

Transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* para inducir tolerancia a la podredumbre blanca del aguacate.

Palomo-Ríos, E¹., Barceló, M²., Barceló-Muñoz, A²., Pliego, C¹., Blanco-Portales, R³., Caballero-Repullo, J.L³., Ruano-Rosa, D⁴., López-Herrera, C⁴., Mercado-Carmona, J.A¹., Pliego-Alfaro, F¹.

¹Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” Universidad de Málaga-CSIC (IHSM-UMA-CSIC), Dept. Biología Vegetal, Campus Teatinos, 29071 Málaga, España

²IFAPA Churriana. Málaga. Cortijo de la Cruz s/n 29140 Churriana, Málaga. España

³Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, 14071, Córdoba, España

⁴Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. c/ Alameda del Obispo s/n, 14084, Córdoba, España.

Abstract

One of the most important limiting factors for avocado production in Spain is the disease caused by the fungus *Rosellinia necatrix*. Genetic manipulation could be useful for the introduction of fungal resistance traits into this crop. An efficient *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for avocado using AGL1 *Agrobacterium* strain and somatic embryos as the target material has been established by our group, although embryo conversion rate into plants needs to be improved. For that reason, we are using the strawberry, another *Rosellinia necatrix*'s host, as model species to test the effect of several transgenes (two of fungal origin, chit 42 chitinase and β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*, and one of plant origin, AtNPR1), on inducing tolerance to this fungus.

Strawberry transformation with the β -1,3-glucanase gene has allowed the selection of two lines, β 6 and β 10, with enhanced tolerance to *R. necatrix* while no positive results were obtained following transformation with the chit-42 gene. In relation to the AtNPR1 gene more than 30 independent transgenic lines have been obtained whose tolerance to *R. necatrix* is currently under evaluation.

Concerning avocado transformation, more than 10 independent transgenic lines (derived from an embryogenic line of an immature Duke7 zygotic embryo) have been obtained with AtNPR1 gene. Plants have been recovered from one line and efforts are underway to recover plants from other lines following micrografting of the transgenic sprouted shoots onto in vitro germinated seedlings.

FINANCIAL SUPPORT: GRANT AGL2008-05453-C02-01/AGR.

Resumen

Uno de los factores limitantes de la producción de aguacate en España es la enfermedad causada por el hongo *R. necatrix*. La manipulación genética podría ser de utilidad para introducir caracteres de resistencia en este cultivo. Se ha establecido un sistema eficiente de transformación en aguacate usando la cepa de *Agrobacterium* AGL1 y células embriogénicas como diana, sin embargo, la conversión en plantas de los embriones transgénicos necesita ser mejorada. Por esta razón, estamos utilizando la fresa, otro huésped de *R. necatrix*, como especie modelo para testar el efecto de varios transgenes (2 de origen fúngico, la quitinasa chit-42 y la β -1,3-glucanasa de *Trichoderma harzianum*, y uno derivado de plantas, AtNPR1), en la inducción de tolerancia a este patógeno tras la transformación de esta especie.

La transformación de fresa con el gen de β -1,3-glucanasa ha permitido la selección de dos líneas, β 6 y β 10, con mayor tolerancia a *R. necatrix*, mientras que no se han obtenido resultados positivos con el gen chit-42. En relación con el gen AtNPR1, se han obtenido más de 30 líneas transgénicas independientes, cuya tolerancia frente a *R. necatrix* se está evaluando en la actualidad.

En relación con la transformación de aguacate, más de 10 líneas transgénicas independientes (derivadas de una línea embriogénica obtenida a partir de un embrión zigótico inmaduro del cv. Duke 7) se han obtenido con el gen AtNPR1. Se han recuperado plantas de una línea y actualmente se está intentando recuperar plantas de otras líneas mediante microinjerto de los embriones transgénicos germinados.

Palabras claves: aguacate, *Rosellinia necatrix*, transformación genética, chit-42, β -1,3-glucanasa, NPR1.

Introducción:

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un árbol frutal cultivado por el alto valor nutricional de sus frutos. La producción mundial de aguacate alcanzó un valor de 3.5 millones de toneladas en 2008, siendo los principales productores a nivel mundial México, Chile e Indonesia (FAOSTAT 2011). Actualmente el cultivo de aguacate está presente en todos los continentes. En España las plantaciones se encuentran en el sur de Andalucía y en las Islas Canarias. El factor limitante más importante en la producción de este fruto a nivel mundial es la podredumbre de raíz causada por el hongo *Phytophthora cinnamomi* Rands. (Litz *et al.*, 2007). La podredumbre blanca, causada por el hongo *Rosellinia necatrix*, es otra importante enfermedad presente en el área mediterránea, que afecta principalmente a las plantaciones de Israel y España (Pliego *et al.*, 2009). Aunque se han encontrado algunos patrones tolerantes al hongo *Phytophthora cinnamomi* Rands., como 'Duke 7', 'Merensky I', 'Merensky II' y 'Thomas', actualmente no se conoce ninguno para *R. necatrix* (Barceló-Muñoz *et al.*, 2007). Este hongo ataca alrededor de 170 especies de 63 géneros diferentes, entre los que se encuentran el aguacate y la fresa (Hoopen y Krauss, 2006). Las plantas infectadas por *R. necatrix* normalmente muestran síntomas en el sistema radicular y/o en la parte aérea, como consecuencia del daño en las raíces, con pérdida de vigor, marchitez, caída de las hojas y, eventualmente, la muerte de la planta (Pliego, 2008).

Las herramientas de transformación genética pueden ser de gran ayuda para la introducción de caracteres de resistencia frente a este tipo de infecciones fúngicas; sin embargo, en el caso del aguacate, la naturaleza recalcitrante de esta especie es un problema para el desarrollo de métodos de regeneración *in vitro*. Existen algunos protocolos de regeneración a partir de cultivos embriogénicos derivados de embriones zigóticos inmaduros (Sánchez-Romero *et al.*, 2005; Litz *et al.*, 2007), aunque la conversión de embriones somáticos es un factor limitante y ocurre con muy baja frecuencia. Se han llevado a cabo varias aproximaciones para la transformación vía *Agrobacterium tumefaciens*. Cruz-Hernández *et al.* (1998) desarrollaron un protocolo basado en la selección permanente en medio líquido para la introducción de los genes *gus* y *nptII*, pero no consiguieron obtener ninguna planta transgénica. Raharjo *et al.* (2008) usaron una modificación del mismo protocolo para la introducción del gen defensiva y aunque obtuvieron plantas, aparentemente todas procedían del mismo evento de transformación. En nuestro laboratorio, desarrollamos un protocolo de transformación basado en el uso de la cepa de *A. tumefaciens* hiper-virulenta AGL-1 y con selección en medio sólido (Palomo-Ríos *et al.*, 2007), lo que permitió la identificación de diferentes eventos de transformación a la vez que se evitaba la degeneración de los cultivos embriogénicos, que puede darse tras un cultivo prolongado en medio líquido (Etienne y Bertrand 2003; Von Arnold, 2008). Sin embargo, las tasas de conversión de embriones continúan siendo muy bajas.

Debido a la baja tasa de recuperación de plantas y al prolongado tiempo del proceso, se decidió la utilización de la fresa, que también es una especie huésped de *R. necatrix*, como planta modelo para la introducción de genes de resistencia a patógenos fúngicos: chit-42, β -1,3-glucanasa, procedentes de *Trichoderma harzianum*, y NPR1, de *Arabidopsis thaliana*, y su posterior evaluación frente a la infección del hongo. En el caso de los genes de origen fúngico que codifican la síntesis de enzimas hidrolíticas, su efecto se debe a que la pared celular de muchos hongos está formada mayoritariamente por quitina y glucanos, por lo que la sobre-expresión de estas enzimas por las células de la planta podría reducir el crecimiento del hongo (Mauch y Staehelin, 1989), como se ha visto que ocurre en plantas transformadas de tabaco, patata o manzano (Borkowska *et al.*, 1998; Bolar *et al.*, 1999; Dana *et al.*, 2006). En el caso del gen NPR1, se ha identificado como un factor clave en la regulación de la SAR mediada por ácido salicílico (Cao *et al.*, 1997) y se ha encontrado que plantas de tomate sobre-expresando este gen mostraron una mayor expresión de genes PR y mayor resistencia a un amplio rango de patógenos (Lin *et al.*, 2004).

En este trabajo se ha evaluado el comportamiento frente a *R. necatrix* de líneas de fresa transformadas con los genes chit-42 y β -1,3-glucanasa. Actualmente, se está evaluando el

comportamiento de las líneas NPR1. En aguacate se presentan los avances obtenidos en el método de transformación y en la conversión de plantas, fundamentalmente de las líneas embriogénicas transformadas con el gen *AtNPR1*. Paralelamente, se llevó a cabo el estudio del cultivo de callo embriogénico de aguacate en presencia de toxinas producidas por *R. necatrix* en el medio de cultivo, para poder realizar con posterioridad un estudio de resistencia a nivel celular de las líneas de callo embriogénico transformadas con los diferentes genes.

Materiales y Métodos:

Aguacate

Transformación

Para este trabajo se utilizó la línea de callo embriogénico D2.3, obtenida a partir de un embrión zigótico inmaduro del cv. Duke 7. El callo embriogénico fue cultivado sobre medio MS suplementado con 0.41 μM picloran (medio MSP) y solidificado con 6 g l⁻¹ de agar (Sigma A-1296) en oscuridad a 25 \pm 1°C (Pliego-Alfaro y Murashige, 1988). Los cultivos fueron mantenidos en medio MSP y subcultivados mensualmente.

El vector binario pBINubiGUSInt (Humara et al., 1999) fue usado para el desarrollo del protocolo de transformación en aguacate. Este plásmido contiene los genes marcadores *nptII* y β -glucuronidasa (*uidA*) bajo el control del promotor de la nopalina sintasa y el promotor del gen *ubi1* de poliubiquitina de maíz respectivamente. El vector binario utilizado para la incorporación del gen *AtNPR1* fue pK7WG2NPR1, conteniendo también el gen marcador *nptII*. La cepa de *A. tumefaciens* utilizada fue AGL1 (Lazo et al., 1991).

Para la transformación en aguacate se utilizó una modificación del protocolo descrito por Palomo-Ríos et al. (2007). Así, se utilizaron embriones somáticos en estadio globular y se cocultivaron en presencia de un cultivo diluido de *Agrobacterium* durante 20 minutos. Posteriormente, se pasaron a medio de selección MSP con 250 mg l⁻¹ de timentina y 50 mg l⁻¹ kanamicina. Tras 3 meses en el medio de selección, el material que mostraba un crecimiento normal se pasaba a medio sin antibióticos. La maduración de embriones se llevó a cabo en un medio de 10 g l⁻¹ agar (Sánchez-Romero et al., 2005) mientras que la germinación se llevó a cabo en medio MS suplementado con 4.44 μM BA y 2.89 μM GA₃ (Witjaksono y Litz, 1999). Los brotes obtenidos se multiplicaron y enraizaron siguiendo el protocolo de Perán-Quesada et al. (2004) y en aquellos casos en los que no mostraban suficiente crecimiento se microinjetaron en semillas Topa-Topa germinadas *in vitro* siguiendo el protocolo de Pliego-Alfaro y Murashige (1987).

Análisis molecular del material transgénico

Para confirmar la naturaleza transgénica de las líneas seleccionadas se llevó a cabo una PCR de cada una de ellas, a partir del callo embriogénico de aguacate y de hojas en el caso de las plántulas de aguacate y de fresa recuperadas. En ambos casos, la extracción de ADN se realizó usando el kit DNeasy[®] Plant Mini Kit (Quiagen). Alícuotas de estas extracciones se utilizaron para amplificar un fragmento de 220 pb del gen *nptII* (Youssef et al., 2009).

Efecto de las toxinas producidas por *R. necatrix* en el crecimiento de cultivos embriogénicos

Se realizó un estudio del efecto de la adición de un filtrado del cultivo del hongo sobre el crecimiento del callo embriogénico de aguacate. Un inóculo del hongo se creció durante 10 días en 200 ml de medio PD (Potato-Dextrose) en oscuridad a 25 \pm 1°C. Después, el cultivo fue esterilizado por filtración a través de un filtro de 0.2 μm , recogiendo en el filtrado las toxinas del hongo producidas durante el periodo de cultivo. Se cultivaron 0.2 g de callo embriogénico durante 1 semana a 120 rpm en frascos con 20 ml de medio líquido MSP suplementado con 0, 20, 40, 60 y 75 % (v/v) del cultivo del hongo filtrado; posteriormente, el callo embriogénico fue cultivado durante un mes en medio sólido MSP. Todo el cultivo del callo embriogénico se realizó en oscuridad a 25 \pm 1°C. Se recogieron los datos de incremento de peso fresco al finalizar el periodo de cultivo.

Fresa

Transformación

Las líneas transgénicas de fresa utilizadas estaban disponibles en nuestro laboratorio y se habían obtenido en el marco de un proyecto cuyo objetivo era la obtención de plantas tolerantes al patógeno *Colletotrichum acutatum* (Mercado et al., 2007). Las plantas se habían transformado utilizando discos de hoja de acuerdo con el protocolo de Barceló et al. (1998). La cepa de *A. tumefaciens* utilizada fue la LBA4404 con un plásmido que contenía los genes chit-42 o β -1,3-glucanasa. En ambos casos, el promotor utilizado fue el CaMV35S y el gen neomicina fosfotransferasa II (*nptII*), que proporciona resistencia a kanamicina, fue usado como marcador de selección. La regeneración de brotes transgénicos se obtuvo en un medio con los macroelementos N₃₀K (Margara, 1984), microelementos MS y vitaminas (Murashige y Skoog, 1962) y un suplemento hormonal de benciladenina (2 mg l⁻¹) y ácido indolbutírico (0.5 mg l⁻¹). Cuando se formaban los brotes transgénicos, éstos se transferían al mismo medio basal pero con un único suplemento de quinetina (0.5 mg l⁻¹). Las condiciones de incubación eran 25±1 °C de temperatura, y fotoperiodo de 16 h a 35 μ mol m⁻² s⁻¹.

Evaluación de la tolerancia a *R. necatrix*

Plantas transgénicas enraizadas *in vitro* y que tenían un buen sistema radicular se transplantaron a maceta de 250 ml con una mezcla de turba y perlita 3:1 (v:v) para aclimatar en condiciones de invernadero. Las plantas se introdujeron en un túnel con 100% de humedad relativa y se endurecieron disminuyendo la humedad de forma progresiva. Posteriormente, las plantas pasaron a macetas de plástico de 14 cm de diámetro conteniendo turba esterilizada. Los tests se llevaron a cabo en plantas de 14-16 semanas, desde la transferencia a condiciones *ex vitro*. Se seleccionó una dosis de inóculo de 0.5 g de trigo colonizado por maceta, ya que ésta dosis provocaba la muerte de todos los controles en un periodo de 28-33 días. En base a la aparición de los síntomas, se elaboró una escala de 1 a 5. 1: Planta sana; 2: Aparición de manchas rojizas y enrojecimiento de peciolos; 3: Comienzo de amarilleo de hojas, peciolos rojos y decaimiento de la planta; 4: Marchitez total, comienzo de aparición de necrosis foliar; 5: Planta muerta. Se evaluaron 9 líneas independientes transformadas con el gen β -1,3-glucanasa y 6 líneas con el gen quitinasa chit-42. Se utilizaron 6-10 plantas por línea y el experimento se repitió 2 veces. Los tests de tolerancia se llevaron a cabo en una cámara de crecimiento a 22-24°C de temperatura con fotoperiodo de 12 horas y 120 μ mol m⁻² s⁻¹ de irradiancia.

Resultados y discusión:

Con la aplicación de nuestro protocolo de transformación en aguacate, pudimos establecer 21 líneas transgénicas con el plásmido pBINUbiGUSInt en la línea de callo embriogénico D2.3, con una eficiencia de transformación del 3.3%, mientras que con el pK7WG2NPR1 se obtuvieron 11 líneas transgénicas, con una eficiencia de transformación en el rango de 1.6-3.33 %.

El proceso de recuperación de plantas a partir de embriones transgénicos es largo y con baja frecuencia de éxito. Con el rescate de brotes a través del microinjerto, se consiguieron recuperar plantas de 5 líneas independientes de aguacate con pBINUbiGUSInt, aunque el método necesita aún mejoras que agilicen el proceso y que incrementen el número de brotes obtenidos. Ahora está en marcha la recuperación de plántulas de las líneas transgénicas portando el gen ANPR1, habiéndose aclimatado ya en el invernadero una de las líneas.

La naturaleza transgénica de estas plantas, así como de las líneas embriogénicas de las que proceden se ha confirmado mediante PCR, amplificando un fragmento del gen *nptII*.

Una selección *in vitro* de material de *Vitis vinifera* resistente a *Elsinoe ampelina* fue realizada cultivando masas proembriogénicas de vid en presencia de un cultivo filtrado del hongo al 40% (v/v) por Jayasankar et al. (2000). En base a esos resultados, desarrollamos un sistema de selección del material de aguacate tolerante a *Rosellinia necatrix* para poder realizar

posteriormente la búsqueda de las líneas transgénicas que presentaran una mejora en su tolerancia a la presencia del hongo. Para ello realizamos un estudio del crecimiento del callo embriogénico de aguacate tras un cultivo de una semana en presencia de diferentes concentraciones de un cultivo del hongo filtrado. Este estudio mostró que el crecimiento del callo embriogénico es dependiente de la concentración del cultivo del hongo, siendo este efecto proporcional a la concentración añadida. Así, se observó una reducción del crecimiento del callo del 83% en presencia del 60 % (v/v) del cultivo del hongo comparado con el control, por lo que este tratamiento parece ser adecuado para el análisis de resistencia de las líneas transgénicas a nivel celular en presencia de un cultivo conteniendo las toxinas del hongo.

Genes de quitinasa de diferentes especies se han usado para inducir tolerancia a patógenos fúngicos (Asao et al., 1997; Terakawa et al., 1997). En fresa la transformación con un gen de quitinasa de *Lycopersicon chilensis* incrementó la resistencia a *Verticillium dahliae* (Chalavi et al., 2003). En nuestro caso, prácticamente todas las líneas de fresa transformadas con el gen chit-42 tienen un comportamiento similar al control en los ensayos de tolerancia a *R. necatrix*, índice de severidad cercano a 5, lo que coincide con los resultados obtenidos por Mercado et al. (2007) al evaluar la tolerancia de estas plantas frente al patógeno *Colletotrichum acutatum*. En relación con las plantas transformadas con el gen β -1,3-glucanasa, las líneas β 6 (índice de severidad 3.5) y β 10 (índice de severidad 4) tuvieron un comportamiento ligeramente superior al control. Curiosamente, la línea β 6 también fue seleccionada por su buen comportamiento frente al patógeno *C. acutatum*. Probablemente estos efectos sean debidos al origen fúngico de la glucanasa, ya que en otras especies como patata, la transformación con una glucanasa de *Nicotiana plumbaginifolia* no incrementó la tolerancia a *Rhizoctonia solani* (Moravčíková et al., 2004). Esta falta de respuesta puede ser debida a que los patógenos segregan inhibidores contra las hidrolasas derivadas de plantas (Ham et al., 1997).

En relación con las plantas de fresa transformadas con el gen *A β NPR1*, se han obtenido más de 45 líneas transgénicas y en una primera fase se está evaluando la tolerancia a *R. necatrix* de 15 de estas líneas.

Agradecimientos: Este trabajo se ha realizado en el marco del proyecto AGL2008-05453-C02-01/AGR.

Bibliografía:

- Asao H, Nishizawa Y, Arai S, Sato T, Hirai M, Yoshida K, Shinmyo A, Hibi T, 1997. Enhanced resistance against a fungal pathogen *Sphaerotheca humuli* in transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene. *Plant Biotech* 14:145-149.
- Barceló M, El-Mansouri I, Mercado JA, Quesada MA, Pliego-Alfaro F, 1998. Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. *Plant Cell Tiss Org Cult* 54:29-36.
- Barceló-Muñoz, A., Zea-Bonilla, T., Jurado-Valle, I., Imbroda-Solano, I., Vidoy-Mercado, I., Pliego-Alfaro, F., López-Herrera, C.J. 2007. Programa de selección de portainjertos de aguacate tolerantes a la podredumbre blanca causada por *Rosellinia necatrix* en el sur de España (1995-2007). <http://www.avocadosource.com>
- Bolar JP, Norelli JL, Wong KW, Hayes CK, Harman GE, Aldwinckle HS, 1999. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology* 90:72-77.
- Borkowska M, Krzymowska M, Talarczyk A, Awan MF, Yakovleva L, Kleczkowski K, Wielgat B, 1998. Transgenic potato plants expressing soybean beta-1,3-endoglucanase gene exhibit an increased resistance to *Phytophthora infestans*. *Z Naturforsch* 53(11-12):1012-6.

- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong XN, 1997. The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88:57-63.
- Cruz-Hernández A, Witjaksono, Litz RE, Lim MG, 1998. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of somatic embryos. *Plant Cell Rep* 17:497-503
- Chalavi V, Tabaeizadeh Z, Thibodeau P, 2003. Enhanced resistance to *Verticillium dahliae* in transgenic strawberry plants expressing a *Lycopersicon chilense* chitinase gene. *J Amer Soc Hort Sci* 128:747-753.
- Dana MDLM, Pintor-Toro JA, Cubero B, 2006. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiology* 92(2):1055-1063.
- Etienne H, Bertrand B, 2003. Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. *Tree Physiol* 23:419-426.
- FAOSTAT, 2011. <http://faostat.fao.org/>
- Ham KS, Wu SC, Darvill AG, Albersheim P, 1997. Fungal pathogens secrete an inhibitor protein that distinguishes isoforms of plant pathogenesis-related endo- β -1,3 glucanases. *Plant J* 11:169-179.
- Hoopen GM, Krauss U, 2006. Biology and control of *Rosellinia bunodes*, *Rosellinia necatrix* and *Rosellinia pepo*: A review. *Crop Prot* 25:89-107
- Humara J, Marín M, Parra F, Ordás R, 1999. Improved efficiency of uidA gene transfer in stone pine *Pinus pinea* cotyledons using a modified binary vector. *Can J Forest Rep* 29:1627-1632
- Jayasankar S, Zhijian Li, Gray DJ, 2000. In-vitro selection of *Vitis vinifera* (Chardonnay) with *Elsinoe ampelina* culture filtrate is accompanied by fungal resistance and enhanced secretion of chitinase. *Planta* 211:200-208
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA, 1991. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology* 9:963-967
- Lin WC, Lu CF, Wu JW, Cheng ML, Lin YM, Tang NS, Black L, Green SK, Wang JF, Cheng CP, 2004. Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis* NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Res* 13:567-581
- Litz RE, Raharjo SHT, Gómez-Lim MA, 2007. Avocado. In: Pua EC, Davey MR (eds.) *Transgenic Crops V. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg pp. 167-187.
- Mauch F, Staehelin LA, 1989. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *The Plant Cell* 1:447-457
- Margara J, 1984. *Bases de la Multiplication Vegetative*. INRA.Versalles. Paris
- Mercado JA, Martín-Pizarro C, Pascual L, Quesada MA, Pliego-Alfaro F, de los Santos B, Romero F, Gálvez J, Rey M, de la Viña G, Llobell A, Yubero-Serrano E-M, Muñoz-Blanco J, Caballero JL, 2007. Evaluation of tolerance to *Colletotrichum acutatum* in strawberry plants transformed with *Trichoderma*-derived genes. *Acta Hort* 738: 383-388
- Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:473-497

- Moravčíková J, Matusílová I, Kibanová J, Bauer M, Mlynárová L, 2004. Expression of a cucumber class III chitinase and *Nicotiana plumbaginifolia* class I glucanase genes in transgenic potato plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 79: 161-168
- Palomo-Ríos E, Sánchez-Romero C, Mercado-Carmona JA, Pliego-Alfaro F, 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of avocado embryogenic cultures. International Conference Plant Transformation Technologies; Viena, Austria.
- Peran-Quesada R, Sánchez-Romero C, Barceló-Muñoz A, Pliego-Alfaro F, 2004. Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. *Sci. Hort* 102: 61-73
- Pliego C, 2008. Multitrophic interactions involved in biological control of avocado white root rot caused by *Rosellinia necatrix*. Ph.D Thesis. Dpto de Biología Celular, Genética y Fisiología, Área de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga.
- Pliego C, Kanematsu S, Ruano-Rosa D, de Vicente A, Lopez-Herrera C, Cazorla FM, Ramos C, 2009. GFP sheds light on the infection process of avocado roots by *Rosellinia necatrix*. *Fungal Gen Biol* 46:137-145
- Pliego-Alfaro F, Murashige T, 1987. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage on to juvenile rootstocks in vitro. *HortSci* 22:1321-1324
- Pliego-Alfaro F, Murashige T, 1988. Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 12:61-66
- Raharjo SHT, Witjaksono NFN, Gomez-Lim MA, Padilla G, Litz RE, 2008. Recovery of avocado (*Persea americana* Mill.) plants transformed with the antifungal plant defensin gene PDF1.2. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 44:254-262
- Sánchez-Romero C, Márquez-Martín B, Pliego-Alfaro F, 2005. Somatic and zygotic embryogenesis in avocado. In: Mujib A, Samaj J (eds.) *Somatic Embryogenesis*. Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg pp. 271-283
- Terakawa T, Takaya N, Horiuchi H, Koike M, Takagi M, 1997. A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Report* 16: 439-443
- Von Arnold S, 2008. Somatic embryogenesis. In: George EF, Hall MA, De Klerk G-J (eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture* 3rd edition. Vol. 1. The Background. Springer, Dordrecht, pp 335-354
- Witjaksono, Litz RE, 1999. Induction and growth characteristics of embryogenic avocado cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 58:19-29
- Youssef SM, Jiménez-Bermúdez S, Luz Bellido M, Martín-Pizarro C, Barceló M, Abdal-Aziz SA, Caballero JL, López-Aranda JM, Pliego-Alfaro F, Muñoz J, Quesada MA, Mercado JA, 2009. Fruit yield and quality of strawberry plants transformed with a fruit specific strawberry pectate lyase gene. *Sci Hort* 119:120-125