



## El cultivo de tejidos y la transformación genética en *Gossypium* spp

### The tissue culture and genetic transformation in *Gossypium* spp

 Luke Leroy Theodore Nedd<sup>1\*</sup>,  Silvio de Jesús Martínez Medina<sup>2</sup>,  María Esther González Vega<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología. Ministerio de Agricultura, Pesquería, Asuntos de Barbudas. Saint Johns, Queen Elizabeth Highway. Antigua y Barbuda.

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. CP 54830. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Carretera a Tapaste km 3,5. Gaveta Postal 1, CP 32700. San José de las Lajas, Mayabeque. Cuba.

**RESUMEN:** La planta de algodón se cultiva principalmente por la fibra, el aceite que se extrae de la semilla que puede utilizarse como aceite comestible y el aprovechamiento de la torta de algodón como forraje. Esta planta es resistente a condiciones de sequía y salinidad del suelo. Sin embargo, posee algunos caracteres que limitan su productividad. Es por ello que requiere de programas de mejoramiento genético, pero los programas por métodos tradicionales están limitados por varios factores en este cultivo, por lo que las técnicas biotecnológicas constituyen alternativas para lograr los objetivos de la mejora. En el trabajo se realizó una breve revisión de la literatura científica nacional e internacional sobre el origen, la distribución e importancia del cultivo, así como los antecedentes de la regeneración de plantas y los métodos de mejoramiento, mediante la transformación genética, en el cultivo del algodón. Se pone a disposición del lector un compendio de resultados como preámbulo para el desarrollo de futuras investigaciones en la regeneración de plantas y mejora genética de *Gossypium* spp. por métodos biotecnológicos.

**Palabras clave:** algodón, mejora genética, biotecnología, *in vitro*, *Agrobacterium*.

**ABSTRACT:** The cotton plant is cultivated mainly by the fiber, the oil that is extracted of the seed that can be used like eatable oil and the use of the cotton cake like forage. This plant is resistant to conditions of drought and salinity of the soil. However, it possesses some characters that limit their productivity. It is for it that requires of programs of plant breeding, but the programs for traditional methods are limited by several factors in this cultivation, for what the biotechnical techniques constitute alternatives to achieve these objectives. In the work was carried out a brief revision of the national and international scientific literature about the origin, the distribution and the cultivation importance, as well as the antecedents of the regeneration of plants and the methods of breeding, by means of the genetic transformation, in the cotton cultivation. It seeks to put on to the reader's disposition a summary of results as preamble for the development of future investigations in the regeneration of plants and breeding genetics of *Gossypium* spp. for biotechnical methods.

**Key words:** cotton, plant breeding, biotechnology, *in vitro*, *Agrobacterium*.

\*Autor para correspondencia. [lukenotin@hotmail.com](mailto:lukenotin@hotmail.com)

Recibido: 07/08/2024

Aceptado: 09/12/2024

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses

**Contribución de los autores:** **Conceptualización-** María Esther González Vega, Silvio de Jesús Martínez Medina, Luke Leroy Theodore Nedd. **Registro de la Información y su Procesamiento-** Silvio de Jesús Martínez Medina Luke Leroy Theodore Nedd. **Organización de la Escritura por temas-** María Esther González Vega, Silvio de Jesús Martínez Medina, Luke Leroy Theodore Nedd. **Escritura del Documento-** Luke Leroy Theodore Nedd. **Revisión y Arreglo del Borrador Inicial-** Silvio de Jesús Martínez Medina, María Esther González Vega, Luke Leroy Theodore Nedd. **Revisión y Arreglo del Segundo Borrador-** María Esther González Vega, Luke Leroy Theodore Nedd. **Revisión y Aprobación del último borrador-** María Esther González Vega, Silvio de Jesús Martínez Medina, Luke Leroy Theodore Nedd

Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0).  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



## INTRODUCCIÓN

El algodón (*Gossypium* spp.) es una de las oleaginosas más cultivada mundialmente para la extracción de aceite, con un total de 32,26 millones de toneladas de aceite producido en 2020 (1). La planta de algodón se cultiva principalmente por su fibra, el aceite que se extrae de la semilla que puede utilizarse como aceite comestible y el aprovechamiento de la torta de algodón como forraje. La cáscara de la semilla puede aprovecharse como forraje crudo y cama para el ganado, como abono o combustible (2). Esta planta es resistente a las condiciones de sequía y salinidad del suelo, sin embargo, posee algunas características desfavorables como el extenso período vegetativo, la fibra es gruesa y de corta longitud, además de la susceptibilidad a patógenos del suelo como *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Fusarium* y *Thielaviopsis basicola*, que provocan la caída de las plántulas (3).

Ante este problema, es necesario desarrollar programas de mejoramiento genético para este cultivo. Aunque es de señalar que en el algodón el uso de métodos tradicionales de mejoramiento genético está limitado por varios factores; entre ellos, la complejidad del carácter a mejorar, la influencia del medio ambiente y los largos periodos de selección, aspectos que los encarecen significativamente (4). El uso de métodos biotecnológicos constituye una alternativa para el desarrollo de estos programas de mejoramiento en el cultivo, aunque para establecer los métodos de mejora biotecnológica, es requisito imprescindible contar con una metodología de regeneración vegetal eficiente y reproducible (5).

En el presente trabajo se realiza una breve introducción al origen, distribución e importancia del cultivo del algodón, los antecedentes para la regeneración de plantas *in vitro* y los métodos de mejoramiento genético en esta especie, con énfasis en las técnicas biotecnológicas. Se pretende poner a disposición de la comunidad científica una recopilación de resultados como introducción para el desarrollo de futuras investigaciones en la propagación y mejora genética de *Gossypium* spp. mediante la aplicación de métodos biotecnológicos.

## DESARROLLO

### Origen, clasificación taxonómica y distribución

El género del algodón (*Gossypium* spp.) incluye, aproximadamente, 50 especies distribuidas en regiones áridas y semiáridas del trópico y subtropico. Incluye cuatro especies que han sido independientemente domesticadas por su fibra, dos en África, una en Asia y otra en América (6).

Su clasificación taxonómica es la siguiente (7): Reino: Plantae, División: Tracheophyta, Clase: Magnoliopsida, Orden: Malvales, Familia: Malvaceae, Género: *Gossypium*.

Este proceso paralelo de domesticación involucró cuatro especies, dos de América: *G. hirsutum* y *G. barbadense*, y dos de África y Asia: *G. alba* y *G. herbaceum* (7).

Existen diversos criterios sobre el origen del algodón. La discusión sobre los centros de origen, según estudios

recientes, establece que no se ha determinado. Sin embargo, se ha descrito que los centros primarios de diversidad biológica para este género son América Central y Sudamérica con 18 especies, entre las cuales 11 se encuentran en la zona centro-oeste y el sureste de México y dos en Perú y las Islas Galápagos (una especie de Hawai). En el Noreste de África y Arabia se identifican 14 especies, mientras que en Australia 17 especies (8).

### Importancia del cultivo

El algodón es un producto cultivado en más de 75 países de los cinco continentes, generando ingresos y empleo rural, lo que significa un ingreso vital para la economía de hogares rurales y un aporte a la seguridad alimentaria de la Agricultura Familiar. La cadena de valor del algodón genera productos agrícolas, fibras, textiles y prendas de vestir industriales y artesanales, así como el aprovechamiento de co-productos como oportunidades de negocio para la alimentación, salud, cosmética, entre otros, lo que dinamiza las economías nacionales y regionales (9).

Al cierre de la campaña 2020/2021, la demanda mundial de algodón ascendió a 25,5 millones de toneladas, con un aumento de 12,4 %. En la campaña 2021/2022, la producción mundial de este rubro alcanzó 25 millones de toneladas, lo que representó un incremento del 3 % (10).

### Métodos de regeneración de plantas *in vitro*

La biotecnología moderna involucra el establecimiento de cultivo de tejidos y sistemas de transferencia de genes, lo que garantiza la obtención de características específicas deseadas, que aporta hacia el mejoramiento del cultivo en cuestión e implica la habilidad de regenerar un gran número de plantas (11). Las principales vías de regeneración de plantas *in vitro* en algodón son: organogénesis (12) y embriogénesis somática (13).

### Organogénesis

La organogénesis es la formación de órganos (hojas, tallo, raíces), a partir de yemas o primordios desarrollados sobre la superficie de callos o de explantes; generalmente, se inicia con la formación de hoja y tallo, y continúa con la formación de raíces (14). La organogénesis implica la formación de estructuras monopolares que establecen conexión vascular con el tejido del que derivan, su origen es multicelular. Normalmente, los tallos y raíces se forman de modo independiente y se caracterizan por la falta de unión entre elementos vasculares de ambas estructuras (15).

La organogénesis involucra la regeneración de brotes directamente de células meristemáticas o de tejidos próximos a estas. Los brotes pueden surgir de los tejidos de los explantes con o sin la fase de callo. Además, es menos dependiente del genotipo en comparación con la embriogénesis somática, ya que cada planta tiene meristemas axilares capaces de regenerar. Sin embargo, la respuesta es diferente entre los cultivares, lo que depende del vigor, nivel de crecimiento de los explantes *in vitro* y la sensibilidad a los componentes del medio de cultivo (16).

En este sentido, y durante la regeneración de plantas vía organogénesis en tres cultivares de algodón de *Gossypium hirsutum*, y utilizando como explante inicial ápices, el mayor rango de elongación de los brotes se observó con 11,1  $\mu\text{M}$  de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y 0,1 % (w/v) de carbón activado, así como un incremento del crecimiento en presencia de Kinetina (kin). Además, se obtuvo alta eficiencia en el enraizamiento con 0,98  $\mu\text{M}$  de Ácido Indolbutírico (AIB) y carbón activado (17).

## Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es una técnica de la biotecnología que permite la obtención de embriones a partir de células somáticas vegetales, sin que exista la unión de los gametos. Esta técnica y el cultivo de tejidos vegetales, en general, se basan en el principio de la totipotencialidad celular, propuesto por Haberlandt en 1902 (18), que consiste en que todas las células vegetales tienen la capacidad de regenerar plantas completas.

Existen dos tipos de embriogénesis somática: directa e indirecta. La vía directa involucra la formación de embriones directamente a partir de un segmento del explante sin la previa formación de callos. La vía indirecta, se da a través de una fase intermedia de formación de callos (19) y se observa con mayor frecuencia que la embriogénesis somática directa (20). En ambos casos, para plantas monocotiledóneas, los embriones somáticos transitan a través de etapas similares a las observadas en un embrión cigótico: globular, acorazonado, torpedo, cotiledonar y embrión maduro (21).

En el año 1979, se informaron los primeros trabajos vía embriogénesis somática en *Gossypium koltzchianum*, pero sin llegar a obtener plantas completas (22). Posteriormente, y desde la primera mitad de los 80, se han desarrollado algunos métodos de regeneración de plantas por esta vía en *Gossypium* spp., en este sentido, para la especie *G. hirsutum* L. cv. Coker se describió por primera vez en 1983 la regeneración de plantas por embriogénesis somática (23). Desde entonces, ha tenido un progreso significativo el empleo de esta vía de regeneración en el cultivo de tejidos en algodón (24). Distinguiéndose, similar a otros cultivos, las fases de inducción y formación, proliferación, maduración, germinación y conversión de embriones somáticos muy bien definidas (25).

La inducción del proceso consiste en la terminación del patrón de expresión de genes presentes en el tejido del explante; y se reemplaza por un programa de expresión del gen o genes en las células del tejido cultivado, que puede dar lugar a embriones somáticos (26). Estas células dependen de diferentes factores para lograr una alta frecuencia de formación de callos, entre ellos, el genotipo, el tipo de planta donante, la edad o etapa de desarrollo del explante, el ambiente *in vitro* que incluye la composición del medio de cultivo y las condiciones físicas (luz, temperatura, humedad relativa) (27). También, existen referencias sobre la influencia del tipo de explante en la formación de callos, ya sea hojas, peciolas, raíces, semillas, cotiledones, meristemos, embriones cigóticos, entre otros (28).

## Factores que inciden en el desarrollo de la embriogénesis somática en el algodón

### Genotipo

La capacidad de regeneración de plantas muestra amplias diferencias entre familias, géneros, especies, e incluso, entre genotipos de la misma especie. Generalmente, las plantas dicotiledóneas se regeneran más fácilmente que las monocotiledóneas. La capacidad de regeneración en la familia Malvaceae y, particularmente, en el género *Gossypium*, se considera muy baja (29). La regeneración de plantas y la transformación genética del algodón, mediante técnicas de ingeniería genética, está estrechamente asociada al genotipo, la mayoría de los protocolos han sido ajustados para variedades modelo. Sin embargo, muchas de las variedades élite de este cultivo son recalcitrantes y no responden favorablemente a la manipulación genética (17). También, se han observado diferencias en la capacidad de regeneración y propagación *in vitro* de plantas de algodón procedentes de varios cultivares de la especie *G. hirsutum* (30). Estos aspectos corroboran la necesidad de estudiar cada genotipo y realizar un ajuste u optimización de los protocolos de regeneración de las plantas.

### Explante

Existen evidencias de que todos los tejidos tienen la capacidad de formar callos *in vitro*, aunque no todos son embriogénicos. Los tejidos embrionarios y los tejidos muy jóvenes son los que poseen una respuesta embriogénica activa. Un aspecto importante a considerar para el establecimiento de un eficiente protocolo de regeneración de plantas es el tipo de explante inicial (31). En el cultivo del algodón se ha descrito el uso de diferentes tipos de explante para el desarrollo de la embriogénesis somática. Entre los más usados se encuentran los que provienen de la reproducción sexual como ovarios, óvulos, embriones cigóticos, anteras, así como raíces, hojas, segmentos de plántulas jóvenes (cotiledones, hipocotilos) (32), y segmentos de tallo de plantas de semillas germinadas *in vitro* (3).

Además, recientemente se informó sobre el uso de segmentos de hojas jóvenes de *Gossypium barbadense* L. cultivar 'MSI', de plántulas crecidas en condiciones *in vitro*, como explante inicial para la formación de callos (33). En el cultivo del algodón no se han encontrado trabajos precedentes sobre el empleo de este tipo de explante, sin embargo, este ha sido utilizado exitosamente para el desarrollo de protocolos de regeneración de plantas en especies tales como *Secale cereale* L. (34), *Handroanthus heptaphyllus* (35) y *Lavandula angustifolia* L. (36).

### Oxidación de compuestos fenólicos

Uno de los factores que afecta con frecuencia durante el aislamiento de los explantes, en el cultivo *in vitro*, es la oxidación de los compuestos fenólicos liberados por las células dañadas durante el proceso de disección de los

órganos fuente de los explantes. Algunas prácticas para contrarrestar este efecto incluyen el uso de sustancias antioxidantes como el ácido ascórbico, el ácido cítrico, la cisteína, el carbón activado, entre otros, o las mezclas de algunos de estos compuestos (37).

El ácido ascórbico es uno de los antioxidantes más usados en el cultivo de tejidos vegetales, actúa como amortiguador redox en las plantas y tiene un importante papel en su metabolismo. Este ácido es un cofactor de las enzimas, interviene en varios procesos fisiológicos de las plantas, entre ellos, división celular, metabolismo de la pared y expansión celular, formación del meristemo apical, desarrollo de la raíz, fotosíntesis, regulación de la florescencia y de la senescencia de las hojas (38).

En la literatura científica, nacional e internacional, existen pocas referencias del uso de antioxidantes para controlar la oxidación de los compuestos fenólicos en el cultivo del algodón. Los autores de un estudio realizado en el cultivar 'MSI' de algodón observaron que, durante la formación de callos con estructuras embriogénicas, se formaron estos compuestos; lo que fue controlado con la adición al medio de cultivo de 60 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico. La incorporación de este antioxidante al medio, en presencia del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), contribuyó a la formación de un mayor número de callos total y de callos embriogénicos (33).

## Medio de cultivo

El medio de cultivo compuesto por las sales de Murashige-Skoog (MS) (39) es el más utilizado para la embriogénesis somática en especies dicotiledóneas (40). En general, y en particular en algodón, se han hecho varias modificaciones a este medio de cultivo para la regeneración de plantas por esta vía morfogenética. En tal sentido, se ha modificado el medio MS con la adición de vitaminas Gamborg B5. Evidencias de lo anteriormente expuesto son los resultados favorables durante la formación de callos, utilizando el medio de cultivo MS, en diferentes cultivares de *Gossypium* spp. (41). También, se ha logrado con éxito la formación de callos, en este género, al utilizar el medio de cultivo MSB (Sales MS más vitaminas Gamborg B5) (40-43).

## Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento de las plantas son compuestos que tienen un papel regulador más que nutricional en el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. En el proceso de formación de callos, el regulador de crecimiento utilizado juega un papel fundamental (44). El 2,4-D es uno de los más empleados en el cultivo de tejidos para estos fines (45). El potencial de la regeneración también es influenciado por la presencia de los compuestos reguladores en el medio de cultivo. Es por ello que, en los protocolos para la regeneración de plantas se utilizan diversos tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento.

Con respecto al algodón, existen diferentes criterios sobre la concentración de 2,4-D a emplear en el proceso de formación de callos. Esta auxina ha resultado de gran utilidad

para la inducción de callos con estructuras embriogénicas, a partir de hojas y cotiledones, en los cultivares de *G. arboreum* 'BD-I' y 'BD-6', así como en los cultivares de *G. hirsutum* 'SH-131' y 'LH-900' (46). En estos cultivares se observó, además, que el 2,4-D es efectivo en la inducción de callos a partir de explantes de diferente procedencia (47).

La combinación de auxinas y citoquininas, en el cultivo del algodón, estimula la formación de callos con estructuras embriogénicas, así por ejemplo se ha señalado que la incorporación de 2,4-D y kinetina en el medio de cultivo induce el desarrollo y la proliferación de embriones somáticos. Algunos autores refieren que la formación de callos, con estructuras embriogénicas, se logró al emplear concentraciones de 9,04 µM de 2,4-D combinadas con 0,46 µM de kin. De igual modo, en cultivares de este género se ha informado la formación de callos con la adición al medio de solo 4,52 µM de 2,4-D y 2,32 µM de kin (41,42,47). La inducción de embriones somáticos se ha obtenido al transferir los callos embriogénicos a un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento y el posterior subcultivo en medio MS enriquecido con 1,9 g L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub> (42).

Existen referencias sobre la obtención de callos friables y de color verde en *Gossypium klotzschianum*, a partir de hipocotilos cultivados en medio con 0,9 µM 2,4-D y 2,32 µM kin (48). Asimismo, se ha logrado el desarrollo y proliferación de embriones con 0,045 µM 2,4-D; 0,93 µM de kin y 2,46 µM de AIB. Por otro lado, la diferenciación de embriones también se ha logrado en medio líquido con 0,226 µM de 2,4-D y 0,93 µM de kin, observándose los diferentes estados del embrión somático: globular, corazón, torpedo y embrión cotiledonar maduro (48).

En este sentido, se desarrolló un protocolo para la embriogénesis somática y regeneración de plantas de cinco cultivares recalcitrantes de algodón (*G. hirsutum*), permitiendo ampliar la gama de genotipos manipulados *in vitro* para el mejoramiento genético, y se logró la mayor formación de embriones somáticos al combinar AIB (0,49 µM), kin (0,46 µM) y 2,4-D (0,45 µM) (49).

En otros protocolos desarrollados para la regeneración de plantas de algodón de las especies *G. hirsutum* y *G. barbadense*, en presencia de 10,74 µM de 2,4-D y 4,64 µM de kin se formaron callos con estructuras pre-embriogénicas (50). Los autores observaron la formación de callos friables, con pequeñas células y citoplasma muy denso, al ser transferidos a medio de cultivo de maduración. También, se han alcanzado altos porcentajes de formación de callos en *G. hirsutum*, con 5,37 µM de ácido naftalen acético (ANA), en combinación con 0,46 µM de Kin o 0,44 µM de 6-BAP, los callos formados con la adición de kinetina se caracterizaron por ser compactos y la presencia de gran número de raíces (51).

Estos reguladores de crecimiento de plantas han sido muy útiles para la inducción de callos en algodón a partir de cotiledones de los cultivares de *G. arboreum* 'BD-I' y 'BD-6', así como de los cultivares de *G. hirsutum* 'SH-131' y 'LH-900', lográndose la formación de callos con concentraciones de 9,04 µM de 2,4-D combinado con 0,464 µM de kin (46).



Otros autores destacan la formación de callos al utilizar dos combinaciones de reguladores de crecimiento: 0,90  $\mu\text{M}$  de 2,4-D + 0,89  $\mu\text{M}$  de 6-BAP y 4,92  $\mu\text{M}$  de 2,4-D + 0,89  $\mu\text{M}$  de 6-BAP, en condiciones de oscuridad y luz, obteniendo la mayor proliferación de callos en presencia de luz y con mayor concentración de 2,4-D, en presencia de 6-BAP (52). Por otro lado, la formación de un callo granular, parcialmente friable y de color marrón claro se obtuvo en presencia de 2-isopentiladenina (2iP) y 2,4-D; apreciándose que, al aumentar las concentraciones de estos reguladores, los callos presentaron color marrón oscuro y porciones necróticas (53).

Algunos autores han informado 0,45  $\mu\text{M}$  de 2,4-D como la concentración más efectiva para la formación de callos embriogénicos en el algodón (4). En *G. barbadense* “algodón nativo”, se obtuvo la mayor inducción de callos embriogénicos (82,5%) con 0,45  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 100 mL  $\text{L}^{-1}$  de agua de coco (3). Otros autores encontraron con 11,31 y 13,58  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y la adición de 60 mg  $\text{L}^{-1}$  de ácido ascórbico los mayores porcentajes de formación de callos totales y con apariencia embriogénica, con 88,05 y 83,50 %, respectivamente (35). Estos callos se caracterizaron por ser compactos, de color amarillo brillante, muy densos, compatibles con células isodiamétricas. Los resultados evidencian que el 2,4-D es necesario para la formación de callos, al menos para los explantes mencionados anteriormente, pues en el medio de cultivo sin este regulador de crecimiento no se logra inducir la callogénesis (33).

### Condiciones de cultivo

La luz es uno de los factores ambientales necesarios en los procesos de fotosíntesis y fotomorfogénesis, los cuales son facilitados por los pigmentos presentes en los tejidos, que absorben la radiación de determinadas longitudes de onda (3). La fotosíntesis llevada a cabo en la mayoría de los tejidos vegetales cultivados *in vitro* es relativamente baja, por lo que los cultivos dependen de una fuente externa de sacarosa. En estas circunstancias, la luz es importante por su efecto en la fotomorfogénesis, debido a que induce el rápido cambio en la expresión genética que conduce al patrón normal de desarrollo (20).

En *Gossypium* spp. se ha logrado la formación e inducción de callo embriogénico, tanto en condiciones de oscuridad continua como de fotoperiodo, siendo este último el más común. Por ejemplo, en algunas investigaciones sobre este cultivo se inició la formación y proliferación de callos con fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad (3,55,56), mientras que en otras se ha logrado en oscuridad continua (57).

### Suplementos orgánicos no definidos

En la formación de callos de diferentes especies vegetales se utilizan sustancias orgánicas de naturaleza química indefinida. Entre las sustancias orgánicas se encuentran el agua de coco, la caseína hidrolizada y el extracto de levadura. El agua de coco es el endospermo líquido del fruto de coco, y entre sus componentes se encuentran aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, purinas,

azúcares, polialcoholes, vitaminas, minerales y reguladores de crecimiento, cuyas concentraciones pueden variar (20).

Algunos autores han evaluado el uso del agua de coco en la inducción de callo, en combinación o ausencia de otros suplementos. Por ejemplo, se obtuvieron callos a partir de óvulos de *Gossypium hirsutum* y *G. barbadense*, utilizando medio MS enriquecido con 100 - 120 mL de agua de coco, 1 g  $\text{L}^{-1}$  de caseína hidrolizada, 1 g  $\text{L}^{-1}$  de extracto de levadura y distintas concentraciones de fitoreguladores de crecimiento (58).

En *Gossypium barbadense* L. “algodón nativo” color pardo se encontró la mayor proliferación de callos friables (82,5%), a partir de explantes obtenidos de segmentos de plantas de semillas germinadas *in vitro* y cultivados en medio MS enriquecido con 0,1 mg  $\text{L}^{-1}$  de 2,4-D y 100 mL  $\text{L}^{-1}$  de agua de coco e incubados bajo un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad (3).

La regeneración *in vitro* de plantas de algodón se dificulta debido, entre otros aspectos, a que la respuesta morfogénica es dependiente del genotipo. La embriogénesis somática es el método más utilizado, debido a que las plantas regeneradas tienen origen unicelular y no existe una conexión vascular entre el embrión somático y el tejido materno (17).

### Métodos de transformación genética

Se han desarrollado diferentes métodos para introducir genes foráneos en plantas. Una característica común para los mismos es que el ácido desoxirribonucleico transformante (ADN transformante), tiene que vencer diferentes barreras; primero, lograr entrar a la célula vegetal, atravesando la pared celular y la membrana plasmática; posteriormente, tiene que llegar al núcleo e integrarse en los cromosomas residentes. Para la mayoría de las especies, la transferencia de genes se lleva a cabo usando explantes que son competentes para la regeneración y, de esa manera, se facilita la obtención de plantas fértiles completas. Esto implica el uso de la tecnología de cultivo de tejidos. Aunque la tecnología de transferencia de genes se ha convertido en una rutina en varias especies, en otras el paso limitante no es propiamente la transformación, sino la ausencia de protocolos de regeneración eficientes (59). Los métodos de transformación se pueden dividir en dos categorías principales: transformaciones directas e indirectas, que se detallan en las secciones siguientes (60).

#### Transformación indirecta

En estos métodos, las plantas se transforman usando *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* para introducir la construcción del plásmido que porta el gen objetivo en la célula blanco (60).

#### Transformación directa

En los métodos directos de transformación no se utilizan células bacterianas. Los métodos directos más utilizados incluyen el bombardeo con microproyectiles o la transformación de protoplastos. Los problemas con la

regeneración de plantas de baja expresión transitoria de transgenes surgen como resultado de la transformación de protoplastos, principalmente en plantas monocotiledóneas. Entre las técnicas de transformación utilizadas en algodón se encuentran: transformación mediada por fibra de carburo de silicio, microinyección, infiltración, electroforesis de embriones, transformación a través de la vía del tubo polínico, electroporación de células y tejidos y transformación mediada por liposomas (60).

### Técnicas de transformación comúnmente usadas en algodón

Entre las técnicas de transformación más usadas en el cultivo del algodón cabe señalar la transformación mediada por *Agrobacterium* y la transformación por biobalística.

#### Transformación mediada por *Agrobacterium*

En 1907, Smith y Townsend (61) demostraron que la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, un miembro de la familia Rhizobiaceae, producía los tumores de la agalla de la corona. Además, destacaron que la formación de estos tumores ocurría como resultado de la infección Bactrian, usualmente en los sitios dañados, en plantas dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas (62). Este descubrimiento no tuvo mayores repercusiones hasta que Armin Braun demostró que las células tumorales eran transformadas y que la proliferación no controlada de estas células no era dependiente de la presencia continua de *Agrobacterium*, lo que implicaba la presencia de un principio de inducción de la transformación (63).

Este sistema de *Agrobacterium* tiene varias ventajas sobre otros sistemas de transformación y es considerado la primera opción para transformar plantas. Entre las ventajas cabe mencionar que los segmentos de ADN, que se integran en las células vegetales, se encuentran en una sola copia en un porcentaje importante de los eventos de transformación (64); se tienen actualmente numerosos vectores que contienen los bordes de T-ADN y una variedad de genes reporteros y de selección, lo que permite a los investigadores escoger la combinación más apropiada para insertar genes heterólogos y seleccionar las células transformadas en su modelo de estudio; es posible transferir grandes fragmentos de ADN incluyendo cromosomas artificiales de levadura (65) y la transformación directa en plantas sin la necesidad de cultivo de tejido es posible en las especies *Arabidopsis thaliana* y *Medicago trunculata* (66).

La transformación del algodón mediada por *Agrobacterium* se informó por primera vez hace una década con hipocótilo y cotiledón como explantes (67). Se han introducido varios genes útiles en el algodón por medio de la transformación mediante *Agrobacterium*, incluyendo genes con resistencia a insectos y herbicidas (68). Se han usado explantes tales como hipocótilo, cotiledón, callo generado del hipocótilo y cotiledón, así como embriones inmaduros, para la transformación mediante *Agrobacterium* (69-71). Sin embargo, las tasas de transformación en general fueron bajas, variando de 20 a 30% cuando se usó el hipocótilo como explante (72,73).

La validez de la octopina como marcador de transformación es cuestionable ya que se ha hallado octopina en varias especies de plantas ciertamente no transformadas por la infección con *A. tumefaciens* (74). Un informe más reciente indicó que la eficiencia de transformación del cotiledón fue aproximadamente de 20 a 30 % (75). La eficiencia de transformación fue incluso menor cuando se usó el procedimiento de bombardeo de partículas (76). Una diferencia en el tipo de explantes usados para la transformación pudo haber tenido un efecto significativo sobre la eficiencia de transformación y regeneración.

La transformación del algodón es muy dependiente del genotipo (68). Además de unos pocos cultivares que son regenerables y transformables, tales como *Gossypium hirsutum* cv. Coker 312 y *G. hirsutum* Jin 7, la mayor parte de los otros cultivares comerciales de elite importantes, tales como *G. hirsutum* cv. D&P 5415, no son regenerables y transformables por esos procedimientos.

La transformación mediante *Agrobacterium* seguida por la embriogénesis somática es el mejor método para la transformación de algodón. Sin embargo, el aspecto de la regeneración del proceso de la transformación permanece más difícil y las opciones están limitadas en el caso de algodón, uno de los cultivos más difíciles para la transformación. El hecho de que el *Agrobacterium* es muy atraído a los compuestos fenólicos, este método de transformación no es preferible en monocotiledóneas debido a la producción de fenólicos, considerando que puede usarse para las dicotiledóneas (77,78).

Le eficiencia de transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* está muy relacionada con la cepa utilizada para la infección. En el año 1989 se describió una transformación notablemente aumentada de puntas de vástagos de algodón mediante la adición simultánea de acetosiringona y nopalina en el momento de la infección (79). Desafortunadamente, este sistema presenta varios inconvenientes. Uno es que el rango de huéspedes es más limitado que en *A. tumefaciens* y otro es que la expresión de los genes del ADN-T en las plantas confiere fenotipos aberrantes a las mismas. Para solucionar este tipo de problemas se ha introducido el gen rol B en un vector binario de *A. tumefaciens* (80).

En este sentido, surge un problema adicional a partir del hecho de que todos los métodos de transformación de algodón, mediados por *Agrobacterium*, requieren la regeneración de un callo embriogénico a partir del explante que contiene las células transformadas, como una operación intermedia en la regeneración de plantas transgénicas de algodón. La ausencia de un procedimiento de regeneración de plantas de alta eficiencia se ha considerado como el mayor obstáculo para la aplicación de la transformación mediada por *Agrobacterium* al algodón (71).

#### Transformación por Biobalística

El método de biobalística fue desarrollado como una necesidad para transformar especies de plantas originalmente recalcitrantes a la transformación por el sistema de *Agrobacterium*, incluyendo los cereales

económicamente importantes. Este método consiste en la introducción de proyectiles, usualmente de tungsteno u oro cubiertos de ADN e impulsados al interior de las células blanco por aceleración. La velocidad de las partículas puede ser generada por la explosión de una pistola convencional o una descarga por gases a alta presión, tales como helio o dióxido de carbono (81,82). El análisis molecular de plantas transformadas por biobalística revela un patrón complejo de la integración del transgene, sin embargo, ha sido demostrado que las copias múltiples se encuentran arregladas formando un locus simple y segregan siguiendo un patrón mendeliano (83). Al igual que con *Agrobacterium*, un gran número de especies diversas de plantas han sido transformadas por el método de biobalística (84). Algunas ventajas del método de biobalística son las siguientes: 1) Puede ser utilizada una amplia variedad de tipos de explantes para ser bombardeados y obtener plantas fértiles; 2) No hay necesidad de utilizar vectores de transformación especializados; y 3) Es el único método confiable para la transformación de cloroplastos.

La biobalística permite la integración de múltiples copias de transgenes en el genoma de plantas transformadas existiendo referencias de hasta 100 copias de un transgén (85). En el cultivo de algodón para la transformación mediante el bombardeo de partículas se han usado explantes (tales como hipocótilo, cotiledón, callo generado del hipocótilo y cotiledón, así como embriones inmaduros) (8,70,71). Además, se ha usado tejido meristemático de ejes embrionarios escindidos para la transformación del algodón por bombardeo de partículas (86).

En algodón se han utilizado procedimientos para la regeneración de plantas genéticamente modificadas después de la transformación mediante el bombardeo de cotiledones (71). Existen referencias del empleo exitoso del bombardeo de ADN sobre ápices embrionarios de algodón (86).

En general, las técnicas de transformación genética de algodón mediante embriogénesis somática conllevan procesos entre 10 y 14 meses, mientras que la transformación de ápices meristemáticos y microinyección de óvulos entre 6 y 10 meses. Las eficiencias de transformación en algodón pueden variar, dependiendo de la técnica y la capacidad operativa, pero siempre es alrededor del 0,1 % (87).

### Mejoramiento genético del algodón mediante la transformación genética

En 1973 surgió la ingeniería genética y en 1983 se desarrolló la primera planta transgénica. Todos los conocimientos emanados a través de la historia de la revolución verde, basados en biotecnología, llevaron a que pronto la revolución de la biotecnología moderna imperara en el desarrollo de plantas de cultivos agrícolas de interés, generándose nuevas variedades portadoras de determinados genes; incluso, que ni siquiera pertenecen a las plantas, sino a organismos de otro reino. En 1996 se desarrolló la primera línea de algodón transgénico comercial:

el algodón Bollgard<sup>®</sup>, al cual se le transfirió el gen Cry1ac, proveniente de la bacteria *Bacillus thuringiensis*; este gen le confiere a la planta de algodón resistencia al ataque de insectos del orden lepidóptera, debido a que expresa una proteína tóxica para dichos insectos, provocándoles la muerte (88).

En 1997 surgió el algodón resistente al herbicida glifosato, ya que se le transfirió a las células de la planta de algodón el gen cp4-epsps, proveniente de la bacteria *Agrobacterium* spp., cepa cp4, que expresa una enzima clave en la síntesis de aminoácidos aromáticos que poseen las plantas, bacterias y algunos hongos. Esta destruye el ingrediente activo del glifosato (N-fosfonometil-glicina); sin embargo, la enzima EPSPS de la bacteria aislada es resistente al glifosato, por lo que la planta no sufre daño alguno.

En el año 2000 se obtuvo una línea de algodón transgénico resistente al herbicida glufosinato de amonio, al cual se le transfirió el gen pat, aislado de la bacteria *Streptomyces viridochromogenes*; este gen expresa una enzima que transforma al ingrediente activo del herbicida en una sustancia no tóxica. Posteriormente, en el año 2002, se desarrollaron y comercializaron semillas de algodón transgénico con doble tecnología, resistentes a insectos lepidópteros, debido al gen cry1Ac y tolerantes al herbicida glifosato, gracias al gen cp4-epsps (89).

El poco conocimiento acerca de la seguridad y el comportamiento de las plantas transgénicas pronto llevó al colapso de la biotecnología transferida al algodón, por lo que aparecieron insectos del orden lepidóptera resistentes a la proteína tóxica expresada por el gen Cry1ac; por ello, en el año 2003 surgió el algodón Bollgard ii<sup>®</sup>, que es una variante del Bollgard i<sup>®</sup>. Este, además de expresar el gen Cry1ac, al cual ya habían desarrollado resistencia algunos insectos, se le transfirió el gen Cry1ab, también aislado de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt), con el fin de enfrentar a los insectos con una nueva toxina, por lo que no debería existir resistencia. Junto con esta nueva tecnología surgió una campaña para la implementación de refugios, con el fin de evitar que sucediera nuevamente la aparición de insectos tolerantes, tal y como ocurrió con el algodón Bollgard i<sup>®</sup> (90).

En el año 2006 se comercializó un algodón transgénico de doble tecnología, resistente a insectos lepidópteros basado en la tecnología del Bollgard ii<sup>®</sup> y, además, tolerante al herbicida glifosato, conocido como algodón Bt-rr, donde Bt (*Bacillus thuringiensis*) se refiere a los genes que le otorgan resistencia a los insectos (Cry1ac y Cry2ab), y rr a que es tolerante al glifosato, específicamente a la marca Roundup Ready<sup>®</sup> (90).

El algodón transgénico ha seguido experimentando transformaciones, pues existen variedades transgénicas tolerantes a herbicidas distintos al glifosato y con otras propiedades. Actualmente, se están generando nuevos conocimientos y nuevas tecnologías, por lo que en los años venideros las modificaciones se harán de diversas maneras, algunas quizás más precisas, lo que permitirá ofrecer nuevas soluciones a los problemas del cultivo.

El desarrollo de métodos no sexuales para transferir genes, como la transformación genética, permite superar

las limitaciones de la mejora genética tradicional, lo que abre nuevas perspectivas en el mejoramiento de plantas (91). El algodón modificado genéticamente es el tercer cultivo transgénico con mayor presencia en el mundo. Actualmente, ocupa el 70 % de la superficie algodonera mundial, siendo las variedades Bt resistentes a insectos las más cultivadas. Entre los países que más cultivan el algodón Bt se encuentra China, India, Pakistán, Sudáfrica y Burkina Faso, entre otros. En estos países, más de 15 millones de pequeños agricultores disfrutan de sus beneficios económicos, sociales y ambientales (92).

Según el Comité Consultivo Internacional del Algodón - ICAC, la producción mundial ascendió a 25,5 millones en la cosecha 2021-2022, registrándose además un aumento de la demanda del 12,4 % (93). El algodón transgénico ocupó un tercer lugar (14 %) de los cultivos producidos por esta vía en el mundo, detrás de la soya (48 %) y el maíz (32 %). El algodón genéticamente modificado que se encuentra actualmente en la producción y el comercio ha sido modificado para que sea tolerante a herbicidas, resistente a insectos o una combinación de ambas características (94).

El algodón genéticamente modificado permitió, mediante el uso de genes de interés, que los cultivos sean más sustentables desde el punto de vista económico y ambiental (17). *Bacillus thuringiensis* es una bacteria muy común que se encuentra en el suelo y puede producir una proteína, la Cry d-endotoxina, que es tóxica para larvas de ciertos insectos, por ejemplo, polillas como los gusanos del algodón que atacan a este cultivo, y su acción es específica para controlar dichos insectos (95). De los transgénicos actualmente disponibles para producción comercial, dos ofrecen tolerancia a herbicidas y uno es resistente a los gusanos del algodón, conocido como algodón Bt, por expresar toxinas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (96).

Existen cultivares de algodón con capacidad de resistencia a insectos, la cual es utilizada para el control del gusano bollero y el gusano rosado; también ejerce cierto control sobre otros gusanos como el llamado soldado y el falso medidor; asimismo, es resistente a los herbicidas glifosato y glufosinato, siendo de utilidad para el agricultor al lograr controlar las plantas arvenses sin afectar a las plantas de este cultivo (95).

## CONCLUSIONES

- En el cultivo del algodón, los cultivares se muestran como genotipo dependiente dado su respuesta diferenciada ante condiciones de cultivo *in vitro* y de transformación genética.
- A pesar de haberse producido a nivel mundial en algodón plantas transgénicas, las metodologías de transformación y regeneración que existen presentan baja eficiencia y frecuente obtención de plantas quiméricas y son específicas para los cultivares que expresan una mejor respuesta embriónica.
- Entre los métodos de regeneración, la embriogénesis somática es más utilizada que la organogénesis, debido a que las plantas regeneradas tienen un origen unicelular y

no existe una conexión vascular entre el embrión somático y el tejido materno, además, ofrecen mayores coeficientes de multiplicación.

- En algodón existen varias técnicas para la transformación genética, pero las más usadas en el cultivo son la transformación mediada por *Agrobacterium* y la transformación por biobalística, su efectividad depende del tipo de tejido empleado, edad, genotipo y susceptibilidad a la infección con la bacteria.
- Las técnicas de transformación mediante *A. tumefaciens* se caracterizan por ser sencillas, de bajo costo, resultan en pocas copias de los transgenes y son reducidos los problemas de expresión. Sin embargo, aunque el algodón es una planta dicotiledónea y hospedera de *Agrobacterium*, presenta dificultades para la transformación mediante este vector, siendo limitados los trabajos de transformación genética de embriones somáticos.

## AGRADECIMIENTOS

A los compañeros del Laboratorio de Recursos Fitogenéticos del Centro de Investigaciones Agropecuarias adscrito a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central "Marta Abreu de Las Villas", por todo el apoyo en la búsqueda de literatura científica para la elaboración del presente documento. A la Ing. Ivonny Hernández Chaviano, directora del Laboratorio Provincial de Ensayos de Semillas del Ministerio de la Agricultura en la provincia de Villa Clara, por su incondicional apoyo durante las búsquedas bibliográficas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. National Cooperative Dairy Federation of India Ltd. (NCDFI), Cottonseed Oil Cake. 2020; 15-21p.
2. SAGARPA. Análisis de la cadena de valor en la producción de algodón en México, Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Ciudad de México, 2014, 71 p.
3. Teruya MS. Evaluación de fitorreguladores del crecimiento en la inducción de callo embriogénico en *Gossypium barbadense* L. 1753 "algodón nativo" color pardo. Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional De Biología, Universidad Ricardo PALMA, Lima, Perú. 201; 69 p.
4. Martínez SJ, Rafael Gómez- Kosky R, Saucedo O. El sorgo: su cultivo y mejora en Cuba. Editorial Académica Española. 2014; 100 p. ISBN: 978-3-8473-6942-4.
5. Martínez SJ. Regeneración de plantas de sorgo granífero [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] cultivar 'CIAP 132R-05' vía embriogénesis somática. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. 2018; 101 p.
6. Conabio. (2005). Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados. Recuperado el 10 de Abril de 2011, de Bioseguridad.



7. Roskov Y, Abucay L, Orrell T, Nicolson D, Flann C, Bailly N, Kirk P, Bourgoin T, DeWalt R.E., Decock W, De Wever A, eds. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2016; Annual Checklist.
8. Pérez M. Documento base de la especie *Gossypium hirsutum* L. para el análisis de riesgo ambiental. Distrito Federal, México: Instituto Nacional de Ecología. 2012.
9. FAO. Día Mundial del Algodón 2021 – Conmemoración Latinoamérica y África. 2021. Consultado 6 de junio del 2022 en: <https://www.fao.org/in-action/program-brazil-fao/news/ver/fr/c/1441913/>
10. FAO. Producción mundial de algodón. 2021. Consultado 6 de junio del 2022 en: <https://www.icac.org/Publications/Details?publicationId=81>
11. Naz S, Ali A, Siddique F.A. and Iqbal J. Multiple shoot formation from different explants of chick pea (*Cicer arietinum* L.), Pak. J. Bot. 2007; 39(6): 2067-2073 p.
12. Zapata C, Srivatanakul M, Park S.H., Lee B.M., Salas M.G., and Smith R.H. Improvements in shoot apex regeneration of two fiber crops: cotton and kenaf, Plant Cell Tissue Org. Cult. 1999; (12):43-50.
13. Firoozabady E, DeBoer D.L. Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 1993; 9:166-173.
14. Thorpe, T.A. Morphogenesis and regeneration in tissue culture. In: Genetic Engineering. Application to agriculture. Beltsville Symposia in Agricultural Research (L.D. Owens, ed.). 1983; 285-303 p. Rowman and Allanheld, Publishers
15. Segura J. Morfogénesis *in vitro*. En: Fisiología y Bioquímica Vegetal (J. Azcón-Bieto, M. Talón, eds) .1993; 381-392 p. Interamericana-McGraw Hill, Madrid.
16. Olhoft P.M., Somers D.A. Soybean. En: EC Pua, M.R. Davey (Eds.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. 2007; 61. Transgenic Crops VI. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
17. Gonzalez A.J. Evaluación *in vitro* de materiales de algodón *Gossypium hirsutum* L. en relación a la capacidad de regeneración y respuesta a estrés abiótico. Análisis de variedades comerciales de INTA, líneas avanzadas. Tesis para obtener el grado de Magister en Genética Vegetal, presentada en la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, 2015; 193 p.
18. Radice S. Morfogénesis. En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L, eds. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Buenos Aires: INTA; 2010; 26–33 p.
19. Bedoya C, Ríos A. Inducción de la embriogénesis somática en *Crinum x powellii* "album" (Amaryllidaceae) [Tesis de pregrado]. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira; 2010.
20. George EF, Hall MA, De Klerk GJ. Plant propagation by tissue culture. 3<sup>rd</sup> ed. Vol. 1. Dordrecht: Springer; 2008.
21. Kamle M, Bajpai A, Chandra R, Kalim S, Kumar R. Somatic embryogenesis for crop improvement. GERF Bull Biosci. 2011; 2(1):54–59 p.
22. Price HJ and Smith RH. Somatic embryogenesis in suspension cultures of *Gossypium klotzschianum* Anderss. Planta. 1979; 145: 305-307.
23. Davidonis GH and Hamilton RH. Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. Plant Sci. Lett. 1983; 32: 89-93.
24. Méndez-Natera JR, Rondón A, Hernández J, Merazo-Pinto JF. Genetic studies in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) I. heterotic effects, Pak. J. Bot. 2007; 39(2): 385-395
25. Chitra Devi B, Narmathabai V. Somatic embryogenesis in the medicinal legume *Desmodium motorium* (Houtt.) Merr. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 2011;106: 409-418.
26. Quiroz FR, Rojas R, Galaz RM, Loyola VM. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2006; 86: 285-301.
27. Bian FH, Qu FN, Zheng CX, You CR, Gong XQ. Recent advances in *Cyclamen persicum* Mill. Somatic embryogenesis. Northern Hortic. 2007; 8:70-72.
28. Rodríguez Beraud MM, Latsague MI, Chacón MA, Astorga PK. Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. Bosque, 2014; 35(1): 111-118. DOI: <http://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>
29. Rojas C, Cuzquén C, Delgado GE. *in vitro* clonal propagation and cutting rooting of native cotton (*Gossypium barbadense* L.). Acta Agron. 2013;62(4): 312-320. ISSN 0120-2812
30. Petrone S. Variación funcional relacionada con la tolerancia al estrés salino de *Gossypium hirsutum* en México. Tesis que para obtener el título de Bióloga. Universidad Nacional Autónoma de México. 2015, 103 p.
31. Dunstan DI, Tautorus TE, Thorpe TA. Somatic embryogenesis in woody plants. In: Thorpe TA (ed) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1995; 471-538.
32. Wu JY, She JM, Cai XN, Bajaj YPS. Establishment of callus culture, somatic embryogenesis, and the regeneration of cotton plants. In: Bajaj YPS. (ed.) Cotton. Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 42. Berlin: Springer. 1998; 37-47.
33. Nedd LL, González ME, Martínez SJ. Efecto del 2,4-d y ácido ascórbico en la formación de callos embriogénicos en *Gossypium barbadense* L. cultivar 'MSI'. Biotecnología Vegetal, 2022:
34. Hossein A, Aydin M, Haliloglu K. Plant regeneration system in recalcitrantrye (*Secale cereale* L.)Arash Hossein Pour, Murat Aydin &Kamil Haliloglu. Biología. 2019, 75(7):1017-1028 DOI <http://doi.org/10.2478/s11756-019-00395->
35. Maura Isabel Díaz MI, Rodas JM, Luis Roberto González LR, Vera M. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus* de flores blancas. Biotecnología Vegetal. 2020; 20(3): 203 – 210. SSN 2074-8647, RNPS: 2154
36. Devasigaman L, Devarajan R, Loganathan R, Rafath H, Padman M, Govinda MV, Giridhar L, Chetan HC . Devasigamani N. *Lavandula angustifolia* L. plants regeneration from *in vitro* leaf explants-derived callus as conservation strategy. Biotecnología Vegetal. 2020; 20(2): 75 – 82. ISSN 2074-8647, RNPS: 2154

37. Azofeifa A. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*. 2009; 20(1): 153-175. issn: 1021-7444
38. Mora ME, Peralta J, López HA, García R, González JG. Efecto del ácido ascórbico sobre crecimiento, pigmentos fotosintéticos y actividad peroxidasa en plantas de crisantemo Revista Chapingo Serie Horticultura. 2011; XVII (2): 73-81.
39. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962; 15:473-497.
40. Sharry S, Adema A, Abedini W. Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Editorial de la Universidad de La Plata, Argentina. 2015; 234 p. ISBN 978-950-34-1254-1
41. Rao AQ, Hussain SS, Shahzad MS, Bokhari SYA, Raza MH, Rakha A. Somatic embryogenesis in wild relatives of cotton (*Gossypium spp.*). *J Zhejiang Univ-SCI B*. 2006; 7(4):291-298.
42. Rajeswari S, Muthuramu S, Chandirakala R, Thiruvengadam V, Raveendran T. Callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Electronic Journal of Plant Breeding*. 2010;1(4):1186-1190
43. Han G, Wang X, Zhang G, Ma Z. Somatic embryogenesis and plant regeneration of recalcitrant cottons (*Gossypium hirsutum*). *Afr J Biotechnol*. 2009; 8(3):432-437.
44. von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2002; 69: 233-249.
45. Yumbra M, Ferreira AC, Marques MV, Rocha DI, Silva D, Dias A, Barbosa LG, Campos Otoni W. Somatic embryogenesis and de novo shoot organogenesis can be alternatively induced by reactivating pericycle cells in *Lisianthus* (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinnery) root explants. Available from: *In Vitro Cell Dev Biol - Plant*. 2017; 50:738-745. DOI <http://doi.org/10.1007/s11627-017-9800-2>
46. Khan T, Singh AK, Pant R. Regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis in different cultivars of cotton (*Gossypium spp.*). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*. 2006; 42:498-501.
47. Zouzou M, Kouakou TH, Koné M, Georges AN, Justin KY. Effect of genotype, explants, growth regulators and sugars on callus induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Aust J Crop Sci*. 2008; 2(1):1-9
48. Sun Y, Zhang X, Jin S, Liang S, Nie Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration in wild cotton (*Gossypium klotzschianum*). *Plant Cell Tiss Org*. 2003; 75:247-253.
49. Han G, Wang X, Zhang G, Ma Z. Somatic embryogenesis and plant regeneration of recalcitrant cottons (*Gossypium hirsutum*). *Afr J Biotechnol*. 2009; 8(3):432-437.
50. Upland (*Gossypium hirsutum* L.) and Pima (*Gossypium barbadense* L.) cottons. *Crop Sci*. 2001; 41:1235-1240.
51. Abdellatif E, Khalafallah M. Influence of growth regulators on callus induction from hypocotyls of medium staple cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Cultivar barac B-67. *J. Soil Nature*. 2008; 2(1):17-22.
52. Hirimburegama K, Ga-mage N. *in vitro* callus and cell cultures of *Gossypium hirsutum* L. (cotton). *J Natn Sci Coun Sri Lanka*. 1994; 22(4):305-312.
53. González-Benito M, Carvalho J, Pérez C. Somatic embryogenesis of an early cotton cultivar. *Pesq agropec bras*. 1997; 32(5):485-488
54. Zhang B-H, Feng R, Liu F, Wang Q. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. *Bot Bull Acad Sin*. 2001; 42:9-16.
55. Ghaemi M, Majd A, Fallahian F, Bezdi G. Comparison of callus induction and somatic embryogenesis of some Iranian cottons (*Gossypium Spp.*) with Coker 312 and histology of somatic embryogenesis. *African Journal of Biotechnology*. 2013; 10(15):2915-2922.
56. Surgun Y, Yilmaz E, Çöl B, Bürün B. Callus induction, *in vitro* shoot development and somaclonal variations in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *J Appl Biol Sci*. 2014; 8(2):62-68.
57. Sanghera GS, Gill MS, Sandhu JS, Gosal SS. Effects of genotype, plant growth regulators and explant source on callus induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Asian Australas J Plant Sci Biotechnol*. 2009; 3:37-42.
58. Efe L. Callus formation and plant regeneration from two cotton species (*Gossypium hirsutum* L. and *G. barbadense* L.). *Pak J Bot*. 2005; 37(2):227-236.
59. Martínez P, Cabrera JL, Herrera L. Las plantas transgénicas: una visión integral. *Genosis* [online]. 2004; 2:28 p.
60. Rao AQ, Ali MA, Khan MAU, Bajwa KS, Iqbal A, Iqbal T, Shahid AA, Nasir IA and Husnain T. Science Behind Cotton Transformation. Chapter from the book *Cotton Research*, Editado por: INTECH, 2016; 209-229. Downloaded from: <http://www.intechopen.com/books/cotton-research>
61. Smith EF, Townsend CO. A plant-tumor of bacterial origin. *Science* 25, 671-673.doi: <http://doi.org/10.1126/science.1907.25.643.671>.
62. Binns A, Campbell A. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of plant cells. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Pub. Group. 2001; 1-6.
63. Chilton MD. *Agrobacterium*. A memoir. *Plant Physiol*. 2001; 125: 9-14.
64. Crouzet P, Hohn B. Transgenic plants. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group. 2002, 1
65. Hamilton CM, Frary A, Lewis C, Tanksley SD. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996, 93: 997-9979.
66. Trieu AT, Burleigh SH, Kardailsky IV, Maldonado-Mendoza IE, Versaw WK, Blaylock LA, Shin H, Chiou TJ, Katagi H, Dewbre GR, Weigel D, Harrison MJ. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J*. 2000; 22: 531-541
67. Umbeck P, Barton KA, Norheim EV, McCarty JC, Parrot WL, Jennings JC. Degree of pollen dispersal by insects from a field test of genetically engineered cotton. *J Econ Entomol*. 1991; 84: 1943-1950.

68. Trolider NL, Berlin JD, Goodin JR. 2,4-D resistant transgenic cotton. Proceedings Beltwide Production Research Conference. National Cotton, Council, Memphis, Tennessee, 1988; 840 p.
69. de Framond AJ, Barton KA, Chilton MD. Mini-Ti: a new vector strategy for plant genetic engineering. Biotechnology (N Y). 1983; 5: 262–269
70. Finer JF, Vain P, Jones MW, McMullen MA. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. Plant Cell Reports. 1993; 11:323–328
71. Firoozabady E, Deboer DL, Merlot DJ, Halh EL, Rahska KL, Murray EE. Transformation of *Gossypium hirsutum* L. by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants. Plant Molecular Biology. 1987; 10 : 105-116
72. Cousins YL, Lyon BR and Llewellyn DJ. Transformation of an Australian cotton cultivar: Prospects for cotton through genetic engineering. Australian Journal of Plant Physiology. 1991; 18: 481-494.
73. Rajasekaran K, Grula, JW, Hudspeth, RL, Pofelis S, Anderson DM. Herbicide-resistant Acala and Coker cottons transformed with a native gene encoding mutant forms of acetohydroxyacid synthase. Molecular Breeding. 1996; 2: 307–319
74. Wendt-Gallitelli MF, Dobrigkeit I. Investigations implying the invalidity of octopine as a marker for transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. Z. Naturforsch. 1973; 28,768–771.
75. Cousins YL, Lyon BR and Llewellyn DJ. Transformation of an Australian cotton cultivar: Prospects for cotton through genetic engineering. Australian Journal of Plant Physiology. 1991; 18: 481-494.
76. Keller K, Melillo J, de mello W. "Trace Gas Emissions from Ecosystems of the Amazon Basin". En: Ciencia e Cultura. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science. 1997; 49(01):87-97.
77. Nadolska-Orczyk A, Orczyk W, Przetakiewicz A. Agrobacterium-mediated transformation of cereals—from technique development to its application. Acta Physiologiae Plantarum. 2000; 22:77-88. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11738-000-0011-8>
78. Thomas JC, Adams DG, Keppenne VD, Wasmann CC, Brown JK, Kanost MR. Protease inhibitors of *Manduca sexta* expressed in transgenic cotton. Plant Cell Reports. 1995; 14:758-762. DOI: <http://doi.org/10.1007/BF00232917>.
79. Dickens JC. Green Leaf Volatiles Enhance Aggregation Pheromone of Boll Weevil, *Anthonomus grandis*. Entomol. Exp. Appl., 1989; 52(3), 191-203.
80. Moffat AS. Transposons Help Sculpt a Dynamic Genome. Science, 2000; 289(5484), 1455-1457.
81. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A Putative rna-interference-based Immune System in Prokaryotes: Computational Analysis of the Predicted Enzymatic Machinery, Functional Analogies with Eukaryotic rna, and Hypothetical Mechanisms of Action. Biol. Direct, 2006; 1, 7.
82. Díaz C, Chaparro A. Métodos de transformación genética de plantas. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica. 2004, 15 (1): 49 – 61
83. Fundación Antama. El algodón transgénico ocupa alrededor del 70% de la superficie algodonera mundial. 2021. Consultado en: <https://twitter.com/fundacionantama/status/1429461923867893762>
84. FAO, Día mundial del algodón 2021. Consultado en: <https://docs.wto.org/dol2fe/Pages/SS/directdoc.aspx?filename=q:/WT/CFMC/W93-03.pdf&Open=True>.
85. Agrogebio. Los cultivos transgénicos en el mundo. 2019. Consultado en: <https://www.argenbio.org/cultivos-transgenicos/12549>
86. FAO. Perspectivas Agrícolas 2013-2022. 2013. Consultado en: <http://www.oaidrus-bc.gob.mx/sispro/algodonbc/PROD UCCION/Mundial/Situacion%20Actual%20del%20mercado%20Internacional%20de%20Algodon.pdf>
87. Shukla V, Devi P, Baghel S. Isolation, characterization and biomass production of *Trichoderma* spp. A review. Research in Environment and Life Sciences. 2016; 9(7): 889-894
88. Veluthambi K, Krishnan M, Gould JH, Smith RH, Gelvin SB. Opines stimulate induction of the *vir*-genes of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. J Bacteriol. 1989; 171(7):3696-3703.
89. Rugini E, Mariotti D. *Agrobacterium* Rhizogenes T-DNA genes and rooting in woody species. Acta Horticulturae. 1999; 300: 301-308.
90. Sanford JC. The biolistic process. Trends Biotechnol. 1988; 6: 299-302.
91. Hansen G, Wright MS. Recent advances in the transformation of plants. Trends Plant Sci. 1999; 4: 226-231
92. Kohli A, Leech M, Vain P, Laurie DA, Christou P. Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998; 95: 7203-7208.
93. Gutiérrez A, Santacruz F, Cabrera JL, Rodríguez B. Mejoramiento genético vegetal in vitro. e-Gnosis, [online]. 2003; 1: 4. [www.e-gnosis.udg.mx/vol1/art4](http://www.e-gnosis.udg.mx/vol1/art4)
94. Reddy, MS, Dinkins RD, Collins GB. Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. Plant Cell Report. 2003; 21: 676-683.
95. McCabe DE, Martinell BJ. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. Bio/Technology. 1993; 11:596-598.
96. Maskin L, Turica M, Nakaya P, González A, Lewi DM. Técnicas aplicadas en la transgénesis en algodón (*Gossypium hirsutum* L.). Trabajo presentado en el 1º Congreso Internacional de Algodón realizado el 27/10 en Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco. Argentina. 2018.