

MEMORIA DEL PROYECTO

Título

Regeneración de plantas transgénicas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) y obtención de líneas puras resistentes a virosis.

Número	RTA01-087
Departamento	Departamento de Genética Vegetal
Centro de Investigación	IRTA, Centro de Cabrils
Coordinador del Proyecto	Ramon Dolcet Sanjuan
Duración	2001-2003

1. Introducción

Siendo originario de América del Sur, actualmente casi la mitad del pimiento (*Capsicum annuum* L.) se produce en la Cuenca del Mediterráneo. En ésta los principales productores son, de mayor a menor, Turquía, España e Italia. En España, el pimiento es uno de los cultivos hortícolas más importantes, siendo las provincias de mayor producción Almería, Murcia y Alicante. La importancia de este cultivo hortícola en España ha aumentado durante las últimas dos décadas debido al aumentar su cultivo en invernadero. Una cuarta parte de la producción de pimiento se exporta para su consumo en fresco, una quinta parte se destina a la industria nacional de transformados, y el resto se consume en fresco en el mercado interior (Nuez et al., 1996).

La gran cantidad de patógenos que atacan el pimiento es la principal dificultad para su cultivo (Nuez et al., 1996; Gil, 1993). Las enfermedades que son difíciles de controlar, cuando ya han atacado el cultivo, son las que causan mayores pérdidas. Éste es el caso de los virus para los que solo se dispone en la actualidad de una capacidad de control limitada. En condiciones de cultivo precoz con altos rendimientos económicos, que permiten controlar las plagas (trips, pulgones, ácaros, orugas, mosca blanca, minadores, y nemátodos), bacteriosis (*Pseudomonas solanacearum*, *Erwinia carotovora*, o *Xanthomonas campestris*) o los hongos (seca o tristeza, *Phytophthora capsici*, verticilosis, *Verticillium dahliae*, podredumbre gris, *Botrytis cinerea*, oidio, alternariosis, antracnosis, cercosporiosis, o fusariosis) que afectan al pimiento, algunas virosis son los principales problemas de este cultivo. Por ejemplo, la incidencia de algunos virus (p.e. CMV, PVY, TEV, TSWV) en pimiento puede alcanzar el 90% de las plantas en una plantación (Padgett

et al., 1990; Abdalla et al., 1991), y esto puede suponer una pérdida del 10 al 60% del rendimiento del cultivo (Boiteux et al., 1993).

La producción de pimiento o la calidad del fruto se ve mermada en el ámbito mundial por el virus del grabado del tabaco (TEV, tobacco etch virus); Y de la patata (PVY, potato virus Y); moteado suave del pimiento (PMMV, pepper mild mottle virus); mosaico del pepino (CMV, cucumber mosaic virus); bronceado del tomate (TSWV, tomato spotted wilt virus); moteado del pimiento (PeMV, pepper mottle virus); mosaico del tabaco (TMV, tobacco mosaic virus); mosaico del tomate (ToMV, tomato mosaic virus); mosaico de la alfalfa (AMV, alfalfa mosaic virus); y marchitamiento del haba (BBWV, broad bean wild virus), y un largo etcétera. Especialmente importantes son el TSWV, TEV, PVY, CMV, ToMV y PMMV. Las virosis que más afectan en España al cultivo del pimiento son el TSWV, PVY, CMV, PMMV, AMV, ToMV y BBMV (Dufour et al., 1989; Gil, 1993; Nuez et al., 1996).

Todos los virus solo pueden multiplicarse en el interior de las células vivas hospedantes utilizando sus mecanismos de replicación, transcripción y traducción a proteínas. Por este motivo no es posible utilizar métodos directos de lucha química, pues los productos que interfieren la replicación del virus también lo hacen con la célula huésped. Tampoco se dispone de agentes que permitan bloquear la adsorción y penetración del virus dentro de la célula vegetal. Esta diferencia frente a enfermedades causadas por hongos, bacterias, o plagas, en las que se pueden emplear productos químicos más o menos efectivos, explica la importancia de las enfermedades víricas en pimiento. Otra característica que afecta su control es el modo de transmisión por contacto, mecánicamente, por la semilla, o mediante un organismo vector (pulgones, trips, nemátodos). Este aspecto, junto con el gran número de especies que pueden actuar como plantas huésped y la capacidad que los virus tienen en mutar, hace que el proceso epidemiológico sea muy complejo, limitando nuestras posibilidades de control y generando fenómenos imprevisibles en su repentina aparición y desaparición en cada zona de cultivo.

Los medios de control indirectos tratan de disminuir el nivel de inóculo existente y controlar las poblaciones de los insectos vectores. No obstante la experiencia acumulada con algunas virosis (p.e. PVY, CMV, TEV, TSWV) indica que estos métodos no son suficientemente eficaces lo que nos lleva al empleo de variedades resistentes como medio más eficaz de control.

A pesar de que existen, dentro de *Capsicum annuum*, algunas accesiones resistentes o parcialmente resistentes a determinados aislados de algunos virus (p.e. PVY, CMV, TEV,

TMV, ToMV), las utilizadas en el desarrollo de nuevas variedades resistentes son pocas, y con caracteres no deseables (p.e. fruto pequeño, cónico o picante). Para otros virus (p.e. TSWV, PMMV), no existen variedades cultivadas de pimiento *C. annuum* que sean total o parcialmente resistentes. Por este motivo y para encontrar mayores niveles de resistencia es necesario acudir a otras especies (*C. chinense*, *C. chacoense*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. eximium*, *C. flexuosum*, *C. pubescens*). Sin embargo, estas fuentes no son fácilmente utilizables en programas de mejora, debido a las barreras de cruzamiento o a la baja calidad del fruto, lo que complica y alarga los planes de mejora.

La biotecnología aplicada a la mejora genética puede acelerar un proceso de mejora clásico. Por ejemplo, la utilización conjunta de la obtención de líneas dihaploides, mediante el cultivo *in vitro* de anteras, y la selección precoz mediante marcadores moleculares puede facilitar la introgresión de caracteres de una especie de pimiento a la *C. Annuum* (Dolcet-Sanjuan et al., 1997). Otra parte de la biotecnología aplicada a la mejora, y que nos ocupa en el presente proyecto, es la incorporación de genes quiméricos mediante los métodos de ingeniería genética aplicables a plantas. La incorporación de un gen, no necesariamente procedente de otra especie vegetal, en el genoma de una variedad cultivada de pimiento, a la que le confiera un carácter deseable (p.e. resistencia a un virus), sin modificar el resto de los caracteres, requiere del desarrollo de un método de transformación genética para dicha especie. El desarrollo de un método para la obtención de plantas transgénicas en pimiento, que podrá emplearse en la incorporación de resistencias a virosis, tiene interés no solo autonómico, sino también nacional y mundial, ya que algunas virosis afectan el cultivo del pimiento en todas las áreas de producción.

Este proyecto se encuadra en la línea prioritaria de (1) tecnologías genéticas para la mejora de especies agrícolas, (1.1) identificación de genes responsables de caracteres de interés agrario, particularmente para resistencia a enfermedades en los cultivos, (1.2) desarrollo de germoplasma vegetal mejorado que pueda ser utilizado para la posterior obtención de cultivares comerciales. Además también se encuadra en la línea prioritaria de (2) protección vegetal, prevención de daños causados por agentes bióticos en cultivos agrícolas, y (2.4) control integrado de enfermedades, desarrollo de métodos biotecnológicos.

2. Planteamiento y desarrollo de las actividades realizadas

El presente proyecto pretende desarrollar un método de transformación genética en pimiento mediante el empleo de técnicas de regeneración adventicia *in vitro* y el cocultivo con

Agrobacterium tumefaciens. La incorporación de genes mediante transformación genética en variedades comerciales de pimiento, proporcionaría una herramienta alternativa a la mejora genética, que ahorraría tiempo en la introducción de genes y evitaría la recombinación genética inherente a las técnicas de mejora clásica. Siguiendo esta estrategia se han establecido métodos para la transformación genética de melón, pepino, tomate y berenjena, y entre otras se ha mejorado la resistencia a CMV en algunas de estas especies. Este no es el caso en pimiento dulce (*C. annuum*), aunque si existen algunos trabajos de transformación genética en otras especies (*C. frutescens*) (Cai et al., 2002). La principal dificultad en el establecimiento de un proceso de transformación genética para pimiento está en definir las condiciones de cultivo *in vitro* que favorezcan la regeneración adventicia de plantas fértiles mediante organogénesis adventicia directa, dependiente del genotipo, o indirecta, a partir de callo, o la embriogénesis somática, así como la transformación genética de los tejidos morfogénicos.

El primer objetivo de este proyecto de investigación es el desarrollar una metodología de transformación genética para pimiento (*Capsicum annuum* L.) de fruto dulce, cuadrado o rectangular, mediante técnicas de cultivo *in vitro* y biología molecular. El alcance de este objetivo permitiría la aplicación de esta tecnología a la mejora genética del pimiento para caracteres de resistencia a plagas y enfermedades. En particular, y como segundo objetivo de este proyecto se aplicará la metodología desarrollada para obtener plantas resistentes a virosis (p.e. TEV, PVY, CMV) de importancia agronómica en este cultivo hortícola. Para la consecución de estos objetivos se procederá a resolverlos en las siguientes fases:

- Mejorar un sistema de regeneración adventicia directa, existente y desarrollado por nuestro grupo de investigación, a partir de explantos procedentes de la semilla: cotiledones, hipocotilos y hojas verdaderas (Dolcet-Sanjuan et al., 2000).
- Establecer un protocolo para la obtención de plantas transgénicas de pimiento mediante la utilización del sistema de regeneración adventicia directa y el cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens*.
- Establecer un sistema de regeneración indirecta a partir del tejido indiferenciado (también denominado callo) que se desarrolla sobre los mismos explantos (cotiledones, hipocotilos, hojas), después del cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens*. El éxito en esta regeneración indirecta garantizaría la obtención de plantas transgénicas ya que nuestro grupo ya ha demostrado la obtención de callos transgénicos.

- Alternativamente, y en el caso de que los sistemas anteriores no resulten en la producción de plantas transgénicas se pasará a desarrollar un sistema de transformación mediante cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens* de cultivos de anteras que utilizamos para la producción de líneas dihaploides.
- Cuando el primer objetivo, obtención de plantas transgénicas, se haya conseguido se procederá a incorporar genes que codifican por la cápside de la proteína de los virus TEV, PVY o CMV, mediante construcciones facilitadas por otros equipos de investigación. Seguidamente se determinará la eficacia de cada gen quimérico en conferir resistencia al virus.

La finalidad última de este proyecto es llegar a producir plantas de pimiento más tolerantes a virosis y por tanto mejorar la calidad en la producción de este cultivo hortícola.

3. Grado de consecución de los objetivos

De los cinco objetivos inicialmente planteados en este proyecto de investigación, se han abordado los cuatro primeros, que han permitido profundizar en el conocimiento de los factores que permiten desarrollar una técnica para la transformación genética en pimiento (*Capsicum annuum* L.). Sin embargo, los tres años de duración del mismo han resultado ser insuficientes para la consecución del último objetivo, y obtener plantas resistentes a virosis. El proyecto se ha concentrado en la obtención de un protocolo de regeneración y transformación partiendo de LDHs de pimiento, seleccionadas por sus características agronómicas.

Los ensayos orientados a mejorar el sistema de regeneración adventicia directa, desarrollado en el proyecto anterior (SC98-074) por nuestro grupo de investigación (Dolcet-Sanjuan et al., 2000), a partir de explantos procedentes de la semillas germinadas in vitro (secciones de cotiledones e hipocotilo) no resultaron en una mejora significativa del método, ya que el sistema depende mucho del genotipo utilizado, y los resultados (Figura 1 y 2) ya son adecuados. Por otro lado, y como alternativa a la regeneración adventicia directa, el establecimiento de un sistema de regeneración indirecta a partir del tejido indiferenciado, o callo, desarrollado sobre los mismos cotiledones después del cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens*, no ha sido hasta ahora posible. Este sistema podría garantizar la obtención de plantas transgénicas ya que nuestro grupo ya ha demostrado la obtención de callos transgénicos (Dolcet-Sanjuan et al., 2000). Alternativamente, por si los sistemas anteriores no resultaban en la producción de plantas transgénicas, se inició el desarrollo de un sistema de transformación mediante cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens* de cultivos de anteras

utilizados para la producción de líneas dihaploides (Dolcet-Sanjuan, et al. 1997.). A pesar de que se consiguiera obtener embriogénesis secundaria sobre los embriones androgénicos, la inoculación con *Agrobacterium* fue difícil de controlar y la excesiva contaminación del medio líquido con bacteria fue un problema limitante del desarrollo de los embriones a plántulas.

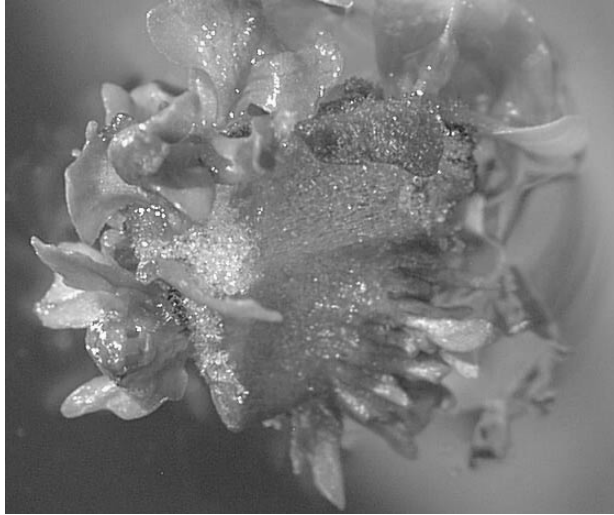


Figura 1. Regeneración adventicia sobre secciones de cotiledón.



Figura 2. Plántulas adventicias aclimatadas.

Partiendo del sistema de regeneración directa desarrollado por nuestro grupo, junto con un nuevo sistema de regeneración a partir de hojas verdaderas, así como a partir de plántulas decapitadas entre los dos cotiledones, se han realizado varios ensayos de transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido binario pBIN19-sGFP (con el gen marcador *sGFP*, green fluorescence protein, y el selectivo *nptII*, resistencia a kanamicin), y el pNOV2819 (con el gen selectivo *PMI*, phosphomannose isomerase, Reed et al. 1999). En estos ensayos se seleccionaron brotes que expresaban el gen marcador *sGFP*, en algunos de sus tejidos. Sin embargo, no fue posible demostrar por PCR y hibridación Southern, de que la planta resultante de esta selección hubiera incorporado en su genoma dichos genes. Los resultados evidencian la formación de plantas quiméricas, con sectores transgénicos, sobre secciones de cotiledón y plántulas decapitadas. La expresión de la *sGFP* en algunos tejidos de brotes y hojas (Figura 3 y 4), junto a PCR positivas para muestras recogidas de partes distintas de la misma planta (Figura 5 y 6), demuestran la regeneración de plantas quiméricas para los genes incorporados.

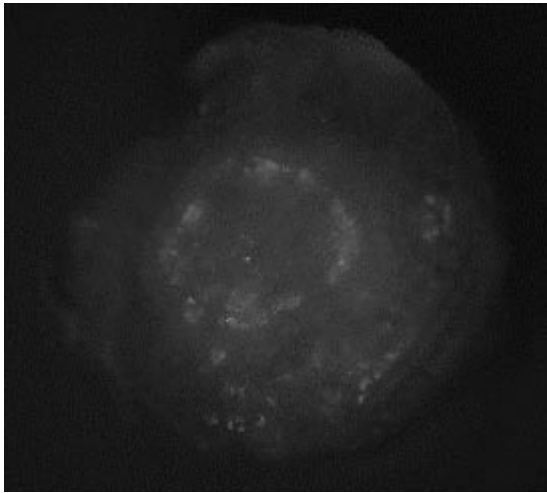


Figura 3. Expresión de sGFP en una sección transversal internodal de un brote adventicio.

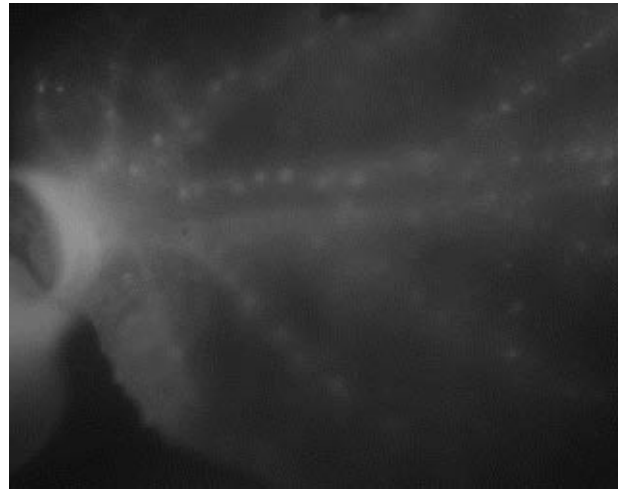


Figura 4. Expresión de sGFP en una hoja de un brote adventicio.

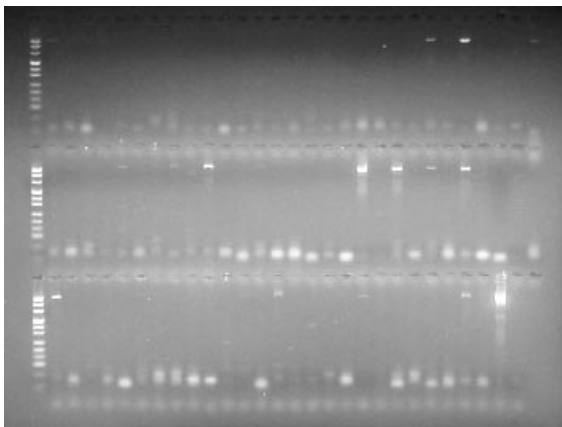


Figura 5. Amplificación por PCR del gen *PMI* en plántulas aclimatadas T0.

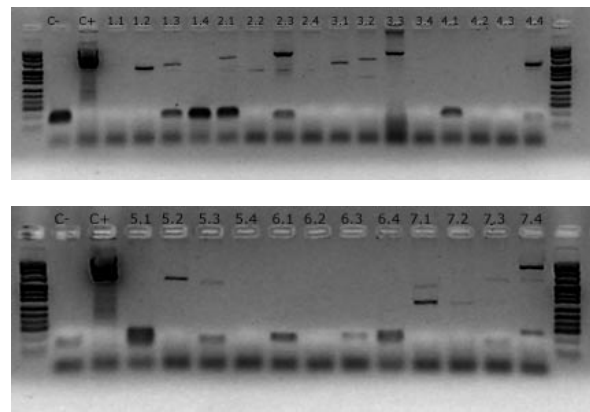


Figura 6. Amplificación por PCR del gen *PMI* en plantas quiméricas T0 en fase de fructificación.

Estos ensayos de transformación se realizaron sobre un total de 25 mil secciones de cotiledón, 10 mil secciones de hipocotilo, mil hojas, y 600 plántulas decapitadas. De estos ensayos se han regenerado y aclimatado un total de 635 plantas (Figura 7), de cinco LDHs distintas. De ellas se han seleccionado 7 como PCR positivas, 1 procedente de ensayos con secciones de cotiledón, y 6 a partir de plántulas decapitadas. Esto supone unos resultados parciales de un 0,6% de plántulas PCR positivas para secciones de cotiledón, y un 10,3% para plántulas decapitadas. De estos ensayos se seleccionaron 7 plantas T0 con sectores transgénicos, que fueron autofecundadas. Su progenie T1 fue germinada (Figura 8) y evaluada por PCR, individualmente y en bloques de 10 plantas, para la presencia del gen introducido. El análisis por Southern de la T1, en grupos de 10 plantas, ha mostrado que las plantas no son transgénicas. Sin embargo, de los análisis individuales por PCR se seleccionaron 3 plantas con posible incorporación del gen *PMI*. Estas tres plantas serán analizadas por hibridación

Southern, para determinar el número de copias del gen incorporado en su genoma, y serán autofecundadas (T2) para su auto-perpetuación.



Figura 7. Plantas T0 para su autofecundación.



Figura 8. Plantas T1 seleccionadas para su autofecundación.

En los numerosos estudios realizados con pimiento (*Capsicum annuum*), en particular el de tipo dulce rectangular o cuadrado, se ha observado que es una de las especies más recalcitrantes a la regeneración adventicia *in vitro* y a la transformación genética vía *Agrobacterium*. Los resultados obtenidos en este proyecto han supuesto un avance muy importante en la puesta a punto de un sistema de regeneración y transformación genética en pimiento mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

4. Conclusiones y resultados alcanzados

La mejora genética del pimiento puede beneficiarse del desarrollo de esta técnica de transformación genética, mediante *Agrobacterium tumefaciens*, por su capacidad de insertar en el genoma de la planta el T-DNA, que puede ser modificado para insertar los genes de interés. Con *Agrobacterium* se han transformado varias especies cultivadas (p.e. tomate, berenjena, melón, pepino), entre ellas algunas de pimiento de origen asiático (*C. frutescens*) o de pimiento picante (Cai et al., 2002). Sin embargo se han encontrado muchas dificultades para transformar los pimientos de tipo dulce cuadrado (tipo 'California' o 'Yolo'), tipo dulce rectangular (tipo 'Lamuyo'), o tipo cónico estrecho (tipo 'Dulce Italiano'). El objetivo de este proyecto ha sido poner a punto, para estos tipos de pimiento, un sistema de transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens*. La disponibilidad de un sistema de transformación genética, complementario, e integrable a un esquema clásico de mejora, permitiría introducir distintos caracteres de interés agronómico, disponibles en la actualidad

(resistencias a virus, hongos, bacterias, nematodos) o que puedan desarrollarse en el futuro, sin modificar el resto de las características de la variedad.

Durante el desarrollo de este proyecto se ha corroborado la dificultad encontrada también por otros grupos en la regeneración adventicia y transformación genética de este tipo de pimiento. Con este proyecto se ha desarrollado un protocolo para regenerar plantas fértiles de pimiento dulce, a partir diferentes explantos de semilla, en suficiente cantidad como para facilitar la obtención de brotes transgénicos.

La información técnica y científica proporcionada por este proyecto se centra en el desarrollo y optimización de un protocolo de regeneración de plantas adventicias, procedentes de semillas de líneas dihaploides (LDHs), de las que se pueden llegar a obtener entre un 0,6 y un 10,3% de transgénicas. Sin embargo las plantas obtenidas son quiméricas para los genes introducidos y por tanto su perpetuación por semilla se ve dificultada. Queda pendiente para futuros trabajos de investigación el desarrollar un método de regeneración indirecta que pueda facilitar la obtención de plantas transgénicas completas.

Este proyecto ha permitido realizar un avance muy importante en la puesta a punto de un sistema de regeneración y transformación genética en pimiento. La futura actividad en esta línea de trabajo, se financiará con un contrato con una empresa privada, en colaboración con investigadores de UC Davis, interesados en nuestro trabajo, y contactados mediante las comunicaciones a congresos realizadas durante el desarrollo de este proyecto.

5. Aplicación al sector y posible difusión de resultados

Este proyecto se encuadra dentro de la línea preferente 1.2 del Programa Sectorial I+D Agrario y Alimentario del MAPA, en la que se contempla el desarrollo de tecnologías genéticas para la mejora de especies agrícolas, y el desarrollo de germoplasma vegetal que pueda ser utilizado para la posterior obtención de cultivares y líneas comerciales, ya que el objetivo final es el desarrollar resistencias o tolerancias a virosis hortícolas con la consiguiente reducción del empleo de pesticidas para controlar los insectos vectores. Además también se encuadra en la línea prioritaria de (2.4) control integrado de enfermedades, desarrollo de métodos biotecnológicos. El desarrollo de un método para la obtención de plantas transgénicas en pimiento, podrá emplearse en la incorporación de resistencias a virosis y otras enfermedades. Si se consiguiera poner a punto un protocolo eficiente de transformación y regeneración, tendría sin duda efectos muy beneficiosos para la horticultura mundial.

La información científica y técnica proporcionada por el proyecto, que se ha divulgado en congresos, se ha centrado en algunas características del medio utilizado durante la regeneración adventicia de plantas, el alto nivel de viabilidad y fertilidad de las plantas regeneradas. En un futuro se difundirá en congresos o en publicaciones la producción de plantas quiméricas transgénicas. A pesar de que estos resultados son solo parcialmente positivos, el éxito conseguido ha despertado el interés de algunos laboratorios y compañías de semillas en colaborar con nosotros. Fruto de este interés existe un acuerdo de colaboración con UC Davis y un contrato de investigación con una empresa privada.

Hasta la actualidad hemos preferido no publicar la metodología desarrollada, reduciendo la divulgación de los resultados a las comunicaciones en congresos, reuniones científicas, y otros trabajos de difusión de resultados a través de la prensa. Con ello pretendemos mejorar la calidad de la publicación, que se realizará a principios del 2005.

Publicaciones:

Huerta, A., Claveria, E., Gonzalo, M.J., Garcia-Mas, J., and Dolcet-Sanjuan, R. (in press). Adventitious shoot formation, plant regeneration, and genetic transformation of sweet bell pepper (*Capsicum annuum* L.).

Congresos:

“The 5th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding (ISHS)”, Debrecen (Hungria) entre el 12 y 17 de Septiembre 2004.

Prensa:

Avui "La carrera transgènica dels pebrots", del 8 de junio del 2002

Avui "Transgènics: llibertat per decidir", del 19 de abril del 2004.

6. Colaboraciones y ayudas recibidas o prestadas

En este proyecto colaboramos con Machteld Mok (Department of Horticulture, OSU, Corvallis, Oregon), Lise Jouanin (INRA-Centre de Versailles, France), y Syngenta biotechnology, que nos proporcionan las cepas de *Agrobacterium* y los vectores binarios para poner a punto el sistema de transformación genética. Colaboraciones con el equipo de IRTAGen, y con el equipo de genética molecular del Departamento de Genética del Centro de Cabrils, han sido necesarias para el desarrollo de este proyecto.

7. Vinculación del proyecto a programas de cooperación científica y técnica internacional; entidades extranjeras con las que se ha cooperado (nombre, dirección y país); financiación y cuantía, en su caso, y utilización de resultados alcanzados.

Este proyecto no ha estado relacionado ni financiado por ningún programa de cooperación científica o técnica internacional. Sin embargo y como se ha indicado en el apartado anterior, si ha existido colaboración científica con otros grupos.

8. Referencias.

- Abdalla, O.A., P.R. Desjardins, and J.A. Dodds. 1991. Identification, disease incidence, and distribution of viruses infecting peppers in California. *Plant Dis.*, 75:1019-1023.
- Boiteux, L.S., T. Nagata, W.P. Dutra, and M.E.N. Fonseca. 1993. Sources of resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) in cultivated and wild species of *Capsicum*. *Euphytica*, 67:89-94.
- Cai, W., R. Fang, F. Zhang, J. Zhang, X. Chen, G. Wang, K. Mang, H. Shang, X. Wang, and Y. Li. 2002. Virus-resistant chili pepper produced by *Agrobacterium* species-mediated transformation, p. 563-578. In: G.G. Khachatourians, A. McHughen, R. Scorza, W.-K. Nip, and Y.H. Hui (eds.). *Transgenic plants and crops*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Dolcet-Sanjuan, R., E. Claveria, and A. Huerta. 1997. Androgenesis in *Capsicum annuum* L. - Effects of Carbohydrate and CO₂ Enrichment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122:468-475.
- Dolcet-Sanjuan, R.; Claveria, E.; Huerta, A.; Gonzalo, M.J.; Garcia-Mas, J. (2000). Adventitious shoot formation, plant regeneration, and genetic transformation of sweet bell pepper (*Capsicum annuum* L.) dihaploid lines. The 4th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding (ISHS). Tampere (Finland), 2 - 7 July, p. 57.
- Dufour, O., A. Palloix, K.G. Selassie, E. Pochard, and G. Marchoux. 1989. The distribution of cucumber mosaic virus in resistant and susceptible plants of pepper. *Can. J. Bot.*, 67:655-660.
- Gil, R. 1993. Pepper growing in Spain. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 12:32-38.
- Nuez, F., R. Gil, and J. Costa. 1996. *El cultivo de pimientos, chiles y ajies*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Padgett, G.B., F.W. Nutter, C.W. Kuhn, and J.N. All. 1990. Quantification of disease resistance that reduces the rate of tobacco etch virus epidemics in bell pepper. *Phytopathology*, 80:451-455.
- Reed JN, Chang Y-F, McNamara DD, Beer S & Miles PJ, 1999. High frequency transformation of wheat with the selectable marker mannose-6-phosphate isomerase (PMI). *In Vitro* 35:57-A abstract P-1079.

El Coordinador del Proyecto

Ramon Dolcet Sanjuán

25 de junio de 2004