



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

MORFOGÉNESIS *in vitro* Y TRANSFORMACIÓN  
TRANSITORIA DE *Phalaenopsis zuma's pixie*

Tesis que presenta

BLANCA ESTELA MORENO LARA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción

Biotecnología

Mérida, Yucatán Agosto del 2011



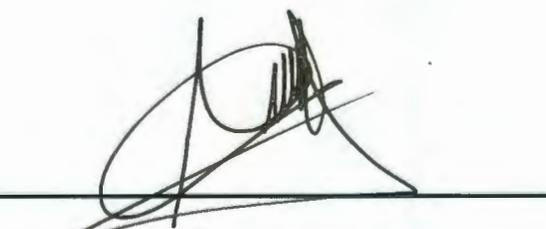


## RECONOCIMIENTO



Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado *Morfogénesis in vitro y transformación transitoria de Phalaenopsis zuma's pixie* fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del (los) Drs. Andrew James Kay y la Dra. Rosa María Gracia Medrano, dentro de la Opción Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



---

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

Mérida, Yucatán, México; a 03 de Agosto de 2011

### DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_



Blanca Estela Moreno Lara

## **Agradecimientos:**

Agradezco al Centro de Investigación Científica de Yucatán por las instalaciones prestadas.

A la beca conacyt otorgada No. 32442

A mis asesores la Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán y el Dr. Andrew James Kay de la unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Al Dr. Gregorio Godoy de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán el por la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*.

Al Dr. Santy Peraza de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán por el plásmido pCAMBIA 1305.1.

A mis revisores de tesis, la Dra. Sara Luz Nahuat Dzib del Tecnológico de Mérida, Dra. Guadalupe López Puc del Ciatej Unidad sureste, y al Dr. Gregorio Godoy.

A la Dra. Cecilia Rodriguez por todos sus consejos y apoyo durante mi estancia en el CICY

Al M.C. Miguel Tzec, por todo su apoyo

A la MC Elidé Avilés, por su apoyo en la parte de laboratorio.

A la M.C. Nuvia Kantún, M.C. Leticia Peraza, M.C. Robero Kú y Q.F.B Rosa Grijalva por sus consejos y apoyo.

A la Lic. Gilma Michell, por su apoyo en la parte administrativa.

A mis amigos de la maestría Anita, Miguel, Abril, Muhi, Frank, Erika que siempre estuvieron para apoyarme.

## ***Dedicatoria:***

*Principalmente a Dios que me ha dado la fuerza y el coraje para salir adelante, así como también ha puesto en mi camino a gente con experiencia para que me brinden sus consejos y soporte.*

*A mis padres por su esfuerzo durante mi educación académica.*

*A mis hermanos por su apoyo y cariño.*

*A mi familia que me ha dado su apoyo y ha estado en momentos difíciles de mi vida.*

*A Omar que estuvo a mi lado y me brindó su apoyo.*

## ÍNDICE

	Pagina
Índice de figuras.....	iv
Índice de Cuadros.....	vii
Lista de abreviaturas.....	viii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
1.- INTRODUCCIÓN.....	3
1.1.-ANTECEDENTES.....	5
1.1.1-ORQUÍDEAS.....	5
1.1.2- <i>Phalaenopsis</i> .....	6
1.1.3.- IMPORTANCIA Y COMERCIALIZACIÓN.....	8
1.1.4.- PROPAGACIÓN DE ORQUÍDEAS .....	12
1.1.5.- TÉCNICAS DE CULTIVO <i>in vitro</i> .....	13
1.1.6.- MORFOGÉNESIS <i>in vitro</i> .....	13
1.1.6.1.- TIPOS DE MORFOGÉNESIS .....	13
1.1.6.2. - TOTIPOTENCIA CELULAR .....	14
1.1.6.3.-ORGANOGENÉNESIS .....	15
1.1.6.4.- EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA (ES) .....	15
1.1.7.- TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS .....	30
1.1.7.1.- MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN .....	31
1.1.7.2.- TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	31
1.1.7.3.- RECONOCIMIENTO DE LAS CÉLULAS VEGETALES COMO ANFITRIÓN POR <i>Agrobacterium</i> .....	33
1.1.7.4.- EXPRESIÓN DE LOS GENES VIR DE <i>Agrobacterium</i> .....	33
1.1.7.5.- SITIOS DE ENTRADA DE <i>Agrobacterium</i> EN LA PLANTA .....	34
1.1.7.6.- ADHESIÓN DE <i>Agrobacterium</i> A LA CÉLULA HOSPEDERA.....	35
1.1.7.7.- SECRECIÓN DEL ADN-T Y PROTEÍNAS VIR DE <i>Agrobacterium</i> DENTRO DE LA CÉLULA DE LA PLANTA .....	35

1.1.7.8.- IMPORTACIÓN DE LOS FACTORES VIR DE <i>Agrobacterium</i> A LAS CÉLULAS HOSPEDERAS.....	36
1.1.7.9.- ENTRADA DE FACTORES DE <i>Agrobacterium</i> A LA CÉLULA DEL HOSPEDERO.....	37
1.1.7.10.- TRANSPORTE NUCLEAR DEL COMPLEJO ADN-T .....	37
1.1.7.11.- INTEGRACIÓN DEL COMPLEJO ADN-T EN EL NÚCLEO .....	38
1.1.7.8.- VARIABLES QUE PERMITEN EFICIENTIZAR LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN PLANTAS .....	41
1.1.9.- TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN ORQUÍDEAS .....	42
1.1.10.- EXPLANTES UTILIZADOS PARA LA TRANSFORMACIÓN.....	42
1.2.- HIPÓTESIS.....	45
1.3.- JUSTIFICACIÓN .....	45
1.4.- OBJETIVOS.....	46
1.4.1.- OBJETIVO GENERAL.....	46
1.4.2. - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
1.5. - ESTRATEGIA EXPERIMENTAL: .....	47
1.6. – REFERENCIAS.....	48
2.- INTRODUCCIÓN.....	63
2.1.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	64
2.1.1.-PROPAGACIÓN <i>in vitro</i> de <i>Phalaenopsis zuma's pixie</i> .....	64
2.1.2.-SELECCIÓN DEL EXPLANTE.....	64
2.1.3.- INDUCCIÓN DE ORGANOGÉNESIS Y EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	65
2.1.4.- DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	66
2.1.5. - HISTOLOGÍA DE LA MORFOGÉNESIS.....	67
2.1.6.- REGENERACIÓN DE LAS PLANTAS .....	67
2.2. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	69
2.2.1.- PROPAGACIÓN .....	69
2.2.2. - EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA.....	70
2.2.3.- ORGANOGÉNESIS <i>in vitro</i> .....	73
2.2.4. – HISTOLOGÍA.....	76
2.2.5.- REGENERACIÓN DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES SOMÁTICOS Y/O BROTES.....	77
2.3. - CONCLUSIONES .....	78

2.4. - REFERENCIAS.....	79
3.- INTRODUCCIÓN .....	81
3.1.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	83
3.1.1.- MATERIAL VEGETAL .....	83
3.1.2.- CEPA BACTERIANA .....	83
3.1.3.- TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA BACTERIANA.....	85
3.1.5.- TRANSFORMACIÓN DE <i>Phalaenopsis zuma's pixie</i> .....	86
3.1.6.- ENSAYO DE GUS .....	89
3.1.7.- EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE INFECCIÓN .....	90
3.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
3.2.1. -TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA LBA4404 MEDIANTE ELECTROPORACIÓN. ....	91
3.2.2.- DETECCIÓN DE INTEGRACIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR.....	92
3.2.3.- PRUEBA HISTOQUÍMICA DE GUS .....	93
3.2.4.- EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE INFECCIÓN .....	94
3.3. - CONCLUSIONES .....	97
3.4. - REFERENCIAS.....	98
4.-DISCUSIÓN.....	101
4.1.- CONCLUSIONES.....	103
4.2. - REFERENCIAS .....	104
ANEXOS.....	107

## INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1.1. <i>Phalaenopsis zuma's pixie</i> .....	9
Figura 1.2.- Una hipótesis sobre la inducción de embriogénesis somática en células vegetales diferenciadas. Diferenciación celular determinada genéticamente y su desarrollo inhibe o permite la expresión del potencial embriogénico dependiendo del genotipo, el estado de desarrollo y el tipo de tejido. Presentando este potencial las células responden a señales específicas, como desequilibrio de auxinas y estrés que pueden dar lugar a la liberación de la represión por medio de cromatina de desarrollo embriogénico. El programa embriogénico de producto en una forma de autorregulación en condiciones fisiológicas permisivas garantizar la producción autótrofa de auxinas y polaridad (Fehér, 2008).....	18
Figura 1.3.-Estadios de embriogénesis en dicotiledóneas y monocotiledóneas (George <i>et al.</i> , 2008).....	19
Figura 1.4.- Representación esquemática de varios genes identificados que influyen a la embriogénesis somática en plantas superiores (Chugh y Khurana, 2002).....	21
Figura 1.5.- Información general de la interacción <i>Agrobacterium</i> –planta. 1. Señales inducidas en la Planta, 2. Activación de VirA/G, y, 3. Síntesis del ADN-T y expresión de genes <i>vir</i> en <i>Agrobacterium</i> . 4. A través de un sistema de secreción bacteriano tipo IV (T4SS) el ADN-T y las proteínas Vir son transferidas a la célula de la planta para ensamblar el complejo de proteínas de ADN-T/Vir. 5. El complejo ADN-T es importado al núcleo de la célula huésped en la cual 6. Pasa a ser integrado en los cromosomas del hospedero mediante recombinación ilegítima (Pitzscheke y Heribert, 2010).....	32
Figura 1.6. Estrategia experimental.....	47
Figura 2.1. Plántula de <i>Phalaenopsis zuma's pixie</i> de seis meses de edad.....	64
Figura 2.2. Hoja de <i>Phalaenopsis</i> a) parte apical; b) parte media y c) parte basal.....	65

Figura 2.3.- Etapas del desarrollo de <i>Phalaenopsis zuma pixie</i> , mediante organogénesis directa, tiempo estimado del desarrollo de <i>Phalaenopsis zuma pixie</i> 9 meses.....	68
Figura 2.4. Propagación de <i>Phalaenopsis zuma's pixie</i> (a) y (b) Brotes adventicios, y (c) propagación del material vegetal.....	69
Figura 2.5. Embriogénesis somática directa sobre tejido foliar de <i>Phalaenopsis zuma's pixie</i> , a) pequeños embriones a los 30 días de cultivo <i>in vitro</i> en presencia de TDZ, b) embriones a los 60 días de cultivo de tejido.....	71
Figura 2.6. Organogénesis de <i>Phalaenopsis zuma's pixie</i> a) explante con organogénesis directa e indirecta, b) organogénesis directa con 5 µM de BAP y c) formación de callo no embriogénico.....	74
Figura 2.7. Cortes histológicos de <i>P. zuma's pixie</i> . a) Formación de células embriogénicas en la epidermis en oscuridad 40X, b) formación de pro-embriones 10X, c) embrión globular (eg) 40 X y d) formación de diferentes embriones, en la parte superior se puede ver la formación de un embrión globular, en la parte inferior izquierda se logra observar la formación de un pro- embrión (pe), dentro de otro embrión 10X.....	76
Figura 2.8. Inducción de Embriogénesis somática de <i>Phalaenopsis zuma's pixie</i> (a) Hojas seccionadas en parte apical, media y basal, (b) Inducción a los 70 días, (c) respuesta a los 70 días, (d) la regeneración a partir de embriones y (e) el enraizamiento.....	77
Figura 3.1. Vector binario pCAMBIA 1305.1.....	84
Figura 3.2. Tratamiento en medio MS con cefatoxima para eliminar el exceso de bacteria.....	88
Figura 3.3. Curva de sensibilidad de <i>P. zuma's pixie</i> hacia higromicina y kanamicina.....	89
Figura 3.4. Crecimiento de <i>A. tumefaciens</i> a diferentes concentraciones de kanamicina a) Blanco; b) 50 mg/L y c) 100 mg/L.....	91
Figura 3.5. PCR de <i>A. tumefaciens</i> transformadas: 1) Se amplificó un fragmento del gen de higromicina con el tamaño de 0.59 kb 1) Control positivo (plásmido pCAMBIA 1305.1), 2-4 LBA4404+pCAMBIA 1305.1, 5) Control negativo.....	92

Figura 3.6. Explantes de hojas de *Phalaenopsis zuma's pixie* a 4 días después de co-cultivo con *A. tumefaciens*.....93

---

**ÍNDICE DE CUADROS**

	<b>Página</b>
Cuadro 1.1. Comercialización de <i>Phalaenopsis</i> .....	7
Cuadro 2.1. Concentraciones de citocininas sintéticas para evaluar la morfogénesis de <i>Phalaenopsis zuma's pixie</i> .....	60
Cuadro 2.2.-Efecto del TDZ en la formación de embriones somáticos sobre tejido foliar de <i>Phalaenopsis zuma's pixie</i> . El porcentaje de explantes que formaron embriones, % E, y el número promedio de embriones por explante, # ES, se analizó a los 60 días de iniciado el cultivo. Promedio de tres experimentos independientes, con un total de 135 explantes foliares, los valores con la misma letra no difieren significativamente a una $P \leq 0.05$ (Duncan, 1955).....	66
Cuadro 2.3.-Efecto del BAP en la regeneración de brotes sobre tejido foliar de <i>Phalaenopsis zuma's pixie</i> . El porcentaje de explantes que formaron brotes, % E, y el número promedio de brotes por explante, # ES, se analizó a los 60 días de iniciado el cultivo. Promedio de tres experimentos independientes, con un total de 135 explantes foliares, los valores con la misma letra no difieren significativamente a una $P \leq 0.05$ (Duncan, 1955).....	69
Cuadro 3.1. Tratamientos (T) en utilizados en el proceso de transformación de <i>P. zuma's pixie</i> con co-cultivo. T1 sin papel filtro a una $DO_{600nm}$ de 0.2; T2 sobre papel filtro y $DO_{600nm}$ de 0.2; T3 sin papel filtro y una $DO_{600nm}$ de 0.5 y T4 sobre papel filtro y una $DO_{600nm}$ de 0.5.....	81
Cuadro 3.2. Tratamiento 1 co-cultivo <i>Phalaenopsis zuma's pixie</i> con <i>A. tumefaciens</i> a una concentración de 0.2 $DO_{600nm}$ sin papel filtro.....	88
Cuadro 3.3. Tratamiento 2 co-cultivo sobre papel filtro <i>Phalaenopsis zuma's pixie</i> con <i>A. tumefaciens</i> con a una concentración de 0.2 $DO_{600nm}$ .....	89
Cuadro 3.4. Tratamiento 3, co-cultivo <i>Phalaenopsis zuma's pixie</i> con <i>A. tumefaciens</i> a una concentración de 0.5 $DO_{600nm}$ sin papel filtro.....	89
Cuadro 3.5. Tratamiento 4, co-cultivo sobre papel filtro <i>Phalaenopsis zuma's pixie</i> con <i>A. tumefaciens</i> a una concentración de 0.5 $DO_{600nm}$ .....	85

## CLAVE DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido indolacético
ANA	Ácido naftalenacético
APS	Ácido periódico-Schiff
AS	Acetosiringona
BAP	6 –Bencilaminopurina
CKs	citocininas
EG	Embrión globular
ES	Embriogénesis somática
IBA	Ácido Indol 3-butírico
GA3	Ácido giberélico
GUS	$\beta$ -glucuronidasa
MS	Murashige y Skoog
mM	Milimolar
$\mu$ M	Micromolar
NR	No respuesta
PE	Pro-embrión
PLBs	Cuerpos parecidos a protocormos
PTH	Higromicina fosfotransferasa
Ti	Inducción a tumor
TDZ	Thidiazuron
SS	Cadena sencilla
X-Gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil beta-D- ácido glucurónico ciclohexil sal de amonio
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético



## RESUMEN

Se desarrolló un protocolo de morfogénesis *in vitro* para la orquídea comercial de *Phalaenopsis zuma's pixie*. Los factores evaluados fueron dos diferentes citocininas; thidiazuron (TDZ) y 6-Bencilaminopurina (BAP) ambas con las siguientes concentraciones 2.5, 5.0, 10.0, 12.5  $\mu\text{M}$ . Los explantes consistieron en tejido foliar dividido en parte basal, media y apical, en medio Murashigue y Skoog (MS) a la mitad de la concentración de las sales, suplementado con vitaminas. Los resultados en la inducción a embriogénesis somática se observó que el medio MS suplementado con 5 y 10  $\mu\text{M}$  de TDZ mostraron un 100 por ciento de explantes con respuesta, sin embargo en la cantidad de embriones somáticos por explante, la parte apical mostro siempre una respuesta mayor que las otras secciones de la hoja, la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de TDZ resulto con un mayor número siendo 8.3 embriones somáticos por explante. En la inducción de embriogénesis somática con BAP fue casi nula, por lo cual no se toma en consideración. La organogénesis se observó en presencia de BAP en el medio MS, esta presento al igual que con TDZ, la mayor respuesta en la zona apical de la hoja, dando el 100 por ciento de los explantes brotes la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de BAP, presento 5.6 brotes por explantes en la zona apical, mientras que en presencia de 2.5 y 12.5  $\mu\text{M}$  de BAP, la producción de brotes fue mínima.

En el caso de transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* se tomaron explantes de hoja, brotes y embriones somáticos, los explantes fueron co-cultivados 3 días en oscuridad con la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* que contenía el plásmido pCAMBIA 1305.1, con dos concentraciones diferentes 0.2 y 0.5  $\text{DO}_{600\text{nm}}$ , posteriormente se eliminó el exceso de bacteria con cefatoxima 100mg/L, y se dejaron incubando en medio MS Murashige y Skoog, se tomaron 30 explantes a los 5, 10 y 15 días, el tratamiento número dos (concentración bacteriana de 0.2  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  y papel filtro) presento una mayor eficiencia de transformación en los explantes de callo y foliar, mientras que para los embriones somáticos se observó que con una concentración bacteriana de 0.5  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  y sin papel filtro .

Palabras clave: *Phalaenopsis zuma's pixie*, *Agrobacterium tumefaciens*, embriogénesis somática.

## ABSTRACT

A protocol to optimize the induction of somatic embryogenesis (SE), shoot organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*- mediated genetic transformation of SEs in the commercial orchid 'Phalaenopsis 'Zuma's Pixie' was developed. Two different plant growth regulators, the cytokinins thidiazuron (TDZ) and 6-benzylaminopurine (BAP) were evaluated at the following concentrations: 2.5, 5.0, 10.0, and 12.5  $\mu\text{M}$ . The optimum explant source was evaluated using the basal, middle, and apical portions of leaf tissue. The basal media consisted of half the concentration of Murashige and Skoog salts (MS) supplemented with vitamins and 3 % sucrose. Results indicated that MS medium supplemented with 5 and 10  $\mu\text{M}$  of TDZ always resulted in a response regardless of explant source; however, for the optimum number of somatic embryos per explant, the apical portion of the leaf always showed a greater response than the other sections of the leaf. The optimum level of TDZ was 10  $\mu\text{M}$  which induced a mean of 8.3 somatic embryos per explants; response to BAP was very low for SE (mean of <1.0 per explant) in all explants; however for shoot organogenesis there was no significant difference between BAP and TDZ, the apical zone of the leaf always giving a 100% response. A concentration of 10  $\mu\text{M}$  BAP gave a mean of 5.6 shoots per apical explants whilst for 2.5 and 12.5  $\mu\text{M}$  of BAP, shoot production was minimal (<1.0 per explant).

For *Agrobacterium tumefaciens* – mediated genetic transformation, in vitro produced leaves, undifferentiated callus and somatic embryos were co-cultured for 3 days in the dark with strain LBA4404 of *A. tumefaciens* containing the pCAMBIA 1305.1 plasmid. Two different levels of *A. tumefaciens* at 0.2 and 0.5  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  were tested and the excess bacteria were removed with 100 mg/L Cefatoxime and incubated in MS medium. Thirty explants were taken for analysis at 5, 10 and 15 days incubation. The optimal 0.2  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  of bacterial concentration with the use of filter paper gave a higher transformation efficiency for callus and leaf explants, however the optimum response for SEs was found to be a bacterial concentration of 0.5  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  and without filter paper .

Keywords: *Phalaenopsis* Zuma's Pixie, *Agrobacterium tumefaciens*, somatic embryogenesis.

## 1.- INTRODUCCIÓN

La palabra "orquídea" (del latín *orchis*, que a su vez deriva del griego) significa "testículo" y hace alusión a los pseudobulbos de algunas especies (Freuler, 2006). La familia Orchidaceae comprende alrededor de 25 000 especies y son consideradas como las más vendidas entre las ornamentales. Las orquídeas se cultivan de forma comercial como flores de corte y plantas en maceta. Las flores son fascinantes y hermosas con colores desconcertantes, sus formas y tamaños, la persistencia de flores hasta la perfección y sus semillas tienen habilidades para viajar largas distancias, por lo anterior ocupan el primer lugar entre los principales 10 tipos de flores cortadas en el mercado internacional. Las orquídeas ocupan el 8% del comercio global de floricultura que tiene un valor mayor a \$40 billones de dólares (Martin y Madassery, 2006).

La propagación vegetativa convencional se enfrenta a la tasa de multiplicación lenta, y no provee suficientes clones dentro de un corto tiempo. La propagación *in vitro* de orquídeas como una opción para la propagación rápida de cultivares comercialmente valiosos ha progresado bien durante las últimas décadas. La micropropagación de orquídeas usando diferentes explantes de plántulas o plantas maduras han sido reportadas en *Paphiopedilum* (Huang *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004), *Phalaenopsis* (Takana, 1992; Lin *et al.*, 2000), *Dendrobium* (Arditti *et al.*, 1973; Martin *et al.*, 2005), *Cattleya* (Fu, 1979), *Oncidium* (Chen y Chang, 2000), *Cymbidium* (Vij *et al.*, 1994; Nayak *et al.*, 1997), *Aerides maculosum* (Murthy and Pyati, 2001) y *Vanda coerulea* (Malabadi *et al.*, 2004).

El cultivo de tejidos de plantas, incluye todos los aspectos del cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos, que por lo general su éxito depende en relación a la inclusión de reguladores del crecimiento de plantas y/o otros activos requeridos (vitaminas), en el medio (Gamborg *et al.*, 1979). En el área de comportamiento de células, temas tales como la citología, nutrición, cultivo celular de metabolitos primarios y secundarios, morfogénesis (incluyendo xilogénesis, organogénesis y embriogénesis somática) y patología han sido estudiados durante casi 50 años (Thorpe, 1990). Los métodos *in vitro* se están utilizando cada vez más como un complemento a los métodos tradicionales de

cultivo para la modificación y mejoramiento de plantas desde 1960. Más recientemente, el uso de métodos de transferencia de genes en vectores independientes y vectores dependientes está jugando un papel importante en la modificación de plantas (Gaspar *et al.*, 1996).

La transformación genética de plantas tiene como objetivo, incorporar genes exógenos en los cromosomas de la(s) planta(s) de interés, y cambiar sus rasgos genotípicos que se manifiestan fenotípicamente como producto de la expresión de los genes exógenos introducidos, y/o la sub-expresión o supresión de la expresión de genes endógenos debido a la interrupción de éstos. Esto es, el ADN exógeno adicional al integrarse al cromosoma puede interrumpir un gen e impedir su expresión y generar así un alelo nulo. Lo cual puede conllevar a la creación de un homocigótico por "knock-out", haciendo que la copia del gen no sea activa o no se transcriba. Este es un método poderoso para investigar directamente la importancia y la función de un gen (Lewin, 2004). Debido a que las orquídeas padecen de enfermedades derivadas de patógenos como hongos (ej. *Colletotrichum* que causa antracnosis), bacterias (ej. *Erwinia* provoca pudrición blanda en los bulbos) o virus (ej. Virus de mosaico de cymbidium (CymMV) que provoca manchas en las hojas); la transformación genética se presenta como una herramienta de gran utilidad para la introducción de genes para su mejoramiento genético proporcionándole resistencia a uno o varios patógenos o así mismo nos ofrece la oportunidad de explotar cualidades de las orquídeas que le dan el valor comercial a fin de que se pueda mejorar el color, olor o tamaño de la planta.

## 1.1.-ANTECEDENTES

### 1.1.1-ORQUÍDEAS

Forman parte de las monocotiledóneas y constituyen una de las familias más numerosas. De acuerdo a un cálculo se estima que la familia *Orchidaceae* incluye a 800 géneros y 25, 000 especies (Stewart y Griffiths 1995) distribuidas en todo el mundo. México cuenta con alrededor de 1, 200 especies. Presentan diversas formas, tamaños y colores. Su diversidad es amplia, por ser un grupo muy joven en la evolución de las plantas, presentan gran facilidad para obtener híbridos exitosos no solamente entre especies del mismo género, sino también intergenéricos, estimándose que existen alrededor de 100, 000 híbridos registrados. En el caso de los híbridos que se obtienen de manera artificial mediante el cruzamiento de individuos de un mismo género o de géneros afines, como sucede en orquídeas, la descendencia tendrá características particulares intermedias a los progenitores (Freuler, 2006). Estas plantas ornamentales de amplia distribución, son cultivadas por sus flores hermosas y son de importancia económica como el género *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Cattleya*, etc. Además de su valor ornamental, las orquídeas también son bien conocidas por su uso especialmente en la medicina tradicional.

### 1.1.2- *Phalaenopsis*

*Phalaenopsis* es un género epífita descrito por Karl L. Blume en 1750. Se divide en 2 conjuntos: *Euphalaenopsis* que incluye aquellas especies cuyos pétalos son notoriamente más anchos que los sépalos ej. *Phalaenopsis schilleriana*, *Phalaenopsis amabilis*, etc. y cuya floración se produce entre mediados de invierno a fines de primavera. El otro conjunto es *Stauroglottis*, el tamaño de los pétalos y sépalos son semejantes. En ella se encuentran comprendidas *Phalaenopsis violacea*, *Phalaenopsis amboinensis*, etc., y florecen principalmente en época estival.

Están distribuidas por todo el sudeste Asiático con unas pocas especies extendidas desde Taiwán, Sikkim a Australia y el Pacífico (Teob, 1989). Este género representa uno de los grupos de orquídeas más apreciados por el colorido y la duración de sus flores. A diferencia de otras especies de orquídeas, la forma de reproducción es difícil, ya que su crecimiento monopodial lento ha dificultado la multiplicación vegetativa de materiales selectos y la reproducción sexual se ha visto agravada en algunos híbridos por la presencia de altos niveles de esterilidad (Gil, 1987).

Todas las *Phalaenopsis* (con excepción de la especie tetraploide, *Phalaenopsis buyssoniana*) tienen 38 cromosomas ( $2n=38$ ) (Woodard 1951, Shindo y Kamemoto 1963, Christenson, 2001). Sin embargo, el número de cromosomas de la subtribu Aeridinar (con solo unas pocas especies tetraploides y hexaploides) es consistente con la de *Phalaenopsis* (Christenson 2001). La cruce entre las especies de *Phalaenopsis* y otro género cercano, es decir *Aerides*, *Arachnis*, *Ascocentrum*, *Doritis*, *Neofinetia*, *Renanthera*, *Rhynchostylis*, *Vanda*, y *Vandopsis* también muestran algún grado de fertilidad (Sweet 1980).

En la mayoría de las orquídeas, la inflorescencia consiste en un eje que lleva flores individuales a lo largo de su longitud. El eje se divide en dos regiones: el pedúnculo, que va desde el tallo hasta el punto de la flor más baja; el raquis, es la parte del eje que contiene las flores.

En general la flor más antigua se encuentra más cerca de la base del eje y las flores son progresivamente más jóvenes a lo largo del eje hacia la punta de la inflorescencia. Las flores son zoomórficas (simetría sobre un solo plano) en la naturaleza.

El tamaño de las flores puede ir desde pocos centímetros hasta 20 cm de ancho. Incluso dentro de un género, su tamaño, forma color varían considerablemente. Florecen 2 ó 3 veces al año dependiendo de su cultivo, su floración puede durar hasta 30 días (Arditti, 1992). Sus flores aparecen en la base de las hojas, en lados alternados y casi siempre ramificadas. El racimo aparece del tallo que surge entre las hojas y florece en todo su esplendor durante varias semanas. Las flores constan de 3 sépalos similares a los pétalos, 3 pétalos con uno de ellos, el inferior, distinto, que forma el llamado labelo y en medio de ellos está la columna (fusión de los estambres y pistilos).

El crecimiento de una inflorescencia de orquídeas varía considerablemente. Evidentemente, el radio de crecimiento depende en las condiciones de cultivo y ambientales. Se considera aproximadamente de 30 días la vida de las flores de *Phalaenopsis* Arditti (1992).

### 1.1.3.- IMPORTANCIA Y COMERCIALIZACIÓN

El cultivo de orquídeas inició desde hace mucho tiempo, mientras han transcurrido los años este cultivo ha ido evolucionando desde la producción tomada como pasatiempo a un mercado comercial alto. La tendencia es cultivar orquídeas como maceteros y como flores de corte a gran escala. En años anteriores los productores y coleccionistas recolectaban especies de orquídeas silvestres, debido a que no estaba disponible una técnica de reproducción, mejoramiento y selección. El descubrimiento y desarrollo del método para germinar semillas de orquídeas fue en el año 1921 por Lewis Knudson. La disponibilidad de germinación de las orquídeas y el cultivo de tejidos ha hecho que las orquídeas se cultiven a gran escala y de forma económicamente factibles. Hoy en día las orquídeas como *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis* y *Oncidium* son comercializadas globalmente y la industria de las orquídeas ha contribuido sustentablemente a la economía de muchos países.

La producción en maceta de *Phalaenopsis* ha aumentado enormemente en los últimos años, y representa más del 75% de todas las orquídeas que se venden, Cuadro 1.1, (American Orchid Society, 2000). En el año 2000, la venta de orquídeas fue de casi \$ 100.000.000 dólares siendo superada tan solo por *Poinsettia*. Durante los últimos cinco años la venta de orquídeas ha ido en aumento, a diferencia de todos los demás cultivos ornamentales como crisantemos, rosas y violetas africanas (Griesbach, 2002).

En años recientes más de 18,000 híbridos han sido producidos para su cultivo y explotación comercial, utilizándose muchos de ellos como parentales para su mejoramiento por sus atractivas características ornamentales. Sin embargo, aún existe la necesidad de mejorar rasgos específicos en las orquídeas, tales como resistencia a diversos tipos de estrés abióticos y bióticos (Liao *et al.*, 2004). Por ende, a pesar de que se han desarrollado protocolos de cultivo *in vitro* que incluyen la embriogénesis somática, por ejemplo, en *Phalaenopsis* (Tanaka *et al.*, 1975; Arditti y Ernst, 1993; Tokuhara y Mii, 1993, 2001; Ernst, 1994; Chen y Piluek, 1995; Duan *et al.*, 1996; Ishii *et al.*, 1998; Islam y Ichihashi, 1999; Young *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002; Chen y Chang, 2006), aún falta

mucho trabajo por hacer para considerar estos protocolos los más eficientes, incluso entre las numerosas especies comerciales de orquídeas con las que se ha trabajado entre las que destacan *Cymbidium* (Huan *et al.*, 2004); *Oncidium* (Chen y Chang, 2000); *Phalaenopsis* (Tokuhara y Mii, 2001), y las de aun mayor importancia como *Cattleya*, *Oncidium*, *Dendrobium*, *Cymbidium*, *Vanda*, *Phalaenopsis*, *Paphiopedilum*, *Miltonia* (Pinske, 2004).

En la mayoría de los casos resultado del vigor híbrido, los híbridos presentan mayor resistencia que los progenitores, por lo que son los que más se producen y comercializan. Un ejemplo de di-híbrido con valor comercial es *Phalaenopsis zuma's pixie* (Figura 1.1), el cual pertenece a la Familia: Orchidaceae, género: *Phalaenopsis*, el cual es producto de la cruce entre el híbrido *Phalaenopsis Carmela's Pixie* con la especie *Phalaenopsis equestris*, obtenido por la empresa estadounidense Zuma Canyon; en 1992 (<http://davesgarden.com>).



Figura 1.1. *Phalaenopsis zuma's pixie*

*Phalaenopsis equestris*, una especie nativa de Filipinas, y es uno de los progenitores más importante en la producción de híbridos de maceta. Hasta el momento no se ha desarrollado un mapa genético de *Phalaenopsis* sin embargo mediante marcadores moleculares como microsatelites (SSR) y Polimorfismo en la longitud de

fragmentos amplificados del ADN(AFLP) se han logrado detectar genes similares a los que intervienen en la biosíntesis de antocianinas mediante la aplicación de este conocimiento podrían desarrollarse nuevas variedades con colores innovadores, así como la identificación de los genes *AGAMOUS (AG)* (Gao *et al.*, 2003 in: Gawenda y Debener 2009) y *FLOWERING LOCUS (FT)* Y *TWIN SISTER OF FT (TSF)* (Yeoh *et al.*, 2011) los cuales permitirán modificar fenotípicamente a la planta y permitirá desarrollar nuevas técnicas de transformación.

Cuadro 1.1. Forma de comercialización de *Phalaenopsis*.

Orquídea	Forma de comercialización	País	Costo de venta al público (M/N)	Fuente
<i>Phalaenopsis</i> Amarilla	Planta entera	México	300	<a href="http://articulo.mercadolibre.com.mx/">http://articulo.mercadolibre.com.mx/</a> 17-09-2009
<i>Phalaenopsis</i> <i>lueddemanniana</i>	Planta entera	México	170	<a href="http://articulo.mercadolibre.com.mx/">http://articulo.mercadolibre.com.mx/</a> 17-09-2009
<i>Phalaenopsis</i> <i>amboinensis</i> (tipo amarillo)	Planta entera	España	166.	<a href="mailto:info@floradeltropico.com">info@floradeltropico.com</a> 17-09-2009
<i>Phalaenopsis</i> <i>chibae</i>	Planta entera	España	277	<a href="mailto:info@floradeltropico.com">info@floradeltropico.com</a> 17-09-2009
<i>Phalaenopsis</i> <i>cornu-cervi</i> forma roja	Planta entera	España	166	<a href="mailto:info@floradeltropico.com">info@floradeltropico.com</a> 17-09-2009
<i>Dendrobium</i> <i>Phalaenopsis</i>	Planta entera	Argentina	151	<a href="http://www.olx.com.ar/">www.olx.com.ar/</a> 17-09-2009
<i>Phalaenopsis</i> <i>zuma's pixie</i>	Planta entera	USA	192	<a href="http://www.orchidsupplies.net/">http://www.orchidsupplies.net/</a> 17-09-2009
<i>Phalaenopsis</i> Tiffany Coll	Frasco	Quebec	600	<a href="http://www.bedfordorchids.com/">http://www.bedfordorchids.com/</a> 17-09-2009

#### 1.1.4.- PROPAGACIÓN DE ORQUÍDEAS

Las plantas se pueden propagar a través de dos formas; la sexual o la asexual. En el ciclo sexual las nuevas plantas surgen después de la fusión de los gametos parentales y se desarrollan a partir de embriones cigóticos dentro de semillas o frutos. En la mayoría de los casos, las semillas serán variables y cada una representará una nueva combinación de genes, provocada durante la formación de gametos (meiosis) y su fusión sexual. Por el contrario, en el ciclo vegetativo (asexual) las características únicas de cualquier planta individual seleccionada para la propagación (denominada la planta madre, el "stock" de la planta) se perpetúan porque, durante la división celular (mitosis), los genes se copian exactamente en cada división. En la mayoría de los casos, cada nueva planta producida por este método se puede considerar que es una extensión de la línea de células somáticas de un individuo. Un grupo de dichas plantas reproducidas asexualmente se denomina un clon. En el entorno natural la reproducción sexual y asexual tienen ventajas selectivas apropiadas de acuerdo con la etapa de la evolución de diferentes tipos de plantas (George *et al.*, 1993).

Muchas plantas de importancia comercial son desarrolladas vegetativamente y desarrolladas como clones. Un gran número de plantas ornamentales herbáceas y leñosas también se propagan por estos medios. Estas técnicas tradicionales de "macropropagación" que utilizan comparativamente grandes piezas de plantas, han sido refinadas y mejoradas por la horticultura moderna.

La propagación vegetativa por las técnicas tradicionales o por el cultivo de tejidos *in vitro*, no solamente depende de las especies de planta, sino también del desarrollo de técnicas, los costos relativos y del objetivo.

La selección de un método de propagación para cualquier planta está limitada por su potencial genético. Por ejemplo, algunas plantas fácilmente producen brotes en sus raíces, mientras que otras no; por lo que tratar de propagar tanto *in vitro* como *in vivo* una planta, que no tiene esta capacidad de regeneración, podría ser problemático.

### 1.1.5.- TÉCNICAS DE CULTIVO *in vitro*

Entre las limitantes del cultivo de orquídeas se destacan, la lentitud de los procesos de germinación, crecimiento vegetativo y reproductivo. Desde la siembra hasta la obtención de una flor, podría pasar entre 3 y 5 años, dependiendo de las condiciones agroclimáticas específicas que se presenten. Por lo tanto preexiste la necesidad disminuir este periodo (Rodríguez *et al.*, 2005). Así mismo se han desarrollado varias formas de propagación clonal *in vitro* de *Phalaenopsis*, dentro de las cuales podemos citar: la formación de embriones somáticos y PLBs (cuerpos tipo protocormos, por sus siglas en inglés) a partir de tejidos como: hojas, ápices radicales, ápices de vástagos, secciones de ejes florales y callos, para su posterior regeneración de plantas (Tirado *et al.* 2005).

### 1.1.6.- MORFOGÉNESIS *in vitro*

La embriogénesis somática y la organogénesis son dos procesos morfogénicos muy frecuentes en el cultivo *in vitro* de especies vegetales. La embriogénesis somática es el proceso por el cual se obtiene una estructura similar al embrión cigótico sin que medie la fertilización de los gametos, mientras que por organogénesis pueden obtenerse tallos y raíces. Estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de células que, según las condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división.

#### 1.1.6.1.- TIPOS DE MORFOGÉNESIS

Bajo condiciones de cultivo *in vitro*, las células somáticas pueden regenerar embriones, brotes o raíces como respuesta a un determinado estímulo. La regeneración es un proceso que comprende diferentes fases que se suceden de manera similar para los dos tipos de morfogénesis como fase de adquisición de la competencia, fase de inducción y fase de realización.

En la primera fase las células no responden al estímulo organogénico, pero adquieren esa competencia durante una fase de desdiferenciación. En la segunda fase o

fase de inducción, las células son receptivas al estímulo morfogénico y hay una relación directa entre el tipo, concentración y combinación de reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo y el órgano a desarrollar. En la fase de realización, la célula sufre las sucesivas divisiones para formar el órgano determinado (De Klerk *et al.*, 1997).

A partir de diferentes explantes cultivados *in vitro* en condiciones adecuadas, puede inducirse la formación de nuevos órganos de manera directa sin la formación de callo. Si la formación es de brotes o de raíces, se denomina organogénesis directa, si en cambio se induce la formación de embriones somáticos, este proceso se denominará embriogénesis directa. Si por el contrario, a partir de la siembra de un explante *in vitro* se observa la proliferación de células en forma desordenada (desdiferenciación) y sin ninguna función predeterminada, dando así la producción de callos o suspensiones celulares (Hicks., 1980).

#### 1.1.6.2. - TOTIPOTENCIA CELULAR

La totipotencia de una célula se refiere a que toda la información genética necesaria para el crecimiento y reproducción del organismo está contenido en la célula, aunque en teoría todas las células son totipotenciales, y particularmente la condición de las células meristemáticas son las más capaces para expresarla (Razdan, 2003).

Esta totipotencia es una de las principales propiedades de las células vegetales, que aseguran la posibilidad de sobrevivencia de las plantas bajo diferentes condiciones ambientales. La totipotencia de las células vegetales garantiza un amplio uso de la biotecnología. En condiciones *in vitro*, prácticamente cualquier célula, aun las diferenciadas son capaces de retornar (des-diferenciarse) a un estado basal meristemático, ello se logra bajo la influencia de reguladores de crecimiento exógenos en un medio de cultivo adecuado, que estimula el inicio de la división celular y la proliferación de las células hasta formar callos y/o suspensiones celulares, e iniciar la formación de brotes o raíces, o embriogénesis somática. Estudios reciente han logrado detectar que los genes que controlan el desarrollo vegetal *in vivo* juegan un papel principal en la expresión de la totipotencia de las células vegetales *in vitro* (Ezhova, 2003).

### 1.1.6.3.-ORGANOGENESIS

La organogénesis *in vitro* puede darse directamente de yemas axilares preexistentes o bien mediante la formación de *novo* de estructuras adventicias (brotes raíces) a partir de tejido diferenciado no meristemáticos. La obtención de estos brotes puede ser de manera directa o indirecta. En la primera se pueden formar brotes en el explante, sin la formación de callo. La segunda se refiere a la inducción de callos a partir de los cuales se desarrollan brotes y raíces. La organogénesis *in vitro* ha sido ampliamente usada en la biotecnología vegetal tanto para la micropropagación, transformación genética y estudios del desarrollo vegetal (Zhang y Lemaux, 2004).

La organogénesis *in vitro* depende de la aplicación exógena de fitohormonas, en particular el balance auxinas: citocinina es primordial para el tipo de respuesta buscada, y ello se relaciona con la concentración endógena de estos en el tejido utilizado como explante y su habilidad a responder a los estímulos hormonales durante el cultivo (Zhang y Lemaux, 2004). La mayor proporción auxina:citocinina en el medio, normalmente induce a la formación de raíces, mientras que una proporción menor de auxina:citocinina promueve la formación directa de brotes.

En general, se reconocen tres fases de la organogénesis; en la primera, las células del explante adquieren la competencia. En la segunda, las células competentes son canalizadas y determinadas para la formación de un órgano específico bajo la influencia de fitohormona vegetales, y en la tercera la morfogénesis continua independiente del suministro de fitofitohormona (Sugiyama, 2000).

### 1.1.6.4.- EMBRIOGENESIS SOMÁTICA (ES)

Un embrión somático es un individuo que se origina de una célula somática (Haccius, 1978), y cuya estructura va a presentar al igual que el embrión cigótico un eje con extremos definidos manifestando una bipolaridad.

En los últimos años, desde el punto de vista biotecnológico se apuesta por la embriogénesis somática, ya que presenta ventajas como un elevado potencial de

multiplicación, la posibilidad de su cultivo en biorreactores (Etienne y Berthouly 2004), la opción de aplicar técnicas de encapsulación para fabricar semillas sintéticas (Aquea *et al.*, 2008) y la utilización de los cultivos embriogénicos como dianas para la transformación genética (Charity *et al.*, 2005). Además, el tejido embriogénico puede ser crioconservado, manteniendo su potencialidad mientras se realizan los ensayos de progerie (Park 2002). La combinación de estas dos técnicas, crioconservación y embriogénesis somática, es la que ha posibilitado el desarrollo clonal de alto valor (Weng *et al.*, 2010).

Las células somáticas vegetales no son terminalmente diferenciadas y pueden por tanto recuperar su totipotencia para retornar a un estado meristemático e iniciar el desarrollo de embriones en condiciones adecuadas. Aunque este fenómeno es conocido por más de 50 años, los detalles son aún en gran parte desconocidos, no sabemos por qué ciertos genotipos, explantes o células son más propicios para la embriogénesis somática que otros. Tampoco se sabe por qué tantas condiciones diferentes pueden utilizarse para iniciar la embriogénesis somática y cuáles son los pasos moleculares clave en todos los casos (Fehér, 2008).

La regeneración de plantas a través de embriogénesis somática incluye cinco pasos:

1. Inducción de la competencia embriogénica, por medio del cual el explante primario en medio de cultivo complementado con reguladores de crecimiento, principalmente auxinas y/o citocininas, dependiente del genotipo.
2. Proliferación de cultivos embriogénicos en medio semisólidos o líquido complementado con reguladores de crecimiento, de manera similar a la inducción.
3. Pre-maduración de embriones somáticos en medio reduciendo el regulador de crecimiento a  $\frac{1}{4}$  o sin este; ello inhibe la proliferación y estimula la diferenciación de embriones somáticos y su desarrollo temprano.
4. Maduración de embriones somáticos, ello se logra cultivando los proembriones en medio cultivo adicionado con ABA y/o bien reducción del potencial osmótico.
5. La regeneración de plantas en medio sin reguladores de crecimiento, o con bajas concentraciones de auxina: citocinina, ello depende del genotipo (George *et al.* 2008).

Se cree, que aunque todas las células de las plantas tienen la capacidad de encaminarse hacia la embriogénesis, la expresión de esta característica, la adquisición de la competencia embriogénica, depende de circunstancias determinados principalmente por el estado fisiológico de la célula del explante, ya que está determina su desarrollo y condición genética y respuesta a señales ambientales. Así, el potencial embriogénico genéticamente determinado puede permitir la expresión de competencia embriogénica en condiciones adecuadas que darán lugar a la iniciación del desarrollo del embrión en respuesta a una señal sólo cuando las condiciones fisiológicas sean favorables (*Figura 1.2*). Esta interacción compleja de factores genéticos y fisiológicos puede explicar por qué sólo ciertos genotipos y ciertas células pueden ir a través de todo el proceso de embriogénesis somática.

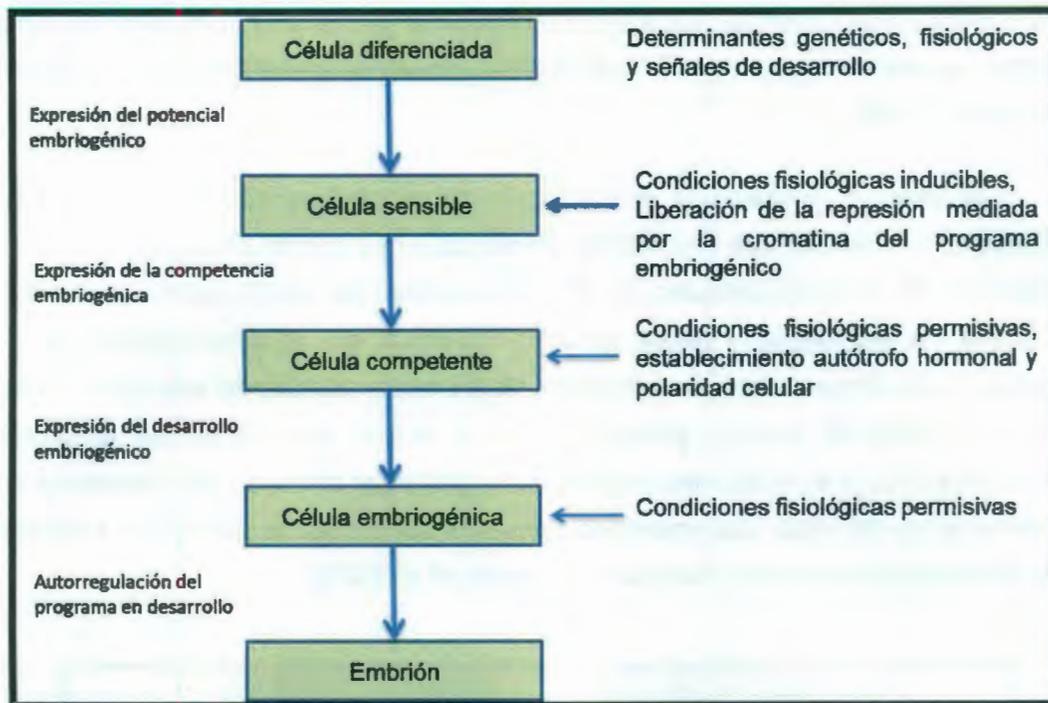


Figura 1.2.- Una hipótesis sobre la inducción de embriogénesis somática en células vegetales diferenciadas. La diferenciación celular, determinada genéticamente y por el estado fisiológico de la célula, impide o permite la expresión del potencial embriogénico dependiendo del genotipo, el estadio de desarrollo y el tipo de tejido. Las células que muestran este potencial son responsivas a señales específicas, tales como el desequilibrio de auxinas y el estrés que puede resultar en la supresión de la represión del desarrollo embriogénico mediada por la cromatina. El programa embriogénico producto de la autorregulación bajo condiciones fisiológicas permisivas garantiza el establecimiento de la autotrofia de auxinas y su polaridad (Fehér, 2008).

Cada embrión somático pasa por estadios similares de desarrollo que aquellos procedentes de la embriogénesis cigótica (Dodds y Roberts, 1982), y pueden iniciarse de poblaciones de células de tejidos del esporofito o del gametofito (Williams y Maheswaran, 1986). Los estadios de desarrollo comunes para ambos procesos embriogénicos (somático y sexual) son por lo general la etapa globular, la etapa de corazón (que en las monocotiledóneas corresponde a la etapa escutelar) y la etapa de torpedo en dicotiledóneas (Zimmerman, 1993). En la embriogénesis cigótica se tiene al cigoto antes

de la etapa globular, mientras que en la embriogénesis somática se tiene una sola célula somática, la cual muestra su patrón embriónico desde su primera división (Williams y Maheswaran, 1986).

Los estadios comparativos de embriogénesis somática entre monocotiledóneas y dicotiledóneas muestran que hay ciertas diferencias entre ambos procesos, *Figura 1.3*; por ejemplo, en el estadio globular, los embriones somáticos son fácilmente confundidos con brotes meristemáticos, y puede ser difícil identificar qué la embriogénesis se está llevando a cabo. Sin embargo, los embriones de las monocotiledóneas dan lugar a brotes discretos a partir de cuerpos globulares, que a medida que crecen, se desarrollan estructuras similares a un escutelo y coleóptilo, a diferencia de los brotes adventicios que forman un grupo de hojas. Los embriones sometidos desarrollan un polo apical y radicular y son discontinuos con el callo subyacente (George *et al.* 2008).

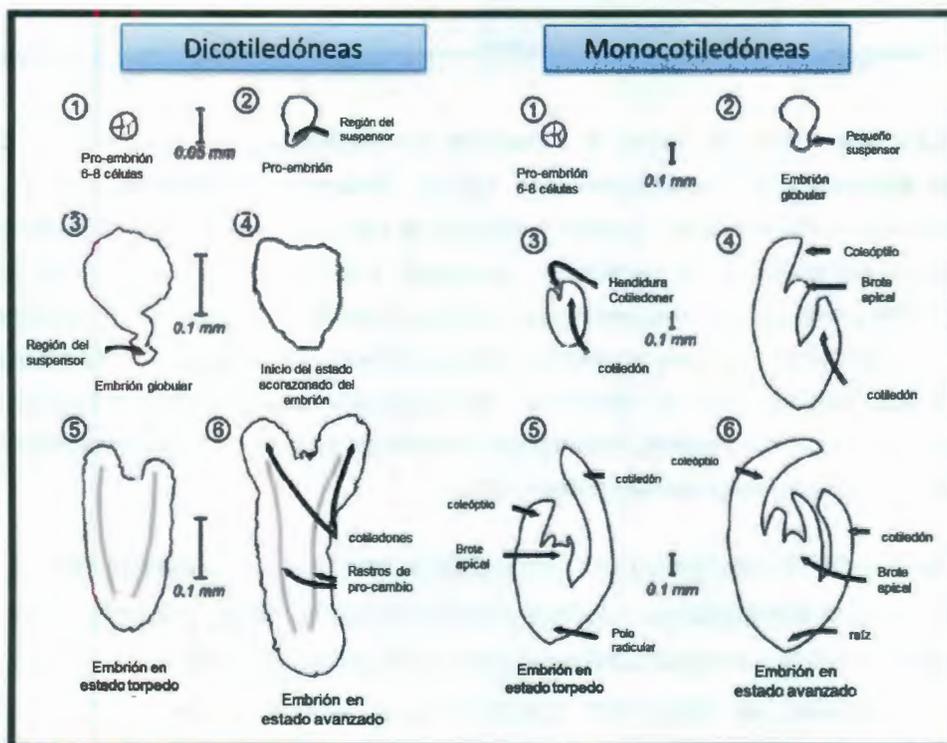


Figura 1.3.-Estadios de embriogénesis en dicotiledóneas y monocotiledóneas (George *et al.* 2008).

Se ha observado que el contenido de auxinas y de nitrógeno en el medio de cultivo son generalmente dos de los factores más importantes en la inducción de la embriogénesis somática (Dodds y Roberts, 1982). De igual importancia es la concentración endógena de fitohormonas en el explante, ya que ello influye en la capacidad embriogénica (Carman, 1990). Existen evidencias de que las concentraciones externas de auxinas o el balance auxinas/citocininas en el cultivo primario de cultivo, es crítico para la inducción de la actividad mitótica y para la predeterminación epigenética de las células involucradas en el desarrollo embriogénico (Evans *et al.*, 1981). En la mayoría de los casos el regulador de crecimiento con acción de auxina 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) es usado en la inducción de la embriogénesis somática, pero no es el único compuesto utilizado (Toonen y De Vries, 1996).

Durante la embriogénesis somática la reestructuración del desarrollo de las células somáticas hacia la vía embriogénica constituye la base de la totipotencialidad celular en las plantas (Raghavan, 2000). Este cambio del desarrollo implica la expresión diferencial de genes que confieren a las células somáticas la capacidad de manifestar el potencial embriogénico. Así en su conjunto el proceso involucra una plétora de sucesos moleculares que abarca no sólo la expresión diferencial de genes, sino las diversas rutas de transducción de señales encaminadas a activar/reprimir numerosos conjuntos de genes, muchos de los cuales están por ser identificado y caracterizado.

La caracterización de genes durante el desarrollo embrionario, la maduración y la germinación ha permitido la identificación de distintos clases de genes (Dure III 1985; Goldberg *et al.*, 1989). Estos genes pueden ser divididos en 5 clases principales de la siguiente manera:

- Clase 1: expresados constitutivamente cuyos productos están presentes en todos los estados y su función es requerida durante el crecimiento normal de la planta. Estos genes tienen funciones de mantenimiento esenciales para muchas células vegetales, incluyendo a los del embrión.
- Clase 2: específicos del embrión cuya expresión está restringida al embrión propiamente, y finaliza antes o con la germinación.

#### **1.1.6.5.8.- FACTORES QUE AFECTAN LOS PROCESOS MORFOGÉNICOS**

Para optimizar la frecuencia y calidad de la embriogénesis somática así como la inducción de la organogénesis, es necesario considerar factores intrínsecos y extrínsecos del explante. Los intrínsecos incluyen el genotipo, el estadio de desarrollo de la planta donadora, el tipo y estado fisiológico del explante. Los extrínsecos comprenden el entorno del medio de cultivo, el suministro de nutrimentos orgánicos e inorgánicos, fitohormonas, y las condiciones físicas, como el pH, humedad, temperatura y potencial osmótico (Ramage y Williams, 2002).

#### **1.1.6.5.9.- EL GENOTIPO**

Uno de los factores que más influye en la respuesta a la morfogénesis *in vitro* es el genotipo. Algunas especies o cultivares regeneran brotes o producen embriones somáticos con una estimulación exógena relativamente pequeña, mientras que en otros casos es más difícil promover el estímulo morfogénico. Incluso, dentro de la misma especie existen notables diferencias entre subespecies, variedades y/o cultivares, por lo que la formulación de un simple medio de cultivo que es adecuada para un cultivar, frecuentemente es inadecuada para la estimulación de morfogénesis en otro cultivar. Así hay especies de ciertas familias que son particularmente difíciles de regenerar ya sea por vía embriogénica u organogénica (Ramage y Williams, 2002).

#### **1.1.6.5.10.-EL EXPLANTE**

La edad fisiológica del explante es de gran influencia en la morfogénesis, por ello cuanto más joven e indiferenciado sea éste, mejor será su respuesta *in vitro*. En consecuencia, los meristemos apicales y axilares se usan ampliamente en numerosas especies (Taji *et al.*, 2002).

Respecto al tamaño del explante, cuanto más grande sea éste, mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos; sin embargo, también aumentan las posibilidades de contaminación por microorganismos. Es necesario tener en cuenta que existe un tamaño mínimo del explante, que depende de la

especie y del objetivo que se persiga, por debajo del cual no es fácil lograr el establecimiento de los cultivos. Los explantes muy pequeños suelen requerir del empleo de medios de cultivos complejos (Taji *et al.*, 2002).

La época del año es un factor que suele tener efecto sobre la respuesta a la micropropagación y que generalmente se asocia con el grado de dormancia que presentan ciertos explantes y la posibilidad de mayor o menos proliferación de microorganismos (Molina *et al.*, 2002).

#### **1.1.6.5.11.-AMBIENTE QUÍMICO: MEDIO DE CULTIVO Y SUS COMPONENTES**

El éxito de cultivos de tejidos depende, en gran medida, del medio de cultivo utilizado. El medio de cultivo no solo debe proporcionar los macro y micronutrientes, sino una fuente de carbohidratos, normalmente sacarosa, para reemplazar el carbón que fijan las plantas de la atmósfera por la fotosíntesis. Los mejores resultados se obtienen adicionando algunos compuestos orgánicos (vitaminas, aminoácidos, etc.) y fitofitohormona (Williams, 1993).

Murashige (1962), estableció que los principales componentes del medio de cultivo pueden agruparse en: (1) sales inorgánicas, (2) sustancias orgánicas, (3) compuestos no definidos de origen natural, y (4) materiales inertes de soporte. Por su parte, Gamborg (2002) considero que los ingredientes de un medio nutritivo comprende 5 grupos: nutrientes inorgánicos, fuente de carbono, vitaminas, reguladores de crecimiento y suplementos orgánicos.

Son varias las variables que determinan el éxito del establecimiento de un cultivo *in vitro*. Entre las variables pueden mencionarse: la importancia del establecimiento de un cultivo estéril, la concentración y balance de los reguladores vegetales usados (auxinas-citocininas) balance que permite "dirigir" en cierta medida diferentes respuestas morfológicas y el desarrollo del tejido (Robles, 1996).

#### 1.1.6.5.12.-MACRONUTRIENTES

Los macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg y S) proporcionan los elementos más indispensables para el desarrollo de las plantas y constituyen al menos el 0.1% del peso de la materia seca de las plantas. El paso más importante en el manejo de un medio de cultivo es la selección de estos iones su concentración y balance (George y Sherrington, 1984).

Comúnmente el N se suministra como una mezcla de iones nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). En forma de iones amonio éste se puede incorporar directamente a las macromoléculas, mientras que los nitratos deben ser reducidos antes de su incorporación. En concentraciones elevadas, los iones amonio pueden ser tóxicos y ocasionar la acidificación del medio, además de causar problemas de vitrificación. Por otra parte, el fósforo normalmente se suministra como ion fosfato y altas concentraciones pueden producir la precipitación de elementos en fosfatos insolubles (Gamborg 2002).

#### 1.1.6.5.13.-MICRONUTRIENTES

Los elementos hierro, magnesio, zinc, cobre, molibdeno, yodo, boro, cobalto y níquel son requeridos en pequeñas cantidades para el desarrollo de las plantas y actúan como cofactores e inductores de la síntesis de enzimas. El hierro se agrega al medio de cultivo como sustratos de hierro, combinado con el ácido etilendiaminotetracético (EDTA). El complejo EDTA-Fe permite la liberación lenta y continua de este elemento al medio, sin este complejo el hierro puede precipitarse como óxido de hierro (Gamborg 2002).

#### 1.1.6.5.14.-VITAMINAS Y MINERALES

Las vitaminas son compuestos químicos requeridos por las células vegetales para realizar papeles catalíticos en el metabolismo. De manera natural, las plantas son capaces de sintetizar sus propios requerimientos, pero bajo condiciones heterotróficas de cultivo *in vitro* no necesariamente ocurre así (George y Sherrington, 1984). Generalmente, la cantidad de las vitaminas sintetizadas, incluso en tejidos y células fotosintéticas activos, son insuficientes para asegurar el suministro. Por lo tanto, las vitaminas del grupo B como

tiamina, piridoxina y ácido pantoténico, así como también la biotina y mio-inositol, deben adicionarse al medio de cultivo (Razdan, 2003).

El ácido ascórbico (vitamina C) es benéfico en algunos casos, debido probablemente a su capacidad para actuar como un agente reductor y para retrasar la formación y oxidación de compuestos fenólicos, que inhiben el crecimiento (Stasolla, *et al.*, 2006).

Los aminoácidos abastecen a las células vegetales con una fuente de N disponible rápidamente y su absorción es más rápida que el N inorgánico del mismo medio. Al parecer no todos los aminoácidos son importantes para el desarrollo de tejidos *in vitro* y los requerimientos varían de acuerdo al tejido u órgano. El aminoácido más utilizado es la glicina pero su inclusión no es esencial. La caseína hidrolizada se puede emplear como una fuente económica de una mezcla de aminoácidos. También en algunos casos se puede utilizar la arginina, la asparagina, el ácido aspártico, la alanina, el ácido glutámico y la prolina (Gamborg 2002).

#### **1.1.6.5.15.-FUENTE DE CARBONO**

La fuente de carbono es un componente importante en cualquier medio de cultivo y es esencial para el desarrollo heterotrófico del material vegetal *in vitro*, ya que las condiciones de cultivo son poco apropiadas para la fotosíntesis. La sacarosa como fuente de carbono, es fácilmente asimilable por las células vegetales, ya que se transporta de manera natural, y es relativamente estable además de ser económica, por lo tanto, es la más comúnmente utilizada. No obstante pueden emplearse otros carbohidratos como glucosa, maltosa, galactosa y sorbitol (Razdan, 2003).

#### **1.1.6.5.16.-AGENTES GELIFICANTES**

Los medios de cultivo pueden manejarse en forma líquida o semisólida, dependiendo del objetivo que se persiga. La condición semisólida del medio se logra adicionándole agar (producido a partir de algas marinas), que es el gelificante más comúnmente empleado (Gamborg 2002).

El agar disuelto forma un gel capaz de retener el agua y adsorber compuestos. Si la concentración de agar se incrementa, resulta más difícil para los explantes establecer

contacto con los componentes del medio, lo cual limita su absorción. El tipo y la concentración de agentes gelificantes pueden afectar sustancialmente la efectividad de varios sistemas de cultivo de tejidos (Gamborg 2002).

#### **1.1.6.5.17.-REGULACIÓN HORMONAL DE LA MORFOGÉNESIS *in vitro***

En el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, la manipulación eficiente de la morfogénesis depende en gran medida del uso apropiado de reguladores de crecimiento (Jiménez, 2005). Los estudios sobre la función de los reguladores de crecimiento llegan a ser complejos debido a que varios de ellos típicamente actúan de forma conjunta con otras y sus concentraciones en la planta cambian con el tiempo, estación y etapa de desarrollo. Algunos reguladores de crecimiento son sintetizados localmente por las células para su propio consumo, mientras que otros son sintetizados en un órgano y transportados a otras partes de la planta para una acción específica. Los reguladores de crecimiento se producen en las plantas, pero se han identificado versiones naturales y sintéticas de estos que se suministran comúnmente a cultivos de células y tejidos (Jiménez, 2005).

La adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo induce la respuesta que se desea de los tejidos vegetales. Los diferentes análogos de fitohormonas tienen diversos efectos dependiendo de la estructura química, tejido vegetal y genotipo. Algunas veces es necesario mezclar varios reguladores de crecimiento o dar tratamientos secuenciales con estos para obtener los resultados deseados. Existen cinco principales grupos de reguladores de crecimiento endógenos: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido ascórbico y etileno. La mayoría de estos grupos tienen múltiples funciones en el desarrollo vegetal y se emplean para manipular la morfogénesis en el cultivo de tejidos vegetales (Jiménez, 2005).

#### **1.1.6.5.18.-AUXINAS**

Las auxinas modulan diversos procesos del crecimiento y desarrollo de la planta, tales como: respuestas trópicas a la luz y a la gravedad, arquitectura del tallo y de la raíz,

desarrollo de órganos y sistema vascular y determinación del eje apical-basal en las células y en la totalidad de la planta (Normanly *et al.*, 2005).

Los ensayos sobre la actividad de estos compuestos se hallan entre los más antiguos dentro del campo de la fisiología vegetal (Woodward y Bartel 2005). Fruto de estos ensayos se descubrió el ácido indol-3-acético (IAA). Este compuesto es ubicuo en los tejidos vegetales, y activo a concentraciones nanomolares (Pěnčík *et al.*, 2009). Se han descubierto otros compuestos naturales con actividad auxínica, aunque parece que esta depende de la posibilidad de que sean transformados por el tejido en IAA (Barceló *et al.*, 2005). El ácido indol-3-butírico (IBA), es también una auxina indólica. Pese a que en un principio se creyó que era un compuesto sintético, posteriormente detecto en tejidos vegetales (Bartel *et al.*, 2001). Esta auxina ha demostrado ser más efectiva en la inducción de raíces laterales tanto *in vitro* como *ex vitro*, y es empleada a nivel comercial con este propósito (Zolman *et al.*, 2000).

En este sentido, se han comercializado y se usan habitualmente en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales dos compuestos sintéticos con gran actividad auxínica: el ácido 1-naftalenacético (NAA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Woodward y Bartel 2005).

#### 1.1.6.5.19.-CITOCININAS

Las citocininas (CCs) son un grupo de reguladores de crecimiento implicadas en el control del desarrollo de las plantas (Nóvak *et al.*, 2008). Desde su descubrimiento (Miller *et al.*, 1955) se ha demostrado su participación diversos procesos fisiológicos como la senescencia foliar, la movilización de nutrientes, la dominancia apical, la formación y actividad de los meristemos del ápice caulinar, el desarrollo floral, la ruptura de la dormición de las yemas, el control de los estomas, la formación de cloroplastos y la germinación de semillas (Mok *et al.*, 2000; Rivero *et al.*, 2009). Además, regulan muchos procesos celulares, destacando el control de la división celular (Kyoizuka 2007).

Las CCs naturales que se producen en los tejidos vegetales son diversas, aceptándose la presencia de dos grupos químicos: los conformados a base de adenina y los que son a base de fenilureas.

Las CCs derivados de la adenina con una cadena lateral o sustituyente unida al grupo amino 6 del anillo purínico, puede ser de naturaleza isoprenoide o aromática (Mok y Mok 2001; Segura, 2000). La trans-zeatina (tZ) es un ejemplo de una CC isoprenoide, es la CC más abundante en los tejidos vegetales. La abundancia de otras CCs isoprenoides como la N6-isopenteniladenina (iP), la cis-zeatina (cZ) o la dehidrozeatina (DHZ) varía según la especie (Voller *et al.*, 2010).

Mientras que las CCs isoprenoides son ubicuas en las plantas, las CCs aromáticas representadas por la citocinina, N6 -benciladenina (BA), y sus derivadas hidroxilados, las Topolinas solo han sido identificadas en un limitado grupo de taxones (Strnad *et al.*, 1997). Las CCs pueden encontrarse en las plantas como bases libre o formando conjugados con diversos compuestos químicos que se unen al anillo de purina en su cadena lateral. Las principales formas conjugadas son los ribósidos, los ribonucleótidos y los glucósidos (Sakakibara, 2006). La aplicación exógena de CCs solas o en combinación con auxinas para la regeneración *in vitro* de tallos adventicios ha sido ampliamente descrita tanto en angiospermas (Moncaleán *et al.*, 2001; Lu 2002) como en gimnospermas (Mata Rosas *et al.*, 2001; Sul y Korban 2005). Pero la morfogénesis *in vitro* implica complejos mecanismos de regulación, que incluyen tanto a los reguladores de crecimiento aplicados exógenamente como a los presentes en los propios tejidos vegetales (Auer *et al.*, 1999; Fehér *et al.*, 2003).

En el caso de CCs del segundo grupo, a base de fenilureas, destaca la presencia de la Difenilurea y algunos derivados de ésta, casos puntuales de moléculas como Forclorfenurón (CPPU) o Thidiazurón (TDZ).

El TDZ es uno de los sustitutos de urea estudiados por su actividad citocinina y se considera el más potente de las difenilureas que se han evaluado para su uso en el cultivo de tejidos vegetales. Concentraciones bajas del orden de <1 µM pueden inducir la producción de yemas axilares más que otras citocininas, pero puede inhibir el alargamiento, para evitar esto es necesario transferir los brotes a un medio de cultivo que contenga bajas concentraciones de TDZ y/o una citocinina menos activa (Gamborg 2002).

Las concentraciones mayores a  $1\mu\text{M}$  pueden estimular la formación de callos, brotes adventicios e incluso embriones somáticos. El principal efecto no deseado del TDZ es la formación de brotes fasciados en algunas especies (Tomsome *et al.*, 2004).

En las orquídeas se ha reportado la inducción de la embriogénesis somática con citocininas, como en *Dendrobium* (Chung *et al.*, 2005), *Phalaenopsis* (Kuo *et al.*, 2005); (Chen *et al.*, 2005), *Oncidium* (Chen *et al.*, 1999); (Chen y Chan 2001), y *Cymbidium* (Huan *et al.*, 2004), entre otras, y ha sido considerada un sistema satisfactorio de propagación en estas, además de que proporciona un sistema modelo para estudiar la fisiología y morfología del desarrollo temprano de estas (Zimmerman, 1993) y para la obtención de plantas transgénicas.

La combinación de ambas técnicas, organogénesis y embriogénesis somática *in vitro*, ayudaría a mejorar la rentabilidad de determinados procesos como en el caso de la multiplicación de plántulas por organogénesis y la clonación de estas por embriogénesis somática, que incrementarían el número de clones generados (Kim *et al.*, 2009; Siva *et al.*, 2009). Asimismo, la combinación de vías de propagación *in vitro* puede posibilitar el desarrollo de procesos de otra manera inviables. Un ejemplo en este sentido sería la aplicación de tratamientos organogénicos para revigorizar el material vegetal como paso previo a la inducción embriogénica en tejido adulto de angiospermas (San-José *et al.*, 2010).

### 1.1.7.- TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS

Esto puede ser definido como la transferencia de genes extraños de organismos (plantas, virus, bacterias, o animales) dentro de un nuevo material genético. En plantas la transformación exitosa requiere la obtención de plantas normales y fértiles que expresen los genes insertados. El proceso de inserción implica distintas etapas como inserción, integración, expresión y heredabilidad del nuevo ADN (Webb y Morris, 1992). La mayoría de las plantas transgénicas, han sido obtenidas usando dos métodos generales: la transformación mediada por *Agrobacterium* y la transferencia directa de ADN, esta última involucra métodos como bombardeo por partículas, la microinyección y la electroporación (Fisk y Dandekar, 1993). La transformación puede ser indirecta o mediada por agentes biológicos virus o bacterias en especial *Agrobacterium*. Este sistema de transformación es específico de plantas, principalmente dicotiledóneas, y a pesar de tener limitaciones en su uso es el que más éxitos ha propiciado.

La ingeniería genética de orquídeas ofrece una efectiva vía para la obtención de nuevos cultivares resistentes a enfermedades y en consecuencia se disminuiría el uso de fungicidas, y bactericidas los cuales son tóxicos en mayor o menor grado. Las orquídeas se ven amenazadas por diferentes patógenos como virus, bacterias, hongos y en muchas ocasiones infectadas por insectos. Uno de los casos más graves para las plantas de ornato es el que presentan *Colletotrichum* sp., el cual provoca antracnosis, esto induce al desprendimiento de hojas hasta que la planta muere (Cabrera, 2002). En los últimos 10 años, se han reportado muchos trabajos de transformación genética para *Dendrobium* (Kuehnle y Sugii, 1992; Men *et al.*, 2003), *Cymbidium* (Yang *et al.*, 1999), *Cattleya*, *Brassia* y *Doritaenopsis* (Knapp *et al.*, 2000).

### 1.1.7.1.- MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN

Los métodos de transformación utilizados para orquídeas son bombardeo de partículas, transformación mediante *Agrobacterium*, a través de polen y electroporación (Mudalige y Kuehnle 2004). Aunque los dos primeros son las más utilizados.

### 1.1.7.2.- TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*

Las especies de *Agrobacterium* son conocidas como los únicos organismos capaces de transferir genes entre reinos. Esta bacteria de suelo, Gram negativa, es patógeno de una amplia gama de plantas, al infectar inicia la formación de tumores en la mayoría de dicotiledóneas y algunas especies de monocotiledóneas (DeCleene y DeLay, 1976). Los tumores así formados no requieren en lo sucesivo de la presencia de la bacteria para su proliferación (White y Braun, 1942), manifestando con ello que las células de la planta han sido transformadas genéticamente. Los factores requeridos para la formación de tumores en el huésped están codificados por los genes presentes en el plásmido de inducción de tumor, conocido como plásmido Ti de las cepas virulentas de *Agrobacterium*. El plásmido Ti también sirve como fuente de ADN de transferencia (ADN-T), que es una región de ADN que es importada hacia la célula vegetal e integrada en el ADN del cromosoma del huésped. La expresión de los genes bacterianos codificados por el ADN-T en las células del huésped resulta en la producción de enzimas que catalizan la síntesis de algunas fitohormonas (auxinas y citocininas), que son responsables del crecimiento tumoral y la formación de aminoácidos conjugados con azúcares, denominados opinas. Debido a que las opinas sirven como fuente de carbón y algunas veces como fuente de nitrógeno para *Agrobacterium* hasta la exclusión de otros microorganismos, estos compuestos proporcionan una ventaja selectiva para esta especie (Tempe y Petit, 1982). La capacidad de poder transferir genes a las plantas ha sido utilizada para desarrollar a *Agrobacterium tumefaciens* como un vector para la manipulación genética. Mediante ingeniería genética los fragmentos de ADN de interés son primero clonados en la región del ADN-T del plásmido desarmado, luego es introducido en *Agrobacterium* y subsecuentemente transferidos a la célula vegetal. De estos plásmidos desarmados los genes responsables del crecimiento del tumor han sido removidos, asegurando con ello que las células transformadas puedan ser regeneradas

en plantas fértiles que transmiten el ADN transferido por ingeniería genética a su progenie (Newell, 2000). Por estos medios, el rango de huéspedes de *Agrobacterium* se ha extendido para incluir a otras especies de bacterias así como hongos e incluso algunas células de mamíferos (Lacroix *et al.*, 2006). Normalmente, bajo condiciones de laboratorio, plantas recalcitrantes (Ishida *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2006), hongos (Abuodeh *et al.*, 2000), e incluso algunas células humanas (Tzfira *et al.*, 2006) pueden ser transformados por *Agrobacterium*. La transformación mediada por *Agrobacterium* sirve como un sistema modelo para estudiar el reconocimiento de hospedero-patógeno y la liberación controlada de macromoléculas a células blanco. La interacción entre *Agrobacterium* y la célula vegetal puede dividirse en varios pasos: reconocimiento, expresiones de genes de virulencia (*Vir*), fijación a la célula del huésped, importación de los factores vir y ADN-T a la célula del huésped, e integración del ADN-T en el cromosoma (Figura 1.3).

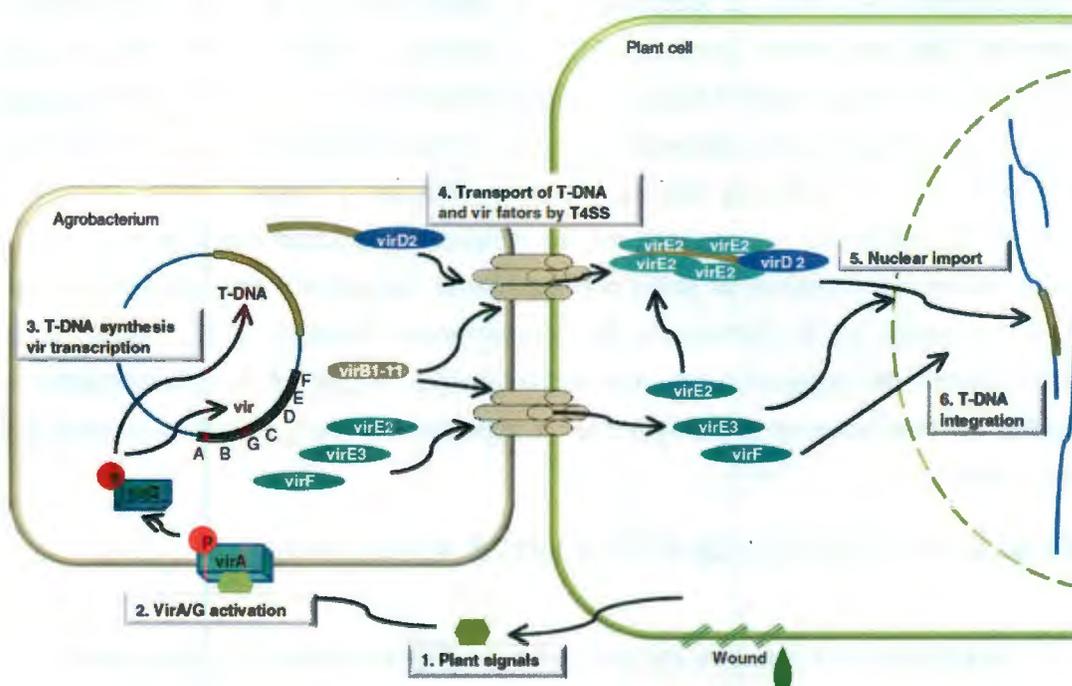


Figura 1.5.- Información general de la interacción *Agrobacterium*–planta. 1. Señales de la Planta, 2. Activación de VirA/G, y, 3. Síntesis del ADN-T y expresión de genes *vir* en *Agrobacterium*. 4. A través de un sistema de secreción bacteriano tipo IV (T4SS) el ADN-T y las proteínas Vir son transferidas a la célula de la planta para acoplar el complejo de proteínas de ADN-T/Vir. 5. El complejo ADN-T es importado al núcleo de la célula huésped en la cual 6. El ADN-T pasa a ser integrado a los cromosomas del hospedero mediante recombinación ilegítima (Pitzscheke y Heribert, 2010).

### 1.1.7.3.- RECONOCIMIENTO DE LAS CÉLULAS VEGETALES COMO ANFITRIÓN POR *Agrobacterium*

Las cepas de *Agrobacterium* se distribuyen ampliamente en el suelo. La mayoría de aislados no portan el plásmido Ti, son capaces de vivir independientemente de la planta hospedera. Sin embargo, las opinas que inducen la formación de agallas o tumores son una fuente de alimento específico para *Agrobacterium*, la capacidad de las cepas de dicha bacteria para inducir este tipo de tumores es una clara ventaja selectiva. Sin embargo, debido a que la transformación de las células vegetales es un proceso complejo y con gran demanda de energía, la expresión de genes *Vir* debe ser cuidadosamente regulada. La identificación de genes *vir*, que son necesarios para la virulencia, pero que están fuera del ADN-T (Stachel y Nester, 1986), fue un paso importante para comprender el proceso de transformación. Con excepción de los genes *virA* y *virG*, se encontró que los genes *vir* están esencialmente silenciados a menos que la bacteria sea cultivada con células vegetales (Stachel y Nester, 1986). Aunque la inducción de los genes *vir* depende de las moléculas exudadas por la planta, para la transformación es necesaria su unión con las células vegetales y ello está mediado por genes codificados en el cromosoma de *Agrobacterium* (Douglas *et al.*, 1982). Así, el reconocimiento del hospedero por *Agrobacterium* que resulta en la transformación es mediado por dos procesos independientes: la activación de los genes *Vir* y la unión a la célula huésped.

### 1.1.7.4.- EXPRESIÓN DE LOS GENES VIR DE *Agrobacterium*

La activación de genes *vir* por factores de la planta requiere dos genes, *virA* y *virG* (Stachel y Nester, 1986), que se expresan constitutivamente a un nivel basal, pero que pueden ser altamente inducidos (Winans *et al.*, 1988). Los genes *virA* y *virG* codifican un sistema de dos componentes que se fosforilan, la proteína VirA es un sensor unido a membranas y VirG es el regulador de respuesta intracelular (Wolanin *et al.*, 2002). Durante la señalización, la cinasa de histidina VirA transfiere su grupo fosfato a un residuo de aspartato (Asp) específico de VirG, con lo cual VirG se activa para cumplir su

función como factor de transcripción. La proteína fosforilada VirG se une a secuencias específicas de 12 pb del ADN de la región de los promotores de genes *vir* (cajas *vir*), activando así la transcripción (Brencic y Winans, 2005). Las señales percibidas por VirA son los fenoles, monosacáridos aldosa, pH ácido, y bajas concentraciones de fosfato (Palmer *et al.*, 2004; Brenicic y Winans, 2005). Los fenoles son indispensables para la inducción de los genes *vir*, mientras que las otras señales sensibilizan a VirA para la percepción de los fenoles, por ejemplo los azúcares permiten la inducción del sistema VirA/VirG a concentraciones mucho más bajas de fenol e incrementan la respuesta por varias veces (Shimoda *et al.*, 1990). La identificación de fenoles, tales como la acetosiringona, como inductores de la expresión de los genes *vir* se logró mediante el análisis de exudados de raíz y protoplastos de hoja (Stachel *et al.*, 1985). La acetosiringona se utiliza de manera rutinaria para incrementar la eficiencia de transformación de las células vegetales mediada por *Agrobacterium*. La capacidad del sistema VirA/VirG para reconocer una diversidad de fenoles y azúcares es una de las posibles explicaciones para el amplio rango de hospederos que presenta *Agrobacterium*.

#### 1.1.7.5.- SITIOS DE ENTRADA DE *Agrobacterium* EN LA PLANTA

En la naturaleza, *Agrobacterium* penetra los tejidos que presentan lesiones (Braun, 1952). Una herida puede ser la simple puerta de entrada, sin embargo, otros procesos específicos que se originan en dichos sitios pueden facilitar la transformación: las heridas secretan compuestos tales como fenoles y azúcares que inducen la expresión de genes *vir*. Además, estos últimos actúan como atrayentes quimiotácticos de *Agrobacterium*. Así, características específicas de las heridas tales como la alta actividad de la vía de los fenilpropanoides, el pH bajo y los azúcares asociados con a la síntesis/reparación de pared celular se correlacionan con el incremento en la eficiencia de transformación (Baron y Zambryski, 1995). No obstante, la transformación también se puede dar en las plantas que no presentan heridas, esto es, con cultivos de *Agrobacterium* creciendo en medios de pre-inducción (Escudero y Hohn, 1997), al parecer *Agrobacterium* ha optimizado el sistema VirA/VirG para responder a las señales de los sitios de la herida. Se cree que la actividad de división celular en los sitios de las heridas es de igual importancia para la transformación (Braun, 1952). Sin embargo, las células en la zona de elongación de la raíz resultaron ser las más altamente transformables (Yi *et al.*, 2002). Las

células de esta zona no son meristemáticas por lo que no están en un ciclo celular normal, sino más bien se sabe que están en ciclos de endoreduplicación.

#### **1.1.7.6.- ADHESIÓN DE *Agrobacterium* A LA CÉLULA HOSPEDERA**

Debido a que el ADN-T y las proteínas de *A. tumefaciens* han de ser transferidas a las células vegetales, se requiere de una íntima asociación entre el patógeno y las células del hospedero previo a la transformación. La adhesión específica de *A. tumefaciens* a las células vegetales no depende del plásmido Ti (Douglas *et al.*, 1982; Neff y Binns, 1985). La transformación es facilitada por los genes codificados por el cromosoma bacteriano *chvA*, *chvB* y *pscA* (*exoC*), que participan en la síntesis y localización del  $\beta$ -1,2 glucano periplásmico (McCullen y Binns, 2006).

Estudios recientes han mostrado que la exposición de las células de *A. tumefaciens* a fracciones solubles de pectinas de pared celular de origen vegetal, reduce tanto la adhesión de *Agrobacterium* a las células del hospedero como la frecuencia de inducción de tumores (Gelvin, 2000), lo que sugiere de la presencia de componentes tipo-receptor, aún por ser identificados. Los posibles candidatos son los dominios-BT1 de proteínas que han sido aisladas como resultado de la búsqueda de proteínas VirB2-que interactúan entre ellas. Debido a su incremento temporal seguidamente a la infección por *Agrobacterium* y su localización preferencial en la periferia de las células de la raíz, se ha sido propuesto la existencia de un contacto directo de BT1 con el T-pilus de *Agrobacterium* en la interacción inicial de *Agrobacterium* con células vegetales (Hwang y Gelvin, 2004).

#### **1.1.7.7.- SECRECIÓN DEL ADN-T Y PROTEÍNAS VIR DE *Agrobacterium* DENTRO DE LA CÉLULA DE LA PLANTA**

Después de la activación de genes *vir* y la adhesión de *Agrobacterium* a las células vegetales, un complejo transportador formado por las proteínas de VirB y VirD4 facilita que las proteínas Vir y el ADN-T atraviesen la membrana bacteriana interna, la capa de peptidoglucanos y la membrana externa, así como la pared y la membrana celular de la célula vegetal del hospedero. El complejo VirB pertenece al sistema de secreción de clase tipo IV (T4SS), que se encuentra en una amplia gama de bacterias

Gram-negativas y que participa en la transferencia de plásmidos entre bacterias mediante la conjugación, así como la translocación de factores Vir del patógeno a las células huésped durante la infección (Cascales y Christie, 2003). El complejo de VirB está integrado por al menos 12 proteínas: VirB1–11 y VirD4, y es necesario para la virulencia. Las proteínas se asocian con la envoltura celular y forman una estructura de múltiples unidades que se extienden a toda la envoltura (Christie *et al.*, 2005). Los factores bacterianos transportados a las células huésped por el complejo de VirB incluye al ADN-T-VirD2, VirE2, VirE3, VirF y VirD5 (Vergunst *et al.*, 2005). VirE2 corta la hebra de ADN-T en las repeticiones de 25 nucleótidos de longitud que bordean el ADN-T y VirD2, después se une covalentemente al extremo 5' del ADN-T. VirD2 parece ser transportado conjuntamente con el ADN-T a la célula vegetal, en donde está involucrada en la importación e integración nuclear del ADN-T en el genoma del hospedero. Vir E2 es una proteína de unión a ADN de cadena sencilla que puede cubrir toda la longitud de la hebra T del ADN *in vitro* (Christie *et al.*, 1988; Citovsky *et al.*, 1992). Es probable que interactúa con ADN-T en el citoplasma de células vegetales y también tenga funciones de importación nuclear e integración (Gelvin, 2003). Curiosamente, el complejo de VirB/D4 no puede sólo transportar el ADN-T derivado de Ti, sino también el plásmido RSF1010 de amplio rango para plantas u otras especies de *Agrobacterium*, mostrando que intermedios conjugativos también deben ser los sustratos (Beijersbergen *et al.*, 1992).

#### 1.1.7.8.- IMPORTACIÓN DE LOS FACTORES VIR DE *Agrobacterium* A LAS CÉLULAS HOSPEDERAS

El sistema de secreción del complejo proteico T4SS codificado por el gen *virB* de *A. tumefaciens* transporta los sustratos a través de la envoltura de la célula bacteriana. Ciertos motivos en el extremo C-terminal parecen ser necesarios para la exportación de sustratos específicos. Estas señales de exportación participan en la interacción de los sustratos con el sistema T4SS. La región C-terminal de VirF, VirE2 y VirE3 es suficiente para mediar el transporte de proteínas de fusión a las plantas (Vergunst *et al.*, 2000). El tamaño mínimo de VirF necesario para dirigir la translocación de proteínas a las plantas es de 10 aminoácidos (Vergunst *et al.*, 2005), de donde la secuencia consenso mínima, R-X (7) - R - X-R-X-R, es necesaria para la secreción de sustrato por el complejo de VirB del que podría derivar (Vergunst *et al.*, 2005).

#### 1.1.7.9.- ENTRADA DE FACTORES DE *Agrobacterium* A LA CÉLULA DEL HOSPEDERO

No está claro hasta ahora cómo es que las proteínas Vir y el complejo ADN-T atraviesan la pared celular y las barreras de la membrana del hospedero. En la transferencia de plásmidos mediada por el sistema secretor T4SS, el pilus permite la interacción entre donador y receptor, formándose una fusión entre las membranas para permitir el paso (Schroder y Lanka, 2005). No se conoce el mecanismo por el cual el conjugado intermediario atraviesa la pared bacteriana y la membrana interna. Menos aún se conoce como se da la transferencia mediada por VirB a través de las barreras de la célula del hospedero. El enorme rango de hospederos transformados por *Agrobacterium* sugiere que la especificidad de la interacción hospedero-patógeno requerida para abrir la pared y las barreras de la membrana celular del hospedero no es tan importante como se esperaba (Pitzchke y Hirt, 2010).

#### 1.1.7.10.- TRANSPORTE NUCLEAR DEL COMPLEJO ADN-T

Dos proteínas que interactúan con VirE2 son VIP1 y VIP2. La función de VIP1 es servir de enlace entre VirE2 y la proteína vegetal importina  $\alpha$ -1 (IMPa-1), facilitando así el importe al núcleo vegetal de VirE2 y su asociación con el ADN-T. Esta función puede ser complementada parcialmente por VirE3, que es similar a VIP1, ya que se comprobó que era capaz de unirse a VirE2 y IMPa-1 (Lacroix *et al.*, 2005). *In vitro*, VIP1 forma complejos ternarios con VirE2 y ADN de cadena sencilla (Tzfira *et al.*, 2001). El análisis de la mutante *vip1-1* de *Arabidopsis*, que produce una proteína VIP1 truncada, reveló que la región C-terminal de la proteína es necesaria para la transformación estable pero prescindible para transformación transitoria (Li *et al.*, 2005). VIP1 es una proteína móvil con tránsito citoplasma-nuclear de una manera dependiente del estrés (Djamei *et al.*, 2007). La otra proteína de interacción-VirE2, VIP2, muestra una localización nuclear (Tian *et al.*, 2004). El rasgo más característico de VIP2 es un dominio NOT (negativo en TATA-menos), haciendo a la proteína VIP2 un posible represor transcripcional (Anand *et al.*, 2007).

La información sobre algunos aspectos de VirE2 sigue siendo algo controvertida. Aun cuando Ballas y Citovsky (1997) reportaron la interacción específica de VirE2 con la importina IMPa-1 de *Arabidopsis* y la localización nuclear de VirE2, otros estudios mostraron una localización predominante citoplasmática de VirE2 (Bhattacharjee *et al.*, 2008) y la interacción de VirE2 con varias isoformas de importinas *in planta* (Bhattacharjee *et al.*, 2008). Por otra parte, *impa-4*, pero no así otras mutantes de importina, es recalcitrante a la transformación. Esta deficiencia puede superarse a través de la sobreexpresión ectópica de isoformas heterólogas de importina (Bhattacharjee *et al.*, 2008).

Una posible explicación de las diferencias reportadas de la localización de VirE2 podría encontrarse en la translocación subcelular dependiente de estrés de la proteína VIP1 que interactúa con VirE2. La fosforilación de VIP1 desencadenada por estrés y su localización nuclear probablemente dirige a VirE2 hacia el núcleo (Djamei *et al.*, 2007). Así, bajo situaciones de estrés, como ocurre en células bombardeadas, la VIP1 fosforilada puede tirar de la VirE2 del citoplasma hacia el núcleo.

VIP1 interactúa con VirE2 y IMPa-1. Tzfira *et al.*, (2002) se encontró la interacción entre VIP1 y IMPa-1, pero no entre VirE2 y IMPa-1. Por ello, los autores sugirieron que VIP1 puede servir como una molécula adaptadora para facilitar la importación hacia el núcleo de VirE2 ligada a cadena-T. Sin embargo, por su parte Bhattacharjee *et al.*, (2008), encontró que VirE2 puede unirse directamente a todas las isoformas de importinas (IMPa-1, -2, -3, -4, -7 y -9) en los estudios de interacción Y2H y BiFC. Los resultados combinados de Tzfira *et al.*, (2002) y Bhattacharjee *et al.*, (2008) sugieren que VirE2 puede utilizar varios mecanismos celulares para su importación nuclear, creando así oportunidades adicionales para la entrada de complejo-T hacia el núcleo.

#### 1.1.7.11.- INTEGRACIÓN DEL COMPLEJO ADN-T EN EL NÚCLEO

Es posible que el ADN-T interactúe con la cromatina de la planta para integrarse a esta, por ello se piensa que alteraciones en la conformación de la cromatina pueden afectar la integración del ADN-T. Mediante estudios genéticos se ha investigado qué proteínas relacionadas con la cromatina son importantes para la transformación (Grúa y Gelvin, 2007). Por ejemplo, con mutantes se han identificado genes en o cercanos a aquellos que

transcriben para histonas, entre los cuales están las acetiltransferasas de histonas, o la deacetilasa de histona como la mutante *raf*. A la par, se han examinado alrededor de 340 mutantes estables mediadas por RNAi en *Arabidopsis* que muestran el fenotipo *raf*; estas líneas comprenden alrededor de 109 genes de 15 familias relacionados con la cromatina. El silenciamiento de 24 de estos genes afines con la conformación de la cromatina, resultó en una reducción de la susceptibilidad a transformación (Pitzschke y Hirt, 2010).

Dado que el ADN-T se integra al genoma de la planta mediante recombinación ilegítima (Mayerhofer *et al.*, 1991), por ello las plantas que presentan sistemas deficientes de reparación y recombinación del ADN posiblemente muestren una limitada integración del ADN-T. Las mutantes en el metabolismo de reparación del ADN es posible que sean hipersensibles a agentes dañinos como UV y la radiación, así como también a antibióticos como la bleomicina. Sonti *et al* (1995) estudiaron mutantes radiosensibles de *Arabidopsis* y analizaron su efecto sobre la transformación transitoria y estable mediada por *Agrobacterium*. Entre los mutantes que analizaron mediante el ensayo de formación de callos resistentes al antibiótico kanamicina, *raf5* y *uvh1* resultaron ser resistentes a la transformación estable pero no así a la transitoria. Sin embargo, un análisis más profundo por Nam *et al.*, (1998) confirmó la deficiencia en la transformación estable sólo para *rad5*, pero no así para *uvh1*. Además, los resultados de estos autores también evidenciaron que RAD5 participa en algún paso antes de la integración del ADN-T, tales como, la transferencia del ADN-T o su destino nuclear (Nam *et al*, 1998).

La función de las histonas en la transformación se ha reforzado por un estudio reciente reportado por Tenea *et al.*, 2009, quienes probaron el efecto de la sobreexpresión de varias histonas sobre la transformación en *Arabidopsis* y la expresión del transgen. Los autores proponen que la mayor transformación a través de la sobreexpresión de histonas es debido a la protección del ADN-T entrante durante las primeras etapas de la transformación. El principal mecanismo por el cual las histonas confieren susceptibilidad parece ser conservado, ya que la sobreexpresión de *HTA1* en *Arabidopsis* no sólo mejora la eficiencia de transformación de *Arabidopsis* (Yi *et al.*, 2002), sino también en arroz (Zheng *et al.*, 2009).

Los estudios sobre la proteína KU80 en *Arabidopsis* subrayan su participación activa en la maquinaria de reparación en integración de ADN-T en el hospedero. KU80, es

una proteína importante en la unión de los extremos del complejo no-homólogo (Jeggio *et al.*, 1999), se une directamente a la doble cadena del ADN-T intermediario (Li *et al.*, 2005), que rápidamente se convierte en cadenas-T desde inicios del proceso de infección y son intermediarios esenciales de la integración de ADN-T (Tzfira *et al.*, 2004). Los mutantes de KU80 son deficientes en la integración del ADN-T, pero no en la expresión transitoria del ADN-T, mientras que la sobreexpresión de KU80 da como resultado mayor susceptibilidad a la infección por *Agrobacterium* e incrementa la resistencia a los agentes dañinos del ADN (Li *et al.*, 2005). Sin embargo, la función de KU80 durante la transformación de las células aun no es clara. KU80 ha demostrado ser necesaria (Friesner y Britt, 2003) y prescindible (Gallego *et al.*, 2003) para la integración de ADN-T.

Por otro lado las planta que han sufrido el ataque por *Agrobacterium* al igual que de otros patógenos, perciben a *Agrobacterium* como un invasor y entonces generan la "respuesta inmune innata", caracterizada por la expresión de genes de defensa y la acumulación de especies reactivas del oxígeno (Pitzschke *et al.*, 2009). Esta reacción se logra a través de la percepción de patrones moleculares asociados (PMAP) por receptores específicos. Aunque se han aislado varios PMAP, pocos receptores han sido identificados. Un estudio reciente por Clauce Coupel *et al.*, 2008 sobre vitronectinas indica fuertemente que este grupo de proteínas es poco probable que actúen como receptores de *Agrobacterium* (Pitzschke y Hirt, 2010).

La degradación del complejo ADN-T y VIP1 por acción de VirF y el sistema del proteosoma vegetal sirve para liberar al ADN-T y bloquear la expresión de genes de defensa inducible por VIP1. De acuerdo con este modelo, ni VirF o VirD2, ni la fidelidad de la maquinaria del proteosoma de la planta, sino mas bien VIP1 fosforilada/localizada, y presumiblemente la importación nuclear del complejo VirE2/ADN-T, pueden ser estos los factores limitantes para la transformación. Debido a su doble función como un factor de transcripción de respuesta al estrés y por otro lado como transportador del ADN-T/VirE2, VIP1 puede ser uno de los factores que incline la balanza hacia el éxito o fracaso de la transformación debido a los niveles de estrés. La batalla entre *Agrobacterium* y la planta, por lo tanto, parece ser una competencia para una de las funciones de VIP1 (Pitzschke y Hirt, 2010).

#### 1.1.7.8.- VARIABLES QUE PERMITEN EFICIENTIZAR LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN PLANTAS

Para incrementar la eficiencia de transformación, se ha recurrido al empleo de diferentes tratamientos; por ejemplo, la aplicación de ultrasonido sobre el explante por breves periodos en presencia de *Agrobacterium*, lo cual produce heridas pequeñas y uniformes, que facilitan el acceso de la bacteria, esto se conoce como transformación mediante *Agrobacterium* asistida por sonicación (SAAT) (Sharma *et al.*, 2005). Otro tratamiento es el método de la punta floral, que consiste en la aplicación directa de *Agrobacterium* al tejido floral (Sharma *et al.*, 2005).

El método de secado del tejido con el aire de una campana de flujo laminar, previo y durante el co-cultivo con la bacteria, fue aplicado por Cheng *et al.*, (2003) e incremento con ellos la eficiencia de transformación estable en trigo. Estos autores mencionan que el efecto positivo de dicho tratamiento debe a que suprime el crecimiento de la bacteria y favorece la recuperación de las células transformadas. Por su parte, Grajales (2005) explica que el secado del tejido previo al bombardeo de macropartículas causa cambios estructurales en la membrana plasmática alterando su permeabilidad, evitando así la muerte masiva de las células por estallamiento provocado por el impacto de los microproyectiles sobre éstas.

El tratamiento osmótico también ha mostrado tener efecto en la eficiencia de transformación. En un estudio con arroz, la transferencia de genes se incrementó en 14% al usar 10% de sacarosa en el medio de co-cultivo (Uzé *et al.*, 1997). Resultados similares fueron reportados en trigo, sorgo y maíz (Uzé *et al.*, 2000)

A pesar de la producción endógena de una cierta concentración de compuestos fenólicos en las orquídeas (Nan *et al.*, 1997; Belarmino y Mii y 2000), una considerable evidencia muestra que la aplicación exógena de acetosiringona (AS), es un elemento esencial para la transformación de algunas monocotiledóneas (Suzuki *et al.*, 2001), y aumenta la eficiencia en la transformación orquídeas (Belarmino y Mii y 2000; Liau *et al.*, 2003). La transformación de orquídeas mediada por *Agrobacterium* como *Dendrobium*, *Phalaenopsis* y *Oncidium* se ha mejorado mediante la adición de una concentración adecuada de AS en el medio de co-cultivo a pH 5.0-5.5, para activar los genes *vir* del plásmido Ti, y para iniciar la transferencia del ADN-T (Stachel *et al.*, 1986).

### 1.1.9.- TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN ORQUÍDEAS

Las orquídeas, al igual que otras monocotiledóneas, son plantas recalcitrantes a la infección por *Agrobacterium*. Sin embargo, la presencia del alcohol coniferil, y los genes *vir*, proporcionan elementos fundamentales necesarios para el éxito de la transformación mediada por *Agrobacterium* (Nan *et al.*, 1997). Nan *et al.*, 1998 reportaron el primer ejemplo de transformación de las orquídeas, mediada por *Agrobacterium*, y en el que se documentó la incorporación parcial del ADN-T en el genoma de *Dendrobium*. Desde entonces, se han realizado esfuerzos para optimizar la transformación mediada por *Agrobacterium* en las orquídeas (cuadro 2). A pesar de la producción endógena de una cierta concentración de compuestos fenólicos en las orquídeas (Nan *et al.*, 1997; Belarmino y Mii y 2000), una considerable evidencia muestra que la aplicación exógena de acetosiringona (AS), es un elemento esencial para la transformación de algunas monocotiledóneas (Suzuki *et al.*, 2001), y aumenta la eficiencia en la transformación orquídeas (Belarmino y Mii y 2000; Liau *et al.*, 2003). La transformación de orquídeas mediada por *Agrobacterium* como *Dendrobium*, *Phalaenopsis* y *Oncidium* se ha mejorado mediante la adición de una concentración adecuada de AS en el medio de cultivo a pH 5.0-5.5, para activar los genes *vir* del plásmido Ti, y para iniciar la transferencia del ADN-T (Stachel *et al.*, 1986).

### 1.1.10.- EXPLANTES UTILIZADOS PARA LA TRANSFORMACIÓN

Durante la transformación y regeneración de orquídeas, la respuesta del explante, protocormos, embriones, callos, pétalos, cuerpos tipo protocormos, se ve influenciada por diversos factores tales como la producción de compuestos fenólicos que resultan de los propios mecanismos de defensa celular, la tasa de división celular y el incremento de la frecuencia de regeneración, a través de la competencia de las células en los sitios de la herida. Un explante que es afectado por la transformación podrá no ser eficiente durante

la regeneración de brotes. Esta podría ser una de las principales razones del por qué la frecuencia de expresión transitoria de los transgenes en los explantes de orquídeas después de la transformación, es generalmente mucho más alta que el de la producción de transformantes estables derivados de estos explantes. Por lo tanto, es importante seleccionar los explantes adecuados y competentes para la transformación y regeneración (Yu y Xu, 2007).

En esta investigación, se utilizó hojas de *Phalaenopsis zuma's pixie* como explante primario para su propagación (Figura 1.2) por organogénesis, las vitroplantas así obtenidas sirvieron de fuente de explante para probar diferentes condiciones de cultivo e inducir la embriogénesis somática, así como de explante para la transformación transitoria mediante *Agrobacterium*. Este tipo de explante ha sido utilizado en otros híbridos o especies de orquídeas, como *Phalaenopsis Little Steve* (Kuo *et al.*, 2005), *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa* Shimadzu (Chen y Chang, 2005), *Oncidium Gower Ramsey* (Chen y Chang, 2001). La importancia de esto se basa en que algunas de estas especies se encuentran amenazadas debido a la destrucción de su hábitat y otras causas debido a su valor ornamental.

Cuadro 1.2. *Phalaenopsis* transformadas. GUS ( $\beta$ -glucuronidasa), GFP (proteína verde fluorescente), Hph (Higromicina), PLB (Cuerpo tipo protocormo).

Orquídea	Cepa(s)	Método transformación de bacteria	Gen reportero	Gen resistencia de	Explantos transformados	Plásmido (s)	Efectividad %	Referencia
<i>Phalaenopsis</i> <i>Violácea</i>	EHA 101 EHA 105	<i>A. tumefaciens</i>	GUS	<i>Hph</i>	PLBs	pCAMBIA 1304	50 60	Sreeramanan <i>et al.</i> , 2008
<i>Phalaenopsis</i>	LBA4404	<i>A. tumefaciens</i>	GUS	<i>Hph</i>	PLBs	pTOK233	—	Chai, <i>et al.</i> , 2002
<i>Phalaenopsis</i>	EHA101	<i>A. tumefaciens</i>	GUS	<i>Hph</i>	Protocormos	pIG121Hm	1.3–1.9	Mishiba <i>et al.</i> , 2005.
<i>Dendrobium secundum</i>	LBA4404	<i>A. tumefaciens</i>	GUS	<i>Hph</i>	Protocormos	pCAMBIA 1305.1	60	Atichart <i>et al.</i> , 2007
<i>Dendrobium nobile</i>	EHA105 AGL1	<i>A. tumefaciens</i>	GUS	<i>Hph</i>	PLB	pCAMBIA 1301	—	Men, <i>et al.</i> , 2003a.
<i>Phalaenopsis</i>	LBA4404 y EHA101	<i>A. tumefaciens</i>	GUS	<i>Hph</i>	PLB	pTOK233 y pIG121Hm	—	Belarmino y Mii (2000)
<i>Phalaenopsis</i> 'TS340	—	Biobalística	GUS	<i>Hph</i>	PLBs	pCAMBIA 1304-Ubi	50%	Liao <i>et al.</i> , 2004
<i>Phalaenopsis bellina</i>	LBA4404	<i>A. tumefaciens</i>	GFP y GUS	<i>Hph</i>	PLBs	pCAMBIA 1304	—	Maziah y Chern, 2008

## 1.2.- HIPÓTESIS

Si *Phalaenopsis zuma's pixie* puede ser regenerada *in vitro* vía organogénesis o embriogénesis, luego entonces sería de esperarse que el mejor sistema sería la vía de embriogénesis

Si los diferentes explantes de *Phalaenopsis zuma's pixie* son transformados con el gen reportero GUS, sería de esperarse que las hojas presenten la mayor expresión transitoria del transgen.

## 1.3.- JUSTIFICACIÓN

*Phalaenopsis zuma pixie* como otras orquídeas, padece enfermedades causadas por diferentes fitopatógenos, como la antracnosis (*Colletotrichum*), la pudrición blanda en los bulbos (*Erwinia*), o manchas foliares causadas por el virus del mosaico de *Cymbidium* (CymMV), entre otros, reduciendo su valor comercial. La transformación genética en *Phalaenopsis zuma pixie* y la regeneración de dichas plantas, que es un di-híbrido, es esencial para apoyar su mejoramiento biotecnológico con el fin de introducir genes que le confiriesen resistencia a dicho fitopatógenos, así mismo ofrecería la oportunidad de explorar cualidades de las orquídeas que incrementen su valor comercial, como el color, el aroma, o el tamaño de la planta y flor.

## 1.4.- OBJETIVOS

### 1.4.1.- OBJETIVO GENERAL

Establecer protocolos de regeneración *in vitro*, y de transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* en *Phalaenopsis zuma's pixie*.

### 1.4.2. - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Inducir y regenerar plantas *in vitro* de tejidos foliares de *Phalaenopsis zuma's pixie* a través de organogénesis y embriogénesis somática.
- Transformar *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 con el plásmido pCAMBIA 1305.1.
- Transformar explantes de hojas, brotes y/o embriones somáticos de *Phalaenopsis zuma's pixie* con *Agrobacterium tumefaciens* mediante infiltración al vacío.
- Verificar la transformación del tejido mediante la prueba histoquímica de Gus.

1.5. - ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:

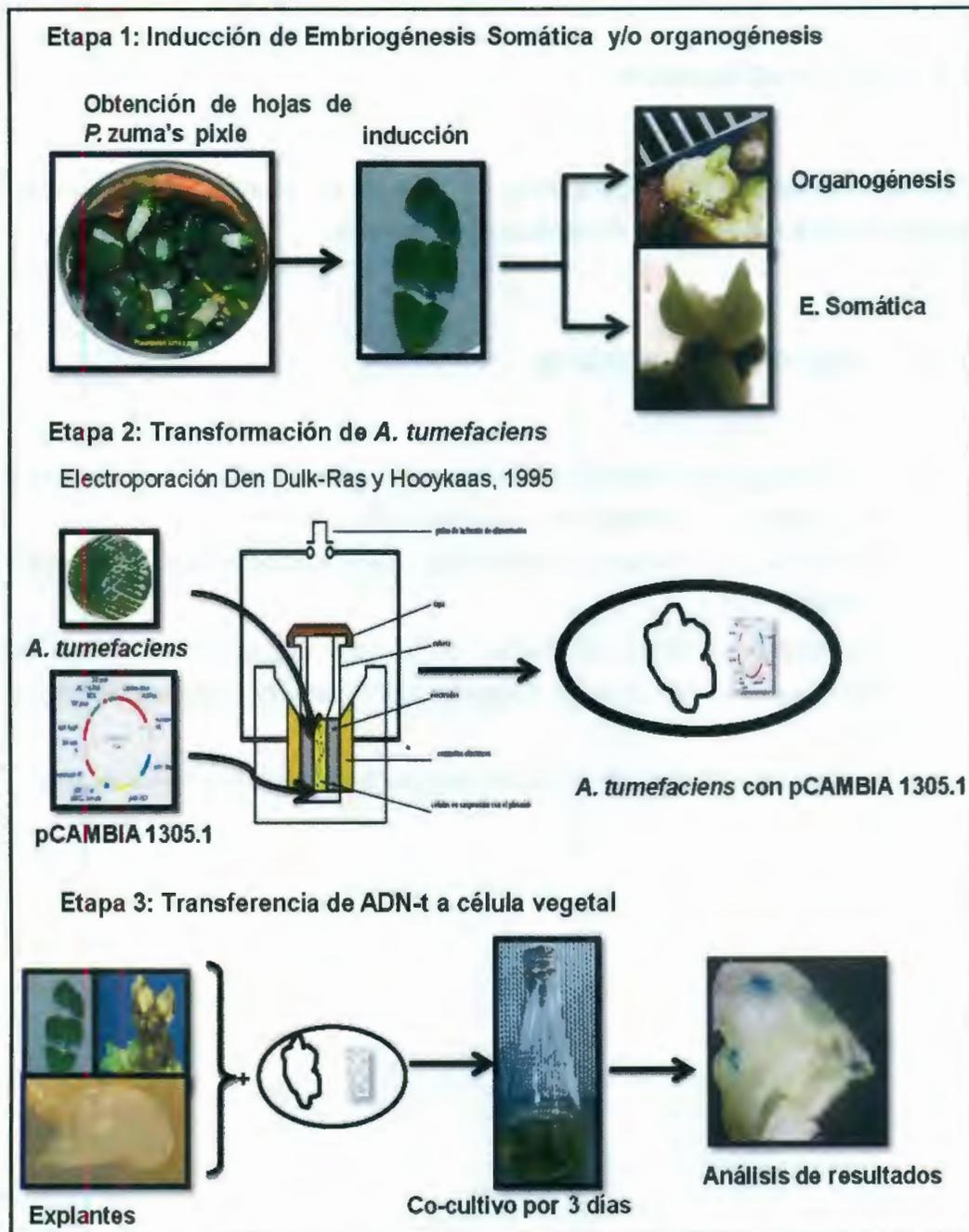


Figura 1.5. El trabajo se dividió en tres etapas: 1, morfogénesis *in vitro* a partir de tejido foliar de *Phalaenopsis zuma's pixle*; 2, Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*, cepa LBA4404, con el plásmido pCAMBIA 1305.1 por electroporación; y 3, Infección de tejido foliar, brote con callo y embrión somático de *P. zuma's pixle*, con la bacteria producto de la etapa 2.

## 1.6. - REFERENCIAS

- Abu-Arish, A., D. Frenkiel-Krispin, T. Fricke, T. Tzfira, V. Citovsky, S. Grayer Wolf y M. Elbaum (2004). Three-dimensional reconstruction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA. *J Biol Chem*, 279,25359-25363.
- Abuodeh, R.O., M.J. Orbach, M.A. Mandel, A. Das, J.N.Galgiani (2000). Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. *J Infect Dis*, 181, 2106–2110
- Anand, A., A. Krichevsky, S. Schornack, T. Lahaye, T. Tzfira, Y. Tang, V. Citovsky, K. S. Mysore (2007). *Arabidopsis* VIRE2 Interacting protein is required for *Agrobacterium* T-DNA integration in plants. *Plant Cell*, 19, 1695–1708.
- Arditti, J. (1992). *Fundamentals of Orchid Biology* (John Wiley and Sons, New York), 691 p.
- Arditti, J., R. Ernst (1993). *Micropropagation of orchids*. Wiley, New York
- Atichart, P., S. Bunnag y P. Heerakulpisut (2007). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl. with antisense ACC oxidase. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6, 1065-1071.
- Aquea, F., M. J. Poupin, J. T. Matus, M. Gebauer, C. Medina, P. Arce-Johnson (2008). Synthetic seed production from somatic embryos of *Pinus radiata*. *Biotechnol Lett*, 30, 1847-1852.
- Auer, C. A., V. Motyka, A. Březinová, M. Kamínek (1999). Endogenous cytokinin accumulation and cytokinin oxidase activity during shoot organogenesis of *Petunia hybrida*. *Physiol Plant*, 105,141-147.
- Barceló, J., G. Nicolás, B. Sabater, R. Sánchez-Tamés (2005). *Fisiología vegetal*. Ediciones Pirámide, Madrid, Spain, pp 566.
- Baron, C., P.C. Zambryski (1995). The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? *Annu Rev Genet*, 29, 107–129.
- Bartel, B., S. LeClere, M. Magidin, B. K. Zolman (2001). Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid b-oxidation. *J Plant Growth Regul*, 20,198-216.

- Beijersbergen, A., A.D. Dulk-Ras, R. A. Schilperoort, P. J. Hooykaas (1992). Conjugative transfer by the virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Science*, 256, 1324–1327.
- Braun, A.C. (1952). Conditioning of the host cell as a factor in the transformation process in crown gall. *Growth* 16, 65–74.
- Brencic, A, S. C. Winans (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69, 155–194.
- Brown, D. C. W. y T. A. Thorpe (1986). Plant regeneration by organogenesis. In: Vasil, I. K., ed. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, vol. 3. New York, 49-65.
- Carman, J.G. (1990). Embryogenic cells in plant tissue cultures: Occurrence and behavior. *In Vitro Cell. Dev. Biol*, 26, 746-753.
- Cascales E, P. J. Christie (2003). The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, 1, 137–149.
- Chai, M.L., C.J. Xu, K.K. Senthil, J.Y. Kim y D.H. Kim (2002). Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Scientia Horticulturae*, 96, 213–224.
- Charity, J. A., L. Holland, L. J. Grace, C. Walter (2005). Consistent and stable expression of the nptII, uidA and bar genes in transgenic *Pinus radiata* after *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation using nurse cultures. *Plant Cell Rep*, 23, 606-616.
- Chen, J. T. y W. C. Chang (2005). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis* var. Formosa Shimadzu. *In vitro cell Bio Plant*.
- Chen, J. T. y W. C. Chang (2006). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Bio. Plantarum*, 50(2), 169-173.
- Chen, J. T. y W. C. Chang (2001). Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium* "Gower Ramsey". *Plant Growth Regul*, 34, 229–232.

- Chen, J. T., C. Chang y W. C. Chang (1999). Direct somatic embryogenesis and subsequent plant regeneration on leaf expansts of *Oncidium* 'Gower Ramsey' *in vitro*. Plant Cell Rep, 19, 143-149.
- Chen, J.T. y W.C. Chang (2000). Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). Plant Sci, 160, 87-93.
- Chen, Y. y C. Piluek (1995). Effects of thiadiazuron and N<sup>6</sup>-bencilaminopurine on shoot regeneration of *Phalaenopsis*. Plant Growth Regul, 16, 99-101.
- Chen, Y, Lu L, Deng W, Yang X, McAvoy R, Zhao D, Pei Y, Luo K, Duan H, Smith W, Thammina C, Zheng X, Ellis D, Li Y (2006). *In vitro* regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Euonymus alatus*. Plant Cell Rep, 25, 1043–1051.
- Cheng, M., T. Hu, J. Layton, C. Liu y E. Fry (2003). Desiccation of plant tissue post-*Agrobacterium* infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat. *In vitro* cellular and Developmental Biology Plant, 39,595-604.
- Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S, Cascales E (2005), Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. Annu Rev Microbiol, 59, 451–485.
- Christie, P.J., J.E. Ward, S.C. Winans, E.W. Nester (1988). The *Agrobacterium tumefaciens* virE2 gene product is a singlestranded-DNA-binding protein that associates with T-DNA. J Bacteriol, 170, 2659–2667
- Chugh, A. y P. Khurana (2002). Gene expression during somatic embryogenesis recent advances. Current science, 83, 715-730.
- Citovsky,V., M. L. Wong, P. C. Zambryski (1989). Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single stranded DNA: implications for the T-DNA transfer process. Proc Natl Acad Sci USA, 86, 1193-1197.
- Citovsky, V., J. Zupan, D. Warnick, P. Zambryski (1992). Nuclear localization of *Agrobacterium* VirE2 protein in plant cells. Science, 256, 1802–1805.
- Christenson, E. A. (2001). *Phalaenopsis*. Timber Press, Portland, OR.
- Christianson, M. L., D. A. Warnick (1988). Organogenesis *in vitro* as a developmental process. Hortscience, 23,515-519.

- Christie, P.J. (2004). Type IV secretion the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim Biophys*, 1694, 219-234.
- Chung, H.H., J.T. Chen, y W. C. Chang. (2005). Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* chiengmai pink and subsequent plant regeneration. *in vitro* Cell. Dev. Biol.Plant, 41,765–769.
- Clauce-Coupel, H., S. Chateau, C. Ducrocq, V. Niot, S. Kaveri, F. Dubois, B. Sangwan-Norreel, R.S. Sangwan (2008). Role of vitronectin-like protein in *Agrobacterium* attachment and transformation of *Arabidopsis* cells. *Protoplasma*, 234, 65–75
- Crane, Y.M. y S.B. Gelvin (2007). RNAi-mediated gene silencing reveals involvement of *Arabidopsis* chromatin-related genes in *Agrobacterium*-mediated root transformation. *Proc Natl Acad Sci*, 104, 15156–15161.
- DeCleene, M., J. DeLay (1976). The host range of crown gall. *Bot Rev*, 42, 389–466.
- De Klerk, G.J., B. Arnholdt-Schmitt, R. Lieberei y K.H. Neumann (1997). Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biologia Plantarum*, 39(1), 53-66.
- Djamei, A., A. Pitzschke, H. Nakagami, I. Rajh, H. Hirt (2007). Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* 318, 453–56.
- Dodds, J. H. y L. W Roberts (1982). *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge University Press. pp.178.
- Douglas, C.J., W. Halperin, E.W. Nester (1982). *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in attachment to plant cells. *J Bacteriol*, 152, 1265–1275.
- Draper, J., R. Scott, P. Armitage, R. Walden (1988). *Plant genetic transformation and gene expression, a laboratory manual*. London: Blackwell Scientific Publications Ltd.
- Duan, J. M., H. Chen y S. Yazawa (1996). *In vitro* propagation of *Phalaenopsis* via culture of cytokinin-induced nodes. *Journal of Plant Growth Regulation*, 15, 133-137.
- Dure III, L. (1985). Embryogenesis and gene expression during seed formation. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol*, 2, 179-197.

- Escudero, J., B. Hohn (1997). Transfer and integration of T-DNA without cell injury in the host plant. *Plant Cell*, 9, 2135–2142.
- Ernst, R. (1994). Effects of thidiazuron on *in vitro* propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 39, 273-275.
- Etienne, H., M. Berthouly (2004). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 69, 215-231.
- Evans, D. A., W. R. Sharp y C. E. Flick (1981). Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T.A. (ed.). *Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture*. Academic Press. Nueva York. p. 45-114.
- Ezhova, T.A. (2003). Genetic control of totipotency of plant cells in an *in vitro* culture. *Russian Journal of Developmental Biology*, 43,197-204.
- Fehér, A. (2008). The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't *Acta Biol Szeged*, 52(1),53-56
- Fehér, A., T. P. Pasternak, D. Dudits (2003), Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 74, 201-22.
- Filichkin S.A. y S.B. Gelvin (1993), Formation of a putative relaxation intermediate during T-DNA processing directed by the *Agrobacterium tumefaciens* VirD1, D2 endonuclease. *Mol Microbiol*, 8, 915-926.
- Fisk, H.J. y A. M. Dandekar (1993), The introduction and expression of transgenes in plants. *Scientia Horticulturae*, 55,5-36.
- Freuler, M. J. (2006). Orquídeas. Ed. Albatros. Argentina. p. 8.
- Friesner, J. y A.B. Britt (2003). KU80- and DNA ligase IV-deficient plants are sensitive to ionizing radiation and defective in T-DNA integration. *Plant J*, 34, 427–440.
- Gallego, M.E., J.Y. Bleuyard, S. Daoudal-Cotterell, N. Jallut, C. I. White (2003). Ku80 plays a role in non-homologous recombination but is not required for T-DNA integration in *Arabidopsis*. *Plant J*, 35, 557–565.
- Gamborg, O.L. (2002). Plant tissue culture. Biotechnology. Milestones. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 38, 84-62

- Gao, L. F., R. L. Jing, N. X. Huo, Y. Li, X. P. Li, R.-H. Zhou, X. P. Chang, J. F. Tang, Z. Y. Ma y J. Z. Jia (2004). One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. *Theor. Appl. Genet*, 108, 1392–1400.
- Gawenda, I. y T. Debener (2009). Association studies and the development of a linkage map in *Phalaenopsis* hybrids. Plant and animal genomes XVII conference. San Diego, CA.
- Gelvin, S. B. (2000). *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51, 223–256.
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the 'gene-jockeying' tool. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, 16–37.
- George, E. F. (1993). Plant propagation by tissue culture. The technology. Exegetics limited. Edington. pp 283-322.
- George, F. E. y D. P. Sherrington (1984). Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial labs. p 690.
- George, E., M. A. Hall y G.-J. De Klerk. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. p. 342-344, 371.
- Gil, T. Y. (1987). The propagation of *Phalaenopsis*. Part II. *Malay Orchid Rev.* (singapur), 21, 45-46.
- Grajales, M. M. (2005). apuntes de Bioquímica vegetal. Bases para su aplicación fisiológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. p 170.
- Griesbach, R. J. (2002). Development of *Phalaenopsis* orchids for the mass-market. J. Janick and A. Whipkey (Eds.) *Trends in New Crops and New Uses*. pp. 458-465.
- Goldber, G. R. B., S. J. Barker y L. Perez-Grau (1989). Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell*, 56, 149-160.
- Halperin, W. (1986). Attainment and retention of morphogenic capacity *in vitro*. In: Vasil, I. K., ed. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol. 3. Plant regeneration and genetic variability. New York. pp 3-47.
- Henshaw, G. G., J. F. O'Hara, K. J. Webb. (1982). Morphogenetic studies in plant tissue cultures. In: Yeoman, M. M.; Truman, D. E., eds. *Differentiation in vitro*. 4th Symposium British Society Cell Biology. pp. 231-251.
- Hilcks, G. S. (1980). Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. *Bot. Rev*, 46, 1-23.

- Huan, I., T. Takamura, y M. Tanaka (2004). Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryogenesis structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Sci*, 166, 1443-1449.
- Hwang, H.H. y S.B. Gelvin (2004). Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *Plant Cell*, 16, 3148-3167.
- Ishida, Y., H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei, T. Komari, T. Kumashiro (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat Biotechnol*, 14, 745-750.
- Ishii, Y., T. Takamura, M. Goi y M. Tanaka (1998). Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep*, 17, 446-450.
- Islam, M. O. y S. Ichihashi (1999). Effects of sucrose, maltose and sorbitol on callus growth of *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis* and *Neofinetia*. *Journal Jap. Soc. Hort. Sci*, 68, 1124-1131.
- Jeggo, P., B. Singleton, H. Beamish, A. Priestley (1999). Double strand break rejoining by the Ku-dependent mechanism of non-homologous end-joining. *C R Acad Sci*, 322, 109-112.
- Jimenez, V.M. (2005). Involvement of plant hormones and growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul*, 47,91-110.
- Kim, S. W., M. J. Oh, J. R. Liu (2009). Plant regeneration from the root-derived embryonic tissues of *Rosa hybrida* L. cv. Charming via a combined pathway of somatic embryogenesis and organogenesis *Plant Biotechnol Rep*, 3,341-345.
- Komamine, A. (1990). *Cell Cultures, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (eds Nijkamp, H. J. J., van der Plas, L. H. W. and van Aatjik, A.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 307-313.
- Kuo, H. L., J.T. Chen y W. C. Chang (2005). Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* "Little Steve". *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 41, 453-456.
- Kyozuka, J. (2007). Control of shoot and root meristem function by cytokinin. *Current Opinion Plant Biol*, 10, 442-446.
- Lacroix, B., T. Tzfira, A. Vainstein, V. Citovsky (2006). A case of promiscuity: *Agrobacterium's* endless hunt for new partners. *Trends Genet*, 22, 29-37.

- Lacroix, B., M. Vaidya, T. Tzfira, V. Citovsky (2005). The VirE3 protein of *Agrobacterium* mimics a host cell function required for plant genetic transformation. *EMBO J* 24,428–437.
- Li, J., A. Krichevsky, M. Vaidya, T. Tzfira, V. Citovsky (2005). Uncoupling of the functions of the *Arabidopsis* VIP1 protein in transient and stable plant genetic transformation by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci*, 102, 5733–5738.
- Liao, L., I.C. Pan, Y. Chan, Y. Hsu, W. Chen y M. Chan (2004). Transgene silencing in *Phalaenopsis* expressing the coat protein of *Cymbidium* Mosaic Virus is a manifestation of RNA-mediated resistance. *Molecular Breeding*, 13, 229–242.
- Lu, M.C. (2002). Micropropagation of *Morus latifolia* Poilet using axillary buds from mature trees. *Sci Hortic*, 96, 329-341.
- Mata Rosas, M., V. M. Chávez Ávila, R. Bye Boettler (2001). *In vitro* regeneration of plantlets from immature zygotic embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, an endemic Mexican endangered species. *In vitro Cell Dev Biol-Plant*, 37, 73-78.
- Mayerhofer, R., Z. Koncz-Kalman, C. Nawrath, G. Bakkeren, A. Cramer, K. Angelis, G.P. Redei, J. Schell, B. Hohn, C. Koncz (1991). T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO J*, 10, 697–704.
- McCullen, C. A., A. N. Binns (2006). *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 101–127.
- McDaniel, C. N. (1992). Determination to flower in *Nicotiana*. In: Pederson, A. A., ed. *Current Topics in Developmental Biology*. New York: Academic Press, 1-37.
- Mishiba, K.I., D.P. Chin, M. Mii (2005). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination. *Plant Cell Rep*, 24, 297-303.
- Mok, M. C., R. C. Martin, D. W. S. Mok (2000). Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. *In vitro Cell Dev Biol-Plant*, 36, 102-107.
- Mok, D. W.S. y M. C. Mok (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52, 89-118.
- Moncaleán, P., A. Rodríguez, B. Fernández (2001). *In vitro* response of *Actinidia deliciosa* explants to different BA incubation periods. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 67,257-266.

- Morris, R. D. (1986). Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens. *Ann. Rev. Plant Physiol*, 37, 509-538.
- Nam, J., K.S. Mysore, S.B. Gelvin (1998). *Agrobacterium tumefaciens* transformation of the radiation hypersensitive *Arabidopsis thaliana* mutants *uvh1* and *rad5*. *Mol Plant Microbe Interact*, 11, 1136–1141.
- Neff, N.T., A. N. Binns (1985). *Agrobacterium tumefaciens* interaction with suspension-cultured tomato cells. *Plant Physiol*, 77, 35–42
- Newell, C.A. (2000). Plant transformation technology. Developments and applications. *Mol Biotechnol*, 16, 53–65.
- Normanly, J., J. P. Slovin, J. D. Cohen (2005). Auxin biosynthesis and metabolism. En: Davies PJ (ed) *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Kluwer Academic Pub, Dordrecht, the Netherlands, pp 36-62.
- Novák, O., E. Hauserová, P. Amakorová, K Doležal, M. Strnad (2008). Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochem*, 69, 2214-2224.
- Palmer, A. G., R. Gao, J. Maresh, W. K. Erbil, D. G. Lynn (2004). Chemical biology of multi-host/pathogen interactions: chemical perception and metabolic complementation. *Annu Rev Phytopathol*, 42, 439–464.
- Park, S. Y. (2002). Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann For Sci*, 59, 651-656
- Park, S. Y., H. N. Murthy y K. Y. Paek (2002). Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In vitro cell. Dev. Biol. Plant*, 38, 168-172.
- Pěňčík, A., J. Rolčík, O. Novák, V. Magnus, P. Barták, R. Buchtík, B. Salopek-Sondi, M. Strnad (2009). Isolation of novel indole-3-acetic acid conjugates by immunoaffinity extraction. *Talanta*, 80, 651-655.
- Pinske, J. (2004). *Orquídeas*. Ed. Omega. Pp.8.
- Pitzschke, A. y H. Hirt (2010). New insights into an old story: *Agrobacterium* induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal*, 29, 1021–1032.
- Pitzschke, A., A. Schikora, H. Hirt (2009). MAPK cascade signaling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol*, 12, 421–426.

- Raghavan, V. (2000). *Developmental Biology of Flowering Plants*, Springer-Verlag, New York, pp. 309–322.
- Razdan, M. K. (2003). *Introduction to plant tissue culture*. 2nd ed. Science Publishers. Inc. Enfield, NH., p.388
- Rivero, R. M., V. Shulaev, E. Blumwald (2009). Cytokinin-dependent photorespiration and the protection of photosynthesis during water deficit. *Plant Physiol*, 150, 1530-1540.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 431-449
- San-José, M.C., E Corredoira, M. T. Martínez, N. Vidal, S. Valladares, R. Mallón, A. M. Vieitez (2010). Shoot apex explants for induction of somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* L. trees. *Plant Cell Rep*, 29, 661-671.
- Schroder, G., E. Lanka (2005). The mating pair formation system of conjugative plasmids—A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid*, 54, 1–25.
- Segura, J. (2000). Citoquininas. En: Azcón-Bieto J., M. Talón (eds.) *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill, Madrid, Spain, pp. 341-375.
- Sharma, K. K., P. Bhatnagar-Mathur y T. A. Thorpe (2005). Genetic transformation technology: status and problems. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 41, 102-112.
- Shindo, K. y H. Kamemoto (1963). Karyotype analysis of some species of *Phalaenopsis*. *Cytologia*, 28, 390–398.
- Siva, R., C. Rajasekaran, G. Mudgal (2009). Induction of somatic embryogenesis and organogenesis in *Oldenlandia umbellata* L., a dye-yielding medicinal plant. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 98, 205-211
- Skoog, F. y C.O. Miller (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol*, 11, 118-131.
- Sonti, R.V., M. Chiurazzi, D. Wong, C.S. Davies, G.R. Harlow, D.W. Mount, E.R. Signer (1995). *Arabidopsis* mutants deficient in T-DNA integration. *Proc Natl Acad Sci*, 92, 11786–11790.

- Stachel, S. E., E. Messens, M. Van Montagu, P. Zambryski (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 318, 624–629.
- Stachel, S. E. y E. W. Nester (1986). The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J*, 5, 1445–1454.
- Stewart, J y M. Griffiths (1995). *Manual of orchids*. Timber press, Portland, Oregon
- Strnad, M., J. Hanuš, T. Vaněk, M. Kamínek, J. A. Ballantine, B. Fussell, D. E. Hanke (1997). Metatopolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x Canadensis* Moench, cv. Robusta). *Phytochem*, 45, 213-218.
- Sugiyama, M. (2000). Genetic analysis of plant morphogenesis *in vitro*. *Int. Rev. Cytol*, 196, 67-4
- Sul, I. W. y S. S. Korban (2005). Direct shoot organogenesis from needles of three genotypes of *Sequoia sempervirens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 80, 353-358.
- Sweet, H. R. (1980). The genus *Phalaenopsis*. The orchid digest, Pomona, CA.
- Tanaka, M., A. Hasegawa y M. Goi (1975). Studies on the clonal propagation of monopodial orchids by Tissue Culture. I. formation of protocormo-like bodies from leaf tissues in *Phalaenopsis* and *Vanda*. *Journal Jap. Soc. Hort. Sci*, 44, 47.
- Tempe' J, y Petit A (1982). *Opine Utilization by Agrobacterium*. New York: Academic.
- Tenea, G.N., J. Spantzel, L.Y. Lee, Y. Zhu, K. Lin, S.J. Johnson, S.B. Gelvin (2009). Overexpression of several arabidopsis histone genes increases *Agrobacterium*-mediated transformation and transgene expression in plants. *Plant Cell*, 21, 3350–3367.
- Teob, E. S. (1989). *Orchids of Asia*. Singapore: times books international. pp. 125–134.
- Tian G. W., A. Mohanty, S. N. Chary, S. Li, B. Paap, G. Drakakaki, C. D. Kopec, J. Li, D. Ehrhardt, D. Jackson, S. Y. Rhee, N. V. Raikhel, V. Citovsky (2004). High-throughput fluorescent tagging of full-length *Arabidopsis* gene products in planta. *Plant Physiol*, 135, 25–38.
- Thorpe, T. A. (1982). Callus organization and de novo formation of shoots roots and embryos *in vitro*. In: Tomes, D. T.; Ellis, B. E.; Harney, P. M. Application of plant

- cell and tissue culture to agriculture and industry. Guelph: University of Guelph, pp. 115-138.
- Thorpe, T. A. (1994). Morphogenesis and regeneration. In: Vasil, I. K. y T. A., Thorpe, eds. Plant cell and tissue culture. Dordrecht: Kluwer Academic Publications.
- Tokuhara, K. y M. Mii (1993). Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. Plant Cell Rep, 13, 7-11.
- Tokuhara, K. y M. Mii (2001). Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant, 37, 457-461.
- Torrey, J. G. (1966). The induction of organized development in plants. Adv. Morphogen, 5, 39-91.
- Tran Than Van, K. (1980). Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. Int. Rev. Cytol. Suppl., 11A, 175-194.
- Tran Than Van, K. (1981). Control of morphogenesis in *in vitro* cultures. Annu. Rev. Plant Physiol, 32, 291-311.
- Tran Than Van, K. y H. Trinh (1978). Morphogenesis in thin cell layers; concept, methodology, and results. In: Thorpe, T. A., ed. Frontiers of plant tissue culture. Calgary: University of Calgary Printing Services. pp. 37-48.
- Tzfira, T., T. Kunik, Y. Gafni, V. Citovsky (2006). Mammalian cells. Methods Mol Biol, 344, 435-451.
- Tzfira, T., J. Li, B. Lacroix, V. Citovsky (2004). *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. Trends Genet, 20, 375-383.
- Tzfira, T., M. Vaidya, V. Citovsky (2001). VIP1, an *Arabidopsis* protein that interacts with *Agrobacterium* VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity. EMBO J 20: 3596-3607.
- Tzfira, T. y V. Citovsky (2006). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Biotechnology, 17, 147-154.
- Uzé, M., I. Potryskus y C. Sautter (2000). Factors influencing T-DNA transfer for *Agrobacterium* to preculture immature wheat embryos (*Triticum aestivum* L.). Plant Science, 130, 17-23.
- Vergunst, A.C., B. Schrammeijer, A. Den Dulk-Ras, C.M.T. de Vlaam, Regensburg, T.J. Tuink, P.J.J. Hooykaas (2000). VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. Science, 290, 979-982.

- Voller, J., M. Zatloukal, R. Lenobel, K. Doležal, T. Béres, Kryštof, L. Spichal, P. Niemann, P. Džubák, M. Hajdúch, M. Strnad (2010), Anticancer activity of natural cytokinins: A structure-activity relationship study. *Phytochem*, 71, 1350-1359.
- Ward, E., W. Barnes (1988). VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 50 end of T-strand DNA. *Science*, 242, 927-930.
- Webb, K. J. y P. Morris (1992). Methodologies of plant transformation. pp. 7- 43.
- Weng, Y., Y. S. Park, M. J. Krasowski (2010) Managing genetic gain and diversity in clonal deployment of white spruce in New Brunswick, Canada. *Tree Genet Genomes* 6:367-376.
- White, P. R., A. C. Braun (1942). A cancerous neoplasm of plants: autonomous bacteria-free crown gall tissue. *Cancer Res*, 2, 597-617.
- Williams, R. R. (1993). Mineral nutrition *in vitro*- A mechanistic approach. *Aust. Bot*, 41, 237-251.
- Winans, S.C., R.A. Kerstetter, E. W. Nester (1988), Transcriptional regulation of the *virA* and *virG* genes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 170, 4047-4054.
- Wolanin, P. M., P. A. Thomason, J. B. Stock (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol*, 3, 3013
- Woodard, J. W. (1951). Some chromosome numbers in *Phalaenopsis*. *Amer. orchid soc. bull*, 20, 356-358.
- Woodward, A.W. y B. Bartel (2005). Auxin: Regulation, action, and interaction. *Ann Bot*, 95, 707-735
- Yeoh, Ch., M. Balcerowicz, R. Laurie, R. Macknight Y J. Putterill (2011). Developing a method for customized induction of flowering. *BMC Biotechnology* , 11, 36.
- Yi, H., K. S. Mysore, S. B. Gelvin (2002). Expression of the *Arabidopsis* histone H2A-1 gene correlates with susceptibility to *Agrobacterium* transformation. *Plant J*, 32, 285-298.
- Young, P. S., H. N. Murthy, P. K. Yoeup (2000). Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 63, 67-72.
- Zhang, S. y P.G. Lemaux (2004). Molecular analysis of *in vitro* shoot organogenesis. *Crit. Rev. Plant Sci*, 23, 325-335.

Zheng, Y., X.W. He, Y.H. Ying, J.F. Lu, S.B. Gelvin, H.X. Shou (2009). Expression of the *Arabidopsis thaliana* histone gene *AtHTA1* enhances rice transformation efficiency. *Mol Plant*, 2, 832–837

Zimmenmar, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The plant cell*, 5, 1411-1423.

Zolman, B. K., A. Yoder, B. Bartel (2000). Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genet*, 156, 1323-1337.

<http://Davesgarden.Com.10/06/09>

<http://www.orchidsonline.com.au/node/7893>

<http://articulo.mercadolibre.com.mx17-09-2009>

[info@floradeltropico.com17-09-2009](mailto:info@floradeltropico.com17-09-2009)

<http://www.bedfordorchids.com/17-09-2009>

[www.olx.com.ar17-09-2009](http://www.olx.com.ar17-09-2009)

[info@floradeltropico.com17-09-2009](mailto:info@floradeltropico.com17-09-2009)

<http://articulo.mercadolibre.com.mx/17-09-2009>

[info@floradeltropico.com17-09-2009](mailto:info@floradeltropico.com17-09-2009)

<http://www.orchidsupplies.net/17-09-2009>



## ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE MORFOGÉNESIS *in vitro* DE *Phalaenopsis zuma's pixie*

### 2.- INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos principales del estudio de cultivo de tejidos es el desarrollo de protocolos para regenerar plantas completas a partir de células, callos y protoplastos. Esto se ha logrado en muchos y diversos tipos de plantas, incluyendo un número de especies de orquídeas. En estas últimas, por ejemplo, Chen (*et al.*, 1999) logró la embriogénesis somática indirecta de *Cymbidium ensifolium* var. *Misericors*, y la directa a partir de tejido foliar en *Oncidium* (Chen *et al.*, 2000).

La orquídea *Phalaenopsis* tiene un alto valor comercial en la producción de flor de corte y como planta de interior en el mercado internacional de flores. Los protocolos de cultivo *in vitro* convencional en este género han sido desarrollados con el propósito de propagar las plantas a través de la formación de cuerpos parecidos a protocormos, la multiplicación de brotes y callos (Tanaka *et al.*, 1975; Arditti y Ernst 1993; Tokuhara y Masahiro 1993; Ernst 1994; Chen y Piluek 1995; Duan *et al.*, 1996; Ishii *et al.*, 1998; Islam y Ichihashi 1999; Chen *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2000; Tokuhara y Mii 2001; Park *et al.*, 2002).

Algunos autores han reportado con frecuencia la formación de callos a partir de tejido de hoja como una fase intermedia antes de la embriogénesis somática o producción de cuerpos parecidos a protocormos (Ishii *et al.*, 1998). Sin embargo, en este género es deseable lograr la embriogénesis somática directa sin formación de callo, ya que acorta el período de tiempo necesario para la regeneración de plantas y reduce la posibilidad de que ocurra la variación somaclonal.

## 2.1.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1.1.-PROPAGACIÓN *in vitro* de *Phalaenopsis zuma's pixie*

La procedencia del material biológico de *Phalaenopsis* es el Orquidiario Río Verde, ubicado en Temascaltepec, Estado de México. Dicho material ha sido mantenido y propagado *in vitro* por el grupo del Dr. Andrew James en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán. La propagación del material referido se realizó mediante organogénesis de brotes adventicios, bajo condiciones estériles, en medio Phytamax® suplementado con AIA 28.06µM y BAP 26.6 µM, dosificado a razón de 30 ml de medio por cada frasco de vidrio de 100 mL de capacidad (Gerber). Las condiciones de cultivo fueron fotoperiodo 16 h luz: 8h oscuridad, 26±2°C; el medio se renovó cada 30 días.

### 2.1.2.-SELECCIÓN DEL EXPLANTE

Para la inducción de organogénesis y embriogénesis somática se seleccionó hojas de plántulas de *Phalaenopsis zuma's pixie* propagadas *in vitro* mediante organogénesis. Las plántulas contaban con 6 meses de edad en el cultivo (Figura 2.1).



Figura 2.1. Plántula de *Phalaenopsis zuma's pixie* de seis meses de edad en medio phytamax®.

### 2.1.3.- INDUCCIÓN DE ORGANOGÉNESIS Y EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Los experimentos de inducción consistieron en inocular tres hojas, segmentadas en porciones apical, medio, y basal (Figura 4) de *Phalaenopsis zuma's pixie*, por caja petri, que contenía 25 ml de medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962) a la mitad de su concentración de sales, adicionado con peptona ( $1.0 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( $170 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), y TDZ (0, 2.5, 5, 10,  $12.5 \mu\text{M}$ ) o BAP (0, 2.5, 5, 10,  $12.5 \mu\text{M}$ ). Se realizaron 3 experimentos independientes, cada experimento consistió de 3 réplicas por cada concentración de los dos reguladores de crecimiento probados. Las condiciones de cultivo, fueron  $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , fotoperiodo 16 h luz/ con lámpara fluorescente de luz de día de 39 W.

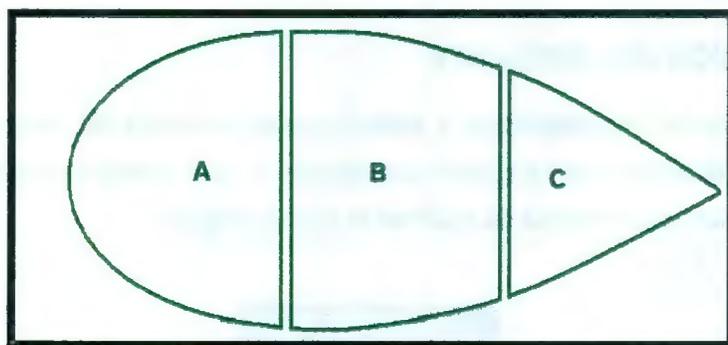


Figura2.2. Hoja de *Phalaenopsis* a) parte apical; b) parte media y c) parte basal.

### 2.1.4.- DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron tres experimentos independientes. Por experimento, un total de 45 explantes de hoja, cada una seccionada en tres porciones, apical, media y basal, fueron distribuidos en cajas Petri, con tres explantes por caja. Se probaron dos tratamientos de las citocininas sintéticas, TDZ y BAP, examinándose 4 concentraciones por regulador de crecimiento con 3 réplicas por concentración. Cada replica consistió de tres cajas petri, cada una conteniendo 3 explantes de hoja segmentados en 3 porciones (Figura 2.2). Las variables analizadas fueron la respuesta a formación de brote o embriones somáticos, de cada sección de lo explantes foliares, a las concentraciones de tratamiento probadas para las dos citocininas sintéticas (cuadro 2.1). Los experimentos desarrollados utilizaron un diseño de bloques completamente al azar. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza utilizando el programa estadístico MSTAT-C. La comparación de medias de los tratamientos se efectuó mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan a un nivel de significancia de  $P < 0.05$ .

**Cuadro 2.1. Concentraciones de citocininas sintéticas para evaluar la morfogénesis de *Phalaenopsis zuma's pixie***

Tratamiento	BAP[ $\mu\text{M}$ ]	Tratamiento	TDZ[ $\mu\text{M}$ ]
1 (control)	0	1(control)	0
2	2.5	6	2.5
3	5.0	7	5.0
4	10	8	10
5	12.5	9	12.5

### 2.1.5. - HISTOLOGÍA DE LA MORFOGÉNESIS

Con la finalidad evaluar la respuesta del tejido foliar al cultivo *in vitro* y confirmar el origen de los embriones somáticos formados, se realizó el análisis histológico del material colectado a las 4 semanas de su inducción. Para ello, el material se fijó en solución de FAA (2 partes de formaldehído: 10 partes de etanol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial: 7 partes agua destilada (v/v), después, el material se deshidrató en una serie ascendente de concentración de etanol al 30%, 50%, 70%, 85%, y 96% (v/v), respectivamente; luego se impregnaron en parafina disuelta a  $60^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Los materiales impregnados se utilizaron para realizar secciones de 3 a 5 micras de espesor en un micrótopo (Micotom HM340E), mismas que se montaron en portaobjetos limpios. Las secciones fueron desparafinadas con dos inmersiones de 10 min c/u de Xileno, e hidratadas en serie descendente de concentración de etanol, 96%, al 50% y al 30% x 2 min respectivamente. Se dejaron secar en estufa a  $42^{\circ}\text{C}$  x toda la noche, y después se prosiguió a la tinción de los cortes. Los cortes histológicos fueron teñidos con doble tinción de Ácido periódico-Schiff (APS) + Azul-Negro de Naftol.

### 2.1.6.- REGENERACIÓN DE LAS PLANTAS

Los embriones somáticos y los brotes que se formaron a partir del tejido foliar fueron transferidos, a los  $\approx 70$  días, a medio MS libre de hormonas, allí permanecen bajo condiciones de fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad a  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$  hasta que terminen de desarrollarse, después de alrededor de 30 días, las plantitas se transfieren a medio Phytamax® con reguladores de crecimiento,  $28.6\mu\text{M}$  de AIA y  $26.6\mu\text{M}$  de BAP, donde permanecen alrededor de 1.5 meses, el medio se renueva al mes, hasta que desarrollaron raíces y alcanzan un tamaño de aproximadamente 3 cm de altura. Después de lo cual, se dejan crecer durante aproximadamente 4 meses en medio Phytamax® sin reguladores de crecimiento, hasta alcanzar un tamaño de casi 6 cm (Figura 2.3), luego pasan a aclimatación. Para la aclimatación, las plantitas son lavadas con agua destilada

para eliminar el medio de cultivo, y son sembradas en macetas que contienen una mezcla de sustrato constituido por 1 parte de corteza de árbol: 1 parte de carbón vegetal: 1 parte de piedra volcánica: 1 parte de arcilla, la maceta se cubre con una bolsa de plástico con perforaciones para crear un ambiente de humedad para la plantulita por espacio de 2 semanas, después de lo cual se remueve la bolsa, la aclimatación se lleva a cabo en un sembradero con malla reductora de la irradiación solar en un 40%, con riego semanal.

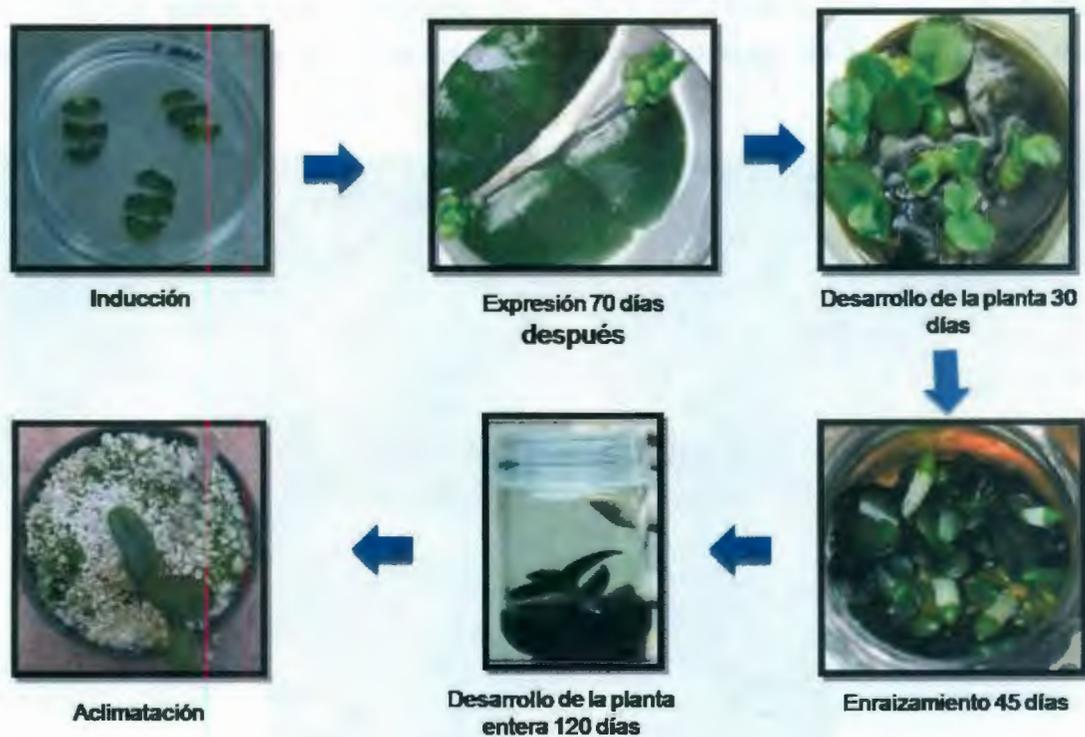


Figura 2.3.- Etapas del desarrollo de *Phalaenopsis zuma pixie*, mediante organogénesis directa, tiempo estimado del desarrollo de *Phalaenopsis zuma pixie* 9 meses

## 2.2. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.2.1.- PROPAGACIÓN

Durante la propagación de *Phalaenopsis zuma's pixie*, se logró 30 días después de iniciado el cultivo obtener brotes, con una tasa de multiplicación de 3 brotes por explante, en medio Phytamax® adicionado con AIA 28.06 $\mu$ M y BAP 26.6  $\mu$ M, y bajo condiciones de fotoperiodo 16 h luz y 26  $\pm$ 1 °C (Figura 2.4). Después de seis meses de cultivo se alcanzó obtener ~ 60 plántulas; mismas que se utilizaron para los experimentos posteriores.



Figura 2.4. Propagación de *Phalaenopsis zuma's pixie* (a) y (b) Brotes adventicios de,(c) propagación del material vegetal.

### 2.2.2. - EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA

La respuesta de los tejidos foliares de *Phalaenopsis zuma's pixie* a la inducción con diferentes concentraciones de citocininas sintéticas, TDZ y BAP, fue opuesta según el regulador. Así, el TDZ promovió la embriogénesis somática directa sobre los tejidos foliares, resultado que aquí se discute, en tanto que el BAP a las concentraciones probadas suscitó la formación de brotes mediante organogénesis indirecta con la formación de un callo moderado del cual se diferenciaron los brotes, que se discute en el inciso 2.2.3.

En presencia de TDZ y después de cerca de 30 días de cultivo bajo condiciones de fotoperiodo en luz indirecta, el tejido foliar de *Phalaenopsis zuma's pixie*, presentó la formación de pequeños embriones somáticos directamente sobre la superficie adaxial del tejido, mismos que triplican su tamaño hacia los 60 días del cultivo (Figura 2.5a y b), respectivamente. Esta respuesta fue más evidente hacia los bordes de las heridas realizadas en los explantes, al seccionar cada lamina foliar en tres partes. La respuesta embriogénica del tejido foliar al TDZ, entendida esta como frecuencia de explantes que formaron embriones, estuvo en el rango de 55 al 100% (Cuadro 2.2). El efecto del TDZ sobre los diferentes segmentos foliares no mostró diferencias significativas, excepto para la menor concentración, 2.5  $\mu\text{M}$ , en las zonas apical y media. Asimismo, al considerar el número total de embriones somáticos (ES), se encontró que la mejor respuesta produjo 16.8 a 21.2 ES por hoja, con un promedio de 8 embriones por segmento apical y basal de la lámina foliar, a las concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{M}$  de TDZ, respectivamente. Cabe señalar, que hubo un número significativamente menor de embriones (4.8 ES) formados en el segmento medio de la lámina foliar, siendo de entre 1.4 a 4.8 ES. En general, nuestros resultados coinciden con lo reportado en la literatura para otras especies de *Phalaenopsis* (Chen y Chang, 2006), no obstante, en relación al número total de ES por lamina foliar, nosotros obtuvimos valores ligeramente mayores que los reportados por Chen y Chang (2006), siendo que ellos no seccionaron los explantes foliares, y además, la respuesta de embriogénesis directa que obtuvimos fue a menores concentraciones de TDZ y sin necesidad de adicionar auxina al medio de inducción, estos resultados también están soportados por el reporte de Chung *et al.*, 2005.

Así mismo, observamos que las respuestas estaban más representadas en la zona apical de la hoja, y cerca de los cortes, en condiciones de fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Otra razón para considerar más adecuado el uso de  $5 \mu\text{M}$  a  $10 \mu\text{M}$ , es que en esta última concentración las plantas obtenidas por embriogénesis somática presentaron una deformación en sus hojas. Con  $2.5 \mu\text{M}$  de TDZ mostraron porcentajes de embriogénesis somática muy baja, al igual que  $12.5 \mu\text{M}$ , en la parte apical y media.

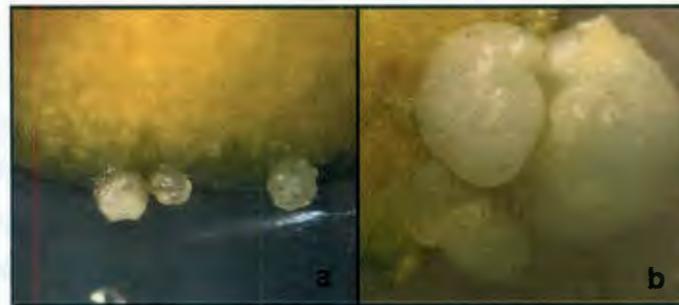


Figura 2.5. Embriogénesis somática directa sobre tejido foliar de *Phalaenopsis zuma's pixie*, a) pequeños embriones a los 30 días de cultivo *in vitro* en presencia de TDZ, b) embriones a los 60 días de cultivo del tejido.

**Cuadro 2.2.-Efecto del TDZ en la formación de embriones somáticos sobre tejido foliar de *Phalaenopsis zuma's pixie*.** El porcentaje de explantes que formaron embriones somáticos, % E, y el número promedio de embriones por explante, # ES, se analizó a los 60 días de iniciado el cultivo. Promedio de tres experimentos independientes, con un total de 135 explantes foliares, los valores con la misma letra no difieren significativamente a una P≤0.05 (Duncan, 1955).

Formación de embriones somáticos (ES)							
REGULADOR DE CRECIMIENTO Citocinina (µM)		RESPUESTA DE LOS SEGMENTOS DE TEJIDO FOLIAR					
		APICAL		MEDIA		BASAL	
		# ES	% E	# ES	% E	# ES	% E
Control	0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
TDZ	2.5	1.5 (c)	66 (bc)	1.4 (c)	55(c)	1.3 (c)	88.67 (ab)
	5	7.0 (ab)	100 (a)	4.8 (ab)	100(a)	5.5 (ab)	88.67 (ab)
	10	8.3 (a)	100(a)	4.8 (ab)	100(a)	8.1 (a)	100(a)
	12.5	3.3 (abc)	88.67 (ab)	2.7 (bc)	77.33 (abc)	6.3 (ab)	88.67 (ab)

### 2.2.3.- ORGANOGÉNESIS *in vitro*

La respuesta de los tejidos foliares en presencia de BAP, y bajo condiciones de fotoperiodo luz indirecta, dio lugar a organogénesis indirecta con formación de un pequeño callo (*Figura 2.6*) del cual se diferenciaron brotes, esto sucedió alrededor de los 60 días después de haber sido inoculados en medio MS a diferentes concentraciones de BAP, 2.5, 5.0, 10.0 Y 12.5  $\mu\text{M}$ . En relación con la frecuencia de respuesta de los segmentos foliares, la zona apical presentó el 77.5% de formación de brotes, mientras que la zona basal presentó un 52.66%, con respecto a las concentraciones utilizadas la más óptima de nuestros resultados para la inducción a brotes fue 10  $\mu\text{M}$  de BAP mostrando entre 100% a 88.67% de respuesta por explante, seguido por 5  $\mu\text{M}$  de BAP que presenta de 88.67% a 60%. Teniendo un resultado mayor a lo reportado por Nayak *et al.*, 1997, donde a 44.38  $\mu\text{M}$  de BAP a los 63 días obtuvieron un 71% en respuesta organogénica y a 8.87  $\mu\text{M}$ , obtuvieron 11.6% de brotes regenerados. Así mismo al obtener el número de brotes por segmento foliar se observó que a 10  $\mu\text{M}$  de BAP, en la zona apical, se presentaron 5.6 brotes por segmento foliar, mientras que en suma de los tres segmentos a la misma concentración se presentaron 12.9, al contrario de Nayak *et al.*, 1997, que a 8.87  $\mu\text{M}$ , presentaron 1.6 brotes, y a 44.38  $\mu\text{M}$ , presentaron 14.5 brotes a las 9 semanas.

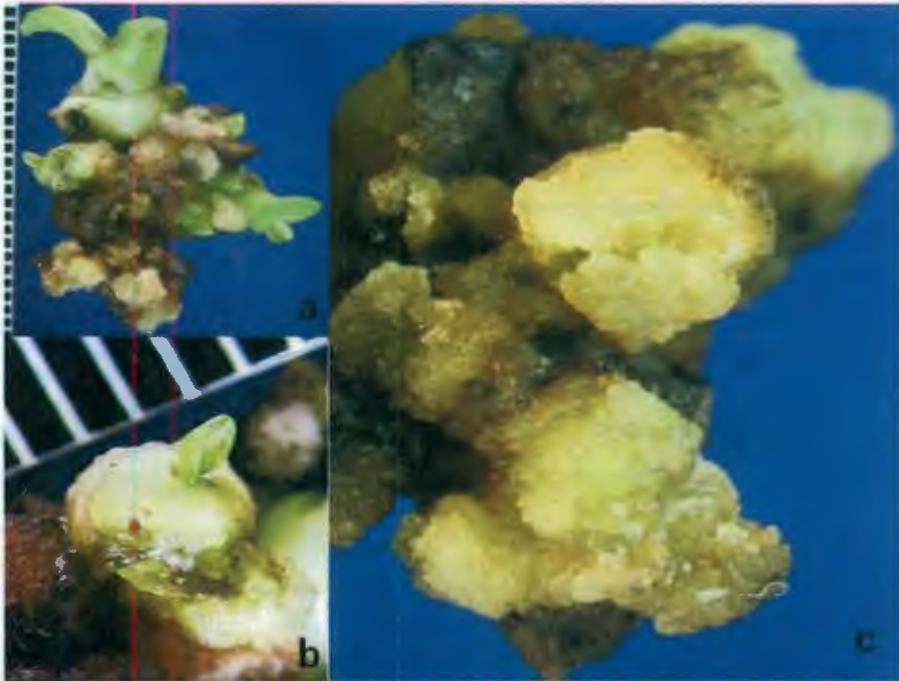


Figura 2.6. Organogénesis de *Phalaenopsis zuma's pixie* a) explante con organogénesis directa e indirecta, b) organogénesis directa con 5  $\mu\text{M}$  de BAP y c) formación de callo no embriogénico.

Cuadro 2.3.-Efecto del BAP en la regeneración de brotes sobre tejido foliar de *Phalaenopsis zuma's pixie*. El porcentaje de explantes que formaron brotes, % E, y el número promedio de brotes por explante, # ES, se analizó a los 60 días de iniciado el cultivo. Promedio de tres experimentos independientes, con un total de 135 explantes foliares, los valores con la misma letra no difieren significativamente a una  $P \leq 0.05$  (Duncan, 1955).

Formación de brotes por organogénesis (B)							
REGULADOR DE CRECIMIENTO Citocinina ( $\mu\text{M}$ )		RESPUESTA DE LOS SEGMENTOS DE TEJIDO FOLIAR					
		APICAL		MEDIA		BASAL	
		# B	%E	# B	%E	# B	% E
Control	0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
BAP	2.5	1.7(de)	55 (abc)	1.3 (de)	55 (abc)	2.4 (cd)	44.33 (bc)
	5	4.6 (ab)	88.67 (ab)	2.4 (cd)	66(ab)	4.0 (ab)	66.67(ab)
	10	5.6 (a)	100 (a)	3.7 (abc)	88.67 (ab)	3.6 (bc)	88.67 (ab)
	12.5	1.4 (de)	66.33(ab)	1.2 (e)	77.33 (ab)	0.1 (f)	11 (c)

#### 2.2.4. – HISTOLOGÍA

Mediante el análisis histológico de los tejidos foliares inducidos se corroboró, la formación de embriones somáticos directamente de la epidermis foliar, y organogénesis *in vitro* de la orquídea *Phalaenopsis zuma pixie*.

Este material fue previamente clasificado en el laboratorio de acuerdo a caracteres morfológicos. Se realizaron cortes histológicos a los 50 días de inducción (Figura 2.7) para observar pro-embriones o embriones bien formados, los cortes se realizaron de 3 a 5 micras de espesor. Así como también se observaron los callos no embriogénicos. En la Figura 2.6(a) se puede observar la presencia de células vacuoladas, con una gran cantidad de almidón; 10(c) se puede observar la estructura de un embrión somático en estadio globular; 10(d) se observa cómo tres embriones somáticos.

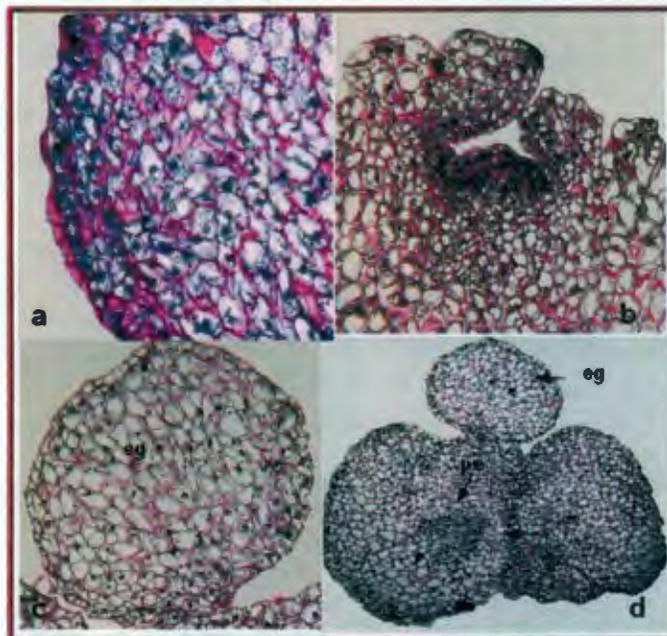


Figura 2.7. Cortes histológicos de *P. zuma's pixie*. a) Formación de células embriogénicas en la epidermis en oscuridad 40X, b) formación de pro-embriones 10X, c) embrión globular (eg) 40 X y d) formación de diferentes embriones, en la parte superior se puede ver la formación de un embrión globular, en la parte inferior izquierda se logra observar la formación de un pro-embrión (pe), dentro de otro embrión 10X.

### 2.2.5.- REGENERACIÓN DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES SOMÁTICOS Y/O BROTES

Para la regeneración de planta entera después de obtener embriogénesis somática directa y/o organogénesis directa e indirecta, estas fueron mantenidas en medio MS sin reguladores para su desarrollo en caso de embriones somáticos y en medio MS con BAP y TDZ para organogénesis, y posteriormente ambas fueron llevadas a medio Phytamax®, para la inducción de enraizamiento, como se observa las diferentes fases de desarrollo de la planta (Figura 2.8). Un año después estas fueron puestas en el invernadero, También se observó que las plantas que fueron inducidas con 10 µM de TDZ o más presentaron hojas deformes.



**Figura 2.8.** Inducción de embriogénesis somática de *Phalaenopsis zuma's pixie* (a) Hojas seccionadas en parte apical, media y basal, (b) Inducción a los 70 días, (c) respuesta a los 70 días, (d) la regeneración a partir de embriones y (e) el enraizamiento.

### 2.3. - CONCLUSIONES

- Se demostró que con la presencia de TDZ a una concentración de 5, 10 y 12.5  $\mu\text{M}$  fueron efectivas en la inducción del embrión somático directa de explantes de hoja de *Phalaenopsis zuma's pixie*.
- No se encontró diferencia significativa entre 5 y 10  $\mu\text{M}$  de TDZ en la inducción de embriones somáticos a partir de las tres diferentes secciones de la hoja. Sin embargo tampoco se observó una diferencia significativa en la parte apical y basal de la hoja a 12.5  $\mu\text{M}$ .
- El porcentaje más alto de embriones por explante fue en presencia de 10  $\mu\text{M}$  TDZ y fue del 8.32%
- Se observó que la parte apical y basal de la hoja muestran una respuesta mucho más favorable para la inducción a la embriogénesis somática con TDZ.
- Se demostró que con presencia de BAP las secciones de las hojas responden de diferente manera, dando una mejor respuesta la parte apical.
- 5.63% fue mayor porcentaje de organogénesis en presencia de 10  $\mu\text{M}$  BAP y fue en la parte apical de la hoja.
- Se logró observar diferentes estadios de embriones somáticos en los cortes histológicos realizados.
- Las condiciones de oscuridad durante los primeros 70 días de inducción permiten la formación de embriones somáticos.
- En presencia de 10  $\mu\text{M}$  TDZ, se obtuvo mayor número de embriones por explante, sin embargo, estos datos no presentaron una diferencia significativa con 5  $\mu\text{M}$ , por lo tanto se considera más adecuado el uso de 5  $\mu\text{M}$  para la inducción de la embriogénesis somática en *Phalaenopsis zuma's pixie*.
- Se obtuvieron plantas regeneradas a partir de embriones somáticos.

## 2.4. - REFERENCIAS

- Arditti, J. y R. Ernst (1993). Micropropagation of orchids. Wiley, New York
- Chen, J.T. y W.C. Chang (2005). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa* Shimadzu. *Bio. Plant*
- Chen, J. T., C. Chang, WC Chang (1999). Direct somatic embryogenesis and subsequent plant regeneration on leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey' *in vitro*. *Plant Cell Rep*, 19, 143-149.
- Chen, Y. CH., CH Chang y W. CH. Chang (2000). A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis in vitro* *Cell. Dev. Biol. Plant*, 36, 420-423.
- Chen, Y. y C. Piluek (1995). Effects of thidiazuron and n<sup>6</sup>-benzilaminopurine on shoot regeneration of *Phalaenopsis*. *Plant Growth Regul*, 16, 99-101.
- Chung, H.H., J.T. Chen, W.C. Chang (2005). Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium Chiengmai* Pink and subsequent plant regeneration. *In vitro – Plant*, 41, 765–769.
- Duan, J. M., H. Chen y S. Yazawa (1996). *In vitro* propagation of *Phalaenopsis* via culture of cytokinin-induced nodes. *Journal of Plant Growth Regulation*, 15, 133-137.
- Ernst, R. (1994) Effects of thidiazuron on *in vitro* propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (orchidaceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 39, 273-275.
- Ishii, Y., T. Takamura, M. Goi, y M. Tanaka, (1998). Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep*, 17, 446–450.
- Islam, M. O. y S. Ichihashi (1999). Effects of sucrose, maltose and sorbitol on callus growth of *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis* and *Neofinetia*. *Journal Jap. Soc. Hort. Sci*, 68, 1124-1131.
- Kuo, H. L., J.T. Chen y W. C. Chang (2005). Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* "Little Steve". *In vitro cell. Dev. Biol. Plant*, 41, 453–456.

- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 495–497.
- Nayak, N. R., S. Patnaik y S. P. Rath (1997). Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann. *Plant Cell Reports*, 16, 583-586.
- Park, S. Y., H. N. Murthy e K. Y. Paek (2002). Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 38, 168-172.
- Tanaka, M., A. Hasegawa y M. Goi (1975). Studies on the clonal propagation of monopodial orchids by tissue culture I. Formation of protocorm-like bodies from leaf tissues in *Phalaenopsis* and *Vanda*. *Journal Jap. Soc. Hort. Sci*, 44 47.
- Tokuhara, K. y M. Mii (1993). Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Rep*, 13, 7–11.
- Tokuhara, K. y M. Mii (2001). Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 37, 457-461.
- Young, P. S., H. N. Murthy y P. K. Yoeup (2000). Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 63, 67-72.

## ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE *Phalaenopsis zuma's pixie*

### 3.- INTRODUCCIÓN

Orquidácea es una de las familias de plantas con flores más grande y más distribuida alrededor del mundo; muchas de ellas son especies ornamentales comercialmente importantes por ejemplo: *Phalaenopsis*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Cattleya*, *Oncidium* y *Vanda*.

Los programas de mejoramiento se iniciaron en el siglo XIX, y han sido producidos un gran número de híbridos y cultivares de orquídeas hasta el momento, especialmente en géneros importantes en la horticultura como *Phalaenopsis*, *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Oncidium*, *Paphiopedilum* y *Vanda*. El objetivo de estos programas de mejoramiento ha sido la producción de nuevos cultivares con características deseables tal como el color de las flores, forma, resistencia a enfermedades, vida de anaquel y tamaño de la planta. En la práctica de cultivo de estas orquídeas, sin embargo, aún tienen muchos problemas tales como, enfermedades, plagas y condiciones ambientales desfavorables que provocan estrés los cuales no pueden ser resueltos con los esfuerzos de mejoramiento convencional mediante la utilización de las riquezas del germoplasma de esta familia. Como un suplemento a los programas de mejoramiento de orquídeas mediante la ingeniería genética es ahora utilizado para conferir nuevas y deseables características derivadas de especies relativamente distantes (Mii y Chin, 2010).

Hay dos sistemas de transformación usadas ampliamente para transferir genes foráneos dentro del genoma de la planta: el lanzamiento del gen directamente mediante el método bombardeo de partículas y mediante transformación por *Agrobacterium*.

La primera transformación estable y eficiente mediante *Agrobacterium* fue lograda en *Phalaenopsis* usando callos friables, derivados del cultivo vegetativo de brotes localizados en la inflorescencia (Belarmino y Mii, 2000). Un punto particularmente notable es que los callos fueron tratados con altas concentraciones (500  $\mu$ M) de acetosiringona durante el

periodo de co-cultivo (Belarmino y Mii, 2000). Subsecuentemente sus estudios demostraron que el remplazo de cefotaxima por meropenem (Ogawa y Mii, 2005, 2007), un novedoso antibiótico para la eliminación de bacterias incrementa el número de líneas de callos transgénicos recuperados de 5 a 10 por 1g de células iniciales después del cultivo con *Agrobacterium* (Sjahril y Mii, 2006). Los resultados sugieren que el meropenem no solo tiene una actividad antibacterial alta contra *Agrobacterium*, si no que no tiene un efecto fitotóxico en el caso de *Phalaenopsis* así como también en otras plantas (Sjahril y Mii, 2006; Ogawa y Mii, 2005, 2007). Este sistema de transformación también está dirigido a producir plantas transgénicas que contenían el gen de la defensina wasabi aislados de *Wasabia japonica* y las plantas transgénicas mostraron una resistencia exitosa a *Erwinia carotovora* que causa la enfermedad de raíz blanda (Sjahril *et al.*, 2006)

En la actualidad, no hay reportes de la eficiencia de las condiciones de transformación de *Phalaenopsis zuma's pixie*, por lo tanto en este trabajo se evaluaron diferentes parámetros para la transformación mediante *Agrobacterium*, usando al gen reportero GUS.

### 3.1.- MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1.1.- MATERIAL VEGETAL

Para la transformación genética se utilizaron tres diferentes explantes de *Phalaenopsis zuma's pixie*; hojas de plantas de aproximadamente 6 meses de edad cultivados en medio PHYTAMAX® complementado con AIA 28.06µM y BAP 26.6 µM en condiciones de fotoperiodo (16 hr luz y 8 hr oscuridad) a pH 5.6 así como también embriones somáticos y callos obtenidos a partir de hojas de *Phalaenopsis zuma's pixie* en medio MS (Murashige and Skoog, 1962) a mitad de concentración de sales, complementado con peptona (1000 mg L<sup>-1</sup>), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (170 mg L<sup>-1</sup>) con adición de TDZ (5, 10, 12.5µM) o BAP (5, 10, 12.5 µM), mantenidos en condiciones de fotoperiodo y oscuridad.

#### 3.1.2.- CEPA BACTERIANA

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada para la transformación fue LBA4404, que contiene al agente selectivo rifampicina 30mg/L y estreptomina 100mg/L (Hellens *et al.*, 2000), donada por el Dr. Gregorio Godoy de la unidad de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, la cual fue transformada con el plásmido pCAMBIA 1305.1 el cual contiene la región de ADN-T con los genes higromicina fosfotransferasa (*hpt*) bajo el control del promotor 35S del virus de mosaico coliflor, y GUS unido con el intrón de la catalasa bajo el control del promotor 35S (Figura 3.1) donado por el Dr. Santy Peraza Echeverría de la unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

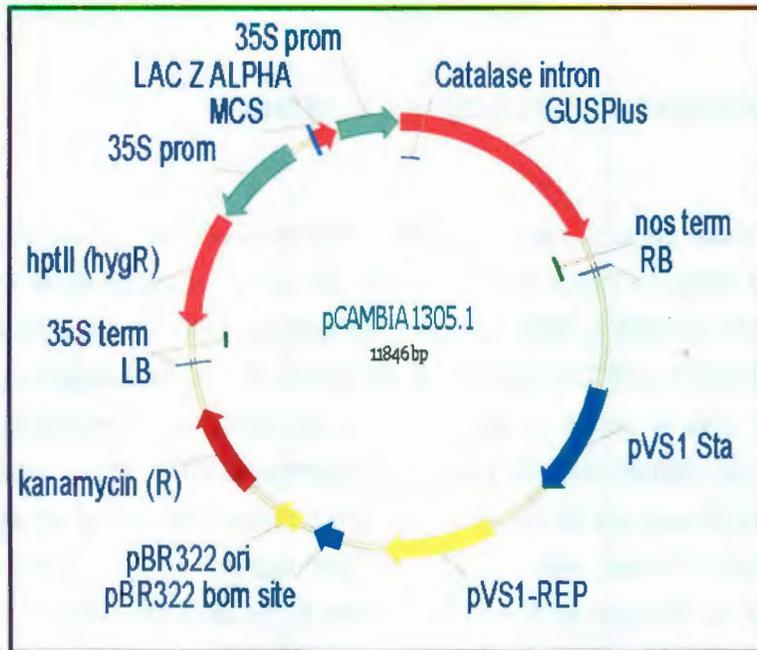


Figura 3.1. Vector binario pCambia 1305.1.

### 3. 1.3.- TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA BACTERIANA

El protocolo general para transformación después de la optimización de las condiciones fue como se indica a continuación. Se utilizaron cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  para clonar el plásmido pCAMBIA 1305.1 y posteriormente se cultivó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 a 28°C en medio LB sólido por 48 hrs, se escogió una colonia y se incubó durante toda la noche a 28°C en 5 ml de medio LB (Sambrook *et al.*, 1989), suplementado con rifampicina (10 mg/L), estreptomycin (100 mg/L), y se mantuvieron con agitación a 200 rpm por 24 hrs. Se resembró 1 ml de este inóculo en 40 ml de medio LB fresco, hasta obtener una OD<sub>600nm</sub> de 1.0 (aprox. 30 hrs). Tras una primera centrifugación a 10 000 rpm en frío (4°C) durante 5 min para concentrar las bacterias, la suspensión se sometió a tres lavados con 10 ml de 1 mM HEPES y después de resuspender el precipitado, se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min a 4°C. Posteriormente se resuspendió el precipitado en 500  $\mu$ l de 1 mM HEPES transfiriéndose a tubos eppendorf. Se centrifugaron de nuevo a 10 000 rpm durante 5 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavaron los precipitados con glicerol estéril al 10%. Se centrifugó de nuevo, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 200  $\mu$ l de glicerol al 10%. Esta suspensión se repartió en volúmenes de 40  $\mu$ l en microtubos, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su empleo.

El procedimiento de transformación por electroporación hace uso de un pulso de corriente de gran voltaje que desestabiliza temporalmente la membrana de las células y permite la entrada de material genético. El tratamiento previo de las células, descrito anteriormente, facilita la formación de poros en la membrana que aumentan la eficiencia del proceso. Los plásmidos a introducir se purificaron utilizando el kit QIA prep® Spin Miniprep y se estimó su concentración mediante un espectrofotómetro SmartSpect Plus de biorad. Este proceso de transformación de las colonias preparadas con el protocolo descrito anteriormente consistió en la incubación en hielo de 40  $\mu$ l de medio con *A. tumefaciens* de células electrocompetentes durante 2 min con 0.5, 1, 1.5, 2 y 4  $\mu$ l de plásmido a una concentración de 105.22 $\mu$ g/ml (aprox. 0,1  $\mu$ g de ADN). Al cabo de este

tiempo de incubación se transfirió la mezcla a cubetas de electroporación de 1 cm de ancho (Equibio, Kent, GB) y se sometieron a un pulso de corriente con un voltaje de 2.5 KV, 400 W de resistencia y 25  $\mu$ F de intensidad. Después del pulso eléctrico se recogió la mezcla de la cubeta en 1 ml del medio YM y se incubó en agitación a 26°C durante 2 h. Al cabo de ese tiempo se sembró una alícuota (200  $\mu$ l) en placas de medio LB suplementado con un antibiótico marcador y se incubó durante dos días a 26°C. Se observó la aparición de colonias y se escogieron 10 para su análisis posterior. La electroporación se llevó a cabo en el aparato Gene Pulser II System (Bio-Rad, CA, EE.UU.).

### 3. 1.4.- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO

Para la comprobación de la transformación de la cepa bacteriana de *A. tumefaciens*–LBA4404 con el plásmido pCAMBIA1305.1, se realizaron mini preparaciones de ADN plasmídico con el kit QIA prep ® Spin Miniprep, de las colonias que se cultivaron con anticipación, el plásmido se re suspendió en agua ultra pura, y se realizó mediante análisis por PCR con cebadores específicos 5'-ACAGCGTCTCCGACCTGATGCA-3' y 5'-AGTCAATGACCGCTGTTATGCG-3' (Mishiba, *et al.*, 2005) que amplifican un fragmento de 0.59 kb del gen de higromicina (*hpt*).

### 3. 1.5.- TRANSFORMACIÓN DE *Phalaenopsis zuma's pixie*

A causa de que las orquídeas son monocotiledóneas y que el proceso de infección mediante *Agrobacterium* es más eficiente en dicotiledóneas (De Cleene y De Ley, 1976) y que no hay reportes de la transformación de este doble híbrido ni de sus progenitores, se probaron 4 diferentes tratamientos para la transformación de *Phalaenopsis Zuma's pixie*, con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* y los diferentes explantes (Cuadro 3.1). Para la transformación de callos, embriones somáticos y hojas de *Phalaenopsis* se le dio una preparación a la cepa de *A. tumefaciens* agregándole 100 $\mu$ M, de acetosiringona (As) y se deja toda la noche, consecutivamente se centrifuga la bacteria y la pastilla se resuspende en medio fresco, se le agrega 200  $\mu$ M de AS y se deja crecer por 18 hrs aproximadamente, seguido se midió la densidad óptica de la bacteria con ayuda de un espectrofotómetro y se ajustó está a la deseada con diluciones en medio fresco (0.2 o 0.5

D.O.<sub>600nm</sub>), en cajas petri se coloca 30 ml de medio con la bacteria cubriendo los explantes, se somete a vacío por 20 minutos y después de esto se les elimina el exceso de bacteria secando a los explantes con toallas absorbentes estériles, seguido son depositados en medio Murashige y Skoog, 1962, sin reguladores y sin antibióticos, se mantuvieron en oscuridad por 3 días a 28°C, posteriormente los explantes se pasan a medios frescos conteniendo 100 mg/l de cefatoxima y 1 mg/L de higromicina. El medio se cambia si se observa crecimiento bacteriano. Los explantes son analizados 5, 10 y 15 días después de la infección, con la prueba de Gus, se sumergieron en una solución con el sustrato X-Gluc (50mM de NaPO<sub>4</sub>, pH 7.0; 10mM de Na<sub>2</sub> EDTA y 5 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D- ácido glucuronido ciclo hexil sal de amonio) por 24h a 37°C, después se decoloraron con etanol al 70% y se observaron los resultados.

Cuadro 3.1. Tratamientos (T) en utilizados en el proceso de transformación de *P. zuma's pixie* con cultivo. T1 sin papel filtro a una DO<sub>600nm</sub> de 0.2; T2 sobre papel filtro y DO<sub>600nm</sub> de 0.2; T3 sin papel filtro y una DO<sub>600nm</sub> de 0.5 y T4 sobre papel filtro y una DO<sub>600nm</sub> de 0.5.

Tratamiento	Papel filtro	0.5 DO <sub>600nm</sub>	0.2 DO <sub>600nm</sub>
1	-	-	✓
2	✓	-	✓
3	-	✓	-
4	✓	✓	-

Para la infección se cortaron explantes de hojas de aproximadamente un centímetro cuadrado, y se les hicieron pequeñas heridas con una aguja, para facilitar la infección, en el caso de los callos se eligieron aquellos de aproximadamente un centímetro cubico y en el caso de las hojas que tenían embriones se cortaron los bordes de los embriones o las hojas con el fin de que todos los explantes tuvieran aproximadamente el mismo diámetro.

Posteriormente los explantes se colocaron en una caja petri que contenían 10 ml de medio MS sin reguladores y sin antibióticos a pH 5.2 y se les añadió un volumen restante de este y el volumen bacteriano dependiendo de la  $DO_{600nm}$  (0.2 y 0.5) con el que se fuera a trabajar, para ajustar a un volumen total de 20 ml, después de ello se sometieron los co-cultivos a vacío durante 20 minutos, seguido se les quito el exceso de bacteria a los explantes con papel absorbente estéril, luego estos explantes fueron puestos en medio MS solido sin reguladores y sin antibióticos por los siguientes tres días (Sreeramanan, *et al.*, 2008) a  $26\pm 1^{\circ}C$ .

Después del co-cultivo de tres días los explantes se dejaron un día más en medio MS liquido con cefotaxima (100mg/L) y sin reguladores (*Figura 3.2*) para eliminar el exceso de bacterias, al siguiente día estos explantes se les elimino el exceso de medio con ayuda me toallas estériles, posteriormente fueron transferidos a cajas petri con medio MS solido a pH 5.2 complementado con cefotaxima 100mg/L e higromicina 1mg/L, antes de realizar la transformación se realizó una curva de sensibilidad de *Phalaenopsis zuma's pixie* a higromicina y se observó que a 3 mg/L las plantas presentaban su límite de tolerancia, ya que con más de esta cantidad de antibiótico, los explantes foliares presentaron muerte (*Figura 3.3*).



**Figura 3.2.** Tratamiento 3: Hojas de *Phalaenopsis zuma's pixie* en medio MS con cefatoxima para eliminar el exceso de bacteria

Sin embargo como los explantes fueron estresados debido al co-cultivo con la bacteria y a los tratamientos, se agregó 1 mg/L de higromicina cada mes al medio hasta llegar a 3 mg/L después de la infección.

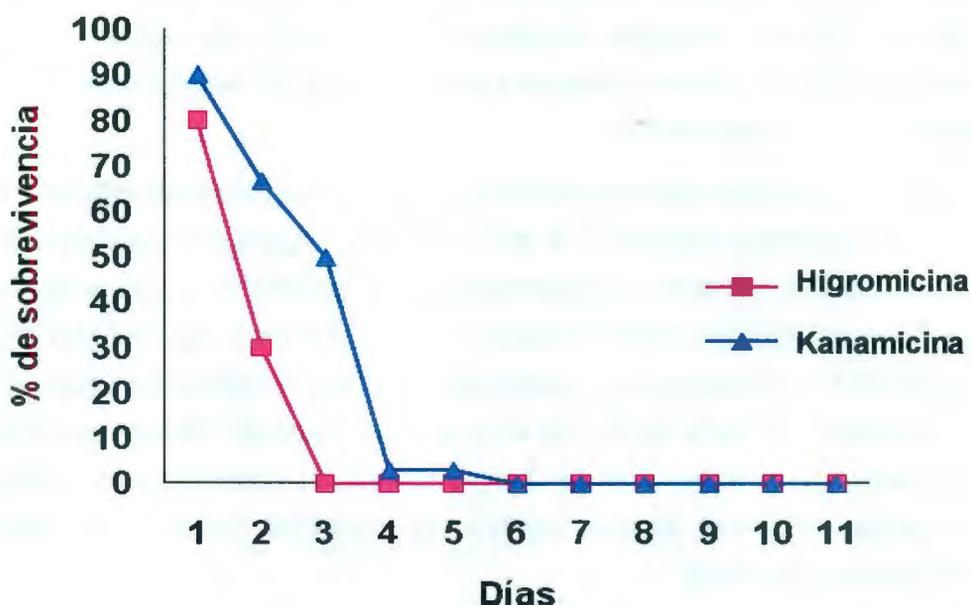


Figura 3.3. Curva de sensibilidad de *P. zuma's pixie* hacia higromicina y kanamicina

### 3. 1.6.- ENSAYO DE GUS

Después de la infección de los embriones somáticos, callos y las hojas, se realizaron las pruebas histoquímicas a 5, 10 y 15 días después del co-cultivo con la cepa LBA4404, para verificar la actividad de GUS (Jefferson, 1987), se sumergieron en una solución con el sustrato X-Gluc (50mM de NaPO<sub>4</sub>, pH 7.0; 10mM de Na<sub>2</sub> EDTA y 5 mg/ml 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D- ácido glucuronido ciclo hexil sal de amonio por 24h a 37°C. Posteriormente los explantes son decolorados los tres diferentes explantes con etanol 70

%, hasta poder observar los puntos azules, los cuales son evaluados con la ayuda de un estereoscopio.

### **3.1.7.- EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE INFECCIÓN**

Para obtener la frecuencia de infección de los explantes transformados, se realiza la siguiente operación.

$$\text{Frecuencia de infección} = \frac{\text{Numero de explantes teñidos} \times 100}{\text{Numero de explantes totales}}$$

Así al final se obtiene la relación del total de puntos azules / el número de explantes positivos.

### 3.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.2.1. -TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA LBA4404 MEDIANTE ELECTROPORACIÓN.

La transformación de la cepa LBA 4404 de *A. tumefaciens* con el plásmido pCAMBIA 1305.1 se realizó mediante el método de electroporación descrito por Den Dulk-Ras y Hooykaas, 1995. Se realizó la prueba de susceptibilidad de la bacteria a diferentes concentraciones de kanamicina antes y después de la transformación (Figura 3.4), para seleccionar la cantidad del inóculo de plásmido pCAMBIA 1305.1 con una concentración de 105.22  $\mu\text{M}/\text{ml}$  en la suspensión bacteria de 40  $\mu\text{L}$  a electroporar, se probaron 0.5, 1.0, 2.0 3.0 y 4.0  $\mu\text{L}$  de volumen de la solución donde estaba contenido el plásmido, en este caso el volumen de 2 $\mu\text{L}$  de plásmido fue el que mostro una mayor cantidad de colonias llegando a 0.7 DO<sub>600nm</sub> a las 48 hrs después de haber sido transformadas y sembradas en medio LB con rifampicina (10mg/L), estreptomomicina (100mg/L) y kanamicina (50 mg/L).

Se midió la densidad óptica a 600 nm de las bacterias resistentes

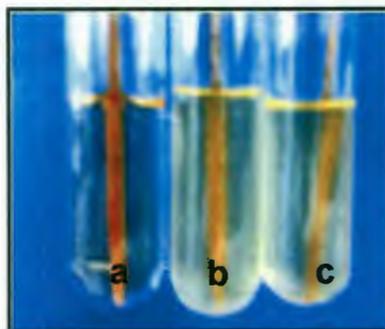


Figura 3.4. Crecimiento de *A. tumefaciens* a diferentes concentraciones de kanamicina a) Blanco; b) 50 mg/L y c) 100 mg/L.

### 3.2.2.- DETECCIÓN DE INTEGRACIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR

En el proceso de aislamiento y purificación de ADN plasmídico de la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* con el plásmido pCAMBIA 1305.1, por el método de extracción casero, el ADN plasmídico quedó con mucha cantidad de carbohidratos, en cambio con la utilización del kit la purificación del plásmido fue mucho más rápida y limpia, posteriormente se llevó a cabo el análisis por PCR utilizando los cebadores específicos 5'-ACAGCGTCTCCGACCTGATGCA-3' y 5'-AGTCAATGACCGCTGTTATGCG-3' (Mishiba, *et al.*, 2005)) que amplifican un fragmento del gen *hgm* (0.59 Kb) de higromicina (Figura 3.5).



Figura 3.5. PCR de *A. tumefaciens* transformadas: Se amplificó un fragmento del gen de higromicina con el tamaño de 0.59 kb 1) Control positivo (plásmido pCAMBIA 1305.1), 2-4 LBA4404+pCAMBIA 1305.1, 5) Control negativo. M Marcador de masas

### 3.2.4.- EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE INFECCIÓN

De los explantes transformados, se tomaron explantes a los 5, 10 y 15 días después de la infección, para realizarles el ensayo de GUS, y obtener la frecuencia de infección (número de explantes teñidos/número de explantes totales) de cada explante con los diferentes tratamientos utilizados.

De acuerdo a los resultados obtenidos de los explantes transformados con los cuatro diferentes tratamientos, se realizó un promedio y se presentan de la siguiente manera.

Los resultados del tratamiento 1 (cepa LBA4404 a D.O.<sub>600nm</sub> 0.2 y sin papel filtro, entre el medio y los explantes) en este caso la mayor frecuencia de infección se encontró en el tejido foliar presentando un 33.33%, el callo presento un 16 % mientras que el embrión somático mostro una baja frecuencia con un 3.33% (Cuadro 3.2). La hoja presento un promedio de 2.66 puntos azules por explantes.

**Cuadro 3.2. Tratamiento 1 co-cultivo *Phalaenopsis zuma's pixie* con *A. tumefaciens* a una concentración de 0.2 DO<sub>600nm</sub> sin papel filtro.**

Explantes	Numero de explantes	Número explantes positivos a GUS	Frecuencia de infección (%)	Puntos azules/explante
Hoja	30	10	33.33	2.66
Callo	30	5	16.66	0.33
Embrión somático	30	1	3.33	0.66

En caso del tratamiento 2 (LBA4404 a D.O.<sub>600nm</sub> a 0.2 y con papel filtro) la frecuencia de infección mostro un 40 % en el tejido foliar, en el tejido calloso mostro un 20% y un 13.33% en los embriones somáticos (cuadro 3.3), el tejido foliar presento 4 puntos azules por explante, mientras que el embrión somático presento 0.13 puntos azules por embrión somático.

**Cuadro 3.3. Tratamiento 2 co-cultivo sobre papel filtro *Phalaenopsis zuma's pixie* con *A. tumefaciens* a una concentración de 0.2 DO<sub>600nm</sub>.**

Explantos	Numero de explantes	Numero de explantes positivos a GUS	Frecuencia de infección	Numero de manchas/explante
Hoja	30	12	40	4
Callo	30	6	20	0.4
Embrión somático	30	4	13.33	0.13

En el caso del tratamiento 3 (a D.O.<sub>600nm</sub> a 0.5 y sin papel filtro), la frecuencia de infección del tejido foliar fue de 16.66%, el callo presento 6.66% y los embriones somáticos un 6.66%(Cuadro 3.4), así el número de manchas en el tejido foliar es un promedio de 2.33 por explante, mientras que en callo es de 0.23 y 0.13 por embrión somático.

**Cuadro 3.4. Tratamiento 3, co-cultivo *Phalaenopsis zuma's pixie* con *A. tumefaciens* a una concentración de 0.5 DO<sub>600nm</sub> sin papel filtro.**

Explantos	Numero de explantes	Numero de explantes positivos a GUS	Frecuencia de infección	Numero de manchas/explante
Hoja	30	5	16.66	2.33
Callo	30	2	6.66	0.23
Embrión	30	2	6.66	0.13

En el tratamiento 4 (a D.O.<sub>600nm</sub> a 0.5 y con papel filtro), se logró obtener muy baja frecuencia de infección a la obtenida en el tratamiento 2, sin embargo en los embriones somáticos fue la que presento mayor frecuencia de infección, aunque a pesar de esto los porcentajes presentados son muy bajos, de acuerdo a los presentados por Atichart *et al.*,

2007, en el cual utilizaron el mismo plásmido y la misma cepa de *A. tumefaciens*. Así mismo los resultados obtenidos por Pimda y Bunnag, 2010, con la especie *Vanda lilacina* fueron muchos mayores a nuestros resultados, sin embargo, para tener éxito en la modificación de plantas a través de un sistema indirecto de transformación genética empleando *A. tumefaciens* LBA4404 (pCAMBIA1305.1) depende de muchos factores claves. Una concentración del antibiótico, tipo de tejido, tiempo de co-cultivo, la utilización de compuestos fenólicos y la actividad de la *A. tumefaciens* se consideran cruciales en este sistema (Pimda y Bunnag, 2010).

**Cuadro 3.5. Tratamiento 4, co-cultivo sobre papel filtro *Phalaenopsis zuma's pixie* con *A. tumefaciens* a una concentración de 0.5 D.O. <sub>600nm</sub>.**

Explantos	Número de explantes	Número de explantes positivos a GUS	Frecuencia de infección	Número de manchas/explante
Hoja	30	5	16.66	3.33
Callo	30	1	3.33	0.1
Embrión somático	30	2	6.66	0.2

En este tratamiento se observó la frecuencia de infección más baja para el callo. Sin embargo, mostró una respuesta mayor en la frecuencia de infección de los embriones.

### 3.3. - CONCLUSIONES

- La amplificación del fragmento del gen *hpt* (0.59 kb) indican que fue insertado el plásmido dentro de la cepa LBA4404.
- La expresión del gen de  $\beta$ -glucuronidasa evidencia que se dio la transformación del tejido de hoja, embrión, y callo.
- La frecuencia de infección del tratamiento 2 fue la más óptima en los tres explantes de *Phalaenopsis zuma's pixie*.
- El uso de papel filtro ayuda a disminuir la cantidad de bacterias en el explante y evita la muerte de explantes por exceso de bacteria.
- Los explantes (callos y embriones) que provenían de medios con TDZ mostraron un mayor deceso a las hojas que no estaban en contacto con los reguladores directamente.
- El método de transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* depende del tipo de explante y la densidad óptica de este, así como también la condición en la que el explante se encuentre, el tipo de regulador de crecimiento, y los antibióticos.

### 3.4. - REFERENCIAS

- Atichart, P., S. Bunnag, P. Theerakulpisut (2007). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl. with antisense ACC oxidase. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6, 1065-1071.
- Belarmino, M. M., M. Mii (2000). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Rep*, 19, 435-442.
- De Cleene, M. y J. De Ley (1976). The host range of crown gall, *Bot Rev*, 42, 389-466
- Hellens, R., P. mullineaux y K. Harry (2000). A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5(10), 446-451.
- Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh y M.W. Bevan (1987). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *European Molecular Biology Organization J*, 6, 3901-3907
- Mii, M y D.P. Chi (2010). Genetic transformations of orchids. First international orchid symposium. *Horticulture*, 878, 461-464.
- Mishiba, K.I., D.P. Chin, M. Mii (2005). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination. *Plant Cell Rep*, 24, 297-303.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15, 495-497.
- Ogawa, Y. y M. Mii, (2005). Evaluation of 12  $\beta$ -lactam antibiotics for *Agrobacterium*-mediated transformations through in plant antibacterial activities and phytotoxicities. *Plant Cell Rep*, 23, 736-743.
- Ogawa, Y. y M. Mii, (2007). Meropenem and moxalactam: novel  $\beta$ -lactam antibiotics for efficient *Agrobacterium* mediated transformation. *Plant Sci*, 172, 564-472.
- Pimda, W., y S. Bunna (2010). Genetic transformation of *Vanda lilacina* Teijsm. y Binnend. with a chitinase gene. *Advances in Agriculture y Botany International Journal of the Bioflux Society*, 2(1), 71-78.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sjahril, R., D.P. Chin., R.S. Khan., S. Yamamura, I. Nakamura, Y. Amemiya y M. Mii (2006). Transgenic *Phalaenopsis* plants with resistance to *Erwinia carotovora* produced by introducing wasabi defense gene using *Agrobacterium* method. *Plant Biotechnology*, 23, 191-194.
- Sjahril, R. y M. Mii, (2006). High-efficiency *Agrobacterium* mediated transformation of *Phalaenopsis* using meropenem, a novel antibiotic to eliminate *Agrobacterium*. *J. Hort. Sci. Biotechnol*, 81, 458-464.
- Sreeramanan, S., B. Vinod, S. Sashi y R. Xavier (2008). Optimization of the transient *Gus* gene transfer of *Phalaenopsis violacea* orchid via *Agrobacterium tumefaciens*: an assessment of factors influencing the efficiency of gene transfer mechanisms. *Advances in natural and applied sciences*, 2(2), 77-88.



#### 4.-DISCUSIÓN

En la obtención de embriones somáticos a partir de tejido foliar en *Phalaenopsis zuma's pixie* se observó con la adición de una citocinina la cual fue TDZ (thidiazuron); sin embargo de acuerdo a lo reportado por Toonen y De Vries, 1996, la embriogénesis somática en la mayoría de los casos es con la utilización de la auxina, 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), en nuestro caso, optamos por no agregar auxina al medio de inducción, ya que en nuestros experimentos preliminares, cuando se le adicionaba auxina al medio inducción, los explantes foliares presentaban muy baja respuesta a organogénesis y nula presencia de embriones somáticos, así también reporta Ávila-Díaz *et al.*, 2009, en la germinación de *Laelia speciosa* se probaron tres diferentes reguladores encontrándose BA el más eficiente en la germinación de las semillas, así mismo en lo reportado por Carrasco *et al.*, 2007 obtienen protocormos utilizando 2mg/L de BA esto se contradice a lo reportado por Evans *et al.* 1981 en el cual demuestra que las concentraciones de auxina/citocininas son importantes para la inducción de la embriogénesis somática. Sin embargo se considera que en el caso de *Phalaenopsis* al ser epífita puede presentar una gran concentración endógena de auxinas, para la producción de raíces, por lo tanto en la inducción *in vitro* lo es necesario agregar al medio de cultivo auxinas. Sin embargo en el 2000 Chen y cols., indujeron callogénesis a partir de protocormos de *Phalaenopsis* en presencia de 2, 4-D y TDZ en medio MS, sin embargo el porcentaje de callogénesis mas alta la obtuvieron sin la presencia de 2, 4-D.

Para la inducción a embriogénesis somática se logró obtener un porcentaje similar con 5, 10  $\mu\text{M}$  de TDZ, sin embargo, se considera que la óptima para la inducción de nuestro di-hibrido es 5  $\mu\text{M}$ , ya que mientras mayor sea la concentración de TDZ las hojas presentan deformaciones lo cual no es deseable para el cultivo, resultados similares obtuvo Chung *et al.*, 2005, probando tres auxinas (AIA, IBA, 2,4-D) y cinco citocininas (2iP, BA, kinetina, TDZ, zeatina), encontrando entre todas la mejor respuesta con 18  $\mu\text{M}$  de TDZ, para la inducción de embriogénesis somática directa en *Dendrobium* Chiengmai Pink, reporte similar es el presentado por Chen *et al.*, 1999, donde obtuvieron embriones somáticos directos a partir de explantes foliares de *Oncidium* Gower Ramsey, en el cual se probó diferentes concentraciones de 2,4-D y TDZ en medio MS, encontrándose la más eficiente con 4.54  $\mu\text{M}$  de TDZ sin la presencia de 2,4-D. Sin embargo Gow *et al.*, 2008,

probo cuatro diferentes auxinas (2,4-D, AIA, IBA, ANA), cinco citocininas (2iP, BA, kinetina, TDZ, zeatina), GA<sub>3</sub>, ancimidol, poliaminas, ACC, AgNO<sub>3</sub> y CoCl<sub>2</sub> en la inducción de embriogénesis somática directa en tejido foliar de *Phalaenopsis amabilis* y *Phalaenopsis Nebula*, y encontraron que BA y 2iP respectivamente son las más efectivas en la inducción de embriones somáticos directos, también encontraron que las auxinas, GA<sub>3</sub>, ancimidol y poliaminas son inhibidores en ambas especies. La organogénesis directa se obtuvo en medio MS a mitad de concentración de sales adicionado con 10 µM de BAP, discrepando esto con los resultados obtenidos por Nayak *et al.*, 1997 quien desarrollo un protocolo de producción de brotes a partir de hojas probando tres citocininas (BAP, kinetina y TDZ), siendo esta ultima la más efectiva para la inducción con 4.54 µM para la orquídea *Acampe praemorsa*.

En el proceso de transformación se utilizó la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, que ha sido utilizada por Maziah y Chern, 2008 y Berlamino y Mii, 2000, los resultados obtenidos en el tratamiento número dos, en el que se utilizó una concentración bacteriana de 0.2 DO<sub>600nm</sub> con papel filtro, fue de 4% frecuencia de infección, esto supera a lo reportado por Mishiba *et al.*, 2005 que presento una eficiencia de transformación de 1.3 a 1.9%, sin embargo nuestros resultados difieren a lo reportado por Chai, *et al.*, 2002; Atichart *et al.*, 2007; Belarmino y Mii (2000) muestran una eficiencia fue mayor a 50%, en donde se utilizan como explante cuerpos parecidos a protocormos de *Phalaenopsis*. AY Sin embargo existen trabajos donde se realiza transformación genética de *Phalaenopsis* mediante biobalística, como lo reportado por Anzai *et al.*, 1996, donde obtuvieron plantas resistentes a *Streptomyces higroscopicus*.

Así como también logramos observar que en presencia del papel filtro nuestros explantes en co-cultivo se mantienen turgentes y no se necrosan tanto como los obtenidos sin papel filtro, esto se soporta por Cheng *et al.*, 2003, quien reporto un incremento en la transformación de trigo con el secado de los explantes previo y durante el cocultivo, a su vez Grajales en el 2005 explica que el secado de los tejidos previo al bombardeo causa cambios estructurales en la membrana alterando su permeabilidad.

#### 4.1.- CONCLUSIONES

- Se obtuvo la propagación de *Phalaenopsis zuma's pixie*, en el medio Phytamax®.
- Se logró establecer el protocolo de regeneración de *Phalaenopsis zuma's pixie* mediante la inducción con TDZ A 10µM en la parte apical de la hoja, y aunque no hay diferencias significativas con respecto a 5 µM, en cuanto a la regeneración de plantas se obtuvieron mayor cantidad de plantas enteras a 5 µM de TDZ.
- En la organogénesis se observó que con 10 µM de BAP, un mayor número de brotes en fotoperiodo, obteniéndose casi el 6% de brotes por explante.
- Para *Phalaenopsis zuma pixie* se observó la inducción a embriogénesis somática con adición de citocininas en medio MS, y con ausencia de auxinas.
- El tiempo de co-cultivo de tres días es adecuado para la transformación de hojas, embriones y callos.
- El mejor sistema de regeneración en *Phalaenopsis zuma's pixie* fue mediante embriogénesis somática, que por organogénesis.
- La cepa LBA4404 con el plásmido pCAMBIA1305.1 logró transformar explantes de hojas, callos y embriones somáticos de *Phalaenopsis zuma's pixie*.
- La adición de acetosiringona (200µM) al medio de crecimiento bacteriano, permite que *Agrobacterium tumefaciens* infecte a *Phalaenopsis zuma's pixie*, debido a que es una planta monocotiledonea.
- En la frecuencia de infección fue más efectiva el tratamiento dos para hoja y callo, mientras que para los embriones somáticos el tratamiento 4 fue el que presentó más eficiencia en el caso de los embriones somáticos.

## 4.2. - REFERENCIAS

- Anzai, H., Y. Ishii, M. Shichinohe, K. Katsumata, C. Nojiri, H. Morikawa, M. Tanaka (1996). Transformation of *Phalaenopsis* by particle bombardment. *Plant Tissue Cult Lett*, 13,265–271
- Ávila-Díaz, I., K. Omayá, Gómez Alonso C. y R. Salgado (2009). *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 99,335–343
- Atichart, P., S. Bunnag, P. Theerakulpisut (2007). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl. with antisense ACC oxidase. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6,1065-1071.
- Belarmino, M.M., M. Mii (2000). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis* Orchid. *Plant Cell Rep*, 19,435–442.
- Carrasco, S., D. Moreno y R. Menchaca (2007). Cultivo de protocormos de *Mormodes maculata* var. *unicolor* L.O. Williams. *Foresta Veracruz*,9, 55-59.
- Chai, M.L., C.J. Xu, K.K. Senthil, J.Y. Kim y D.H. Kim (2002). Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Scientia Horticulturae*, 96, 213–224.
- Chen, J. T., C. Chang, WC Chang (1999). Direct somatic embryogenesis and subsequent plant regeneration on leaf expanpts of *Oncidium* 'Gower Ramsey' *in vitro*. *Plant Cell Rep.*, 19, 143-149.
- Chen, Y.-Ch., Ch. Chang y W.-Ch. Chang (2000). A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 36, 420-423.
- Chung, H.H., J.T. Chen, W.C. Chang (2005). Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium Chiengmai* Pink and subsequent plant regeneration. *In vitro – Plant*, 41, 765–769.
- Evans, D. A., W. R. Sharp y C. E. Flick (1981). Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T.A. (ed.). *Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture*. Academic Press. Nueva York. p. 45-114.

- Gow, W.-P., J.T. Chen, W. Ch. Chan (2008) Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Physiol Plant*, 30, 507–512.
- Nayak, N.R., S. Patnaik y S. P. Rath (1997). Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann. *Plant Cell Reports*, 16, 583-586
- Toonen M., S.C. de Vries (1996). Initiation of somatic embryos from single cells. In: Wang T L, Cuming A (eds) *Embryogenesis is: the generation of a plant*. Bios Scientific Publishers, Oxford, pp 173-18.

**ANEXOS****Medio Phytamax Sigma**

Componentes	mg/L
Nitrato de amonio	825.0
Polvo de banana (50% Malto-dextrina)	30000.0
Acido bórico	3.10
Cloruro de calcio anhidro	166.0
Cloruro de cobalto 6-hidratado	0.0125
Sulfato cúprico 7-hidratado	0.0125
EDTA-sodio 2-hidratado	37.240
Sulfato de fierro 7-hidratado	27.850
Sulfato de magnesio anhidro	90.350
Sulfato de manganeso	8.450
Ioduro de potasio	0.4150
Nitrato de potasio	950.0
Fosfato de potasio monobásico	85.0
Molibdato de sodio 2-hidratado	0.1250
Sulfato de zinc 7-hidratado	5.30
Carbón	2000.0
MES	1000.0
Mio-Inositol	100.0
Acido nicotínico	1.0
Peptona Tipo I	2000.0
piridoxina hidroclicrica	1.0
Sacarosa	20000.0
Tiamina hidroclicrica	10.0
<i>Se requiere 57.3 g de polvo para preparar 1 L de medio.</i>	

**Medio Murashige y Skoog**

<b>Componentes</b>	<b>mg/L</b>
Nitrato de amonio	1650 mg/l
Cloruro de calcio	440
Sulfato de magnesio	370
Nitrato de potasio	1900
Fosfato de potasio	170
Ácido bórico	6.2
Cloruro de cobalto	0.0125
Sulfato de cobre	0.0125
Sulfato de manganeso	11.25
Ioduro de potasio	0.415
Molibdato de sodio	0.25
Sulfato de zinc	8.6
Niacina	0.5
Piridoxina	0.5
Tiamina	0.1
Glicina	2.0
Mio inositol	100
Extracto de levadura	1000
Sacarosa	30 000
Gelrite	2 500

**Fijación:****Preparación de FAA**

Etanol	500 ml
Ácido Acético glacial	50ml
Formaldehído	100 ml
H <sub>2</sub> O	350 ml

**Preparación de PBS 10 X**

Agregue 76.0 g de NaCl (1.3 M), 12.46 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O (70 mM, ) y 4,68 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O(30 mM) a 900 ml de agua, ajustar el pH a 7.4 con solución M de NaOH o HCl, y afore a 1 litro antes de esterilizar.

### **Fijación de material biológico en FAA**

- 1.- Sumergir el tejido en el fijador
- 2.- Aplicar vacío al material biológico x 10 min y dejar x 3 h
- 3.- Aplicar vacío x 10 min y dejar que el material se vaya al fondo del recipiente
- 4.- Cambiar el FAA y dejar toda la noche en agitación y/o refrigeración.
- 5.- Cambiar el FAA y agregar PBS en frío, se deja agitando 30 min.
- 6.- Renovar el PBS en frío y dejar en agitación 1 h
- 7.- Eliminar el PBS y adicionar ETOH 30 % en agitación 1 h
- 8.- Cambiar a ETOH 50% en agitación 1 h
- 9.- Cambiar a ETOH 70% toda la noche en refrigeración

### **Inclusión en parafina con butanol**

- 1.- Agregar ETOH 95% 30 min a 94°C
- 2.- Agregar ETOH 95 % 30 min a 94°C
- 3.- Agregar Butanol 100% T.A. 24 h (día 1)
- 4.- Agregar Butanol 100% T.A. 24 h (día 2)
- 5.- Agregar Butanol 100% T.A. 24h (día 3)
- 16.- Adicionar 15 hojuelas de parafina y colocarlo en agitación toda la noche a temperatura ambiente.
- 17.- Al día siguiente: agregar más hojuelas a 60 °C x la mañana
- 18.- Al día siguiente primer cambio de parafina líquida

19.- Al día siguiente segundo cambio de parafina

20.- Al día siguiente tercer cambio de parafina

22.- Cubrir todo el explante con la parafina para evita que el explante se hidrate

23.- Colocar las inclusiones en los moldes.

#### **Desparafinización de los cortes**

1.- Colocar los cortes en solución de Histoclear en una caja couplin por 10 minutos

2.- Colocar los cortes en solución de Histoclear en una caja couplin por 15 minutos

#### **Hidratación**

3.- Colocar los cortes en etanol al 96 %, al 50 % y al 30 % en una caja coplan por 2 minutos respectivamente.

4.- Dejar secar a 42° C hasta el día siguiente.

#### **Doble tinción APS + Naphtol blue black**

#### **Ácido periódico-Schiff (APS) + Azul-Negro de Naftol**

#### **Protocolo**

##### Parafina\*

Hidrolizar cortes en ácido periódico 5'

Lavar en agua corrientes con piseta y dejar secar

Tañir (x goteo) en reactivo de Schiff en oscuridad <1´

Lavar en agua hasta que agua quede incolora y secar

Tañir en solución de azul-negro de naftol al 1% en ácido acético al 7% a temperatura ambiente o calentada previamente a 60 °C <1´

Lavar rápidamente y abundantemente en agua y secar

Opcional: Regresar al ácido acético al 7% para examinar la tinción en el microscopio

Deshidratar en serie 50 % y 100 % etanol y secar

Secar y montar en Permount.

### Preparación de Colorantes

#### 1) Reactivo de Schiff

Pararosalinine chloride ( fuscina básica)	1.0 g
Metabisulfito de Sodio	3.0 g
Carbón Activado	0.5 g
HCl 1 N	30.0 ml
H <sub>2</sub> O destilada	cbp 200.0 ml

#### 2) Ácido periódico (Sigma 7875), para hidrólisis 15´a 20´ temperatura ambiente\*

Ácido periódico	1.0 g
H <sub>2</sub> O	100.0 ml

#### 3) Naphtol blue black (Sigma N 3005), se usa para contrastar la tinción PAS

Ácido acético al 7 %	100.0 ml
Naphtol blue black	1.0 g.

### Resultados de la tinción:

EL ácido periódico-Schiff es uno de los métodos más utilizados en histología, en esta técnica se tratan los explantes con ácido periódico que oxida los 1,2-glicoles formándose grupos aldehído. Con el reactivo de Schiff, se puede observar que los polisacáridos se tiñen específicamente de color rojo al igual que las reservas de almidón y las paredes celulares, el nucléolo y núcleo tiñen de color azul verdoso, mientras que con el azul de naftol las reservas proteínicas se tiñen específicamente de color azul oscuro.

### Protocolo de Transformación de bacterias *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$

#### Recomendaciones:

\*Antes de comenzar este protocolo, se recomienda tener todos los materiales listos, las incubadoras a la temperatura recomendada, ya que las bacterias no pueden pasar mucho tiempo fuera del ultracongelador sin ser usadas.

\*Las bacterias *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  se mantienen a una temperatura de -80°C en un ultracongelador; por lo que al sacarlas de este para uso, los tubos deben estar todo el tiempo en hielo.

\*Para el caso del vector pGem-Teasy, se utiliza como antibiótico de selección la Ampicilina.

\*La incubación de las bacterias en la estufa no debe pasarse de las 16 hrs, ya que después de este tiempo otros microorganismos y colonias satélite pueden comenzar a crecer afectando a nuestras colonias de bacterias.

#### Proceso:

1. Mezclar en picofuga, la reacción de ligación del vector pGem-Teasy con el fragmento de ADN que se desee ligar
2. Agregar todo el contenido de la reacción de ligación a los tubos que contienen las cepas bacterianas de *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  sin sacar estos tubos del hielo

3. Mezclar la reacción dando pequeños golpes, cuidando el tiempo en que los tubos están fuera del hielo
4. Dejar incubando los tubos en hielo por 20 minutos
5. Llevar a cabo el proceso de heatshock: incubar 45 segundos las cepas a 42°C e inmediatamente incubar en hielo por 2 minutos.
6. En campana de flujo laminar previamente limpiada y utilizando material estéril: Añadir 900µl de medio SOC
7. Dejar incubando en agitación a 37°C en un orbitador a 170 rpm por 2 h
8. Centrifugar a 5000 rpm las muestras y decantar sobrenadante, cuidando la pastilla formada con poco volumen de medio.
9. En campana de flujo laminar: Plaquear 20µl de X-gal (Concentración: 50µg/ml) y dejar secar.

Resuspender (con ayuda de puntas estériles y micropipeta) la pastilla formada de la centrifugación con el medio que le quedó y plaquear 100µl en cajas petri con medio de cultivo LB (20 ml) adicionado con 20µl de ampicilina (Concentración: 50µg/ml) como antibiótico de selección

10. Dejar en la estufa de incubación a 37°C por 14 a 16 hrs

**Medio LB sólido (1 lt)**

Triptona	10 gr
Extracto de levadura	5 gr
NaCl	5 gr

NaOH 1N	1ml
<p>Mezclar en agua destilada y agregar 15 gr de Agar</p> <p>Esterilizar y vaciar en campana</p> <p>*Si se requiere usa antibiótico; agregar este antes de vaciar, cuidando no tener una temperatura muy alta, ya que el antibiótico podría degradarse.</p>	

**Medio SOC (1 lt)**

Triptona	20 gr
Extracto de levadura	5 gr
1M NaCl	10 ml
1M KCl	2.5 ml
<p>Mezclar en agua destilada y alicuotar en frascos de 50 ml.</p> <p>Esterilizar y añadir a cada alícuota:</p>	
2M Mg <sup>2+</sup>	0.5 ml
2M Glucosa	0.5ml

**X\_Gluc (20 mg/ml)**

Pesar 25 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D- ácido glucuronido ciclo hexil sal de amonio (X-Gluc) y disolver en 1000  $\mu$ L dimetil sulfóxido (DMSO).

Cubrir los tubos con papel aluminio y guardar en congelación

\*Todo el procedimientos de selección de bacterias, se lleva a cabo en condiciones estériles en campanas de flujo laminar con material estéril

\*Para acelerar el proceso de alicuotar el medio LB con ampicilina en los tubos de cultivo y evitar contaminación del medio, se recomienda preparar el medio LB con la ampicilina en un vaso precipitado tomando en cuenta el volumen total del número de tubos que se van a utilizar, agregar a este el volumen total requerido del antibiótico para todas las muestras; mezclar con ayuda de una micropipeta de 5000  $\mu$ L, repartir en cada a cada tubo el volumen requerido.

1. Seleccionar colonias de bacterias que presenten el color blanco para llevar a cabo el crecimiento de estas en medio LB líquido
2. Llenar con 4 ml de medio LB adicionado con 4 $\mu$ l de ampicilina (50  $\mu$ g/ml) como antibiótico de selección los tubos de cultivo estériles
3. Picar la colonia de bacteria seleccionada con un palillo de dientes o con puntas de micropipeta estériles y, agregar este inmediatamente al tubo de cultivo
4. Dejar en crecimiento los tubos de cultivo en agitación a 150 rpm por no más de 16 hrs.

**Medio LB líquido (1 lt)**

Triptona	10 gr
Extracto de levadura	5 gr
NaCl	5 gr
NaOH 1N	1ml
Mezclar con agua destilad y esterilizar	

**Protocolo de Minipreparaciones para la purificación del plámidos**

1. Colectar las células bacterianas crecidas 16 hrs previas a este proceso
2. Resuspender vigorosamente la pastilla en 100 µl de Buffer 1 (TEG)  
Dejar incubar 5 min en hielo
3. Adicionar 200 µl de buffer 2 (NS) y mezclar por inmersión rápida  
Dejar incubar 5 min en hielo
4. Adicionar 150 µl de buffer 3 (KoAC) y mezclar cuidadosamente por inmersión lenta  
Dejar incubar por 5 min en hielo
5. Centrifugar 15 a 20 min a 13000 rpm
6. Tomar el sobrenadante y Adicionar 900 µl de etanol absoluto frio
7. Mezclar por inmersión  
  
(En este punto, el procedimiento puede ser detenido hasta por 24 hrs [simporte y cuando las muestras se mantengan en congelación])
8. Incubar 2 min a temperatura ambiente
9. Centrifugar 15 min a 13000 rpm
10. Decantar el sobrenadante y lavar la pastilla con etanol frio al 70 % (2 veces)
11. Dejar secar la pastilla

12. Resuspender en 30 a 50  $\mu$ l de agua ultrapura estéril
13. Adicionar 1  $\mu$ l de RNAsa (10 mg/ml) e incubar a 37°C por 30 a 60 min
14. Guardar en congelación

**Buffer 1 (TEG) 250 ml**

Glucosa (50mM): 6.25 ml  
Tris (25mM): 6.25 ml  
EDTA (10mM): 5 ml

Preparar cada componente de forma independiente y tomar el volumen requerido.

Mezclar los componentes en agua estéril

Mantener en refrigeración

**Buffer 2 (NS) 500 ml**

NaOH (0.2N): 25 ml  
SDS (0.5%): 12.5 ml

Preparar cada componente de forma independiente y tomar el volumen requerido.

Mezclar los componentes en agua estéril

Mantener a temperatura ambiente.

**Buffer 3 (KoAc) (375 ml)**

Acetato de Potasio (5M): 225 ml  
Ácido acético glacial: 43 ml

Preparar el acetato de potasio de forma independiente y tomar el volumen requerido para mezclar con agua estéril y agregarle lentamente en ácido acético  
Mantener a temperatura ambiente