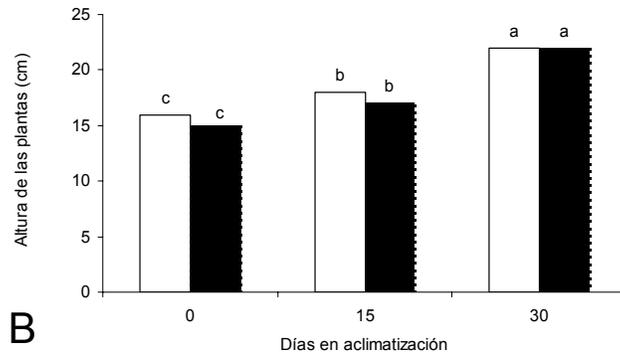
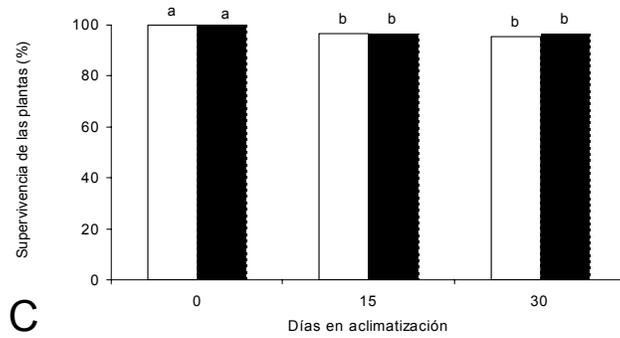


**A**  
 Media general = 21.0 g Error típico de la media = 1.1 g



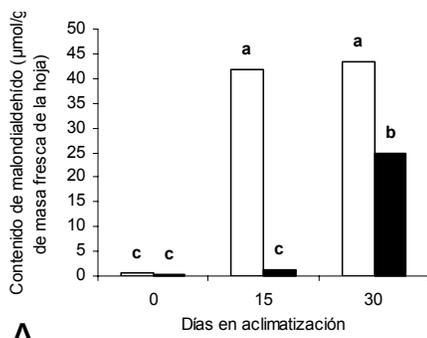
**B**  
 Media general = 18.33 cm Error típico de la media = 0.92 cm



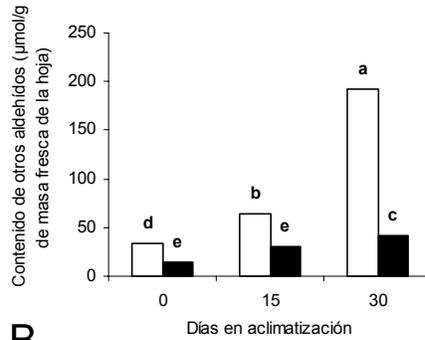
**C**  
 Media general = 97.56 % Error típico de la media = 0.97 %

 Plantas no transformadas  
 Plantas transformadas

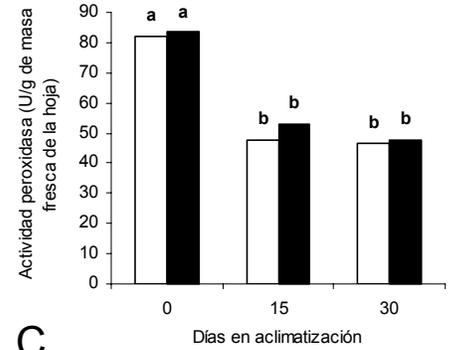
**Figura 7.** Efecto de la transformación genética en la supervivencia y en el crecimiento de las vitroplantas durante la aclimatización. Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tukey,  $p > 0.05$ ). Los porcentajes de supervivencia se transformaron para el análisis según  $y' = 2 \cdot \arccoseno (y/100)^{0.5}$ .



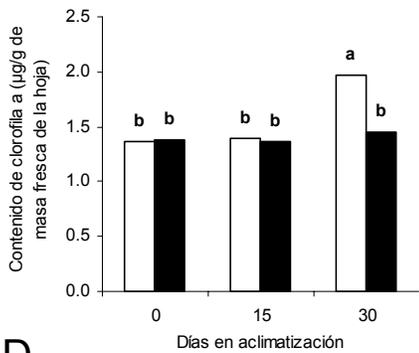
**A**  
 Media general = 18.72 µmol/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 1.38 µmol/g de masa fresca de la hoja



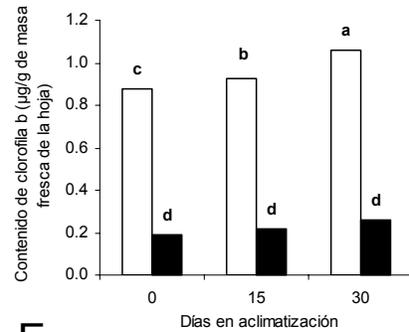
**B**  
 Media general = 35.47 µmol/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 4.11 µmol/g de masa fresca de la hoja



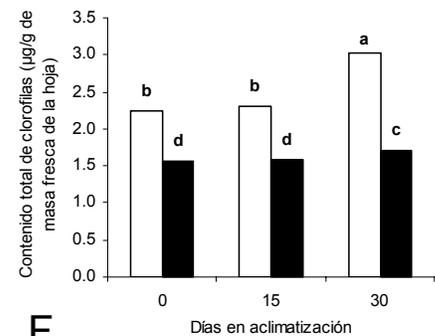
**C**  
 Media general = 66.48 U/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 3.29 U/g de masa fresca de la hoja



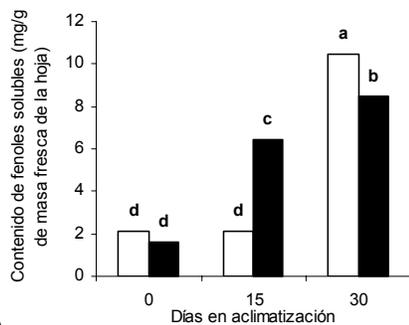
**D**  
 Media general = 1.37 µg/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 0.01 µg/g de masa fresca de la hoja



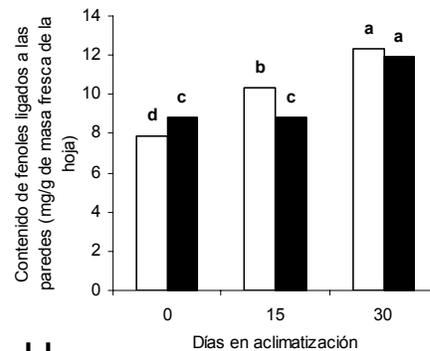
**E**  
 Media general = 0.55 µg/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 0.01 µg/g de masa fresca de la hoja



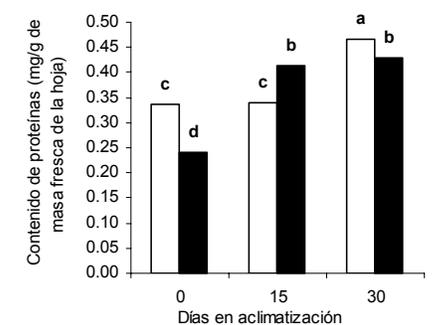
**F**  
 Media general = 1.92 µg/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 0.01 µg/g de masa fresca de la hoja



**G**  
 Media general = 5.19 mg/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 0.23 mg/g de masa fresca de la hoja



**H**  
 Media general = 10.03 mg/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 0.29 mg/g de masa fresca de la hoja



**I**  
 Media general = 0.37 mg/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 0.01 mg/g de masa fresca de la hoja

Plantas no transformadas
  Plantas transformadas

**Figura 8.** Efecto de la transformación genética de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cultivar Cayena lisa Serrana en los niveles endógenos de actividad peroxidasa (C), malondialdehído (A), otros aldehídos (B), pigmentos clorofílicos (a, b, total) (D,E,F), fenoles libres y ligados a las paredes celulares (G,H) y proteínas (I). Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, tukey  $p > 0.05$ ).

En las plantas transformadas decrecieron de manera marcada los niveles de malondialdehído a los 15 y 30 d durante la aclimatización. En el caso de otros aldehídos, clorofila *b* y totales también fueron menores los valores de estos indicadores en este grupo de plantas (0-30 d).

Los resultados mostrados sugieren que la integración del ADN foráneo en las plantas de piña tiene lugar en una región del genoma relacionado con la síntesis de clorofilas y la peroxidación lipídica.

Para las plantas obtenidas por tecnologías recombinantes, los efectos indeseados encontrados pueden aparecer por el proceso de introducción de genes foráneos. También puede ocurrir como resultado de la interacción de los transgenes, la composición genética natural de la planta y el medio ambiente (Brake *et al.*, 2005). Además, la inserción al azar de las secuencias de ADN pueden provocar la modificación, interrupción o silenciamiento de los genes existentes y la activación de los genes silenciados (Haslberger, 2003; Danny *et al.*, 2006).

En la actualidad, la transgénesis es una herramienta importante para el mejoramiento genético (Gómez-Lim y Litz, 2004). Sin embargo, existen detractores de los organismos modificados genéticamente (Schubert, 2005). Por lo tanto estudios a niveles bioquímicos, fisiológicos, agrícolas y ecológicos deben desarrollarse para determinar si el producto alimentario que se oferta al mercado tiene inocuidad científicamente demostrada (Gail *et al.*, 2003).

Varios estudios metabólicos en plantas transgénicas revelan efectos no deseados provocados por la transformación genética (Haslberger, 2003). Se han informado en el cultivo de la papa (Conner *et al.*, 1994; Birch *et al.*, 2002), en arroz (Momma *et al.*, 1999), canola (Shewmaker *et al.*, 1999), en semillas de colza (Al-Kaff *et al.*, 2000b), en cebada (Horvath *et al.*, 2001) y en maíz (Saxena y Stotzky, 2001).

Al-Kaff *et al.* (2000a) informaron que en plantas transgénicas de colza que contenían el gen *bar*, de manera inexplicable, se hizo sensible al herbicida FINALE<sup>®</sup>, después de la infección con el virus del mosaico de la coliflor. El cultivo transgénico en condiciones naturales, mostró una expresión diferente de los transgenes ante la infección viral del patógeno, con la supresión de la expresión del gen *bar*. Esta respuesta está relacionada con el proceso transcripcional de los genes foráneos y el silenciamiento. La estabilidad en la expresión de los transgenes es un importante carácter en los cultivos genéticamente modificados, por lo que ante situaciones de patógenos trasmisores de virus pueden dar lugar a la pérdida de expresión de otros genes no

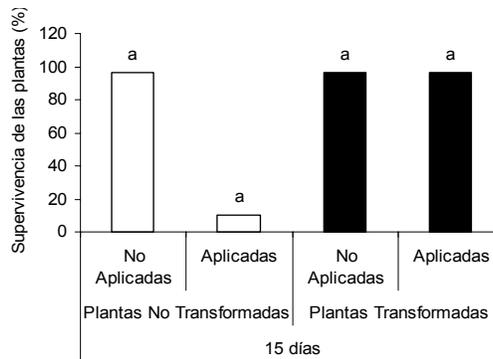
relacionados con la resistencia a enfermedades. Este efecto es una consecuencia de la activación de genes de defensa responsables de evitar que se replique el virus, lo que causa que se silencien genes homólogos.

Por otra parte, Horvath *et al.* (2001) dieron a conocer cambios inesperados en la estabilidad y expresión del transgen insertado en el genoma del cultivo de la cebada. Estudios de campo demostraron diversidad de genotipos como resultado de la transformación genética e introducción del gen *bar*. También Satu (2005) informaron en el cultivo de la papa variaciones en su composición natural. Para su estudio utilizaron la metabolómica que les permitió hacer una caracterización completa de la composición metabólica de líneas transgénicas y compararla con el cultivar progenitor. Los resultados indicaron eventos metabólicos inesperados en seis cultivares genéticamente modificados. Estos investigadores asociaron la síntesis de nuevos metabolitos, a la frecuencia y distribución de los transgenes. En la expresión del fenotipo de plantas adultas se encontraron cambios. Hasta el momento, no se tiene conocimiento de referencias publicadas sobre los efectos indeseados que pudieran provocar los genes de *quitinasa* y *AP24*.

Los resultados de este acápite indican que la transformación genética de la piña con los genes *bar*, *AP24* y *quitinasa* causaron cambios en los niveles bioquímicos, durante las etapas tempranas de aclimatización *ex vitro*. Los niveles de malondialdehído y otros aldehídos son diferentes entre las plantas transformadas y no transformadas, también se observó que los contenidos de los pigmentos clorofílicos variaron, estos cambios pudieran no manifestarse en plantas adultas establecidas en condiciones de campo, de allí la importancia de continuar estos estudios.

#### **4.3.2. Efectos secundarios bioquímicos de la aplicación del herbicida FINALE® en plantas transgénicas de piña en fase de aclimatización.**

En la figura 9 se observa el porcentaje de supervivencia de las plantas transformadas y no transformadas de piña a los 15 d de ser aplicadas y no con el herbicida FINALE®. A los 15 d de aplicado el herbicida las plantas no transformadas comenzaron a morir, mientras que las plantas transformadas supervivieron al estrés y no mostraron diferencias significativas con relación a las plantas testigo (plantas no tratadas con el herbicida FINALE®). Aunque los valores fueron estadísticamente diferentes al comparar los dos grupos de plantas (transformadas y no transformadas). Las plantas transformadas a los 15 d de aplicado el herbicida transitaban por un período de recuperación al estrés abiótico inducido por el producto activo fosfinotricina. Diferentes variables bioquímicas mostraron el estado fisiológico de las plantas de piña durante este período.



**Figura 9.** Efecto de la transformación genética en la supervivencia de plantas de piña cv. Cayena lisa Serrana a los 15 días de ser asperjadas con el herbicida FINALE® durante la aclimatización. Media general= 74.95%, Error típico de la media= 0.88%. Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tukey,  $p > 0.05$ ). Para el análisis, los datos se transformaron según  $y' = 2 \arcseno (y/100)^{0.5}$ .

La figura 10 presenta los cambios metabólicos producidos en plantas transformadas de piña portadoras del gen *bar*, y en las no transformadas después de 15 d de aplicadas con el herbicida FINALE®. El efecto del herbicida FINALE® provocó una reducción en el contenido de malondialdehído en las plantas no transformadas (figura 10A). El grupo de plantas no transformadas que no se le aplicó el herbicida, mostró un mayor contenido de este indicador, al aplicar el herbicida la disminución fue significativamente mayor que en las plantas transformadas. En las plantas transformadas no se encontraron diferencias significativas entre las aplicadas o no con el herbicida, lo cual indica que este grupo de plantas estén más preparadas para prevenir una mayor peroxidación lipídica. A los 15 d aún se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de plantas evaluadas con la aplicación del herbicida.

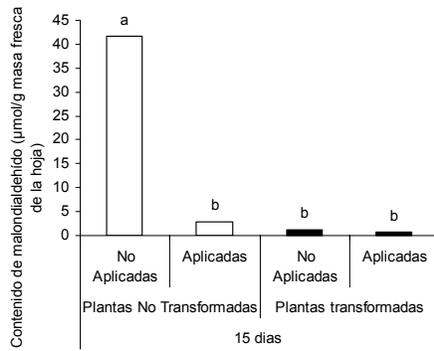
El contenido de otros aldehídos se comportó de manera muy similar al nivel de malondialdehído, el mismo disminuyó tanto en las plantas transformadas como en las no transformadas (figura 10B). Sin embargo, en las plantas no transformadas se observó una disminución más marcada después de la aplicación del herbicida, con diferencias significativas entre estos grupos de plantas. Es importante destacar que las plantas de piña transformadas no mostraron una respuesta de cambio metabólico en estos dos indicadores evaluados y esto puede estar dado por la afectación de las membranas ante dos factores de estrés abiótico: la acumulación temporal del

amonio y la formación de compuestos derivados de la fosfinotricina como resultado del producto de la acción del gen *bar*.

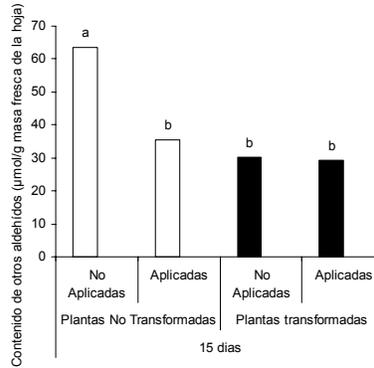
Aunque los compuestos derivados de la fosfinotricina no se han descrito como tóxicos a las células vegetales (Shimizu *et al.*, 1997), los mismos se forman paulatinamente y provocan un desbalance interno con daños en la integridad del funcionamiento de la célula. Torres *et al.* (1999) comprobaron que la acumulación de amonio es uno de los factores principales de estrés en las plantas de lechuga no transformadas. El malondialdehído constituye el metabolito primario de la respuesta de las plantas a un estrés como resultado de la peroxidación lipídica en las membranas celulares y es promotor de la formación de otros aldehídos (Moller, 2001).

El herbicida FINALE<sup>®</sup> incrementó la actividad peroxidasa en los dos grupos de plantas (transformadas y no transformadas), pero el efecto fue más dramático en las plantas no transformadas (figura 10C). Durante el proceso de estrés oxidativo por factores abióticos se forma el peróxido de hidrógeno por la acción del radical superóxido y con ello se estimula la actividad peroxidasa, tanto en las plantas transformadas como en las no transformadas. Los resultados obtenidos en la actividad peroxidasa indican que el estrés provocado por la aplicación del herbicida FINALE<sup>®</sup> indujo la activación de diversas respuestas celulares. La relación de los niveles de malondialdehído y otros aldehídos y la actividad peroxidasa se describió en diferentes condiciones de estrés oxidativo (Gross *et al.*, 2000; Moller, 2001). El incremento de la actividad peroxidasa es una de las respuestas catabólicas que puede estar asociada a la reducción del peróxido de hidrógeno en la célula, el cual puede provocar un aumento de los niveles de malondialdehído y otros aldehídos.

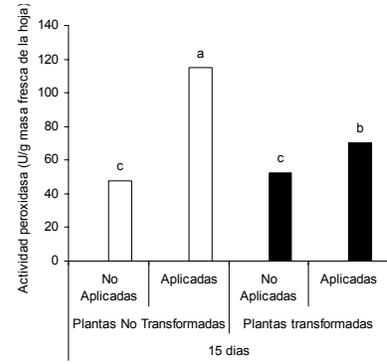
Mohammadi y Kazemi (2002) encontraron un incremento en la actividad peroxidasa en plantas de trigo sometidas a estrés. También Nawar y Kuti (2003) determinaron un incremento de la actividad peroxidasa en *Vicia faba* L. ante situaciones similares. Los resultados mostrados indicaron que el incremento de estas enzimas puede estar dado por una respuesta celular de las plantas de piña cuando son afectadas por condiciones desfavorables a su metabolismo.



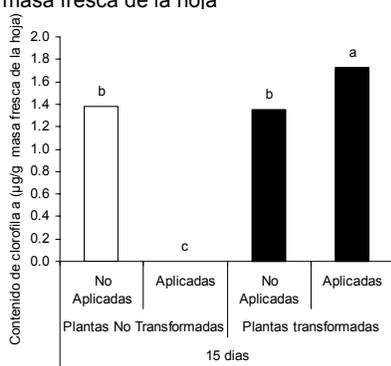
**A**  
 Media general = 11.64 µmol/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 1.19 µmol/g de masa fresca de la hoja



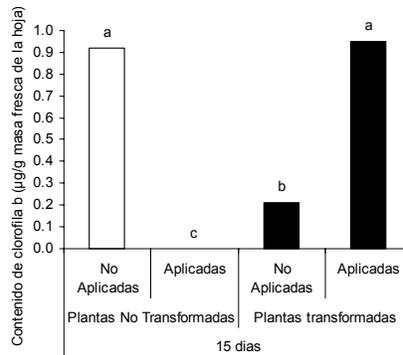
**B**  
 Media general = 39.66 µmol/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 0.97 µmol/g de masa fresca de la hoja



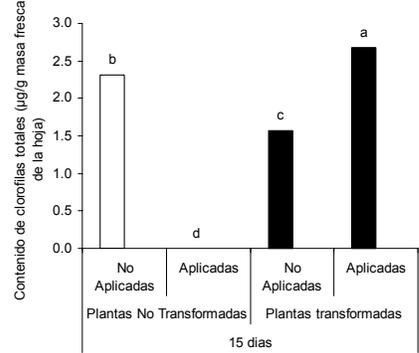
**C**  
 Media general = 71.31 U/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 1.22 U/g de masa fresca de la hoja



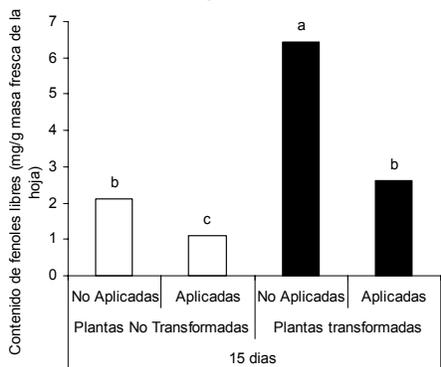
**D**  
 Media general = 1.12 µg/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 0.09 µg/g de masa fresca de la hoja



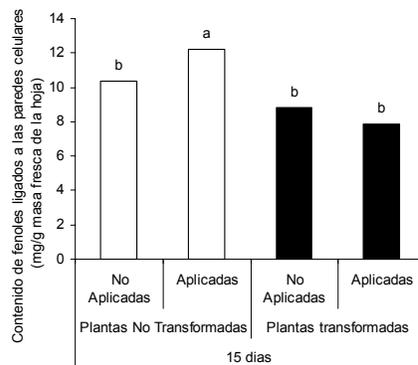
**E**  
 Media general = 0.52 µg/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 0.01 µg/g de masa fresca de la hoja



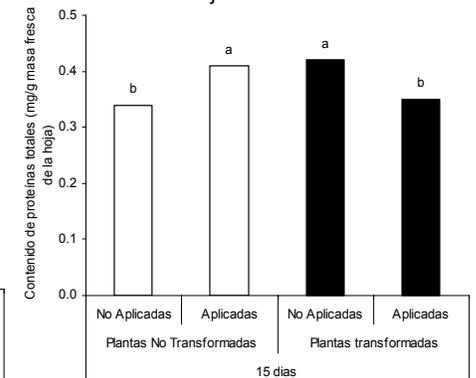
**F**  
 Media general = 1.64 µg/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 0.02 µg/g de masa fresca de la hoja



**G**  
 Media general = 3.07 mg/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 0.08 mg/g de masa fresca de la hoja



**H**  
 Media general = 9.82 mg/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 0.79 mg/g de masa fresca de la hoja



**I**  
 Media general = 0.38 mg/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 0.01 mg/g de masa fresca de la hoja

**Figura 10.** Actividad peroxidasa (C), niveles de malondialdehído (A), otros aldehídos (B), pigmentos clorofílicos (a, b, total) (D,E,F), fenoles libres y ligados a las paredes celulares (G,H) y proteínas (I) en plantas No-Transformadas y Transformadas, a los 15 días de ser aplicadas o no con el herbicida FINALE®. Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey p>0.05).

Los niveles de clorofila *a*, *b* y totales en las plantas no transformadas fueron siempre disminuidos por la aplicación del herbicida (figura 10D,E,F). Sin embargo, el herbicida incrementó el contenido de clorofila *a*, *b* y totales en las plantas transformadas (figura 10D,E,F). El herbicida afectó drásticamente los niveles de clorofila *b* en las plantas no transformadas (figura 10E). Por el contrario, en las plantas transformadas fue siempre significativamente superior (figura 10E). El contenido de clorofilas totales fue siempre inferior en las plantas no transformadas (figura 10F).

La expresión del gen *bar* en las plantas transformadas (línea transgénica 90), evitó un incremento de las lesiones necrosadas en las hojas, después de la aplicación del herbicida FINALE<sup>®</sup> según los resultados mostrados en el acápite 4.2.1. Esto permite que se contrarreste la pérdida progresiva de pigmentos fotosintéticos. La respuesta de las plantas para mantener la actividad fotosintética a los mismos niveles que en condiciones no estresantes, pudo ser lo que ocasionó el aumento de los pigmentos clorofílicos *a*, *b* y totales. Respuestas fisiológicas similares para compensar los daños causados por estrés fue descrita por Scarpari *et al.* (2005).

Sakamoto y Murata (2001) sugirieron que para estabilizar o proteger las membranas frente a un estrés abiótico en plantas transgénicas se sobreexpresa la enzima glicinbetaina sintetasa, la cual protege la actividad metabólica y fisiológica de los cloroplastos y estabiliza la estructura cuaternaria de los complejos proteicos tales como el fotosistema II. En las plantas no transformadas ocurre una reducción de los contenidos de clorofila *a*, *b* y totales después de la aplicación del herbicida FINALE<sup>®</sup>, lo cual puede estar asociado a la ausencia en estas plantas del gen *bar*. Esto provoca que no se inactive la fosfinotricina y se acumule el amonio con afectaciones en las estructuras de los cloroplastos y pérdida de pigmentos clorofílicos (Metz *et al.*, 1998). Scarpari *et al.* (2005) determinaron que las plantas sometidas a un estrés mostraron alteraciones bioquímicas relacionadas directamente con los niveles de síntesis de etileno, las que se relacionan con las respuestas de las clorofilas, con disminución del contenido frente a situaciones de daño celular.

El herbicida FINALE<sup>®</sup> provocó una reducción del contenido de fenoles solubles en las plantas transformadas y no transformadas (figura 10G). Los compuestos fenólicos presentan estructuras muy diversas, pero todos se originan a partir de la fenilalanina y la tirosina (Zobel *et al.*, 1999). Los fenoles son metabolitos secundarios de plantas que han sido asociados a procesos de estrés

tanto biótico como abiótico (Casal *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 2000), los mismos pueden ser libres, fijarse a las paredes celulares por enlaces covalentes o polimerizarse para formar lignina.

El incremento de los niveles de fenoles solubles en las plantas transformadas puede estar relacionado con la liberación de fenoles ligados a las paredes celulares (ruta catabólica). Esta ruta de movilización de fenoles ligados a las paredes celulares se estudió en plantas como respuesta para lograr la supervivencia a diferentes tipos de estrés (Yaginuma *et al.*, 2002). Este fue el caso de las plantas de piña transformadas que lograron mayores valores de supervivencia después de la aplicación del herbicida FINALE® (acápite 4.2.1).

Por otra parte, los niveles de fenoles ligados a las paredes celulares aumentó en las plantas no transformadas después de la aplicación del herbicida FINALE®. Mientras que las plantas transformadas no mostraron cambios en los niveles de fenoles ligados a las paredes celulares después de la aplicación del herbicida (figura 10H). El comportamiento observado en las plantas no transformadas puede estar asociado al proceso de apoptosis celular (muerte celular programada) que experimentaron las plantas en el transcurso del tiempo, debido a que estas plantas no son resistentes al herbicida y en la medida que transcurrió el tiempo se observó en este grupo de plantas lesiones necrosadas en las hojas y finalmente muerte de la planta (acápite 4.2.1). En estudios realizados por Gilchris (1998) se determinó que el proceso de ligamiento de los fenoles a las paredes celulares aumenta durante la muerte celular.

En cuanto al contenido total de proteínas (figura 10I), en el mismo se observó un aumento en las plantas no transformadas y una disminución en las plantas transformadas después de la aplicación del herbicida FINALE®. Estos resultados pueden estar asociados al proceso acelerado de muerte celular programada que ocurre donde el estrés al herbicida FINALE® fue mayor (plantas no transformadas). La muerte celular programada se induce como mecanismo de defensa de la planta frente a situaciones de estrés abiótico, en el caso especial que ocurren interrupciones en el estado oxidativo o en el estado energético celular (Beers y McDowell, 2001). El incremento del contenido de proteínas en las células en apoptosis puede estar relacionado, entre otras causas, con la aparición de proteasas asociadas a la apoptosis o con la posterior formación de los fragmentos de péptidos.

Jones (2001) determinó que los cambios bruscos en el metabolismo provocan una respuesta hipersensitiva en la célula. Esta respuesta conduce a la producción de fitoalexinas tóxicas, quitinasas, proteasas y nucleasas que se excretan al medio, y se liberan cuando la vacuola colapsa. La propia acción de las proteasas sobre los elementos proteicos de las células hace que en etapas avanzadas se produzca un aumento del nivel de proteínas totales.

Samali y Orrenius (2001) estudiaron varios grupos de proteínas y su relación con la respuesta al estrés, señalan que el efecto del estrés abiótico producido por las altas temperaturas provoca la aparición de proteínas específicas. Estas proteínas están relacionadas con el proceso de apoptosis, y con procesos de defensa contra los daños producidos por la muerte de las células. Las proteínas expresadas ante condiciones de estrés pueden ser inducidas por mecanismos de estrés oxidativo.

Contrastantemente, en las plantas transformadas hubo una disminución del contenido total de proteínas cuando se le aplicó el herbicida. Aún cuando estas plantas supervivieron al proceso de estrés abiótico inducido por el herbicida, en ellas la disminución de la concentración de proteínas pudo estar asociada al período de transición previamente mencionado.

Es importante señalar que el análisis integral de los resultados descritos en este trabajo de tesis demostró que la transformación genética en plantas de piña mediante *A. tumefaciens* con la inserción del gen *bar* confirió tolerancia al herbicida FINALE®. Los estudios bioquímicos realizados permiten explicar posibles cambios metabólicos provocados por la inserción del gen *bar*, que constituye la base para estudios de los caracteres agronómicos de interés y su relación con la bioseguridad.

#### **4.3.3 Tolerancia al herbicida FINALE®, perfil proteómico, el número de cromosomas e indicadores bioquímicos y agronómicos en plantas transgénicas de piña en condiciones de campo.**

A los 30 d de aplicado el herbicida FINALE® todas las plantas no transformadas habían muerto, sin embargo el 98% de las plantas transformadas (línea 90) supervivieron al estrés. Las no transformadas comenzaron a morir a partir de los 7 d posteriores a la aplicación del herbicida. Las plantas transformadas toleraron la concentración aplicada al igual que en aclimatización. El

herbicida en este grupo de plantas tolerantes no provocó afectaciones graves que impidieran su supervivencia y desarrollo fisiológico normal (figura 11).

En la tabla 11 se muestra la supervivencia a los tres meses después de aplicado el herbicida FINALE®. En ese momento, todas las plantas no transformadas habían muerto. Sin embargo, el 93% de las plantas transformadas (línea 90) supervivieron al estrés.

**Tabla 11.** Porcentaje de supervivencia de las plantas de piña Cayena lisa Serrana después de tres meses de aplicado el herbicida FINALE®.

Plantas no transformadas macropropagadas (testigo)		Plantas no transformadas micropropagadas (testigo)		Plantas transformadas micropropagadas		Media general	Error típico de la media
No asperjadas con el herbicida FINALE®	Asperjadas con el herbicida FINALE®	No asperjadas con el herbicida FINALE®	Asperjadas con el herbicida FINALE®	No asperjadas con el herbicida FINALE®	Asperjadas con el herbicida FINALE®		
100.0 a	0.0 b	93.3 a	0.0 b	91.7 a	93.3 a	63.05	6.1

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tukey,  $p > 0.05$ ). Para el análisis, los datos se transformaron según  $y' = 2 \cdot \arcseno(y/100)0.5$ . Las plantas fueron asperjadas con el herbicida FINALE® a los tres meses de haber sido transplantadas a condiciones de campo.

Autores como Facchini *et al.* (2008) plantean que el herbicida produce alteraciones metabólicas entre las que se encuentran: inhibición de las funciones de la membrana celular por acumulación de amonio, reducción de la biosíntesis de péptidos, proteínas y nucleótidos, incremento de la proteólisis y la inhibición rápida de la fijación fotosintética de CO<sub>2</sub> (entre 2 a 8 h), acompañada por daño permanente en el aparato fotosintético. En consecuencia, las plantas dejan de crecer desde el mismo día de la aplicación de glufosinato, aunque no se manifiesten signos visibles.

Según Mulwa *et al.* (2006), la eficiencia del herbicida glufosinato de amonio es mayor en plantas en activo crecimiento. El mecanismo primario del herbicida en las plantas es inhibir la enzima glutamina sintetasa. Está enzima que cataliza la síntesis de la glutamina juega un papel central en el metabolismo del nitrógeno de las plantas, principalmente en el proceso de asimilación de amoníaco en nitrógeno orgánico; la fosfotricina inhibe más rápido el proceso de fotosíntesis en las plantas jóvenes.



**A** Clon 90



**B** Testigo macropropagado



**C** Testigo micropropagado

**Figura 11.** Plantas de piña en condiciones de campo a los 30 días después de aplicado el herbicida FINALE®.

La inhibición de la glutamina sintetasa por la fosfinotricina trae consigo una disminución en la concentración de glutamina como también de glutamato (Wendler *et al.*, 1990). Una explicación a esta inhibición de la fotosíntesis por la fosfinotricina es la disminución en el suplemento de potencial de aminoácidos donadores, tales como el aspartato, asparagina, serina, glicina y glutamato, lo cual es un obstáculo para que el glicerato retorne al Ciclo de Calvin. La falta de estos aminoácidos donadores también impide la transaminación del glioxalato, por lo que éste se acumula e inhibe a la ribulosa-1,5-carboxilasa y por ende la fijación del CO<sub>2</sub>.

La mayoría de las investigaciones realizadas describen que el proceso de inhibición de la fotosíntesis por fosfinotricina en plantas C<sub>4</sub> (Wendler *et al.*, 1990). Estudios en plantas C<sub>3</sub> mostraron que la acumulación de amonio en estas plantas es mucho mayor que en las plantas C<sub>4</sub> (Gangopadhyay *et al.*, 2009; Gaurab *et al.*, 2009). También se evidenció que una disminución en la concentración de O<sub>2</sub> y un aumento en las concentraciones de CO<sub>2</sub> compensaban los efectos inhibitorios de la fosfinotricina en la fotosíntesis. En el caso de la piña al ser una planta CAM, con cierto comportamiento C<sub>3</sub>, las implicaciones de la acumulación de amonio pueden tener un efecto diferente al que normalmente ocurre en plantas C<sub>4</sub>.

En la actualidad se realizan investigaciones a plantas transgénicas en condiciones de campo. Los ensayos están dirigidos a la respuesta del organismo transgénico en el medio *ex vitro* y su comparación con grupos de plantas no transformadas (Quemada *et al.*, 2008). El impacto en las producciones es otra de las observaciones, así como el análisis de las diferencias y semejanzas con el cultivo original (Gore *et al.*, 2008; Meihls *et al.*, 2008). La interacción genotipo - ambiente es otro de los estudios que mayormente se refiere en la literatura, así como la interacción ecológica de los organismos genéticamente modificados (Snoeren *et al.*, 2007; Meihls *et al.*, 2008).

Sripaoraya *et al.* (2006), fueron los primeros en analizar la estabilidad del transgen *bar*, su expresión y tolerancia al herbicida FINALE® en el cultivo de la piña (*Ananas comosus* cv. Phuket) en condiciones de campo. Sin embargo, de este trabajo investigativo realizado en Tailandia, se informan algunos caracteres agrícolas evaluados, el estudio solo incluye la primera generación vegetativa. Esos autores describen los efectos tóxicos que provoca el herbicida en las plantas de piña no transformadas, los signos visuales en las hojas fueron en forma de quemadura foliar.

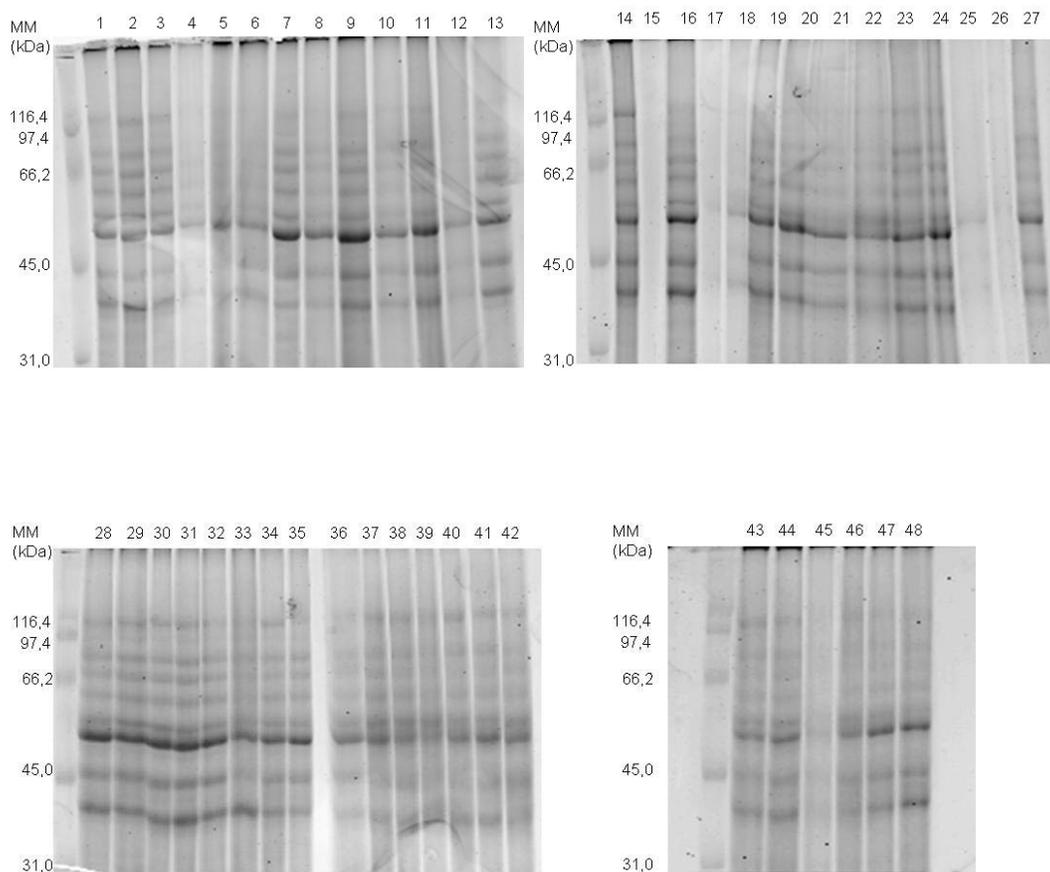
Por otra parte, Enriquez-Obregón *et al.* (1998) evaluaron la tolerancia al herbicida FINALE® a plantas de caña de azúcar que contenían en su construcción genética el gen *bar*, las condiciones de cultivo fueron en campo. Las plantas no transgénicas (testigos) mostraron lesiones necrosadas, y murieron después de una semana de la aplicación del herbicida FINALE®. Sin embargo, en las plantas transgénicas se observaron signos producidos por el efecto tóxico del herbicida, pero se seleccionaron de forma cualitativa las plantas que presentaron menores afectaciones.

Los resultados obtenidos en este acápite permitieron comprobar en condiciones de campo la tolerancia de las plantas transgénicas (línea 90) al herbicida FINALE®.

#### **Comparación del perfil proteómico de plantas de piña transformadas con *Agrobacterium tumefaciens* y no transformadas.**

El estudio electroforético (SDS PAGE) de extracto de hojas de piña transformadas y no transformadas aparece en la figura 12. A las 72 h se observó una mayor diferencia entre los niveles de proteínas de las diferentes plantas analizadas, de allí que se seleccionaran este grupo de muestras para comparar el perfil proteómico de los diferentes tratamientos.

Los perfiles proteicos resultantes de extractos de hojas sometidos a los diferentes tratamientos se analizaron comparativamente. El número de manchas detectado en el análisis digital y confirmado visualmente fue de  $520 \pm 45$  (figura 12), con un patrón altamente reproducible en las tres réplicas de cada tratamiento. Para considerar diferencias entre manchas se siguió como criterio: i) la presencia consistente o la ausencia en todas las réplicas analizadas; y ii) la existencia de proporciones entre los tratamientos que difieren en más de 1.5 veces. El análisis estadístico de los datos (ANOVA, LSD  $p < 0,05$ ) (tabla 12) permitió comprobar diferencias cualitativas y cuantitativas entre los tratamientos. En total, 18 manchas mostraron diferencias significativas, tanto cualitativas (13) como cuantitativas (5) y en plantas sometidas a estrés por la aplicación del herbicida 15 manchas mostraron diferencias cualitativas y tres diferencias cuantitativas, al comparar plantas transformadas y no transformadas.



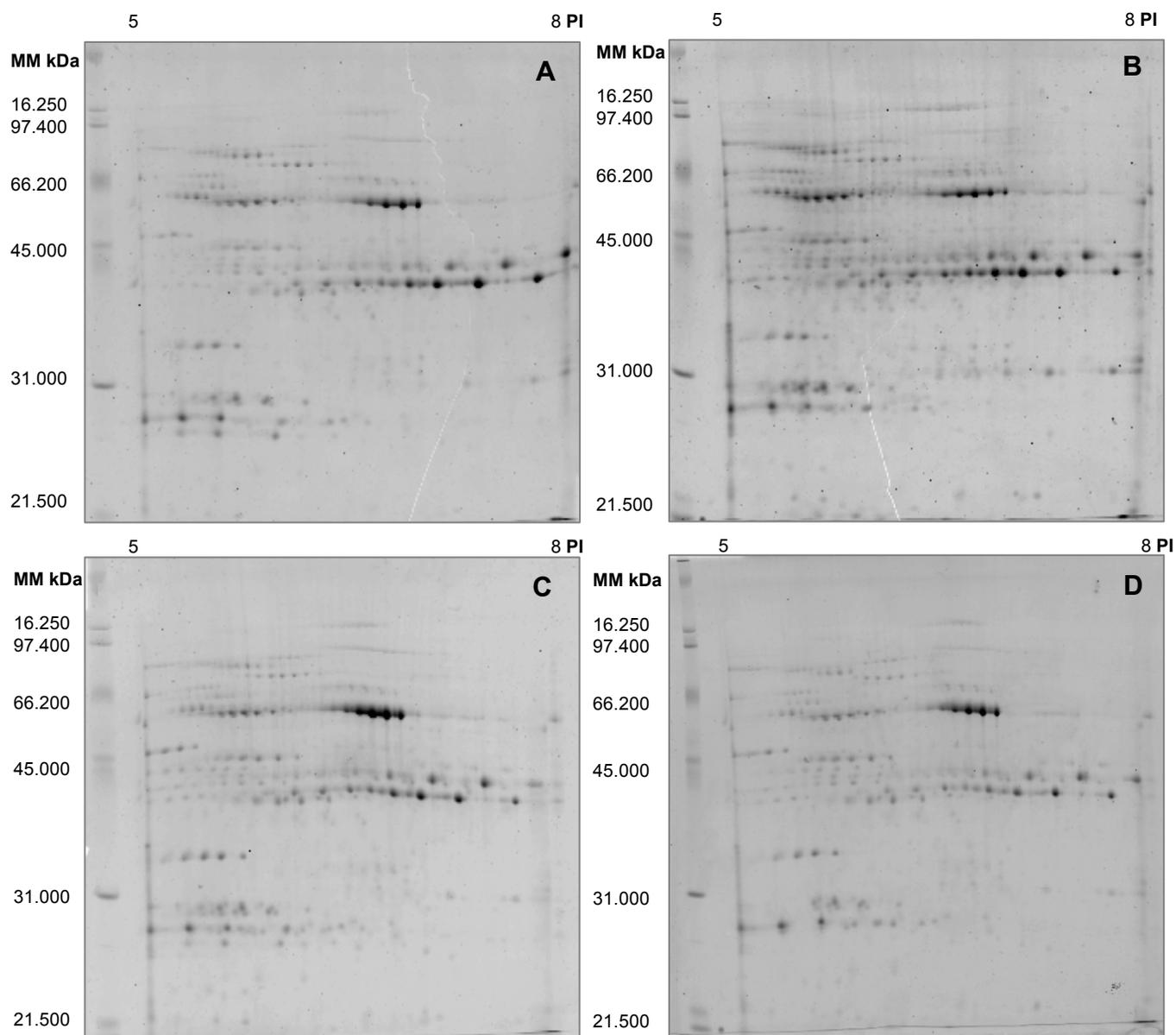
**Figura 12.** Electroforesis SDS-PAGE en gels de poliacrilamida al 12,5% teñidos con Sypro RUBY de extractos de plantas de piña crecidas en condiciones de campo. Se aplicaron 20  $\mu$ g de extracto proteico en cada carril:

- 1. 2. 3. Testigo no transformado, no aplicado con herbicida (24 horas)
- 4. 5. 6. Testigo no transformado, aplicado con herbicida (24 horas)
- 7. 8. 9. Clon 90, aplicado con herbicida (24 horas)
- 10. 11. 12. Clon 90, no aplicado con herbicida (24 horas)
- 13. 14. 15. Testigo no transformado, aplicado con herbicida (48 horas)
- 16. 17. 18. Testigo no transformado, no aplicado con herbicida (48 horas)
- 19. 20. 21. Clon 90, aplicado con herbicida (48 horas)
- 22. 23. 24. Clon 90, no aplicado con herbicida (48 horas)
- 25. Testigo no transformado, aplicado con herbicida (72 horas)
- 26. Clon 90, aplicado con herbicida (72 horas)
- 27. Clon 90, no aplicado con herbicida (72 horas)
- 28. 29. Testigo no transformado, aplicado con herbicida (72 horas)
- 30. 31. 32. Testigo no transformado, no aplicado con herbicida (72 horas)
- 33. 34. Clon 90, aplicado con herbicida (72 horas)
- 35. 36. Clon 90, no aplicado con herbicida (72 horas)
- 37. 38. 39. Testigo no transformado, aplicado con herbicida (7 días)
- 40. 41. 42. Testigo no transformado, no aplicado con herbicida (7 días)
- 43. 44. 45. Clon 90, aplicado con herbicida (7 días)
- 46. 47. 48. Clon 90, no aplicado con herbicida (7 días)

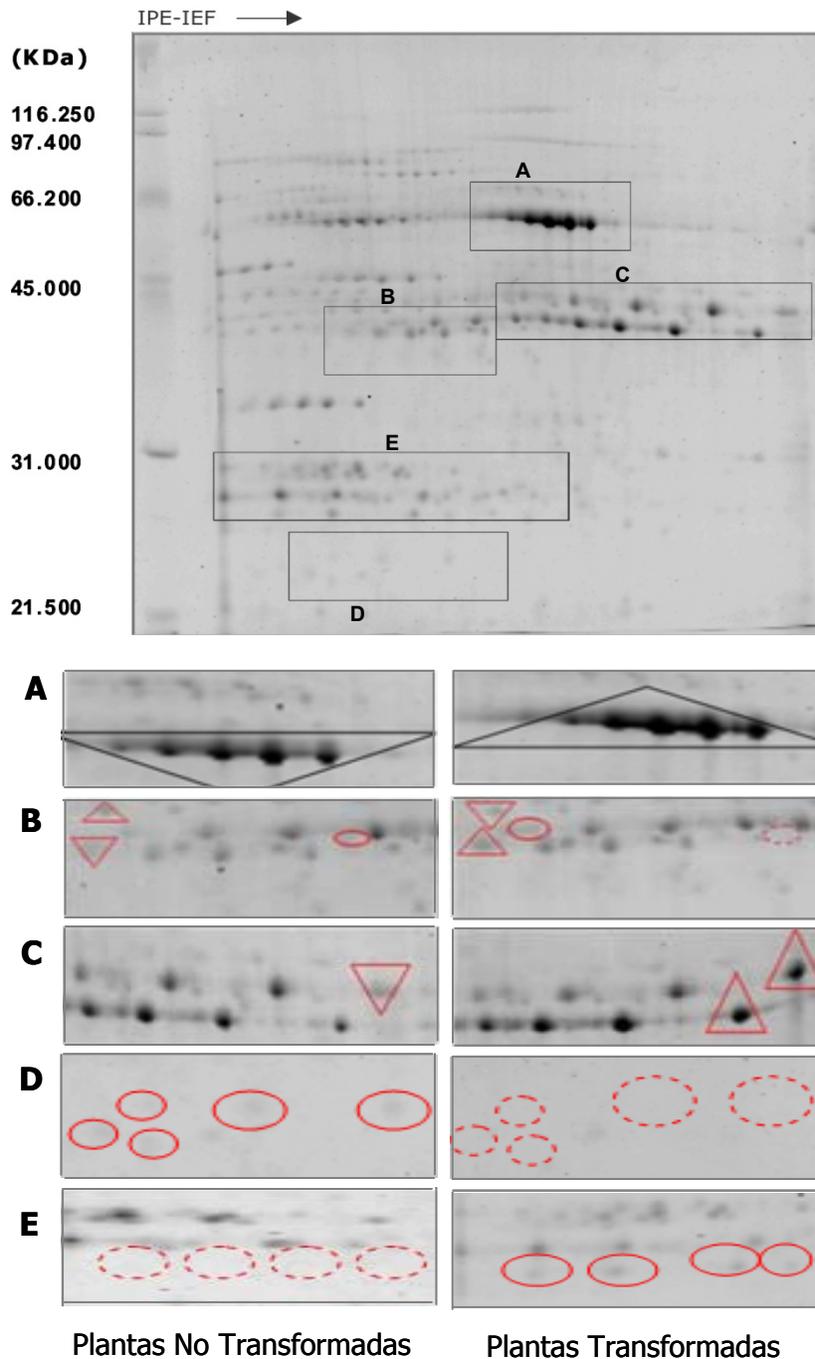
**Tabla 12.** Diferencias cualitativas y cuantitativas en el análisis comparativo del perfil proteico de las muestras.

No. de Manchas	Plantas no tratadas con el herbicida			Plantas tratadas con el herbicida		
	Testigo	Transformadas	Tasa	Testigo	Transformadas	Tasa
204	5477.33	11803.38	2.15	11989.43	24256.87	2.03
207	1674.64	1948.03	1.16	0	229.88	
1109	0	98.1		0	141.22	
1808	576.87	443.73	0.76	1636.57	889.87	0.54
2106	71.23	325.67	4.57	0	112.49	
2201	5920.47	6676.2	1.12	11989.43	24256.87	2.02
2404	0	0		330.44	96.81	0.29
3204	2957.13	1673.63	0.56	0	104.25	
4215	0	1557.83		0	79.02	
5202	0	0		1141.37	25.93	0.02
5214	0	382.1		0	29.17	
6802	0	0		232.97	16.44	0.07
6805	0	0		210.64	19.18	0.09
6809	0	0		139.14	23.02	0.16
7302	615.8	574.8	0.93	5280.3	10204	1.93
7406	0	0		225.9	38.37	0.16
7705	603.94	1689.57	2.79	1399.3	750.53	0.54
7809	0	0		114.5	0	0

En el análisis de los perfiles bidimensionales de la línea transgénica (línea 90) y su parental (CIS) se demostró que no existen diferencias significativas en las proteínas mayoritarias (figura 13). La presencia o ausencia de proteínas en el mapa bidimensional de las plantas tratadas con herbicidas nos indica que bajo condiciones de estrés en las células vegetales se sintetizan nuevas proteínas que juegan un papel importante en la resistencia o que están relacionadas con los procesos de defensa contra los daños producidos por la muerte programada de las células (apoptosis). Así mismo, también se produce la degradación de otras especies proteicas como respuesta a dicho estrés.



**Figura 13.** Comparación de los perfiles proteicos 2D de extractos de hojas de piña. **A)** extractos de hojas de piña CIS- sin aplicar herbicida; **B)** extractos de hojas de piña CIS- aplicadas con el herbicida; **C)** extractos de hojas de piña Clon 90- sin aplicar el herbicida; **D)** Extracto de hojas de piña Clon 90- aplicadas con el herbicida. Aparece un gel representativo de cada tratamiento a las 72 horas. En todos los casos se colocaron 100  $\mu$ g de proteínas en el gel, el isoelectroenfoco se realizó en tiras de 17 cm, pH 5-8. Los gels 2D contenían 12% de acrilamida y se tiñeron con Sypro RUBY.



**Figura 14.** Perfil proteico 2D de extractos de hojas de piña. Aparece un gel representativo de los tratamientos evaluados, donde se señalan con recuadros las zonas en las que se observaron diferencias en la expresión de proteínas al comparar plantas transformadas y plantas no transformadas. En las zonas ampliadas (A-E) los círculos indican diferencias cualitativas (presencia/ausencia) y los triángulos las manchas que aumentan o disminuyen su intensidad, respectivamente. Se colocaron 100 µg de proteínas en cada gel, el isoelectroenfoco se realizó en tiras de 17 cm, pH 5-8. Los gels 2D contenían 12% de acrilamida y se tificaron con Sypro RUBY.

Las variaciones en el perfil proteómico de las plantas no transformadas pueden estar asociadas a una respuesta biológica como consecuencia de alteraciones fisiológicas y defensivas de estas plantas, donde el estrés al herbicida FINALE<sup>®</sup> fue mayor. La aplicación de herbicidas produce en la célula respuestas moleculares específicas, en el caso especial que ocurren interrupciones en el estado oxidativo o en el estado energético celular. Estas se desencadenan producto de los daños en los cloroplastos con afectación de la proteína D1. Así como de la enzima glicina descarboxilasa, además inhiben rutas metabólicas concretas, y los cambios bioquímicos que se producen (Jorrín *et al.*, 2009).

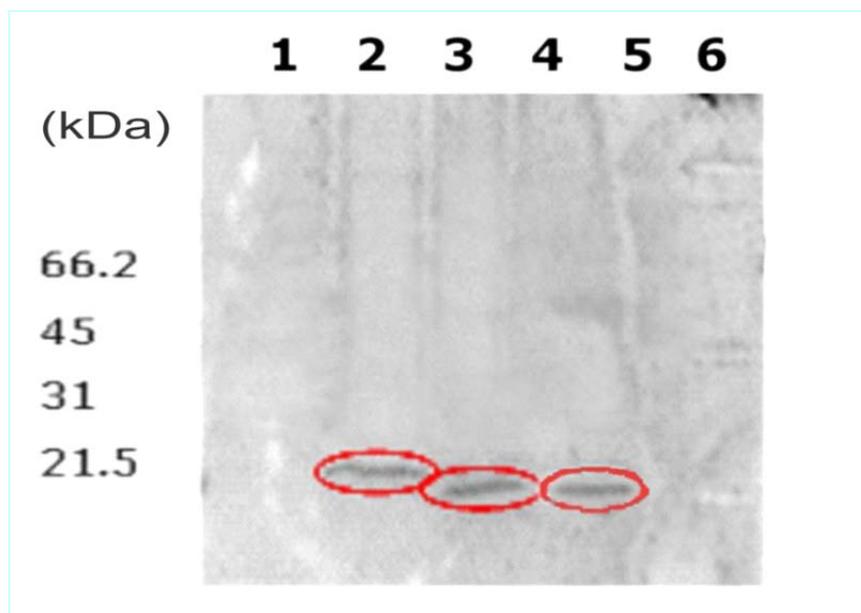
Los estudios de proteómica permiten una mejor caracterización de la piña transgénica. La disponibilidad de información genómica ha hecho posible el análisis global de la expresión génica, lo que se ha visto facilitado por el desarrollo de tecnologías genómicas, tales como microordenamientos, y SAGE (Serial Analysis of Gene Expresión) (Rossignol *et al.*, 2006). Estos estudios han impulsado el conocimiento, a nivel molecular, de cualquier aspecto de la biología vegetal, y en particular de la interacción planta-patógeno (Talbot, 2003). No obstante, el análisis a nivel de ARNm presenta una serie de limitaciones y la interpretación fenotípica de los resultados no es siempre adecuada. Es necesario, por tanto, complementar dichos estudios con otras aproximaciones “ómicas” (proteómica y metabolómica) y de bioquímica clásica (Castro *et al.*, 2005).

Los estudios de proteómica se justifican ya que las proteínas son las biomoléculas encargadas de ejecutar la información impresa en los genes, y las que finalmente determinan el fenotipo. Por otra parte, se desconoce la función de la mayoría de los genes (85% de los 25 000 o 32-56 000 descritos en *Arabidopsis* y arroz no tienen una función asignada). La transcriptómica proporciona información incompleta, ya que no considera las modificaciones postraduccionales, así como la interacción entre proteínas o proteínas y otros ligandos, lo que finalmente puede determinar su actividad (Feder y Walter, 2005). Otro elemento es que la correlación entre el contenido celular de algunos ARNm y su producto génico correspondiente es a menudo muy baja (Gygi *et al.*, 1999). Se estima que los cambios en el nivel de ARNm representan únicamente 60-70% de los cambios en los niveles de proteínas (MacKay *et al.*, 2004).

El éxito de cualquier experimento de proteómica dependerá en último extremo de la disponibilidad de información genómica sobre el organismo de estudio, o especies filogenéticamente muy cercanas, lo que permitirá identificar las proteínas de interés mediante comparación de los patrones de huella peptídica o secuencia aminoacídica obtenidos mediante espectrometría de masa con los anotados en las bases de datos de ADN genómico. Por último, no existe un método de amplificación equivalente a la PCR, por lo que el estudio de proteínas presentes en la célula en bajo número de copias constituye un importante reto aún no totalmente resuelto. Las limitaciones (Kerry et al., 2001)□.

La expresión de productos de genes que son directamente tóxicosolverán a medida que se avance en el desarrollo de equipamientos y protocolos (Garbis et al., 2005).

La figura 15 muestra los resultados de inmunodetección de hojas de plantas de piña transformadas y no transformadas. El ensayo revela la aparición de una banda de baja masa molar, aproximadamente de 20 kDa, que puede estar asociada a la expresión del gen *bar*. La secuencia de la enzima utilizada corresponde a la fosfinotricina acetil transferasa de *Streptomyces higroscópicus* (Kerry et al., 2001). La banda esperada se expresó diferencialmente en plantas transformadas con respecto a las no transformadas.

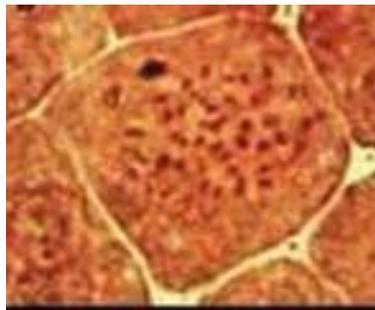


**Figura 15.** Análisis por Western Blot de muestras de plantas de piña transformadas y no transformadas. Corresponde a un ensayo de Inmunodetección. Carriles: **1.** Plantas no transformadas; **2, 3, 4.** Plantas transformadas 48, 72 horas y 7 días **5.** Marcadores de baja masa preteñidos. **6.** Marcadores Broad Range. En todos los casos se aplicaron 30 µg de proteínas por carril. Se revelaron con anticuerpo usado Anti-PAT (SIGMA).

En el área de la Biotecnología al trabajar con organismos genéticamente modificados, el nuevo producto agrícola obtenido requiere de exhaustivos estudios. Los análisis fisiológicos, bioquímicos y moleculares se deben enfocar al análisis de las diferencias y semejanzas con el cultivo original. En esta investigación se realizaron estudios proteómicos para estudiar y comparar las proteínas de plantas transformadas y no transformadas de piña. Se demostró la similitud del proteoma de plantas transformadas y no transformadas. Se detectaron manchas correspondientes a proteínas minoritarias en las plantas no transformadas en respuesta al estrés abiótico provocado por el herbicida FINALE®. El ensayo de inmunodetección reveló la presencia de una banda con una masa molecular asociada a la expresión del gen *bar*.

- **Análisis del cariotipo. Cuento cromosómico.**

Al analizar los meristemas de las raíces de las plantas de piña en condiciones de campo, se encontró el mismo nivel de ploidía. La técnica citogenética demostró que tanto las plantas transformadas aplicadas o no con el herbicida FINALE®, las plantas testigos macropropagadas y micropropagadas mostraron  $2n=50$  cromosomas (figura 16). Este nivel de ploidía corresponde al de las plantas diploides en piña (Bor *et al.*, 1987).



**Figura 16.** Cromosomas de una célula del ápice radicular de una planta de piña cultivada en campo (100x). Todas las plantas analizadas mostraron  $2n=50$  cromosomas.

Varios indicadores del cariotipo pueden ser alterados por rearrreglos estructurales en los cromosomas. En algunos casos puede variar el número cromosómico y la simetría de ellos. En otros casos no se encuentra variación en el número cromosómico ya que en muchos géneros el

número y la morfología cromosómica son constantes entre las distintas especies que lo componen (Barro *et al.*, 2003).

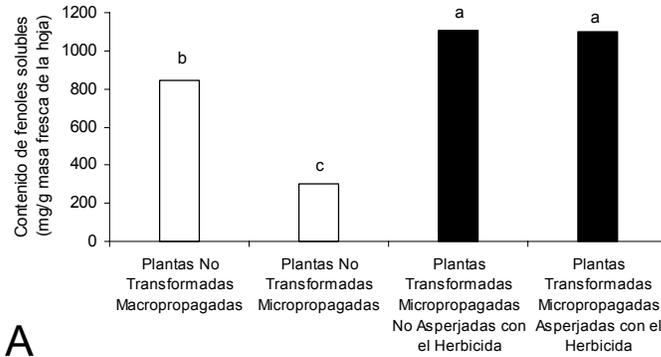
Muchas evidencias han sugerido que la integración del ADN-T causa rearrreglos cromosómicos significativos en tabaco (Ohba *et al.*, 1995). Además, Castle *et al.* (1993), que estudiaron 36 mutantes de *Arabidopsis* y produjeron semillas después de la transformación con ADN-T, encontraron indicios de traslocaciones cromosómicas en nueve de ellas. Los autores concluyeron que los rearrreglos cromosómicos podrían ser una característica común de las plantas transformadas con ADN-T. Por otra parte, Takano *et al.* (1997) describieron rearrreglos marcados (inversiones y duplicaciones) del ADN genómico en los sitios de integración. En esta tesis no se realizó un estudio detallado de los rearrreglos cromosómicos en piña, pero se observó que el número y forma de los cromosomas pareció ser similar. Sin embargo no se ignora que las modificaciones mencionadas anteriormente podrían haber ocurrido.

- ***Evaluación de los caracteres bioquímicos, agronómicos y bromatológicos.***

El estudio de la influencia de la transformación en los caracteres bioquímicos y agronómicos se presenta en las figuras 17-21, y la tabla 13. Las plantas micropropagadas transformadas asperjadas con el herbicida no mostraron diferencias fenotípicas al compararse con las plantas micropropagadas transformadas no asperjadas con FINALE<sup>®</sup>, al año de crecimiento en campo.

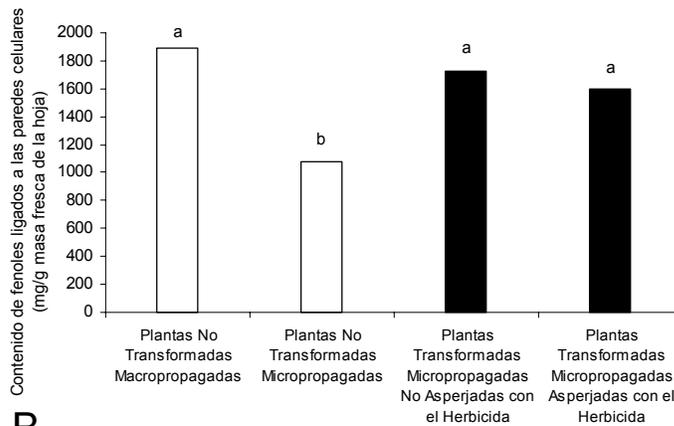
Por el contrario, se apreciaron diferencias experimentales entre las plantas transformadas micropropagadas asperjadas con el herbicida FINALE<sup>®</sup> y las plantas micropropagadas testigos sin aplicar el herbicida. Se observaron variaciones en los niveles de fenoles ligados a las paredes celulares, fenoles solubles y fenoles totales (figura 17), así como en las proteínas totales (figura 18). Por otra parte se detectaron cambios en la masa del fruto sin corona (tabla 13).

Como se muestra en las figuras 18 y 19 aparecen diferencias en el contenido de proteínas, los niveles de clorofilas *b* y clorofilas *totales* entre las plantas micropropagadas transformadas asperjadas con el herbicida y las plantas macropropagadas testigos. También se modificó la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa, superóxido dismutasa y la glutamina sintetasa (figura 20). La altura y diámetro de las plantas, y el tamaño de la corona del fruto (tabla 13) se modificaron también.



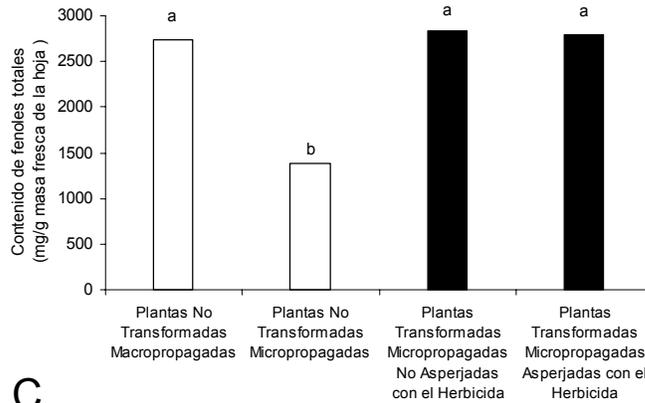
**A**

Media general = 837.36 mg/g masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 49.38 mg/g masa fresca de la hoja



**B**

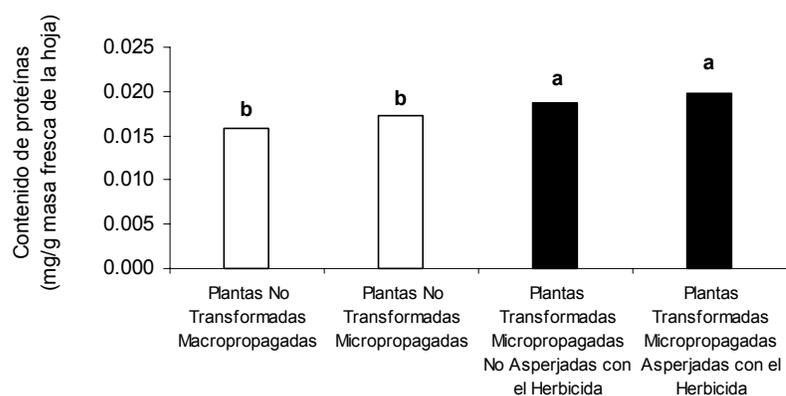
Media general = 1574.79 mg/g masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 147.35 mg/g masa fresca de la hoja



**C**

Media general = 2437.33 mg/g masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 185.19 mg/g masa fresca de la hoja

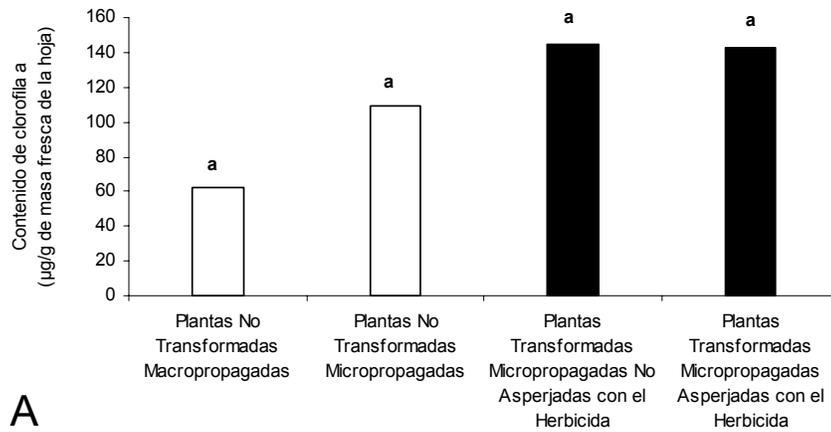
**Figura 17.** Contenido de fenoles solubles, ligados a las paredes celulares y totales evaluados a la hoja D de plantas de piña (CIS) después de un año de haber sido trasplantadas a condiciones de campo. Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey,  $p > 0.05$ ).



**Figura 18.** Comportamiento del contenido de proteínas de extractos procedentes de la hoja D de plantas de piña (CIS) después de un año de haber sido trasplantadas a condiciones de campo. Plantas no transformadas macropropagadas y micropropagadas, plantas transformadas micropropagadas no asperjadas y asperjadas con el herbicida FINALE®. Media general= 0.018 mg/g masa fresca de la hoja , Error típico de la media= 0.001 mg/g masa fresca de la hoja . Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey,  $p > 0.05$ ).

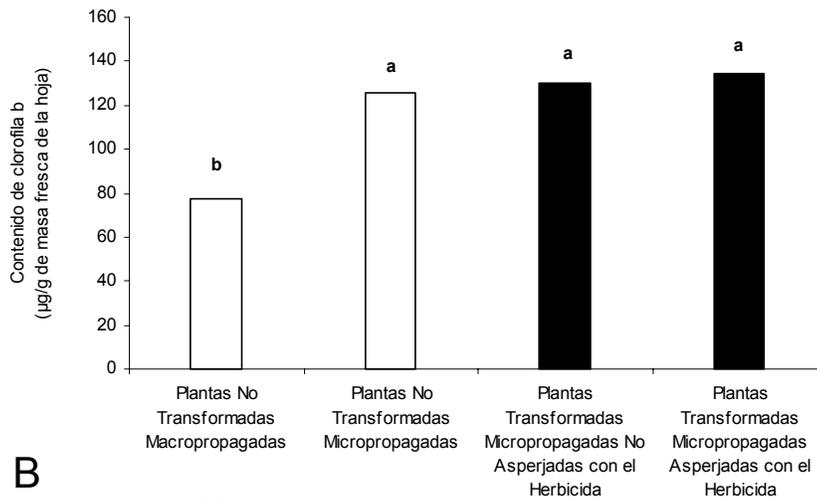
Como se mencionó en el acápite 4.3.1, durante la fase de aclimatación los niveles de malondialdehidos, otros aldehidos, pigmentos de clorofilas *b*, y clorofilas *totales* disminuyeron solo por el efecto de la transformación genética. Estas diferencias entre las plantas transformadas y no transformadas no se observaron después de un año de estar expuestas las plantas a condiciones experimentales de campo (figura 21). Sin embargo, los niveles de fenoles (solubles, ligados a la pared celular y totales), proteínas totales y masa del fruto sin corona fueron estadísticamente diferentes, entre estos dos grupos de plantas.

Por otra parte, el herbicida FINALE® causó varios efectos cuando se asperjaron las plantas transformadas jóvenes durante la fase de aclimatación. Estos efectos no se observaron en plantas adultas. El intervalo de duración entre la aplicación del herbicida y la evaluación de estos indicadores fue relevante. Cuando el herbicida fue asperjado durante la fase de aclimatación, los indicadores bioquímicos se evaluaron a los 15 d posteriores a la aplicación. En contraste, durante el desarrollo en campo, las determinaciones bioquímicas se evaluaron a los 9 meses de la aplicación del herbicida.



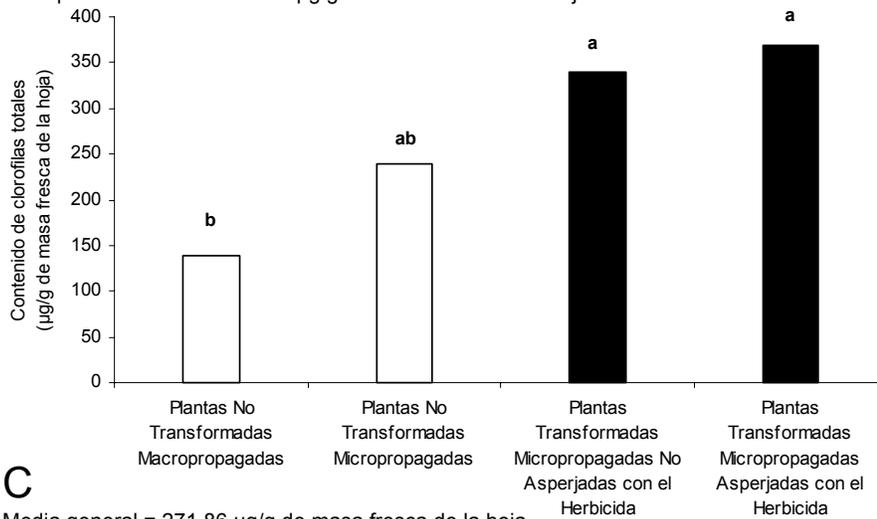
**A**

Media general = 114.67 µg/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 18.43 µg/g de masa fresca de la hoja



**B**

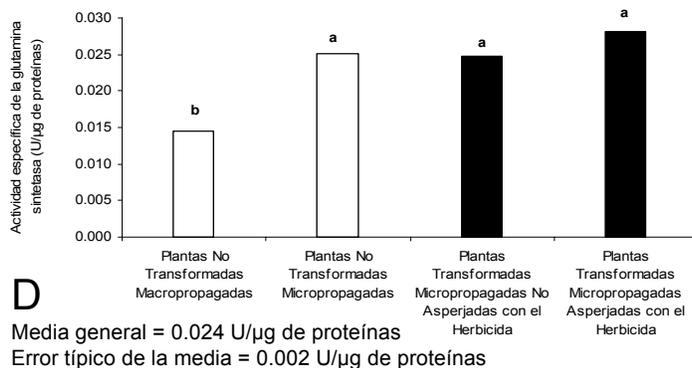
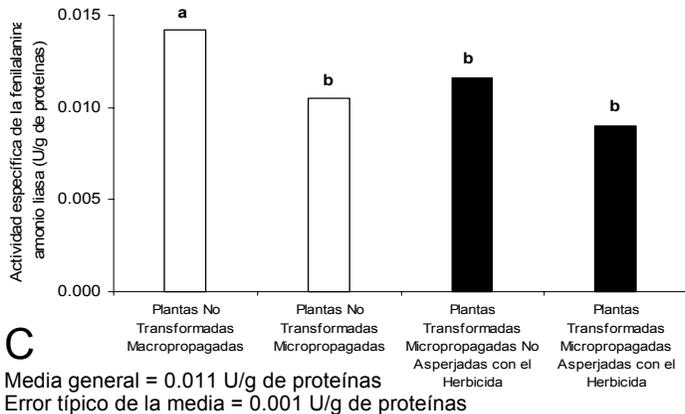
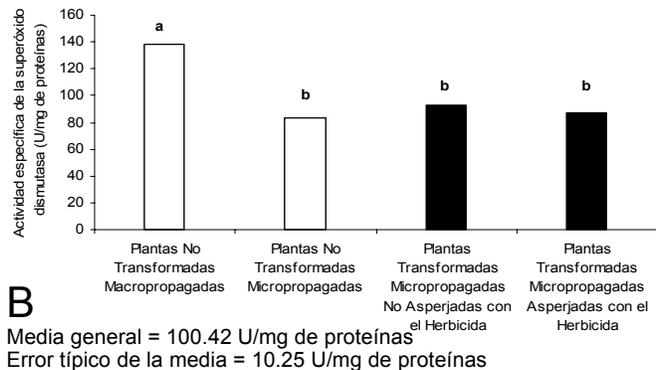
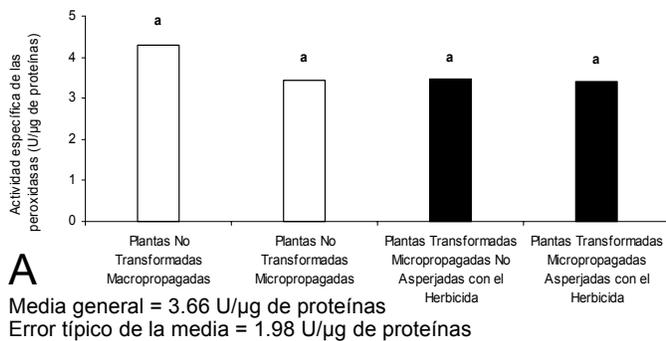
Media general = 116.97 µg/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 18.43 µg/g de masa fresca de la hoja



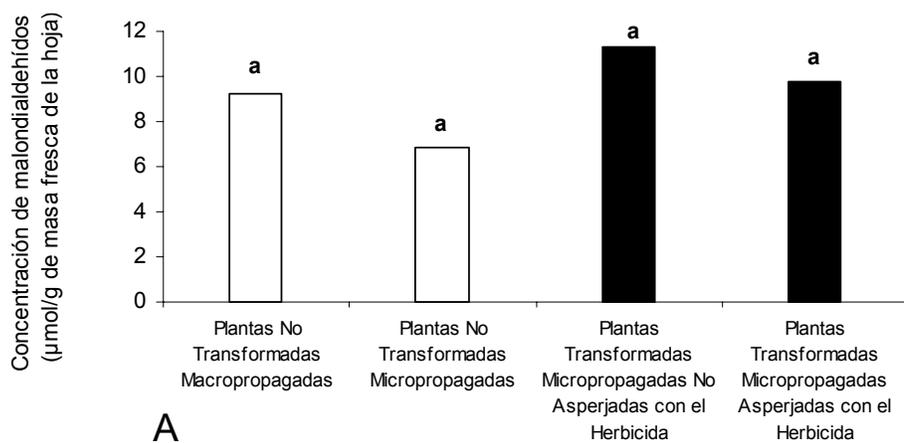
**C**

Media general = 271.86 µg/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 12.77 µg/g de masa fresca de la hoja

**Figura 19.** Comportamiento del contenido de clorofilas a, b y totales realizadas a la hoja D de plantas de piña (CIS) después de un año de haber sido trasplantadas a condiciones de campo. Plantas no transformadas macropropagadas y micropropagadas, plantas transformadas micropropagadas no asperjadas y asperjadas con el herbicida FINALE®. Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey,  $p > 0.05$ ).

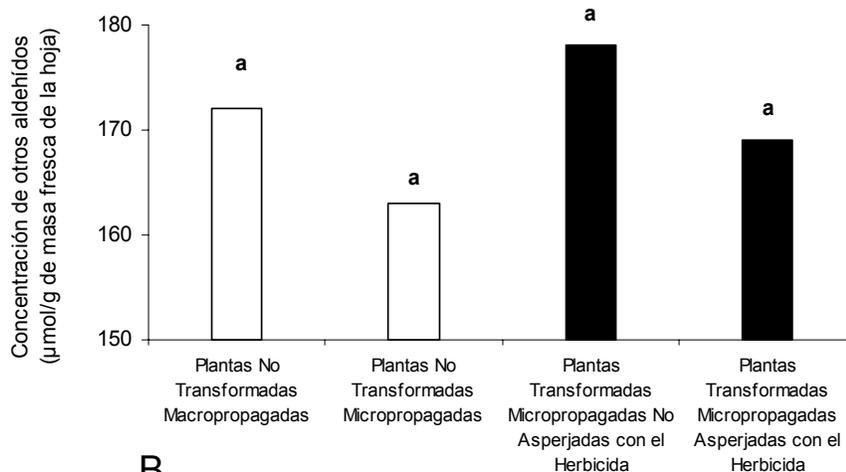


**Figura 20.** Comportamiento de la actividad específica de las enzimas peroxidases, superóxido dismutasa, fenilalanina amonio liasa, glutamina sintetasa de plantas de piña (CIS) no transformadas macropropagadas, plantas no transformadas micropropagadas y plantas transformadas micropropagadas no asperjadas y asperjadas con el herbicida FINALE®. Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey,  $p > 0.05$ ).



**A**

Media general = 9.13 µmol/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 0.68 µmol/g de masa fresca de la hoja



**B**

Media general = 170.56 µmol/g de masa fresca de la hoja  
 Error típico de la media = 18.72 µmol/g de masa fresca de la hoja

**Figura 21.** Concentración de malondialdehídos (A) y otros aldehídos (B) de plantas de piña (CIS) no transformadas macropropagadas, plantas no transformadas micropropagadas y plantas transformadas micropropagadas no asperjadas y asperjadas con el herbicida FINALE®. Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey,  $p > 0.05$ ).

El análisis proteómico mostrado en el acápite 4.3.3 indicó que no existieron diferencias marcadas en las proteínas mayoritarias de las plantas transformadas (aplicadas o no con el herbicida) a las 72 h. Por su parte, la determinación del contenido total de proteínas al año del crecimiento en campo tampoco mostró diferencias estadísticas (figura 18).

**Tabla 13.** Evaluaciones de caracteres agronómicos y bromatológicos realizadas a plantas de piña (CIS) después de un año de haber sido transplantadas a condiciones de campo.

	Plantas no transformadas macropropagadas (testigo)	Plantas no transformadas micropropagadas (testigo)	Plantas transformadas micropropagadas		Media general	Error típico de la media
	No asperjadas con el herbicida FINALE®	No asperjadas con el herbicida FINALE®	No asperjadas con el herbicida FINALE®	Asperjadas con el herbicida FINALE®		
Altura de la planta (cm).	63.70 b	71.11 a	79.42 a	77.34 a	72.89	7.26
Diámetro de la planta (cm).	73.04 b	93.57 a	97.63 a	91.76 a	89.00	9.02
Diámetro del pedúnculo (cm).	1.95 a	1.81 a	1.74 a	1.87 a	1.84	0.08
Longitud del pedúnculo (cm).	18.31 a	17.01 a	20.8 a	22.43 a	19.63	1.51
Masa del fruto con corona (kg).	1.85 a	1.40 b	1.69 ab	1.61 ab	1.63	0.16
Masa del fruto sin corona (kg).	0.78 a	0.50 b	0.82 a	0.72 a	0.70	81.77
Masa de la corona del fruto (kg)	0.48 a	0.40 b	0.43 ab	0.41 ab	0.43	0.03
Longitud de la corona (cm).	22.75 a	18.20 ab	14.80 b	12.34 b	17.02	35.33
Número de ojos en el fruto	99.83 a	50.83 b	72.67 ab	74.68 ab	74.50	7.29
Número de espirales en el fruto	3 a	3 a	3 a	3 a	3	0.00
Profundidad de los ojos del fruto (cm).	0.20 a	0.17 a	0.28 a	0.24 a	0.22	0.04
Diámetro del corazón del fruto (cm).	1.87 a	1.75 a	2.08 a	1.98 a	1.92	0.17
Longitud del fruto (cm).	12.53 a	8.28 b	10.52 ab	9.99 ab	10.33	0.65
Diámetro superior del fruto (cm).	9.22 a	8.90 a	9.18 a	8.56 a	8.96	0.37
Diámetro inferior del fruto (cm).	9.62 a	8.97 a	8.73 a	8.56 a	8.97	0.25
Contenido de vitamin C (mg/100 mL jugo).	15.19 a	16.87 a	14.25 a	15.32 a	15.40	1.43
Porcentaje de acidez (%).	1.53 a	1.36 a	1.71 a	1.67 a	1.56	0.12
Contenido sólidos solubles (° Brix)	17.63 a	15.04 a	16.87 a	18.5 a	17.01	1.68
Índice de madurez	12.22 a	11.10 a	10.58 a	12.67 a	11.64	1.21
Número de coronas por fruto.	1	1	1	1		
Ciclo de generación de la planta (meses).	18	18	18	18		
Presencia de espinas en las hojas	Pocas, cortas y solo en las hojas viejas	Pocas, cortas y solo en las hojas viejas	Pocas, cortas y solo en las hojas viejas	Pocas, cortas y solo en las hojas viejas		
Color de la hoja.	Verde oscuro con manchas rojizas	Verde oscuro con manchas rojizas	Verde oscuro con manchas rojizas	Verde oscuro con manchas rojizas		
Forma de los ojos del fruto.	Ojos planos de forma hexagonal	Ojos planos de forma hexagonal	Ojos planos de forma hexagonal	Ojos planos de forma hexagonal		
Color del fruto.	Anaranjado - rojizo	Anaranjado - rojizo	Anaranjado - rojizo	Anaranjado - rojizo		
Forma del fruto.	Cilíndrica	Cilíndrica	Cilíndrica	Cilíndrica		
Presencia de espinas en la corona del fruto	Pocas (solo en los extremos de las hojas)	Pocas (solo en los extremos de las hojas)	Pocas (solo en los extremos de las hojas)	Pocas (solo en los extremos de las hojas)		

\* Los datos se transformaron para el análisis según  $y' = y^{0.5}$

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey,  $p > 0.05$ ). Las plantas fueron asperjadas con el herbicida FINALE® a los tres meses de haber sido transplantadas a condiciones de campo.

El efecto del cultivo *in vitro* incidió en las evaluaciones realizadas. Cuando se compararon las plantas macropropagadas testigos con otros grupos de plantas, se encontraron diferencias estadísticas en los niveles de clorofilas *b* (figura 19) y fenoles solubles, ligados a las paredes celulares y totales (figura 17). En la actividad de la fenilalanina amonio liasa, superóxido dismutasa y la glutamina sintetasa también se observaron variaciones (figura 20). La altura y el diámetro de la planta, la masa del fruto (con y sin corona), el número de ojos en el fruto y la longitud del fruto sufrieron afectaciones (tabla 13).

El cultivo *in vitro* frecuentemente produce rejuvenecimiento y cambios epigenético en muchas plantas. Sin embargo estos efectos generalmente disminuyen durante el transcurso del crecimiento en campo y la primera multiplicación clonal (Lorenzo *et al.*, 2001; Sripaoraya *et al.*, 2001). En investigaciones realizadas en el cultivo de la piña en el Centro de Bioplantitas, durante más de 20 años solamente se han encontrado dos variantes somaclonales confirmadas. La variación somaclonal en este cultivo se considera un evento poco probable (Pérez *et al.*, 2009). En la tabla 13 se muestran los resultados de los indicadores evaluados para la primera generación vegetativa. Probablemente el efecto del cultivo *in vitro* desaparezca en las próximas generaciones.

El aumento de las clorofilas *b* y totales en las plantas micropropagadas con respecto a las macropropagadas puede deberse al efecto de la juvenilidad y revigorización que adquieren las plantas salidas de un sistema de micropropagación. Tienen mayor capacidad fisiológica en menos tiempo y tasa de crecimiento, todo esto contribuye a que tengan menores desórdenes en la organización de las granas de los cloroplastos (Precce y Sutter, 1991; Rodríguez *et al.*, 2003).

En las plantas macropropagadas cuando aumentan los niveles en la actividad específica de enzimas como la fenilalanina amonio liasa y la superoxido dismutasa, disminuye el contenido de clorofilas *b* y totales porque estas enzimas se inducen por las especies reactivas de oxígeno. Según Edna *et al.* (2008) la superóxido dismutasa tiene como primer blanco las clorofilas, cuyos niveles aumentan como mecanismo de defensa para proteger y estabilizar las membranas de los cloroplastos, lo cual mantiene la actividad metabólica y fisiológica. Además, Castro *et al.* (2005) señala que la glutamina sintetasa es la principal enzima involucrada en la asimilación de amonio en plantas y es un blanco del ingrediente activo fosfotricina del herbicida FINALE® (Castro *et al.*, 2005). Esta enzima es fijadora de nitrógeno y está relacionada con el desarrollo fisiológico de las hojas (Cohen y Mayfield, 1997; Pastori *et al.*, 2000; Pascual *et al.*, 2008).

Las diferencias en la concentración de proteínas totales es un resultado esperado, producto de la incorporación de genes asociados a la transgénesis que pudieron dar lugar a la síntesis de proteínas. Por otra parte los niveles de fenoles (solubles, ligados a la pared celular y totales) fueron siempre superiores en las plantas transformadas, lo que pudiera estar asociado a un aumento del metabolismo de los fenoles como consecuencia de la transformación.

La presencia de las enzimas glucanasas y quitinasas se han visto expresadas en tejidos de plantas transformadas que no han sido sometidas a estrés con el patógeno y pertenecen al grupo de proteínas relacionadas con la patogénesis (Taira *et al.*, 2005). Estas enzimas tienen también funciones importantes en procesos de desarrollo de las plantas.

Se ha descrito que las proteínas PR en general tienen otras funciones que no están directamente relacionadas con el estrés biótico. Además de los roles en la defensa de plantas informados para la  $\beta$ - 1,3- glucanasa, algunos autores demuestran funciones fisiológicas que incluye la fertilización (Nagendra-Pradra *et al.*, 2007), formación del polen en las flores, germinación de la semilla, maduración del fruto (Leubner-Metzger y Meins, 1999). Wrobel- Kwiatkowska *et al.* (2004), relacionaron la actividad protectora contra el patógeno de la  $\beta$ - 1,3- *glucanasa* con la presencia de metabolitos secundarios como los fenoles, que pueden potenciar la inhibición del patógeno.

En el estudio realizado para comparar plantas no transformadas y líneas transgénicas de *Linux usitatissimum* L. con resistencia a *Fusarium* sp. Wrobel- Kwiatkowska *et al.* (2004) encontraron que para las tres líneas evaluadas el contenido de compuestos fenólicos fue siempre superior en las plantas transformadas que en las testigo. Los resultados demostraron que no existe una correlación simple entre el contenido de estos compuestos y la resistencia de la planta ante el ataque del patógeno. La actividad de la  $\beta$ - 1,3- glucanasa en respuesta a la infección del patógeno se conoce, sin embargo la influencia de esta enzima en el estatus metabólico de la célula hospedero no ha sido explicada. Al estudiar los perfiles metabólicos (más de 150 compuestos) estos autores observaron diferencias sustanciales entre las plantas transgénicas y las testigos.

En la comparación bromatológica de los frutos (tabla 13) no se encontraron diferencias significativas entre los cuatro grupos de plantas evaluadas. Los índices de calidad se comportaron de forma favorable según lo informado por varios autores que han caracterizado previamente esta variedad de piña. En el caso de la vitamina C, los valores entre 13 y 18 (mg/100 mL de jugo) se

corresponden a las características de las Cayenas descritas por otros autores (Py *et al.*, 1987), quienes destacan que el contenido de vitamina C en los frutos de piña es uno de sus componentes nutritivos más importantes.

Otro de los indicadores a tener en cuenta para evaluar la calidad requerida por los mercados importadores es la madurez del fruto en la que influye el porcentaje de acidez del jugo. El índice de madurez se obtiene de la relación que se establece entre los sólidos solubles y la acidez. Las variaciones de este indicador de madurez se deben a los cambios que experimentan los ácidos del jugo. Este factor depende mucho del estado en que se tome la muestra del campo, aspecto importante a evaluar pues permite determinar la época de cosecha en dependencia de las condiciones ambientales y de cultivo (Gadelha y Viera, 1986).

La evaluación de la acidez del jugo permitió comprobar que no existieron diferencias significativas entre los tres grupos de plantas de piña evaluadas y los valores estuvieron en rangos aceptables para este indicador. La baja acidez en los jugos de piña influye favorablemente en el sabor del fruto, pues resulta más agradable al paladar cuando se consume como fruta fresca, por lo que los frutos no deben cosecharse antes de la madurez comercial (Zambrano y Castellanos, 1997).

El porcentaje de sólidos solubles, es un indicador que brinda información en el momento de la cosecha, ya que la piña es un fruto no climatérico que una vez que se desprende de la planta mantiene sus cualidades o propiedades internas, por lo que los sólidos solubles tienen que alcanzar un valor mínimo para que esta pueda ser consumida y considerarse como fruta de calidad. Al analizar este indicador tampoco se encontraron diferencias significativas en los frutos de piña de cada grupo de plantas evaluadas y los valores se comportaron en correspondencia con los descritos como óptimos para este cultivar. Este es un carácter muy importante ya que contribuye al dulzor de la fruta.

Hasta el momento se han evaluado plantas de piña transformadas durante la aclimatización y crecimiento en campo. Se encontraron algunas variaciones en los indicadores bioquímicos y agronómicos, sin embargo estas no son lo suficientemente relevantes para limitar la transgénesis como una importante herramienta en el mejoramiento genético en el cultivo de la piña. Tales estudios se completarán mediante la evaluación y caracterización de las plantas transformadas y no transformadas en la segunda y tercera generaciones vegetativas.

## 5 CONCLUSIONES

1. Se estableció una metodología para la transformación genética de callos con estructuras embriogénicas de piña mediante *A. tumefaciens*. Se demostró la factibilidad del uso de los Biorreactores de Inmersión Temporal como una herramienta para la selección de líneas transgénicas de piña resistentes a fosfotricina. El agente de selección fue efectivo a concentraciones menores en comparación con los frascos convencionales de micropropagación.
2. Se seleccionaron en condiciones de aclimatización las líneas 90, 40, 44, 46 y 27 con niveles de tolerancia al herbicida FINALE®; mientras las líneas 90, 79, 41, 1 y 20 mostraron protección frente al ataque del patógeno *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica*. La línea 90 mostró niveles altos de tolerancia al herbicida y resistencia al oomicetes.
3. Las plantas transformadas (línea 90) y las no transformadas fueron estadísticamente similares en cuanto a la masa fresca, altura y supervivencia así como, en la actividad peroxidasa durante los 30 primeros días de la aclimatización. Sin embargo, cambios significativos causados por la transgénesis, se detectaron en los niveles de malondialdehído, otros aldehídos, clorofilas, fenoles y proteínas.
4. En la fase de aclimatización, las plantas transformadas (línea 90) y no transformadas respondieron de forma diferente a la aplicación del herbicida FINALE®. A los 15 d posteriores a la aplicación, ambos grupos tenían respuestas desiguales en cuanto a la supervivencia, los niveles de malondialdehído, otros aldehídos, clorofilas, fenoles y proteínas. Solamente eran similares en cuanto a la actividad peroxidasa que había aumentado, tanto en el material transgénico como no transgénico, como respuesta al herbicida.
5. El estudio en campo de la primera generación vegetativa de la línea transgénica 90, mostró su capacidad para sobrevivir a la aplicación del herbicida FINALE®. Las proteínas mayoritarias del proteoma no variaron y se mantuvo con 50 cromosomas. Se observaron diferencias estadísticas con respecto al testigo micropropagado no transformado y al testigo macropropagado en cuanto a niveles de fenoles, clorofilas, proteínas; actividad fenilalanina amonio liasa, superóxido dismutasa, glutamina sintetasa; masa del fruto sin corona; altura de la corona; y altura y diámetro de la planta. Sin embargo, tales variaciones inesperadas no justifican el rechazo de la transgénesis como una herramienta importante para el mejoramiento genético de la piña.

## 6 RECOMENDACIONES

1. Aplicar el método de transformación desarrollado en esta investigación doctoral para introducir otros transgenes en el genoma de *Cayena lisa* Serrana.
2. Profundizar en el estudio de las restantes líneas transgénicas promisorias en cuanto a la tolerancia al FINALE<sup>®</sup> y la resistencia a *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*.
3. Continuar la evaluación de la línea transgénica 90 en la segunda y la tercera generaciones vegetativas, así como, realizar determinaciones de riesgos.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accotto, G.P.; Nervo, G.; Acciarri, N.; Tavella, L.; Vecchiati, M.; Schiavi, M.; Mason, G.; Vaira, A. Field evaluation of tomato hybrids engineered with tomato spotted wilt virus sequences for virus resistance, agronomic performance, and pollen-mediated transgene flow. *Phytopathology*. 95:800-807; 2005.
- Aguero, C.B.; Uratsu, S.L.; Greve, C.; Powell, A.L.T.; Labavitch, J.M.; Meredith, C.P.; Dandekar, A.M. Evaluation of tolerance to Pierce's disease and *Botrytis* in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear *PGIP* gene. *Mol. Plant Pathol.* 6:43-51; 2005.
- Ahmad, A.; Wen-Yuan, S.; H., J.; Graham, J.; Grosser, W. Comparison between protoplast transformation and co-transformation in 'Hamlin' Sweet Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *HortScience*. 41:972-973; 2006.
- Ahn, I. Glufosinate ammonium-induced pathogen inhibition and defense responses culminate in disease protection in *bar*-transgenic rice. *Plant Physiol.* 1:213-227; 2008.
- Ahn, Y.-J.; Zimmerman, J.L. Introduction of the carrot *HSP17.7* into potato (*Solanum tuberosum* L.) enhances cellular membrane stability and tuberization *in vitro*. *Plant Cell Environ.* 29:95-104; 2006.
- Akama, K.; Puchta, H.; Hohn, B. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the *bar* gene as selectable marker. *Plant Cell Rep.* 14:450-454; 2005.
- Al-Kaff, N.S.; Kreike, M.M.; Covey, S.N.; Pitcher, R.; Anthony, M. Plant viruses: benefits and problems for genetic engineering. *Nat. Biotech.* 18 995-999; 2000a.
- Al-Kaff, N.S.; Kreike, M.M.; Covey, S.N.; Pitcher, R.; Page, A.M.; Dale, P.J. Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter-regulated transgene. *Nat. Biotech.* 18:995-999; 2000b.
- Altpeter, F.; Baisakh, N.; Beachy, R.; Bock, R.; Capell, T.; Christou, P.; Daniell, H.; Datta, K.; Datta, S.; Dix, P.; Fauquet, C.; Huang, N.; Kohli, A.; Mooibroek, H.; Nicholson, L.; Nguyen, T.; Nugent, G.; Raemakers, K.; Romano, A.; Somers, D.; Stoger, E.; Taylor, N.; Visser, R. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Mol. Breed.* 15:305-327; 2005.
- Anand, A.; Zhou, T.; Trick, H.N.; Gill, B.S.; Bockus, W.W.; Muthukrishnan, S. Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *J. Exp. Bot.* 54:1101-1111; 2003.

- Aragón, C.; Carvalho, L.; González, J.; Escalona, M.; Amancio, S. Sugarcane (*Saccharum* sp. Hybrid) propagated in headspace renovating systems shows autotrophic characteristics and develops improved anti-oxidative response. *Trop. Plant Biol.* 2:38-50; 2009.
- Aragón, C.; Escalona, M.; Capote, I.; Pina, D.; Cejas, I.; Rodríguez, R.; Cañal, M.; Sandoval, J.; Roels, S.; Debergh, P.; González-Olmedo, J. Photosynthesis and carbon metabolism in plantain (*Musa* AAB) growing in temporary immersion bioreactor (TIB) and *ex vitro* acclimatization. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* 41:550-554; 2005.
- Arangao, F.; Vianna, G.; Albino, M.; Rech, E. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. *Crop Sci.* 42:1298- 1302; 2002.
- Arencibia, A. Gene transfer in sugarcane. In: Hohn, T., Leisinger, K., eds. *Plant Gene Research*. Amsterdam: Elsevier; 79-104; 1999.
- Arencibia, A.; Gentinetta, E.; Cussoni, E.; Catiglione, S.; Kohli, A.; Vain, P.; Leech, M.; Christou, P.; Sala, F. Molecular analysis of the genome of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced via particle bombardment or intact cell electroporation. *Mol. Breed.* 4:99-109; 1998a.
- Arencibia, A.; Molina, P.; de la Riva, G.; Selman-Housein, G. Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell electroporation. *Plant Cell Rep.* 14:305-309; 1995.
- Arencibia, A.D.; Carmona, E.R.; Tellez, P.; Chan, M.T.; Yu, S.M.; Trujillo, L.E.; Oramas, P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum spp.* L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transg. Res.* 7:213-222; 1998b.
- Arnold, G.R.W. *Lista de Hongos Fitopatógenos de Cuba*. Ciudad de La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1986.
- Attard, A.; Gourgues, M.; Galiana, E.; Panabières, F.; Ponchet, M.; Keller, H. Strategies of attack and defense in plant-oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur. *J. Plant Physiol.* 165:83-94; 2008.
- Bae, T.; Vanjildorj, E.; Song, S.; Nishiguchi, S.; Yang, S.; Song, I.; Chandrasekhar, T.; Kang, T.; Kim, J. Environmental risk assessment of genetically engineered herbicide-tolerant *Zoysia japonica*. *J. Environ. Qual.* 37:207-218; 2008.
- Bahieldin, A.; Mahfouz, H.; Eissa, H.; Saleh, O.; Ramadan, A.; Ahmed, I.; Dyer, W.; El-Itriby, H.; Madkour, M. Field evaluation of transgenic wheat plants stably expressing the *HVA1* gene for drought tolerance. *Physiol. Plant.* 123:421-427; 2005.
- Barro, F.; Martín, A.; Cabrera, A. Transgene integration and chromosome alterations in two transgenic lines of *Triticordeum*. *Chrom. Res.* 11:565- 572; 2003.

- Bartholomew, D. MD2 pineapple transforms the world's pineapple fresh fruit export industry. *Pineapp. News.* 2-5; 2009.
- Bartholomew, D.; Paul, R.; Rohrbach, K. *The pineapple: Botany, production and use.* Wallingford: CABI Publishing; 301; 2003.
- Bayer. Bayer Technical Information: Glufosinate-ammonium. Monheim: Bayer CropScience; 1-5; 2005.
- Beers, E.; McDowell, J. Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Plant Biol.* 4:561-567; 2001.
- Benega, R.; Isidrón, M.; Arias, E.; Daquinta, M.; Dominguez, Q.; Borroto, C.; Hidalgo, M. Estudio comparativo entre dos variedades de piña (*Ananas comosus* L. Merr.). *Pineapp. News.* 2:6-9; 1996.
- Bertani, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *E. coli*. *J. Bacteriol.* 62:293-300; 1951.
- Binns, A.N.; Thomashow, M.F. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Annu. Rev. Microbiol.* 42:575-606; 1988.
- Birch, A.N.E.; Geoghegan, I.E.; Griffiths, D.W.; McNicol, J.W. The effects of genetic transformations for pest resistance on foliar solanidine-based glycoalkaloids of potato (*Solanum tuberosum*). *Ann. Appl. Biol.* 140 143-149 2002.
- Birch, R.; Bower, R.; Elliott, A.; Hansom, S.; Basnayake, S.; Zhang, L. Regulation of transgene expression: progress towards practical developments. In: Arencibia, A. D., ed. *Plant Genetic Engineering Towards the Third Millennium.* Amsterdam: Elsevier; 118-125; 2000.
- Birch, R.G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 48:297-326; 1997.
- Bor, Y.; Silva, P.; Francisco, R. Número cromossômico de exemplares da família *Bromeliaceae*. *Rev. Bras. Frut.* 9:49-55; 1987.
- Borras, O.; Santos, R.; Tussel, T.; Matos, P.; Cabral, R. Phytotoxicity of *Fusarium subglutinans* culture filtrates on *in vitro* plantlets and calli of resistant and susceptible pineapple (*Ananas comosus*). *Plant Pathol.* 48:756-758; 1999.
- Botella, J.R.; Caravallo, A.S.; Cazzonelli, C.I. Towards the production of transgenic pineapple to control flowering and ripening. *Acta Hort.* 529:115-122; 2000.
- Botella, J.R.; Fairbairn, D.J. Present and future potential of pineapple biotechnology. *Acta Hort.* 622:23-28; 2005.
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254; 1976.

- Brake, J.; Faust, M.; Stein, J. Evaluation of transgenic hybrid corn (VIP3A) in broiler chickens. *Poult Sci.* 84:503-12; 2005.
- Breitler, J.; Vassal, J.; del Mar Catala, M.; Meynard, D.; Marfa, V.; Mele, E.; Royer, M.; Murillo, I.; San Segundo, B.; Guiderdoni, E.; Messeguer, J. *Bt* rice harbouring *cry* genes controlled by a constitutive or wound-inducible promoter: protection and transgene expression under Mediterranean field conditions. *Plant Biotech. J.* 2:417-430; 2004.
- Brumbarova, T.; Matros, A.; Mock, H.-P.; Bauer, P. A proteomic study showing differential regulation of stress, redox regulation and peroxidase proteins by iron supply and the transcription factor *FER*. *The Plant J.* 54:321-334; 2008.
- Bruner, S.C. Lista preliminar de las enfermedades de las plantas de importancia económica para Cuba. Informe de los años 1918, 1919 y 1920 de la Estación Agrícola de Santiago de las Vegas. 21:725-763; 1920.
- Bytebier, B.; Deboeck, F.; Greve, H.; Van Montagu, M.; Hernalsteens, J. T-DNA organization in tumor cultures and transgenic plants of the monocotyledon *Asparagus officinalis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 84:5345-5349; 1987.
- Caboche, M. Liposome mediated transfer of nucleic acids into plant cells. *Physiol. Plant.* 79:173-176; 1990.
- Cangelosi, G.A.; Best, E.A.; Martinetti, C.; Nester, E.W. Genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens*. *Meth. Enzymol.* 145:177-181; 1991.
- Cangelosi, G.A.; Martinetti, G.; Leigh, J.A.; Lee, C.C.; Theines, C.; Nester, E.W. Role of *Agrobacterium tumefaciens* *chvA* protein in export of B-1,2 glucan. *J. Bacteriol.* 171:1609-1615; 1989.
- Capodicasa, C.; Vairo, D.; Zabolina, O.; McCartney, L.; Caprari, C.; Mattei, B.; Manfredini, C.; Aracri, B.; Benen, J.; Knox, P.; De Lorenzo, G.; Cervone, F. Targeted modification of homogalacturonan by transgenic expression of a fungal polygalacturonase alters plant growth. *Plant Physiol. Rev.* 135:1294-1304; 2004.
- Carmona, E.R.; Arencibia, A.D.; López, J.; Simpson, J.; Vargas, D.; Sala, F. Analysis of genomic variability in transgenic sugarcane plants produced by *Agrobacterium tumefaciens* infection. *Plant Breed.* 124:33-38; 2005.
- Carre, I.A.; Kay, S.A. Multiple DNA-protein complexes at a circadian-regulated promoter element. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 7:2039-2051; 1995.
- Casal, J.; Mella, R.; Ballare, C.; Maldonado, S. Phytochrome-mediated effects on extracellular peroxidase activity, lignin content and bending resistance in etiolated *Vicia faba* epicotyls. *Physiol. Plant.* 92:555-562; 1994.

- Castle, L.; Errampalli, D.; Atherton, L.; Franzmann, E. Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis*. *Mol. Gen. Genet.* 241:504-514; 1993.
- Castro, A.J.; Carapito, C.; Zorn, N.; Magné, C.; Leize, E.; Van Dorsselaer, A.; Clement, C. Proteomic analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) tissues subjected to herbicide stress. *J. Exp. Bot.* 56:2783-2795; 2005.
- Cervera, M.; Navarro, A.; Navarro, L.; Peña, L. Production of transgenic adult plants from Clementine mandarin by enhancing cell competence for transformation and regeneration. *Tree Physiol.* 28:55-66; 2008.
- Clarke, J.; Spetz, C.; Haugslien, S.; Xing, S.; Dees, M.; Moe, R.; Blystad, D. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Poinsettia*, *Euphorbia pulcherrima*, with virus-derived hairpin RNA constructs confers resistance to *Poinsettia* mosaic virus. *Plant Cell Rep.* 27:1027-1038; 2008.
- Clive, J. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. Ithaca: FALTA; 2008.
- Cohen, A.; Mayfield, S. Translational regulation of gene expression in plants. *Curr. Opin. Biotech.* 8:189-194; 1997.
- Confalonieri, M.; Belenghi, B.; Balestrazzi, A. Transformation of elite white poplar (*Populus alba* L.) cv. "Villafranca" and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Rep.* 19:978-982; 2000.
- Conner, A.J.; Williams, M.K.; Abernethy, D.J.; Fletcher, P.J.; Genet, R.A. Field performance of transgenic potatoes. *HortScience* 22:361-371; 1994.
- Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Leal, F. Morphology, Anatomy and Taxonomy. Oxon,UK: CABI Publishing; 13-32; 2003.
- Corazzari, E.; Badialia, D.; Bazzocchib, G.; Bassottic, P.; Rosellic, G.; Mastropaolod, M.; Lucàd, G.; Galeazzie, R.; Peruzzie, E. Long term efficacy, safety, and tolerability of low daily doses of isosmotic polyethylene glycol electrolyte balanced solution (PMF-100) in the treatment of functional chronic constipation. *Gut.* 46:522-526 2000.
- Cromwell, G.; Henry, B.; Scott, A.; Gerngross, M.; Dusek, D.; Fletcher, D. Glufosinate herbicide tolerant (Liberty Link) rice vs. conventional rice in diet for growing-finishing swine. *J. Anim. Sci.* 83:1068-1074; 2005.
- Chan, Y.; Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Sanewski, G. Breeding and variety improvement. In: Bartjolomew, D. P., PAull, R. E., Rohrbach, K. G., eds. *The Pineapple: Botany, Production and Uses*. New York: CAB International; 33-35; 2003.
- Chen, S.Y.; Wang, A.M.; Li, W.; Wang, Z.Y.; Cai, X.L. Establishing a gene trap system mediated by T-DNA (GUS) in rice. *J. Integr. Plant Biol.* 50:742-751; 2008.

- D'Halluin, K.; De Block, M.; Denecke, J.; Janssens, J.; Leemans, J.; Reynaerts, A.; Botterman, J. The *bar* gene as selectable and screenable marker in plant genetic engineering. *Meth. Enzymol.* 216:415-426; 1992.
- Daley, M.; Knauf, V.C.; Summerfelt, K.R.; Turner, J.C. Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 17:489-496; 1998.
- Damerval, C.; de Vienne, D.; Zivy, M.; Thiellement, H. Technical improvements in two-dimensional gel electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis.* 7:52-54; 1986.
- Danny, W.-K.; Chandrasekharan, M.B.; Timothy, C.H. Ordered histone modifications are associated with transcriptional poising and activation of the *phaseolin* promoter. *Plant Cell.* 18:119-132; 2006.
- Daquinta, M.; Benega, R. Brief review of tissue culture in pineapple. *Pineapp. News.* 3:7-9; 1997.
- Daquinta, M.A.; Castillo, R.; Lorenzo, J.C.; Cobo, I.; Escalona, M.; Trujillo, R.; Borroto, C. Formación de callos en piña (*Ananas comosus* (L.) Merr). *Rev. Bras. Frut.* 16:83-89; 1994.
- Darmency, H.; Vigouroux, Y.; Gestat, D.; Richard-Molard, M.; Muchembled, C. Transgene escape in sugar beet production fields: data from six years farm scale monitoring. *Environ. Biosafety Res.* 6:197-206; 2007.
- Davey, M.; Sripaoraya, S.; Anthony, P.; Lowe, K.; Power, J. Biotechnology in agriculture and forestry. In: Pua, E. C., Davey, M. R., eds. *Transgenic Crops*. Berlin: Springer Verlag; 97-127; 2007.
- De Block, M.; De Brouwer, D.; Tenning, P. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants. *Plant Physiol.* 91:694-701; 1989.
- De Vries, J.; Heine, M.; Harms, K.; Wackernagel, W. Spread of recombinant DNA by roots and pollen of transgenic potato plants, identified by highly specific biomonitoring using natural transformation of an *Acinetobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4455-4462; 2003.
- Dellaporta, S.; Wood, J.; Hicks, B. A plant minipreparation: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 4:19-21; 1983.
- Di Cola, A.; Shaun, B.; Robinson, C. The thylakoid pH are not required for the initial stages of Tat-dependent protein transport in tobacco protoplasts. *J. Biol. Chem.* 280:41165-41170; 2005.
- Diemer, F.; Caissard, J.; Moja, S.; Jullien, F. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Mentha spicata* and *Mentha arvensis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 57:75-78; 1999.

- Dronne, S.; Moja, S.; Jullien, F.; Berger, F.; Caissard, J.-C. *Agrobacterium*-mediated transformation of lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur) cultivars. *Transg. Res.* 8:335-347; 1999.
- Dumet, D.; Benson, E.E. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In: Engelmann, F., Takagi, H., eds. *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. Rome, Tsukuba: JIRCAS, IPGRI; 43-56; 2000.
- Duval, M.; Noyer, J.; Hamon, P.; Coppens d'Eeckenbrugge, G. Study of variability in the genera *Ananas* and *Pseudoananas* using RFLP. *Acta Hort.* 529:123-131; 1998.
- Eady, C.C.; Weld, R.J.; Lister, C.E. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and transgenic-plant regeneration of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Cell Rep.* 19:376-381; 2000.
- Edna, A.; Tahar, T.; Mikae, I.; Courbot, S.; Mugford, J.; Andrew, C.; Borland, A. Cloning, localization and expression analysis of vacuolar sugar transporters in the CAM plant *Ananas comosus* (pineapple). *J. Exp. Bot.* 43:1-14; 2008.
- Edward, R.; Dixon, D. The role of glutathione transferases in herbicide metabolism. In: Cobb, A. H., Kirkwood, R., Sheffield, C., eds. *Herbicides and Their Mechanisms of Action*. FALTA: Sheffield Academic Press; 33-71; 2000.
- Egidi, M. Proteomics as a complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic maize seeds as a result of genetic modifications. . *Plant Proteomics in Europa*. COST Action. Abstracts of the II Meeting.18-24; 2008.
- Enriquez-Obregón, G.A.; Vázquez-Padrón, R.I.; Prieto-Samsonov, D.L.; De la Riva, G.A.; Selman-Housein, G. Herbicide-resistance sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta.* 206:20-27; 1998.
- Escalona, M.; Lorenzo, J.C.; González, B.; Daquinta, M.; González, J.L.; Desjardins, Y.; Borroto, C.G. Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) micropopagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.* 18:743-748; 1999.
- Facchini, P.; Loukanina, N.; Blanche, V. Genetic transformation via somatic embryogenesis to establish herbicide-resistant opium poppy. *Plant Cell Rep.* 27:719-727; 2008.
- FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>; 2008.
- Feder, M.E.; Walter, J.-C. The biological limitations of transcriptomics in elucidating stress and stress responses. *J. Evolut. Biol.* 18:901-910; 2005.
- Firoozabady, E.; Heckert, M.; Gutterson, N. Transformation and regeneration of pineapple. *Plant Cell Rep.* 84:1-16; 2006.

- Firoozabady, E.; Heckert, M.; Oeller, P.; Gutterson, N. Transformation and regeneration of transgenic pineapple plants. Proc. 5th Int. Cong. Plant. Mol. Biol. Singapore, Abstract No. 1358. 1997.
- Fitch, M.M.; Manshard, T.R.M.; Gonsalves, D.; Slightom, J.I.; Sanford, J.C. Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. Plant Cell Rep. 9:189-1994; 1990.
- Fraley, R.T.; Rogers, S.G.; Horsch, R.B.; Sanders, P.R.; Flick, J.S.; Adams, S.P.; Bittner, M.L.; Brand, L.A.; Fink, C.L.; Fry, J.S.; Galluppi, G.R.; Goldberg, S.B.; Hoffmann, N.L.; Woo, S.C. Expression of bacterial genes in plants cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 80:4803-4807; 1983.
- Fraser, P.; Enfissi, E.; Goodfellow, M.; Eguchi, T.; Bramley, P. Metabolite profiling of plant carotenoids using the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. The Plant J. 49:552-564; 2007.
- Fromm, M.; Callis, J.; Taylor, L.; Walbot, L.O. Electroporation of DNA and RNA into plant protoplasts. Meth. Enzymol. 153:351-366; 1987.
- Gadelha, R.; Viera, A. Competição entre as cultivares de abacaxi Perolera e Smooth Cayene. Rio de Janeiro Pesagro-Rio, Comunicado técnico 165; 1986.
- Gahan, P.; Wyndale, R.; Mandell, S.; Boggetti, F. Evidence that direct DNA uptake through cut shoots leads to genetic transformation of *Solanum aviculare* Forst. Cell Biochem. Funct. 21:11- 17; 2002.
- Gail, L.S.; Wesley, S.V.; Kenneth, L.K.; Chen, F.; Lamb, C.; Dixon, R.A. Phenylpropanoide compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanina ammonia-lyase. Phytochemistry. 64:153-161; 2003.
- Gangopadhyay, G.; Kanti, R.; Gangopadhyay, S.; Mukherjee, K. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of pineapple var. *Queen* using a novel encapsulation-based antibiotic selection technique. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 97:295-302; 2009.
- Garbis, S.; Lubec, G.; Fountoulakis, M. Limitations of current proteomic technologies. J. Chromatogr. 1:1-18; 2005.
- Gaulin, E.; Drame, N.; Lafitte, C.; Torto-Alalibo, T.; Martinez, Y.; Ameline-Torregrosa, C. Cellulose binding domains of a *Phytophthora* cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. Plant Cell. 18:1766-77; 2006.
- Gaurab, G.; Subhash Kanti, R.; Sangita Basu, G.; Kalyan Kumar, M. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of pineapple var. *Queen* using a novel encapsulation-based antibiotic selection technique. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 97:295-302; 2009.

- Gilchris, D. Programmed cell death plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Phytopathology*. 36:393-414; 1998.
- Gómez-Lim, M.A.; Litz, R.E. Genetic transformation of perennial tropical fruits. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant*. 40:442-449; 2004.
- Gordon-Kamm, W.W.; Spencer, T.M.; Mangano, M.L.; Adams, T.R.; Daines, R.J.; Start, W.G.; O'Brien, J.V.; Chambers, S.A.; Adams, W.R.; Willets, N.G.; Rice, T.B.; Mackey, C.V.; Kruegen, R.W.; Kausch, A.P.; Lemaux, P.G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell*. 2:603-618; 1990.
- Gore, J.; Adamczyk, J.J.; Catchot, A.; Jackson, R. Yield response of dual-toxin *Bt* cotton to *Helicoverpa zea* infestations. *J. Econ. Entomol.* 101:1594-1599; 2008.
- Graham, M.; Ko, L.; Dahler, J.; Underhill, S.; Smith, M. The development of blackheart resistant pineapples through genetic engineering. *Acta Hort.* 529:133-136; 2000.
- Graves, A.E.; Goldman, S.L. The transformation of *Zea mays* seedlings with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 19:1031-1040; 1986.
- Gross, N.T.; Hultenby, K.; Mengarelli, S.; Cammer, P.; Jarstrand, C. Lipid peroxidation by alveolar macrophages challenged with *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* or *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* 38:443-449; 2000.
- Groten, K.; Barz, W. Elicitor-induced defence reactions in cell suspension cultures of soybean cultivars. *Z Naturforsch.* 55:718-30; 2000.
- Gurr, S.I.; McPherson, J.; Bowles, D.J. Lignin and associated phenolic acids in cell walls. In: Wilkinson, D. L., ed. *Molecular Plant Pathology*. Oxford: FALTA; 51-56; 1992.
- Gygi, S.; Rochon, Y.; Franza, B.; Aebershold, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19:1720-1730; 1999.
- Habash, D.; Massiah, J.; Rong, H.; Wallsgrove, R.; Leigh, R. The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. *Ann. Appl. Biol.* 138:83-89; 2001.
- Hamilton, C.M. A binary-BAC system for plant transformation with high molecular weight DNA. *Gene*. 200:107-116; 1997.
- Han, K.; Meilan, R.; Ma, C.; Strauss, S. An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*). *Plant Cell Rep.* 19:315-320; 2000.
- Hanhineva, K.; Karenlampi, S. Production of transgenic strawberries by temporary immersion bioreactor system and verification by TAIL-PCR. *BMC Biotech.* 7:20-30; 2007.
- Harding, K.; Benson, E. *Genetic Preservation of Plant Cells*. Berlin: BWW Grout. Springer Verlag; 1995.

- Haslberger, A. Codex guidelines for GM foods include the analysis of unintended effects. *Nat. Biotech.* 21:739-741; 2003.
- Heath, R.L.; Packer, J. Photoperoxidation in isolated chloroplast: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125:189-198; 1968.
- Hernández, I.; Portieles, R.; Chacón, O.; Borrás, O. Proteins and peptides for the control of phytopathogenic fungi. *Biotecnología Aplicada.* 22:256-260; 2005.
- Herouet, C.; Esdaile, D.J.; Mallyon, B.A.; Debruyne, E.; Schulz, A.; Curtier, T.; Hendricx, K.; Van der Klis, R.J.; Rován, D. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 41:134-149; 2005.
- Herrera-Estrella, L.; De Block, M.; Messens, E.; Hernalsteens, J.; Van Montagu, M.; Schell, J. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 2:987-995; 1983.
- Hidaka, T.; Omura, M.; Masashi, O.; Masamitsu, T.; Akira, K.; Masahiro, O.; Motoyoshi, F. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus spp.* from suspension cells. *Japan. J. Breed.* 40:199-207; 1990.
- Hiei, Y.; Komari, T.; Ishida, Y.; Saito, H. Development of an *Agrobacterium*-mediated transformation method for monocotyledonous plants. *Breed. Res.* 2:205-213; 2000.
- Hiei, Y.; Ohta, S.; Komari, T.; Kumashiro, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6:271-282; 1994.
- Hiei, Y.; Ohta, S.; Komari, T.; Kumashiro, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6:271-282; 1997.
- Hjerno, K.; Alm, K.; Canback, B.; Matthiesen, R.; Trajkovski, K.; Bjork, L.; Roepstorff, P.; Emanuelsson, C. Down-regulation of the strawberry Bet v 1-homologous allergen in concert with the flavonoid biosynthesis pathway in colorless strawberry mutant. *Proteomics.* 6:1574-87; 2006.
- Hooykaas, P.J.J.; Beijersbergen, A.G.M. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32:157-179; 1994.
- Hooykaas, P.J.J.; Schilperoort, R.A. *Agrobacterium* and plant engineering. *Plant Mol. Biol.* 19:15-38; 1992.
- Horvath, H.; Jense, L.G.; Wong, O.T. Stability of transgenes expression, field performance and recombination breeding of transformed barley lines. *Theor. Appl. Genet.* 102:1-11; 2001.

- Hu, F.; Zhang, L.; Wang, L.; Ding, J.; Wu, D. *Agrobacterium*-mediated transformed transgenic triploid bermuda grass (*Cynodon dactylon* x *C. transvaalensis*) plants are highly resistant to the glufosinate herbicide Liberty. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 83:13-19; 2005.
- IBPGRI. Descriptors for pineapple. CAB International. 1991.
- Igasaki, I.; Mohri, T.; Ichikawa, H.; Shinohara, K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Robinia pseudoacacia*. *Plant Cell Rep.* 19:448-453; 2000.
- INISAV. Metodologías de señalización y pronóstico de plagas y enfermedades. Ciudad de La Habana: Instituto de Sanidad Vegetal, MINAGRI; 9-38; 1978.
- Isidró, M. Proyecto utilización de técnicas biotecnológicas en el mejoramiento y conservación del germoplasma de piña. Informe final al PNCT Biotecnología Agrícola. 120; 2000.
- Isidró, M. Algunas consideraciones técnicas acerca del establecimiento y atenciones al cultivo de la piña. Ciego de Avila: Centro de Bioplasmas; 1-50; 2002.
- Isidró, M.; Benega, R.; Cisneros, A.; Arias, E.; Lorenzo, J.C.; Espinosa, P.; Borroto, C. Application of biotechnological and traditional methods in Cuban pineapple breeding program. *Pineapp. News.* 6; 1999.
- Isidró, M.; Rosales, Y.; Pifferrer, A.; Cisneros, A.; Benega, R.; Carvajal, C. Caracterización del germoplasma de piña colectado en Cuba mediante prospección nacional: localización, diversidad genética y situación actual. *Cult. Trop.* 24:65-71; 2003.
- Janssen, B.J.; Gardner, R.C. Localized transient expression of GUS in leaf discs following co-cultivation with *Agrobacterium*. *Plant Mol. Biol.* 14:61-72; 1989.
- Janyce, A.; Sugui, Y.; Chang, C.; Kwon-Chung, K.J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. *Appl. Environ. Microbiol.* 4:1798-1802; 2005.
- Jefferson, R.A. Assaying chimeric genes in plants: the genes fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387; 1987.
- Jeon, G.A.; Eum, J.S.; Sim, W.S. The role of inverted repeat (IR) sequence of the *virE* gene expression in *Agrobacterium tumefaciens* pTiA6. *Mol. Cells.* 8:49-53; 1998.
- Jia, Y.H.; Li, L.P.; Hou, Q.M.; Pan, S.Q. An *Agrobacterium* gene involved in tumorigenesis encodes an outer membrane protein exposed on the bacterial cell surface. *Gene.* 284:113-124; 2002.
- Jianxiong, L.; Manjusha, V.; White, C.; Vainstein, A.; Citovsky, V.; Tzfira, T. Involvement of *KU80* in T-DNA integration in plant cells. *Plant Biol.* 102:19231-19236; 2005.
- Jones, A. Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol.* 125:94-97; 2001.

- Jorrín, J.; Dixon, R.A. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). II. Purification, characterization, and induction of phenylalanine ammonia-lyase isoforms from elicitor-treated cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 92:447-455; 1990.
- Jorrín, J.; Maldonado, A.; Echevarría, S.; Valledor, L.; Castillejo, M.; Curto, M.; Valero, J.; Sghaiera, B.; Donoso, G.; Redondo, I. Second-generation proteomic techniques, an appropriate 3 experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE 4 standards, increase plant proteome coverage and expand 5 biological knowledge. *J. Proteom.* 25:1-30; 2009.
- Kamoun, S. Non-host resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Plant Biol.* 4:295-300; 2001.
- Kartha, K.K.; N., C.R.; Georges, F.; Leung, N.; Casell, K.; Kendal, E.; Qureshi, J. Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene in barley cell cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.* 8:429-432; 1989.
- Kartzke, S.; Saedler, H.; Meyer, P. Molecular analysis of transgenic plants derived from transformants of protoplasts at various stages of the cell cycle. *Plant Sci.* 67:63-72; 1990.
- Kathryn, K. Biolistic-mediated transformation of *Lilium longiflorum* cv. Nellie White. *HortScience.* 43:1864-1869; 2008.
- Kerry, A.; Lutz, J.; Knapp, E.; Maliga, P. Expression of *bar* in the plastid genome confers herbicide resistance. *Plant Physiol.* 125:1585-1590; 2001.
- Kim, L.; Raemakers, A.; Jacobsen, D.; Visser, J. Efficient production of transgenic *Alstroemeria* plants by using *Agrobacterium tumefaciens*. *Ann. Appl. Biol.* 151:401-412; 2007.
- Kimber, I.; Kerkvliet, N.I.; Taylor, S.L.; Astwood, J.D.; Sarlo, K.; Dearman, R.J. Toxicology of protein allergenicity : prediction and characterization. *Toxicol. Sci.* 48:157-162; 1999.
- Kokko, H.; Kärenlampi, S. Transformation of arctic bramble (*Rubus arcticus* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 17:822-826; 1998.
- Kondo, T.; Hasegawa, H.; Suzuki, M. Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Plant Cell Rep.* 19:989-993; 2000.
- Krishnamurthy, K.V.; Suhasini, K.; Sagare, A.P.; Meixner, M.; de Kather, A.; Pickardt, T.; Schieder, O. *Agrobacterium*-mediated transformation of chick pea (*Cicer arietinum* L.) embryo axes. *Plant Cell Rep.* 19:235-240; 2000.
- Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685; 1970.
- Leubner-Metzger, F.; Meins, J. Functions and regulation of plant beta-1,3-glucanases (PR-2). In: Datta, S. K., Mathukrishnan, S., eds. Pathogenesis-Related Proteins in Plants. Boca Raton: CRC Press; 49-76; 1999.

- Li, D.; Shi, W.; Deng, X. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses of ponka mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. *Plant Cell Rep.* 21:153-156; 2002.
- Liu, C.W.; Chin-Chung, L.; Chen, J.; Tseng, M. Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata) by particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 26:1733-1744; 2007.
- Liu, S.; Wei, Z.; Huang, J. The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties. *Plant Cell Rep.* 5:489-498; 2008.
- Loeillet, D. Victoria pineapple: a promising market. *Fruitrop.* 24:7-9; 1996.
- Lorenzo, J.; Blanco, M.; Peláez, O.; González, A.; Cid, M.; Iglesias, A.; González, B.; Escalona, M.; Espinosa, P.; Borroto, C. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 65:1-8; 2001.
- Lorenzo, J.C.; González, B.L.; Escalona, M.; Teisson, C.; Espinosa, P.; Borroto, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 54:197-200; 1998.
- Lusso, M.; Kuc, J. The effect of sense and antisense expresión of the *PR-N* gene for  $\beta$ -1,3-glucanase on disease resistance of tobacco to fungi and viruses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49:267- 283; 1996.
- MacKay, V.; Li, X.; Flory, M.; Turcott, T.; Law, G.; Serikawa, K.; Xu, X.; Lee, H.; Goodlett, D.; Aebersold, R.; Zhao, L.; Morris, D. Gene expression analyzed by high-resolution state array analysis and quantitative proteomics: response of yeast to mating pheromone. *Mol. Cell Proteom.* 3:478-489; 2004.
- Madduri, K.; Snodderley, E. Expression of phosphinothricin N-acetyltransferase in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*: influence of mRNA secondary structure, host, and other physiological conditions. *Protein Expr. Purif.* 55:352-360; 2007.
- Manickavasagam, M.; Ganapathi, A.; Anbazhagan, V.; Sudhakar, B.; Selvaraj, N.; Vasudevan, A.; Kasthuriengan, S. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. *Plant Cell Rep.* 23:134-143; 2004.
- Masoud, S.; Zhu, Q.; Lamb, C.; Dixon, R. Constitutive expression of an inducible  $\beta$ -1,3-glucanase in alfalfa reduces disease severity caused by the *Oomycete* pathogen *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*, but does not reduce severity of chitin-containing fungi. *Transg. Res.* 5:313- 323; 1996.
- Matos, A.P. Pineapple fusariosis in Brazil: an overview. *Fruits.* 42:1-5; 1987.

- Matthysse, A.G. Characterization of non-attaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 169:313-323; 1987.
- Mauch, F.; Staehelin, L. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and  $\beta$ -1,3 glucanase in bean leaves. Plant Cell. 1:447-457; 1989.
- McCabe, D.E.; Swain, W.F.; Martinell, B.J.; Christou, P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. BioTechnology. 6:923-926; 1988.
- McCabe, M.; Schepers, F.; Van der Arend, A.; U., M.; Laat, A.; Power, J.; Davey, M. Increased stable inheritance of herbicide resistance in transgenic lettuce carrying a petE promoter-*bar* gene compared with a CaMV 35S-*bar* gene. Theor. Appl. Genet. 99:587- 592; 1999.
- McCafferty, H.; Moore, P.; Zhu, Y. Improved carica papaya tolerance to carmine spider mite by the expression of *Manduca sexta* chitinase transgene. Transg. Res. 15:337-347; 2006.
- McCord, J.; Fridovich, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein. J. Inorg. Biochem. 244:6049-6055; 1969.
- Meihls, L.N.; Higdon, M.L.; Siegfried, B.D.; Miller, N.J.; Sappington, T.W.; Ellersieck, M.R.; Spencer, T.A.; Hibbard, B.E. Increased survival of western corn rootworm on transgenic corn within three generations of on-plant greenhouse selection. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 49:19177-19182; 2008.
- Merritt, C.; Raina, S.; Fedoroff, N.; Curtis, W. Direct *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Hyoscyamus muticus* hairy roots using green fluorescent protein. Biotech. Prog. 15:278-282; 1999.
- Metz, P.L.J.; Stiekema, W.J.; Nap, J.P. A transgene-centered approach to the biosafety of transgenic phosphinothricin-tolerant plants. Mol. Breed. . 4:335-341; 1998.
- MINAGRI. Instructivo Técnico para el Cultivo de la Piña. Ciudad de la Habana: CIDA; 1989.
- Moeller, L.; Wang, K. Engineering with precision: tools for the new generation of transgenic crops. BioScience. 58:391-401; 2008.
- Mohammadi, M.; Kazemi, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. Plant Sci. 162:491-498; 2002.
- Mohr, K.; Tebbe, C. Field study results on the probability and risk of a horizontal gene transfer from transgenic herbicide-resistant oilseed rape pollen to gut bacteria of bees. Appl. Microbiol. Biotech. 75:573-582; 2007.
- Moller, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. Plant Mol. Biol. . 52:561-591; 2001.

- Momma, K.; Hashimoto, W.; Ozawa, S.; Kawai, S.; Katsube, T.; Takaiwa, F.; Kito, M.; Utsumi, S.; Murata, K. Quality and safety evaluation of genetically engineered rice with soybean glycinin: analyses of the grain composition and digestibility of glycinin in transgenic rice. *Biosci. Biotech. Biochem.* 63:314-318; 1999.
- Moran, R.; García, R.; Armas, R.; Zaldúa, Z.; López, A.; Mena, J.; Somontes, D.; García, M.; Gómez, M.; Rodríguez, J.; Pimentel, E. Transgenic sweet potato plants carrying the deltaendotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis. *Plant Sci.* 2:179-185; 1998.
- Mulwa, M.; Richard, S.; Mwanza, M. Review: biotechnology approaches to developing herbicide tolerance/selectivity in crops. *African J. Biotech.* 5:396-404; 2006.
- Mullins, K.; Llewellyn, D.; Hartney, V.; Strauss, S.; Dennis, E. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Rep.* 16:787-791; 1997.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497; 1962.
- Nagendra-Pradra, D.; Sudhakar, N.; Murugesan, K.; Mohan, N. Application of ozone on induction of resistance in *Vigna unguiculata* cv. Co 6, against *Fusarium* wilt. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 3:1-10; 2007.
- Nawar, H.; Kuti, J. Weyerone acid phytoalexin synthesis and peroxidase activity as markers for resistance of broad beans to chocolate spot disease tolerance in kiwi plants. *Plant Cell Rep.* 18:527-532; 2003.
- Nehaus, G.; Spangerberg, G.; Scheid, O.M.; Schweiger, H.G. Transformation of plants by microinjection. *Theor. Appl. Genet.* 75:30-36; 1987.
- Nester, E.W.; Gordon, M., P.; Kerr, A. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-ADN transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. In: Nester, E., Gordon, M. P., Kerr, A., eds. *Agrobacterium tumefaciens: From Plant Pathology to Biotechnology*. FALTA: APS Press; 221-236; 1984.
- Nishizawa, Y.; Nishio, Z.; Nakazono, K.; Soma, M.; Nakajima, E.; Ugaki, M.; Hibi, T. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theor. Appl. Genet.* 99:383-390; 1999.
- Nordlee, J.A.; Taylor, S.L.; Townsend, J.A.; Thomas, L.A.; Bush, R.K. Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *New Engl. J. Med.* 334:688-692; 1996.
- Oard, J.H.; Paige, D.F.; Simmonds, J.A.; Gradziel, T.M. Transient gene expression in maize, rice and wheat cells using an airgun apparatus. *Plant Physiol.* 92:334-339; 1990.
- OECD. Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology. [www.oecd.org/dsti/sti/s\\_t/biotech/prod/modern.htm](http://www.oecd.org/dsti/sti/s_t/biotech/prod/modern.htm); Verificado: 20/junio/2008. 1993.

- Ogaki, M.; Furuichi, Y.; Kuroda, K.; Chin, D.; Ogawa, Y.; Mii, M. Importance of co-cultivation medium pH for successful *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lilium* × *Formolongi*. *Plant Cell Rep.* 26:699-705; 2008.
- Ohba, T.; Machida, C.; Y., M. DNA rearrangements associated with the integration of T-DNA in tobacco: an example for multiple duplications of DNA around the integration target. *Plant J.* 7:157-164; 1995.
- Ohkama- Ohtsu, N.; Kezuka, A.; Onouchi, H.; Fujiwara, T.; Naito, S. Promoter region of the  $\beta$  subunit gene of  $\beta$ -conglycinin responds to methionine and glutathione in transient assays using *Arabidopsis* protoplasts. *Soil Sci. Plant Nut.* 54:128-132; 2008.
- Ohta, S.; Mita, S.; Hattori, T.; Nakamura, K. Construction and expression in tobacco of a *b-glucuronidase* (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.* 31:805-813; 1990.
- Okada, Y.; Nishiguchi, M.; Saito, A.; Kimura, T.; Mori, M.; Hanada, K.; Sakai, J.; Matsuda, Y.; Murata, T. Inheritance and stability of the virus-resistant gene in the progeny of transgenic sweet potato. *Plant Breed.* 121:249-253; 2002.
- Okamoto, S.; Tsuruda, K.; Yamaguchi, N.; Matsuo, T.; Nakamura, Y. Effects of reducing compounds on *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet potato. *Acta Hort.* 682:411- 418; 2005.
- Padgett, S.R.; della-Cioppa, G.; Shah, D.M.; Fraley, R.T.; Kishore, G.M. Selective herbicide tolerance through protein engineering. In: Schell, J., Vasil, I. K., eds. *Molecular Biology of Plant Nuclear Genes*, Vol. 6. Gainesville: Academic Press, Inc; 425-439; 1989.
- Padilla, I.; Golis, A.; Gentile, A.; Damiano, C.; Scorza, R. Evaluation of transformation in peach (*Prunus persica*) explants using green fluorescent protein (GFP) and beta-glucuronidase (GUS) reporter genes. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 84:309-314; 2006.
- Park, S.-U.; Facchini, P.J. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 19:1006-1012; 2000.
- Parra, G.; Ristaino, J. Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora blight* of bell pepper. *Plant Dis.* 85:1069-75; 2001.
- Pascual, M.; Jing, Z.; Kirby, E.; Cánovas, F.; Gallardo, F. Response of transgenic poplar overexpressing cytosolic glutamine synthetase to phosphinothricin. *Phytochemistry.* 69:382-389; 2008.

- Pascual, M.R.; Pereda, C.M.; Pérez, R. Inverse correlation between estrogens receptor and peroxidase activity in human mammary tumor. *Neoplasma*. 30:611; 1983.
- Pastori, G.; Mullineaux, P.; Foyer, C. Post-transcriptional regulation prevents accumulation of glutathione reductase protein and activity in the bundle sheath cells of maize. *Plant Physiol*. 122:667-675; 2000.
- Peña, H.; Díaz, J.A.; Martínez, T. *Fruticultura Tropical*. Bogotá: Instituto Colombiano para el Fomento de la Educación Superior (ICFES); 1996.
- Peña, L.; Cervera, M.; Juárez, J.; Navarro, A.; Pina, J.; Navarro, L. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing): factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep*. 17:731- 737; 1997.
- Peña, L.; Cervera, M.; Juárez, J.; Ortega, C.; Pina, J.A.; Durán-Vila, N.; Navarro, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. *Plant Sci*. 104:183-191; 1995.
- Peña, L.; Martín- Trillo, M.; Juarez, J.; Piña, J.; Duran-Vila, N.; Navarro, L.; Martinez-Zapater, J. Constitutive expression of *Arabidopsis LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. *Nat. Biotech*. 19:263-267; 2001.
- Pereira, L.F.; Goodwin, P.H.; Erickson, L. Peroxidase activity during susceptible and resistant interactions between cassava (*Manihot esculenta*) and *Xanthomonas cassavae*. *J. Phytopathol*. 148:575-577; 2000.
- Pérez, G.; Yanes, E.; Isidró, M.; Lorenzo, J.C. Phenotypic and AFLP characterization of two new pineapple somaclones derived from *in vitro* culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 96:113-116; 2009.
- Porrás, R.J. Recent advances and re-assessments in chlorophyll extraction and assay procedures for terrestrial, aquatic and marine organisms including recalcitrant algae. In: Scheer, H., ed. *Chemistry of Chlorophyll*. Boca Raton: FALTA; 320; 1991.
- Potrykus, I. Gene transfer to plant: assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 42:205-225; 1990.
- Potrykus, I.; Shillito, R. Protoplast: isolation, culture and plant regeneration. *Meth. Enzymol*. 118:549-578; 1986.
- Prakash, J. The genetically modified crop debate in the context of agricultural evolution. *Plant Physiol*. 126:8- 15; 2001.
- Prakash, J.; Brown, S.K.; Norell, J.L.; Aldwinckle, H.S. Factors affecting the transformation of 'Marshall McIntosh' apple by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 55:31-38; 1999.

- Prece, J.; Sutter, G. Acclimatization in micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh, P., Zimmerman, R., eds. *Micropropagation Technology and Applications*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 71-73; 1991.
- Pu, L.; Derek, W.; Eugene, W.N. Phosphoenolpyruvate carboxykinase is an acid-induced, chromosomally encoded virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 187:6039-6045; 2005.
- Pu, L.; Eugene, W.N. Indoleacetic acid, a product of transferred DNA, inhibits *vir* gene expression and growth of *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Biol. Sci. Microbiol.* 103:4658-4662; 2006.
- Puchta, H. Towards the ideal GMP: homologous recombination and marker gene excision. *J. Plant Physiol.* 160:743-754; 2003.
- Punja, Z. Genetic engineering of plant to enhance resistance to fungal pathogens: a review of progress and future prospects. *Chin. J. Plant Pathol.* 23:216-235; 2001.
- Punja, Z.; Zhang, Y. Plant chitinase and their roles in resistance to fungal disease. *J. Nematol.* 25:526-540; 1993.
- Py, C.; Lacoëuihe, J.; Teisson, C. The pineapple cultivation and uses. In: FALTA, ed. *Techniques Agricoles et Productions Tropicales*. Paris: Maisonneuve & Larose; 39-67; 1987.
- Qing-chang, L.; Sheng-Jun, J.; Hong, Z.; Li-Sha, W.; Yu-Ping, W. Regeneration of sweet potato transgenic plants with *oryzacystatin-I (OCI)* gene. *Chin. J. Agr. Biotech.* 2:99-102; 2004.
- Quemada, H.; Strehlow, L.; Decker-Walters, D.; Staub, J. Population size and incidence of virus infection in free-living populations of *Cucurbita pepo*. *Environ. Biosafety Res.* 7:185-196; 2008.
- Quilis, J.; Meynard, D.; Vila, L.; Aviles, F.; Guiderdoni, E.; San Segundo, B. A potato carboxypeptidase inhibitor gene provides pathogen resistance in transgenic rice. *Plant Biotech. J.* 5:537-553; 2007.
- Rao, S.S.; Lippincott, B.B.; Lippincott, J.A. *Agrobacterium* adherence involved pectin portion of the host wall and is sensitive to the degree of methylation. *Physiol. Plant.* 56:374-380; 1982.
- Rathinasabapathi, B.; McCue, K.F.; Gage, D.A.; Hanson, A.D. Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplast where they confer betaine aldehyde resistance. *Planta.* 193:155-162; 1994.
- Rentao, S.; Segal, G.; Messing, J. Expression of the sorghum 10-member *kafirin* gene cluster in maize endosperm. *Nuc. Acid Res.* 32:89-109; 2004.
- Rhodes, C.; Pierce, D.; Mettier, I.; Mascarenhas, D.; Detmer, J. Genetically transformed maize plants from protoplast. *Science.* 240:204-206; 1988.

- Riemens, M.; Dueck, T.; Kempenaar, C. Predicting sublethal effects of herbicides on terrestrial non-crop plant species in the field from greenhouse data. *Environ. Pollut.* 155:141-149; 2008.
- Riveros, A.; Rosales, E.; Pocasangre, L. Manejo alternativo de *Mycosphaerella fijiensis* a través de la inducción de resistencia y uso de bioproductos. Publicación Especial XVI Reunión Internacional ACORBAT.47 - 52; 2004.
- Rodríguez, R.; Cid, M.; Pina, D.; Gonzalez-Olmedo, J.; Desjardins, Y. Growth and photosynthetic activity during acclimatization of sugarcane plantlets cultivated in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* 39:657-662; 2003.
- Rodríguez, Y.; Daquinta, M.; Cisnero, A.; Mosqueda, M.; Lorenzo, J.C.; Escalona, M. Histología de la embriogénesis somática en piña (*Ananas comosus* (L.) Merr). *Biotam.* 7:45-47; 1996.
- Rodríguez, Y.; Mosqueda, M.; Companioni, B.; Arzola, M.; Borrás, O.; Pérez, M.; Lorenzo, J.; Santos, R. Bioassay for *in vitro* differentiation of pineapple cultivar resistance levels to heart rot disease. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* 38:613-616; 2002.
- Rohrbach, K.; Christopher, D.; Hu, J.; Paull, R.; Sipes, B.; Nagai, C.; Moore, P.; McPherson, M.; Atkinson, H.; Levesley, A.; Oda, C.; Fleisch, H.; McLean, M. Management of a multiple goal pineapple genetic engineering program. *Acta Hort.* 529:111-113; 2000.
- Rohrbach, K.; Johnson, M. Pest, diseases and weeds. In: Bartholomew, D., Paull, R. E., Rohrbach, K. G., eds. *The Pineapple Botany, Production and Uses*, Vol. 301. Wallingford: CABI Publishing; 503-509; 2003.
- Rosignol, M.; Peltier, J.-B.; Mock, H.-P.; Matros, A.; Maldonado, A.; Jorrín, J. Plant proteoma analysis: A 2004-2006 update. *Proteomics.* 6:5529- 5548; 2006.
- Ruiz, J. Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis and Assembly. Boca Raton: CRC Press; 77-79; 1992.
- Sakamoto, A.; Murata, N. The use of bacterial choline oxidase, a glycinebetaine-synthesizing enzyme, to create stress-resistant transgenic plants. *Plant Physiol.* 125:180-188; 2001.
- Samali, A.; Orrenius, S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperon.* 3:228-236; 2001.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 16.63-18.35; 1989.
- Sanewski, G. A method for screening pineapple genotypes for resistance to *Phytophthora cinnamomi*. *Pineapp. News.* 11:16-17; 2004.
- Sanford, J.C. Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant.* 79:206-209; 1990.

- Satu, J.; Lehesranta, H.; Davies, V.; Louise, V.; Shepherd, T.; Naoise, N.; McNicol, J.; Seppo, A.; Kaisa, M.; Koistinen, S.; Suomalainen, H.; Kokko, I.; Kärenlampi, S. Comparison of tuber proteomes of potato varieties, landraces, and genetically modified lines. *Plant Physiol. Rev.* 10:105-108; 2005.
- Saxena, D.; Stotzky, A.M. *Bt* corn has a higher lignin content than non-*Bt* corn. *Am. J. Bot.* 88:1704-1706; 2001.
- Scarpari, L.M.; Meinhardt, L.W.; Mazzafera, P.; Poniella, A.W.V.; Schiavinata, M.A.; Cascardo, J.C.M.; Pereira, G.A.G. Biochemical changes during the development of withes' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. *J. Exp. Bot.* 56:865-877; 2005.
- Schubert, D. Sensible regulations for GE food crops. *Nat. Biotech.* 23:785-787; 2005.
- Seidel, D. Lista Preliminar de Hongos Fitopatógenos de Cuba. Ciudad de La Habana: Instituto Cubano del Libro; 90-98; 1976.
- Seyama, F.; Tomoko, A.; Kimura, D.; Satoshi, H.; Sasamoto, C.; Hamako, A.; Hisashi, S.; Kondo, F.; Tetsuo, J. Spinning of a gigantic bundle of hollow fibrils by a spirally moving higher plant protoplast. *Appl. Microbiol. Biotech.* 73:1348-1354; 2007.
- Shewmaker, C.K.; Sheehy, J.A.; Daley, M.; Colburn, S.; Dang, Y.K. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J.* 20:401-412; 1999.
- Shillito, R.; Saul, M.; Paszkowski, J.; Muller, M.; Potrykus, I. High efficiency direct transfer to plants. *Biotechnology.* 3:1099-1103; 1986.
- Shimamoto, K.; Terada, R.; Izawa, Y.; Fujimoto, H. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplast. *Nature.* 338:274-276; 1989.
- Shimizu, J.; Okumura, Y.; Yoda, K.; M., Y. A glutamine synthetase mutant of *Saccharomyces cerevisiae* shows defect in cell wall. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43:157-162; 1997.
- Shrawat, A.; Lorz, H. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. *Plant Biotech. J.* 4:575-603; 2006.
- Skipsey, M.; Cummins, I.; Christopher, J.A.; Jepson, I.; Edwards, R. Manipulation of plant tolerance to herbicide through coordinated metabolic engineering of a detoxifying glutathione transferase and thiol cosubstrate. *Plant Biotech. J.* 3:409-420; 2005.
- Smith, M.; Ko, H.L.; Sanewski, G.; Botella, J. *Bromeliaceae*. In: Litz, R. E., ed. *Biotechnology of Perennial Fruit and Nut Crops*. Wallingford: CABI; 54-73; 2004.
- Snoeren, T.; De Jong, P.; Dicke, M. Ecogenomic approach to the role of herbivore-induced plant volatiles in community ecology. *J. Ecol.* 95:17-26; 2007.

- Sripaoraya, S.; Keawsompong, S.; Insupa, P.; Power, J.B.; Davey, M.R.; Srinives, P. Genetically manipulated pineapple: transgene stability, gene expression and herbicide tolerance under field conditions. *Plant Breed.* 125:411-413; 2006.
- Sripaoraya, S.; Marchant, R.; Archant, J.; Power, B.; Davey, M.R. Herbicide-tolerant transgenic pineapple (*Ananas comosus*) produced by microprojectile bombardment. *Ann. Bot.* 88:597-603; 2001.
- Sripaoraya, S.; Marchant, R.; Ingram, H.; Davey, M.; Lowe, K.; Power, J. Transformation of pineapple (*Ananas comosus*) via particle bombardment. *J. Exp. Bot.* 51:29-55; 2000.
- Stanton, B.G. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:16-37; 2003.
- Taira, T.; Toma, N.; Ishihara, M. Purification, characterization, and antifungal activity of chininases from pineapple (*Ananas comosus*) leaf. *Biochemistry.* 69:189-196; 2005.
- Takano, M.; Egawa, H.; Ikeda, E.; Wakasa, K. The structures of integration sites in transgenic rice. *Plant J.* 11:353-361; 1997.
- Talbot, N. Functional genomics of plant-pathogen interaction. *New Phytol.* 159:1-3; 2003.
- Tang, H.; Ren, Z.; Krezal, G. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut somatic embryos and for the effects on the proliferation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 19:881-887; 2000.
- Tession, C.; Alvard, D. A new concept of plant *in vitro* cultivation in liquid medium: temporary immersion. In: Terzi, M., Cella, R., Falavigna, A., eds. *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. FALTA: Kluwer Academic Publishers; 105-109; 1995.
- Thompson, C.J.; Movva, N.R.; Tizard, R.; Cramer, R.; Davies, J.E.; Lauwereys, M.; Botterman, J. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces higroscopicus*. *EMBO J.* 6:2523-2527; 1987.
- Torisky, R.S.; Kovacs, L.; Avdiushko, S.; Newman, J.D.; Hunt, A.G.; Collins, G.B. Development of a binary vector system for plant transformation based on supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Chry5. *Plant Cell Rep.* 17:102-108; 1997.
- Torres, A.C.; Nagata, R.T.; Ferl, R.J.; Bewick, T.A.; Cantliffe, D.J. *In vitro* assay selection of glyphosate resistance in lettuce. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 1:86-89; 1999.
- Tung, W.; Swee, A.; Smeeton, F.; Meeton, H.; RACHEL, M.; White, B.; Charlotte, A.; Black, S.; Colin, E.; Taylor, I.; Hilton, O.; Howard, W.; Andrew, J. Over-expression of *LeNCED1* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) with the *rbcS3C* promoter allows recovery of lines that accumulate very high levels of abscisic acid and exhibit severe phenotypes. *Plant Cell Environ.* 31:968-981; 2008.

- Tyler, B. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:137-67; 2002.
- Usami, S.; Okamoto, S.; Takebe, I.; Machida, Y. Factor inducing *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression is present in monocotyledonous plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 85:3748-3752; 1988.
- Vunsh, R.; Jihong, L.; Hanania, U.; Edelman, M.; Flaishman, M.; Perl, A.; Wisniewski, J.; Freyssinet, G. High expression of transgene protein in *Spirodela*. *Plant Cell Rep.* 26:1511-1519; 2007.
- Wakasa, K.; Hasegawa, H.; Nemoto, H.; Matsuda, F.; Miyazawa, H.; Tozawa, Y.; Morino, K.; Komatsu, A.; Yamada, T.; Terakawa, T.; Miyagawa, H. High-level tryptophan accumulation in seeds of transgenic rice and its limited effects on agronomic traits and seed metabolite profile. *J. Exp. Bot.* 12:3069-3078; 2006.
- Wang, L.; Uruu, G.; Xiong, L.; He, X.; Nagai, C.; Cheah, T.; Hu, S.; Nan, G.; Sipes, S.; Atkinson, J.; Moore, H.; Rohrbach, G.; Paull, R. Production of transgenic pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) plants via adventitious bud regeneration. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* 45:113-121; 2009.
- Wang, W. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis.* 27:2782-2786; 2006.
- Wang, Z.Y.M.; Scott, J.; Bell, A.; Hopkins, D.L. Field performance of transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants and their progenies. *Theor. Appl. Genet.* 107:406-412; 2003.
- Wendler, C.; Barniske, M.; Wild, A. Effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis and photorespiration of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Photosynth. Res.* 24:55-61; 1990.
- Wilson, A.K.; Latham, J.R. Transformation-induced mutations in transgenic plants: analysis and biosafety implications. *Biotech. Genet. Eng. Rev.* 23:209-234; 2006.
- Wrobel-Kwiatkowska, M.; Lorenc-Kukulaa, K.; Starzyckib, M.; Oszmian'skic, J.; Kepczyn'skad, E.; Szopaa, J. Expression of  $\beta$ -1,3-*glucanase* in flax causes increased resistance to fungi. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65:245-256; 2004.
- Xiang Yang, D.; Zhi Ming, W.; Hai Long, A. Transgenic peanut plants obtained by particle bombardment via somatic embryogenesis regeneration system. *Cell Res.* 11:156-160; 2001.
- Yaginuma, S.; Shiraishi, T.; Ohya, H.; Igarashi, K. Polyphenol increases in cucumber seedlings exposed to strong visible light and limited water. *Biosci. Biotech. Biochem.* 66:65-72; 2002.

- Yanes, P.E.; González, O.J.; Sánchez, R.R. A technology of acclimatization of pineapple vitroplants. *Pineapp. News.* 7:24; 2000.
- Ye, X.Z.; Wang, Y.; Wu, X.; Potrykus, I.; Spangenberg, G. Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. *Plant Cell Rep.* 21:379-384; 1997.
- Yoshikawa, M.; Tsuda, M.; Takeuchi, Y. Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor,  $\beta$ -1,3-endoglucanase, from soybean. *Naturwissenschaften.* 80:417- 420; 1993.
- Yuji, S.; Maki, O.; Hanako, H.; Keiko, O.; Ryuichi, Y.; Soichi, K.; Toshihiko, H.; Tomoyuki, Y.; Tadahiko, M.; Amane, M. Increased rubisco content in transgenic rice transformed with the 'Sense' *rbcS* gene. *Plant Cell Physiol.* 48:626-637; 2007.
- Zambrano, J.; Castellanos, E. Características físico-químicas en 3 variedades de pina (*Ananas comosus*) durante el período de postcosecha. *Ver. Fac. Agron.* 14:849-857; 1997.
- Zambryski, P. Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 43:465-490; 1992.
- Zárate, R.; El Jaber-Vazdekis, N.; Cequier-Sánchez, E.; Gutierrez-Nicolás, F.; Ravelo, A. Biotechnology for the production of plant natural products. In: A., R., ed. *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 34. The Netherlands: Elsevier Science Publishers; 309-392; 2008.
- Zárate, R.; Verpoorte, R. Strategies for the genetic modification of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Phytochem. Rev.* 6:475-491; 2007.
- Zeng-Yu, W.; Yaxin, G.; Megann, S.; Spangenberg, G. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) (*Poaceae*) plants. *J. Exp. Bot.* 91:523-530; 2004.
- Zhao, Z.Y. Sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Meth. Mol. Biol.* 343:233-44; 2006.
- Zhou, Y.; Dahler, J.; Underhill, S.; Will, R. Enzymes associated with blackheart development in pineapple fruit. *Food Chem.* 80:565-572; 2003.
- Zobel, A.; Pamela, A.; Clarke, N.; Jeffrey, M. Production of phenolics in response to UV irradiation and heavy metals in seedlings of *Acer* species. In: FALTA, ed. *Recent Advances in Allelopathy: A Science for the Future*. FALTA: Servicios de Publicaciones de la Universidad de Cádiz; 231-242; 1999.
- Zupan, J.R.; Zambryski, P. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to plants cell. *Plant Physiol.* 107:1041-1047; 1995.