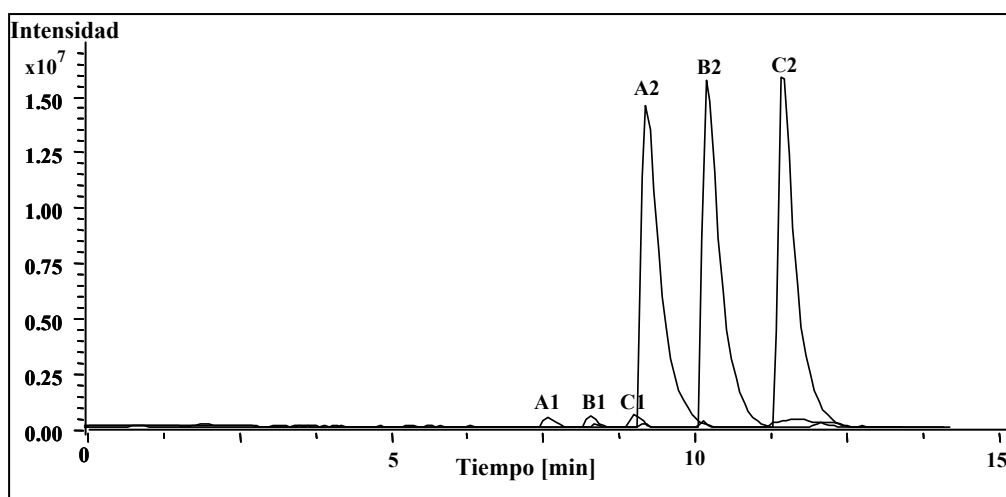
otras bases cuaternarias han sido identificadas en tejidos de *C. sativa* incluida la raíz aunque los informes son escasos y análisis cuantitativos no se han encontrado. La presencia de sustancias tipo muscarina (otra base cuaternaria) y atropina (alcaloide tropánico) en preparaciones crudas de diferentes materiales de *C. sativa* se ha sugerido a partir del estudio farmacológico de estas preparaciones (Gill *et al.*, 1970) sin embargo resultados confirmatorios adicionales no se han presentado. Más recientemente se ha informado que la intoxicación con especies ricas en atropina como *Datura stramonium* o en muscarina provoca síntomas parecidos a los notados tras la ingestión del *Cannabis* (Stark *et al.*, 2003; Desachy *et al.*, 1997). La identificación de estas dos sustancias en *C. sativa*, especialmente la atropina sería de relevancia no solo por su interés farmacológico sino además porque hasta el momento no hay constancia de su existencia fuera de las *Solanaceae*. Por todo ello nos planteamos abordar la identificación y cuantificación de colina, muscarina y atropina en raíces transformadas de *C. sativa* así como estudiar su capacidad para la producción de estos metabolitos.

#### III.4.2.1. Optimización del método analítico

Para la separación de extractos vegetales mediante electroforesis capilar, los tampones comúnmente usados son el borato, fosfato y SDS. No obstante estos tampones no son convenientes para el acoplamiento de la electroforesis capilar (CE) vía interfase ortogonal de ionización, con el espectrómetro de masa (ESI-MS), pues de una parte no son volátiles y de otra, implican el riesgo de contaminación de la fuente del espectrómetro. Otros tampones como el ácido fórmico, ácido acético, carbonato amónico y acetato amónico mostraron ser más compatibles con la interfase del CE-MS y/o con el espectrómetro de masa (Tanaka *et al.*, 1998).

En una primera fase se optimizaron las condiciones electroforéticas antes que las del MS para obtener la mejor migración, sensibilidad, tiempo de análisis y forma de los picos. Así, las condiciones ensayadas fueron el tipo, concentración y pH del tampón, voltaje y tiempo de inyección. La concentración del tampón es un

parámetro importante a tener en consideración durante la optimización de las condiciones del CE-ESI-MS, así pues, se usaron varios tampones de corrida como el ácido fórmico, ácido acético y acetato amónico siendo este último el que dio mejores resultados en la separación de los estándares de colina y atropina. Seguidamente se estudió el efecto de la concentración de dicho tampón en el rango 20 a 60 mM y como se puede observar en la Figura 30 con 20 mM se consiguió una buena relación entre tiempo de análisis y resolución. A continuación se ensayo un rango de pH para el acetato amónico entre 8 y 11 en incrementos de 0.5 unidades y se eligió, en base a la alta resolución y el corto tiempo de análisis obtenidos para ambos compuestos, el pH de 8.5 para el tampón de corrida.



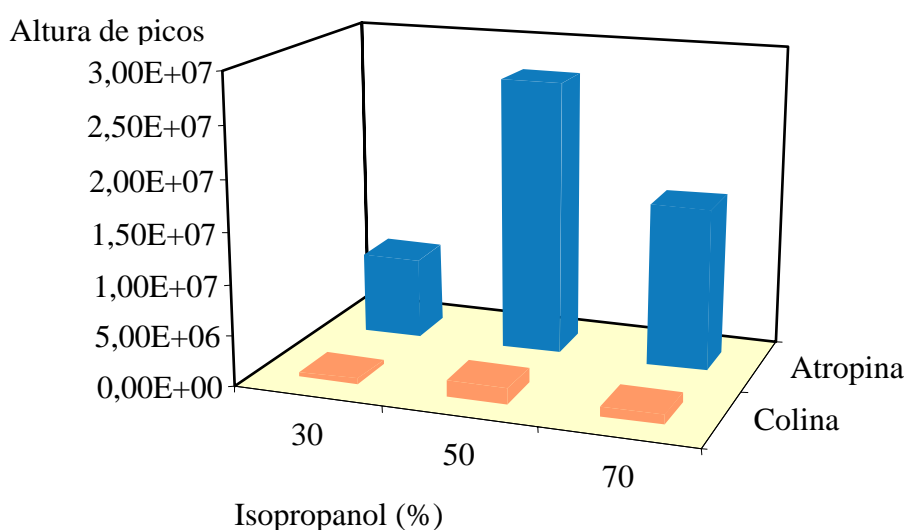
**Figura 30.** Influencia de la concentración del tampón acetato amónico: 20 mM (A), 40 mM (B) y 60 mM (C) sobre la separación entre colina (1) y atropina (2).

En cuanto al voltaje aplicado este vario entre 10 y 30 kV, siendo este último el que permitió obtener mejor resolución y en corto tiempo de análisis. Finalmente, las muestras se inyectan en el extremo anódico del capilar usando una presión de  $N_2$  de 0.5 psi durante 10s (1 psi= 6894.76 Pa).

Con las condiciones establecidas anteriormente para CE se pasó a optimizar los parámetros de ESI para la obtención de una señal óptima de cada metabolito en el MS. Estos parámetros se optimizaron en modo “full-scan” (escaneando a partir de

m/z 50-350) haciendo pasar soluciones estándar de 1000 mg/L de cada uno de los metabolitos, en el modo positivo, a través del capilar a una presión de 0.5 psi. Los parámetros estudiados fueron la composición y flujo del líquido adicional, flujo y temperatura del gas de secado y presión del gas de nebulización. Eligiéndose, en cada caso, las condiciones que dieron mayor sensibilidad de los picos.

El líquido adicional cierra el circuito eléctrico necesario durante la CZE e incrementa el flujo de salida en el extremo del capilar. Se ha comprobado que la naturaleza, composición y velocidad de flujo del líquido adicional tienen efecto crítico sobre el funcionamiento de la interfase CE-ESI (Geiser *et al.*, 2000). De los disolventes orgánicos investigados en este trabajo, metanol e isopropanol, el segundo dio mejores resultados, estudiándose a continuación el efecto de diferentes concentraciones del mismo. Como se observa en la Figura 31 con una mezcla isopropanol-agua al 50/50 v/v en presencia de ácido fórmico al 0.5% se obtuvo la mejor señal (altura de picos) para ambos compuestos colina y atropina. En cuanto al flujo del líquido adicional, en un rango de 0.15-0.25 mL/h no se observaron diferencias significativas. Finalmente se seleccionó como óptimo en términos de respuesta y estabilidad de la señal, un valor de 18 mL/h para la velocidad de flujo del líquido adicional.



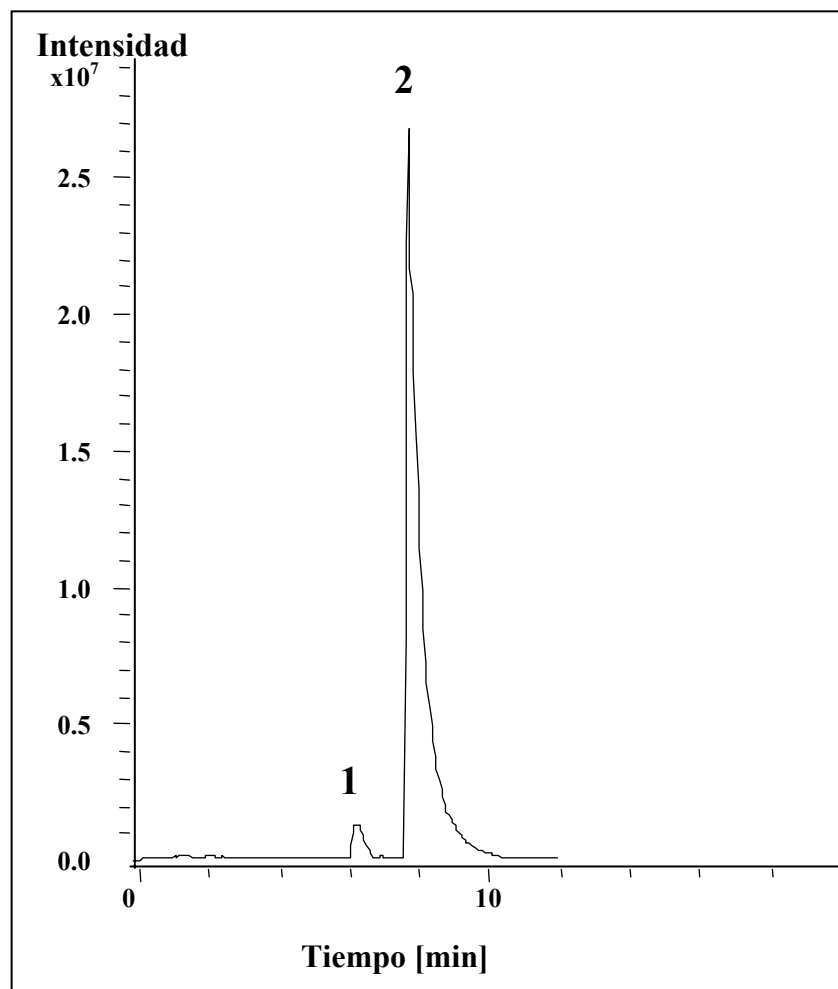
**Figura 31.** Influencia de la concentración de la mezcla isopropanol-agua en el líquido adicional sobre la sensibilidad de la señal para colina y atropina. Los estudios se realizaron en presencia del 0.5% de ácido fórmico.



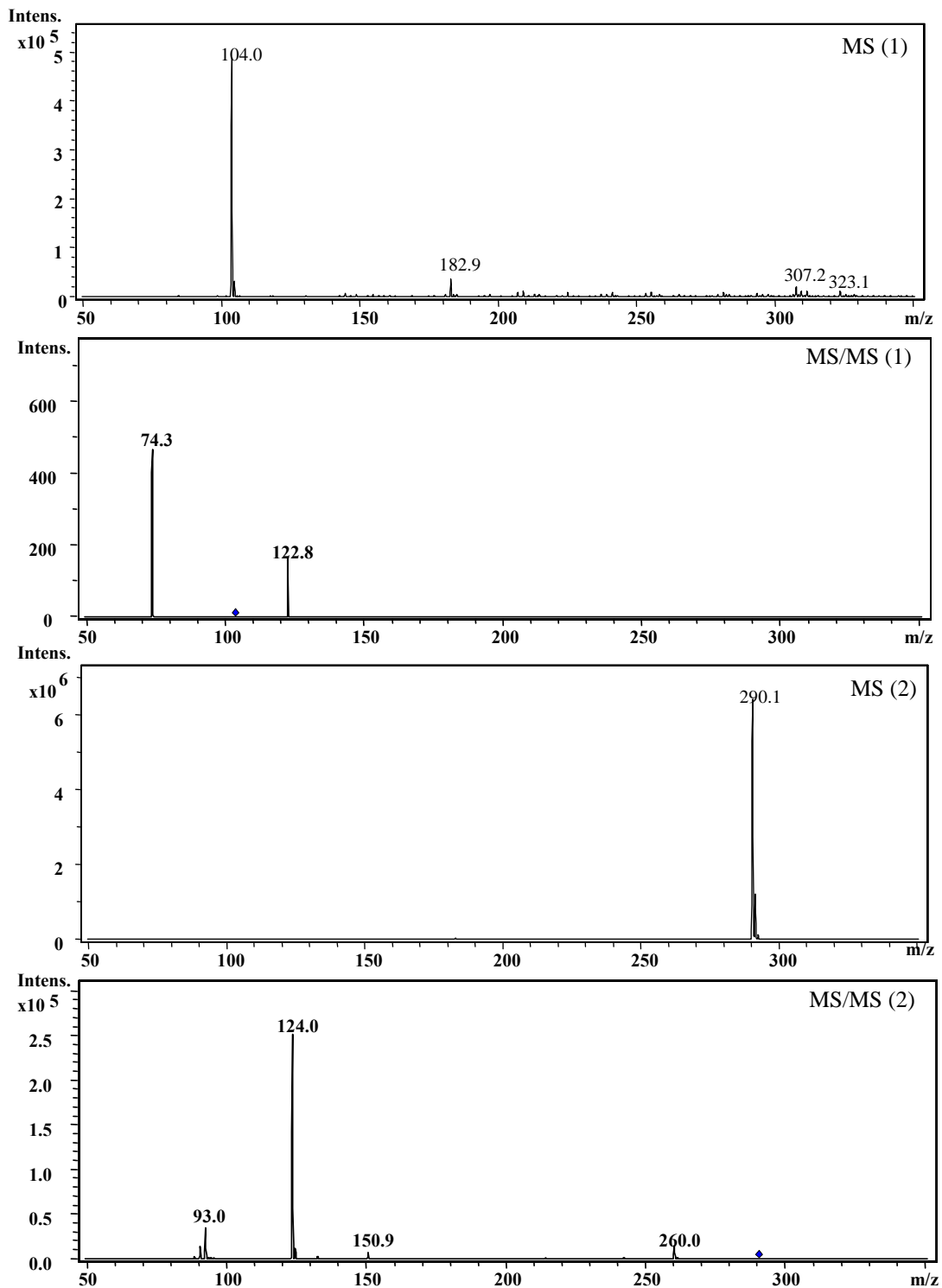
El gas de nebulización tiene un efecto de aspiración, debido a un aumento del flujo inducido por presión, que puede afectar considerablemente la separación de los analitos (Sheppard *et al.*, 1995). Por ello se ensayaron diferentes presiones de nebulización (2-10 psi) del nitrógeno (gas nebulizador) a temperatura ambiente, observándose que bajas presiones mejoraban la sensibilidad y resolución entre los compuestos estudiados y eligiéndose el valor de 4 psi para la presión de nebulización como parámetro óptimo.

El gas de secado (N<sub>2</sub>) se usa en el ESI para acelerar la eliminación del disolvente y aumentar la sensibilidad (Maciá *et al.*, 2004). Este parámetro fue usado a la temperatura 350°C y se ensayaron diferentes flujos (2-8 L/min), eligiendo 6L/min como valor óptimo.

En conclusión la optimización metodológica llevada a cabo para la identificación y cuantificación de colina y atropina, por CE-ESI-MS, ha permitido establecer las siguientes condiciones: tampón acetato amónico 20 mM a pH 8.5 para el desarrollo, una diferencia de potencial eléctrico de 30 kV, tiempo de inyección de 10s a 0.5 p.s.i., isopropanol-agua (50:50) con ácido fórmico 0.5% (v/v) como líquido adicional a un flujo de 0.18 mL/min, 6L/min y 350°C para el gas de secado y una presión de nebulización de 4 psi. Con estas condiciones se obtuvo una buena resolución en la separación de colina y atropina en una mezcla estándar como muestra el electroferograma de la Figura 32. Finalmente como muestran los espectros MS y MS/MS (Figura 33) la forma iónica predominante de cada analito fue el ión molecular protonado.



**Figura 32.** Separación de colina (1) y atropina (2) obtenida en las condiciones de CE-MS: capilar de sílice fundida de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro y 100 cm de longitud total, tampón acetato amónico 20 mM a pH 8.5, voltaje: 30 kV, tiempo de inyección: 10s a 0.5 psi, líquido adicional: 2-propanol/agua 50:50 (v/v) con 0.5% de ácido fórmico a una intensidad de flujo de 0.18 mL/h, gas de secado: 6L/min a 350°C, presión del gas de nebulización: 4 psi y escaneo de MS: 50-350 m/z.



**Figura 33.** Espectros MS y MS/MS de las soluciones estándar de (1) colina y (2) atropina. Las condiciones analíticas son las mismas expuestas en la Figura 32.

La reproducibilidad es un aspecto importante en cualquier método de análisis. En nuestro trabajo esto se ha estudiado realizando series de análisis con las condiciones previamente optimizadas en el mismo día (precisión intradiaria) y durante 5 días consecutivos (precisión interdiaria). Como índice de reproducibilidad se usó el valor de la desviación estándar relativa (para  $n=5$ ) de los tiempos de migración y del área de los picos para cada uno de los compuestos analizados. Para los tiempos de migración dichos valores fueron 1.10 y 0.95% (colina y atropina respectivamente) para los análisis intradiarios mientras que para los análisis interdiarios fueron de 2.37 y 2.01%. Para el área total de los picos los valores de la desviación estándar relativa fueron 1.80 y 1.30% (colina y atropina respectivamente) para las determinaciones intradiarias y para las determinaciones interdiarias fueron 4.78 y 3.98%. Cuando se analizaron extractos de muestras de *C. sativa* (raíces transformadas, raíces y hojas), los valores de reproducibilidad (desviación estándar relativa) interdiaria obtenidos fueron 6.1 y 5.9% para los tiempos de migración (colina y atropina respectivamente) y 6.8 y 6.4% para el área total de los picos.

Los límites de detección de este método analítico se calcularon para cada compuesto analizado en base del electroferograma y que resultaron ser de 18 mg/L y 320  $\mu\text{g/L}$  para colina y atropina respectivamente. Las curvas de calibración (Figura 34) para cada compuesto analizado fueron lineales con altos coeficientes de correlación en el rango de concentraciones ensayadas para cada metabolito (25-500 mg/L y 500-1000  $\mu\text{g/L}$  para colina y atropina respectivamente).

Las Figuras 35 y 36 recogen, respectivamente, los electroferogramas y los espectros MS y MS/MS obtenidos tras el análisis de colina (1) y atropina (2) en los extractos de *C. sativa* (raíces transformadas, raíces normales y hojas) los cuales fueron comparados con los espectros MS y MS/MS de ambos analitos en las soluciones estándar. Lo que permitió caracterizar los metabolitos encontrados en las muestras de cáñamo.

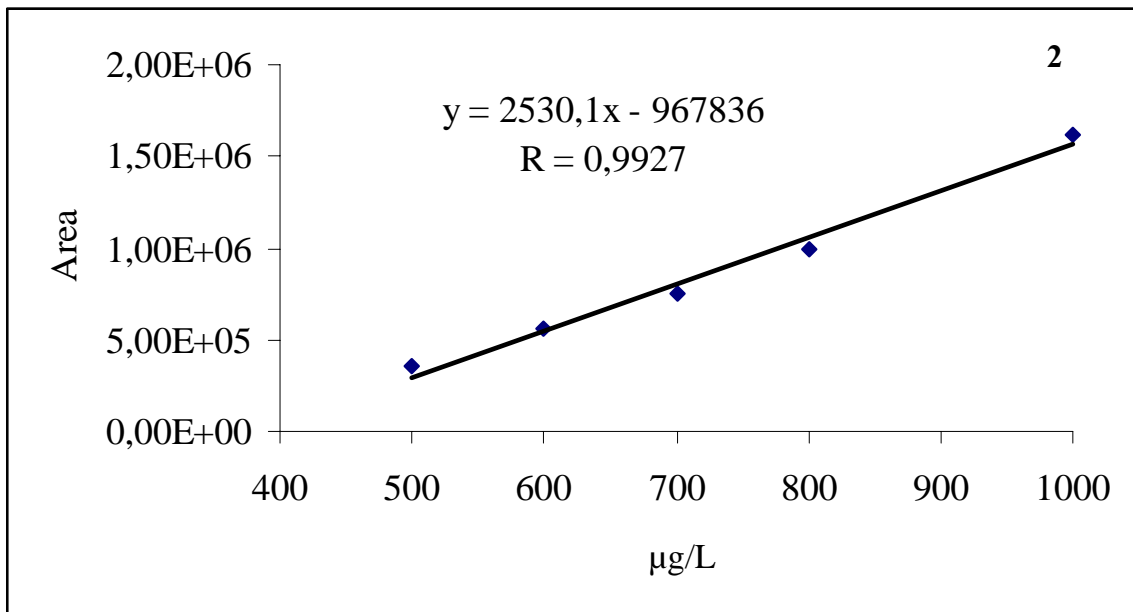
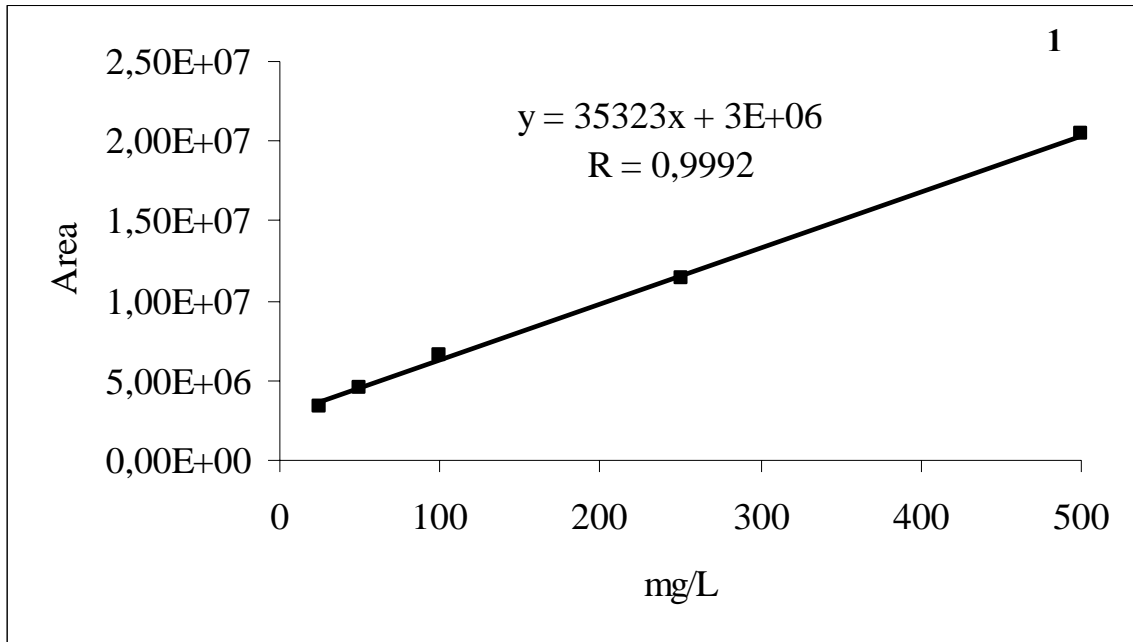
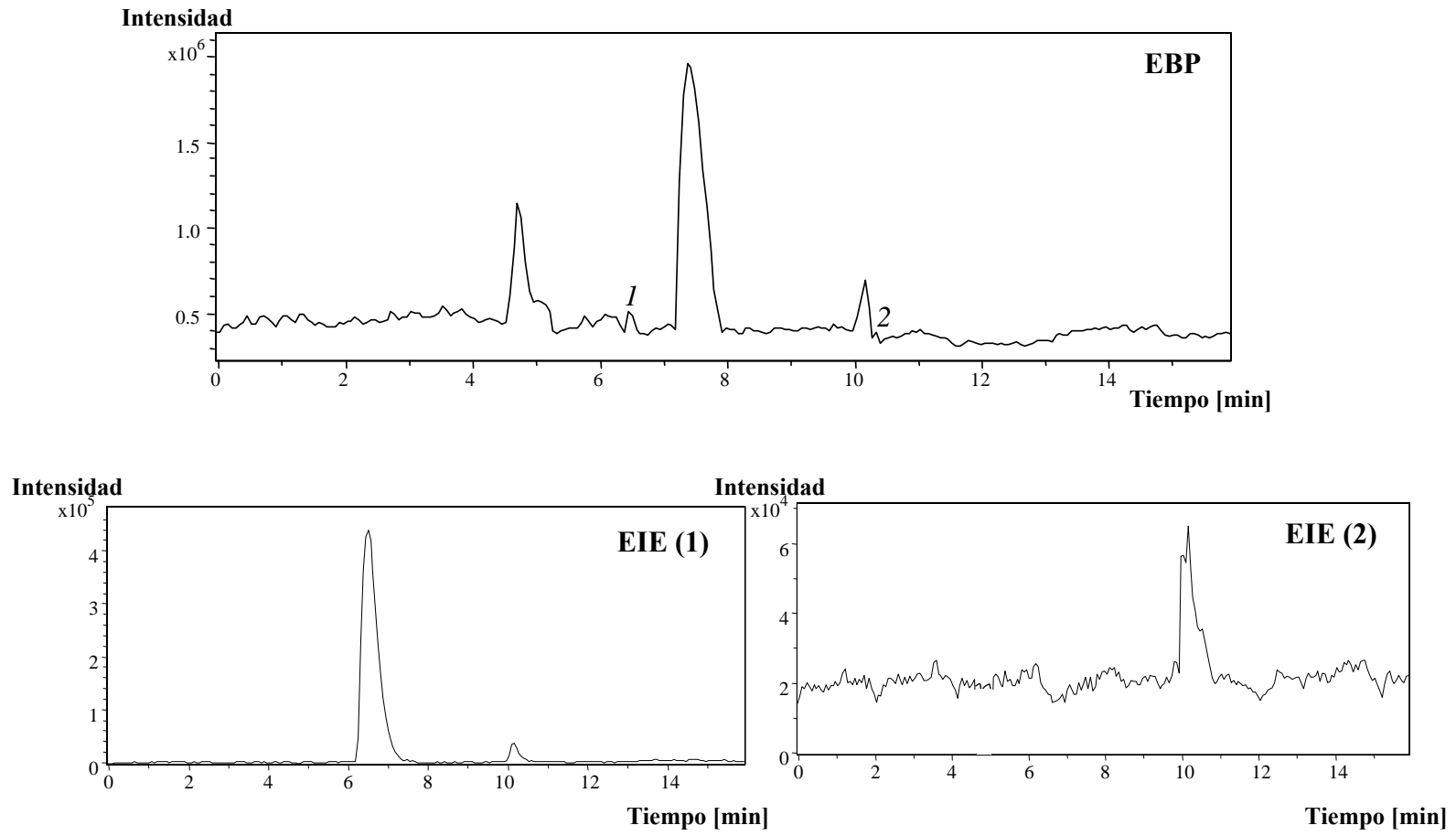
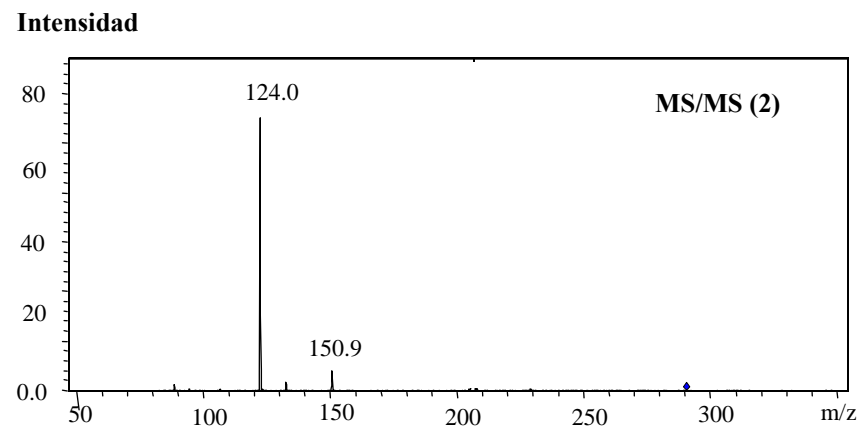
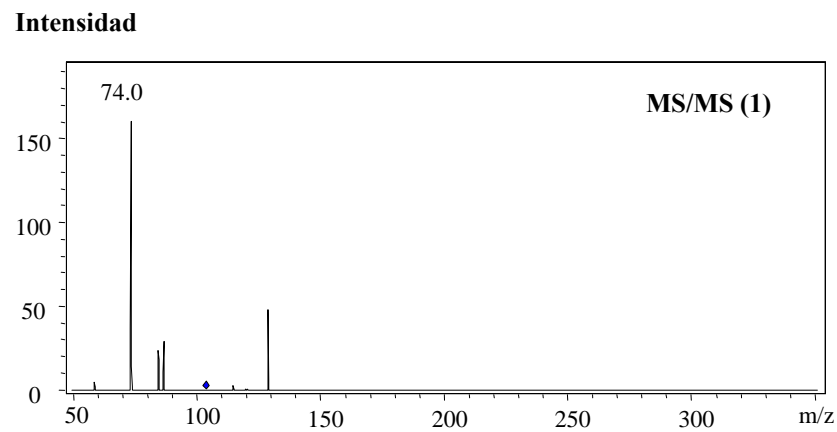
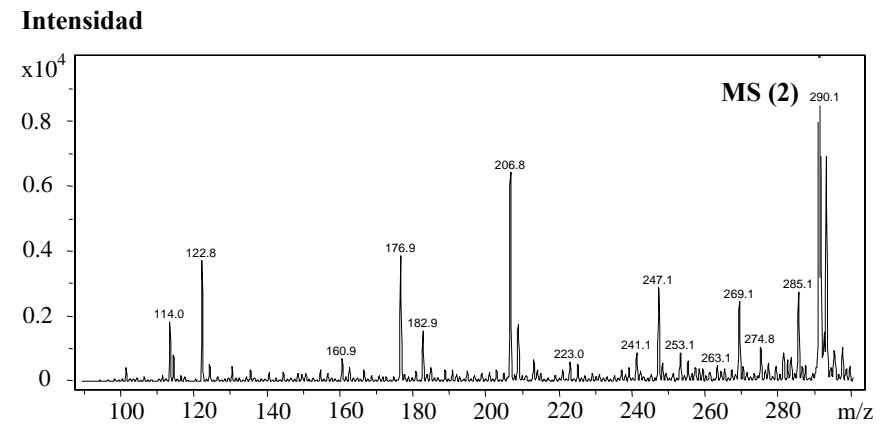
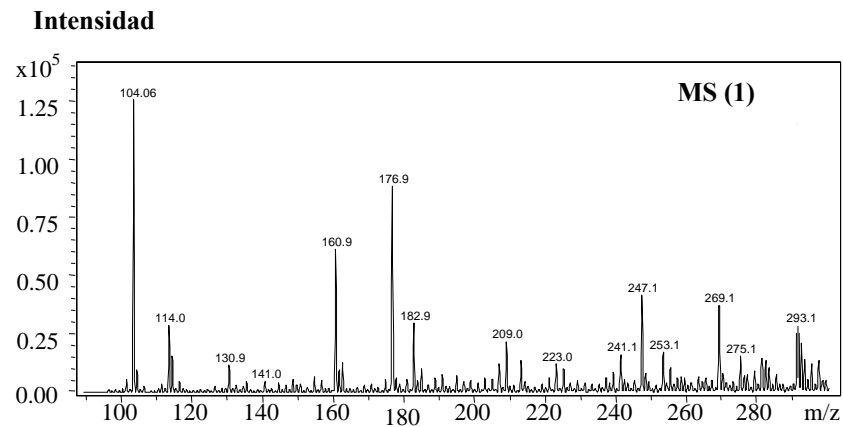


Figura 34. Curvas de calibración de colina (1) y atropina (2).



**Figura 35.** Electroferograma de la base de los picos (EBP) y electroferograma de iones extraídos (EIE) de colina (1) y atropina (2) en extractos de *C. sativa*. Todas las condiciones analíticas son las mismas expuestas en la Figura 32.



**Figura 36.** Espectros MS y MS/MS de colina (1) y atropina (2) en extractos de *C. sativa*. Todas las condiciones analíticas son las mismas que se indican en la Figura 32.

### III.4.2.2. Niveles de colina, atropina y muscarina en las raíces transgénicas

Con los parámetros de CE-ESI-MS previamente optimizados fue posible detectar colina en todas las líneas de raíces transgénicas de cáñamo incluidas en este estudio incluso con niveles elevados que llegaron hasta  $3 \text{ mg.g PS}^{-1}$  (Tabla 28). Además los niveles de colina detectados fueron significativamente más elevados, en la mayoría de las líneas de raíces, con respecto a aquellos encontrados en las raíces normales de la planta llegando a ser hasta 4 veces mayores. Por otra parte las concentraciones de colina fueron notablemente más elevadas en todas las líneas de raíces transformadas con respecto a las hojas (usadas como control) llegando a ser hasta 6 veces superiores en las líneas de raíces más productivas. La producción de colina fue muy variable según la línea de raíces, notando un importante efecto del fenotipo de la planta usada para la inducción de raíces. Asimismo, las líneas procedentes de cultivares de fibra mostraron tener niveles de colina significativamente mayores (49%) en comparación con líneas que provienen de genotipos de droga. Por otro lado, la morfología de las raíces mostró también tener un papel importante en la producción de colina de modo que estableciendo una comparación general, se pudo ver que las raíces con morfología fina fueron dos veces más productivas que las que tienen morfología gruesa, contrariamente a los datos de biomasa que muestran que las líneas de morfología gruesa acumulan una biomasa 2 veces mayor que las raíces finas.

El contenido de atropina en las líneas C1601, CAR10 así como en las raíces no transformadas estuvo probablemente por debajo de los límites de detección del método analítico usado. En la mayoría de las líneas de raíces los niveles de atropina detectados fueron parecidos a los encontrados en las hojas de la planta e incluso superiores en las líneas más productivas alcanzando  $5.46 \mu\text{g.g PS}^{-1}$  en la línea C1801. Además, la producción de atropina no estuvo relacionada con el fenotipo de las plantas y fue ligeramente mayor en las líneas con morfología fina. Las líneas C1801 y CABE exhibieron los mayores contenidos de atropina con diferencias significativas ( $P < 0.01$ ). Así, la clasificación de las líneas de raíces transformadas de



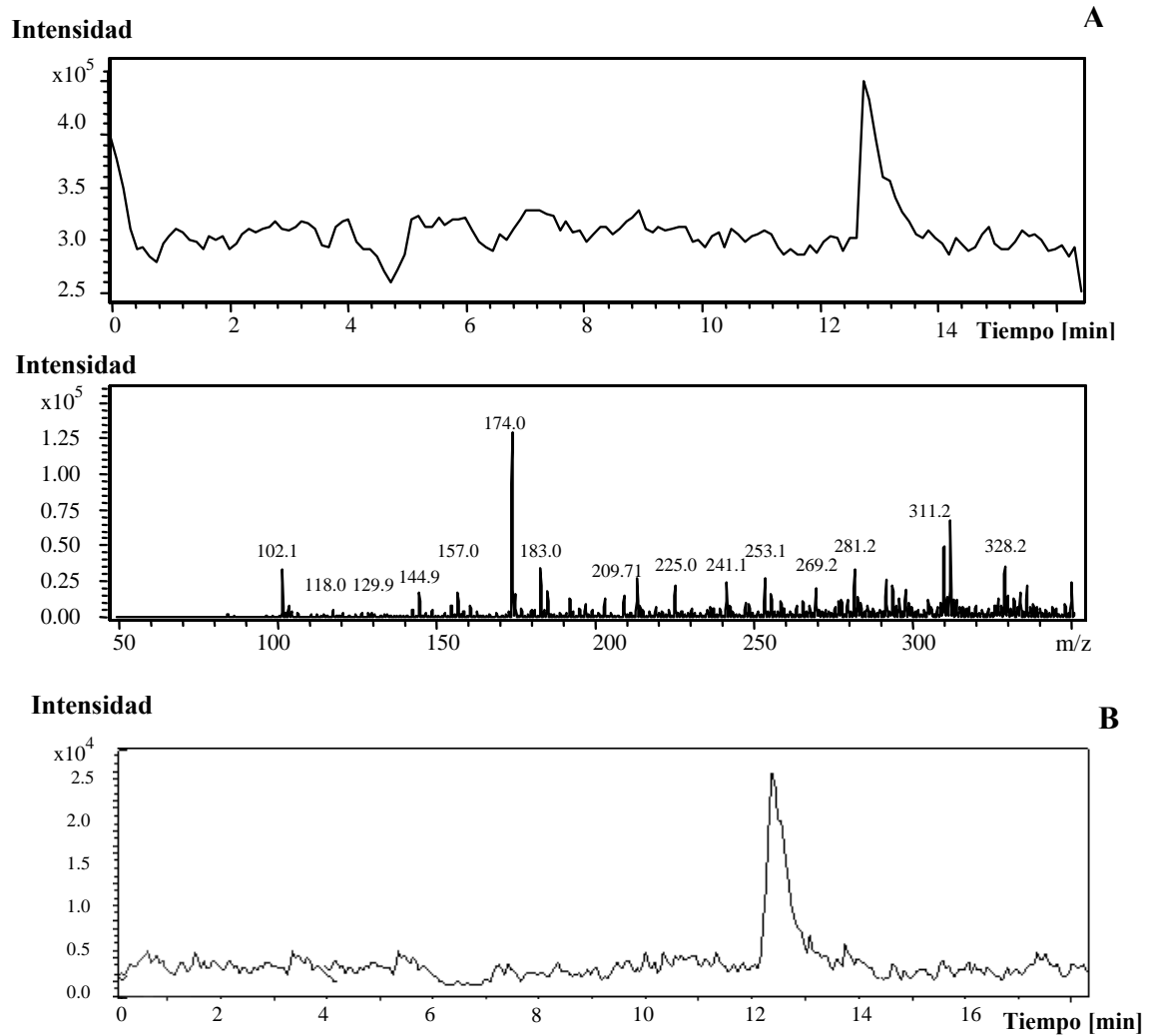
*C. sativa* según la productividad ha sido la misma para atropina como para colina:  
C1801>CABC>C55≥C1901>C1602>C70>C1701>C2701>C1601>CAR10

**Tabla 28.** Contenido de colina (mg.g PS<sup>-1</sup>) y atropina (µg.g PS<sup>-1</sup>) en diez líneas de raíces transformadas de *C. sativa* cultivadas en medio MS líquido durante 20 días. Como controles (a) se usaron raíces y hojas de plantas no transformadas.

Líneas de raíces transformadas	biomasa (g PF.matraz <sup>-1</sup> )	Colina (mg.g <sup>-1</sup> PS)	Atropina (µg.g <sup>-1</sup> PS)
<b>C55</b>	3.45	2.28	3.90
<b>C70</b>	7.60	1.28	3.36
<b>C1601</b>	7.25	1.00	N.D.
<b>C1602</b>	5.30	1.42	3.66
<b>CAR10</b>	8.25	0.99	N.D.
<b>CABC</b>	3.05	2.51	4.20
<b>C2701</b>	4.43	0.94	3.06
<b>C1801</b>	4.55	2.92	5.46
<b>C1701</b>	4.66	1.43	3.18
<b>C1901</b>	4.02	2.29	3.90
<b>Controles<sup>a</sup></b>			
<b>Raíces CAN0221</b>		0.60	N.D.
<b>Raíces Δ-llosa</b>		0.95	N.D.
<b>Hojas CAN0221</b>		0.41	3.06
<b>Hojas Δ-llosa</b>		0.52	3.30
<b>MDS<sub>0.05</sub></b>	0.40	0.01	0.04

N.D: no detectado

En las mismas condiciones experimentales previamente optimizadas para la determinación de colina y atropina las líneas de raíces C1801 y CABC, con los niveles máximos de ambos metabolitos, fueron usadas para averiguar la presencia de la muscarina en este material. Asimismo en base a los resultados presentados en la Figura 37 (electroferograma y espectro MS del patrón de muscarina y del extracto) en ambas líneas de raíces ha sido posible identificar muscarina a las concentraciones de 1.23 y 1.02 µg.g PS<sup>-1</sup> para las líneas C1801 y CABC respectivamente.



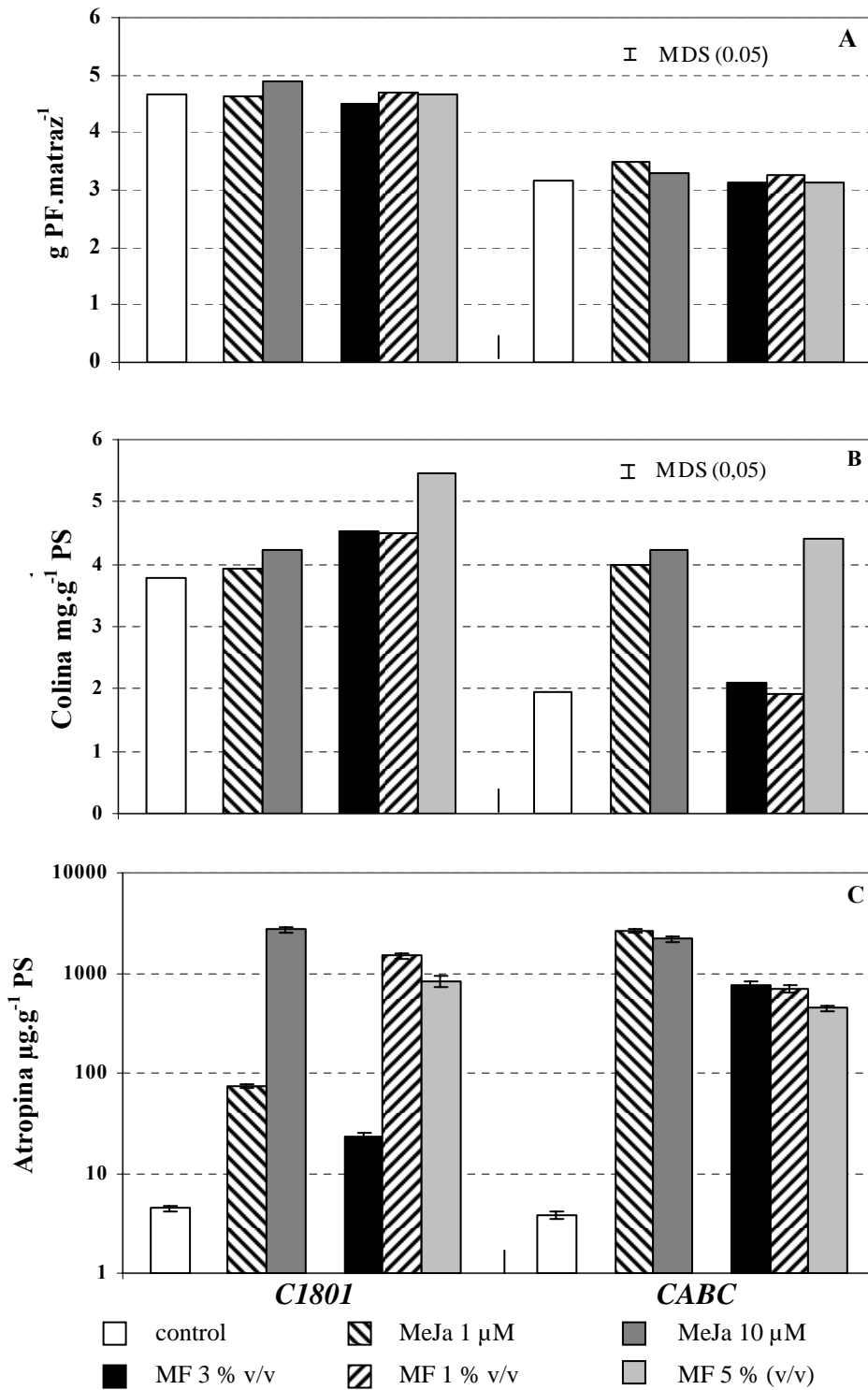
**Figura 37.** (A) Electroferograma y espectro MS obtenidos tras el análisis del patrón de muscarina. (B) Electroferograma obtenido tras el análisis de muscarina en extractos de raíces transformadas de *C. sativa*.

### III.4.2.3. Efecto de los elicitores sobre la producción de alcaloides

Las líneas de raíces C1801 y CABC se seleccionaron para estudiar el efecto de elicitores bióticos (hongo) y abióticos (MeJa), aplicados al final de la fase de crecimiento linear (día 20 del cultivo), sobre la biosíntesis (expresada como acumulación del producto) de colina y atropina en las raíces transgénicas.

En las condiciones control (sin elicitación) ambas líneas de raíces crecieron siguiendo el patrón de crecimiento destrito anteriormente, presentando la línea C1801 un peso fresco 50% más elevado (Figura 38A). La adición de elicitores, sea el MeJa o el filtrado del medio (FM) de *Fusarium oxysporum*, no afectó, en ninguna de las concentraciones ensayadas y por el periodo de tratamiento elegido, el crecimiento de las raíces (Figura 38A). El MeJa, usado a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , incrementó ligeramente el contenido de colina en la línea C1801 respecto al control, mientras que una concentración de 1  $\mu\text{M}$  no mostró tener efecto (Figura 38B) sobre la producción de este alcaloide. En la línea CABC, el MeJa, en las dos concentraciones, aumentó el contenido de colina más de dos veces con respecto al control. El filtrado de medio (FM) de *F. oxysporum* incrementó también cuantitativamente la acumulación de colina en ambas líneas de raíces pero con patrones diferentes. Asimismo, en la línea C1801 el tratamiento con FM 1% y 3% v/v aumentó ligera pero significativamente el contenido de colina con respecto al control, mientras que estas concentraciones no tuvieron efecto en el caso de la línea CABC. El tratamiento con FM 5% v/v fue el más eficiente en ambas líneas llevando a un incremento de colina de 1.44 y 2.23 veces para las líneas C1801 y CABC respectivamente con respecto a las raíces no-elicidadas. Finalmente, cabe mencionar que las raíces de la línea C1801 tuvieron una concentración de colina 2 veces mayor (condiciones control) y que el máximo nivel de acumulación de colina (después de la elicitación) fue también mayor (26%) en esta línea. No obstante, la elicitación fue mucho más eficiente en la línea CABC para ambos tipos de elicitores ensayados (Figura 38B).

Los controles de las dos líneas de raíces mostraron niveles similares de atropina ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ ), los cuales fueron notablemente incrementados después de cuatro días de tratamiento con MeJa o filtrado de medio (FM) de *Fusarium oxysporum*, con una gran influencia de la dosis de elicitor aplicada, especialmente para la línea C1801 (Figura 38C). En esta línea la concentración de atropina fue incrementada 17 y 607 veces respecto al control con 1 y 10  $\mu\text{M}$  de MeJa respectivamente, mientras que para la línea CABC la máxima elicitación fue alcanzada al usar 1  $\mu\text{M}$  de MeJa (688 veces) con pequeñas diferencias en comparación con el tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de MeJa (Figura 38C). El filtrado de medio de *F. oxysporum* fue menos eficiente desde un punto de vista cuantitativo (en media los niveles fueron 3 veces menores) en comparación con el MeJa, en lo que respecta a la estimulación de la producción de atropina en las dos líneas (Figura 38C) contrariamente a lo que fue observado para la colina (Figura 38B). El efecto máximo fue registrado usando FM 3% v/v en la línea C1801 mientras que en la línea CABC los tratamientos con FM 1 y 3% v/v dieron mejores resultados sin diferencias significativas entre ellos (Figura 38C). FM al 5% v/v resultó en una disminución de los niveles de atropina 45 y 40% ( $p < 0.01$  test t Student) con respecto a los niveles máximos alcanzados en las líneas C1801 y CABC respectivamente. Aun así, estos niveles permanecen mucho más elevados en comparación con los correspondientes controles. La concentración de la atropina ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ ) incrementó 5.3, 345 y 186 veces respecto al control al usar 1, 3 y 5% v/v de FM respectivamente, mientras que para las mismas concentraciones el incremento en la línea CABC fue de 198, 186 y 116 veces respectivamente. Además, la máxima acumulación de atropina en respuesta a *F. oxysporum*, fue dos veces mayor en la línea C1801 en comparación con la línea CABC (1486 y 730  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$  respectivamente).



**Figura 38.** Efecto del MeJa y del filtrado de medio (FM) de *F. oxysporum* sobre la acumulación de biomasa (A) y producción de alcaloides (colina (B) y atropina (C)) en las líneas C1801 y CABC de raíces transgénicas de *C. sativa* tras 96 h de elicitación. Los datos de atropina están representados en escala logarítmica y las barras verticales en cada valor representan el Error Estándar.

#### **III.4.2.4. Relación de la producción de etileno y actividad NR con el contenido de alcaloides en las raíces transformadas**

Con el fin de estudiar la relación de la producción de etileno y la actividad nitrato reductasa en las raíces transgénicas de *C. sativa* con el contenido de alcaloides en este material, se ha establecido un análisis de los diferentes variantes por regresión simple. Asimismo, no se ha notado correlación significativa del contenido de atropina con la producción de etileno ( $r=0.346$ ,  $p<0.1$ ) ni con la actividad nitrato reductasa ( $r=0.254$ ,  $p>0.1$ ). En cambio, la síntesis de colina fue positivamente correlada con la actividad nitrato reductasa ( $r=0.620$ ,  $p<0.01$ ) mientras que la producción de etileno no mostró tener relación significativa ( $r=0.101$ ,  $p>0.1$ ) con el contenido de este alcaloide.

#### **IV. ESTUDIO DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA MEDIADA POR *Agrobacterium* Y REGENERACIÓN EN CÁÑAMO**

Un objetivo general de este trabajo ha sido la transformación genética del cáñamo e identificación de las condiciones para la regeneración de plantas transgénicas de esta especie. La transformación de plantas usando *Agrobacterium rhizogenes* presenta unas características que en algunos casos la hacen ventajosa respecto de la transformación, más generalmente usada, mediada por *A. tumefaciens*. La mayoría de las células vegetales transformadas con *A. rhizogenes* desarrollan raíces transgénicas que son aisladas y cultivadas *in vitro*. En diversas especies vegetales se ha observado que estas raíces transformadas fácilmente regeneran plantas bien espontáneamente o tras la aplicación de reguladores de crecimiento y a pesar del síndrome de raíces en cabellera que puedan presentar las plantas regeneradas, esta aproximación se considera útil para especies recalcitrantes (Tepfer, 1984; Mugnier, 1988; Stougaard, 1995). Obtenidos y estabilizados cultivos de raíces transformadas, por cepas de *A. rhizogenes*, de diferentes genotipos de cáñamo se investigó su habilidad para la callogénesis y regeneración de plantas en diferentes medios de cultivo y con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento.

##### **IV.1. Callogénesis y regeneración en raíces transformadas**

Cultivos axénicos de raíces de *C. sativa* (genotipos de fibra y droga) transformadas con diferentes cepas de *A. rhizogenes* fueron usados como material de inicio en los experimentos de regeneración y los explantos consistieron en segmentos

**Tabla 29.** Callogénesis y organogénesis en líneas de raíces de cáñamo (accesión CAN0221 y cv Futura77), transformadas con diferentes cepas de *A. rhizogenes* (al menos una línea de cada combinación). Los explantos, procedentes de cultivos axénicos de las diferentes líneas de raíces, se cultivaron en medio B5 con 0.5 y 0.05  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de BA y ANA respectivamente. Tras 6 semanas de cultivo se determinó, frecuencia de callogénesis, tamaño (diámetro medio) de los callos, coloración y textura, frecuencia de raíces y frecuencia de tallos. F: friable, +: 0.5 a 1 cm de diámetro medio.

Líneas de raíces transformadas (Bacteria/Genotipo planta)	Aparición de callos (semanas)	Formación de callos <sup>a</sup> (%)	Formación de raíces <sup>b</sup> (%)	Formación de tallos <sup>c</sup> (%)	Textura de los callos	Color de callos	Tamaño de callos
<b>A4/CAN0221</b>	1	100	100	0	F	Blanco	+
<b>AR10/CAN0221</b>	1	100	100	0	F	Blanco	+
<b>R1601/CAN0221</b>	1-2	97	100	0	F	Blanco	+
<b>LBA-rolABC/CAN0221</b>	1	100	100	0	F	Blanco	+
<b>A4/Futura77</b>	1-2	96	98	0	F	Blanco	+
<b>AR10/Futura77</b>	1-2	97	100	0	F	Blanco	+
<b><i>MDS</i><sub>0.05</sub></b>	-	0.93	0.59	-	-	-	-

<sup>a</sup> Porcentaje de explantos que desarrollan callos

<sup>b</sup> Porcentaje de callos obtenidos con respuesta MHR.

<sup>c</sup> Porcentaje de callos que desarrollan yemas o tallos.



de  $\approx$  1 cm de longitud de regiones apicales. En el primer experimento los explantos radicales se cultivaron en medio B5 sólido y una combinación hormonal (medio n° 1 de la Tabla 5, Material y Métodos) usada previamente para la regeneración de plantas transgénicas de *Lotus japonicus* (Stiller *et al.*, 1997) y *Catharantus roseus* (Choi *et al.*, 2004) a partir de raíces transformadas por *A. rhizogenes*. Entre una y dos semanas de cultivo, en el citado medio, todas las líneas de raíces iniciaron callos siendo la frecuencia de callogénesis (numero de explantos que forman callos/número total de explantos cultivados), tras tres semanas de cultivo, muy alta y similar (alrededor del 100%, Tabla 29) en todas las líneas.

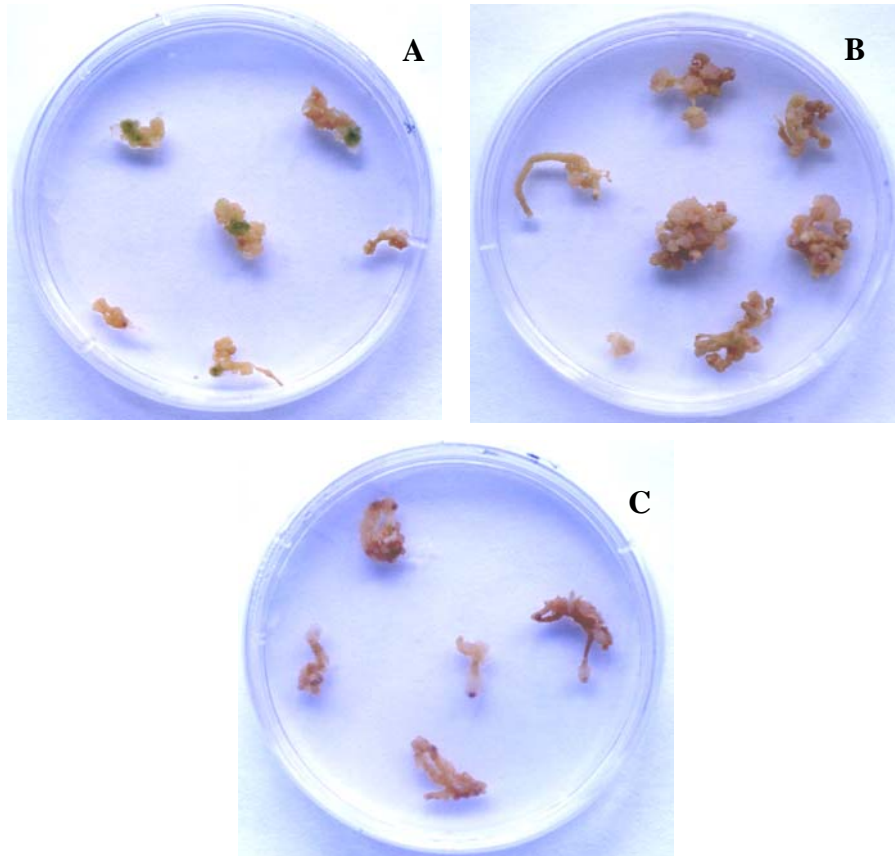
El desarrollo de los callos empezó en los extremos del explanto y en 2 a 3 días la callogénesis se extendió a toda su superficie. Los callos fueron todos de color blanco, friables (disgregación manual fácil) y formaron abundantes raíces en toda su superficie. Tras cuatro semanas de cultivo los callos con un diámetro medio de entre 0.5 y 1 cm (Tabla 29) aparecían como pequeñas masas de tejido enteramente cubiertas de raíces emergentes en todas las direcciones (Figura 39). El fenómeno es progresivo y acaba con la degeneración del callo y la reexpresión del carácter de raíz transformada: raíces finas y ramificadas, rápido crecimiento y geotropismo alterado. Cuando estas raíces fueron aisladas y cultivadas en medio sin fitohormonas mostraron un patrón de crecimiento característico de raíces inducidas por *A. rhizogenes*. A esta proliferación masiva de raíces plagiotrópicas en los callos se le denominó “Memoria hairy root” (MHR). Estas raíces neoformadas cultivadas en el mismo medio de regeneración volvieron a formar callos del mismo tipo (friables con respuesta MHR) cuyo patrón de crecimiento fue muy similar al del callo inicial. En ninguno de estos callos, sin embargo, se obtuvo inducción de tallo (Tabla 29) ni aunque el cultivo se prolongara durante 12 semanas.



**Figura 39.** Callos de cuatro semanas derivados de explantos de raíces transformadas de cáñamo, en medio n° 1 exhibiendo respuesta MHR.

Dada la ausencia de diferencias apreciables en los resultados obtenidos con las diferentes líneas de raíces en este primer experimento se decidió elegir la línea procedente de la combinación A4/CAN0221 para seguir trabajando en la identificación de condiciones para la inducción de tallo en callos derivados de raíces transformadas. Se ensayaron a continuación diferentes combinaciones de ácido naftalenacético (ANA), como auxina, y 6-bencilaminopurina (BA), como citoquinina, variando primero BA y manteniendo ANA constante (medios n° 2 a 5, Tabla 5, Material y Métodos) y variando ANA después, manteniendo BA constante (medios n° 6 a 12, Tabla 5). En todos estos medios la frecuencia de callogénesis de la línea de raíces ensayada fue del 100% y los callos fueron todos de textura friable (Tabla 30, medios n° 2-12). Otras características de los callos como la frecuencia de respuesta MHR, tamaño y color tras 6 semanas de cultivo fueron más dependientes de la combinación hormonal utilizada. La frecuencia de callos rizogénicos o con MHR disminuyó progresiva y fuertemente con la concentración de BA en el medio llegando a 0 en presencia de 2 y 4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente (Tabla 30, Figura 40 B y C). La BA estimuló el crecimiento de los callos y tras 6 semanas de cultivo el tamaño varió entre 0.5 y 1 cm de diámetro, para la concentración más baja y más de 1.5 cm para la más alta (Tabla 30). Estos callos, sin embargo, eran muy friables y de color

marrón indicativo de envejecimiento y degeneración. Cabe señalar que en los medios nº 2 y 3 los callos friables y de color blanco mostraron zonas verdes en la superficie (Figura 40 A).



**Figura 40.** Callos no rizogénicos desarrollados en los medios nº 2(A), 4(B), 5(C) tras 4 semanas de cultivo.

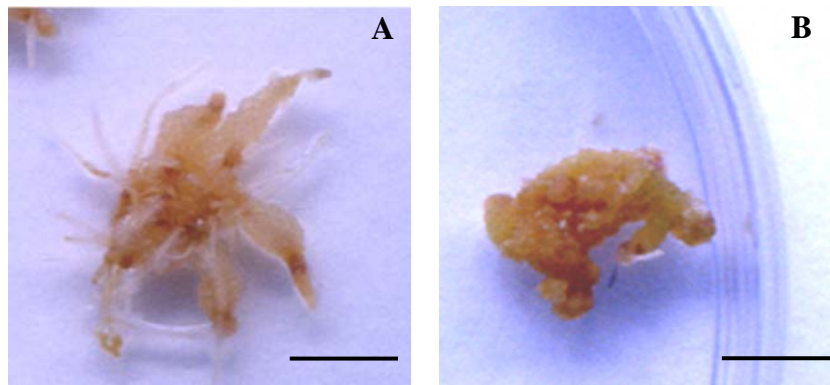
**Tabla 30.** Callogénesis y regeneración en raíces de cáñamo (*C. sativa*) transformadas por *A. rhizogenes*. Los explantos se cultivaron en los medios listados más abajo cuya composición se recoge en la Tabla 5 (Sección Material y Métodos). Tras 6 semanas de cultivo se determinó, frecuencia de callogénesis, formación de raíces, tamaño (diámetro medio) de los callos, coloración y textura (como indicadores de habilidad de regeneración). En ningún medio se observó formación de yemas o tallos. El tamaño de los callos se clasificó según la siguiente clave: += pequeño (0.5-1.0 cm); +=+ mediano (1.0-1.5 cm) y +=+= grande (> 1.5 cm). F: friable.

Medio	Formación de callos <sup>a</sup> (%)	Formación de raíces <sup>b</sup> (%)	Características de los callos		
			Tamaño	Color	Textura
1	100	100	+	Blanco	F
2	100	79	+	Blanco/verde	F
3	100	25	++	Blanco/verde	F
4	100	0	++	Marrón	F
5	100	0	+++	Marrón	F
6	100	89	+	Marrón	F
7	100	100	+++	Blanco/marrón	F
8	100	100	+	Blanco	F
9	100	89	+	Blanco	F
10	100	86	+	Blanco	F
11	100	85	+	Marrón	F
12	100	31	+	Marrón	F
13	100	90	+	Blanco	F
14	100	100	+	Blanco	F
15	100	100	+	Blanco	F
16	89	0	+	Marrón	F
17	94	0	+	Marrón	F
18	100	0	+	Blanco	F
19	100	41	+	Marrón	F
<i>MDS</i> <sub>0.05</sub>	0.68	2			

<sup>a</sup> Porcentaje de explantos que formaron callos

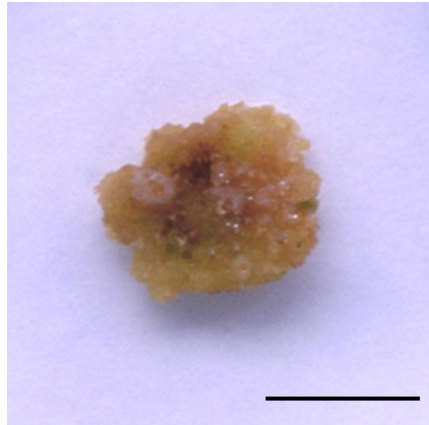
<sup>b</sup> Porcentaje de callos con respuesta MHR.

Al incrementar la concentración del ácido naftalenacético, como auxina, en presencia de BA a  $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  disminuyó el porcentaje de callos rizogénicos hasta un 31% en el medio n° 12 ( $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de ANA) pero estos callos friables eran pequeños y de color marrón no desarrollando nunca zonas verdes (Tabla 30, Figura 42). Por otra parte en el medio n° 7 con una concentración muy baja ( $0.025 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de ANA se obtuvieron callos friables de gran tamaño, blancos con zonas marrones pero todos dieron respuesta MHR, lo que según apuntan los resultados no sería un signo de buena competencia para regeneración.



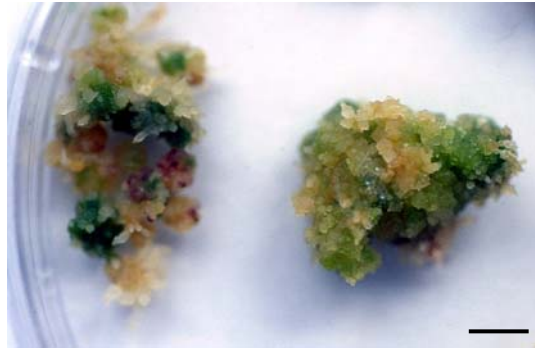
**Figura 42.** Callo rizogénico (A) y no rizogénico (B) derivadas de raíces transformadas, tras 4 semanas de cultivo en el medio n° 12. La barra horizontal representa 0.5 cm.

En presencia de Kinetina (medios n° 13-15) también se obtuvo el 100% de callogénesis formándose callos pequeños, de color blanco, friables y prácticamente todos con MHR (Tabla 32). En medio MB, la combinación de BA y 2,4-D (medios n° 16 y 17) o de Kinetina y AIA (medio n° 18) eliminó completamente la MHR en los callos pero estos eran además de friables, pequeños y de color marrón (Tabla 30, Figura 43), El 2,4-D además disminuyó ligeramente la frecuencia de callogénesis.



**Figura 43.** Callo no rizogénico después de 6 semanas de cultivo en el medio n° 16. La barra horizontal representa 0.5 cm.

Al objeto de investigar el efecto del cambio de medio y los sucesivos subcultivos sobre la habilidad organogénica de los callos, estrategia con la que se ha mejorado la respuesta organogénica en otras especies (Hamza y Chupeau, 1993 y Gurriarán *et al.*, 1999), fragmentos (0.5 cm, nódulos de crecimiento activo y de color verde intenso) de callos obtenidos con el medio n° 3 (Tabla 30) se subcultivaron en el mismo medio y en los medios n° 7, 16 y 17 (ver Tabla 5) para los que se informó una eficiente regeneración de tallos a partir de raíces transformadas de *Lotus japonicus* (Stiller *et al.*, 1997) y ocasionales eventos de regeneración en explantos no transformados de *C. sativa* (Mandolino y Ranalli, 1999). En los medios n° 3 y 7 los callos crecieron vigorosamente, la mayoría desarrollaron áreas nodulares verdes en la superficie (Figura 41) tras cuatro semanas de cultivo y alcanzaron un tamaño de entre 1.5 y 2 cm de diámetro. Este patrón se ha mantenido durante todo el periodo de cultivo que se extendió hasta 12 semanas. Sin embargo en ninguno de los dos medios estos callos regeneraron yemas o tallos. En los medios n° 16 y 17, por otra parte, los callos perdieron la coloración verde, dejaron de crecer y murieron tras dos semanas de cultivo.



**Figura 41.** Callos obtenidos en el medio n° 7 tras 4 semanas de cultivo de fragmentos de callos iniciales formados en el medio n° 3. La barra horizontal representa 0.5 cm.

#### **IV.2. Efecto del antiauxinas sobre la expresión de la rizogénesis en los callos inducidos a partir de raíces transgénicas**

Un rápido y prolífico desarrollo de raíces en los callos no es un signo de buena competencia para regeneración de yemas y tallos en dichos callos (Batista *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 2004). La expresión de los genes *rol*, y probablemente otros oncogenes, influencia los niveles hormonales y altera la percepción de las hormonas por las células vegetales (Schmülling *et al.*, 1993). Particularmente *rolB* incrementa la sensibilidad a las auxinas en las células donde se expresa (Maurel *et al.*, 1994), lo que podría explicar, al menos en parte, la actividad rizogénica de los callos notada en este trabajo. Aunque esta actividad rizogénica ha resultado inhibida con algunas de las combinaciones de reguladores utilizados, no se observó inducción de yemas o tallos en esos callos. Como alternativa se planteo ensayar el efecto de un inhibidor de la acción de auxinas, el PCIB (ácido p-clorofenoxiisobutírico), adicionado al medio n° 2 de la Tabla 5 (Material y Métodos) libre de auxinas.

Con independencia de la concentración aplicada, el PCIB disminuyó apreciablemente (un 34% de media) la formación de callos en raíces transformadas de cáñamo (Tabla 31) respecto de los controles no tratados. El PCIB también afectó notablemente el desarrollaron de los callos obteniéndose callos pequeños, que tras 2 semanas de cultivo desarrollan en la superficie unas estructuras a modo de rizoides o

**Tabla 31.** Efecto del PCIB sobre la callogénesis y organogénesis en raíces transformadas de cáñamo, en medio n° 2 sin auxinas, después de 6 semanas de cultivo. Se indican como muy rizogénicos (+++) los callos cuya superficie fue totalmente cubierta con rizoides, moderadamente rizogénicos (++) callos que llevaron rizoides en menos de la mitad de su superficie y ligeramente rizogénicos (+) aquellos que no formaron más de 5 rizoides. F: friable, F<sup>+</sup>: muy friable. El diámetro medio de los callos fue de 0.5-1 cm (+).

PCIB ( $\mu$ M)	Formación de callos <sup>a</sup> (%)	Formación de rizoides <sup>b</sup> (%)	Formación de tallos <sup>c</sup> (%)	Características de los callos obtenidos				
				Textura	Tamaño	Color	N° de rizoides por callo	Tamaño medio de rizoides (mm)
<b>0</b>	100	*	0	F	+	Blanco/marrón	-	-
<b>10</b>	62	100	0	F	+	Blanco	+++	10-20
<b>20</b>	72	100	0	F	+	Blanco	+++	10-20
<b>40</b>	68	100	0	F	+	Blanco/verde	++	10-20
<b>70</b>	66	100	0	F	+	Blanco/verde	++	5-12
<b>100</b>	64	8	0	F <sup>+</sup>	+	Marrón/verde	+	2-5
<i>MDS<sub>0.05</sub></i>	9	23	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Porcentaje de explantos que desarrollan callos

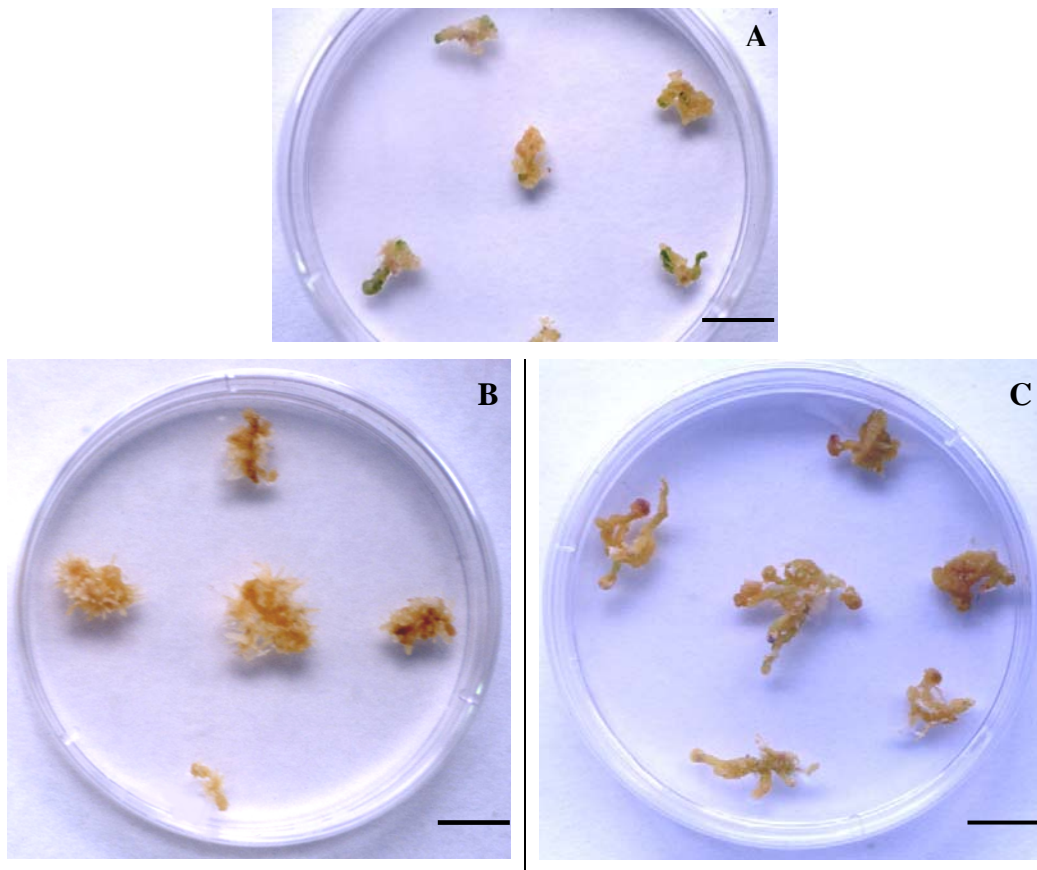
<sup>b</sup> Porcentaje de callos que desarrollan raíces callosas (rizoides).

<sup>c</sup> Porcentaje de callos que desarrollan yemas o tallos.

\* En este medio no se desarrollaron rizoides sino que el 89% de los callos expresaron la MHR.



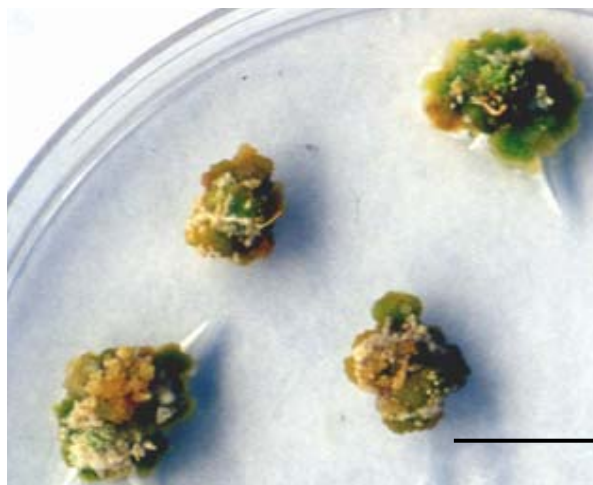
raíces callosas como muestra la Figura 44. Entre 10 y 70  $\mu\text{M}$  de PCIB el 100% de los callos formados desarrollaron estas estructuras en superficie frente al 8% con 100  $\mu\text{M}$ . El número y tamaño de estos rizoides disminuyó drásticamente al incrementar la concentración de PCIB desde callos totalmente cubiertos de tales estructuras de 10-20 mm de longitud con 10 y 40  $\mu\text{M}$  hasta callos con menos de 5 rizoides < 5 mm con 100  $\mu\text{M}$  de PCIB.



**Figura 44.** Callos derivados de raíces transformadas de cáñamo en el medio n° 2 libre de auxinas con PCIB: (A) 40  $\mu\text{M}$  tras 2 semanas de cultivo, (B) y (C) 10 y 100  $\mu\text{M}$  respectivamente tras 4 semanas de cultivo. Las barras horizontales representan 1 cm.

En los extremos de estas raíces callosas o rizoides obtenidos en presencia de PCIB 40 y 70  $\mu\text{M}$  empezaron a crecer, en la tercera semana de cultivo, callos secundarios de textura muy compacta y color verde intenso (Figura 44 A). Dos semanas después, estos callos (3-6 mm de longitud) fueron aislados y cultivados en el mismo medio, en el cual mostraron un crecimiento lento (no superando 1 cm de

diámetro), mantuvieron la textura compacta y color verde, si bien al avanzar el cultivo se desarrollaron áreas de color blanco y otras amarillentas en superficie (Figura 45). A partir de dichas zonas pronto empezaron a desarrollarse nuevas raíces con un patrón similar al observado en ausencia de PCIB. El PCIB ha alterado notablemente la estructura y apariencia de los callos y raíces pero el material se adaptaría y reaparecen callos de tipología normal incluyendo expresión de la respuesta MHR (Figura 45).



**Figura 45.** Callos derivados de rizoides (Figura 44 A) cultivados durante 4 semanas en el mismo medio con 40  $\mu$ M de PCIB. La barra horizontal representa 1 cm.

### IV.3. Obtención de callos transformados con *A. tumefaciens*

Dado que la estrategia de transformación genética mediante regeneración a partir de raíces transformadas por *A. rhizogenes* no resultó en la obtención de plantas transgénicas de cáñamo, alternativamente se ha ensayado la aproximación más clásica de transformación mediada por *A. tumefaciens*. Solo dos informes se han encontrado en la bibliografía sobre la aplicación de esta aproximación en *C. sativa*, la transformación de ápices de tallo (Mackinnon *et al.*, 2000) sin que se aportara una clara confirmación de la naturaleza transgénica de las plantas obtenidas, y la transformación de cultivos en suspensión (Fenney y Punja, 2003) que formaron

callos transformados que nunca regeneraron plantas. En nuestro trabajo se ha usado la cepa EHA105 de *A. tumefaciens* (Tabla 3, Material y Métodos) para infectar numerosos explantos (1 cm) de hipocotilo procedente de plántulas del genotipo CAN0221 cultivadas *in vitro*. Tras el cocultivo los segmentos de hipocotilo fueron transferidos a medio de selección con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento (Tabla 6, Material y Métodos) y 50 mg.L<sup>-1</sup> de Kanamicina. Previamente se puso de manifiesto que esta concentración de Kanamicina era letal para explantos control que murieron tras una semana de cultivo, mientras que prácticamente no afectó la callogénesis en los explantos transformados (Tabla 32). El transgen *nptII* conlleva la inactivación de la Kanamicina, confiriendo a las células vegetales que lo expresan, resistencia a este antibiótico.

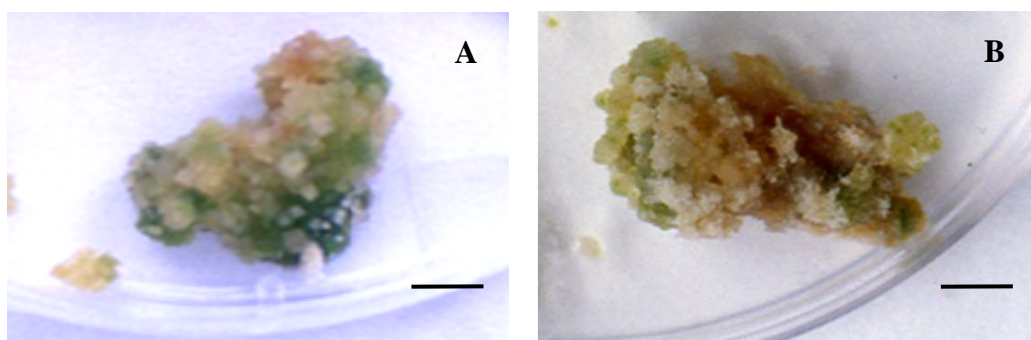
**Tabla 32.** Efecto de la concentración de Kanamicina usada para la selección de transformantes, sobre el desarrollo de callos en explantos de hipocotilo transformados y no transformados (control) después de 4 semanas de cultivo.

Kanamicina (µg.mL <sup>-1</sup> )	Formación de callos <sup>a</sup> (%)	
	<i>Explantos transformados</i>	<i>Explantos control</i>
<b>0</b>	67	100
<b>25</b>	65	15
<b>50</b>	63	0
<b>75</b>	18	0
<i>MDS</i> <sub>0.05</sub>	12	14

<sup>a</sup> Porcentaje de explantos que formaron callos.

En todos los medios de regeneración ensayados se observó formación de callo en los extremos cortados del explanto, tras una semana de cultivo, extendiéndose después a toda la superficie. En seis semanas se obtuvieron callos resistentes a Kanamicina, grandes, friables de color verde-claro con áreas nodulares en la superficie (Tabla 33, Figura 46). La frecuencia de formación de callos resistentes al antibiótico varió entre 35% y 63% dependiendo de los niveles de fitohormonas en los diferentes medios de regeneración, si bien se observaron dos grupos netamente diferenciados. Los medios 1 y 2 con un promedio del 40% de

callogénesis frente a los medios 3, 4 y 5 con un 60% de callogénesis. También resultó evidente que el *Agrobacterium* pudo reducir la callogénesis en un 30% respecto de los explantos control (Tabla 32). En ningún caso se observó formación de raíces y/o yemas/tallos en el periodo de cultivo que se extendió hasta 12 semanas.



**Figura 46.** Callos transformados con la cepa EHA105 (A) y callos no transformados (B) cultivados en medio de regeneración n° 5 (TDZ  $1.9 \mu\text{g.mL}^{-1}$  y AIA  $0.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) durante 6 semanas. Las barras horizontales representan 0.5 cm.

**Tabla 33.** Callogénesis en explantos de hipocotilo transformados con la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* después de 6 semanas de cultivo en los medios indicados cuya composición se recoge en la Tabla 6 (Material y Métodos). F: friable

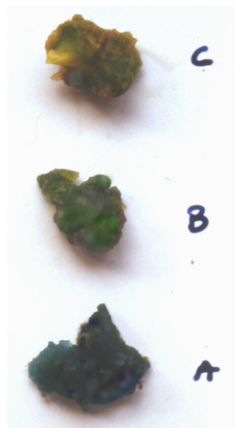
Medio	Formación de callos <sup>a</sup> (%)	Formación de raíces <sup>b</sup> (%)	Formación de tallos <sup>c</sup> (%)	Características de los callos		
				Textura	Color	Tamaño(cm)
1	44	0	0	F	Verde	1.0-2.0
2	35	0	0	F	Verde	1.5-2.3
3	63	0	0	F	Verde	1.2-2.6
4	58	0	0	F	Verde	1.1-2.4
5	60	0	0	F	Verde	1.5-2.0
<i>MDS</i> <sub>0.05</sub>	14	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Porcentaje de explantos que formaron callos.

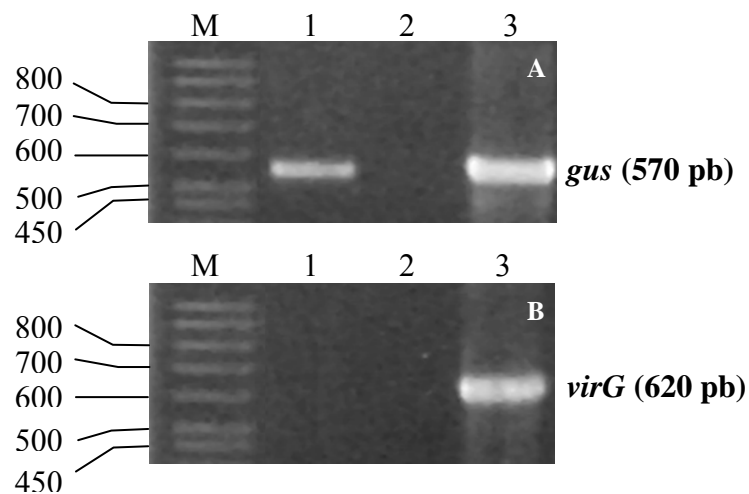
<sup>b</sup> Porcentaje de callos que formaron raíces.

<sup>c</sup> Porcentaje de callos que formaron yemas o tallos.

Para confirmar la naturaleza transformada de los callos se determinó la expresión del gen *gusA* en este material y su integración en el genoma. La expresión de la actividad GUS fue analizada mediante ensayo histoquímico en callos seleccionados en medio de regeneración con Kanamicina, en callos obtenidos de explantos no inoculados con *Agrobacterium* y en tumores inducidos por la cepa silvestre C58 de *A. tumefaciens*. Todos los callos resistentes a Kanamicina dieron positivo en la tinción histoquímica sin que se observaran centros o nódulos no teñidos en ninguno de los callos (Figura 47A) indicando que todos los callos se han desarrollado a partir de células transformadas con el T-DNA binario de la cepa EHA105 que incluye los genes *gus* y *nptII*, por el contrario los callos no transformados (controles) y los tumores inducidos por la cepa silvestre no portadora del gen *gusA* dieron negativo en dicho ensayo histoquímico (Figura 47B y C). Adicionalmente la integración del gen *gusA* en el genoma de las células de callos resistentes a Kanamicina fue confirmada mediante análisis por PCR utilizando cebadores específicos para dicho gen (Figura 48A) los cuales amplificaron la esperada banda *gus* de aproximadamente 570 pb (Stiller *et al.*, 1997). Dicha banda también se identificó en el ADN plasmídico de la bacteria pero no en el ADN genómico callos no transformados. La ausencia de una banda de 620 pb, amplificada por cebadores específicos del gen *virG*, en los callos transformados y no transformados (Figura 48B) indica que el material está libre de *Agrobacterium*.



**Figura 47.** Tinción histoquímica GUS positiva en callos transformados con la cepa EHA105 portadora del gen *gus* (A). Los callos no transformados (B) y tumores inducidos por la cepa C58 de *A. tumefaciens* (C) dieron negativo en la tinción.



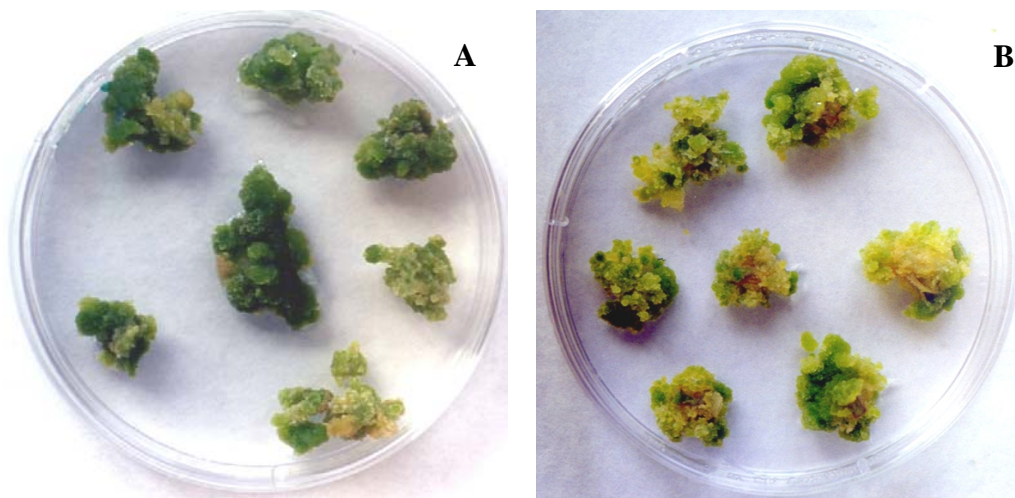
**Figura 48.** Análisis por PCR del ADN de los callos transformados con la cepa EHA105 de *A. tumefaciens*. (A) Detección del gen *gusA* (570 pb) en callos transformados (1) y en el ADN bacteriano (3) y ausencia de dicho gen en el ADN de callos no transformados (2). (B) Ausencia, en callos transformados (1) y no transformados (2), de una banda de 620 pb (*virG*) específica de la bacteria (3). M: marcadores de peso molecular.

#### VI.4. Callogénesis y regeneración de plantas *in vitro* a partir de tejidos no transformados

Los resultados anteriores han puesto claramente de manifiesto que el cáñamo muestra adecuada susceptibilidad al *Agrobacterium* (plásmido Ri o Ti) como vector de genes obteniéndose fácilmente material establemente transformado y alto vigor de crecimiento como órganos diferenciados (caso de las raíces en cabellera) o tejidos indiferenciados (caso de los callos de raíces o hipocotilos transformados) o incluso como típicas agallas de cuello o tumores (masas desorganizadas de células relativamente indiferenciadas). Algunos de estos materiales también han integrado y expresado adecuadamente transgenes (*gusA*, *nptII*) incluidos en el T-DNA de vectores binarios introducidos en *Agrobacterium*. Sin embargo ninguno de ellos mostró habilidad alguna para regenerar yemas y/o tallos y por consiguiente plantas transgénicas de cáñamo. Como siguiente paso en nuestro trabajo se planteó investigar la habilidad, para regenerar en cultivo *in vitro*, de tejidos de cáñamo equivalentes a los usados en el trabajo precedente, esto es explantos de raíz e hipocotilo no transformados. A tal fin se han elegido los medios y combinaciones de

reguladores del crecimiento recopilados en la Tabla 7 (Material y Métodos) en base a la investigación anterior y los escasos informes que sobre este particular se han encontrado. Según bibliografía, los explantos de *Cannabis* responderían favorablemente tanto en medio B5 como en el medio MS.

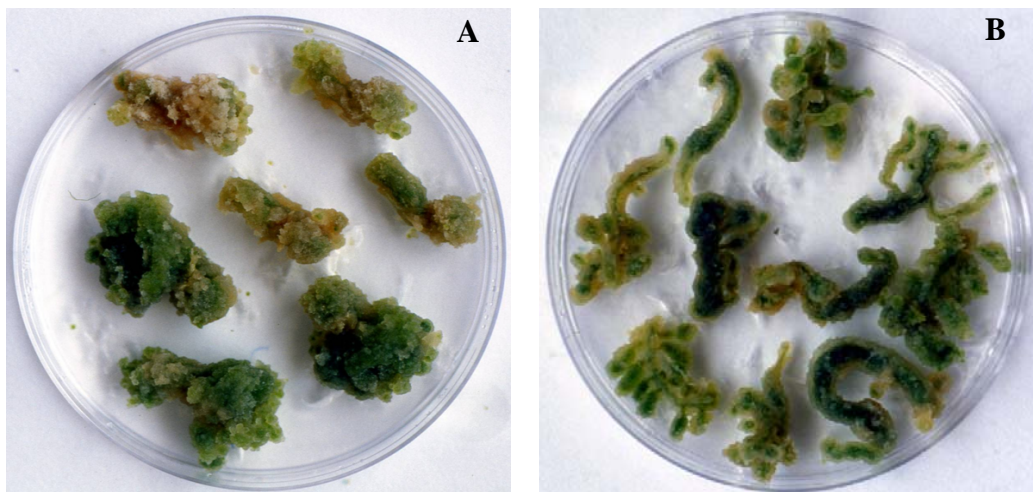
En todos los medios ensayados se observó inducción de callo, en ambos tipos de explantos, siendo visibles en los extremos del explanto en 7-8 días de cultivo y extendiéndose por todo el explanto después. La respuesta de callogénesis fue también muy alta y similar para los dos tipos de tejidos (excepto en los medios que incluyen altos niveles de 2,4-D) los cuales tras 15-18 días de cultivo mostraron una frecuencia media del 93% (75-100%) y 91% (68-100%), respectivamente, de explantos que han producido callo de buen aspecto y crecimiento (Tabla 34, Figura 49), sin que se observaron variaciones posteriores de estos datos.



**Figura 49.** Callos inducidos a partir de explantos de hipocotilo (A) y raíz (B) tras 5 semanas de cultivo en el medio n° 1 (Tabla 7).

Niveles de entre 3 y 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de 2,4-D, con los que se informó por primera vez regeneración de tallos a partir de explantos de *Cannabis*, inhibieron fuertemente la callogénesis en los explantos de cáñamo resultando la raíz considerablemente más sensible que los explantos de hipocotilo (Tabla 34). Estos

callos friables y de coloración blanco-marrón crecieron mal alcanzando un tamaño, tras 5 semanas de cultivo, de tan solo 1-1.5 cm de diámetro (Tabla 35). Sin embargo niveles más bajos de 2,4-D combinados con BA para tener una relación auxina citoquinina de 1 y 2 (medios n° 12 y 13 respectivamente) promovieron una alta respuesta callogénica y un buen crecimiento (1.6-2.5 cm de diámetro en 5 semanas de cultivo) de callos friables o muy friables y coloración verde claro para la concentración más baja de 2,4-D o blanco con zonas amarillentas para la más alta, en ambos tipos de explantos (Tabla 35). La inclusión de TDZ y AIA, a las concentraciones indicadas en la Tabla 7 (medio n° 14) en medio MS con 3% de sacarosa estimuló el 100% de callogénesis y los callos friables y verdes mostraron un crecimiento muy vigoroso (Tablas 34, 35, Figura 50).



**Figura 50.** Callos derivados de explantos de hipocotilo (**A**) y raíz (**B**) tras 5 semanas de cultivo en presencia de TDZ y AIA como citoquinina y auxina respectivamente (medio n° 14, Tabla 7).

La combinación de BA y ANA (1 y 0.05  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente) en medio B5 con 2% de sacarosa anteriormente usado para explantos de raíces transformadas (medio n° 2, Tabla 5) también favoreció el 100% de callogénesis en ambos tipos de explanto dando callos friables de color verde (hipocotilo) o blanco



con nódulos verdes en la superficie (explantos de raíz) y de gran tamaño en 5 semanas de cultivo (Tablas 34, 35 medio n° 2).

**Tabla 34.** Formación de callos, raíces y tallos en explantos de hipocotilo (H) y raíz (R) del genotipo CAN0221 de *C. sativa* después de 5 semanas de cultivo en los medios indicados cuya composición se recoge en la Tabla 7.

Medio	Explanto	Formación de callos <sup>a</sup> (%)	Formación de raíces <sup>b</sup> (%)	Formación de tallos <sup>c</sup> (%)
1	H	75	-	-
	R	68	-	-
2	H	100	-	-
	R	100	-	-
3	H	90	-	-
	R	96	-	-
5	H	36	-	-
	R	16	-	-
6	H	27	-	-
	R	13	-	-
7	H	45	-	-
	R	19	-	-
8	H	98	22	<b>3.8</b>
	R	93	50	-
9	H	99	13	<b>3.1</b>
	R	99	48	-
10	H	97	21	<b>5.2</b>
	R	90	56	-
11	H	95	29	<b>2.3</b>
	R	98	42	-
12	H	95	-	-
	R	86	-	-
13	H	92	-	-
	R	88	-	-
14	H	99	-	-
	R	100	-	-
<i>MDS</i> <sub>0.05</sub>	-	2.5	4.9	0.4

<sup>a</sup> Porcentaje de explantos cultivados que formaron callos.

<sup>b</sup> Porcentaje de callos que formaron raíces.

<sup>c</sup> Porcentaje de callos que formaron yemas o tallos.

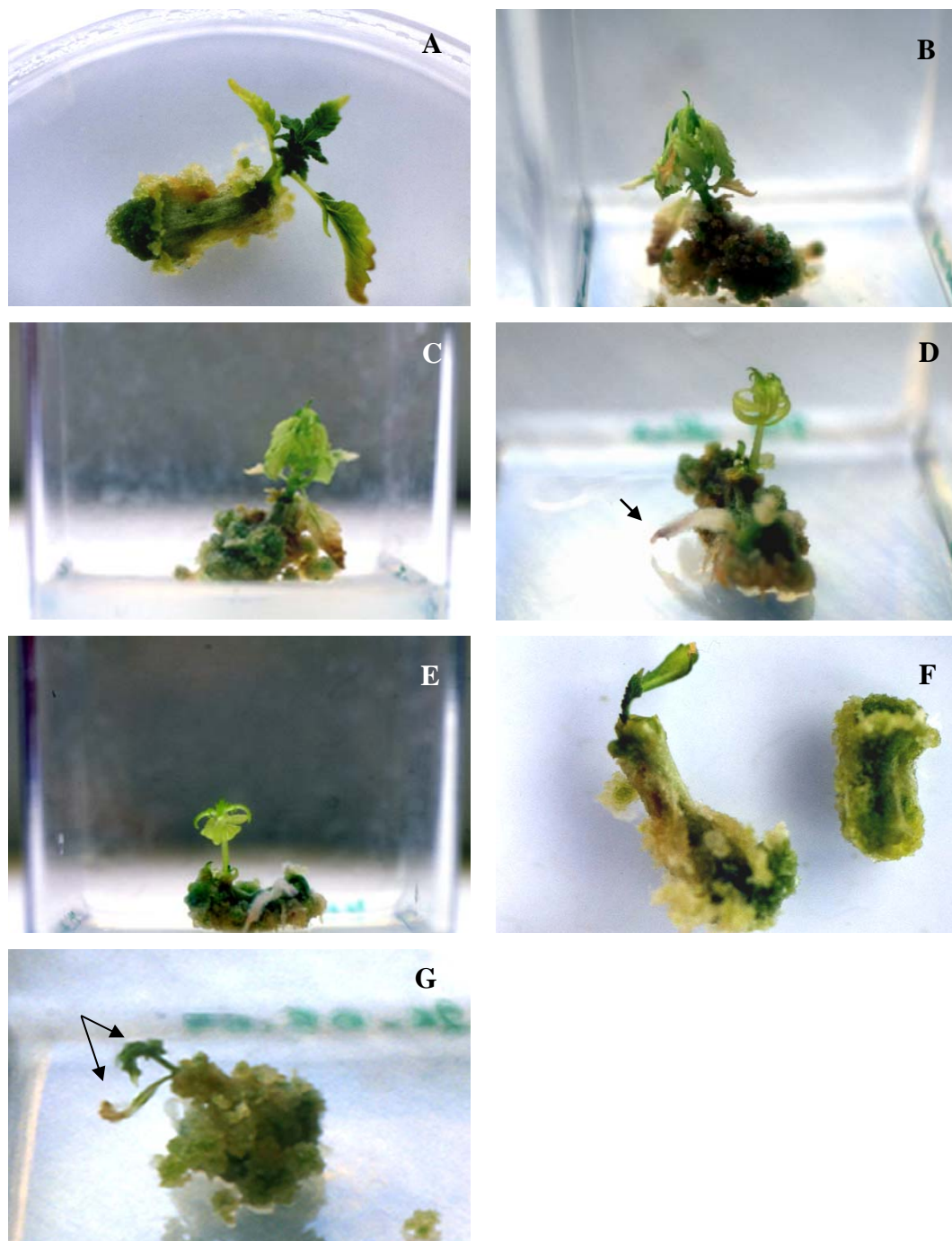
**Tabla 35.** Características de los callos formados a partir de explantos de hipocotilo (H) y raíz (R) en los medios indicados cuya composición se recoge en la Tabla 7 después de 5 semanas de cultivo. Se registró el tamaño (diámetro medio), coloración y textura de los callos. El tamaño se expresa según la clave: += 1-1.5 cm; +++= 1.6-2.5 cm; ++++= >2.5 cm. F: friable, F<sup>+</sup>: muy friable, C: compactos, F/C: friable con zonas compactas.

Medio	Explanto	Características de los callos		
		Tamaño	Color	Textura
1	H	++	verde	F
	R	++	verde	F
2	H	+++	Verde	F
	R	+++	Blanco/verde	F
3	H	++	Blanco/verde	F
	R	++	Blanco/verde	F
5	H	+	Blanco/marrón	F
	R	+	Blanco/marrón	F
6	H	+	Blanco/marrón	F
	R	+	Blanco/marrón	F
7	H	+	Blanco/marrón	F
	R	+	Blanco/marrón	F
8	H	+++	Verde/blanco	F/C
	R	+++	Verde/blanco	F
9	H	+++	Verde/blanco	F
	R	+++	Verde/ blanco	F/C
10	H	+++	Verde	F/C
	R	+++	Verde/blanco	F
11	H	+++	Verde	F/C
	R	+++	Verde/blanco	F/C
12	H	++	Verde claro	F <sup>+</sup>
	R	++	Verde claro	F <sup>+</sup>
13	H	++	Blanco/amarillento	F
	R	++	Blanco/amarillento	F <sup>+</sup>
14	H	+++	Verde	F
	R	+++	Verde	F

Como muestra la Tabla 34 ninguna de las concentraciones de 2,4-D como auxina con BA como citoquinina (medios n° 5-7, 12 y 13) o AIA con TDZ (medio n° 14) promovieron la formación de raíces en estos callos del genotipo CAN0221 de cáñamo usado. Tampoco se observó formación de raíces con diferentes combinaciones de ANA y BA en medio B5 con 2% de sacarosa (medios n° 1-3). Es

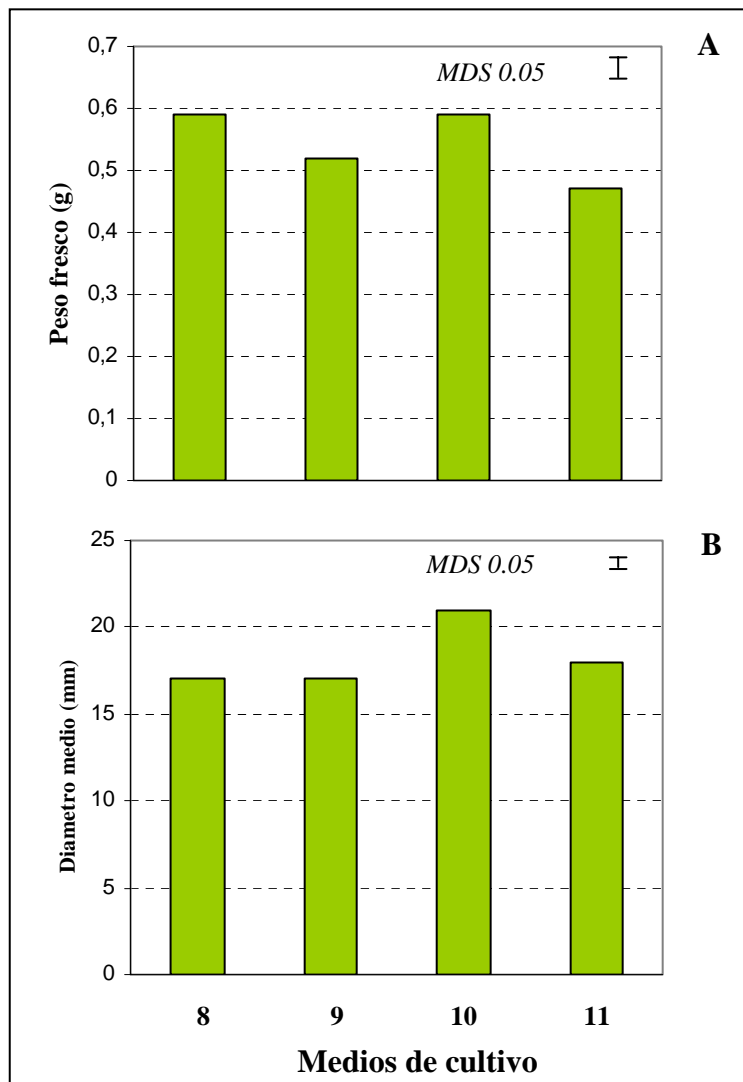
de destacar sin embargo que cuando alguna de estas combinaciones (medio n° 3) se incluyó en el medio MS con 3% de sacarosa (medio n° 8), el crecimiento de los callos fue muy vigoroso. Todos mostraron áreas verdes en la superficie en aproximadamente 15 días y el 50 y 22% de los callos derivados de raíz e hipocotilo, respectivamente, desarrollaron raíces en 15-18 días de cultivo. Más notablemente, el 3.8% de los callos derivados de explantos de hipocotilo regeneraron además tallo en el mismo tiempo (Tabla 34) lo que también apoyaría un papel clave del medio base en la habilidad organogénica de los explantos de cáñamo usados en este trabajo. En este mismo medio otras combinaciones de BA y ANA (medios n° 9-11) también promovieron callos vigorosos con zonas verdes compactas y desarrollo de raíces en ambos tipos de explantos en el mismo tiempo y con frecuencias muy similares a las mencionadas para el medio n° 8 (Tabla 34). En estos tres medios los callos derivados de explantos de hipocotilo también regeneraron tallos pero con distinta frecuencia dependiendo del medio (Tabla 34), siendo siempre la frecuencia de callos caulogénicos muy inferior (2.3-5.2%) respecto a los callos rizogénicos (13-29%) y no observándose correlación entre la actividad rizogénica y la habilidad para regenerar yemas o tallos en estos callos. Hay que decir también que en ningún caso se observó desarrollo de tallos o raíces directamente del explanto.

La mayor tasa de regeneración de tallo (5.2%) se obtuvo con la combinación de 2 y 0.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de BA y ANA respectivamente (Tabla 34, medio n° 10) mientras que la respuesta más baja (2.3%) se obtuvo con el medio n° 11 (3 y 0.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). El número de tallos en cada callo varió entre 1 y 2 desarrollándose a partir de áreas nodulares de color verde intenso y compactas en la parte superior del callo (Figura 51A), mientras que el número de raíces fue algo mayor (2-5 por callo) formándose a partir de áreas friables y no clorofílicas. Dichas raíces crecieron muy lentamente, presentaron geotropismo positivo y eran independientes de los tallos (Figura 51D). Como se ha dicho tallos y raíces se desarrollaron de manera prácticamente simultánea en el callo (tercera semana de cultivo) no apareciendo más tallos después de dicho periodo, en cambio si emergieron algunas raíces más. Tampoco se observó posterior regeneración cuando, tras aislar los tallos, los callos o fragmentos de estos fueron subcultivados a medio fresco, por un periodo mínimo de 12 semanas.



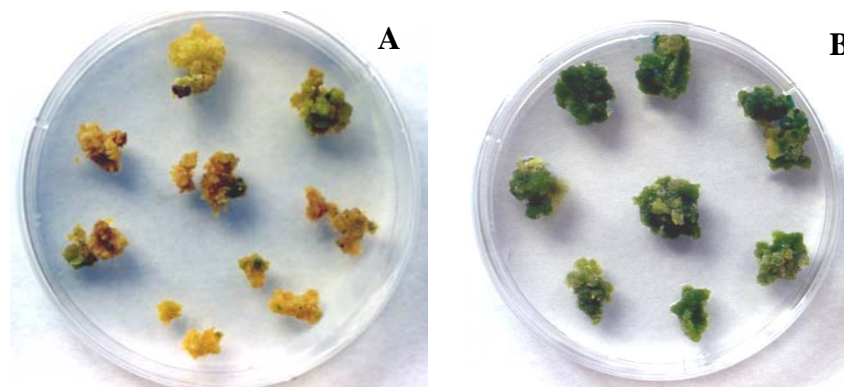
**Figura 51.** Inducción de tallos en callos inducidos a partir de explantos de hipocotilo de cáñamo. **(A)** Plántula de 4 días iniciada sobre un callo de 16 días inducido en medio n° 10. **(B, C)** Plántulas de 19 días cultivadas en medio de elongación durante 1 semana. **(D)** Raíz de 10 días desarrollada en callo caulogénico recién transferido a medio de elongación. **(E)** Plántula de 19 días presentando síntomas de vitrificación. **(F)** Hojas deformadas 4 días tras su aparición en un callo de 2 semanas. **(G)** Tallo deformado, con única hoja unifoliar y demás hojas no desplegadas, 19 días tras su aparición.

En algunos experimentos se registró el crecimiento (peso fresco y diámetro medio) de estos callos tras 5 semanas de cultivo en los correspondientes medios y los datos se muestran en la Figura 52. Como se puede observar las diferentes combinaciones de reguladores utilizadas no afectaron de forma importante el crecimiento de estos callos, hecho también puesto de manifiesto por la escasa variación en la relación PF/tamaño (0.026-0.034) de los mismos. El mayor diámetro medio correspondió a los callos cultivados en el medio 10 mientras que el mayor peso fresco se obtuvo en los medios 8 y 10.



**Figura 52.** Subcultivo de callos organogénicos de hipocotilo, tras aislar los tallos regenerados, en los mismos medios de regeneración. Crecimiento de los callos después de 5 semanas de cultivo; peso fresco en g (A) y diámetro medio en mm (B).

Ante la baja respuesta organogénica obtenida se intentó la regeneración a partir de callos preexistentes derivados de explantos de hipocotilo. El medio elegido para inducir los callos fue el medio n° 10, con el que se obtuvo mayor respuesta organogénica (Tabla 34). Los callos formados fueron subcultivados en el mismo medio, en el medio n° 5 (con el que se informaron ocasionales eventos de regeneración en *Cannabis* por Mandolino y Ranalli, (1999) o en medio n° 4 cuya composición se recoge en la Tabla 7. Cuando se cultivaron en el mismo medio, los callos mostraron el mismo patrón de desarrollo descrito anteriormente (Tablas 34, 35). En el medio n° 5 (2,4-D como auxina, 3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) los callos se volvieron de color amarillento (Figura 53A), muy friables y murieron después de cuatro semanas de cultivo. Sin embargo en medio n° 4 el crecimiento fue muy vigoroso obteniendo en 4 semanas de cultivo callos con un peso fresco medio de aproximadamente 1.8 g, color verde intenso y textura bastante compacta (Figura 53B). No obstante estos callos tampoco regeneraron tallos o raíces aun manteniéndolos 12 semanas en cultivo. Los resultados parecen sugerir que en el cáñamo la regeneración *in vitro* requiere que los callos sean iniciados desde el principio en los medios que la favorecen.



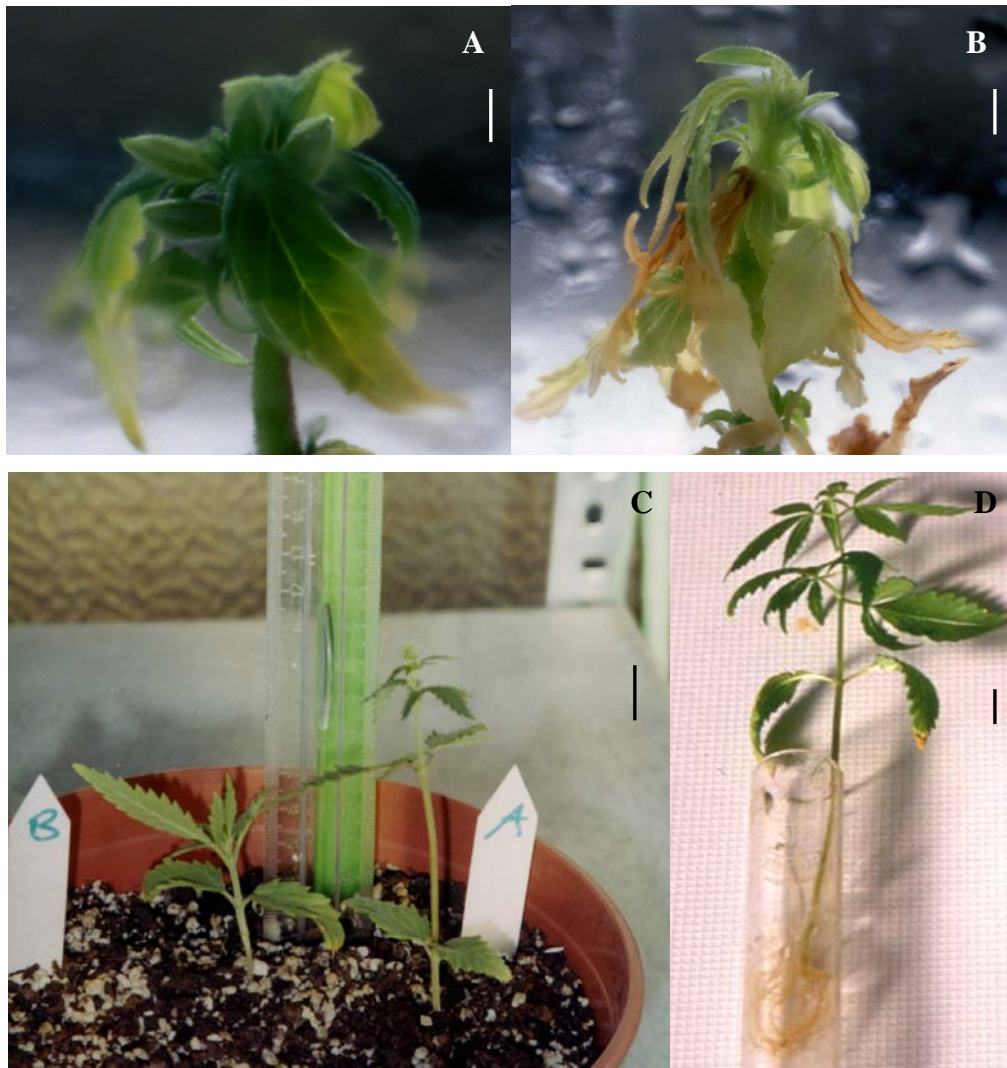
**Figura 53.** Callos procedentes de callos iniciados en medio n° 10, tras 4 semanas de cultivo en los medios n° 5 (A) y 4 (B).

Cuando los tallos regenerados alcanzaron 1 cm de longitud ( $\approx$  15 días) se transfirieron a medio de elongación (medio n° 15, Tabla 7) en jarras Magenta y se subcultivaron unidos a un fragmento de callo base (Figura 51B, C) durante 1 semana antes de aislarlos y transferirlos a medio fresco donde continuaron desarrollándose y

empezaron a enraizar en 6-7 días prolongándose el cultivo dos semanas antes de la aclimatación.

De un total de 28 plántulas regeneradas 8 mostraron un desarrollo totalmente anormal (tallos deformados, hojas no desplegadas, hojas unifoliadas muy grandes, (Figura 51F y G) y fueron descartadas. Por lo que al medio de elongación se transfirieron solo 20 plántulas. De estas, 6 mostraron una acusada hiperhidricidad manifestada por un aspecto muy vitrificado o translucido de tallo y hojas como índice, de acuerdo con George *et al.* (1996), del elevado contenido hídrico en estos tejidos. Dichas plántulas manifestaron estos síntomas durante toda esta fase de cultivo en medio de elongación (Figura 51E) y aunque alcanzaron un cierto desarrollo en dicho periodo se murieron en la fase de aclimatación. Finalmente 13 plántulas fueron aclimatadas y transferidas a macetas.

En 16-18 días de cultivo en medio de elongación las plantas alcanzaron 4 cm de altura sin que se notara crecimiento posterior en los restantes 8-10 días de esta fase hasta la aclimatación. En cambio las raíces continuaron creciendo y alcanzaron 5 cm de longitud al final de dicho periodo. La detención del crecimiento del tallo podría deberse al inicio del crecimiento reproductor ya que en este periodo tuvo lugar la floración de estas vitroplantas. Se observó la aparición de flores masculinas y femeninas normales en plantas (pies) separadas (Figura 54) manteniéndose por tanto el carácter dioico del genotipo de cáñamo usado para iniciar el cultivo *in vitro*. Las plantas macho desarrollaron de 4 a 6 anteras grandes de  $\approx 2$  mm (Figura 54A) que tras 5 a 6 días se abrieron liberando el polen, mientras que en las plantas hembra aparecieron flores sentadas (2-4 mm) localizadas en la región apical (Figura 54B). En plantas de diferentes genotipos de cáñamo crecidas en jarras Magenta con vermiculita en cámara de cultivo, y exhibiendo un desarrollo adecuado, la floración se inicio en la 5ª semanas de cultivo (apartado I.2, Resultados) coincidiendo con la floración *in vitro* por lo que las plantas regeneradas de cáñamo presentaron una morfología y habito de desarrollo relativamente normales.

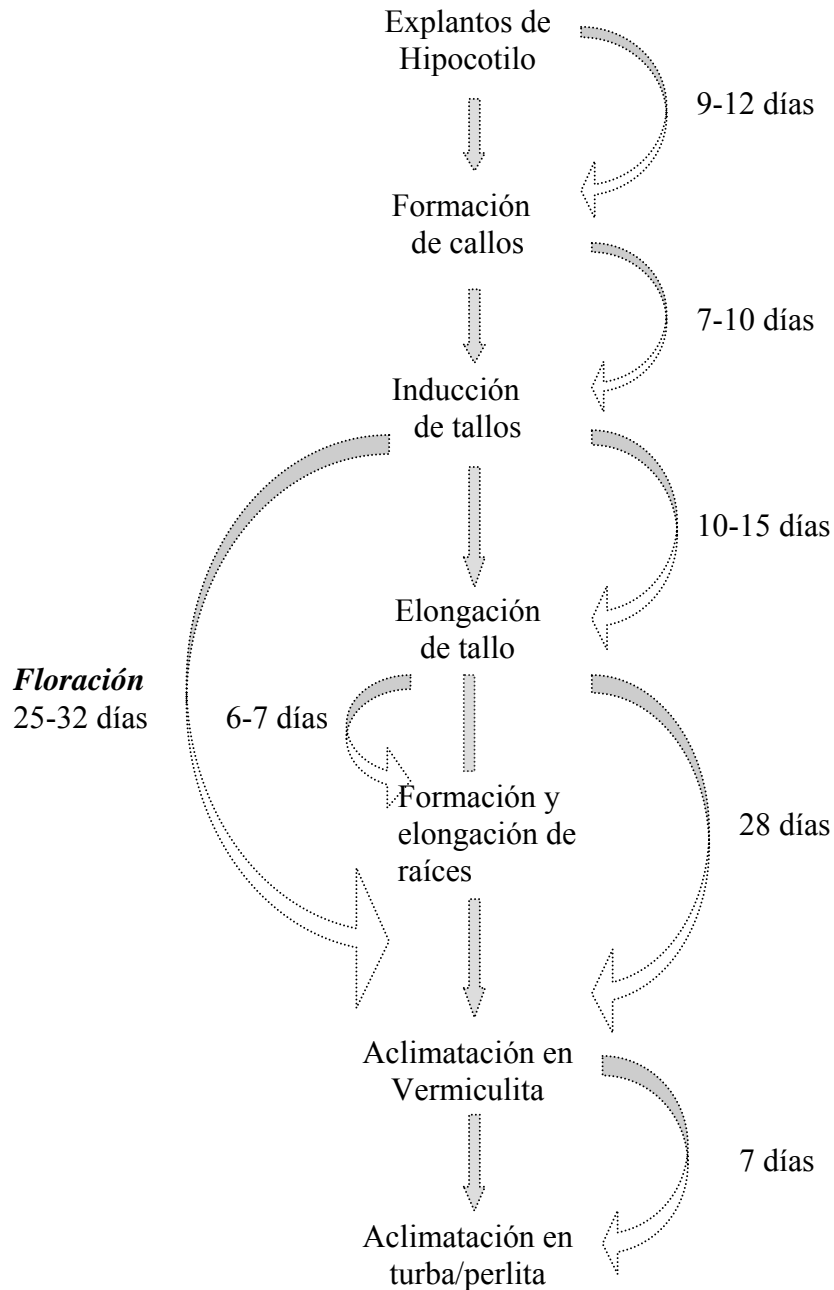


**Figura 54.** Floración y aclimatación de las plántulas regeneradas de cáñamo. (A, B) Desarrollo de flores masculinas (A) y femeninas (B) en plántulas separadas tras 13 y 17 días de cultivo en el medio n° 15 respectivamente. (C) plantas de 8 semanas aclimatadas en maceta. (D) sistema radical desarrollado de una planta aclimatada. Las barras verticales representan: 2 mm (A), 5 mm (B), 20 mm (C) y (D).

Las plantas aclimatadas se transfirieron a macetas y se mantuvieron en cámara de cultivo hasta senescencia. En este tiempo las plantas mostraron un aspecto y desarrollo tanto de parte aérea (Figura 54C) como de raíz (Figura 54D) similar al de plántulas normales transferidas a macetas tras la germinación; cuatro a cinco entrenudos, primer par de hojas unifoliadas y las siguientes trifoliadas si bien el tamaño de estos órganos fue algo menor y no aparecieron hojas con más de tres folíolos. Siguió apareciendo algunas flores y en algunas plantas se formaron



aquenos que resultaron estar vacíos quizás porque en estas condiciones la polinización sería improbable. La Figura 55 recoge las etapas principales y periodos requeridos para cada paso de la regeneración desde la aparición de yemas hasta la obtención de plantas aclimatadas.



**Figura 55.** Diagrama de flujo de regeneración de cáñamo. Etapas y tiempos requeridos desde el cultivo de explantos de hipocotilo hasta la obtención de plantas aclimatadas.

## Capítulo 5

# DISCUSIÓN

En muchas especies vegetales, el uso de *Agrobacterium* como agente de transformación genética, se considera la técnica más eficiente y menos laboriosa para la mejora biotecnológica de los cultivos (Gheysen *et al.*, 1998). Asimismo, la relativa facilidad con la se que pueden obtener raíces transgénicas o “hairy root” en muchas especies vegetales, junto con su capacidad de producir metabolitos secundarios existentes en la planta de origen, han hecho de este material una fuente irremplazable para la producción de varios compuestos de interés industrial. En relación con este tema, los avances logrados en el cultivo y aplicaciones de las raíces transformadas han pasado de ser una metodología experimentada en los laboratorios de investigación a ser una técnica últimamente adaptada para la producción de varios metabolitos a nivel industrial (Guillon *et al.*, 2006). Por otra parte, y como ha sido ya explicado en el apartado II.2.6 de la Introducción, la posibilidad de usar las raíces transformadas como alterativa a otros sistemas de transformación genética se está incluyendo cada vez más en los programas de mejora de los cultivos (Christey, 1997; Miranda y Campos, 1998).

La literatura científica recoge ya bastantes trabajos que abordan tanto la transformación de varias especies vegetales con *Agrobacterium* como las aplicaciones que tienen los cultivos de raíces transgénicas. Así, en varias centenas de especies (principalmente dicotiledoneas) se ha conseguido inducir formación de raíces transformadas (Bourgaud *et al.*, 1997), de las cuales más de 80 han mostrado ser capaces de producir metabolitos secundarios de interés farmacéutico, alimentario o cosmético (Giri y Narasu, 2000). Desde esta perspectiva, la susceptibilidad a la infección con *Agrobacterium* puede considerarse, para una especie, el primer paso hacia nuevas aplicaciones biotecnológicas para la mejora de su cultivo.

### **Cultivo y caracterización de las raíces transformadas**

La idea de estudiar detalladamente la interacción del cáñamo con *Agrobacterium*, y de usar tejidos transformados, principalmente raíces, para el estudio de su crecimiento y capacidad biosintética y regeneradora, ha surgido de la funcionalidad demostrada en plantas de esta técnica de transformación. Aspecto que ha estado, a nuestro conocimiento, aun sin abordar en el género *Cannabis*.

Por todo ello, se decidió utilizar, en el presente trabajo, variedades de cáñamo cultivadas para la producción de droga y otras seleccionadas para la obtención de fibra con el propósito de estudiar su interacción con varias cepas de *Agrobacterium rhizogenes* y *A. tumefaciens*. El primer paso del trabajo ha sido averiguar la susceptibilidad a la infección. En este sentido, al alcanzar un porcentaje de respuesta superior al 90 %, en las condiciones experimentales óptimas, el cáñamo puede considerarse altamente susceptible a este patógeno tomando como referencia otras plantas conocidas por su alta susceptibilidad a *Agrobacterium* como es el caso de *Lotus japonicus*, *Lycopersicon esculentum*, *Arabidopsis* y *Nicotiana* (Stiller *et al.*, 1997; Escobar *et al.*, 2001; Clemente, 2006). La respuesta del cáñamo a *Agrobacterium* resultó estrechamente ligada a de varios factores, destacando de forma especial, el tipo de tejido usado para la infección. Asimismo las hojas y cotiledones no mostraron ningún tipo de respuesta en las condiciones usadas en el presente trabajo. Parecidos efectos críticos del tejido inoculado sobre la respuesta se observaron previamente observados en varias especies vegetales (Chriqui *et al.*, 1988; 1991; 1996).

La cepa de *Agrobacterium* usada para la infección representó otro componente importante de la respuesta encontrándose diferencias significativas en la infectividad de las cepas probadas aunque todas fueron capaces de inducir respuesta, como mínimo adecuada, en cáñamo. En el plásmido Ri de *A. rhizogenes*, y como es sabido, el ADN transferido codifica al menos por tres genes *rol* (*A*, *B* y *C*) cuya acción sinérgica es capaz de inducir la formación de raíces transgénicas en el sitio de infección (Cardarelli *et al.*, 1987; Jouanin *et al.*, 1987; Spena *et al.*, 1987; Altabella

*et al.*, 1995). Además varios trabajos mostraron que incluso estos *loci* usados individualmente, pueden inducir la formación de raíces en muchas especies (Spena *et al.*, 1987; Vilaine *et al.*, 1987; Capone *et al.*, 1989; Lambert y Tepfer, 1991). De acuerdo con esto hemos constatado que en *C. sativa* tanto los genes *rolA*, *rolB*, *rolC* y *rolD* usados por separado como la combinación de los *loci rolA+rolB* provocaron el desarrollo de raíces en los sitios de infección siendo el *rolB* más efectivo que los genes *rolA* y *rolC* en la estimulación de la formación de raíces. Spena *et al.* (1987) habían notado efectos parecidos del *rolB* en plantas de tabaco mientras que en hojas de kalanchoe dicho gen fue el único, entre todos los demás genes *rol* probados individualmente, capaz de inducir raíces. Esta acción diferente de los mismos genes *rolA*, *rolB* y *rolC* en varias especies indica que los productos de estos *loci* no son únicamente sinérgicos entre ellos sino que interfieren con factores de la propia planta implicados en la diferenciación celular (Spena *et al.*, 1987).

Ha sido comentado que la combinación de varios genes *rol* puede mejorar la respuesta a la infección, de modo que en tabaco y kalanchoe el uso de los genes *rolA+rolB* mejoró significativamente la respuesta con respecto al *rolB* sólo (Spena *et al.*, 1987), cosa que no hemos podido observar en el caso del cáñamo. En cambio usando una combinación de los genes *rolA+rolB+rolC* se ha constatado el restablecimiento de la respuesta normal de la planta a la infección con un porcentaje de respuesta igualable al obtenido tras la infección, con cepas que portan el Ri completo, de acuerdo con las constataciones presentadas por varios autores en otras especies vegetales (Cardarelli *et al.*, 1987; Jouanin *et al.*, 1987; Spena *et al.*, 1987). Cabe mencionar que cuando las raíces inducidas por los genes *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD* y *rolA+rolB* fueron aisladas y cultivadas en medio sin fitohormonas sólo aquellas procedentes de la infección con el *rolB* consiguieron crecer *in vitro* y que solo en las líneas procedentes de la combinación de los genes *rolA*, *rolB* y *rolC* se obtuvieron raíces con un crecimiento rápido y una apariencia típica de las raíces inducidas con el Ri completo como ha sido observado en *Nicotiana tabacum* (Palazón *et al.*, 1997b).

A partir de los resultados obtenidos en esta parte del trabajo, se puede desprender también una adecuada influencia del genotipo de cáñamo usado para la

infección sobre la respuesta, siendo algunos genotipos más susceptibles a *Agrobacterium* que otros. Por otra parte si la infección con *Agrobacterium rhizogenes* no permitió concluir sobre la existencia de diferencias atribuibles al fenotipo expresado por la planta infectada, el uso de la cepa I251 de *A. tumefaciens* permitió ver que el peso seco de los tumores formados en los genotipos de droga fue significativamente mayor con respecto a los cultivares de fibra. Este mismo criterio se usó previamente por Owens y Cress (1985) para la clasificación de genotipos de soja.

Como se indicó en el apartado III de Resultados, las raíces transformadas se eligieron como principal material de trabajo en el presente estudio. Para ello, varias líneas de raíces, procedentes de la infección de plántulas de varios genotipos (con fenotipo droga y fibra) con diferentes cepas de *A. rhizogenes*, fueron establecidas y seleccionadas en función de su capacidad de crecimiento y de su morfología. Como resultado de ello, hemos obtenido, por un lado, líneas de raíces transformadas por un lado con distintas combinaciones cepa-genotipo, y por otro, dos tipos de morfología. Así pues, las dos morfologías obtenidas difieren en el tipo y grosor de las raíces, destacando la existencia de raíces finas o normales y otras más gruesas. Cabe mencionar que no hemos observado líneas con capacidad de diferenciación resultando en la morfología parecida a callos o “callus like morphology” descrita en las raíces transgénicas de algunas *Solanáceas* (Moyano *et al.*, 1999) y de *Panax ginseng* (Mallol *et al.*, 2001). La variabilidad notada entre las diferentes líneas incluso las resultantes de la misma combinación cepa/genotipo (C55/C70, C1601/C1602) podría estar debida por una parte al origen clónico de las raíces transformadas (Tempé y Casse-Delbart, 1989; Giri y Narasu, 2000) y por otra a la variabilidad del número de copias y emplazamiento del T-DNA en el genoma vegetal a lo largo de la infección (Bourgau *et al.*, 1997).

En general, los cultivos de raíces transformadas muestran una gran dependencia a las condiciones de cultivo como la composición del medio de cultivo, concentración de sacarosa, frecuencia de subcultivos así como la concentración y fuente de nitrógeno usadas (Giri y Narasu, 2000; Bensaddek *et al.*, 2001; Królicka *et al.*, 2001; Lourenço *et al.*, 2002). Por todo ello y por la ausencia de datos relativos al

cultivo de las raíces transformadas de *C. sativa*, fue imprescindible llevar a cabo una primera fase de optimización de las condiciones de cultivo. Asimismo hemos constatado que tanto la concentración de sales como de sacarosa en el medio de cultivo fueron determinantes para el crecimiento de las raíces transformadas sin haberse notado efecto ninguno sobre la morfología. De este modo hemos obtenido mejor crecimiento de las raíces en las mayores concentraciones de sales ensayadas (medios MS y B5 respectivamente) (Figura 22) de acuerdo con los resultados obtenidos en raíces transformadas de *Artemisia annua* (Jaziri *et al.*, 1995). En cambio el crecimiento de raíces transgénicas de *Datura quercifolia* estuvo reprimido al usar altas concentraciones de sales en el medio de cultivo (Dupraz *et al.*, 1994). Es importante mencionar que en bajas concentraciones de sales (medios MS½ y B5 ½) hemos notado una considerable multiplicación bacteriana resultando en una alta frecuencia de contaminación con *Agrobacterium* en las primeras semanas de cultivo aún en presencia de Cefotaxima, lo que se observó previamente en cultivos de raíces transformadas de otras especies (Giri y Narasu, 2000).

Las raíces transgénicas de cáñamo crecen en oscuridad y no son autótrofas por lo que sólo un aporte externo de carbono cubrirá sus necesidades metabólicas. Así pues, el mejor crecimiento se alcanzó usando el 3% (p/v) de sacarosa mientras que concentraciones mayores reprimieron significativamente el crecimiento de las raíces (Figura 24). Esto contrasta con los resultados obtenidos por Yu *et al.* (1996) y Lourenço *et al.* (2002) en cultivos de raíces transgénicas de *Solanum aviculare* y *Centaurea calcitrapa*, respectivamente, que mostraron mejor crecimiento en concentraciones de sacarosa del rango 3 a 7% (p/v). Por otra parte, el crecimiento de las raíces requiere una mínima concentración de sacarosa variable según la especie, en caso de las raíces transformadas de *C. sativa* el crecimiento fue lento pero posible en presencia de la mínima concentración de sacarosa ensayada en el presente trabajo (1% p/v), mientras que la misma concentración no fue capaz de inducir un crecimiento significativo en raíces transformadas de *Centaurea calcitrapa* (Lourenço *et al.*, 2002). Además en cultivos de raíces transformadas de *Ipomea aquatica* y *Nicotiana tabacum* la disminución de la concentración de sacarosa al 2.5% resultó ser la causante de la supresión del crecimiento de las raíces sin pérdida de viabilidad

(Nagatome *et al.*, 2000). Como se conoce, el coste del metabolismo energético puede estar asegurado dividiendo la utilización de las fuentes de carbono para la producción de masa celular y el mantenimiento de células preexistentes (Pirt, 1965). De este modo, a bajas concentraciones de azúcar la energía disponible no es suficiente para la síntesis de masa celular y las células entran en una fase en la que la energía es solamente consumida para el mantenimiento del metabolismo. Por último, es importante indicar que la influencia de la sacarosa sobre el crecimiento de las raíces parece no tener mucho interés si no se aprecia su efecto como sustrato metabólico, sus actividades fisiológicas y su función como modulador de la expresión génica (Yu *et al.*, 1996; Sturm y Tang, 1999).

Los efectos del medio de cultivo (concentración de sales y de sacarosa) pueden diferir de un clon de raíces a otro, hecho que complica bastante la optimización de las condiciones de cultivo como ha sido previamente comentado por Aoki *et al.* (1997). Para paliar este problema, hemos optado por usar, a lo largo de los primeros experimentos de optimización, un elevado número de colonos de raíces transformadas (60 clones).

Los resultados referidos al análisis del crecimiento (Figura 26) indican que, en las condiciones de cultivo optimizadas, las raíces transformadas de cáñamo mostraron un alto potencial de crecimiento tanto en medio sólido como líquido. En este último medio, y al cabo de 4 semanas de cultivo, se obtuvieron índices de crecimiento ( $I_c = \text{PS final} / \text{PS inicial}$ ) de 1733 y 1663 en las líneas C55 y CABC respectivamente, los cuales fueron notablemente superiores a los índices de crecimiento obtenidos en raíces transformadas de *Atropa belladonna*  $I_c = 5.4$  (Bensaddek *et al.*, 2001) y dos líneas de raíces de *Duboisia*  $I_c = 5.7$  y  $46.3$  (Celma *et al.*, 2001). De este modo vemos que el crecimiento de las raíces transformadas de *C. sativa* en las condiciones elegidas fue mayor que otras especies incluyendo el tabaco (Palazón *et al.*, 1997b), *Catharanthus roseus* (Palazón *et al.*, 1998), *Datura metel* y *Duboisia hybrid* (Moyano *et al.*, 1999), *Atropa belladonna* (Kamada *et al.*, 1986), *Ammi majus* (Królicka *et al.*, 2001), *Brugmansia candida* (Pitta-Álvarez y Giulietti, 2001) y *Salvia miltiorrhiza* (Chen *et al.*, 2001).



De forma general, en la literatura científica no hemos podido encontrar explicación alguna sobre la determinación del ciclo de subcultivos para las raíces transformadas, aunque el tiempo de subcultivo ha mostrado tener una gran influencia sobre el crecimiento de este material (Rijhwani y Shanks, 1998). Así, los intervalos de subcultivo de las raíces transformadas de *C. sativa* a medio fresco no superaron los 7 días en medio sólido y 10 días en caso de los cultivos líquidos, principalmente durante las primeras semanas de cultivo. En cambio con periodos de subcultivo más largos las raíces empezaban a mostrar síntomas de senescencia manifestándose en el ralentizamiento y, más tarde, después la detención del crecimiento, el amarillamiento de las raíces, etc. De hecho, se puede ver que esta frecuencia de subcultivo es corta en comparación con otras especies donde se usaron intervalos de subcultivo de 2 a 3 semanas (Królicka *et al.*, 2001; Lourenço *et al.*, 2002) y llegando hasta 4 semanas en algunas especies (Celma *et al.*, 2000). Lo que podría explicarse por el alto potencial de crecimiento que han mostrado las raíces transformadas de cáñamo en comparación con otras especies o, probablemente, por una elevada liberación de exudados radicales tóxicos en el medio.

Por otra parte, hemos constatado también que la identidad y cantidad de nitrógeno en el medio de cultivo afectó de forma muy significativa el crecimiento y la morfología de las raíces transformadas de cáñamo de forma semejante a la descrita para otras especies (Bensaddek *et al.*, 2001; Lourenço *et al.*, 2002). Así, el uso de altas concentraciones de nitrato o de amonio en el medio de cultivo afectó negativamente el crecimiento de las raíces con una disminución de la biomasa entorno al 50%, de la misma manera observada en raíces transformadas de *Atropa belladonna* por Bensaddek *et al.* (2001). Por otra parte, la disminución de los niveles de nitrógeno por debajo de los encontrados en el medio MS (usado como control) tuvo también un efecto negativo sobre la acumulación de la biomasa pero de forma menos acentuada, contrariamente a lo que se notó en las *Solanáceas*, donde la reducción de la concentración de nitrógeno favoreció el crecimiento de las raíces transformadas (Payne *et al.*, 1987; Parr *et al.*, 1990). El uso del nitrato como única fuente de nitrógeno ralentizó el crecimiento de las raíces transformadas de cáñamo

sin reprimirlo completamente debido a la disminución de la concentración de nitrógeno en el medio, mientras que el uso exclusivo del amonio no fue capaz de soportar crecimiento ninguno. Hecho que fue previamente observado en los cultivos de raíces transformadas de *Hoyoscyamus muticus* (Oksman-Caldentey *et al.*, 1994) y *Centaurea calcitrapa* (Lourenço *et al.*, 2002). En todo caso, resulta lógico el comportamiento de las raíces en presencia del amonio como única fuente de nitrógeno ya que además del efecto letal de la acidificación del medio durante la absorción del amonio, el incremento de la concentración intracelular del amonio puede explicar también este hecho (Loyola-Vargas y Jiménez, 1986; Oksman-Caldentey *et al.*, 1994).

La variación de la fuente y concentración de nitrógeno en el medio de cultivo influyó también sobre la morfología de las raíces transformadas de *C. sativa*. Asimismo, hemos podido constatar que en altas concentraciones de nitrato las raíces tuvieron una morfología gruesa, mientras que tras la eliminación de ese compuesto del medio, las raíces formadas fueron muy finas. Por otra parte, la variación de la concentración del amonio no pareció afectar la morfología de las raíces. A partir de estos resultados se puede desprender una influencia del nitrato sobre la morfología de las raíces mientras que el amonio parece influir más sobre la actividad de crecimiento y división celular. Por todo ello, se puede concluir que tanto el amonio como el nitrato tienen que ser presentes a concentraciones adecuadas visto que el nitrato en todas sus formas es un elemento esencial para la síntesis de muchas macromoléculas; ácidos nucleicos, proteínas, etc., el nitrato, por su parte, parece estar involucrado en la señalización del crecimiento vegetal y la modulación de la expresión génica (Crawford y Glass, 1998; Stitt, 1999).

Cabe destacar también, que a lo largo de este experimento no hemos podido constatar diferencia alguna entre la línea CABC, transformada con una cepa de *Agrobacterium* portadora de solo los genes *rolABC*, y la línea C55, inducida por una cepa de *A. rhizogenes* silvestre (A4), en cuanto a morfología y respuesta fisiológica a la variación de la fuente y concentración de nitrógeno en el medio. Lo que fue

también notado en raíces transformadas de otras especies (Cardarelli *et al.*, 1987; Spina *et al.*, 1987; Palazón *et al.*, 1997b; Bensaddek *et al.*, 2001).

Cuando se optimizaron los parámetros primordiales del cultivo y crecimiento de las raíces transformadas de *C. sativa*, se seleccionaron 10 líneas de raíces con distintas morfologías (fina y gruesa) y procedencias para investigar la presencia de algunos metabolitos secundarios en este material. Como primer paso, se evaluó la presencia de algunos cannabinoides principales como el  $\Delta^9$  THC, CBD y CBN, que pese a ser principalmente sintetizados en la parte aérea de la planta podrían aparecer en las raíces transformadas como se comentó en material parecido de otras especies (Jaziri *et al.*, 1995; Bakkali *et al.*, 1997; Nishikawa y Ishimaru, 1997). No obstante, no hemos podido detectar cantidades cuantificables de ninguno de los cannabinoides estudiado. De acuerdo con ello, existen indicaciones de la ausencia de estos metabolitos en las raíces de la planta y en callos y suspensiones celulares procedentes de ellas (Veliky y Genest, 1972). Lo que podría explicarse con la ausencia, en las raíces, de las glándulas epidérmicas donde ocurre la biosíntesis de cannabinoides (Fujita *et al.*, 1967; Fairbain, 1972; Hammond y Mahlberg, 1973; Malingre *et al.*, 1975; Small *et al.*, 1975; Lanyon *et al.*, 1981). A partir de allí se desvió nuestro interés hacia la detección, en las raíces transformadas de cáñamo, de alcaloides con actividades farmacológicas como la atropina, colina y muscarina.

Como se puede ver en el apartado II.4.2 de Resultados, la colina y atropina estuvieron presentes en las hojas, raíces (la atropina por debajo de los límites de detección) y raíces transformadas de *C. sativa* a niveles cuantitativos. En estas raíces la capacidad de biosíntesis de colina fue considerablemente superior a la encontrada en las raíces y hojas de la planta (2 a 4 veces, respectivamente). Además, la presencia de la muscarina que pertenece, al igual que la colina, al grupo de las bases cuaternarias, fue también demostrada en las raíces transformadas de cáñamo. En lo que respecta a la atropina, las diferencias con las raíces no transformadas podían ser incluso mayores puesto que el límite de detección para este metabolito estaba por debajo de 1  $\mu\text{g}$  por g de peso seco en material de *C. sativa* (Wahby *et al.*, 2006). Así se puede deducir que los cambios genéticos engendrados por la transformación con

*A. rhizogenes* indujeron una mejora en la capacidad biosintética de los alcaloides, por lo menos aquellos considerados en el presente trabajo.

La colina ha sido previamente identificada en *C. sativa* en muestras heterogéneas de diferentes orígenes (Turner *et al.*, 1980), raíces (Mole y Turner, 1973) y suspensiones celulares (Veliky y Genest, 1972), sin haberse presentado datos cuantitativos. Por otra parte, basándose sobre estudios farmacológicos (Gill *et al.*, 1970), se sugirió la presencia de una sustancia atropínica y dos muscarínicas en tinturas de *C. sativa* procedentes de Pakistán. No obstante, no se publicaron datos adicionales relacionados con ello. En el presente trabajo, las concentraciones de colina determinadas en las raíces transformadas de *C. sativa* son similares a aquellas previamente mencionadas en varias plantas medicinales Europeas (Wake *et al.*, 2000), *Dioscorea opposita* [Thunb] (Zhang *et al.*, 2004) y *Brassica oleracea* L. (Sárdi y Tordai, 2005). A nuestro conocimiento, no existen datos de la concentración de colina en las raíces transformadas. En cambio, las concentraciones de atropina encontradas en nuestro estudio fueron entre 2 a 3 ordenes de magnitud inferiores a aquellas halladas en cultivos de raíces transformadas de *Atropa belladonna* (Kamada *et al.*, 1986), en plantas de *Hyoscyamus muticus* (Eeva *et al.*, 1998) y *Flos daturae* (Ye *et al.*, 2001).

A partir de los resultados obtenidos se puede deducir igualmente que el genotipo de la planta y la cepa bacteriana utilizada para la inducción de las raíces representaron factores importantes en la variabilidad observada entre las líneas de raíces en términos de productividad. El fenotipo de las plantas también contribuyó en esta variabilidad siendo las líneas de raíces procedentes de cultivares de cáñamo industrial significativamente más productivas de ambos alcaloides con respecto a las accesiones de droga. No obstante, la morfología de las raíces parece ser el factor que más afectó a la biosíntesis de estos alcaloides siendo las líneas con morfología gruesa las menos productivas. (Tabla, 28). En algunos trabajos realizados sobre otras especies como *Catharanthus roseus* (Palazón *et al.*, 1998), *Nicotiana tabacum* (Palazón *et al.*, 1997b) y algunas especies de *Solanáceas* (Moyano *et al.*, 1999), se ha visto que la morfología de las raíces transformadas puede ser un buen criterio para la

selección de líneas de raíces con alta productividad de alcaloides. De acuerdo con ello, en nuestras líneas de raíces transformadas la morfología fue un importante factor en la determinación de la productividad, aun que en algunas líneas de raíces con morfología gruesa, el alto potencial de crecimiento podría remediar a su baja productividad de alcaloides.

Junto a los factores previamente citados como la morfología de las raíces y el fenotipo de la planta madre, otros de tipo fisiológico pueden estar relacionados con la producción de alcaloides en las raíces transformadas como la actividad de la enzima nitrato reductasa NR siendo la enzima clave del metabolismo nitrogenado (Tischner, 2000). Asimismo la actividad NR en las raíces transformadas de *C. sativa* mostró estar influida por la morfología y el fenotipo de las mismas, con niveles notablemente mayores en comparación con las raíces no transformadas. Lo que podría estar debido, por una parte a una aceleración del metabolismo nitrogenado en las raíces transformadas como consecuencia de la transformación, y por otra, a la alta concentración del sustrato disponible (nitrato) en el medio usado para el cultivo de las líneas de raíces transformadas ( $\text{NO}_3^-$  39.5 mM en medio MS) en comparación con la solución nutritiva ( $\text{NO}_3^-$  5 mM) empleada durante el crecimiento de las raíces no transformadas, usadas como control. La poca información bibliográfica que hemos podido encontrar en relación con la actividad NR en las raíces transformadas nos permitió ver que en raíces transformadas de cáñamo la actividad NR fue notablemente más alta (alcanzando  $1.01 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) con respecto a los valores encontrados en material parecido de *Datura stramonium* ( $0.15 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) (Sikuli y Demeyer, 1997), donde no se encontró correlación entre la actividad NR y la concentración de alcaloides. En cuanto se refiere a nuestro estudio, la actividad NR mostró estar positivamente correlada con la producción de colina sin poder apreciar ninguna correlación significativa con la biosíntesis de atropina.

Por otra parte, hemos procedido a la evaluación de la producción de etileno en las líneas de raíces transformadas con el fin de ver su relación con la producción de alcaloides en este material. Así, con respecto a las raíces normales, los niveles de etileno encontrados en las raíces transformadas fueron significativamente menores.

Lo que podría ser otro aspecto de la alteración del balance hormonal causado por la expresión del T-DNA en el tejido transformado. Palazón *et al.* (1998), trabajando con raíces transformadas de *Catharantus roseus*, encontraron una significativa relación entre la morfología de las raíces y los niveles de etileno encontrados en ellas. No obstante, en nuestros experimentos esta relación no ha sido apreciada. Por otra parte, varios trabajos hablaron del papel importante del etileno en el metabolismo secundario de las plantas. Asimismo, en cultivos celulares de *Vitis vinifera* (Chung *et al.*, 2001; El-kereamy *et al.*, 2003) y *Taxus chinensis* (Pan *et al.*, 2000) anotaron una relación positiva entre la producción de etileno y la síntesis de metabolitos secundarios. Mientras que en otros casos, se registró una relación inversa entre los niveles de etileno y la concentración de compuestos secundarios como en el caso de cultivos celulares de *Vaccinium pahalae* (Shibli *et al.*, 1997), *Catharantus roseus* (Lee y Shuler, 1991; Schlatmann *et al.*, 1993) y raíces transformadas de *Salvia miltiorrhiza* (Zhang *et al.*, 2004) y *Brugmansia candida* (Pitta-Álvarez *et al.*, 2000). Otros autores no apreciaron ninguna relación entre la producción etileno y la biosíntesis de alcaloides en cultivos celulares de *Eschscholtzia ssp.* (Piatti *et al.*, 1991) y *Papaver somniferum* (Songstad *et al.*, 1989), como es el caso de nuestro presente estudio donde el etileno no parece estar relacionado con la producción de alcaloides en raíces transformadas de *C. sativa*.

El efecto de la elicitación sobre la biosíntesis de alcaloides en las raíces transformadas de cáñamo fue igualmente investigado. Así, como se puede ver en los resultados obtenidos (Figura,38), las raíces mostraron una buena habilidad para incrementar los niveles de los alcaloides estudiados tras la adición de elicitores. El metiljasmonato (MeJa), como elicitor abiótico, y el filtrado de medio (FM) de *Fusarium oxysporum*, como elicitor biótico, se eligieron para elicitar dos líneas de raíces, seleccionadas por su alto contenido en alcaloides, durante un periodo de 4 días aplicando los tratamientos al final de la fase de crecimiento linear. En la bibliografía se ha descrito que ambos elicitores han sido usados para incrementar la producción de alcaloides, incluyendo los tropánicos, junto con otros metabolitos secundarios en las raíces transformadas de muchas especies (Gundlach *et al.*, 1992; Zabetakis *et al.*, 1999; Bais *et al.*, 2000; Stojakowska *et al.*, 2002; Palazón *et al.*,

2003; Suresh *et al.*, 2004; Savitha *et al.*, 2005). En estos trabajos, se relataron efectos estimulantes o, al contrario, perjudiciales sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios dependiendo de la especie vegetal, del hongo utilizado, concentración del elicitor y del estadio de crecimiento en el cual se aplican los tratamientos de elicitación.

En los experimentos llevados a cabo durante el presente trabajo, ninguno de los elicitores probados afectó el crecimiento de las raíces transformadas de *C. sativa*, por ello, no se observó el efecto negativo que ha tenido el MeJa sobre el crecimiento de las raíces transformadas de otras especies (Suresh *et al.*, 2004; Savitha *et al.*, 2005). Esto se podría explicarse, al menos parcialmente, con la aplicación del tratamiento de elicitación en la fase de crecimiento ralentizado, clásicamente asociada con la producción de metabolitos secundarios, cuando la biomasa máxima ya se había alcanzado. Constataciones parecidas fueron obtenidas en raíces transformadas de *Panax ginseng* (Palazón *et al.*, 2003) y *Solanum tuberosum* (Komaraiah *et al.*, 2003).

Los dos elicitores ensayados provocaron un aumento del contenido de colina en las dos líneas de raíces siguiendo patrones parecidos, pero con efectividad variable según la línea (Figura, 38) siendo la línea menos productiva (comparando las raíces no elicidadas) la que mostró mayor respuesta a la elicitación. Holden *et al.* (1988) encontró que diferentes líneas celulares responden de distintas maneras a un tratamiento de elicitación. De ello, la variabilidad observada en la respuesta de las líneas de raíces transformadas a los elicitores ensayados podría explicarse con el origen clónico de cada línea de raíces (Tempé y Casse-Delbart, 1989). Finalmente, es de suma importancia mencionar que los niveles de colina obtenidos con los tratamientos de elicitación ensayados superaron considerablemente el contenido mencionado en muchas plantas medicinales (Wake *et al.*, 2000).

Al igual que la colina, los niveles de atropina alcanzados con los dos elicitores fueron notablemente superiores en ambas líneas con respecto a los controles (607 y 688 veces con MeJa y 345 y 198 veces con FM en la máxima

estimulación obtenida en las líneas C1801 y CABC respectivamente). Estas líneas respondieron de manera diferente a cada elicitor, mostrando la línea CABC mayor sensibilidad a los tratamientos visto que se obtuvieron respuestas elevadas con bajas concentraciones de elicitores (Figura, 38). La línea C1801 mostró tener niveles de atropina parecidos (2698 y 2622  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  PS) y hasta dos veces más altos (1486 y 730  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  PS) con respecto a la línea CABC con el MeJa y el FM respectivamente. No obstante, requirió mayores concentraciones de ambos elicitores para ello. Debería destacarse el hecho de que el contenido de atropina encontrado en las raíces transformadas de *C. sativa* en nuestras condiciones de elicitación, fue similar al encontrado, por otros autores, en raíces transformadas y no transformadas de *Atropa belladonna* (Kamada *et al.*, 1986) y extractos vegetales de *Hyoscyamus muticus* (Eeva *et al.*, 1998) y *Flos Daturae* (Ye *et al.*, 2001).

Así, como se indicó anteriormente, ninguno de los tratamientos de elicitación empleados afectó el crecimiento de las raíces en los cultivos llevados a cabo en el presente trabajo, descartando la posibilidad de que el cambio en el contenido de alcaloides podría ser el resultado de a una fototoxicidad inespecífica. Generalmente, la respuesta de las raíces transformadas de *C. sativa* a los tratamientos de elicitación aplicados dependió más de la concentración que del tipo de elicitor elegido, no notándose diferencias apreciables entre los niveles de alcaloides alcanzados usando el MeJa o el FM de *F. oxysporum*. Cabe mencionar que otros trabajos realizados, previamente sobre otras plantas, demostraron que la elicitación con hongos induce la producción de MeJa (Reinbothe *et al.*, 1994; Szabo *et al.*, 1999) lo que justificaría probablemente los resultados obtenidos.

Como se indicó con anterioridad, y según nuestros conocimientos, no existen, hasta la fecha, datos cuantitativos sobre los alcaloides en *C. sativa*. Hemos constatado que alcaloides con importantes aplicaciones farmacológicas como la colina, atropina y muscarina están presentes a niveles cuantitativos en germoplasmas de *C. sativa* y que podrían incrementarse, mediante procesos biotecnológicos, a niveles superiores (colina) o similares (atropina) a aquellos encontrados en las fuentes naturales frecuentemente usadas. La contribución de compuestos, otros que



los cannabinoides, en la actividad de la planta de *Cannabis* ha sido previamente sugerida por diversos autores (Yamamoto *et al.*, 1988; Yamamoto *et al.*, 1991; Williamson y Evans, 2000). Por lo que la determinación de colina, atropina y muscarina en *C. sativa* apunta a su posible implicación en la fitotoxicidad de la planta. Del mismo modo, cabe destacar que estos compuestos fueron hallados a niveles parecidos e incluso mayores en los cultivares de cáñamo industrial con respecto a los genotipos de droga.

### **Transformación genética y regeneración *in vitro***

Como otro objetivo del presente trabajo, se abordó la posibilidad de regeneración a partir de las raíces transformadas usando varias combinaciones y concentraciones de fitohormonas. Asimismo, en presencia de BA y ANA (Tabla 30) se notó una alta capacidad de callogénesis en este material, alcanzando el 100% en la mayoría de los medios usados. Desafortunadamente la excesiva friabilidad de los callos y la expresión de la “Memoria hairy root” notadas en la mayoría de los callos inducidos a partir de raíces transformadas apuntan a un desequilibrio hormonal en estos callos, probablemente debido a la transformación. Por lo que la variación de las concentraciones de BA y ANA en el medio no mejoró significativamente la calidad de los callos obtenidos. A partir de allí se incorporaron al medio de cultivo otras fitohormonas conocidas por su efecto inhibitorio sobre la rizogénesis.

Existen evidencias de que el 2,4-D inhibe la formación de raíces en callos y explantos no transformados de *C. sativa* (Hemphill *et al.*, 1978; Mandolino y Ranalli, 1999; Feeney y Punja, 2003) al igual que en otras especies vegetales. De acuerdo con ello, hemos constatado que la presencia de esta auxina suprimo totalmente la expresión de la “Memoria hairy root” en los callos transformados pero bajó drásticamente la calidad de los mismos. Por otra parte Jasik *et al.* (1997) notaron que el uso de la kinetina bloqueó la formación de raíces en tejidos transformados, llevando los genes *rolABC*, de *Solanum aviculare*. No obstante, el uso de esta

citoquinina, en nuestros experimentos, no afectó el desarrollo de la “Memoria hairy root” notada en los callos regenerados en nuestros experimentos.

En tejidos transformados de tabaco que expresan el *rolB*, se constató un incremento significativo en los niveles de auxinas endógenas por varios autores (Nilsson *et al.*, 1993; Schmölling *et al.*, 1993). Todo esto podría explicar, tal vez, la formación de algunas raíces en los tejidos transformados en ausencia de auxinas exógenas pero no justifica la excesiva expresión de la “Memoria hairy root” en la mayoría de los callos obtenidos a lo largo del presente estudio. Otros estudios habían sugerido que los efectos morfogénicos de la expresión del *rolB* se deben a una alta sensibilidad de las células transformadas a las auxinas debido a alteraciones en la ruta de percepción y transducción de dichas hormonas (Delbarre *et al.*, 1994; Maurel *et al.*, 1994). Asimismo, para estudiar posibles alteraciones en los receptores de auxinas en callos transformados de cáñamo hemos usado el antiauxinas PCIB que actúa compitiendo con las auxinas para sus receptores (De Klerk *et al.*, 1995). Resultado de ello, hemos constatado que la presencia de bajas y moderadas concentraciones de PCIB (10, 40, 70  $\mu\text{M}$ ) no afecta la rizogénesis mientras que en altas concentraciones (100 $\mu\text{M}$ ) una importante limitación de la incidencia de la “Memoria hairy root” pudo ser obtenida al igual que el número de rizoides formados en cada callo (Tabla 31). No obstante, y de forma paralela a ello, la calidad de los callos fue drásticamente afectada obteniendo callos de color marrón y friabilidad acentuada. Este efecto débil del PCIB sobre la rizogénesis fue previamente notado en tejidos de *Solanum aviculare* que expresan los genes *rolABC* (Jasik *et al.*, 1997).

Cabe mencionar que pese al problema de la “Memoria hairy root” expresada en los callos regenerados a partir de raíces transformadas, se ha podido obtener hasta un 75% (medio n° 3, Tabla 30) de callos transformados que escaparon a este fenómeno y que siguieron creciendo durante todo el periodo experimental. Estos callos presentaron las características típicas de los callos caulogénicos (callos friables con áreas verdes compactas como signo del desarrollo de yemas) descritas en *C. sativa* (Mandolino y Ranalli, 1999) y *H. lupulus* (Batista *et al.*, 1996; Gurriarán *et al.*, 1999). No obstante, no se observó durante el periodo de cultivo considerado (más

de 4 meses), regeneración de parte aérea en estos callos. Finalmente, y pese a la resistencia de estos callos a la regeneración, es la primera vez que se consiguen, en cáñamo, callos transformados con *A. rhizogenes* y que muestran además buen crecimiento y adecuada calidad. Por otra parte, el uso de líneas de raíces previamente establecidas para la obtención de callos transformados tiene la ventaja, entre otras, de evitar el efecto nefasto que pueden tener los agentes de selección, principalmente los antibióticos, sobre los tejidos cultivados *in vitro* como ha sido previamente observado en diversas especies (Pollock *et al.*, 1983; Holford y Newbury, 1992; Lin *et al.*, 1995).

Frente a la dificultad de regenerar a partir de callos transformados con el Ri debido a la expresión de la “Memoria hairy root”, como consecuencia de la presencia de los genes *rol* en los callos transformados, se recurrió a la obtención de callos transformados con una cepa desarmada de *A. tumefaciens* siguiendo el protocolo optimizado para la transformación de *Humulus lupulus*, *Cannabaceae* (Horlemann *et al.*, 2003). El otro motivo de la elección de este protocolo fue el uso del TDZ que es una citoquinina conocida por su promoción de la regeneración en el lúpulo (Huetteman y Preece, 1993; Murthy *et al.*, 1998). Así pues, hemos obtenido un porcentaje de transformación que alcanzó el 63% superando de esta forma la frecuencia de transformación (31.2%) obtenida por Feeney y Punja (2003) que obtuvieron callos a partir de suspensiones celulares transformadas con *A. tumefaciens*. Los callos transformados obtenidos en el presente trabajo se caracterizaron por su alta friabilidad, color verde claro y ausencia de todo tipo de organogénesis tanto tratándose de raíces como de tallos lo que podría estar debido a un efecto inhibitor del TDZ sobre la organogénesis.

Vistas todas las dificultades previamente comentadas se presentó la necesidad de evaluar la capacidad de regeneración de los mismos tejidos usados para la obtención de callos transformados, esto es explantos de raíz y de hipocotilo no transformados. Estos tejidos mostraron una alta tendencia callogénica (número de explantos cultivados que desarrollan callos) que superó el 90% en la mayoría de los medios ensayados después de 2 semanas de cultivo de acuerdo con constataciones

previas relatadas en varios trabajos realizados sobre *C. sativa* (Zottini *et al.*, 1996; Mandolino y Ranalli, 1999). Los callos formados tuvieron un tamaño mínimo de 1 cm y alcanzaron hasta 3 cm en muchos medios al cabo de 4 semanas de cultivo. En la bibliografía el único dato cuantitativo del tamaño de los callos de *C. sativa* hace referencia a callos de 6.8 a 7.8 mm (Feeney y Punja, 2003).

La tendencia rizogénica de los callos de *C. sativa* descrita por varios autores (Hemphill *et al.*, 1978; Fisse *et al.*, 1981; Feeney y Punja, 2003) se notó únicamente en los medios nº 8-11 (Tabla 34) siendo inhibida por el 2,4-D como fue previamente comentado en los escasos trabajos realizados sobre esta planta (Hemphill *et al.*, 1978; Feeney y Punja, 2003). Esta auxina mostró también tener un efecto positivo sobre la caulogénesis en callos inducidos a partir de hojas de *C. sativa* (Mandolino y Ranalli, 1999; Ślusarkiewicz-Jarzina *et al.*, 2005). No obstante, a las concentraciones de 2,4-D usadas en el presente trabajo no se consiguió la inducción de tallos de acuerdo con los resultados notados en otros sistemas de cultivo de *C. sativa* (suspensiones celulares), donde se sugirió que el 2,4-D alteró el mecanismo genético de la organogénesis (Veliky y Genest, 1972; Hemphill *et al.*, 1978). Además la posible contribución del 2,4-D en la formación de anomalías a nivel cromosómico, previamente mencionada (Singh y Harvey, 1975), podría explicar los resultados obtenidos. Por otra parte, el efecto positivo del TDZ sobre la caulogénesis junto con su acción inhibitoria de la rizogénesis fueron previamente mostrados en explantos de *Humulus lupulus* (Gurriarán *et al.*, 1999; Horlenmann *et al.*, 2003). En nuestros experimentos, la presencia de esta citoquinina en el medio de regeneración (medio nº 14, Tabla 34) generó callos grandes, friables y clorofilicos tanto en explantos de hipocotilo como de raíz, sin llegar a formarse ningún tipo de órganos (tallos o raíces) en los callos formados.

Contrariamente a lo que se describió en trabajos anteriores de callogénesis en cáñamo (Fisse *et al.*, 1981; Mandolino y Ranalli, 1999), en el presente estudio los callos desarrollados a partir de explantos de raíz mostraron una calidad comparable a aquellos procedentes de hipocotilo en términos de tamaño, color, peso y consistencia (Figura 52). La única diferencia a resaltar fue que en los medios donde se formaron

callos organogénicos (medios n° 8-11, Tabla 34) los callos originarios de raíz mostraron porcentajes de rizogénesis (número de callos que desarrollan raíces) significativamente mayores con respecto a los callos formados a partir de hipocotilo, lo que podría explicarse con un mayor contenido de auxinas en los callos originarios de raíces.

En los trabajos existentes referentes a la regeneración en *C. sativa*, la caulogénesis ha sido calificada como imposible en varias ocasiones (Veliky y Genest; Hemphill *et al.*, 1978; Fenney y Punja, 2003), ocasional (Mandolino y Ranalli, 1999) o difícilmente asequible (Ślusarkiewicz-Jarzina *et al.*, 2005). En el presente estudio, pese al bajo porcentaje de callos caulogénicos obtenidos (5%), este resultado representa, a nuestro conocimiento, el mayor porcentaje de regeneración alcanzado con resultados cuantitativos y reproducibles. El único dato cuantitativo encontrado en la bibliografía sobre la caulogénesis en *C. sativa* habla de un porcentaje de regeneración del 1.4% (Ślusarkiewicz-Jarzina *et al.*, 2005). Por otra parte, en *Humulus lupulus* (especia de la misma familia que *C. sativa*) sólo se consiguió regenerar plántulas en un 3.3% de los callos (Gurriarán *et al.*, 1999) lo que apunta a una posible resistencia de ambos géneros a la formación *de novo* de tallos. Cabe señalar que un alto número de callos no llegó a desarrollar tallos a pesar de tener la apariencia típica de los callos caulogénicos (callos friables con áreas verdes compactas como signo del desarrollo de yemas) descrita en *C. sativa* (Mandolino y Ranalli, 1999) y *H. lupulus* (Batista *et al.*, 1996; Gurriarán *et al.*, 1999). En los callos caulogénicos obtenidos en nuestros experimentos, la formación de tallo empieza con el desarrollo de callos friables con zonas compactas de color verde donde ocurre la aparición de yemas, de la misma forma descrita previamente por Mandolino y Ranalli (1999). Los tallos formados se desarrollaron a razón de 1 a 2 tallos por callo durante de la tercera semana de cultivo. En el trabajo de Ślusarkiewicz-Jarzina *et al.* (2005) el periodo requerido para la aparición de yemas fue más largo (6 semanas). Cuando se separaron los tallos neo-formados de los callos y se subcultivaron a medio de elongación, no se notó el desarrollo de nuevas yemas en los callos, contrariamente a lo que se describió en callos caulogénicos de *Humulus lupulus* (Gurriarán *et al.*, 1999).

La hiperhidricidad denominada también vitrificación, translucidez, transformación hiperhídrica o vitrosidad representa uno de los mayores problemas de la regeneración *in vitro*, causando la aparición de características atípicas de las plantas a nivel anatómico, morfológico y fisiológico (George *et al.*, 1996). La característica principal de las plantas vitrificadas es la enorme cantidad de agua en los tejidos de las hojas y tallos y que puede estar debida a varios factores como la saturación del vapor de agua y la acumulación de etileno y CO<sub>2</sub> en los recipientes de cultivo sellados, a la propia composición del medio de cultivo o una baja concentración de agar en el mismo (Aitken *et al.*, 1981; Debergh y Maene, 1981; George *et al.*, 1996). Este fenómeno se produjo con una frecuencia del 30% en las condiciones de cultivo usadas en el presente trabajo notando la muerte de las plántulas vitrificadas en las condiciones *ex vitro*, tal y como fue observado previamente por George *et al.* (1996).

Como se sabe, la aclimatación consiste en el restablecimiento en el invernadero de las plántulas cultivadas *in vitro*. Desafortunadamente, un gran número de plantas micropropagadas no sobrevive el paso desde el cultivo *in vitro* a condiciones *ex vitro*, invernadero o campo debido a su desarrollo en un único microambiente casi óptimo para el crecimiento durante su cultivo *in vitro*. De acuerdo con ello, solo un 63% de plantas de *Cannabis sativa* se desarrollaron exitosamente y sobrevivieron en las condiciones de aclimatación diseñadas en estos experimentos. En estas plantas las principales variaciones fenotípicas con respecto a las plantas cultivadas *in vivo* afectaron el tamaño general de planta (tamaño y número de entrenudos y hojas) resultando en plantas con un tamaño máximo de 4 cm, lo que podría estar debido a un tardío traspaso de las plántulas a las condiciones *ex vitro*.

Por último hay que mencionar que en cáñamo no se observó organogénesis directa en ninguno de los tratamientos ensayados de acuerdo con las constataciones existentes (Fisse *et al.*, 1981; Mandolino y Ranalli, 1999). A partir de nuestros experimentos pese al éxito y reproducibilidad del protocolo de regeneración y de acuerdo con los pocos trabajos publicados sobre la regeneración *in vitro* de *C. sativa*,

se puede ver que la capacidad de regeneración de esta planta es muy limitada lo que implica la necesidad de mejorar el protocolo y probar, probablemente, otras combinaciones hormonales para incrementar la eficiencia de la regeneración.

**Capítulo 6**

**CONCLUSIONES**





1.- *Cannabis sativa* ha mostrado una respuesta adecuada a *Agrobacterium rhizogenes* y *A. tumefaciens* en todas las combinaciones genotipo/cepa ensayadas. Dicha respuesta se vio notablemente influida por la cepa usada para la infección, genotipo a infectar y tejido inoculado. Este último tuvo un efecto determinante sobre la respuesta.

2.- Se ha establecido un gran número de líneas de raíces transformadas con diferentes procedencias (genotipo de *C. sativa*/cepa de *A. rhizogenes*) que mostraron una alta variabilidad en cuanto a morfología y potencial de crecimiento. Estas raíces, en las condiciones de cultivo óptimas, mostraron un apreciable crecimiento, con elevados índices de crecimiento y alta estabilidad fenotípica.

3.- \* Se determinó, mediante la metodología de separación y caracterización usada, la presencia de colina, atropina y muscarina en las raíces transformadas. Los niveles encontrados fueron superiores que en hojas y raíces de la planta para la colina y parecidos a los encontrados en hojas para la atropina, que no se detectó en las raíces normales.

\* Los tratamientos de elicitación empleados (metiljasmonato y *Fusarium oxysporum*) a las concentraciones aplicadas resultaron en incrementos apreciables en los niveles de alcaloides en las raíces transformadas, principalmente en caso de la atropina.

\* Compuestos específicos de la planta de *C. sativa* como los cannabinoides (tetrahidrocannabinol, cannabidiol y cannabinol) no se han encontrado en las raíces transformadas por la metodología y líneas de raíces empleadas.

4.- Los tejidos de *C. sativa* transformados con *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens* mostraron una alta aptitud a formar callos con crecimiento apreciable. No obstante, a parte de la tendencia rizogénica que han mostrado los callos regenerados a partir de raíces transformadas, no ha sido posible regenerar plantas a partir de este material.

5.- A partir de tejidos no transformados de *C. sativa* se ha conseguido por primera vez regenerar plantas, que además fueron viables y tuvieron un patrón de crecimiento parecido a las plantas cultivadas en macetas. No obstante, debido al bajo porcentaje de regeneración obtenido, *C. sativa* sigue caracterizándose como especie recalcitrante a las técnicas *in vitro*.

**Capítulo 7**

**BIBLIOGRAFÍA**

**Abeles, F.B.; Morgan, P.W. y Saltveit, M.E.Jr. (1992)** Ethylene in plant biology (segunda ed.). Academic Press, New York. pp. 414.

**Abuodeh, R.O.; Orbach, M.J.; Mandel, M.A.; Das, A. y Galgiani, J.N. (2000)** Genetic transformation of *Coccidiodes immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. J. Infect. Dis. **181**: 2106-2110.

**Aird, E.L.H.; Hamill, J.D. y Rhodes, M.J.C. (1988)** Cytogenetic analysis of hairy root cultures from a number of plant species transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. **15**: 47-57.

**Aitken, S.; Horgan, K.J. y Thorpe, T.A. (1981)** Influence of explant selection on shoot forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*. Can. J. For. Res. **11**: 112-117.

**Akiyoshi, D.E., Morris, R.O.; Hinz, R.; Mischke, P.S.; Kosuge, T.; Garfinkel, D.J.; Gordon, M.P. y Nester, E.W. (1983)** Cytokinin/auxin balance in crown gall tumors is regulated by specific loci in the T-DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **80**: 407-411.

**Akiyoshi, D.E.; Klee, H.; Amasino, R.M., Nester, E.W. y Gordon, M.P. (1984)** T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **81**: 5994-8.

**Alfermann, A.W. y Peterson, M. (1995)** Natural products formation by plant cell biotechnology. Plant Cell Tissue Org. Cult. **43**: 199-205.

**Altabella, T.; Angel, E.; Biondi, S.; Palazon, J.; Bagni, N. y Piñol, M.T. (1995)** Effect of the *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* on polyamine metabolism in tobacco roots. Physiol. Plant. **95**: 479-485.

**Alt-Mörbe, J.; Kuhlmann, H. y Schroder J. (1989)** Differences in induction of Ti plasmid virulence gene *virG* and *virD* and continued control of *virD* expression by four external factors. Mol. Plant-Microbe Int. **2**: 301-308.

**Amselem, J. y Tepfer, M. (1992)** Molecular basis for novel root phenotypes induced by *Agrobacterium rhizogenes* A4 on cucumber. Plant Mol. Biol. **19**: 421-432.

- Ankenbauer, R.G. y Nester, E.W. (1990)** Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes: Structural specificity and activities of monosaccharides. *J. Bacteriol.* **172**: 6442-6446.
- Aoki, T.; Matsumoto, H.; Asako, Y.; Matsunaga, Y. y Shimomura, K. (1997)** Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy roots and regenerated plants of *Atropa belladonna* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* 15834. *Plant Cell Rep.* **16**: 282-286.
- Arellano, J.; Vásquez, F.; Villegas, T. y Hernández, G. (1996)** Establishment of transformed root cultures of *Perezia cuernavacana* producing the sesquiterpene quinone perezone. *Plant Cell Rep.* **15**: 455-458.
- Asada, Y.; Li, W. y Yoshikawa, T. (1998)** Isoprenylated flavonoids from hairy root cultures of *Glycyrrhiza glabra*. *Phytochemistry* **47**: 389-392.
- Bais, H.P.; Madhusudhan, R.; Bhagyalakshmi, N; Rajashekaran, T.; Ramesh, B.S. y Ravishankar, G.A. (2000)** Influence of polyamines on growth and transformation of secondary metabolites in hairy root cultures of *Beta vulgaris* and *Tagetes patula*. *Acta Pysiol. Plant* **22**: 151-158.
- Bais, H.P.; Walker, T.S.; Schweizer, H.P. y Vivanco, J.M. (2002)** Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 983-995.
- Bais, H.P.; Vepachedu, R. y Vivanco, J.M. (2003)** Root specific elicitation and exudation of fluorescent [beta]-carbolines in transformed root cultures of *Oxalis tuberosa*. *Plant Physiol. Biochem.* **41**: 345-353.
- Bakkali, A.T.; Jaziri, M.; Foriers, A.; Vanderheyden, Y.; Vanhaelen, N. y Homès, J. (1997)** Lawsonic acid accumulation in normal and transformed cultures of henna, *Lawsonia inermis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **51**: 83-87.
- Balandrin, M.J. y Klocke, J.A. (1988)** Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. En: *Biotechnology in agriculture and forestry. Medicinal and aromatic plant*. Bajaj YPJ (ed.) vol. 4. Berlin: Springer-Verlag, pp. 1-36.
- Barry, G.F.; Rogers, S.G.; Fraley, R.T. y Bry, L. (1984)** Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **81**: 4776-80.
- Barz, W.H. y Oksman-Caldentey, K.M. (2002)** Plant Biotechnology- An emerging field. En: *Plant Biotechnology and Transgenic Plants*. K.M. Oksman-Caldentey and W.H. Barz (eds.), Marcel Dekker, New York. pp. 1-21.
- Batista, D.; Sousa, M.J. y Pais, M.S. (1996)** Plant regeneration from stem and petiole-derived callus of *Humulus lupulus* (hop) clone Bragança and var. Brewers Gold. *In Vitro cell Dev. Biol. Plant* **32**: 37-41.

- Bensaddek, L.; Gillet, F.; Saucedo, J.E.N. y Fliniaux, M.A. (2001)** The effect of nitrate and ammonium concentration on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. *J. Biotechnol.* **85**: 35-40.
- Bercetche, J.; Chriqui, D.; Adam, S. y David, C. (1987)** Morphogenetic and cellular reorientations induced by *Agrobacterium rhizogenes* (strains 1855, 2659 y 8196) on carrot, pea and tobacco. *Plant Sci.* **52**: 195-210.
- Bergmann, B.A.; Lin, X. y Whetten, R. (2004)** Susceptibility of *Paulownia elongata* to *Agrobacterium* and production of transgenic calli and hairy roots by *in vitro* inoculation. *Plant cell Tiss. Org. Cult.* **55(1)**: 45-541
- Binns, A.N. y Thomashow, M.F. (1988)** Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Ann. Rev. Microb.* **42**: 575-606.
- Bligny, R.; Foray, M.F.; Roby, C y Douce, R. (1989)** Transport and phosphorylation of choline in higher plant cells. *J. Biol. Chem.* **264**: 4888-4895.
- Bócsa, I. y Karus, M. (1997)** Der Hanfanbau-Botanik, Sorten, Anbau und Ernte. [Hemp cultivation-botany, varieties and harvested] C.F. Muller, Heidelberg, Germany.
- Bohm, H. y Rink, E. (1988)** Betalaines. En: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Constabel F, Vasil I (eds.) vol.5. New York: Academic Press, pp. 449-463.
- Bollinger, H. y Eugster, C.H. (1971)** Detection of (+)-epi-muscarine in *Inocybe geophylla*. *Helv. Chim. Acta* **54**: 1332-1335.
- Bolton, G.W.; Nester, E.W. y Gordon, M.P. (1986)** Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. *Science* **232**: 983-985.
- Bond, J.A.; McDonnell, R.E. y Gresshoff, P.M. (1996)** Susceptibility of Nodulation Mutants of Soybean (*Glycine max*) to *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Plant. Physiol.* **148**: 684-692.
- Bourgaud, F.; Bouque, V.; Gontier, E y Guckert, A. (1997)** Hairy root culture for the production of secondary metabolites. *AgBiotech News Inform.* **9(10)**: 205-208.
- Braemer, R.; y Paris, M. (1987)** Biotransformation of cannabinoids by a cell suspension culture of *Cannabis sativa* L. *Plant Cell Rep.* **6**: 150-152.
- Bredemann, G.; Schwanitz, Fr. y Von Sengbusch, R. (1957)** Aufgaben und Möglichkeiten der modernen Hanfzüchtung mit besonderer Berücksichtigung des Problems der züchtung haschischer oder -freier Hanfsorten. *Technical Bulletin, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Hamburg-Volksdorf* **4**: 1-15.

- Buchmann, I.; Marner, F.J.; Schröder, G.; Waffenschmidt, S. y Schröder, S. (1985)** Tumor genes in plants: T-DNA encoded cytokinin biosynthesis. *EMBO J.* **4**: 853-859.
- Bundock, P.A.; den Dulk-Ras, A.; Beijersbergen, A. y Hooykaas, P.J.J. (1995)** Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**: 3206-3214.
- Caba, J.M.; Lluck, C.; Hervás, A. y Ligeró, F. (1990)** Nitrate metabolism in roots and nodules of *Vicia faba* in response to exogenous nitrate. *Physiol. Plant.* **79**: 531-539.
- Caba, J.M.; Lluck, C.; Hervás, A. y Ligeró, F. (1991)** Acumulación de nitratos y actividad nitrato reductasa en diferentes cultivares de *Vicia faba* L. *Suelo y Planta* **1**: 105-116.
- Caba, J.M.; Poveda, J.L.; Gresshoff, P.M. y Ligeró, F. (1999)** Differential sensitivity of nodulation to ethylene in soybean cv. Bragg and a supernodulation mutant. *New Phytol.* **142**: 233-242.
- Calabresi, P.; Centonze, D.; Pisani, A.; Sencenario, G.; Alan North, R. y Bernardi, G. (1998)** Muscarinic IPSP<sub>s</sub> in rat striatal cholinergic interneurons. *J. Physiol.* **510(2)**: 421-427.
- Capone, I.; Spano, L.; Cardarelli, M.; Bellicampi, D.; Petit, A. y Costantino, P. (1989)** Induction and growth properties of carrot roots with different complements of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant Mol. Biol.* **13**: 43-52.
- Cardarelli, M.; Mariotti, D.; Pomponi, M.; Spano, L.; Capone, I. y Costantino, P. (1987)** *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 475-480.
- Celma, C.R.; Palazón, J.; Cusidó, R.M.; Piñol, M.T. y Keil, M. (2000)** decreased scopolamine yield in field-grown *Duboisia* plants regenerated from hairy roots. *Planta Med.* **67**: 249-253.
- Chen, H.; Chena, F.; Chiu, F.C. y Lo, M.C. (2001)** The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Enzyme Microb. Technol.* **28**: 100-105.
- Cherniak, L. (1982)** The great books of Cannabis. Vol. I: Book II. Cherniak/Damele Publishing Co., Oakland, CA, USA, pp. 207.
- Chilton, M.D.; Drummond, M.H.; Merlo, D.J.; Sciaky, D.; Montoya, A.L.; Gordon, M.P. y Nester, E.W. (1977)** Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* **11**:263–271



- Chilton, M.D.; Tepfer, D.A.; Petit, A.; David, C.; Casse-Delbart, F. y Tempe, J. (1982)** *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells. *Nature* **295**:432-434.
- Choi, P.S.; Kim, Y.D.; Choi, K.M. y Chung, H.J. (2004)** Plant regeneration from hairy-root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.* **22**: 828-831.
- Chopra, R.K. (1983)** Effects of temperature on the *in vivo* assay of nitrate reductasa in some C3 and C4 species. *Ann. Bot.* **51**: 617-620.
- Chriqui, D.; David, C. y Adam, S. (1988)** Effect of differentiated or dedifferentiated state of tobacco pith tissue on its behaviour after inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* **7**: 111-114.
- Chriqui, D.; Adam, S.; Caissard, J.C.; Noin, M. y Azmi, A. (1991)** Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eucalyptus globulus* and *E. gunnii*. En: Symposium on intensive forestry: the role of Eucalypts, Proceedings, Vol. 1 (ed.) APG Schonau. pp. 70-80. IUFRO, Durhan, Sourth Africa.
- Chriqui, D.; Guivarc'h, A.; Dewitte, W.; Prinsen, Els. y Van Onkelen, H. (1996)** *Rol* genes and root initiation and development. *Plant and Soil* **187**: 47-55.
- Christey, M.C. (1997)** Transgenic crop plants using *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation, En: P.M. Doran (ed.), Hairy Roots: Culture and Applications. Harwood, Amsterdam, pp. 99-111.
- Chung, I.M.; Park, M.R.; Rehman, S. y Yun, S.J. (2001)** Tissue specific and inducible expression of resveratrol synthase gene in peanut plants. *Mol. Cell* **12**: 353-359.
- Ciau-Uitz, R.; Miranda-Ham, M.L.; Coello-Coello, J.; Chí, B.; Pacheco, L.M. y Loyola-Vargas, V.M. (1994)** Indole alkaloid production by transformed and non-transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* **30**: 84-88.
- Ciddi, V.; Srinivasan, V. y Shuler, M.L. (1995)** Elicitation of *Taxus* sp. cell cultures for production of taxol. *Biotechnol. Lett.* **17**: 1343-1346.
- Clarke, R.C. (1981)** Marijuana Botany. And/Or Press, Berkeley, CA. USA, 197pp.
- Clarke, R.C. (1997)** Hanf-Botanik, Anbau, Vermehrung und Züchtung. [Hemp-botany, cultivation, propagation y breeding.] AT, Aarau, Switzerland.
- Clemente, T. (2006)** Nicotiana (*Nicotiana tobacum*, *Nicotiana benthamiana*). *Methods Mol. Biol.* **343**: 143-154.

- Constabel, F. y Shyluk, J. (1994)** Initiation, nutrition, and maintenance of plant cell and tissue cultures. En: Plant Cell and Tissue Culture. I.K. Vasil and T.A. Thorpe (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 3-15.
- Costantino, P.; Mauro, M.L.; Micheli, G.; Risuleo, G.; Hooykaas, P.J.J. y Schilperoort, R. (1981)** Fingerprinting and sequence homology of plasmids from different virulent strains of *Agrobacterium rhizogenes*. Plasmid **5**: 170-182.
- Crawford, N.M. y Glass, A.D.M. (1998)** Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. Trends Plant Sci. **3**: 389-395.
- David, C.; Chilton, M.D. y Tempe, J. (1984)** Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures. Bio/Technology **2**:73-76.
- De Cleene, M. y De Ley, J. (1981)** The host range of infectious hairy- root. Bot. Rev. **47**: 147-194.
- De Groot, M.J.A.; Bundock, P.; Hooykaas, P.J.J. y Beijersbergen, A.G.M. (1998)** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nat. Biotechnol. **16**: 839-842.
- De Klerk, G.J. (1995)** Hormone requirement during the successive phases of rooting of *Malus* microcutting, En: M. Terzi, R. Cella and A. Falavigna (eds.), Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology. Kluwer, Dordrecht, pp. 111-116.
- De Meijer, E.P.M. y Van Soest, L.J.M. (1992)** The CPRO *Cannabis* germplasm collection. Euphytica **62**: 201-211.
- De Meijer, E.P.M.; Van der Kamp, H.J. y Van Eeuwijk, F.A. (1992)** Characterization of *Cannabis* accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters. Euphytica **62**: 187-200.
- De Meijer, E.P.M. (1994)** Variation of *Cannabis* with reference to stem quality for paper pulp production. Ind. crops Prod. **3**: 201-211.
- De Meijer E.P.M. y Keizer, L.C.P. (1994)** Variation of *Cannabis* for phenological development and stem elongation in relation to stem production. Field Crops Res. **38**: 37-46.
- De Meijer, E.P.M. (1995)** Fibre hemp cultivars: A survey of origin, ancestry, availability and brief agronomic characteristics. J. Int. Hemp Assoc. **2 (2)**: 66-73.
- De Meijer, E.P.M. y Keizer, L.C.P. (1996)** Patterns of diversity in *Cannabis*. Genet. Res. Crop Evol. **43**: 41-52.

- De Paolis, A.; Mauro, M.L.; Pomponi, M.; Cardarelli, M.; Spanò, L. y Costantino, P. (1985)** Localization of Agropine-Synthesizing Function in the TR - Region of the Root-Inducing Plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* 1855. Plasmid **13**: 1-7.
- De Zeeuw, R.A.; Wijsbek, J.; Breimer, D.D.; Vree, T.B.; Van Ginneken, C.A. y Van Rossum, J.M. (1972)** Cannabinoids with a propyl side chain in *Cannabis*. Occurrence and chromatographic behaviour. Science **175**: 778-779.
- Debergh, P.C. y Maene, L.J. (1981)** A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Sci. Hort. **14**: 335-345.
- Dehio, C.; Grossmann, K.; Schell, J. y Schmülling, T. (1993)** Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants overexpressing the *rolA* gene of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA, Plant Mol. Biol. **23**: 1199-1210.
- Delay, D.; Cizeau, J. y Delmotte, F. (1992)** Synthesis of aryl glycosides as *vir* genes inducers of *Agrobacterium tumefaciens*. Carbohydr. Res. **225**: 179.
- Delbarre, A.; Muller, P.; Imhoff, V.; Barbier-Brygoo, H.; Maurel, C.; Leblanc, N.; Perrot-Rechenmann, C. y Guern, J. (1994)** The *rolB* gene of *Agrobacterium rhizogenes* does not increase the auxin sensitivity of tobacco protoplasts by modifying the intracellular auxin concentration. Plant Physiol. **105**: 563-569.
- Dempsey, J.M. (1975)** Fibber Crops. University of Florida Press, Gainesville. FL., USA, pp. 46-89.
- Depicker, A.G.; Jacobs, A.M. y Van Montagu, M.C. (1988)** A negative selection scheme for tobacco protoplast-derived cells expressing the T-DNA gene 2. Plant Cell Rep. **7**: 63-66.
- Desachy, A.; Francois, B.; Vignon, P.; Roustan, J. y Gay, R. (1997)** Une intoxication rare au *Datura stramonium*, A propos de deux cas. Réan Urg. **6(1)**: 51-53.
- Dewey, L.H. (1914)** Yearbook of the U.S. Departement of Agriculture. **1913**: 283-346.
- Dhar, A.K. y Bhat, B.K. (1982)** Ontogenic variability in alkaloid synthesis and other morphological characters in five genotypes of belladonna. J. Nat. Prod. **45**: 525-531.
- Dimitrov, K.; Metcheva, D. y Boyadzhiev, L. (2005)** Integrated processes of extraction and liquid membrane isolation of atropine from *Atropa belladonna* roots. Sep. Pur. Technol. **46**: 41-45.
- Dornenburg, H. y Knorr, D. (1997)** Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures. Food Technol. **51**: 47-54.

- Dragendorff, G. (1876)** Jahresber. Fortschr. Pharmacog. Toxicol. **11**: 98.
- Duarte, C.M.; Marbá, N.; Agawin, N.S.R.; Cebrián, J.; Enríquez, S.; Forte, M.D.; Gallegos, M.E.; Merino, M.; Olesen, B.; Sand-Jensen, K.; Uri, J.S. y Vermaat, J.E. (1994)** Reconstruction of seagrass dynamics: age determinations and associated tools for the seagrass ecologist. Mar. Ecol. Prog. Ser. **107**: 1195-209.
- Dupraz, J.M.; Christen, P. y Kapetanidis, I. (1994)** Tropane alkaloids in transformed roots of *Datura quercifolia*. Planta Med. **60**: 158-162.
- Ebel, J. y Mithöfer, A. (1997)** Early events in the elicitation of plant defence. Planta **206**: 335-348.
- Eeva, M.; Salo, J.P. y Oksman-Caldentey, K.M. (1998)** Determination of the main tropane alkaloids from transformed *Hyoscyamus muticus* plants by capillary zone electrophoresis. J. Pharm. Biomed. Anal. **16**: 717-722.
- Eilert, U.; Constabel, F. y Kurz, W.G.W. (1986)** Elicitor-stimulation of monoterpene indole alkaloid, in suspension cultures of *Catharanthus roseus*. J. Plant Physiol. **126**: 11-22.
- El-Kereamy, A.; Chervin, C.; Roustan, J.P.; Cheynier, V.; Souquet, J.M. y Moutounet, M. (2003)** Exogenous ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. Phyiol. Plant. **119**: 175-182.
- Endo, T.; Goodbody, A.E.; Misawa, M (1987)** Alkaloid production in root and shoot cultures of *Catharanthus roseus*. Plant Med. **53**: 479-482.
- Ermayanti, T.M.; McComb, J.A. y O'Brien, P.A. (1993)** Cytological analysis of seedling roots, transformed root cultures and roots regenerated from callus of *Swainsona galegifolia* (Andr.) R. Br. J. Exp. Bot. **44**: 375-380.
- Escobar, M.A; Civerolo, E.L.; Summerfelt, K.R. y Dandekar, A.M. (2001)** RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. PNAS. **98(23)**: 13437-13442.
- Estruch, J.J.; Schell, J y Spena, A. (1991a)** The protein encoded by the *rolB* plant oncogene hydrolyses indole glucosides. EMBO J. **10**: 3125-3128.
- Estruch, J.J.; Chriqui, D.; Grossmann, K.; Schell, J. y Spena, A. (1991b)** The plant oncogene *rolC* is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates. EMBO J. **10**: 2889-2895.
- Faeti, V.; Mandolino, G. y Ranalli, P. (1996)** Genetic diversity of *Cannabis sativa* L. germplasm based on RAPD markers. Plant Breed **115**: 367-370.

- Fairbain, J.W. (1972)** The trichomes and glands of *Cannabis sativa* L. UN Bulletin on Narcotics **24**: 29-33.
- Fan, X.; Mattheis, J.P. y Roberts, R.G. (2000)** Biosynthesis of phytoalexin in carrot root requires ethylene action. *Physiol. Plant.* **110**: 450-454.
- Feaster, C.V. (1956)** Monoecious hemp breeding in the United States. *Fibres (Engineering and Chem.)*, **17**: 339-340.
- Feeney, M. y Punja, Z.K. (2003)** Tissue culture and *Agrobacterium*-mediated transformation of hemp (*Cannabis sativa* L.) *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **39**: 578-585.
- Fetterman, P.S.; Keith, E.S.; Waller, C.W.; Guerrero, O.; Doorenbos, N.J. y Quimby, M.W. (1971)** Mississippi grown *Cannabis sativa* L. A preliminary observation on the chemical definition of phenotype and variations in THC content versus age, sex, and plant part. *J. Pharm. Sci.* **60**: 1246-1249.
- Filippini, F; Rossi, V.; Marin, O.; Trovato, M.; Costantino, P.; Powney, P.M.; Lo Schiavo, F. y Terzi, M. (1996)** A plant oncogene as a phosphatase. *Nature* **379**: 499-500.
- Fisse, J.; Cosson, L. y Paris, M. (1981)** Études *in vitro* des capacités organogénétiques de tissus de *Cannabis sativa* L. ; effet de différentes substances de croissances. *Pl. Méd. Phytoth.* **15** : 217-223.
- Flick, C.E.; Evans, D.A. y Sharp, W.R. (1983)** Organogenesis. En: *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol 1. Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V.; and Yamada, Y. (eds.) New York: Macmillan, pp. 13-81.
- Floersheim, G.L. (1987)** Treatment of human amatoxin mushroom poisoning. Myths and advances in therapy. *Med. Toxicol.* **2**: 1-9.
- Flores, H.E. (1987)** Use of plant cells and organ culture in the production of biological chemicals. En: *Biotechnology in Agricultural Chemistry*. HM LeBaron, RO Mumma, RC Honeycutt, JH Duesing, (eds.) ACS Symp. Ser. 334. Washington, DC: American Chemical Society, pp 66-86.
- Flores, H.E. y Filner, P. (1985)** Metabolic relationships of putrescine, GABA and alkaloids in cell and root cultures of *Solanaceae*. En: *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures*. Neumann, K.H.; Barz, W. y Reihard, E. (eds.) Berlin, Germany: Springer-Verlag, pp. 568-578.
- Forapani, S.; Carboni, A.; Paoletti, C.; Moliterni, V.M.C.; Ranalli, P. y Mandolino, G. (2001)** Comparison of hemp varieties using random amplified polymorphic DNA markers. *Crop Sci.* **41**: 1682-1689.

- Fournier, G. y Paris, M.R. (1979)** Le chanvre papetier (*Cannabis sativa* L.) cultivé en France : Le point sur les constituants. *Plant. Med. Phytother.* **13**: 116-121.
- Fournier, G. ; Beherec, O.; Bertucelli, S. y Mathieu, J.P. (2001)** A propos des conditions d'échantillonnage pour le dosage du delta-9-tétrahydrocannabinol dans les variétés de chanvre à usage industriel (Comments on the sampling conditions for the titration of delta-9-tetrahydrocannabinol in varieties of hemp used for industrial purposes). *Ann. toxicol. anal.* **13** : 275-281.
- Fraunfelder, F.T. y Meyer, S.M. (1989)** Drug-induced ocular side effects and drug interactions. *Agents Affecting Central Nervous Sys.* 130-132.
- Fujita, M.H.; Shimomura, E., Kuriyama, M.; Shigehiro, M. y Akusu, M. (1967)** Studies on *Cannabis* (2). Examination of the narcotic and its related components in hems, crude drugs, and plant organs by gas-liquid chromatography y thin-layer chromatography. *Jap. J. Pharmacog.* **21**: 57-64.
- Fujita, Y. y Tabata, M. (1987)** Secondary metabolites from plant cells-pharmaceutical applications and progress in commercial production. En: Green CE, Somers DA, Hackett WP & Biesboer DD (eds.) *Plant Tissue and Cell Cultur*, Liss, New York, pp 169–185.
- Fujita, Y.; Hara, Y.; Morimoto, T. y Misawa, M. (1990)** En: Progress in plant celular and molecular biology. Nijkamp *et al.* (eds.) Kluwer Academic Publisher, pp. 738-743.
- Fullner, K.J.; Lara, J.C. y Nester, E.W. (1996)** Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science* **273**: 1107 1109.
- Gamborg, O.L.; Miller, R.A. y Ojima, K. (1968)** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**: 151-158.
- Garfinkel, D.J. y Nester, E.W. (1980)** *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *J. Bacteriol.* **144(2)**:732–743.
- Ge, X. y Wu, J. (2005)** Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag<sup>+</sup> and yeast elicitors. *Plant Sci.* **168**: 487-491.
- Geiser, L.; Cherkaoui, S. y Veuthey, J.L. (2000)** Simultaneous analysis of some amphetamine derivatives in urine by nonaqueous capillary electrophoresis coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **895**: 111-121.
- Gelvin, S. B. y Liu C. N. (1994)** Genetic manipulation of *A. tumefaciens* strains to improve transformation of recalcitrant plant species. En: *Plant molecular biology manual B4*: 1-13, Edd. Kluwer Academic Publishers.

- George, E.F. (1996)** Problems in initiating and maintaining cultures. En: Plant propagation by tissue culture. Part 2. In practice. Exegenetics Ltd., Edington, Wilts (eds.) England. pp. 638-669.
- Gheysen, G.; Angenon, G. y Van Montagu, M. (1998)** *Agrobacterium*-mediated plant transformation: a scientifically intriguing story with significant applications. En: Lindsey K (ed.) Transgenic plant research. Harwood, Amsterdam, pp. 1-33.
- Gill, E.W.; Paton, W.D.M. y Pertwee, R.G. (1970)** Preliminary Experiments on the Chemistry and Pharmacology of *Cannabis*. *Nature* **228**: 134-136.
- Giri, A.; Baberjee, S.; Ahuja, P.S. y Giri, C.C. (1997)** Production of hairy roots in *Aconitum heterophyllum* Wall. Using *Agrobacterium rhizogenes*. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* **33**: 280-284.
- Giri, A. y Narasu, M.L. (2000)** Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnol. Adv.* **18**: 1-22.
- Gold, T. J.; Lee, J. Y.; Husnain, T.; Ghose, T. K. y Davey, M. R. (1991)** *Agrobacterium rhizogenes* Mediated Transformation of the Forage Legumes *Medicago sativa* and *Onobrychis viciifolia*. *J. Exp. Bot.* **42(242)**: 1147-1157.
- González, S.; Sagredo, O.; Gómez, M. y Ramos, J.A. (2002)** Química y metabolismo de los cannabinoides. En: Guía básico sobre los cannabinoides. Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides (SEIC). Madrid, pp. 13-21.
- Gossell-Williams, M.D.; West, M.E. y Simon, O. (1997)** An alkaloidal extract (ALKS1) from *Trophis racemosa* lowers intra-ocular pressure in dogs. *Phytother. Res.* **11**: 57-58.
- Granicher, F; Christen, P y Kapétanidis, L. (1995)** Production of valepotriates by hairy root cultures of *Centranthus ruber* DC. *Plant Cell Rep.* **14**: 294-298.
- Grima-Pettenati, H.; Chriqui, D.; Sarni-Manchado, P. y Prinsen, E. (1989)** Stimulation of lignification in neoformed calli induced by *Agrobacterium rhizogenes* on bean hypocotyls. *Plant Sci.* **61**: 179-188.
- Grlic, L. y Andrec, A. (1961)** The content of acid fraction in *Cannabis* resin of various age and provenances. *Experientia* **17**: 325-326.
- Guharoy, S.R. y Barajas, M. (1991)** Atropine intoxication from the ingestion and smoking of jimson weed. *Vet. Hum. Toxicol.* **33**: 588-589.
- Guillon, S.; Trémouillaux-Guiller, J.; Pati, P.K.; Rideau, M. y Gantet, P. (2006)** Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 341-346.

- Guivarc'h, A.; Caissard, J.C.; Brown, S.; Marie, D.; Dewitte, W. y Van Onckelen, H. y Chriqui, D. (1993)** Characterization of target cells and improvement of *Agrobacterium*-mediate transformation efficiency by direct acetosyringone pretreatment of carrot root discs. *Protoplasma* **174**: 10-18.
- Gundlach, H.; Muller, M.J.; Kutchan, T.M. y Zenk, M.H. (1992)** Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceed. National Acad. Sci. USA* **89**: 2389-2393.
- Gurriarán, M.A.; Revilla, M.A. y Tamés, R.S. (1999)** Adventitious shoot regeneration in cultures of *Humulus lupulus* L. (hop) cvs. Brewers Gold and Nugget. *Plant Cell Rep.* **18**: 1007-1011.
- Gutierrez-Pesce, P.; Taylor, K.; Muleo, R. y Rugini, E. (1998)** Somatic embryogenesis and shoot regeneration from transgenic roots of cherry rootstock Colt (*Prunus avium* X *P. pseudocerasus*) mediated by pRi 1855 T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* **17**: 581-585.
- Haas, J.H.; Moore, L.W.; Ream, W. y Manulis, S. (1995)** Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *App. Envir. Microb.* **61**: 2879-2884.
- Hageman, R.H. y Hucklesby, D.P. (1971)** Nitrate reductase from higher plants. *Methods Enzymol.* **23**: 491-503.
- Hakim, H.A.; El Kheir, Y.M. y Mohamed, M.I. (1986)** Effect of the climate on the content of a CBD-rich variant of *Cannabis*. *Fitoterapia* **57**: 239-241.
- Hamamoto, H.; Boulter, M.E.; Shirsat, A.H.; Croy, E.J. y Ellis, J.R. (1990)** Recovery of morphogenetically normal transgenic tobacco from hairy roots co-transformed with *Agrobacterium rhizogenes* and a binary vector plasmid. *Plant Cell Rep.* **9**: 88-92.
- Hamill, J.D.; Parr, A.J.; Rhodes, M.J.C.; Robins, R.J. y Walton, N.J. (1987)** New routes to plant secondary products. *BioTechnology* **5**: 800-804.
- Hamill, J.D.; Robins, R.J.; Parr, A.J.; Evans, D.M.; Furze, J.M. y Rhodes, M.J.C. (1990)** Over-expressing a yeast ornithine decarboxylase gene in transgenic roots of *Nicotiana rustica* leads to enhanced nicotine accumulation. *Plant Mol. Biol.* **15**: 27-38.
- Hammond, C.T. y Mahlberg, P.G. (1973)** Morphology of glandular hairs of *Cannabis sativa* from scanning electron microscopy. *Am. J. Bot.* **60**: 524-528.
- Hamza, S. y Chupeau, Y. (1993)** Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Exp. Bot.* **44**: 1837-1845.



- Han, K.H.; Gordon, M.P. y Strauss, S.H. (1997)** High-frequency transformation of cottonwoods (*Genus populus*) by *Agrobacterium rhizogenes*. Can. J. Fro. Res. **27**: 464-470.
- Handa, T. (1992)** Regeneration and characterization of Prairie Gentian (*Eustoma grandiflorum*) plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Tissue Cult, Letts. **9(1)**: 10-14.
- Hashimoto, T.; Yun, D.J. y Yamada, Y. (1993)** Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. Phytochemistry **32**: 713-718.
- Hashimoto, T. y Yamada, Y. (1994)** Alkaloid biosynthesis: molecular aspects. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **45**: 257-285.
- Hay, M. (1883)** A new alkaloid in *Cannabis indica*. Pharm. J. **42**: 998.
- Hemphill, J.K.; Turner, J.C. y Mahlberg, P.G. (1978)** Studies on growth and cannabinoid composition of callus derived from different strains of *Cannabis sativa*. Lloydia **41**: 453-462.
- Herman, L.; Jacobs, A.; Van Montagu, M. y Depicker, A. (1990)** Plant chromosome/marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration. Mol. Gen. Genet. **29**: 248-256.
- Hervás, A.; Caba, J.M.; Ligeró, F. y Lluck, C. (1991)** Effect of combined nitrogen on dinitrogen fixation and productivity in *Pisum sativum* L. inoculated with different strains of *Rhizobium*. Chemosphere **22**: 1153-1160.
- Hoffmann, W. (1961)** Hanf, *Cannabis sativa*. En: H. Kappert & W. Rudolf (eds.). Hybuch der Pflanzenzüchtung, By V, Paul Parey, Berlin-Hamburg, pp. 204-261.
- Hogg, R.; Beal, J. y Cava, M.P. (1961)** A study of the alkaloids of *Thalictrum*. I. Isolation of some quaternary alkaloids from *Thalictrum dasycarpum* var. *hypoglaucum*. Lloydia **24(1)**: 45-54.
- Holden, M.A.; Holden, P.R. y Yeoman, N.M. (1988)** Elicitation of cell cultures, En: R.J. Robins (eds.), Manipulating Secondary Metabolism in Culture, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 57-65.
- Holfort, P. y Newbury, H.J. (1992)** The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Antirrhinum majus*. Plant Cell Rep. **11**: 93-96.
- Hood, E.E.; Gelvin, S.B.; Melchers, L.S. y Hoekema, A. (1993)** New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. Transgenic. Res. **2**: 208-218.

**Horlemann, C.; Schwekendiek, A. y Höhnle, M. (2003)** Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Rep.* **22**: 210-217.

**Horn, R.A. (1973)** Morphology of wood pulp fibre from softwoods and influence on paper strength. Presentation at the 58<sup>th</sup> annual meeting of the Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Chicago. U.S. Government Printing Office, pp. 11.

**Hu, Z. y Du, M. (2006)** Hairy root and its application in plant genetic engineering. *J. Integrat. Biol.* **48** (2): 212-127.

**Huetteman, C.A. y Preece, J.E. (1993)** Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cul.* **33**: 105-119.

**Huffman, G.A.; White, F.F.; Gordon, M.P. y Nester, E.W. (1984)** Hairy-root-inducing plasmid: physical map and homology to tumor-inducing plasmids. *J. Bacteriol.* **157**: 269–276.

**Hughes, J.B.; Shanks, J.; Vanderford, M.; Lauritzen, J. and Bhadra, R. (1997)** Transformation of TNT by aquatic plants and plant tissue cultures. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 266-271.

**Huhnke, W.; Jordan, C.; Neuer, H. y von Sengbusch, R. (1951)** Grundlagen für die Züchtung eines monözischen Hanfes. *Z Pflanzzüchtg* **29**: 55–75.

**Inzé, D.; Follin, A.; Van Lijsebettens, M.; Simoens, C.; Genetello, C.; Van Montagu, M. y Schell, J. (1984)** Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*; further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. *Mol. Gen. Genet.* **194**: 265-74.

**Jagadish, V.; Robertson, J. y Gibbs, A. (1996)** RAPD analysis distinguishes *Cannabis sativa* samples from different sources. *Forensic Sci. Int.* **79**: 113-121.

**Jahns, E. (1887)** Ueber das alkaloid des indischen hanfs. *Arch. Pharm. (Weihheim)*, **XXV**: 479.

**Janischevsky, D.E. (1924)** Forma Konopli na sornykh mestakh vyugo-vostochnoi rossii. *Uchenye. Zapiski, Saratov Gosud Univ.* **2**: 2, 3-17.

**Jasik, J.; Boggetti, B.; Caricato, G. y Mantell, S. (1997)** Characterisation of morphology and root formation in the model woody perennial shrub *Solanum aviculare* Forst. Expressing *rolABC* genes of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Sci.* **124**: 57-68.

**Jaziri, M.; Shimomura, K.; Yoshimatsu, K.; Fauconnier, M.L.; Marlier, M. y Homès, J. (1995)** Establishment of normal and transformed root cultures of *Artemisia annua* L. for artemisinin production. *J. Plant Physiol.* **145**: 175-177.

- Jefferson, R.A. (1987)** Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**: 387-405.
- Jefferson, R.A.; Kavanagh, T.A. y Bean, M. W. (1987)** Gus fusions:  $\beta$ -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**: 3901-3907.
- Jin, S.; Komari, T.; Gordon, M.P. y Nester, E.W. (1987)** Genes responsible for the super-virulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. *J. Bacteriol.* **169**: 4417-4425.
- João, KHL y Brown, T.A (1994)** Long-term stability of root cultures of tomato transformed with *Agrobacterium rhizogenes* R1601. *J. Exp. Bot.* **45(5)**: 641-647.
- Johnson, P. (1999)** Industrial hemp: a critical review of claimed potentials for *Cannabis sativa*. *Tappi J.* **82**: 113-123.
- Jouanin, L.; Vilaine, F.; Tourneur, J.; Tourneur, G.; Pautot, V.; Muller, J.F. y Capone, M. (1987)** Transfer of a 4.3-kb fragment of the TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* strain A4 confers the pRi transformed phenotype to regenerated tobacco plants. *Plant Sci.* **53**: 53-63.
- Jouhikainen, K.; Lindgren, L.; Jokelainen, T.; Hiltunen, R.; Teeri, T.H. y Oksman-Caldentey, K.M. (1999)** Enhancement of scopolamine production in *Hyoscyamus muticus* L. hairy root cultures by genetic engineering. *Planta* **208**: 545-551.
- Jung, H.Y.; Kang, S.M.; Kang, Y.M.; Kang, M.J.; Yun, D.J.; Bahk, J.D.; Yang, J.K. y Choi, M.S. (2003)** Enhanced production of scopolamine by bacterial elicitors in adventitious hairy root cultures of *Scopolia parviflora*. *Enzyme Microb. Technol.* **33**: 987-990.
- Kaiser, J.J. y Lewis, O.A.H. (1984)** Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate fed *Helianthus annuus* L. *Plant Soil* **70**: 127-130.
- Kalant, O.J. (1968)** An interim guide to the *Cannabis* (marijuana) literature. Addiction Research Foundation. Toronto, pp. 39.
- Kamada, H.; Okamura, N.; Satake, M.; Harada, H. y Shimomura, K. (1986)** Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant cell Rep.* **5**: 239-242.
- Kang, K.H.; Cha, M.Y.; Pae, A.N.; Choi, K.I.; Cho, Y.S.; Koh, H.Y. y Chung, B.Y. (2000)** Synthesis of (+)-muscarine from (S)-(-)-5-hydroxymethyl-2(5H)-furanone. *Tetrahedron Lett.* **41 (42)**: 8137-8140.

- Kanokwaree, K. y Doran, P.M. (1997)** The extent to which external oxygen transfer limits growth in shake flask culture of hairy roots. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 520-526.
- Karus, M. (2002)** European hemp industry 2001: Cultivation, processing, and product lines. Bioresource HEMP and other fibre crop. Wolfsburg, Holanda 13-16 September.
- Karus, M. y Kaup, M. (2002)** Natural Fibres in the European Automotive Industry. *J. Ind. Hemp* **7(1)**: 117-129.
- Kennedy, G.W. (1886)** Does *Cannabis indica* contain nicotine? *Pharm. J.* **46**: 453.
- Kimura, M. y Okamoto, K. (1970)** Distribution of THC Acid in Fresh Wild *Cannabis*. *Specialia* **15 (8)**: 819-820.
- Kitamura, Y.; Tominaga, Y. y Ikenaga, T. (2004)** Winter cherry bugs feed on plant tropane alkaloids and de-epoxidize scopolamine to atropine. *J. Chem. Ecol.* **30(10)**: 2085-2090.
- Komaraiah, P.; Reddy, G.V.; Reddy, P.S.; Raghavendra, A.S.; Ramakrishna, S.V. y Raddanna, P. (2003)** Enhanced production of antimicrobial sesquiterpenes and lipoxygenase metabolites in elicitor-treated hairy root cultures of *Solanum tuberosum*. *Biotechnol. Lett.* **25**: 593-597.
- Koncz, C. y Schell, J. (1986)** The promoter of T<sub>L</sub>-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204(3)**: 383-396.
- Krejci, Z. (1970)** Changes with maturation in amounts of biologically interesting substances of *Cannabis*. En: *The botany and chemistry of Cannabis*. Joyce, C.R.B. and S.H. Curry, (eds.) Churchill, London. pp 49.
- Królicka, A.; Staniszewska, I.; Bielawski, K.; Maliński, E.; Szafranek, J. y Lojkowska, E. (2001)** Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. *Plant Sci.* **160**: 259-264.
- Kunik, T.; Tzfira, T.; Kapulnik, Y.; Gafni, Y.; Dingwall, C y Citovsky, V. (2001)** Genetic transformation of Hela cells by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 1871-1876.
- Kwasniewski, V. (1954)** Der fliegenpilz *amanita muscaria* also raushgift. *Deut. Apothekar. Ztg.* **94**: 1177.
- Kwon, B.M.; Ro, S.H.; Kim, M.K.; Nam, J.Y.; Jung, H.J.; Lee, I.R.; Kim, Y.K. y Bok, S.H. (1997)** Polyacetylene analogs isolated from hairy roots of *Panax ginseng*, inhibit acyl-CoA-cholesterol. *Plant Med.* **63**: 552-553.

- Lamarck, J. B. (1785)** Encyclopedie méthodique. Botanique, pp. 1783-1817.
- Lambert, C. y Tepfer, D. (1991)** Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create chimeric apple trees through genetic grafting. *Biotechnology* **9**:80–83.
- Lanyon, V.S.; Turner, J.C. y Mahlberg, P.G. (1981)** Quantitative analysis of cannabinoides in the secretory product from captitate-stalked glands of *Cannabis sativa* L. (*Cannabaceae*). *Bot. Gaz.* **142**: 316-319.
- Lawi-Berger, C.; Miége, M.N.; Kapétanidis, I. y Miége, J. (1982)** Contribution a l'étude chimiotaxonomique de *Cannabis sativa* L. *CR. Acad. Sci. Paris*, **295**: 397-402.
- Lee, C.W.T. y Shuler, M.L. (1991)** Different shake flash closures alter gas phase composition and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell suspensions. *Biotech. Tech.* **5(3)**: 173-178.
- Lessi, M. y Lanka, E. (1994)** Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells. *Cell* **77**: 321 324.
- Levee, V.; Garin, E.; Klimaszewska, K. y Seguin, A. (1999)** Stable genetic transformation of white pine (*Pinus strobus* L.) after cocultivation of embryogenic tissues with *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Breeding* **5**: 429-440.
- Ligero, F.; Lluch, C.; Olivares, J y Bedmar, E.J. (1987)** Nitrate reductasa activity in nodules of pea inoculated with hidrogenase positive and hidrogenase negative strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Physiol. Plant.* **69**: 313-316.
- Ligero, F.; Poveda, J.L.; Gresshoff, P.M. y Caba, J.M. (1999)** Nitrate-and inoculation-enhanced ethylene biosynthesis in soybean roots as a possible mediator of nodulation control. *J. Plant Physiol.* **154**: 482-488.
- Lin, J.J.; Assad-Garcia, N. y Kuo, J. (1995)** Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. *Plant Sci.* **109**: 171-177.
- Linné, C. (1753)** Speies plantarum, Stockholm, **2**: 1072.
- Lisson, S.N.; Mendham, N.J. y Carberry, P.S. (2000)** Development of a hemp (*Cannabis sativa* L.) simulation model 3. The effect of plant density on leaf appearance, expansion and senescence. *Austr. J. Exp. Agric.* **40(3)**: 419-423.
- Litz, R.E. y Gray, D.J. (1992)** Organogenesis and somatic embryogenesis. En: Hammerschlag FA, Litz RE (eds.) *Biotechnology of perennial fruit crops*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 3-34.

- Lourenço, P.M.L.; De Castro, S.; Martins, T.M.; Clemente, A. and Domingos, A. (2002)** Growth and proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: effect of nitrogen and sucrose. *Enz. Microb. Technol.* **31**: 242-249.
- Loyola-Vargas, V.M. y Jiménez, E.S. (1986)** Effect of nitrate, ammonium and glutamine on nitrogen assimilation enzyme during callus growth of maize. *J. Plant Physiol.* **125**: 225-234.
- Macek, T.; Kotrba, P.; Suchova, M.; Skacel, F.; Demnerova, K y Ruml, T. (1994)** Accumulation of cadmium by hairy-root cultures of *Solanum nigrum*. *Biotechnol. Lett.* **16**: 621-624.
- Macià, A.; Borrull, F.; Calull, M y Aguilar, C. (2004)** Determination of some acidic drugs in surface and sewage treatment plant waters by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* **25**: 3441-3449.
- MacKinnon, L.; McDougall, G.; Aziz, N. y Millam, S. (2000)** Progress towards transformation of fibre hemp. Scottish Crop Research Institute Annual Report 2000/2001. Invergowrie, Dundee: Scottish Crop Research Institute, 84-86.
- Mackova, M.; Macek, T.; Ocenaskova, J.; Burkhard, J.; Demnerova, K. y Pazlarova, J. (1997)** Biodegradation of polychlorinated biphenyls by plant cells. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **39**: 317-325.
- Maitani, T.; Kubota, H.; Sato, K.; Takeda, M y Yoshihira, K. (1996)** Induction of phytochelatin (class III metallothionein) and incorporation of copper in transformed hairy roots of *Rubia tinctorum* exposed to cadmium. *J. Plant Physiol.* **147**: 743-748.
- Maldonado-Mendoza, I.E.; Ayora-Talavera, T. y Loyola-Vargas, V.M. (1993)** Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **33**: 321-329.
- Malingre, T.N.; Hendricks, H.; Batterman, S.; Bos, R. y Visser, J. (1975)** The essential oil of *Cannabis sativa*. *Planta Med.* **28**: 56-61.
- Mallol, A.; Cusidó, R.M.; Palazón, J.; Bonfill, M.; Morales, C. y Piñol, M.T. (2001)** Ginsenoside production in different phenotypes of *Panax ginseng* transformed roots. *Phytochemistry* **57**: 365-371.
- Mandolino, G. y Ranalli, P. (1999)** Advances in biotechnological approaches for hemp breeding and industry. En: *Advances in hemp research*. Ranalli, P. (ed.). New York: Haworth Press, pp. 185-208.
- Mandolino, G.; Carboni, A.; Bagatta, M.; Moliterni, V.M.C. y Ranalli, P. (2002)** Occurrence and frequency of putatively Y chromosome linked DNA markers in *Cannabis sativa* L. *Euphytica* **126**: 211-218.

- Mano, Y.; Ohkawa, H. y Yamada, Y. (1989)** Production of tropane alkaloid by hairy root cultures of *Duboisia leichhardtii* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Sci.* **59**: 191-201.
- Mantell, S.H. y Smith, H. (1984)** Cultural factors that influence secondary metabolite accumulation in plant cell and tissue cultures. En: *Plant biotechnology*. Mantell SH, Smith H, (eds.). Cambridge: Cambridge Univ. Press, pp. 75-108.
- Masoud, A.N. y Doorenbos, N.J. (1973)** Mississippi grown *Cannabis sativa* L. III. Cannabinoid and cannabinoic acid content. *J. Pharm. Sci.* **62**: 313-315.
- Matthysse, A.G. (1983)** Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. *J. Bacteriol.* **154(2)**:906–915.
- Matthysse, A.G. (1986)** Initial interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. *Crit. Rev. Microbiol.* **13**: 281 307.
- Matthysse, A.G.; Thomas, D.L. y White, A.R. (1995)** Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **177(4)**: 1076-1081.
- Matto, A.K. y Suttle, J.C. eds. (1991)** The plant hormone Ethylene. CRC Press, Boca Raton, FL. 337pp.
- Maurel, C.; Leblanc, N.; Barbier-Brygoo, H.; Perrot-Rechenmann, C.; Bouvier-Durand, M. y Guern, J. (1994)** Alterations of auxin perception in *rolB*-transformed tobacco protoplasts. *Plant Physiol.* **105**: 1202-1215.
- Mauro, M. L.; Trovato, M.; De Paolis, A.; Gallelli, A.; Costantino, P. y Altamura, M. M. (1996)** The plant oncogene *rolD* stimulates flowering in transgenic tobacco plants. *Dev. Biol.* **180**: 693-700.
- McAfee, B.J.; White, E.E. y Pelcher, L.E. (1993)** Root induction in pine (*Pinus*) and larch (*Larix*) ssp. Using *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **34**: 53-62.
- McPartland, J.M. (1996)** A review of *Cannabis* disease. *J. Int. Hemp Assoc.* **3(1)**: 19-23.
- Mechoulam, R. y Gaoni, Y. (1967)** Recent advances in the chemistry of hashish. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **25**: 175.
- Mediavilla, V.; Jonquera, M.; Schmid-Slembrouck, I. y Soldati, A. (1998)** Decimal code for growth stages of hemp (*Cannabis sativa* L.). *J. Int. Hemp Assoc.* **5(2)**: 65, 68-74.

- Merzouki, A.; Tamsamani M'rabet, R. y Molero Mesa, J. (1997)** Différenciation du sexe chez le *Cannabis dioïque* a partir des caractéristiques morphocinétiques précoces. Arch. Geobot. **2(29)**: 165-169.
- Metzger, L.; Fouchault, I.; Glad, C.; Prost, R. y Tepfer, D. (1992)** Estimation of cadmium availability using transformed roots. Plant soil **143**: 249-257.
- Miki, B. y McHugh, S. (2004)** Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. J. Biotechnol. **107**: 193-232.
- Miranda, A.C. y Campos, V.T. (1998)** Manual de transformacao genética de plantas. Embrapa servico de producao de informacao, SPI, Brasilia, Brasil, Chapter 8, pp. 127-141.
- Modolo, L.V.; Augusto, O.; Almeida, I.M.G.; Pinto-Maglio, C.A.F.; Oliveira, H.C.; Seligman, K. y Salgado, I. (2006)** Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. Plant Sci. **171**: 34-40.
- Mole, M.L. y Turner, C.E. (1973)** Phytochemical screening of *Cannabis sativa* L. II. Choline and neurine in the roots of a Mexican variant. Acta Pharm. Jugoslav. **23**: 203.
- Moliterni, V.M.C.; Cattivelli, L.; Ranalli, P. y Mandolino, G. (2004)** The sexual differentiation of *Cannabis sativa* L.: A morphological and molecular study. Euphytica **140**: 95-106.
- Montford, S. y Small, E. (1999)** A comparison of the biodiversity friendliness of crops with special reference to hemp (*Cannabis sativa*). J. Int. Hemp Assoc. **6**: 53-63.
- Mooney, D.M.; Hu, B. y Senatorov, V.V. (1995)** Muscarine induces an anomalous inhibition of synaptic transmission in rat auditory thalamic neurons *in vitro*. J. Pharmacol. Exp. Therap. **275(2)**: 838-844.
- Morgan, A. J.; Cox, P. N.; Turner, D. A.; Peel, E.; Davey, M. R.; Gartland, K. M. A. y Mullican, B. J. (1987)** Transformation of tomato using an Ri plasmid vector. Plant Sci. **49**: 37-49.
- Moris, J.W. y Moris, R.O. (1990)** Identification of an *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene inducer from the pinaceous gymnosperm *Pseudotsuga menziesii*. Prod. Natl. Acad. Sci. USA, **87**: 3614-3618.
- Moyano, E.; Fornalé, S.; Palazón, J.; Cusidó, R.M.; Bonfill, M.; Morales, C. y Piñol, M.T. (1999)** Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in *Solanaceae* plants. Phytochemistry **52**: 1287-1292.



- Muchow, R.C. (1979)** Effect of plant population and season on kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) grown under irrigation in tropical Australia, II. Influence on growth parameters and yield prediction. *Field Crops Res.* **2**: 67-76.
- Mudd, S.H. y Datko, A.H. (1989)** Synthesis of methylated ethanolamine moieties. Regulation by choline in soybean and carrot. *Plant Physiol.* **90**: 306-310.
- Mudryi, F.V.; Smirnov, V.V. y Zotov, S.B. (1970)** Muscarine research, I. Synthesis of a mixture of racemates of muscarine and its stereoisomers. *Chem. Heterocycl. Comp.* **5**: 579-581.
- Mugnier, J (1988)** Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* **7**: 9-12.
- Murari, G.; Lombardi, S.; Puccini, A.M. y De Sanctis, R. (1983)** Influence of environmental conditions on tetrahydrocannabinol (delta-9- THC) in different cultivars of *Cannabis sativa* L. *Fitoterapia* **54**: 195-201.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassay with tissue culture. *Plant Physiol.* **15**: 473-497.
- Murthy, B.N.S.; Murch, S.J. y Saxena, P.K. (1998)** Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* **34**: 267-275.
- Nagatome, H.; Yamamoto, T.; Taya, M. y Tanaka, N. (2000)** Viability of plant hairy roots is sustained without propagation in low sugar medium kept at ambient temperature. *Biochem. Eng. J.* **6**: 75-80.
- Nedelkoska, T.V. y Doran, P.M. (2000)** Characteristics of heavy metal uptake by plant species with potential for phytoremediation and phytomining. *Minerals Eng.* **549**: 549-561.
- Nehra, N.S. y Kartha, K.K. (1994)** Meristem and shoot tip culture: requirement and applications. En: *Plant Cell and Tissue Culture*. Indra K. Vasil and Trevor A. Thorpe (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 37-70.
- Nilsson, O.; Crozier, A.; Schmülling, T.; Sandberg, G. y Olsson, O. (1993)** Indole-3-acetic acid homeostasis in transgenic tobacco plant expressing the *Agrobacterium rhizogenes rolB*. *Plant J.* **3**: 681-689.
- Nishikawa, K. y Ishimaru, K. (1997)** Flavonoids in root cultures of *Scutellaria baicalensis*. *J. Plant Physiol.* **151**: 633-636.
- Nitta, K; Stadelmann, R.J. y Eugster, C.H. (1971)** Zur Biogenese des Muscarins in Mycelkulturen von *Clitocybe rivulosa*. *Helv. Chim. Acta.* **60**: 1747-1753.

- Nuccio, M.L.; Russell, B.L.; Nolte, K.D.; Rathinasabapathi, B.; Gage, D.A. y Hanson, A.D. (1998)** The endogeneous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *Plant J.* **16(4)**: 487-496.
- Nussbbaumer, P.; Kapetanidis, I. y Christen, P. (1998)** Hairy roots of *Datura candida* X *D. aurea*: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Rep.* **17**: 405-409.
- Observatorio Vasco de drogodependencias (2002)** Cannabis: de la salud y del derecho. Gobierno Vasco. pp. 200.
- Oksman-Caldentey, K.; Sevón, M.; Vanhala, L. y Hiltunen, R. (1994)** Effect of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism of transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **38**: 263-272.
- Ooms, G.; Klapwijk, P.M.; Poulis, J.A. y Schilperoort, R.A. (1980)** Characterization of Tn904 insertions in octopine Ti plasmid mutants of *Agrobacterium tumefaciens* J. *Bacteriol.* **144(1)**: 82-91.
- Owens, L.D. y Cress, D.E. (1985)** Genotypic variability of Soybean response to *Agrobacterium* strains harbouring the Ti or Ri plasmids. *Plant Physiol.* **77**: 87-94.
- Palazón, J.; Piñol, M.T.; Cusidó, R.M.; Morales, C. y Bonfill, M. (1997a)** Application of transformed root technology to the production of bioactive metabolites. *Recent Res. Devel. En: Plant Physiol.* **1**: 125-143.
- Palazón, J.; Cusidó, R.M.; Roig, C y Piñol, M.T. (1997b)** Effect of *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA on nicotine production in tobacco root cultures. *Plant Physiol. Biochem.* **35(2)**: 155-162.
- Palazón, J.; Cusidó, R.M.; Gonzalo, J.; Bonfill, M.; Morales, C. y Piñol, M.T. (1998)** Relation between the amount of *rolC* gene product and indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* transformed root cultures. *J. Plant Physiol.* **153**: 712-718.
- Palazón, J.; Cusido, R.M.; Bonfill, M.; Mallol, A.; Moyano, E.; Morales, C. y Piñol, M.T. (2003)** Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production. *Plant Physiol. Biochem.* **41**: 1019-1025.
- Pan, Z.; Wang, H. y Zhong, J. (2000)** Scale-up study on suspension cultures of *Taxus chinensis* cells for production of taxane diterpene. *Enzyme Microb. Technol.* **27**: 714-723.
- Parr, A.D. Hamill, J.D. (1987)** Relationship between *Agrobacterium rhizogenes* transformed hairy root and intact, uninfected *Nicotiana* plants. *Phytochemistry* **26**: 3241-3245.

- Parr, A.J.; Peerless, A.C.J.; Hamill, J.D.; Walton, N.J.; Robins, R.J. y Rhodes, M.J.C. (1988)** Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.* **7**: 309-312.
- Parr, A.J.; Payne, J.; Eagles, J.; Chapman, B.T.; Robins, R.J. y Rhodes, M.J.C. (1990)** Variation in tropane alkaloid accumulation within the *Solanaceae* and strategies for its exploitation. *Phytochemistry* **29**: 2545-2550.
- Pasquali, G., Goddijn, O.J.M.; Waal, A.; Verpoorte, R.; Schilperoort, R.A.; Hoge, J.H.C. y Memelink, J. (1992)** Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Mol. Biol.* **18**: 1121-1131.
- Pate, D.W. (1994)** Chemical ecology of *Cannabis*. *J. Int. Hemp Assoc.* **2 (29)**: 32-37.
- Payne, M.A.; Hamill, J.D.; Robins, R.J. y Rhodes, M.J.C. (1987)** Production of hyoscyamine by hairy root culture of *Datura stramonium*. *Planta Med.* **53**: 474-478.
- Perez-Molphe, E. y Ochoa-Alejo, N. (1998)** Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes* transformed tissues. *Plant Cell Rep.* **17**: 591-596.
- Pezzuto, J.M. (1995)** Natural products cancer chemoprotective agents. En: *Recent advances in phytochemistry. Phytochemistry of medicinal plants.* Arnason JT, Mata R, Romero JT (eds.) vol. 29. New York: Plenum, pp. 19-45.
- Phillipson, J.D. (1990)** Plants as source of valuable products. En: *Secondary products from plant tissue culture.* Charlwood BV, Rhodes MJC (eds.) Oxford: Clarendon Press, pp. 1-21.
- Piatti, T.; Boller, T. y Brodelius, P.E. (1991)** Induction of ethylene biosynthesis is correlated with but not required for induction of alkaloid accumulation in elicitor-treated *Eschscholtzia* cells. *Phytochemistry* **30**: 2151-2154.
- Pierik, R. L. M. (1987)** *In Vitro Culture of Higher Plants.* Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht (Netherlands), pp 343.
- Piñol, M.T.; Palazón, J.; Cusidó, R. y Serrano, M. (1996)** Effects of Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* on growth and hyoscyamine production in *Datura stramonium* root cultures. *Bot. Acta* **109**: 133-138.
- Pirt, S.J. (1965)** The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proc. R. Soc. London (Biol.)* **169**, pp. 224-231.

- Pitta-Alvarez, S.I.; Spollansky, T.C. y Giulietti, A.M. (2000)** The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme Microb. Technol.* **26**: 252-258.
- Pitta-Alvarez, S.I. y Giulietti, A.M. (2001)** Hairy roots of *Brugmansia candida* that grow without agitation: Biotechnological implications *Biotechnol. Progr.* **17**: 661 - 663.
- Pollock, K.; Barrfield, D.G. y Shields, R. (1983)** The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant Cell Rep.* **2**: 36-39.
- Porter, J.R. (1991)** Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. *Crit. Rev. Plant Sci.* **10(4)**: 387-421.
- Preobraschensy, W. (1876)** Cannabineae. *Jahresber. Pharmacog. Toxicol.* **11**: 98.
- Pythoud, F.; Sinkar, V.P.; Nester, E.W. y Gordon, M.P. (1987)** Increased virulence on *Agrobacterium rhizogenes* conferred by the *vir* region of pTiBo542: application to genetic engineering of poplar. *Bio/Technol.* **5**: 1323-1327.
- Quimby, M.W. (1974)** Botany of *Cannabis sativa*. *Arch. Invest. Med.* **5** Suppl. **1**: 127.
- Radman, R.; Saez, T.; Bucke, C. y Keshavarz, T. (2003)** Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotech. Appl. Biochem.* **37**: 91-102.
- Ramachandra, R.S. y Ravishankar, G.A. (2002)** Plant cell culture: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* **20**: 101-153.
- Ramsay, G. y Kumar, A. (1990)**. Transformation of *Vicia faba* cotyledon and stem tissues by *Agrobacterium rhizogenes*: infectivity and cytological studies. *J. Exp. Bot.* **41**: 841-847.
- Ravishankar, G.A.; Bhyalakhmi, N. y Ramachandra, R.G. (1999)** Production of food additives. En: *Biotechnology: secondary metabolites*. Ramawat KG, Merillon JM (eds.) New Delhi: Oxford IBH, PP. 89-110.
- Reinbothe, S.; Mollenhauer, B. y Reinbothe, C. (1994)** JIPs and RIPs: the regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *The Plant Cell* **6**: 1197-1209.
- Reinert, N. (1958)** Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten. *Naturwissenschaften* **45**: 344-345.
- Rhodes, D. y Hanson, A.D. (1993)** Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 357-384.

- Richez-Dumanois, C.; Braut-Boucher, F.; Cosson, L. y Paris, M. (1986)** Multiplication végétative *in vitro* du chanvre (*Cannabis sativa* L.). Application à la conservation des clones sélectionnés. *Agronomie* **6**: 487-495.
- Rigaud, J. y Puppo, A. (1975)** Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* **88**: 223-228.
- Rijhwani, S. K. y Shanks, J. V. (1998)** Effect of subculture cycle on growth and indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Enzyme Microb. Technol.* **22**: 606-611.
- Robbins, M.P.; Bolwell, G.P. y Dixon, R.A. (1985)** Metabolic changes in elicitor-treated bean cells. *Eur. J. Biochem.* **148**:563–569.
- Roblot, F.; Montaz, L.; Delcoustal, M.; Gaboriau, E.; Chavagnat, J.J.; Morichaud, G.; Pourrat, O.; Scepi, M. y Patte, D. (1995)** Intoxication par *Datura stramonium*: le diagnostic est clinique, le traitement est symptomatique. *Rev. Méd. Interne* **16**: 187-190.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989)** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandford, J.C. (1990)** Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant.* **79**: 206-209.
- Sanità, L.D.T.; Lambardi, M.; Pecchioni, N.; Pazzagli, L.; Durante, M. y Gabrielli, R. (1999)** Effects of cadmium stress on hairy roots of *Daucus carota*. *J. plant Physiol.* **154**: 385-391.
- Sárdi, E. y Tordai, E. (2005)** Determination of fully N-methylated compound in different cabbage and beetroot varieties. *Acta Biologica Szegediensis* **49**: 43-45.
- Sassman, M. (1938)** *Cannabis indica* in Pharmaceuticals. *J. Med. Soc. New Jersey*: 42-51.
- Savitha, B.C.; Thimmaraju, R.; Bhagyalakshmi, N. y Ravishankar, G.A. (2005)** Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Proc. Biochem.* **41**:50-60.
- Schell, J. (1995a)** Progress in plant science is our best hope to achieve an economically rewarding, sustainable and environmentally stable agriculture. *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.* **1**: 10–12.
- Schell, J. (1995b)** Crop Biotechnology - a necessity for an environmentally friendly and sustainable agriculture. *Proceedings Part 1. Ninth Forum for Applied Biotechnology University of Gent.* **60**: 1513–1514.

- Schlatmann, J.E.; Nuutila, A.M.; Vangulik, W.M.; Tenhoopen, H.J.G.; Verpoorte, R. y Heijnen, J.J. (1993)** Scaleup of ajmalicine production by plant-cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Bioeng.* **41(2)**: 253-262.
- Schmülling, T.; Fladung, M.; Grossman, K. y Schell, J. (1993)** Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant J.* **3**: 371-382.
- Schröder, G.; Waffenschmidt, S.; Weiler, E.W. y Schröder, J. (1984)** The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesis indol-3-acetic acid. *Eur. J. Biochem.* **138**: 387-391.
- Schultes, R.E. (1970)** Random thoughts y queries on the botany of *Cannabis*. In: Joyce, C.R.B. y S.H. Curry, *The Botany y Chemistry of Cannabis*. J. & A. Churchill. London, England. pp. 11-38.
- Schultes, R.E.; Klein, W.M.; Plowman, T. y Lockwood, T.E. (1974)** *Cannabis*: an example of taxonomic neglect. *Bot. Mus. Leaflet*. (Harvard Univ.). **23**: 337-364.
- Schumacher, H.M.; Malik, K.A. y Iren, F.V. (1995)** Technical information sheet No. 13: simple storage of plant cell cultures in liquid media, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 703-705.
- Scragg, A.H. (1997)** The production of aromas by plant cell cultures. En: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* Schepier T. (eds.) vol. 55. Berlin: Springer-Verlag, pp. 239-263.
- Seitz, H.U. y Hinder, W. (1988)** Anthocyanins. En: *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Constabel F. Vasil I. (eds.), vol. 5. San Diego: Academic Press, pp. 49-76.
- Shanks, J.V. y Morgan, J. (1999)** Plant 'hairy root' culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 151-155.
- Sharp, J.M. y Doran, P.M. (1999)** Effect of bacitracin on growth and monoclonal antibody production by tobacco hairy root and cell suspensions. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **4**: 253-258.
- Shen, W.H.; Davioud, E.; David, C.; Barbier-Brygoo, J.; Tempé, J. y Guern, J. (1990)** High sensitivity to auxin is a common feature of hairy root. *Plant Physiol.* **94**: 554-560.
- Sheppard, R.; Tong, X.; Cai, J. y Henion, J. D. (1995)** Chiral Separation and Detection of Terbutaline and Ephedrine by Capillary Electrophoresis Coupled with Ion Spray Mass Spectrometry. *J. Anal. Chem.* **67**: 2054-2058.

- Shiao, T. y Doran, P.M. (2000)** Root hairiness: effect on fluid flow and oxygen transfer in hairy root cultures. *J. Biotechnol.* **83**: 199-210.
- Shibli, R.A.; Smith, M.A.L. y Kushad, M.H. (1997)** headspace ethylene accumulation effects on secondary metabolite production in *Vaccinium pahalae* cell culture. *Plant Growth Reg.* **23**: 201-205.
- Shimomura, K.; Sudo, H.; Saga, H. y Komada, H. (1991)** Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Rep.* **10**: 282-285.
- Shoyama, Y.; Yamauchi, T. y Nishioka, I. (1970)** *Cannabis* V. Cannabigerolic acid monomethyl ether and cannabinolic acid. *Chem. Pharm. Bull.* **18**: 1327-1335.
- Siebold, L. y Bradbury, T. (1881)** Note on the alleged presence of nicotine in Indian Hemp. *Pharm. J.* **41**: 326.
- Sikuli, N.N. y Demeyer, K. (1997)** Influence of the ion-composition of the medium on alkaloid production by "hairy root" of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **47**: 261-267.
- Singh, B.D. y Harvey, B.L. (1975)** Does 2,4-D induce mitotic irregularities in plant tissue cultures? *Experientia* **31**: 785-787.
- Singh, G. (1999)** Elicitation-Manipulating and enhancing secondary metabolite production. En: FU, Tong-Jen; SINGH, Gurmeet and CURTIS, Wayne R. (eds.) *Plant cell and tissue culture for the production of food ingredients*. New York, USA, Kluwer Academic, pp. 121-128.
- Siniscalco, G. (2001)** *Cannabis sativa* L.-Botanical problems and molecular approaches in forensic investigations. *Forensic Sci. Rev.* **13**: 2-17.
- Skoog, F. and Miller, C. O. (1957)** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **11**: 118-140.
- Slightom, J.L.; Dury-Tardif, M.; Jouanin, L. y Tepfer, D. (1986)** Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid: identification of open-reading-frames. *J. Biol. Chem.* **261**: 108-121.
- Ślusarkiewicz-Jarzina, A.; Ponitka, A. y Kaczmarek, Z. (2005)** Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* **47**: 145-151.
- Small, E. y Beckstead, H.D. (1973)** Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of *Cannabis*. *Lloydia* **36**: 144-165.

- Small, E.; Beckstead, H.D. y Chan, A. (1975)** The Evolution of Cannabinoid Phenotypes in *Cannabis*. *Eco. Bot.* **29**: 219-232.
- Small, E. y Cronquist, A. (1976)** A practical and natural taxonomy for *Cannabis*. *Taxon.* **25**: 405-435.
- Small, E. y Marcus, D. (2000)** Hemp germplasm trials in Canada. 3rd International Symposium Bioresource Hemp. Websites: Nova Corporation (Germany), Hemphasis Limited (Toronto).
- Snell, F.D. y Snell, C.T. (1949)** Colorimetric Methods of Analysis. D. Van Nostrand Co., New York, pp. 802-807.
- Songstad, D.D.; Giles, K.L.; Park, J.; Novakosvski, D.; Epp, D.; Friesen, L. y Roewer, I. (1989)** Effect of ethylene on sanguinarine production from *Papaver somniferum* cell cultures. *Plant Cell Rep.* **8**: 463-466.
- Southern, E.M. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Spanó, L.; Mariotti, D.; Cardarelli, M.; Barranca, C. y Costantino, P. (1988)** Morphogenesis and auxin sensitivity of transgenic tobacco with different complements of Ri T-DNA. *Plant Physiol.* **87**: 479-483.
- Spanó, L.; Mariotti, D.; Pezzotti, M.; Damiani, F. y Arcioni, S. (1987)** Hairy root transformation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **73**: 523-530.
- Spena, A.; Schmülling, T.; Koncz, T. y Schell, J. (1987)** Independent and synergistic activity of *rolA*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants. *EMBO J.* **6**: 3891-3899.
- Stachel, S. E. y Nester E. W. (1986)** The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* **5**:1445-1454.
- Stachel, S.E.; Messens, E.; Van Montagu, M. y Zambryski, P.C. (1985)** Identification of the signal molecules produced by wounded plant cell that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **318**: 624-629.
- Staniszewska, I.; Krolicka, A.; Malinski, E.; Lojkowska, E. y Szafranek, J. (2003)** Elicitation of secondary metabolites in *in vitro* cultures of *Ammi majus* L. *Enzyme Microb. Technol.* **33**: 565-568.
- Stark, M.M.; Englehart, K.; Sexton, B.F.; Tubridge, R. y Jackson, P. (2003)** Use of a pupillometer to assess change in papillary size post-cannabis. *J. Clin. Forensic Med.* **10**: 9-11.



- Stiller, J.; Martirani, L.; Tupale, S.; Chian, R.J. ; Chiurazzi, M. y Gresshoff, P.M. (1997)** High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lottus japonicus*. J. Exp. Bot. **48(312)**: 1357-1365.
- Stitt, M. (1999)** Nitrate regulation of metabolism and growth. Curr. Opin. Plant Biol. **2**: 178-186.
- Stojakowska, A.; Malarz, J. y Kisiel, W. (2002)** Salicylate and methyl jasmonate differentially influence diacetylene accumulation pattern in transformed roots of feverfew. Plant Sci. **163**: 1147-1152.
- Stougaard, J.; Abildsten, D. y Marcher, K. A. (1987)** The *Agrobacterium rhizogenes* pRi TL-DNA segment as a gene vector system for transformation of plants. Mol. Gen. Genet. **207**: 251-255.
- Stougaard, J. (1995)** *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. En: Methods in Molecular Biology, Vol. 49: Plant gene transfer and expression protocols. (eds.) H. Jones Humana Press Inc., Totona, NJ. pp. 49.
- Sturm, A. y Tang, G.Q. (1999)** The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. Trends Plant Sci. **4**: 401-407.
- Subroto, M.A.; Artanti, N.; Sudrajat, D.; Djanakum, A. y Widayat, E. (2001)** *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Solanum nigrum* L.; spontaneous plant regeneration and endogenous IAA contents. Indon. J. Agric. Sci. **1**: 53-59.
- Sukhapinda, K.; Spivey, K. y Shanhin, E.A. (1987)** Ri-plasmid as a helper for introducing vector DNA into alfalfa plants. Plant Mol. Biol. **8**: 209-216.
- Suresh, B.; Thimmaraju, R.; Bhagyalakshmi, N. y Ravishankar, G.A. (2004)** Polyamine and methyl jasmonate-influenced enhancement of betalaine production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* grown in a bubble column reactor and studies on efflux of pigments. Proc. Biochem. **39**: 2091-2096.
- Szabo, E.; Thelen, A. y Petersen, M. (1999)** Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. Plant Cell Rep. **18**: 484-489.
- Takahashi, W.; Komatsu, T.; Fujimori, M. y Takamizo, T. (2004)** Screening of regenerable genotypes of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). Plant Prod. Sci. **7**:55-61
- Tanaka, Y.; Kishimoto, Y.; Otsuka, K. y Terabe, S. (1998)** Strategy for selecting separation solutions in capillary electrophoresis-mass spectrometry. J. Chromatogr. A **817**: 49-47.

**Tempé, J.; Petit, A. y Farrand, S.K. (1984)** En: Plant gene research. D.P.S. Verna y Th. Holm (eds.). Springer-Verlag/Wien, pp. 271.

**Tempé, J y Casse-Delbart, F. (1989)** Plant vectors and plant transformation: *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmids. En: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Schell, J.; Vasil, K. (eds.), San Diego, USA: Academic Press, pp. 26-49.

**Tepfer, D. (1984)** Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual transformation of the transformed genotype and phenotype. Cell **37**:959–967.

**Tepfer, D. (1989)** Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* biology y plant development, ecology and evolution. En Plant-Microbe Interactions. T Kosuge y E. Nester (eds.) vol. 3. pp. 294-342. Mc Graw Hill, New-York, USA.

**Thom, C. y Raper, K.B. (1945)** Manual of the aspergilli. Baltimore, USA: Williams and Wilkins.

**Thomashow, L. S.; Reeves, S. y Thomashow, M. F. (1984)** Crown gall oncogenesis: evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indoleacetic acid. Proc. Natl Acad. Sci. USA. **81**: 5071-5.

**Thomashow, M.F.; Nugly, S.; Buchholz, W.G. y Thomashow, L.S. (1986)** Molecular basis for the auxin-independent phenotype of crown gall tumor tissues. Science **231**: 616-618.

**Thorpe, T.A. (1980)** Organogenesis *in vitro*: Structural, physiological and biochemical aspects. Int. Rev. Cytol. Suppl. **11A**: 71-111.

**Thorpe, T.A. (1982)** Callus organization and *de novo* formation of shoots, roots and embryos *in vitro*. En: Techniques and Applications of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture and Industry. D.T. Tomes, B.E. Ellis, P.M. Harney, K.J. Kasha, and R.L. Peterson (eds.), University of Guelph, Ontario, pp. 115-138.

**Thorpe, T.A. (1994)** Morphogenesis and Regeneration. En: Plant Cell and Tissue Culture. I.K. Vasil and T.A. Thorpe (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 17-36.

**Tinland, B.; Schoumacher, F.; Gloeckler, V.; Bravo-Angel, A.M. y Hohn, B. (1995)** The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. EMBO J. **14**: 3585-3595.

**Tischner, R. (2000)** Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. Plant Cell Env. **23**: 1005-1024.

- Toivonen, L. (1993)** Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. *Biotechnol. Prog.* **9**: 12-20.
- Tran Thanh Van, K. (1981)** Control of morphogenesis in *in vitro* cultures: *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **32**: 291–311.
- Tsujikawa, K.; Mohri, H.; Kuwayama, K.; Miyaguchi, H.; Iwata, Y.; Gohda, A.; Fukushima, S.; Inoue, H. y Kishi, T. (2006)** Analysis of hallucinogenic constituents in *Amanita* mushrooms circulated in Japan. *Forens. Sci. Inter.* **164(2-3)**: 172-178.
- Turner, C.E.; Hadley, K.W.; Fetterman, P.S.; Doorenbos, N.J.; Quimby, M.W. y Waller, C. (1973)** Constituents of *Cannabis sativa* L. IV: Stability of cannabinoides in stored plant material. *J. Pharm. Sci.* **62**: 1601-1605.
- Turner, C.E.; Elsohly, M.A. y Boeren, E. (1980)** Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A review of the natural constituents. *J. Nat. Prod.* **43 (2)**: 169-234.
- Van Wordragen, M.R. y Dons, H.J.M. (1992)** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of recalcitrant crops. *Plant. Mol. Biol. Rep.* **10**: 12-36.
- Vancanneyt, G.; Schmidt, R.; O'Connor-Sanchez, A.; Willmitzer, L. y Rocha-Sosa, M. (1990)** Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* **220**: 245–250.
- Veliky, I.A. y Genest, K. (1972)** Growth and metabolites of *Cannabis sativa* cell suspension cultures. *Lloydia* **35(4)**: 450-456.
- Vilaine, F.; Charbonnier, C. y Casse-Delbart, F. (1987)** Further insight concerning the TL region of the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* strain A4: Transfer of a 1.9 kb fragment is sufficient to induce transformed roots on tobacco leaf fragments. *Mol. Gen. Genet.* **210**: 111-115.
- Vincent, J.M. (1970)** *En: A manual for the practical study of root nodule bacteria.* I.B.P. Handbook No. 15, Oxford and Edinburgh, Blackwell Scientific Publications.
- Wahby, I.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A.; Ligeró, F.; Caba, J.M. and Fernández-Gutiérrez, A. (2006)** Analysis of choline and atropine in hairy root cultures of *Cannabis sativa* L. by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *Electrophoresis* **27**: 2208-2215.
- Wake, G.; Court, J.; Pickering, A.; Lewis, R.; Wilkins, R. y Perry, E. (2000)** CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory. *J. Ethnopharmacol.* **62(2)**: 105-114.

- Wang, K.L.; Li, H. y Ecker, J.R. (2002)** Ethylene biosynthesis and signalling networks. *Plant Cell* **14**: S131-S151.
- Ward, E.R. y Barnes, W.M. (1988)** *VirD2* protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end to T-strand DNA. *Science* **242**: 927-930.
- Waser, P.G. (1961)** Chemistry and pharmacology of muscarine and some related compounds. *Pharmacol. Rev.* **13**: 465-515.
- Weretilnyk, E.A.; Smith, D.D.; Wilch, G.A. y Summer, P.S. (1995)** Enzyme of choline synthesis in spinach. Response of phospho-base *N*-methyltransferase activities to light and salinity. *Plant Physiol.* **109**: 1085-1091.
- West, M.E. (1991)** *Cannabis* and night vision. *Nature* **351**: 703-704.
- White, F.F.; Taylor, B.H.; Huffman, G.A.; Gordon, M.P. y Nester, E.W. (1985)** Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.* **164**(1): 33-44.
- Wieland, T. (1968)** Poisonous principles of mushrooms of the genus *Amanita*. *Science* **159**: 946-952.
- Wilkinson, S. (1961)** The history and chemistry of muscarine. *Quart. Rev. Chem. Soc.* **15**: 153-171.
- Williamson, E.M. y Evans, F.J. (2000)** Cannabinoids in clinical practice. *Drugs* **60**(6): 1303-1314.
- Willmitzer, L.; Sancez-Serrano, J.; Buschfeld, E. y Schell, J. (1982)** DNA from *Agrobacterium rhizogenes* is transferred to and expressed in axenic hairy root plant tissue. *Mol. Gen. Genet.* **186**: 16-22.
- Wongsamuth, R. y Doran, P.M. (1997)** Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots. *Biotechnol. Bioeng.* **54**: 401-415.
- Wynter-Adams, D.M.; Simon, O.R.; Gossell-Williams, M.D. y West, M.E. (1999)** Isolation of a muscarinic alkaloid with ocular hypotensive action from *Trophis racemosa*. *Phytother. Res.* **13**: 670-674.
- Yamamoto, L.; Umebayashi, H.; Watanabe, K. y Yoshimura, H. (1988)** Interactions of *Cannabis* extract,  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and 11-hydroxy- $\Delta^8$ -tetrahydrocannabinol with methamphetamine in mice. *Res. Commun. Abuse* **9**: 107-116.

- Yamamoto, I.; Matsunaga, T.; Kobayashi, H.; Watanabe, K. y Yoshimura, H. (1991)** Analysis and Pharmacotoxicity of Feruloyltyramine as a New Constituent y p-Coumaroyltyramine in *Cannabis sativa* L. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **40**: 465-469.
- Yan, Q.; Hu, Z.; Tan, R.X. y Wu, J. (2005)** Efficient production and recovery of diterpenoid tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures with *in situ* adsorption, elicitation and semi-continuous operation. *J. Biotechnol.* **119**: 416-424.
- Yaoya, S.; Kanho, H.; Mikami, Y.; Itani, T.; Umehara, K. y Kuroyanagi, M. (2004)** Umbelliferone release from hairy root cultures of *Pharbitis nil* treated with copper sulfate and its subsequent glucosylation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 1837-1841.
- Ye, N.; Zhu, R.; Gu, X. y Zou, H. (2001)** Determination of scopolamine, atropine y anisodamine in *Flos daturae* by capillary electrophoresis. *Biomed. Chromatogr.* **15**: 509-512
- Ylinen, M.; Naaranlahti, T.; Lapinjoki, S.; Huhtikangas, A.; Salonen, M.L.; Simola, L.K. y Lounasmaa, M. (1986)** Tropane alkaloids from *Atropa belladonna*, part I. Capillary gas chromatographic analysis. *Planta Med.* **52**: 85-87.
- Yoshikawa, M.; Yamada, N. y Takeuchi, Y. (1993)** Elicitors: Their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions. *Plant Cell Physiol.* **34**: 1163-1173.
- Young, C. y Nester, E.W. (1988)** Association of the *virD2* protein with the 5' end of T strands in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **170**: 3367-3374.
- Yu, S.; Kwok, K. y Doran, P. (1996)** Effect of sucrose, exogenous product concentration, and other culture conditions on growth and steroidal alkaloid production by *Solanum aviculare* hairy roots. *Enzyme Microb. Technol.* **18**: 238-43.
- Yukimune, Y.; Tabata, H.; Higashi, Y. y Hara, Y. (1996)** Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature Biotechnol.* **14**: 1129-1132.
- Zabetakis, I.; Edwards, R. y O'Hagan, D. (1999)** Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry* **50**: 53-56.
- Zaenen, I.; Van Lerebeke, N.; Teuchy, H.; Van Montagu, M. y Schell, J. (1974)** Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium*-strains. *J. Mol. Biol.* **86**: 109-127.

- Zambryski, P.; Joos, H.; Genetello, C.; Leemans, J.; Van Montagu, M. y Schell, J. (1983)** Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* **2**:2143–2150.
- Zambryski, P.; Tempe, J. y Schell, J. (1989)** Transfer y function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti y Ri plasmids in plants. *Cell* **56**: 193-201.
- Zhang, C.; Yan, Q.; Cheuk, W. y Wu, J. (2004)** Enhancement of tanshinone production in Planta Med. *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag<sup>+</sup> elicitation and nutrient feeding. **70**: 147-151.
- Zhang, L.; Liu, Y. y Chen, G. (2004)** Simultaneous determination of allantoin, choline and L-arginine in *Rhizoma Dioscoreae* by capillary electrophoresis. *J. Chromat. A* **1043**: 317-321.
- Zhao, Z.; Zhu, W.H.; Hu, Q. y He, X.W. (2000)** Improved indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* suspension cell cultures by various chemicals. *Biotechnol. Lett.* **22**: 1221-1226.
- Zhao, J.; Fujita, K.; Yamada, J. y Sakai, K. (2001)** Improved beta-thujaplicin production in *Cupressus lusitanica* suspension cultures by fungal elicitor and methyl jasmonate. *Appl. Microb. Biotechnol.* **55**: 301-305.
- Zottini, M.; Moschella, A.; Mandolino, G. y Ranalli, P. (1996)** Efforts to improve tissue culture in hemp (*Cannabis sativa* L.). Abstracts of the Third European Symposium on Industrial Crops and Products, Reims (France), April 22–24, pp. 15.