



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FISICO-QUIMICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Carrera: Microbiología y Licenciatura en Ciencias Biológicas

Asignatura: Biotecnología Vegetal

Código: 2184

Profesores responsables: Dra. Elizabeth Agostini y Dra. Melina Talano.

Equipo docente: Dra. María Inés Medina, Dr. Lucas Sosa Alderete, Lic. Mariana Vezza.

Año Académico: 2019

Régimen de la asignatura: Bimestral para Microbiología y cuatrimestral para Licenciatura en Ciencias Biológicas

Materias Correlativas para Lic. en Ciencias Biológicas: Genética General, Biología Vegetal I, Biología de los Microorganismos.

Materias Correlativas para Microbiología: Genética General (2119) y Genética Microbiana (2163).

Carga Horaria Total: 70 h

Detalle de horas de clase de acuerdo a la actividad: 20 hs de trabajos prácticos, 10 hs de teóricos-prácticos y 40 hs de teóricos.

Cupo: 30 alumnos

A. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA ASIGNATURA: 3er bimestre (Microbiología) y 2do Cuatrimestre (Lic. en Ciencias Biológicas)

B. OBJETIVOS PROPUESTOS: Que el alumno logre comprender la importancia de la biotecnología vegetal, sus principales aplicaciones y su impacto en el medio ambiente. Aportar los conocimientos básicos y las herramientas adecuadas para que adquiera habilidades en el manejo de esta tecnología, que presenta importantes perspectivas para su futura inserción laboral.

C. CONTENIDOS BÁSICOS DEL PROGRAMA A DESARROLLAR:

El genoma vegetal. Elementos transponibles y transposones. Expresión génica en plantas. Métodos de cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales. Diferentes tipos de cultivo *in vitro*. Obtención y mantenimiento de los cultivos. Aplicaciones de los cultivos *in vitro*. Producción de metabolitos secundarios. Micropropagación. Bancos de germoplasma. Plantas transgénicas. Importancia en la agricultura y en la salud. Transferencia de genes. Promotores. Análisis de plantas transgénicas. Respuesta de la planta a estrés abióticos. Respuesta de la planta a estrés biótico. Manipulación genética a

factores adversos. Resistencia a herbicidas. Resistencia a enfermedades fúngicas y bacterianas. Resistencia a insectos. Manipulación del metabolismo secundario. Fitorremediación. Biorreactores y las plantas como biorreactores. Perspectivas de la Biotecnología vegetal. Aspectos éticos del uso de plantas transgénicas. Patentes.

D. FUNDAMENTACIÓN DE LOS CONTENIDOS:

La biotecnología, actualmente, es sinónimo de "modificación genética", y se la define como: "la aplicación de organismos, sistemas o procesos biológicos para la producción de bienes y servicios útiles". Consiste en un gradiente de tecnologías que van desde las técnicas de la biotecnología "tradicional", largamente establecidas y ampliamente conocidas y utilizadas (e.g., fermentación de alimentos, control biológico), hasta la biotecnología moderna, basada en la utilización de las nuevas técnicas del ADN recombinante (técnicas de ingeniería genética), los anticuerpos monoclonales y los nuevos métodos de cultivo de células y tejidos.

La biotecnología vegetal es una extensión de la tradición de modificar las plantas, con una diferencia muy importante: la biotecnología vegetal permite la transferencia de una mayor variedad de información genética de una manera más precisa y controlada.

En la década del 80 se lograron dos grandes avances, que impulsaron la biotecnología vegetal:

- a) la aplicación de protocolos experimentales para la regeneración de plantas completas fértiles a partir de cultivos de células o tejidos *in vitro*
- b) el desarrollo de métodos para introducir el ADN exógeno, de modo directo o indirecto, seguido de su inserción en el genoma y su expresión.

Actualmente uno de los objetivos principales de la biotecnología vegetal es crear, por medio de la ingeniería genética, nuevas variedades de plantas, comúnmente denominadas **plantas transgénicas**, que presenten alguna característica que mejore su valor o sus propiedades respecto de las especies cultivadas ya existentes.

A través de estas técnicas las plantas pueden ser modificadas, básicamente, con dos finalidades:

- a) el mejoramiento de las características agronómicas y/o su calidad nutricional (plantas resistentes a insectos y otras enfermedades, resistencia a herbicidas, etc.)
- b) el uso de las plantas como reactores biológicos para la producción de biomoléculas.

Asimismo la biotecnología vegetal tiene aplicación en la conservación del medio ambiente (fitorremediación), ya que ha contribuido y continúa haciéndolo con la selección y mejora de especies vegetales que colaboran con el ambiente reparando, en ocasiones, los daños generados por las distintas actividades del hombre.

Otro área de interés en el campo de la biotecnología vegetal, que está íntimamente relacionada con la producción de biomoléculas, lo constituye el cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos vegetales ya que las células de una gran variedad de especies vegetales pueden cultivarse *in vitro* si se les suministra nutrientes y sustancias para el crecimiento, bajo estrictas condiciones asépticas. Los cultivos de células individuales (suspensiones celulares) pueden desarrollarse en un fermentador y ser utilizados, en lugar de cultivar la planta entera, para la producción de sustancias de alto valor económico como colorantes y aditivos, sustancias anticancerígenas, etc.

Por otra parte, además de la gran cantidad de investigaciones referidas a la utilización de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* para la producción de biomoléculas se están produciendo compuestos de alto valor comercial en cultivos *in vitro* derivados de las plantas transgénicas.

De todo lo expuesto se desprende que el campo de la biotecnología vegetal, referido a la obtención de productos de interés industrial y farmacéutico constituye un área de continuo crecimiento y que sin dudas obtendrá resultados de una gran trascendencia en un futuro muy cercano.

Por lo tanto, se intentará que durante el dictado de la asignatura los alumnos adquieran los conocimientos básicos y precisos de los fundamentos, de las técnicas utilizadas y de las principales aplicaciones de la biotecnología vegetal, ya que el estudio y el conocimiento en este área les permitirá ser participantes activos del debate respecto del uso de los OGMs, aportando una opinión sólida y bien fundamentada y por otra parte adquirir los habilidades en el manejo de una tecnología con gran futuro y que presenta importantes perspectivas en lo que se refiere a la salida laboral de los estudiantes.

Básicamente se propone en el dictado de la asignatura:

- a: Indagar sobre los conocimientos previos.
- b: Proporcionar los conocimientos mínimos que permitan al alumno resolver problemas y estimular su pensamiento crítico.
- c: Estimular el trabajo grupal, con el objeto de lograr la integración e interacción de los alumnos para fomentar la discusión y confrontación de ideas y contribuir a su formación, teniendo en cuenta la posibilidad de su futura incorporación a un equipo de trabajo.

E. ACTIVIDADES A DESARROLLAR

Se utilizarán diversas estrategias de aprendizaje: **1) Clases expositivas**, en las que se les proporcionarán los marcos conceptuales teóricos (40 Hs). **2) Trabajos prácticos de laboratorio** (20 Hs), donde deberán desarrollar habilidades en el manejo del material y equipamiento de laboratorio, discutirán los resultados y elaborarán un informe final integrador de los trabajos prácticos (bajo la supervisión de los docentes de manera continua) a manera de una publicación científica, que les permita desarrollar la capacidad para comunicar sus datos experimentales, constituyendo una importante etapa de aprendizaje de la producción científica escrita.. **3) Clases de seminarios** (7 Hs), donde los estudiantes presentarán y discutirán un artículo científico relacionado con los temas tratados en las clases teóricas y prácticas, bajo la supervisión de los docentes. **4) Actividades de aula**, en donde los alumnos realizaran un trabajo grupal con creatividad, a partir del título de un trabajo publicado en una revista científica de prestigio, y redactará cada sección de ese trabajo como si él mismo lo hubiera realizado, escrito y publicado. También se realizará una prueba diagnóstica de conocimientos al comienzo de la asignatura y al final el bimestre se re-elaborarán las definiciones de estos conceptos analizando aciertos y/o desaciertos y modificando según sea necesario los conceptos, basados en un conocimiento y argumentación más profunda y criteriosa. (6 hs).

Se pretende de esta manera transmitir los conocimientos básicos, estimular la participación activa de los estudiantes y favorecer los procesos de construcción paulatina de los conocimientos.

F. NÓMINA DE TRABAJOS PRÁCTICOS

Trabajo Práctico N°1: Esterilización y siembra de semillas en medios de cultivo sólidos. Obtención de plántulas en condiciones de asepsia. Incubación. Inducción de callos en medios de cultivos suplementados con fitohormonas. Incubación.

Trabajo Práctico N°2: Obtención de cultivos de raíces transformadas. Mantenimiento. Subcultivo. Extracción de peroxidasas a partir de cultivos de raíces transformadas de tomate y nabo. Determinación de actividad enzimática. Estudio de perfiles de isoenzimas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

Trabajo Práctico N°3: Análisis de plantas transgénicas por PCR.

Parte A: Extracción de ADN. PCR.

Parte B: Análisis de productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa.

Trabajo Práctico N°4: Fitorremediación de fenol mediante la aplicación de cultivos de raíces transformadas. Determinación de fenol residual por ensayo colorimétrico.

Trabajo Práctico N°5: Visitas a empresas y/o Instituciones donde se desarrollan proyectos de biotecnología. Previstas: En Buenos Aires: Bio-Sidus SA, Biogénesis-Bagó, INTA Castelar y Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología- FFyB- UBA. En Córdoba: CEPROCOR; Agroplant S.A.

G: ACTIVIDADES AÚLICAS:

AA1: Evaluación diagnóstica: Se realizan dos actividades, una al inicio de la asignatura y otra al finalizar el dictado de la misma.

AA2: Redacción de una publicación científica: Diagramación y escritura de un manuscrito científico con las secciones correspondientes, en un tema relacionado al programa de la asignatura y con la entrega del título original, figuras y datos mínimos de un trabajo original.

AA 3: Bioinformática: Introducción y herramientas básicas para el diseño de oligonucleótidos a utilizar en los trabajos prácticos.

AA·4: Seminarios de bibliografía: Exposición grupal de trabajos recientemente publicados en revistas científicas, previamente seleccionados por el docente.

H. HORARIOS DE CLASE: Martes de 13-16 hs, Jueves: 14-18 hs y viernes 14-17 hs

HORARIO DE CLASES DE CONSULTA: 1 hora semanal.

I. MODALIDAD DE EVALUACIÓN:

- **Exámenes parciales:** 2 exámenes escritos
- **Examen final:** escrito
- **Condiciones de Regularidad:** los alumnos deberán cumplir los siguientes requisitos mínimos:

1. Asistencia al 80 % de las clases teóricas, seminarios y al 80 % de los trabajos prácticos. En la calificación de los trabajos prácticos se tendrá en cuenta la participación del estudiante y la presentación de un informe.
2. Se deberán aprobar dos parciales con nota 5 o superior. Se podrá recuperar cada uno de ellos, una sola vez. Los parciales constan de una parte teórica y una parte práctica. Para aprobar el examen parcial se deberá tener el 50 % del examen que equivale a una calificación de 5 puntos.

- **Condiciones de Promoción:** los alumnos deberán cumplir los siguientes requisitos mínimos:

- 1- Asistir al 80 % de las clases teóricas, seminarios y al 80 % de los trabajos prácticos. En la calificación de los trabajos prácticos se tendrá en cuenta la participación del estudiante y la presentación de un informe.
- 2- Se deberán aprobar 2 parciales con una calificación promedio de 7 puntos (sin registrar instancias evaluativas de aprobaciones con notas inferiores a cinco puntos). Si habiendo aprobado una instancia la evaluación parcial, un alumno no hubiere alcanzado la nota mínima de cinco puntos, tendrá derecho a presentarse al recuperatorio para intentar levantar esa nota y mantenerse en el sistema de promoción.
- 3- En el segundo examen parcial se realizarán preguntas integradoras referidas a los conceptos desarrollados durante el transcurso de la asignatura.
- 4- Los trabajos prácticos y seminarios deberán aprobarse con una nota promedio de 7 puntos.
- 5- A los estudiantes que estén en condiciones de obtener la promoción pero que no cuenten con las condiciones previas de correlatividades, se les conservará la promoción hasta finalizado el semestre siguiente.

J. PROGRAMA ANALÍTICO

CONTENIDOS

- 1- Descripción y objetivos de la asignatura. Concepto de la Biotecnología vegetal. Relación con otras disciplinas.
- 2- El genoma vegetal. Composición. Tamaño. Secuencias repetidas. Organización. Elementos transponibles y transposones. Expresión génica en plantas
- 3- Métodos de cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales. Breve historia y antecedentes del cultivo vegetal *in vitro*. Concepto de cultivo *in vitro*. Totipotencia celular. Laboratorio: Infraestructura, equipos y materiales. Cabina de flujo laminar. Medios de cultivo. Composición y preparación. Medios sólidos y líquidos. Recipientes utilizados. Esterilización. Obtención, preparación y desinfección del material vegetal. Fuentes y tipos de explantos. Obtención de plantas en condiciones de asepsia. Tipos de incubación. Factores físicos.
- 4- Diferentes tipos de cultivo *in vitro*. Cultivo de callos y suspensiones celulares. Inducción, mantenimiento y subcultivo. Estabilidad genética. Variación somaclonal. Cultivo de raíces transformadas: Transformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes*, mecanismo de transformación. Obtención y mantenimiento de los cultivos. Principales características.
- 5- Aplicaciones de los cultivos *in vitro*. Potencial biosintético de los cultivos *in vitro*. Producción de metabolitos secundarios y enzimas. Biotransformaciones. Conservación de germoplasma. Micropropagación: principales conceptos, esquema general de la micropropagación, aplicaciones.

- 6- Plantas transgénicas. Concepto. Mejoramiento vegetal. Ventajas y desventajas de las técnicas tradicionales. Importancia en la agricultura y en la salud.
- 7- Transferencia de genes. Métodos de transformación mediada por vectores biológicos. *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes*. Vectores de cointegración y vectores binarios. Virus como vectores de genes. Inoculación en tallos, discos de hojas, infiltración de órganos florales, protoplastos. Genes de selección: nptII, bar. Genes reporteros: GUS, β -galactosidasa, luciferasa, GFP. Promotores constitutivos y tejido específicos. Métodos de transformación directa. Métodos químicos, Físicos. Electroporación. Microinyección, Biobalística.
- 8- Análisis de plantas transgénicas. Criterios de transformación. Pruebas físicas, fenotípicas y genotípicas.
- 9- Respuesta de la planta a estrés abióticos. Resistencia a frío y a altas temperaturas. Resistencia a salinidad y a sequía. Resistencia a estrés oxidativo.
- 10- Respuesta de la planta a estrés biótico. Resistencia a patógenos.
- 11- Manipulación genética a factores adversos. Resistencia a herbicidas. Resistencia a enfermedades fúngicas y bacterianas. Resistencia a insectos.
- 12- Manipulación del metabolismo secundario. Maduración de frutos. Producción de vitamina C. Durabilidad y pigmentación floral. Cambios en el contenido de lignina. Modificación del valor nutricional y propiedades para el consumo de los productos vegetales. Reloj circadiano.
- 13- Fitorremediación. Concepto. Terminología básica. Ventajas y desventajas. Remoción de compuestos orgánicos e inorgánicos. Fitoextracción de metales pesados. Remoción de pesticidas. Remoción de fenol y derivados clorofenólicos. Aplicación de cultivos in vitro como herramientas para procesos de fitorremediación de contaminantes. Impacto ambiental.
- 14- Biorreactores y las plantas como biorreactores.
- 15- Perspectivas de la Biotecnología vegetal. Problemas específicos. Impacto en el ambiente, en la industria y en la sociedad. Aspectos éticos del uso de plantas transgénicas. Patentes.

K. BIBLIOGRAFÍA

- Abiri R, Valdiani A, Maziah M, Shaharuddin NA, Sahebi M, Yusof ZN, Atabaki N, Talei D. (2016).** A Critical Review of the Concept of Transgenic Plants: Insights into Pharmaceutical Biotechnology and Molecular Farming. Curr. Issues Mol. Biol. 18: 21-42.
- Agostini E, Coniglio MS, Milrad SR, Tigier HA and Giulietti AM (2003).** Phytoremediation of 2,4- dichlorophenol by *Brassica napus* hairy root cultures. Biotech. and Applied Biochem. 37 (2) 139-144.
- Agostini, E.; Talano MA.; González PS., Wevar-Oller AL; Medina MI. (2011).** Phytoremediation of phenolic compounds: recent advances and perspectives. In “Handbook of phytoremediation”, Chapter 1, pp 1-50.F. Columbus Ed. Nova Science Publishers INC. New York. USA.
- Agostini, E; Talano MA; Gonzalez PS; Wevar- Oller AL; Medina MI. (2013).** Application of hairy roots for phytoremediation: what makes them an interesting tool for this purpose? Applied Microb. and Biotechnology. 97:1017–1030.
- Agostini, E. (2000).** Biotecnología vegetal: el cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos vegetales. Cuadernos de divulgación científica y tecnológica 1: Aplicaciones en el campo de la biotecnología. I.S.B.N.987-982-59-9-3. Páginas: 41-52. Editorial de la Fundación UNRC, Río Cuarto (Cba) Argentina.
- Aguilera P, Tachiquín MR, Munive MGR, Olvera BP, Cárdenas MEC (2010)** PCR en tiempo real.
- Alberts B, Johnson A; Lewis J, Morgan; Raff M; Roberts K; Walter P (2016).** Biología Molecular de la célula, 6ta Ed. Omega, Barcelona.
- Ali H; Khan E; Sajad MA. (2013)** Phytoremediation of heavy metals- concepts and applications. Chemosphere 91: 869-881.

Ansari, A.A., Gill, S.S., Gill, R., Lanza, G.R., Newman, L (2015) Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants, Volume 1. Springer BWF Books- Switzerland.

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. (2015). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. 2 nd Ed. American Society of Plant Physiologists. USA.

Curtis H, Barnes SN , Schnek A.; Massarini A. (2008) Biología, 7ma edic. española. Ed. Med. Panamericana.

da Conceição Gomes MA, Hauser-Davis RA, Nunes de Souza A, Vitória AP (2016) Metal phytoremediation: General strategies, genetically modified plants and applications in metal nanoparticle contamination. Ecotoxicology and Environmental Safety, (134) 133-147.

Dixon RA (1985) Isolation and Maintenance of Callus and Cell Suspension Cultures. En: Rickwood D y Hames BD eds, Plant Cell Culture, a practical approach. IRL Press, Oxford, Inglaterra, pág. 1-20.

Doran, P. M. (1997) Hairy roots: Culture and Applications. Hardwood Academic Publishers. Amsterdam, The Netherlands. ISBN: 90-5702-117-X

Feduchi Canosa E, Romero Magdalena C, Yáñez Conde E, Blasco Castiñeyra I, García-Hoz Jiménez C (2015) Bioquímica: Conceptos esenciales, 2da edición, Editorial Médica Panamericana. España.

Gao Y, Min Zhao, Xiao-HanWu, Da Li, Devajit Borthakur, Jian-HuiYe, Xin-QiangZheng & Lu JL (2019). Analysis of differentially expressed genes in tissues of *Camellia sinensis* during dedifferentiation and root redifferentiation. Scientific Reports. 9:2935.

Gerhardt KE, Gerwing PD, Greenberg BM. (2017) Opinion: Taking phytoremediation from proven technology to accepted practice. Plant Science 256: 170-185.

Green MR, Sambrook J (2012) Molecular Cloning: A Laboratory manual, 4th edition. Cold Spring Harbor. New York.

Hasanuzzaman M , Fujita M (2013). Heavy metals in the environment: current progress, toxic effects on plants and phytoremediation. En Phytotechnologies: remediation of environmental contaminants. Anjum NA; Pereira M.E.; Ahmad I; Duarte AC; Umar S; Khan N.A.eds. Cap 2: 7-74. CRC Press- Taylor and Francis Group, Boca Ratón, USA.

Hurtado D y Merino ME eds (1997). Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas, México.

Ibañez S.G.; Wevar Oller AL, Paisio C.E., Sosa Alderete LG; González PS, Medina MI, Agostini E. (2018). “The challenge of remediating metals using phytotechnologies”. En Heavy metals in the environment: Microorganisms and Bioremediation. CRC Press Taylor and Francis. Editor: Donati E. 370 pag.

Ibañez SG; Talano MA; Ontañón OM; Suman J; Macek T. Medina MI; Agostini E (2016) Transgenic plants and hairy roots: exploiting the potential of plant species to remediate contaminants. New Biotechnology 33 (5): 625-635.

Ibañez, S.G.; Paisio C.E. Wevar Oller AL, Talano MA, González PS, Medina MI, Agostini E (2015). Overview and New Insights of Genetically Engineered Plants for Improving Phytoremediation. En "Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants, Volume 1; Part II"- Chapter 8. Springer BWF Book 315747. Ansari, A.A., Gill, S.S., Gill, R., Lanza, G.R., Newman, L. (Eds.), Springer Int. Pub. Switzerland. ISBN 978-3-319-10394-5. 2015; pág 99-113.

Kamburova VS, Nikitina EV, Shermatov SE, Buriev ZT (2017) Genome Editing in Plants: An Overview of. Tools and Applications. International Journal of Agronomy, Article ID 7315351, 1-15.

Kotrba, P. (2013). Transgenic Approaches to Enhance Phytoremediation of Heavy Metal-Polluted Soils. Plant Based remediation Processes. Soil Biology 35: 239-271.

Kung S y Wu R. (1993). Transgenic Plants. vol 1 and vol 2. Academic press, Inc.

Kurien BT, Scofield RH (2012) Protein Electrophoresis. Methods and Protocols. Springer Protocols, Humana Press Ed. Londres.

Lee JW; Chan CTY; Slomovic S, Collins J.J. (2018) Next-generation biocontainment systems for engineered organisms Nature Chemical Biology , Vol 14: 530–537.

Levitus G, Echenique V; Rubinstein C; Hopp E.Mroginski L. (2010) Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ediciones INTA, 643Pag.

Lewin, B. (1998). Genes VI. Oxford University Press. USA.

Lodish HF, Berk A, Kaiser CA; Krieger M; Bretscher A; Ploegh H; Amon A; Scott MP (2016) Biología celular y Molecular 7ma ed. Editorial Médica Panamericana.

Ludwig-Müller JL; Xu J; Agostini E., Georgiev MI. (2014). Advances in Transformed Root Cultures for Root Biofactory and Phytoremediation Research. En: “Root Engineering, Soil Biology 40 (eds. Morte, A., Varma, A.), Springer, pp. 387-405.

Manuales de BIORAD para uso de Miniprotean III Electrophoresis Cell. Miniprotean II-2D Cell, Miniprotean II Tube Cell and Miniprotean II tube module.

Mc Cutcheon S.C. y Schnoor J.L (2003) Phytoremediation- Transformation and control of contaminants. Wiley Interscience Series – USA.

Olguín y Sanchez Galván (2012). Heavy metal removal in phytofiltration and phycoremediation: the need to differentiate between bioadsorption and bioaccumulation. New Biotechnol 30: 3-8.

Ouyang B; Gu X; Holford P (2017) Plant genetic engineering and biotechnology: a sustainable solution for future food security and industry. Plant Growth Regul. 83: 171–173

Papikian A., Wanlu Liu, Javier Gallego-Bartolomé & Steven E. Jacobsen (2019) Site-specific manipulation of *Arabidopsis* loci using CRISPR-Cas9 SunTag systems. *Nature communications* 10:729. www.nature.com/naturecommunications

Pierik RLM (1990) En: Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ediciones Mundiprensa, Madrid, España.

Potrykus F, Spangerberg, G. (1995). Gene transfer to plants. Springer lab Manual.

Ruf S, Forner J, Hasse C, Kroop X, Seeger S, Schollbach L, Schadach A and Bock R (2019) High-efficiency generation of fertile transplastomic *Arabidopsis* plants. *Nature Plants*, 5,282–289.

Sabbadini S, L. Capriotti , B. Molesini , T. Pandolfni, O. Navacchi, C. Limera, A. Ricci & B. Mezzetti (2019) Comparison of regeneration capacity and *Agrobacterium* mediated cell transformation efficiency of different cultivars and rootstocks of *Vitis* spp. via organogenesis. *Nature Scientific Reports* 9:582.

Sanagala R, Moola AK, Bollipo Diana RK (2017) A review on advanced methods in plant gene targeting. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 15: 317–321

Sosa Alderete L.G., Ibáñez S.G., Agostini E., Medina M.I. (2012). Phytoremediation of Phenol at pilot scale by tobacco hairy roots”. *Int. J. of Environm. Sciences* 3 (1): 398-407. ISSN: 0976-4402.

Sosa Alderete, LG; Guido ME; Agostini E.; Mas P. (2018) Identification and characterization of key circadian clock genes of tobacco hairy roots: putative regulatory role in xenobiotic metabolism. *Env Sci Poll. Res.* 25(2):1597-1608.

Stephenson FH (2012) La reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) Cap. 9. Cálculo en Biología Molecular y Biotecnología. 2da edición. Elsevier. España. pp 211-311.

Taiz, L y Zeiger E. (2010). Plant Physiology. 5 th ed. Sinauer Associates, Inc., publishers. USA.

Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C (2013) Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en Salud* 2: 70-78.

Van Eck J (2018) Genome editing and plant transformation of Solanaceous food crops. *Curr. Opinion in Biotechnology*, 49: 35–41.

vanPelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP (2010) Principles and technical aspects of PCR Amplification, Springer ISBN 978-90-481-7579-6.

Vázquez-Nuñez E, Peña-Castro JM., Fernández-Luqueño F, Cejudo E, de la Rosa-Alvarez MG., García-Castañeda MC. (2018) A Review on Genetically Modified Plants Designed to Phytoremediate Polluted Soils: Biochemical Responses and International Regulation. *Pedosphere* 28(5): 697-712.

Verma V., Ravindran P., Kumar P.P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology* 16: 86.

Walker JM (2009) The Protein Protocols Handbook, 3rd edition. Detailed theory and laboratory protocols for a range of electrophoretic techniques and blotting procedures. New York, Humana Press

Walker JM, Rapley R (2008) Molecular Biomethods Handbook, 2nd edn. Totowa, NJ: Humana Press.

Wang L, Yu Du, Md. Mahbubur Rahman, BiaoTang, Li-Juan Fan & Aruna Kilaru (2018) Establishment of an efficient *in vitro* propagation system for *Iris sanguinea*. *Nature Scientific Reports* 8:17100. DOI:10.1038/s41598-018-35281-y.

Wani, S.H., Kumar V., Shriram V., Kumar S.S. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal* 4: 162-176.

Watson JD, Baker, TA, Bell, SP, Gann A, Levine M, Losick R (2016) Biología molecular del Gen. 7ma edición. Editorial Médica Panamericana. España.

Xu, Y. (2010) Molecular Plant Breeding. CAB International, UK.