



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *Phalaenopsis amabilis* BLUME VAR.
LUCHIA LADY (ORCHIDACEAE) CON EL GEN DE LA β -1,3-GLUCANASA**

TESIS

QUE PRESENTA

BIÓL. LUZ MARÍA MALAGÓN QUINTANA

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

DIRECTOR DE TESIS:

DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

Morelia, Michoacán

Diciembre, 2007

**LA PRESENTE INVESTIGACIÓN SE
REALIZÓ EN EL LAB. DE BIOTECNOLOGÍA
VEGETAL DEL INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE
LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN
DEL DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA.**

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas por el apoyo recibido para realizar este trabajo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Al Dr. Rafael Salgado Garciglia por su infinita paciencia, por todos sus consejos, y por ser no sólo una guía en el campo de la investigación, sino además un ejemplo a seguir por su determinación y sus valores. Me es imposible expresar la admiración y el cariño que le tengo. ¡Gracias!

A los integrantes de mi mesa sinodal, D.C. Eva Luz Soriano Bello, D.C. Ernesto García Pineda y D.C. José López Bucio, por la revisión de este trabajo y por su objetividad y duro escrutinio a lo largo de los seminarios; la formación que me han dejado es invaluable.

Al D.C. Miguel Ángel Gómez Lim del CINVESTAV Irapuato por haber donado parte del material con que se realizó este trabajo, y a la D.C. Ana María Bailey por su colaboración con la determinación de actividad enzimática de glucanasas.

Al Biol. José Herrera por las muchas horas que pasamos hombro con hombro frente al termociclador. Gracias por haber hecho el trabajo tan ameno!

Al Biol. Luis María Suárez Rodríguez por todas las aventuras que vivimos en los congresos, y por su apoyo incondicional dentro y fuera del laboratorio. Sin ti este trabajo no habría sido posible, tenqiu!

A la generación 2004-2006, León, Arnoldo, Carlos, César, Patricia, Lupita, Yesenia, Idolina, Rosenda y por supuesto Areli; gracias a ustedes, este viaje ha sido un mejor viaje.

DEDICATORIA

A MIS PADRES, Dr. Roberto Malagón Ramírez y Sra. Luz María Quintana Méndez; este logro es tan suyo como mío, pues con su apoyo y su cariño están conmigo aún en la distancia. ¡Los quiero!

A mi hermana Mayra, por sus llamadas y correos para levantarme el ánimo cuando más lo necesitaba.

A mi tío Lalo y a mi tío Rafa, porque los quiero mucho y porque siempre han estado al pendiente de una sobrina que los quiere.

A Don Héctor Gutiérrez López, por haberme abierto las puertas de su casa y haberme apoyado siempre incondicionalmente.

A Marsella, porque después de tanto tiempo y a pesar de estar separadas, todavía no nos asusta el acertijo.

A mis amigos, César y Pat, por su disposición para escuchar, su fortaleza, sus bromas, sus conocimientos, por las meriendas en casa y tantos momentos gratos que pasamos en este tiempo... junto con Areli, José Luis, Eva y Chava, espero que sigamos siendo los mismos de siempre!

Para Areli, mi Clon Bueno. Has sido una hermana para mí, ayudándome a superar los tiempos difíciles y haciendo mejores los ratos agradables; sin tu prudencia, tu sabiduría y tu cariño no sé qué hubiera sido de mí. Recuerda siempre que te quiero mucho... ¡Queda!

A José, por haberme devuelto la esperanza en mí misma y ayudarme a ser una mejor persona, a pesar de los errores pasados. ¡Gracias corazón!

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	4
2.1.	MEJORAMIENTO GENÉTICO EN PLANTAS	4
2.1.1.	Ingeniería genética	4
2.1.2.	Aplicaciones de la ingeniería genética en plantas.....	6
2.1.3.	Transformación genética con <i>Agrobacterium</i>	8
2.2.	PLANTAS TRANSGÉNICAS RESISTENTES A HONGOS	10
2.3.	β -1,3-GLUCANASAS	13
2.3.1.	Mecanismo de acción antifúngica de β -1,3-glucanasas	15
2.3.2.	Expresión de genes de β -1, 3-Glucanasa en plantas transgénicas....	16
2.3.3.	β -1,3-glucanasa clase III de Tabaco	16
2.4.	LAS ORQUÍDEAS.....	17
2.4.1.	Reproducción	18
2.4.2.	Micropropagación	20
2.4.3.	Comercialización.....	21
2.4.4.	Transformación genética de orquídeas.....	23
2.5.	<i>Phalaenopsis</i> spp.....	24
2.5.1.	Características principales	24
2.5.2.	Plagas y enfermedades	27
2.5.3.	<i>Fusarium oxysporum</i>	28
3.	HIPÓTESIS	31
4.	OBJETIVOS	31
	OBJETIVO GENERAL	31
4.1.1.	Objetivos específicos	31
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1.	MATERIAL BIOLÓGICO	32
5.2.	METODOLOGÍA.....	34
5.2.1.	CULTIVO IN VITRO DE <i>Phalaenopsis amabilis</i>	34
5.3.	TRANSFORMACIÓN GENÉTICA de <i>P. amabilis</i>	36
5.3.1.	Método de co-cultivo con <i>A. tumefaciens</i>	36
5.3.2.	Selección de transformantes	36
5.3.3.	Ensayo histoquímico de actividad de β -glucuronidasa (GUS).....	37
5.3.4.	Técnica de PCR para la detección del gen <i>PR-Q'</i>	37
5.4.	Ensayo de actividad enzimática de glucanasas totales.....	38
5.5.	ENSAYOS ANTIFÚNGICOS <i>IN VITRO</i>	39
5.5.1.	Ensayos con discos de hojas	39
5.5.2.	Ensayos con discos impregnados	40
6.	RESULTADOS	41
6.1.	MICROPROPAGACIÓN DE <i>P. amabilis</i>	41
6.1.1.	Producción de protocormos	41
6.1.2.	Desarrollo de plántulas	41

6.2.	OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>P. amabilis</i>	44
6.2.1.	Resistencia a kanamicina.....	44
6.2.2.	Selección de transformantes	44
6.2.3.	Actividad histoquímica de β -glucuronidasa	46
6.2.4.	Detección del gen <i>PR-Q'</i>	47
	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GLUCANASAS.....	48
	ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA <i>in vitro</i>	49
6.4.1.	Ensayo antifúngico en disco de hojas.....	49
6.4.2.	Ensayo antifúngico con discos impregnados	49
6.2.5.	Difusión en placa.....	51
7.	DISCUSIÓN	52
7.1.	MICROPROPAGACIÓN DE <i>Phalaenopsis amabilis</i>	52
7.2.	TRANSFORMACIÓN GENÉTICA.....	55
7.3.	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GLUCANASAS.....	57
7.4.	ENSAYOS ANTIFÚNGICOS <i>in vitro</i>	58
8.	CONCLUSIONES	61
9.	LITERATURA CITADA.....	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Ejemplos de plantas transformadas con la técnica de inserción de genes por <i>A. tumefaciens</i>	10
Cuadro 2. Ejemplo de plantas transgénicas con resistencia a hongos.	12
Cuadro 3. Secuencia de bases del ARNm (1195 pb) del gen de la proteína PR-Q'	17
Cuadro 4. Ejemplos de orquídeas genéticamente transformadas.....	23
Cuadro 5. Ubicación taxonómica de <i>Phalaenopsis</i> spp. (Sweeth, 1980).....	25
Cuadro 6. Tratamientos (ANA/GA ₃) para la producción de protocormos en segmentos de hojas y bases de tallo de <i>Phalaenopsis amabilis</i>	35
Cuadro 7. Tratamientos (ANA/BA/GA ₃) para obtener el crecimiento y mejor desarrollo de plántulas de <i>Phalaenopsis amabilis</i> obtenidas a partir de protocormos.	35
Cuadro 8. Actividad enzimática de glucanasas totales de plantas control y plantas transformadas de <i>P. amabilis</i> (n=3, Tukey p < 0.5).	48
Cuadro 9. Porcentajes de inhibición de extractos enzimáticos de <i>P. amabilis</i> en el crecimiento de micelio de <i>F. oxysporum</i> a los 8 días de cultivo...	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Phalaenopsis</i> sp.	20
Figura 2. Importancia comercial de <i>Phalaenopsis</i> sp.	22
Figura 3. Ejemplar de <i>Phalaenopsis amabilis</i> (Blume) var. Luchia Lady.....	33
Figura 4. Plásmido pCAMBIA-2301	33
Figura 5. Desarrollo de plántulas de <i>P. amabilis</i>	42
Figura 6. Número de protocormos en segmentos de hojas de <i>P. amabilis</i>	42
Figura 7. Crecimiento (altura), número de hojas y de raíces de plántulas micropropagadas de <i>P. amabilis</i>	43
Figura 8. Ensayos de resistencia a kanamicina	45
Figura 9. Ensayo de GUS	46
Figura 10. Amplificación del gen PR-Q' a través del método de PCR.....	47
Figura 11. Ensayo antifúngico en discos de hojas	50
Figura 12. Ensayo antifúngico con discos impregnados	50

RESUMEN

Phalaenopsis amabilis es una orquídea de gran demanda comercial alrededor del mundo, cuyo cultivo se realiza de forma masiva en diferentes países. Dado que su ciclo de vida es largo, el ataque de hongos, y particularmente la infección por *Fusarium oxysporum* en etapas tempranas de desarrollo ponen en riesgo la producción de esta planta de interés ornamental. En el presente trabajo, plántulas de *P. amabilis* var. Luchia Lady fueron transformadas por *Agrobacterium tumefaciens* con el gen PR-Q', que codifica para una β -1,3-glucanasa clase III. Explantes de hojas y bases de tallo fueron sometidos a cocultivo con la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*, conteniendo el gen PR-Q', el gen marcador *nptII* y el gen reportero *uidA*. Los explantes generaron protocormos en medio MS con 0.5 mg/l ANA y 1.0 mg/l GA₃ con 150 mg/l de kanamicina como antibiótico de selección. Los protocormos resistentes a kanamicina fueron cultivados de forma individual en medio MS con 0.5 mg/l GA₃ para obtener plantas bien desarrolladas, obteniendo así 115 líneas. La transformación genética fue confirmada en las líneas 64, 69, 79 y 115 mediante el análisis de la actividad histoquímica de la β -glucuronidasa, y del análisis por PCR para amplificar el gen PR-Q'. Las líneas transformadas presentaron altos niveles de inhibición en el crecimiento de micelio de *F. oxysporum*, lo cual sugiere que la transformación genética confirió resistencia a la fusariosis en *P. amabilis*.

ABSTRACT

Phalaenopsis amabilis is an orchid of great commercial importance, which has become widely cultured in different countries. Due to having slow growth rates, fungal attack and specially the infection by *Fusarium oxysporum* in early growth stages of *P. amabilis* have led to significant economic losses in the ornamental field. In the present work, transgenic seedlings of *P. amabilis* var. "Luchia Lady" were successfully produced by *Agrobacterium tumefaciens*, carrying a plasmid containing the class III β -1,3-glucanase gene PR-Q' and selectable markers *nptII* and *uidA*. Leaf and stem segments produced Protocorm-Like-Bodies (PLB's) in MS medium with 0.5 mg/l ANA y 1.0 mg/l GA₃, containing 150 mg/l de kanamycin. Antibiotic-resistant PLB's were cultivated individually in MS medium with 0.5 mg/l GA₃ to produce well developed seedlings corresponding to 115 plant lines. Transformation of plantlets with PR-Q' was confirmed by PCR analysis in lines 64, 69, 79 and 115, which were also positive in GUS assays. Transgenic lines showed strong levels of growth inhibition in *F. oxysporum* mycelium, suggesting that genetic transformation conferred resistance to Fusariosis in *P. amabilis*.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, *Fusarium oxysporum*, *Phalaenopsis amabilis*, class III β -1,3-glucanase.

1. INTRODUCCIÓN

La transformación de plantas mediante la introducción de genes específicos por diversas técnicas de ingeniería genética, supone uno de los avances científicos más espectaculares de los últimos años, ya que ha abierto nuevas perspectivas para la mejora genética. Mediante estas técnicas es posible introducir en plantas no solo genes procedentes de otras plantas, sino genes provenientes de animales u organismos como bacterias, levaduras o virus, produciendo plantas transgénicas.

La ingeniería genética es una herramienta que complementa los métodos tradicionales de mejoramiento genético, que ha permitido importantes avances en el área del conocimiento de la biología vegetal. Dentro de los métodos de transformación genética utilizando vectores biológicos, el principal utiliza a *Agrobacterium tumefaciens*, bacteria capaz de transformar células vegetales ya que tiene la facultad de insertar un segmento del ADN plasmídico, hacia el genoma de la planta infectada. Esta capacidad de transmisión de ADN por *Agrobacterium* se usa extensamente como medio de insertar genes dentro de las plantas, desarrollando una gran cantidad de plantas modificadas genéticamente. Se trata entonces de un vehículo óptimo para procedimientos de ingeniería genética (Vain *et al.*, 1995; Zupan *et al.*, 2000).

En la actualidad se habla ya de tres generaciones de cultivos transgénicos comercializados: en la primera generación el objetivo fue el aumento en la producción de alimentos con interés en la reducción de contaminantes; los cultivos transgénicos de la segunda generación se enfocaron hacia el mejoramiento de la calidad nutrimental, la eliminación de alérgenos, la fitorremediación y la utilización de plantas como biorreactores; los de la tercera generación tienen como objeto la modificación de características tales como la arquitectura de la planta, color, aroma, etc. (Goto *et al.*, 1999; Lucca, 1999; Peng *et al.*, 1999; Souza, 1999; Ye *et al.*, 2000).

Las plantas ornamentales son productos de consumo para los que existe una demanda en aumento continuo y en los que se aprecian sobre todo la novedad y el atractivo, por ello éstas son material biológico para la tercera generación de plantas transgénicas, ya que su mejora genética se centra en cambios en la arquitectura de la planta, adaptación a nuevos sustratos, retraso de la senescencia, modificación de la arquitectura de la flor, color y fragancia, pero también en caracteres tales como la resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a diversos tipos de estrés abiótico, adaptación a nuevos sistemas de producción, etc. (Rosati *et al.*, 1996; Li y Pei, 2007).

Aunque son muy diversos los tipos de plantas transgénicas, las de valor agrícola son las más importantes, pero actualmente numerosas plantas ornamentales han sido modificadas a través de la ingeniería genética, produciendo especies con mayor vida de anaquel de sus flores, mayor número de pétalos por flor, diversos tipos de fragancias, cambios en el color y arquitectura de las flores y el follaje, así como el logro de variedades resistentes a plagas y enfermedades (Rosati *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 2001; Bruner *et al.*, 1998).

Aunque la transformación genética de plantas mediante *Agrobacterium* ha sido más efectiva en especies dicotiledóneas, también se ha establecido para algunas monocotiledóneas. Plantas de ornato de esta última clase, como anturios (Kuehnle *et al.*, 2004), claveles (Ovadis *et al.*, 2000), gladiolas (Löffler *et al.*, 2000), iris (Jeknic *et al.*, 1999) y algunas pocas orquídeas (Nan *et al.* 1998), han sido transformadas genéticamente por esta vía de mejoramiento genético, indicativo de la posibilidad de transferir genes de *Agrobacterium* hacia este tipo de plantas. Estas técnicas modernas de mejoramiento brindan la posibilidad de obtener plantas de valor ornamental no sólo con cambios en la arquitectura de la planta o de la flor, sino hacia la obtención de resistencia a algunos patógenos que les causan enfermedades, lo que conlleva a pérdidas graves en la producción de flores. Lo anterior se logra por la inserción o modificación de genes, que expresen metabolitos, proteínas o enzimas antifúngicas. Un ejemplo de ello, es la

transformación genética de plantas con resistencia a hongos, las cuales ahora expresan genes de enzimas como quitinasa y glucanasa y muestran resistencia a diversos hongos fitopatógenos. Se ha logrado la inserción de este tipo de genes en plantas como tabaco, arroz, trigo, petunia, papa, etc. (Malik y Saroha, 1999). Específicamente contra hongos, se han transferido genes como el de la β -1,3-glucanasa a diferentes especies (alfalfa, arroz, jitomate, kiwi, tabaco, trigo, etc.), confiriéndoles la resistencia a hongos tales como *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora megaspermae*, *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani*, entre otros (Masoud *et al.*, 1996 ; Nakamura *et al.*, 1999).

La obtención de orquídeas con resistencia a hongos es un campo de interés económico, ya que debido a sus largos períodos de cultivo en invernadero previa la floración, para su comercialización, hongos como *Fusarium oxysporum* (Wan *et al.*, 1997), *Rhizoctonia solani* (Agrios, 2005), *Phytophthora cactorum* (Ranadive, 1994) y *Botrytis cinerea* (Coley-Smith *et al.*, 1980), causan pérdidas considerables. Una alternativa para controlar el ataque de este tipo de hongos patógenos en orquídeas es la obtención de plantas transgénicas con algún gene antifúngico. Aunque son pocas las especies de esta familia de plantas, que han sido transformadas genéticamente, se ha logrado conseguir plantas transgénicas de *Cymbidium* (Yang *et al.*, 1999), *Dendrobium* (Nan *et al.*, 1997; Nan *et al.*, 1998) y *Phalaenopsis* (Anzai *et al.*, 1996), utilizando solo genes marcadores o reporteros (Chen *et al.*, 2003).

Como una nueva alternativa para el mejoramiento de plantas, principalmente para la generación de orquídeas que muestren resistencia a hongos, en el presente trabajo se estableció el método de transformación genética con *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404, pCAMBIA con el gen de β -1,3-Glucanasa, *Pr2d* o *PRQ'*) en la orquídea *Phalaenopsis amabilis* Blume var. Luchia Lady, con el objetivo de conferir resistencia a *Fusarium oxysporum*.

2. ANTECEDENTES

2.1. MEJORAMIENTO GENÉTICO EN PLANTAS

El establecimiento de la agricultura hace alrededor de 10,000 años, garantizó la supervivencia de la especie humana sobre el planeta. A partir de entonces la domesticación de los vegetales fue modificando gradualmente el contenido genético de las plantas silvestres, hasta tal punto que hoy resulta muy difícil identificar a las plantas primitivas que dieron origen a las actuales plantas domesticadas. El mejoramiento genético se ha realizado desde entonces con procedimientos tradicionales y empíricos, aunque generalmente relacionando especies emparentadas. Fue recién en el siglo XX, gracias al desarrollo de la genética, que las plantas comenzaron a ser modificadas con mayor eficiencia, rapidez y control. Estas alteraciones genéticas fueron efectuadas por métodos hoy llamados convencionales, basados principalmente en la reproducción sexual y selección. También convencionales son consideradas las técnicas de obtención de nuevas variedades vegetales por hibridación interespecífica y por mutaciones artificiales causadas por radiaciones ionizantes, no ionizantes y agentes físicos y químicos. Desde hace cincuenta años se han estado realizando cruzamientos con todo el germoplasma disponible de la especies de uso agronómico: los grandes cereales y las oleaginosas. Sin embargo este procedimiento resulta un poco lento en comparación con la creciente demanda alimenticia para seres humanos y animales que se viene registrando en un mundo en expansión (ONU, 1997).

2.1.1. Ingeniería genética

Los progresos relativos al conocimiento de la naturaleza y estructura del material genético de los seres vivos, el ácido desoxirribonucleico (ADN), llevaron a partir de 1970 al desarrollo de técnicas que permiten la transferencia de genes específicos de una especie a otra, sin que se realice reproducción sexual. Esta tecnología recibió el nombre de ingeniería genética, cuyo objetivo último es introducir,

aumentar o quitar ciertas características hereditarias a un organismo vivo. Dichos organismos obtenidos por esta herramienta biotecnológica son conocidos bajo el nombre de transgénicos, haciendo el término referencia a cualquier entidad biológica (un vegetal, un animal, una bacteria, etc.), con capacidad de reproducirse, a la cual se le ha modificado su material genético original gracias a técnicas diversas. De esta manera y en el área agronómica se pensó que, en lugar de cruzar plantas entre sí, podía optarse por cruzar segmentos de ADN correspondientes a especies diferentes, procedimiento hasta entonces inhabilitado por una barrera biológica (Camadro, 2000; Ho *et al.*, 2000).

Cabe señalar, en cualquier caso, que el mejoramiento genético de los vegetales siempre se desarrolló utilizando los conocimientos y las técnicas disponibles. Fue, de esta manera, comprensible, que las nuevas técnicas de transgénesis se emplearan para la producción de nuevas variedades mejoradas. Sin embargo esta nueva modalidad de mejoramiento vegetal mediante transgénesis dispone de características propias, a saber: recombina en laboratorio material genético que proviene de distintas especies, las cuales jamás se entrecruzarían en la naturaleza. Además de permitir que en un determinado organismo se introduzcan genes exóticos, la ingeniería genética obtiene resultados que son, en alguna medida, impredecibles respecto de la fisiología y la bioquímica de los nuevos organismos obtenidos (Duvick, 1996; Camadro, 2000).

Las primeras plantas transgénicas fueron obtenidas, por su mayor simplicidad, con genes de efectos muy específicos, como la tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos, a virus o a hongos. Esto ha prometido a corto plazo un aumento en el rendimiento de los cultivos y un mejor aprovechamiento del suelo, incluyendo en ocasiones un ahorro significativo en el costo total del cultivo por hectárea. Otros desarrollos en estudio apuntan a mejorar las propiedades de los vegetales para ser almacenados, o a la adaptación de ciertas especies para que sean capaces de resistir condiciones ambientales adversas. Plantas transgénicas con propiedades más amplias, como una mejor calidad nutricional debido a la incorporación de

proteínas, vitaminas, composición de ácidos grasos y suplementos minerales (modificación de la composición) también han sido obtenidas (Brenner, 1991; Smith y Paliwal, 1996).

Es importante resaltar que ambos métodos, convencionales y transgénicos, no son mutuamente excluyentes. Por el contrario, ellos se complementan, ya que los transgenes han sido incorporados en variedades ya mejoradas por los métodos convencionales. De tal forma, las perspectivas sugieren que el mejoramiento de plantas tendrá que beneficiarse de la combinación de esas dos técnicas disponibles, las cuales ya han demostrado su eficiencia. Tanto los nuevos genotipos obtenidos por métodos convencionales como los obtenidos por transgénesis, necesitan ser debidamente evaluados, en especial con relación a la salud y al ambiente. Si bien estos controles han sido frecuentes y más o menos estrictos, en el caso de los organismos vegetales genéticamente modificados esta necesidad se acentúa, dado que el material resultante deviene de un proceso innovador y sin familiaridad con los métodos convencionales. Tales genotipos, por tanto, se hacen acreedores a una evaluación más rigurosa, lo cual tiende a minimizar los riesgos eventuales que estos organismos puedan traer a la salud humana y animal (efectos tóxicos, pleiotrópicos, alergenicidad, resistencia antibiótica, etc.) y al medioambiente (alteraciones genéticas de otras especies vecinas –polución génica-, alteraciones del ecosistema, alteraciones indeseadas en los mismos genes del organismo manipulado, susceptibilidad, etc.) (Camadro, 2000).

Una de las ventajas de esta metodología, es que se pueden modificar propiedades de las plantas de manera más amplia, más precisa y más rápida.

2.1.2. Aplicaciones de la ingeniería genética en plantas

La primera generación de cultivos transgénicos, comercializados en la actualidad, corresponden a la búsqueda de un aumento en la productividad, reducción en el

uso de agroquímicos, conservación de la tierra cultivable, mejor manejo y aprovechamiento del agua y la energía, reducción de la contaminación del ambiente y los beneficios para la salud humana derivados de estos aspectos. La segunda generación de cultivos transgénicos ofrece más beneficios directos para los consumidores y comprenden el mejoramiento de la calidad nutrimental (proteínas, aceite, vitaminas y minerales), la eliminación de alérgenos, la fitorremediación (es decir la recuperación de ambientes contaminados mediante el uso de plantas) y la utilización de plantas como biorreactores ('molecular pharming') para la expresión de proteínas recombinantes con fines tales como la producción de anticuerpos, vacunas y otras proteínas de uso terapéutico o industrial. Un ejemplo es el 'arroz dorado', llamado así por la pigmentación amarilla que tienen sus granos debido a que acumula altos niveles de pro-vitamina A en el endospermo. La tercera generación de cultivos transgénicos tiene por objeto aspectos tales como la modificación de la arquitectura de la planta, la manipulación de la floración, el mejoramiento de la eficiencia fotosintética, etc. Esto será posible en la medida que se obtengan resultados de los proyectos de secuenciación de genomas (Clives, 2004).

Hasta el año 2000, varias millones de hectáreas habían sido sembradas anualmente con cultivos transgénicos comerciales, como soya, algodón, tabaco, papa y maíz, en varios países entre los que figuran Estados Unidos de América (28.7 millones de hectáreas en 1999), Canadá (4 millones de hectáreas), China (0.3 millones de hectáreas) y Argentina (6.7 millones de hectáreas) (James, 1999). En Latinoamérica, actualmente se reportan siembras comerciales sólo en Argentina, Brasil, México, Uruguay, Honduras, Colombia y Paraguay. El mayor productor es Argentina, con cerca de 16 millones de hectáreas, siendo la soya el cultivo predominante y, en menor proporción, el maíz y el algodón (Runge, 2004).

En términos generales, los cultivos transgénicos que se han sembrado comercialmente en los últimos cinco años, con diferencias anuales, han sido soya, algodón, maíz, claveles, papa y canola. Esencialmente se ha trabajado con cuatro

características dominantes: tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos, resistencia a virus y resistencia a hongos/bacterias (Cohen, 2005).

2.1.3. Transformación genética con *Agrobacterium*

Existen diferentes métodos empleados en la transformación genética de plantas basados en el sistema natural, o utilizando medios químicos, físicos o eléctricos. Entre los más comunes están la transferencia directa de ADN, microinyección de ADN, método de las fibras de silicón carbonadas, agitación con microesferas de vidrio, electroporación y vectores biológicos. También se han empleado otros métodos alternativos de transferencia directa de ADN a células vegetales con diferentes grados de éxito, entre los que se encuentran la incubación con polietilenglicol y cloruro de calcio (CaCl_2), la electroporación y el bombardeo de micropartículas o llamada comúnmente biobalística o biolística, siendo éstos los más usados. No obstante, no son los únicos, ya que existen otros como la fusión de liposomas a vacuolas o protoplastos, aunque éstos no son tan utilizados debido a la comprobada poca eficacia y reproducibilidad, comparados con las ventajas que otros ofrecen. El común denominador de estas técnicas es que prescinden de sistemas biológicos de transferencia (virus, bacterias, etc.) para introducir información genética de otros organismos a las células vegetales (Brown, 1986).

Dentro de los métodos de transformación genética utilizando vectores biológicos, el principal es *Agrobacterium tumefaciens*, bacteria capaz de transformar células vegetales debido a que posee un plásmido llamado Ti (de las siglas en inglés, "Tumor Inducing"), que es ADN circular extracromosómico, del cual se puede insertar un segmento del ADN que posee, hacia el genoma de la planta infectada, denominado ADN de transferencia (ADN-T) (Zupan *et al.*, 2000). Asimismo se pueden emplear virus como vectores de transformación como los geminivirus (Vega y Rivera, 2001; Mor *et al.*, 2002).

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria patógena, Gram negativa, presente en el suelo, no esporulada, capsulada con flagelo polar. Son aerobias facultativas que

se desarrollan en los medios ordinarios entre 10 y 37°C, tiene distribución cosmopolita y gran variedad de huéspedes, principalmente dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas (Pelczar *et al.*, 1982).

La transformación es causada por la transmisión del ADN-T del plásmido bacteriano, el cual se integra al azar de manera estable en alguna zona del genoma de la planta. Debido a esta capacidad, se ha empleado como vector en la transformación genética de una gran variedad de plantas. La bacteria se guía por las sustancias que la planta excreta de heridas pequeñas, por las que se introduce (Mattsson *et al.*, 1992).

Este ADN-T transferido por *Agrobacterium* contiene genes que provocan la producción de hormonas, de lo cual resulta el desarrollo del tumor. El ADN-T también contiene genes que codifican enzimas que causan que la planta sintetice análogos de aminoácidos, los cuales solo la bacteria puede metabolizar, llamados opinas. Éstos son la fuente de energía específica para *A. tumefaciens*, pero no para otros organismos. Un tipo específico de opina es la nopalina. El ADN-T en las células infectadas juega un papel fundamental en la patogénesis y la colonización (Zambryski, 1983).

Esta capacidad de transmisión de ADN por *Agrobacterium* se usa extensamente en biotecnología, como medio de insertar genes extraños dentro de las plantas, desarrollando una gran cantidad de plantas modificadas genéticamente. Se trata entonces de un vehículo óptimo para operaciones de ingeniería genética. Como ejemplos de plantas transformadas por este medio están: una línea élite de Nopal (*Opuntia ficusindica*), en dicho trabajo se utilizó la cepa *A. tumefaciens* PGV 2260 la cual contenía el plásmido pBH21, con gen para resistencia a kanamicina y se obtuvo una eficiencia en la transformación de 26% (Silos *et al.*, 1999); la planta de arroz (*Oryza sativa* L.) ha sido transformada con diferentes cepas de *A. tumefaciens*, introduciendo genes reporteros (*uidA*, β -glucuronidasa), marcadores (antibióticos) y genes de resistencia a hongos fitopatógenos, obteniéndose transformación estable (Ming *et al.*, 1992; Shin *et al.*, 2006; Kathuria *et al.*, 2007).

Existen además muchas especies de interés agrícola que han sido transformadas efectivamente (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ejemplos de plantas transformadas con la técnica de inserción de genes por <i>A. tumefaciens</i> .		
PLANTA	GEN INSERTADO	REFERENCIA
Naranja	<i>uidA</i> (B-glucuronidasa) y <i>nptII</i> (Neomicín fosfotransferasa) Resistencia a Kanamicina	Gutiérrez <i>et al.</i> , 1997
Aguacate	<i>uidA</i> y <i>nptII</i> Resistencia a Kanamicina	Cruz-Hernández <i>et al.</i> , 1998
Pérsimo	<i>uidA</i> y <i>nptII</i> Resistencia a Kanamicina	Nakamura <i>et al.</i> , 1999
Brócoli	Gen de endoquitinasa <i>uidA</i> y <i>nptII</i> Resistencia a hongos	Mora-Avilés, 2000
Zanahoria	Genes <i>tlp</i> (taumatina), <i>bar</i> (fosfinotricina acetiltransferasa) y <i>hpt</i> (higromicina fosfotransferasa) Resistencia a herbicida y hongos fitopatógenos	Chen y Punja, 2002.
Ajonjolí	Gen <i>cam-4</i> (calmodulina) de zanahoria, Sobreproducción de fenilpropanoides	Mitsuma <i>et al.</i> , 2004.
Papa	<i>mirl2</i> (inhibidor de proteasa) y <i>pmi</i> (fosfomanosa isomerasa)	Carvajal y Chaparro, 2004
Jitomate	Gen <i>ctb</i> (Toxina B del Cólera) Vacuna	Jiang <i>et al.</i> , 2004
Tabaco	Gen de la trehalosa sintasa (<i>TSase</i>)	Zhang <i>et al.</i> , 2006
Apio	<i>uidA</i> y <i>nptII</i> Resistencia a Kanamicina	Song <i>et al.</i> , 2007

2.2. PLANTAS TRANSGÉNICAS RESISTENTES A HONGOS

Las estrategias para obtener plantas transgénicas resistentes a hongos, principalmente son la introducción de genes que expresen enzimas que controlen

la síntesis de metabolitos secundarios antifúngicos o proteína y enzimas que actúen por sí mismos contra los hongos. La fitoalexinas son metabolitos secundarios vegetales que tienen un papel de defensa en las plantas contra hongos. Estos metabolitos son derivados de los isoflavonoides en leguminosas como soya y frijol, y de sesquiterpenos en solanáceas como tabaco y chile. La introducción de genes que controlen la síntesis de fitoalexinas en plantas que habitualmente no las producen, puede ayudar a la resistencia de hongos. Un ejemplo es la resistencia incrementada en plantas de tabaco a *Botrytis cinerea* por la síntesis del isoflavonoide resveratrol, cual es un metabolito común en el vino y cacahuates, que ha sido asociado con beneficios a la salud humana (Dixon *et al.*, 1996).

Las paredes celulares de los hongos son susceptibles a las acciones de enzimas hidrolíticas tales como las quitinasas y β -1,3 glucanasas. Plantas transgénicas que expresan genes de quitinasa, de glucanasa o de ambos (no propios de la planta) han mostrado una incrementada tolerancia o resistencia en contra de hongos fitopatógenos. Los genes de estas enzimas pueden ser derivados no solo de plantas sino también de bacterias, insectos y hongos (Kramer y Muthukrishnan, 1997).

Plantas transgénicas con genes de quitinasas que han mostrado resistencia son: trigo *vs. Erysiphe graminis*, sorgo *vs. Fusarium moniliforme* y pepino *vs. Botrytis cinerea* (Bliffeld *et al.*, 1999; Krishnaveni *et al.*, 1999; Tabei *et al.*, 1999). Otra enzima hidrolítica de pared celular es lisozima, la cual protege en contra de hongos y bacterias, como ocurre con plantas transgénicas de tabaco con el gen de lisozima humana, las cuales muestran una resistencia aumentada en contra del hongo *Erysiphe cichoracearum* y la bacteria *Pseudomonas syringae* (Nakajima *et al.*, 1997).

Existen inhibidores de proteínas ribosomales (RIPs, de siglas en Inglés), los cuales inactivan selectivamente ribosomas de hongos pero no los de plantas, por

lo que inhiben la síntesis de proteínas exclusivamente de hongos. Plantas de tabaco transformadas con estos genes RIP derivados de cebada y maíz confieren resistencia a la infección por *Rhizoctonia solani* (Maddaloni *et al.*, 1997).

Además, las proteínas tipo osmotina que median la tolerancia a salinidad en plantas, también tienen propiedades antifúngicas, por la interacción con la membrana celular del hongo (Yun *et al.*, 1997). Plantas transgénicas de papa que expresan estas proteínas fueron resistentes a la infección por *Phytophthora infestans* (Zhu *et al.*, 1995). Muchas de las plantas transgénicas de importancia agrícola con propiedades antifúngicas han sido probadas en campos agrícolas de los Estados Unidos de América y contienen los genes para quitinasa, glucanasa y osmotina (Malik y Saroha, 1999) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Ejemplo de plantas transgénicas con resistencia a hongos.			
PLANTA	TRANSGEN	RESISTENCIA	REFERENCIA
Tabaco y Papa	Gen de la osmotina	Resistencia a <i>P. infestans</i>	Dong <i>et al.</i> , 1994
Jitomate	Genes de quitinasa y β -1,3-glucanasa	Resistencia a <i>Fusarium</i>	Rommens <i>et al.</i> , 1995
Tabaco y Papa	Gen de endoquitinasa	Resistencia a <i>Alternaria alternata</i> , <i>A. solani</i> , <i>Botrytis cinerea</i> .	Lorito <i>et al.</i> , 2001
Trigo	Genes de quitinasa y β -1,3 glucanasa	Resistencia a hongos	Anand <i>et al.</i> , 2003
Jitomate	Gen <i>NPR1</i> de <i>Arabidopsis</i>	Resistencia a bacterias y hongos que causan marchitamiento	Lin <i>et al.</i> , 2004
Lúpulo	Gen de estilbeno sintasa	Resistencia a <i>Pseudoperonospora humuli</i> y <i>Podosphaera macularis</i>	Schwekendiek <i>et al.</i> , 2005

2.3. β -1,3-GLUCANASAS

Las β -1,3-glucanasas son proteínas relacionadas con patogénesis (proteínas PR), clasificadas como miembros de la familia PR-2. Debido a su actividad hidrolítica y que se relacionan con infección por patógenos, se sugiere que son importantes componentes de los mecanismos de defensa de las plantas en contra de patógenos (Kauffmann *et al.*, 1987; Mauch y Staehelin 1989; Linthorst *et al.*, 1991; Cordero *et al.*, 1994). Se ha demostrado que tienen un papel directo en la defensa contra hongos al hidrolizar las paredes celulares, lo que consecuentemente causa la lisis de las células fúngicas. Además, estas enzimas pueden indirectamente participar en la defensa causando la formación de oligosacáridos inductores de la producción de otro tipo de proteínas PR o compuestos antifúngicos de bajo peso molecular, tales como fitoalexinas (Keen y Yoshikawa, 1983; Ham *et al.*, 1991; Klarzynski *et al.*, 2000).

Los genes de β -1,3-glucanasas han sido identificado en diferentes especies de plantas, incluyendo tabaco (De Loose *et al.*, 1988), soya (Takeuchi *et al.*, 1990), caucho (Chye y Cheung., 1995), plátano (Peumans *et al.*, 2000) y arroz (Yamaguchi *et al.*, 2002). Además de que las plantas tienen diferentes genes β -1,3-glucanasas, una planta puede tener varias copias de dichos genes. Por ejemplo, más de 14 genes de β -1,3-glucanasa se han encontrado en plantas de tabaco (Leubner-Metzger y Meins, 1999).

Las proteínas codificadas por los diferentes genes de β -1,3-glucanasa muestran diferencias en el tamaño, punto isoeléctrico (pI), estructura primaria, localización celular y en el patrón de regulación (Meins *et al.*, 1992). En base a estas diferencias, especialmente en las secuencias de aminoácidos, tanto las β -1,3-glucanasas de tabaco y otras plantas, se han clasificado en cinco clases (Leubner-Metzger y Meins, 1999).

Las β -1,3-glucanasas mejor caracterizadas son las isoformas de la clase I que son inducidas por etileno o infección por patógenos y su regulación es determinada por el desarrollo de la planta (Felix y Meins, 1986); éstas se localizan únicamente en las vacuolas (Van Den Bulcke *et al.*, 1989). La clase II incluye a las proteínas de respuesta a patógenos PR-2, PR-N, PR-O, y PR-35 (Kauffmann *et al.*, 1987; Van Den Bulcke *et al.*, 1989), también son inducidas por patógenos y se localizan en los espacios extracelulares. La clase III, que incluye la proteína de respuesta a patógenos PR-2d, también denominada PR-Q' (Payne *et al.*, 1990), también es inducible por el ataque de patógenos y se encuentra localizada en espacios extracelulares. Los miembros de la clase IV, que incluyen a las proteínas sp41a y sp41b, se acumulan en altos niveles en el tracto del estilo y no son inducibles por patógenos (Ori *et al.*, 1990).

La de clase V es una β -1,3-glucanasa extracelular que se expresa en la antera (Bucciaglia y Smith, 1994) y está involucrada en la disolución de tétradas callosas. La función de estas proteínas es la de catalizar la hidrólisis de los enlaces β -1,3;1,4 de los glucanos, que son componentes mayores en las paredes celulares de endospermo y de hongos fitopatógenos (Fincher *et al.*, 1986). Además de las diferencias en el pI y localización celular, las β -1,3-glucanasas clase II, III y IV difieren de la clase I en la masa molecular y secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, la masa molecular de β -1,3-glucanasa de tabaco, es de 33 kDa, mientras que la de la clase II (PR-2a, PR-2b, PR-2c), clase III (PRQ') y clase IV (tag1) están en un rango de 34 to 36 kDa (Beffa *et al.*, 1993; Bucciaglia y Smith, 1994). De manera general, las enzimas de las clases II, III y IV no contienen una extensión en el carboxilo terminal (Linthorst *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1991; Beffa *et al.*, 1993), aunque algunas de la clase II y las de la clase I tienen péptidos señal (Von Heijne, 1983).

Según la secuencia de aminoácidos en las β -1, 3-glucanasas maduras de la clase II, III y IV, pueden distinguirse unas de otras, ya que difieren en homología de por lo menos entre un 40 y 50% (Meins *et al.*, 1992; Simmons, 1994). Por ejemplo, la

β -1, 3-glucanasa tag1 (clase IV) muestra un 37-38% de identidad en la secuencia de formas maduras de las β -1, 3-glucanasas clase I (Gla), clase II (PR-2) y clase III (PR-Q) de tabaco (Payne *et al.*, 1990; Bucciaglia y Smith, 1994; Leubner-Metzger y Meins, 1999).

Diversos reportes indican que diferentes β -1,3-glucanasas pueden ser inducidas en plantas como respuesta al ataque de patógenos. Estudios en plantas de tabaco se ha demostrado que las clase I y III se inducen de manera local y sistémica (Tuzun *et al.*, 1989; Ward *et al.*, 1991; Lusso y Kuc, 1995; Bol *et al.*, 1996); en cebada se inducen por mildiú (Ignatius y Chopra, 1994), en maíz al infectarlo con *Aspergillus flavus* (Lozovaya *et al.*, 1998), en soya infectada con *Pseudomonas syringae* (Cheong *et al.*, 2000), en pimiento con *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y *Phytophthora capsici* (Jung y Hwang, 2000), en trigo infectado con *Fusarium graminearum* (Li *et al.*, 2001) y en durazno al infectarlo con *Monilinia fructicola* (Zemanek *et al.*, 2002).

Varias de las clases de β -1,3-glucanasas de diferentes plantas (tabaco, tomate, arroz y trigo) han mostrado tener actividad antifúngica *in vitro* contra el crecimiento de diversos hongos fitopatógenos como *Fusarium solani* (Sela-Buurlage *et al.*, 1993), *Alternaria solani*, *Trichoderma viridae* y *Phytophthora infestans* (Lawrence *et al.*, 1996; Anfoka y Buchenauer, 1997).

2.3.1. Mecanismo de acción antifúngica de β -1,3-glucanasas

La actividad antifúngica de las β -1,3-glucanasas se debe a su capacidad de hidrolizar los enlaces β -1,3 de los glucanos que forman parte de la pared celular de los hongos, particularmente en el apresorio hifal de hongos filamentosos donde éstos se encuentran más expuestos, resultando en el debilitamiento de la pared celular. Debido a la alta presión de turgor presente en las células hifales, este debilitamiento en la pared lleva a la lisis y consiguiente muerte celular (Selitrennikoff, 2001).

2.3.2. Expresión de genes de β -1, 3-Glucanasa en plantas transgénicas

Algunos genes de β -1,3-glucanasa, solos o junto con genes de quitinasa, han sido transferido a cierto número de plantas y expresados constitutivamente en ellas. En muchos casos, las plantas transgénicas resultantes han exhibido altos niveles de resistencia al ataque por hongos o disminuido los síntomas de la enfermedad, al compararse con las plantas control (Zhu *et al.*, 1994; Jach *et al.*, 1995; Jongedijk *et al.*, 1995). En algunos casos se ha obtenido que la expresión de los transgenes de β -1,3-glucanasa solamente ha reducido la susceptibilidad de las plantas a la infección por ciertos hongos. Por ejemplo, plantas transgénicas de tabaco que expresaron la β -1,3-glucanasa de soya, mostraron reducidos síntomas al infectarlas con *Alternaria alternata* (Yoshikawa *et al.*, 1993). También plantas transgénicas de tabaco que expresaron la β -1, 3-glucanasa clase III de la misma planta, mostraron una reducida infección por *Phytophthora parasifica* var *nicotinae* o con *Peronospora tabacina* (Lusso y Kuc, 1996). Resultados similares de han reportado en plantas de tomate y alfalfa, las cuales se han protegido contra el ataque de sus hongos patógenos respectivos como: *Rhizoctonia solani* (Jach *et al.*, 1995), *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Jongedijk *et al.*, 1995), *Fusarium solani* (Melchers *et al.*, 1993; Sela-Buurlage *et al.*, 1993), *Cercospora nicotianae* (Zhu *et al.*, 1994) y *Phytophthora megasperma* f. sp *medicaginis* (Masoud *et al.*, 1996).

2.3.3. β -1,3-glucanasa clase III de Tabaco

La β -1,3-glucanasa Clase III de tabaco es de carácter ácido de 35 kDa y no contiene la extensión C-terminal típica de otras glucanasas como las de la Clase I, lo que le permite ser excretada y no permanecer en vacuola (Van Loon *et al.*, 1994). Es denominada PR-Q' ó PR-2d y es la única representativa de la clase III en tabaco. Fue reportada y secuenciada por Payne y colaboradores en 1990. (Cuadro 3).

Cuadro 3. Secuencia de bases del ARNm (1195 pb) del gen de la proteína PR-Q' (glucan endo-1,3-beta-glucosidasa, EC=3.2.1.39) de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Locus X54456 (Payne *et al.*, 1990).

1	CTGCAGTTTT	GACAGAGTTG	TTGTCATGGC	AACAAAAGCT	TCTCTCTCCA	50
2	TAAAAGGCTT	TGCCTTGCTG	GTTTCAGTCC	TTGTAGCAGT	TCCAACAAGA	100
3	GTGCAATCGA	TTGGTGTCTG	CTACGGCATG	CTCGGCAACA	ATCTTCCCCC	150
4	GCCCAGCGAG	GCCCAGCGAG	TCTACAAATC	CAACAACATC	GCGAGGATGA	200
5	GACTCTACGA	TCCAAACCAA	GCCGCCCTGC	AAGCCCTCAG	GAACTCCAAC	250
6	ATCCAAGTCC	TGTTGGATGT	CCCCCGATCC	GACGTGCAGT	CACTGGCCTC	300
7	CAATCCTTCG	GCCGCCGGCG	ACTGGATCCG	GAGGAACGTC	GTCGCCTACT	350
8	GGCCAGCGT	CTCCTTTCGA	TACATAGCTG	TCGGAAACGA	GCTGATCCCC	400
9	GGATCGGATC	TGGCGCAGTA	CATCCTCCCC	GCCATGCGCA	ACATCTACAA	450
10	TGCTTTGTCC	TCGGCTGGCC	TGCAAAAACCA	GATCAAGGTC	TCGACCGCGG	500
11	TCGACACGGG	CGTCCTCGGA	CGTCCTACCC	TCCCTCCGCC	GGCGCCTTCT	550
12	CCTCCGCCCG	CCAGGCGTAC	CTGAGCCCCA	TCGTGCAGTT	CTTGGCGAGT	600
13	AACGGAGCGC	CGTCCTGGT	CAATGTGTAC	CCTTATTTTA	GCTACACCGG	650
14	CAACCCGGGA	CAGATCTCGC	TGCCCTACGC	CCTGTTACAG	GCCTCCGGCG	700
15	TCGTCGTGCA	GGATGGGCGA	TTCAGCTATC	AGAACCTGTT	CGACGCCATC	750
16	GTCGACGCGG	TCTTCGCGGC	GCTGGAGAGA	GTGGGAGGGG	CGAACGTGGC	800
17	GGTGGTGGTG	TCGGAGAGCG	GGTGGCCGTC	GGCGGGCGGA	GGAGCCGAAG	850
18	CGAGCACCAG	CAACGCGNGG	ACGTACAACC	AGAACTTGAT	CAGGCATGTT	900
19	GGCGGAGGAA	CGCCGAGGAG	ACCAGGGAAG	GAGATCGAGG	CGTACATATT	950
20	CGAGATGTTC	AACGAGAACC	AGAAGGCTGG	AGGGATCGAG	CAGAACTTTG	1000
21	GCCTGTTTTA	TCCCAACAAG	CAGCCCGTCT	ACCAAATAAG	CTTNTAGAAA	1050
22	CTAACTTGTA	AGGTTGATGA	ATCATNTCCT	ACCTACCTAC	CTACGAATAA	1100
23	AACATGAAAT	AAAGCACCAG	AATAAAGGGA	GAATTCTGAT	CTTGGAGAAA	1150
24	AAAAAAAAAA	AAAAA				1165

2.4. LAS ORQUÍDEAS

Las orquídeas conforman la familia más extensa del reino vegetal, con alrededor de 30, 000 especies divididas en unos 1, 800 géneros distribuidos por todo el mundo. Esta familia (Orchidaceae) forma parte de la Clase *Liliopsida*, es decir, de las que comúnmente se denominan angiospermas monocotiledóneas. Solamente existen dos ambientes en la tierra donde no prosperan estas plantas, los polos y los desiertos de arena, han sobrevivido durante miles de años, mucho antes de que el hombre habitara el planeta, ya las orquídeas reinaban en él. Son las plantas más evolucionadas y especializadas, su capacidad para adaptarse es notable, pueden crecer tanto a nivel del mar como en los elevados páramos, muchas viven sobre los árboles (epífitas), otras lo hacen sobre las rocas (litófitas), otras sobre la tierra y algunas especies se desarrollan incluso en ambientes subterráneos.

Algunas llegan a medir solo unos pocos centímetros y otras pueden tener el porte de un árbol (Dressler, 1981).

Los países centroamericanos son particularmente ricos en variedades de todo tipo, aunque en el continente americano se encuentran distribuidas desde las zonas más templadas de los Estados Unidos, pasando por México, Guatemala, Belice y todos los demás países sudamericanos hasta Chile. México, Colombia, Venezuela (cuya flor nacional es la *Cattleya*) y Brasil son particularmente ricos en especies de orquídeas. En Europa se ubican a todo lo largo de Europa y en la cuenca del Mediterráneo, con excepción de aquellos lugares que por sus condiciones de altitud no ofrecen un clima propicio para el desarrollo de las orquídeas. En Asia se les encuentra en abundancia en China Sudoriental, Filipinas, India, Java, Birmania, Tailandia, Nueva Guinea e islas adyacentes y la península Indochina. También las hay al norte del continente australiano y en gran abundancia en las zonas tropicales de África y en Madagascar. Es interesante hacer notar que cada continente tiene especies endémicas y únicas en diferentes regiones, que no se encuentran en ningún otro continente, lo cual hace suponer que las orquídeas tomaron líneas evolutivas diferentes después de la separación de la Pangea (Wiard, 1987).

2.4.1. Reproducción

Al igual que las demás plantas fanerógamas, las orquídeas se reproducen sexualmente. En géneros como *Cattleya*, alcanza un asombroso promedio de 30,000 semillas por cápsula. Las semillas son realmente pequeñas, y tan ligeras que son arrastradas por el viento y la lluvia. A pesar de tan asombrosa fecundidad, si acaso alguna semilla de cada cápsula llegue a adulta, ya que no sólo debe conseguir un sustrato favorable, sino que además debe establecer una asociación simbiótica con una micorriza del género *Rhizoctonia*. La asociación entre ambos seres fue descubierta a principios de siglo. Este hongo introduce sus hifas en el interior del tegumento de la semilla, proporcionándole nutrimentos en sus primeras

etapas, a cambio de un sustrato donde se pueda desarrollar el hongo. Si se logra establecer exitosamente esta relación, la semilla se desarrolla en un protocormo, conjunto de células indiferenciadas de rápido crecimiento, luego formando una plántula. Por esta razón el cultivo de orquídeas por métodos convencionales ofrece una efectividad prácticamente nula. Afortunadamente existe la técnica del cultivo *in vitro* (Ávila, 1996).

Aunque algunas orquídeas tienen una vida corta, la generalidad de ellas es que poseen condiciones sobresalientes de resistencia, se adaptan y logran sobrevivir en las más difíciles condiciones del medio. Muchas especies, separadas del lugar donde crecen y sometidas a condiciones extremas, son capaces de reiniciar su crecimiento y desarrollo tan pronto como sean replantadas; presentan una durabilidad extraordinaria, que las hace en elemento de alto valor como flor cortada u ornamental; las flores separadas de la planta pueden permanecer sin marchitarse hasta tres o cuatro semanas; en la planta permanecen hasta tres meses, como en el *Cymbidium lowvianum*. Las orquídeas, además se multiplican a través de propagación agámica, a través de la formación de hijuelos que pueden aparecer en la base del tallo y con frecuencia en los nodos de la vara floral, y que son conocidos como “keikis”. Los keikis desarrollan sus propias hojas y raíces y eventualmente se desprenden de la planta madre para dar lugar a una nueva planta independiente. Cualquier orquídea puede desarrollar keikis en algún momento de su desarrollo, pero lo más usual es que ocurra después de alcanzar la madurez sexual (Jones, 1986).

En la figura 1 se muestra de manera esquemática el ciclo de vida de la orquídea *Phalaenopsis* sp., donde se observa su sistema de reproducción sexual (por semillas) y asexual o agámica (por hijuelos). Un proceso específico de las orquídeas es la formación de estructuras protocórmicas (protocormos), las cuales se desarrollan por la germinación del embrión y a partir del cual se forman las plántulas.

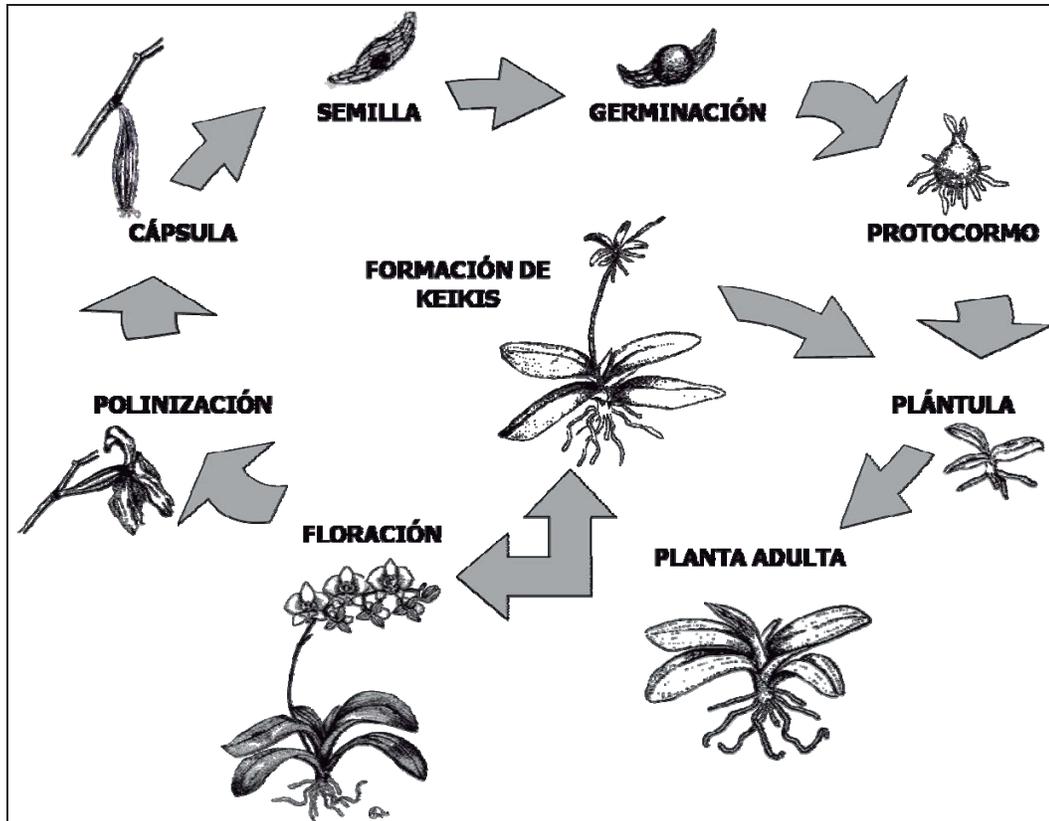


Figura 1. Ciclo de vida de *Phalaenopsis* sp. La formación de protocormos es específica para la familia Orchidaceae. A partir de la germinación, el género *Phalaenopsis* requiere entre 3 y 6 años para alcanzar la etapa de floración.

2.4.2. Micropropagación

La micropropagación de las orquídeas puede hacerse a partir de semillas, protocormos o explantes. Las semillas pueden perder su viabilidad prontamente y mostrar largos periodos de germinación, por lo tanto se han buscado formas alternas y rápidas de micropropagación basadas en explantes, tomados a partir de plántulas y plantas desarrolladas *in vitro*, en medios adicionados con reguladores de crecimiento y/o complejos orgánicos. Todo ello se ha desarrollado con fines de producción y conservación (Arditti, 1982; George y Sherrington, 1984).

El medio Knudson C ha sido, probablemente, el más usado en la propagación *in vitro* de orquídeas desde su aparición en 1946. Algunas modificaciones de este medio han permitido alternativas en la propagación de orquídeas no solo a partir de semillas, sino también usando explantes. Estos procedimientos se han aplicado en diversos géneros entre los que cabe mencionar a *Phalaenopsis*, el más que se ha estudiado en torno a la micropropagación a partir de explantes de las inflorescencias que producen cuerpos parecidos a protocormos (PBL). Para el género *Epidendrum*, los estudios son escasos. Steward y Button realizan en 1976 el cultivo *in vitro* a partir de inflorescencias de *Epidendrum O'brienianum*. Desde 1916 se reportan métodos de micropropagación de orquídeas, la mayoría comerciales y algunas amenazadas (Knudson, 1922; Arditti, 1982).

La productividad en la micropropagación de muchas especies y cultivares de orquídeas ha sido base de la próspera industria mundial productora de vitroplantas (Murashige, 1974). Sin embargo, se ha observado que la tasa de multiplicación, y con ello el rendimiento de los cultivos, depende en gran medida de la metodología utilizada. De igual manera, la producción de cuerpos protocórmicos presenta rendimientos sustancialmente superiores a los de la brotación axilar, lo cual es un requisito indispensable para la calidad de un programa de propagación con fines comerciales. De ahí que se han concentrado esfuerzos para la optimización de los procesos de micropropagación por la producción de cuerpos protocórmicos de *Phalaenopsis* spp., una de las orquídeas de mayor demanda mundial.

2.4.3. Comercialización

Se sabe que hace miles de años los aztecas utilizaban algunas especies de orquídeas para curar heridas. En el México precortesiano, se usaron también diversas especies como ornamentos de los géneros *Stanhopea* y *Laelia*, costumbres medicinales que en muchas comunidades indígenas de América todavía se conservan (Hágsater *et al.*, 2005).

Ahora bien, debido a su belleza, las orquídeas tienen gran demanda en el mercado internacional de flores y alcanzan precios en algunos casos exorbitantes, motivo por el cual han sido y son víctimas de depredación en todos los lugares donde crecen de manera natural. En el mundo se calcula que hoy en día casi nueve millones de orquídeas y flores de los bosques tropicales son recolectadas con destino a países occidentales y cada día, los que comercian de manera ilegal con esta especie están en búsqueda de una nueva variedad, la más exótica, la más extraña, las mismas que son subastadas en el mercado negro a cultivadores y coleccionistas en miles de dólares (USDA, 2006).

En el 2006, la USDA (United States Department of Agriculture) registró a las orquídeas como el segundo grupo de plantas ornamentales más vendidas en Estados Unidos de América, con ganancias de casi 150 millones de dólares (Figura 2). En 1996, cuando las orquídeas comenzaron a aparecer en las estadísticas, éstas apenas llegaban a los 100 millones de dólares anuales en ventas; en la actualidad, su valor de mercado se ha incrementado en un 206.4%, superando radicalmente a cualquier otra especie de interés ornamental (USDA, 2006).

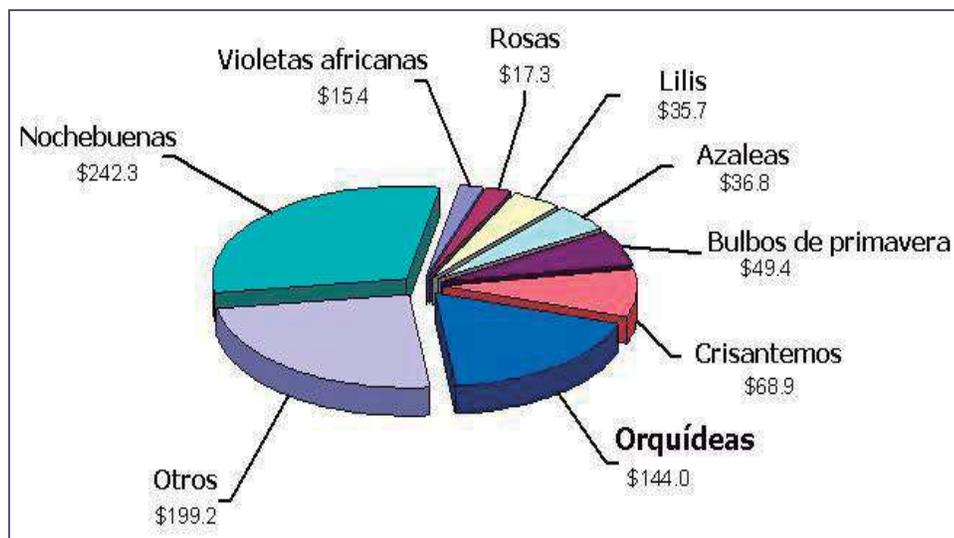


Figura 2. Importancia comercial de *Phalaenopsis* sp. Ganancias en millones de dólares en venta de diferentes plantas de valor ornamental en los Estados Unidos de América (USDA 2006).

2.4.4. Transformación genética de orquídeas

La transformación genética en orquídeas se ha enfocado principalmente a la inserción de genes reporteros y marcadores, como *uidA*, *nptII*, *hpt* y *hptII* (Cuadro 4), con el objeto de eventualmente llevar a cabo modificaciones en las plantas, principalmente en las flores. Siendo las flores el principal atractivo de las orquídeas, se espera obtener en el futuro ejemplares con formas florales modificadas, combinaciones de colores novedosas y mayor vida de anaquel dado el extenso mercado que existe para la flor cortada.

Sin embargo, los adelantos biotecnológicos de la última década han llevado la transformación genética de orquídeas un poco más lejos, hacia la producción de plantas con tolerancia a estrés biótico o abiótico (Sanjaya y Chan, 2007) o con resistencia a microorganismos fitopatógenos (Anzai *et al.*, 1996; Mii *et. al*, 2006). Aunque las modificaciones genéticas enfocadas a la arquitectura de las orquídeas siguen predominando como proyectos científicos, los adelantos en la transformación genética han abierto ya una enorme gama de posibilidades para la investigación y el mejoramiento de las orquídeas.

Cuadro 4. Ejemplos de orquídeas genéticamente transformadas.

Especie	Tejido	Gen	Referencia
<i>Cymbidium</i> spp.	Protocormos	<i>hpt</i> , <i>nptII</i> , <i>uidA</i>	Mii <i>et al.</i> , 2007
<i>Vanilla planifolia</i>	Protocormos	<i>nptII</i> , <i>uidA</i>	Malabadi y Nataraja, 2007
<i>Phalaenopsis</i> spp.	Protocormos	<i>hptII</i> , <i>uidA</i>	Mishiba <i>et al.</i> , 2005
<i>Oncidium</i> spp.	Protocormos	<i>hptII</i> , <i>uidA</i>	Liau <i>et al.</i> , 2003
<i>Dendrobium</i> spp.	Protocormos	<i>hptII</i> , <i>uidA</i>	Men <i>et al.</i> , 2003
<i>Phalaenopsis</i> spp.	Callos	<i>hpt</i> , <i>uidA</i>	Belarmino y Mii, 2000
<i>Phalaenopsis</i> spp.	Protocormos	<i>hpt</i> , <i>uidA</i>	Lin, 1999
<i>Phalaenopsis</i> spp.	Semillas en germinación	<i>hpt</i> , <i>uidA</i>	Huang, 1997

2.5. *Phalaenopsis* spp.

2.5.1. Características principales

El nombre de *Phalaenopsis* (de *phalaina*, polilla, y *opsis*, semejante) designa a una tribu de orquídeas que es comúnmente conocida como la orquídea mariposa porque se asemeja estrechamente a esa clase de insectos. Sus flores crecen en largos y arqueados ramajes que en ocasiones caen elegantemente, portando un buen número de flores hermosamente proporcionadas y de delicados colores. Las *Phalaenopsis* están adaptadas a las condiciones imperantes en la jungla. El hábitat natural de esta planta se encuentra en las Filipinas y en las zonas tropicales asiáticas, así como en Australia y África. Generalmente crecen a baja altitud, situada en la parte baja de árboles con pocas hojas y en general cerca de cursos de agua. Algunas especies crecen de forma litofítica sobre rocas cubiertas de musgo (Fanfani, 1990).

Las plantas del género *Phalaenopsis* son orquídeas que pertenecen a la tribu Vandae (Cuadro 5), las más comunes son cerca de 40 especies distribuidas en las regiones tropicales de Asia, Indonesia, Filipinas, Nueva Guinea y Australia. La descripción más antigua de este género es de la especie *Phalaenopsis amabilis*, hecha por Rumphius en 1750 como *Angreacum album majus*. Linneo en 1753 la describió como *Epidendrum amabile*, en 1814 Roxburgh la transfirió al género *Cymbidium* como *Cymbidium amabile* y finalmente Blume la estableció como el género *Phalaenopsis* en 1825 (Sweeth, 1980; Fanfani, 1990).

La mayoría de las flores de esta tribu son blancas o de un rosado lavanda y su tamaño va de casi 2 cm a 12 cm. Las flores, algunas veces, abren todas de una vez, o unas cuantas, poco a poco, durante un período de dos a cinco meses. Existen cientos de híbridos muy cotizados en el comercio mundial de plantas ornamentales, por su gran colorido y formas de sus flores (Sweeth, 1980).

Cuadro 5. Ubicación taxonómica de *Phalaenopsis* spp. (Sweeth, 1980).

Reino: Vegetal

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsidae

Orden: Orchidales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu: Vandeeae

Subtribu: Sarcanthinae

Género: *Phalaenopsis*

Las plantas de este género, pueden ser pequeñas, medianas y grandes, carentes de pseudobulbos y son de estructura monopodial. El tallo tiene por lo general una altura muy reducida, envainado desde la base de las hojas y puede estar atravesado por gruesas raíces que brotan del mismo tallo. Por lo general las hojas aparecen en número de cuatro a cinco, elípticas, ovaladas o lanceoladas, alternadas, carnosas, muy juntas, de dimensiones y colores variables según la especie, desde algunos centímetros hasta un metro. Tallos florales axilares, rígidos, más o menos largos, ramificados o no, erectos, horizontales o péndulos, pueden portar desde una o dos flores hasta más de cien. Las flores, que se abren en sucesión, son más o menos grandes y consistentes, de formas, colores, difuminados y dibujos muy variables, incluso en el ámbito de la misma especie, pero invariablemente de labelo trilobado en forma de gancho. El periodo de floración cambia según la especie y con frecuencia se prolonga durante varios meses, siendo también notable la duración de las flores. Existen casi 50 especies, la mayoría epífitas y solo algunas litófitas y varios miles de híbridos (Fanfani, 1990).

De *P. amabilis* y otras especies actualmente existen miles de híbridos representando nuevas formas y una gran gama de colores, incluyendo variedades

blancas, rosadas, lavandas, amarillas y rojas, además de patrones estriados, manchados o pecosos. Las combinaciones de colores, patrones, tamaños, formas y texturas arrojan un número incalculable de diseños florales que pueden originarse a través de cruces. Las flores blancas provienen de *P. amabilis* y *P. aphrodite*, mientras que las rosadas son originadas por *P. sanderiana* y *P. schilleriana*. Las estrías provienen de *P. lindenii* y *P. intermedia* (un híbrido natural entre *P. equestris* y *P. aphrodite*), y las pecas se presentan gracias a especies como *P. stuartiana* y *P. leuddemanniana*. Muchas miniaturas de gran colorido han sido desarrolladas a partir de *P. pulcherrima*, *P. lobbii*, *P. maculata* y *P. parishii*. Sin embargo, la especie más utilizada para crear nuevos híbridos es *P. amabilis*, debido a que sus flores son las más grandes (hasta 8 centímetros de pétalo a pétalo) dentro del género *Phalaenopsis*. Así mismo, existen híbridos intergenéricos como *Dendrophalaenopsis* (*Dendrobium* x *Phalaenopsis*) que también gozan de gran popularidad en el mercado internacional (Laurel Glen Publishing, 2002).

Phalaenopsis amabilis es una orquídea de muy fácil cultivo, especialmente en interiores, lo que le ha granjeado su popularidad entre los amantes de las plantas con flor. Los sustratos más recomendados incluyen materiales como corteza de encino, tezontle o perlita, y carbón de hulla en diferentes proporciones, lo cual garantiza un buen drenaje y una correcta aireación de las raíces. La temperatura es determinante para el desarrollo de *Phalaenopsis*; temperaturas de 28 a 32° C aseguran un crecimiento vegetativo favorable, un rango de 17 a 25° C induce la formación de la vara floral, y con un ambiente que se encuentre entre los 17 y los 26° C, se asegura el mayor número y tamaño posible de flores por vara. Niveles mayores o menores son tolerables, con el único inconveniente de que podría verse retrasada la floración. No es recomendable mantener a *Phalaenopsis amabilis* o sus híbridos bajo la luz solar directa; la iluminación óptima fluctúa entre los 1600 y los 2000 luxes (1.6 – 2.0 klx) (Runkle *et al.*, 2007).

2.5.2. Plagas y enfermedades

Las condiciones de cultivo que propician el crecimiento de las orquídeas en el invernadero favorecen de igual manera la proliferación y el desarrollo de diferentes enfermedades y plagas, motivo por el cual el floricultor debe prestar constante atención a todos sus ejemplares. Las plantas de reciente introducción deberán mantenerse en observación al menos por un mes para disminuir las probabilidades de un posible contagio en caso de existir organismos fitopatógenos en el sustrato o en el follaje (Runkle *et al.*, 2007; AOS, 2002).

Las especies de *Phalaenopsis* al igual que otras orquídeas son atacadas por diferentes patógenos desde moluscos (caracoles y tlaconetes de jardín, *Slytommatophora*), algunos artrópodos como pulgones (Aphididae), insectos de escamas armadas (Diaspididae) y escamas blandas (Coccidae), ácaros (Acari), trips (Thysanoptera), piojos harinosos o algodonosos (Pseudococcidae), y algunas especies de escarabajos y avispas. En sus etapas larvales algunos de estos organismos se alimentan de hojas, tallos, flores, o incluso raíces ocasionando serias lesiones; otros succionan los fluidos vegetales ocasionando manchas cloróticas, deshidratación, e incluso muerte de la planta si las colonias son muy numerosas. El uso de insecticidas es variable según el tipo de plaga que se presente, y en ocasiones es posible utilizar solo agua jabonosa para detener y eliminar la infestación (AOS, 2002).

Entre los microorganismos que atacan a este tipo de orquídeas se mencionan a los virus como el Virus del Mosaico del *Cymbidium* (CyMV) y el Virus del Mosaico del Tabaco (TMV), a las bacterias *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi* y *Erwinia cypripedii* y *Pseudomonas cattleya*, y entre los principales hongos a *Colletotrichum*, *Cercospora*, *Gloeosporium*, y *Phyllostictina*, aunque existe una gran variedad de hongos que producen manchas foliares que disminuyen el valor de las orquídeas en el mercado. *Botrytis cinerea* representa una amenaza mucho peor para los floricultores, ya que produce la enfermedad del Tizón de los Pétalos

en una gran variedad de orquídeas, provocando, como su nombre lo indica, manchas oscuras en las flores que varían en tamaño y número de acuerdo con el grado de avance de la enfermedad en la planta. *Phytium ultimum* y *Phytophthora cactorum* causan la enfermedad de la pudrición negra en una gran variedad de plantas, destruyendo en las orquídeas desde los pseudobulbos hasta las varas florales. *Fusarium oxysporum*, uno de los hongos considerado como el más difícil de erradicar o controlar en orquídeas, causa la enfermedad del marchitamiento o pudrición de los pseudobulbos denominada fusariosis (AOS, 2002).

2.5.3. *Fusarium oxysporum*

Uno de los hongos que ocasionan más pérdidas en invernaderos de orquídeas es *Fusarium oxysporum*, un hongo asexual que produce tres tipos de esporas: microconidios, macroconidios y clamidosporas. Los microconidios, integrados por una a dos células, son los que se generan más en las plantas infectadas pero pueden ser producidos en cualquier estadio de vida del hongo. Los macroconidios están formados por tres a cinco células que gradualmente se alargan y terminan en puntas curvadas; éstas se encuentran con frecuencia en el tejido superficial de plantas que han muerto por fusariosis. Las clamidosporas son esporas redondas, de pared gruesa, formadas por una o dos células, y pueden permanecer en estado latente en el suelo sin perder su viabilidad por espacio de hasta 30 años, siendo capaces de infectar plantas en ese tiempo, *F. oxysporum* puede subsistir indefinidamente en su forma micelial o a través de sus esporas (Agrios, 2005).

Los tres tipos de esporas se dispersan fácilmente a través del viento, agua de riego, maquinaria de granja y herramientas de jardinería. También pueden infectar plantas no-hospederas, que muestran pocos o ningún síntoma de fusariosis, pero que actúan como portadoras de la enfermedad; el hongo se mantiene vivo y virulento en esas plantas hasta que se aloja en una planta hospedera (Mace y Bell, 1981).

F. oxysporum es un hongo necrotrófico especializado, cuyo crecimiento se encuentra restringido a una variedad de hospederos, cuyas células mata para alimentarse a partir de los tejidos vegetales muertos (Herrera y Ulloa, 1998). Uno de los principales síntomas del ataque del hongo es el marchitamiento, que ocurre cuando el hongo se aloja en el sistema vascular. Una vez allí, el micelio produce toxinas que afectan la permeabilidad de las hojas, causando un descontrol sobre la pérdida de agua del hospedero; al mismo tiempo, enzimas pectinolíticas producen gomas y geles derivados de la degradación de los tejidos vegetales, bloqueando el flujo de agua a través de los haces vasculares (Herrera y Ulloa, 1998). De este modo, la planta hospedera muere entre 3 y 9 semanas después de la infección, aunque es frecuente que muchas plantas sobrevivan por espacio de un año o más en constante declive (AOS, 2002; Vázquez-Ávila, 2000).

En orquídeas, además del marchitamiento, aparecen hojas amarillentas y deshidratadas y pseudobulbos ligeramente torcidos por la marchitez, además de lesiones necróticas en las bases de las hojas y del tallo y pudrición de la raíz, que presenta bandas púrpuras características de la infección por *Fusarium* (AOS, 2002). En el caso de las orquídeas monopodiales como *Vanda* y *Phalaenopsis*, la fusariosis puede llegar a ser una enfermedad letal ya que la retirar las zonas infectadas supone necesariamente cortar la base del tallo, del cual depende toda la parte aérea.

F. oxysporum ha probado ser resistente a varios fungicidas, y aunque el tratamiento de la enfermedad es posible con agentes químicos como el Tecto 60® (tiabendazol) y el Benlate® (benomilo), en la mayoría de los casos es poco probable contener la infección (Vázquez-Ávila 2000). La penetración del hongo es tal, que eliminar la enfermedad es muy difícil y en muchos casos se recomienda quemar los tejidos e incluso de la totalidad de las plantas infectadas para contener la propagación de la enfermedad (Light, 2004).

Para la producción masiva de *Phalaenopsis* es necesario contar con miles de plantas en diferentes estadios de desarrollo, mismas que se encuentran expuestas al ataque de hongos fitopatógenos que causan grandes pérdidas a los floricultores, como *Fusarium oxysporum* (Wan *et al.*, 1997), *Rhizoctonia solani* (Agrios, 2005), *Phytophthora cactorum* (Ranadive, 1994) y *Botrytis cinerea* (Coley-Smith *et al.*, 1980). Existen antecedentes de transformación genética en orquídeas como *Cymbidium* (Yang *et al.*, 1999), *Dendrobium* (Nan *et al.*, 1997; Nan *et al.* 1998) y *Phalaenopsis* (Anzai *et al.*, 1996), utilizando solo genes marcadores o reporteros (Chen *et al.*, 2003), y de la misma manera hay muchos trabajos previos de transformación genética en diferentes plantas de interés agrícola con genes de acción antifúngica.

Por la necesidad de encontrar nuevas alternativas para el mejoramiento de plantas, principalmente para la generación de orquídeas que muestren resistencia a organismos fitopatógenos, una posibilidad es la transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* con el fin de insertar genes que confieran resistencia a hongos.

3. HIPÓTESIS

La transformación de plántulas de *Phalaenopsis amabilis* con el gen de la β -1,3-glucanasa (*PR-Q'*) de *Nicotiana tabacum* confiere resistencia a *Fusarium oxysporum*.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtener plantas transgénicas de *P. amabilis* con el gen PR-Q' de la β - 1, 3-glucanasa.

4.1.1. Objetivos específicos

1. Establecer el sistema de micropropagación de *P. amabilis* a través de la producción de protocormos.
2. Obtener plantas de *P. amabilis* con el gen de la β -1,3-glucanasa (*PR-Q'*) transformadas por *Agrobacterium tumefaciens*.
3. Comprobar la transgénesis de las plántulas de *P. amabilis* mediante métodos moleculares.
4. Evaluar la resistencia *in vitro* de las plantas transgénicas de *P. amabilis* a *Fusarium oxysporum*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron plántulas *in vitro* de seis meses de edad de *Phalaenopsis amabilis* (Blume) var. Luchia Lady, las cuales fueron establecidas *in vitro* previamente a partir de semillas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), sin reguladores de crecimiento (Figura 3).

Se usó la cepa LBA4404 de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido pCAMBIA-2301, cultivada en medio sólido YEB (extracto de levadura 1 g/l; sulfato de magnesio 0.1 g/l; sacarosa 5 g/l; peptona de caseína 5 g/l; peptona de carne 5 g/l; agar bacteriológico 10 g/l), a 28°C.

El plásmido contiene el gen de selección *nptII* de la neomicín fosfotransferasa II, que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, y el gen reportero *uidA*, que codifica para la expresión de la enzima β -glucuronidasa. La construcción contiene el gen *PR-Q'* de 1195 pb para la expresión de la β -1-3-glucanasa clase III (Payne *et al.*, 1990), insertado en el sitio de clonación múltiple. El gen cuenta con un promotor 35S y un terminador *nos*, flanqueados por sitios de restricción *HindIII*. (Figura 4). La cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, el plásmido pCAMBIA-2301 y el gen *PR-Q'* que contiene fueron donados por el Dr. Miguel A. Gómez Lim, del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato.

Se utilizó una cepa de *Fusarium oxysporum*, donada por la Facultad de Agrobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Se mantuvo bajo cultivo a 28° C en medio Agar Dextrosa-Papa (PDA, Bioxón®, Becton Dickinson de México).



Figura 3. Ejemplar de *Phalaenopsis amabilis* (Blume) var. Luchia Lady, del cual se logró el establecimiento *in vitro* de plántulas, utilizadas como fuente de explantes para esta investigación.

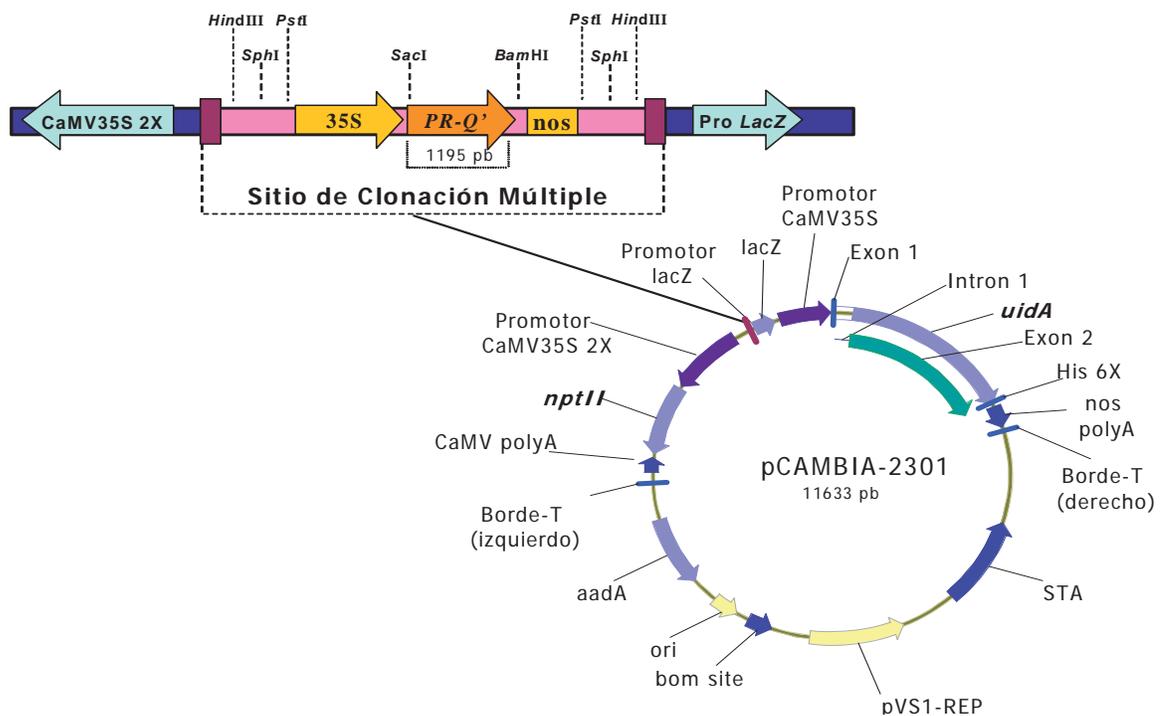


Figura 4. Plásmido pCAMBIA-2301 con el gen marcador *uidA* de la β -Glucuronidasa y el gen reportero *nptII* de la neomicín fosfotransferasa II que confiere resistencia a Kanamicina. El gen *PR-Q'* que corresponde la glucanasa clase III utilizada en este trabajo se encuentra inserto en el Sitio de Clonación Múltiple del plásmido y cuenta con un promotor 35S y un terminador *nos*.

5.2. METODOLOGÍA

5.2.1. CULTIVO IN VITRO DE *Phalaenopsis amabilis*

Para la producción de protocormos y regeneración de plántulas se utilizaron segmentos de hojas de *P. amabilis* de aproximadamente 0.5 cm, utilizando el medio basal MS, con 30 g/l de sacarosa y 7 g/l de agar, pH 5.7.

Para inducir la formación de protocormos se probaron 16 tratamientos con diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y ácido giberélico (GA₃), como se muestra en el cuadro 6.

Para el desarrollo de plántulas se probaron 6 tratamientos con distintas concentraciones de ácido naftalenacético (ANA), benciladenina (BA) y ácido giberélico (GA₃) (Cuadro 7).

Estos medios de cultivo se probaron en base a resultados previos con esta orquídea (Malagón y Salgado-Garciglia, 2005). Los medios óptimos fueron designados MS PRO (para producción de protocormos) y MS GRO (para desarrollo de plántulas).

Todos los cultivos fueron incubados con un fotoperiodo de 16 horas luz (2000 lux), en temperatura de 25 a 28° C.

Se determinaron los parámetros de número de protocormos por explante, así como altura y número de hojas y raíces por plántula con una n=10. Los resultados se presentan como el promedio \pm error estándar y fueron analizados con una análisis de varianza (ANOVA) y separación de medias con Tukey-Kramer ($p < 0.05$).

Cuadro 6. Tratamientos (ANA/GA₃) para la producción de protocormos en segmentos de hojas y bases de tallo de *Phalaenopsis amabilis*

mg/l	0 GA ₃	0.1 GA ₃	0.5 GA ₃	1.0 GA ₃
0 ANA	T1	T2	T3	T4
0.1 ANA	T5	T6	T7	T8
0.5 ANA	T9	T10	T11	T12
1.0 ANA	T13	T14	T15	T16

Cuadro 7. Tratamientos (ANA/BA/GA₃) para obtener el crecimiento y mejor desarrollo de plántulas de *Phalaenopsis amabilis* obtenidas a partir de protocormos.

MEDIO	ANA mg/l	BA mg/l	GA ₃ mg/l
T1	0	0	0
T2	0.1	0.1	0.1
T3	0.1	0	0.1
T4	0.1	0	1
T5	0	0.1	0.1
T6	0.5	0.5	0.5
T7	0.5	0	0.5
T8	0.5	0.5	0
T9	0	0.5	0.5
T10	0	0	0.1
T11	0	0	0.5

5.3. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA de *P. amabilis*

5.3.1. Método de co-cultivo con *A. tumefaciens*

Se realizó un cultivo previo de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa LBA4404, pCAMBIA-2301, PR-Q) durante 24 h en medio YEB líquido, en agitación a 28° C. Después se procedió al primer paso de la transformación, consistiendo en infectar tejido vegetal con *Agrobacterium*, mediante el método de co-cultivo (modificado de Burow *et al.*, 1990), incubando segmentos de 5–10 mm de hojas de *P. amabilis* en medio YEB con bacteria por 2 h en oscuridad (100 µl, 1x10⁶ bacterias/ml) a temperatura ambiente. Los segmentos fueron sembrados en medio MS sin reguladores de crecimiento por 24 horas a 28°C. Posteriormente fueron enjuagados con antibiótico (500 mg/L de carbenicilina) y resembrados en medio MS PRO + 500 mg/l carbenicilina y el antibiótico de selección.

5.3.2. Selección de transformantes

Para determinar la concentración óptima del antibiótico de selección (kanamicina), plántulas de *P. amabilis* no transformadas (n=7) fueron cultivadas en MS al 25% (Jefferson, 1987), con diferentes concentraciones (50, 75, 100 y 150 mg/L de kanamicina). Después de 30 días de cultivo, se determinó la concentración letal del 100%, en la cual el total de las plántulas no sobrevivieron.

Los explantes después de 8 días del co-cultivo fueron cultivados en medio MS PRO con la concentración letal 100 de kanamicina como antibiótico de selección, hasta obtener la formación de protocormos. Éstos posteriormente fueron cultivados en MS GRO con la misma concentración letal de kanamicina para conseguir el desarrollo de plántulas, cultivando de manera individual cada protocormo y obtener diferentes líneas resistentes al antibiótico de selección.

5.3.3. Ensayo histoquímico de actividad de β -glucuronidasa (GUS)

Las plántulas resistentes a kanamicina, de 115 líneas fueron sometidas al ensayo histoquímico de β -glucuronidasa (GUS). De dos a tres muestras de tejido foliar de cada una de las plántulas analizadas, fueron colocadas en tubos Eppendorf con 1 ml de solución con X-Gluc (500 μ l de Buffer de Fosfatos (EDTA 0.25M, Ferrocianuro de Potasio 5mM, Ferricianuro de Potasio 5mM, Tritón 10%, X-Gluc 40mM y agua destilada). Las muestras fueron incubadas a 37° C por una hora en la oscuridad. La coloración azul en el tejido indicó positivo el ensayo.

5.3.4. Técnica de PCR para la detección del gen *PR-Q'*

Se extrajo ADN de algunas de las plantas resistentes a kanamicina y que mostraron positivo el ensayo de GUS, así como de plantas control (no transformadas). Principalmente el ADN se extrajo e hojas.

Extracción de ADN.- Para la extracción de ADN genómico, se utilizó el kit DNAzol® Reagent de Invitrogen, y se siguió el protocolo establecido en el producto. Los reactivos utilizados fueron etanol, cloroformo y Buffer TE (no incluidos en el kit). Para la fase de extracción se utilizaron 0.3 ml de Plant DNAzol + 0.1 g de tejido vegetal pulverizado + 0.3 ml de cloroformo, centrifugados a 12,000x g por 10 min. Se precipitó el ADN tomando el sobrenadante de la fase anterior + 225 ml de etanol al 100%, centrifugados a 5,000x g por 4 min.

Posteriormente se lavó el ADN utilizando 0.3 ml de Plant DNAzol y centrifugando a 5,000x g, 4 min. A la pastilla obtenida se le agregaron 0.3 ml de etanol al 75% y se centrifugó a 5,000x g, por 4 min. Para la resuspensión de la pastilla de ADN se añadieron 0.07 ml Buffer TE pH 8 y se centrifugó a 12,000x g por 4 min. Finalmente, la pastilla fue resuspendida en 70 μ l de agua estéril y se almacenó a 4° C. Todo el procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente.

Amplificación del gen PR-Q' por la técnica de PCR (reacción de polimerasa en cadena).- Se utilizaron los oligos sentido: 5'-GCC CTA GGC GTC GAA GAG AGT ATT CAC TCT AC-3' y antisentido: 3'-AGG CAT CGT TTG TGG ATG ACT AAC AGA TCT CG-5' específicos para amplificar el gen PR-Q'. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94° C por 10 minutos; 40 ciclos a 94° C por 1 minuto, 48.5° C por 1.20 minutos, 72° C por 1.30 minutos; 72° C por 10 minutos. Los productos de la reacción fueron conservados a 4° C. Para comprobar la amplificación del gel se corrieron 4µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1%, con una escalera molecular Lambda Hind III con un rango de 125 a 23130 pb, esperando la formación de bandas de alrededor de 1200 pb correspondientes al gen de interés.

5.4. Ensayo de actividad enzimática de glucanasas totales

Se obtuvieron extractos enzimáticos por triplicado de las líneas 64, 69, 79 y 115 y una planta control (no transformada) y se midió la actividad enzimática de glucanasas totales de cada extracto. Se siguió el protocolo de Ardila e Higuera (2005) para la obtención de los extractos y la actividad de glucanasa (total) se realizó por determinación colorimétrica, cuantificando glucosa como producto de reacción (Somogyi, 1945).

Método de extracción.- Se obtuvieron polvos de acetona (0.25 g hojas/2.5 ml de acetona, -20°C, 30 seg), posteriormente se sometieron a tratamiento con buffer de fosfatos (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 pH 6.5 100 mM) por 1 h a 4°C, obteniendo el extracto por centrifugación (11 000x g por 30 min) y se llevó a un volumen final de 250 µl.

Actividad enzimática.- Se obtuvo por la cuantificación de glucosa como producto de reacción, bajo las siguientes condiciones de ensayo: 250 µl de extracto enzimático, 25 µl de laminarina (2.5 mg/ml) como sustrato, a una temperatura de 37 °C, con un pH de 5.5 durante 30 minutos.

La cuantificación de glucosa generada se realizó por el método de Nelson–Somogyi, detectándola a 660 nm, usando glucosa como solución estándar (1 mg/ml) (Somogyi, 1945). Asimismo, se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976), usando albúmina bovina sérica (BSA) como patrón. Los valores de actividad se expresaron como mol glucosa min⁻¹ mg proteína⁻¹.

5.5. ENSAYOS ANTIFÚNGICOS *IN VITRO*

Una porción de micelio de *Fusarium oxysporum* fue cultivada previamente en medio PDA para su crecimiento, hasta lograr la esporulación. La incubación se realizó durante 15 días en oscuridad a 25° C. Las esporas fueron obtenidas de la siguiente manera: se añadió 5 ml de agua destilada estéril sobre el micelio esporulado en caja de Petri y se hizo un raspado suave superficial para liberar principalmente conidias; 1 ml de esta suspensión se vertió a tubo Eppendorf y se sometió a centrifugación tres veces continuas (5000xg 5 min), desechando cada vez el sobrenadante y añadiendo 1 ml de agua destilada estéril, con el fin de obtener una suspensión de conidias con mínima cantidad de micelio.

De la suspensión de conidias se realizó la cuantificación en un hematocitómetro y se preparó un inóculo a 1×10^3 conidias/ml en agua destilada estéril, utilizado para los diferentes ensayos *in vitro*.

5.5.1. Ensayos con discos de hojas

Se tomaron segmentos de hoja de plántulas de las líneas 64, 69, 79 y 115 y la planta control, y fueron sembrados individualmente en cajas de Petri sobre Agar-Agua sin reguladores de crecimiento. En los discos de hoja se hicieron incisiones finas con aguja de disección y fueron inoculados únicamente en la superficie con 10 µl de la suspensión de conidias (1×10^3 conidias/ml) de *F. oxysporum*. Posteriormente fueron incubados durante seis días en oscuridad a 25° C,

realizando observaciones cada 2 días. El experimento se realizó por triplicado (n=3).

5.5.2. Ensayos con discos impregnados

Discos de papel absorbente estéril de 1 cm. de diámetro fueron colocados individualmente en cajas de Petri con medio PDA sin reguladores de crecimiento. Los discos fueron embebidos con extractos enzimáticos de las líneas 64, 69, 79 y 115 y una planta control, mismos utilizados para la cuantificación de la actividad de glucanasas totales, también se impregnaron otros con benomilo (Benlate®, 1 g/l) como control positivo y buffer de extracción para eliminar la posibilidad de que éste fuera determinante para la inhibición del crecimiento del hongo.

Este tipo de ensayo se realizó por dos procedimientos: a, fragmentos de 0.2 cm² de micelio de *F. oxysporum* crecido por 15 días, fueron colocados sobre los discos, incubando un disco de cada tratamiento por caja Petri con medio PDA, determinando el crecimiento de micelio sobre el disco y alrededor de éste; b, fragmentos de 0.2 cm² de micelio de *F. oxysporum* crecido por 15 días, fueron colocados en el centro de una caja Petri con medio PDA y alrededor de éste se colocaron cada uno de los discos de papel filtro impregnados de cada tratamiento, se determinaron los halos de inhibición en cm. de diámetro. Las determinaciones de realizaron cada dos días durante seis días en oscuridad a 25° C. El experimento se hizo con una n=3.

Los datos se sometieron a un análisis de varianza ($p \leq 0.05$) y a una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Se utilizó el programa Statgraphics versión 3.1.

6. RESULTADOS

6.1. MICROPROPAGACIÓN DE *P. amabilis*

Con el fin de establecer un sistema óptimo de micropropagación de *P. amabilis* y conseguir la regeneración de plantas transgénicas, plántulas de 6 meses de cultivo *in vitro* (Figura 5A) fueron fuente de los explantes, segmentos de hoja de 0.5 cm² (Figura 5B), los cuales fueron cultivados en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con reguladores de crecimiento, logrando la formación y proliferación de protocormos (Figura 5C).

6.1.1. Producción de protocormos

La producción de protocormos fue dependiente de la concentración y combinación de los reguladores de crecimiento, consiguiéndose desde la formación de un protocormo/explante en 4 de los tratamientos, más de dos protocormos/explante se obtuvieron en los demás tratamientos (Figura 6). El mayor número de protocormos resultó en los explantes cultivados en el tratamiento 12 (0.5 mg/l ANA y 1.0 mg/l GA₃), produciendo un promedio de 8 protocormos/explante en un período de 60 días (Figura 5C, Figura 6). Este medio de cultivo por ser el óptimo para la formación de protocormos, fue seleccionado para los estudios de obtención de plantas transgénicas de esta orquídea y se le denominó por practicidad como MS PRO (medio inductor de protocormos).

6.1.2. Desarrollo de plántulas

Al cultivarse los protocormos en los diferentes tratamientos para regenerar plántulas con un óptimo desarrollo, a los 60 días del cultivo se observó la formación de plántulas con una altura promedio de 4 cm, con variaciones en el número de hojas y raíces (Figura 5D).

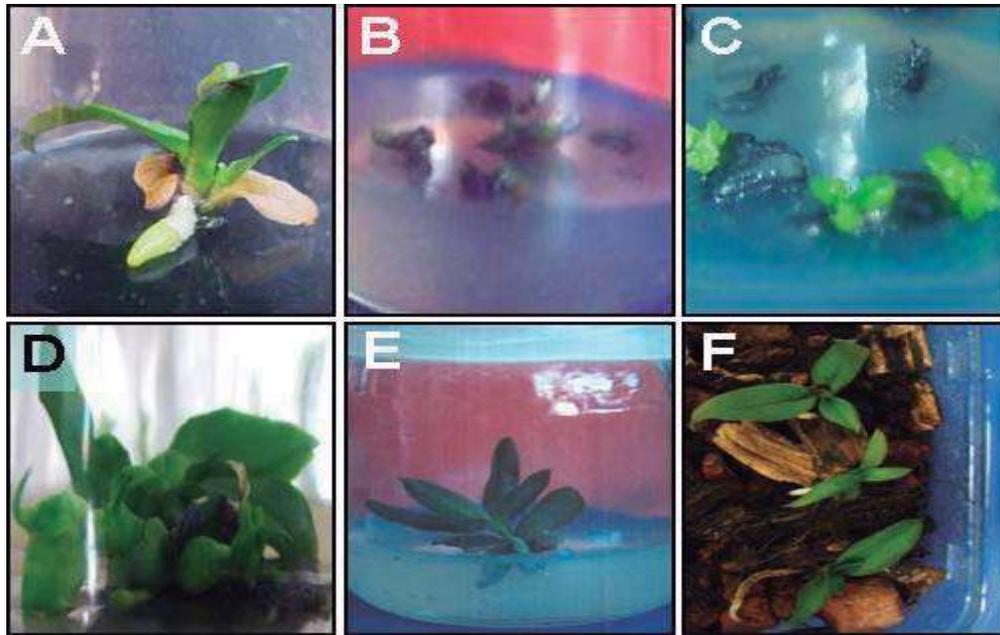


Figura 5. Desarrollo de plántulas de *P. amabilis*. Plántulas de 6 meses de cultivo *in vitro* (A) y proceso de micropropagación de *P. amabilis* var. Luchia Lady: Segmentos de hoja (B), Proliferación de protocormos (C), Formación de plántulas (D), Plántula regeneradas de 60 días de cultivo (E) y Plántulas durante su aclimatación en invernadero (F), Protocormos, plántulas regeneradas

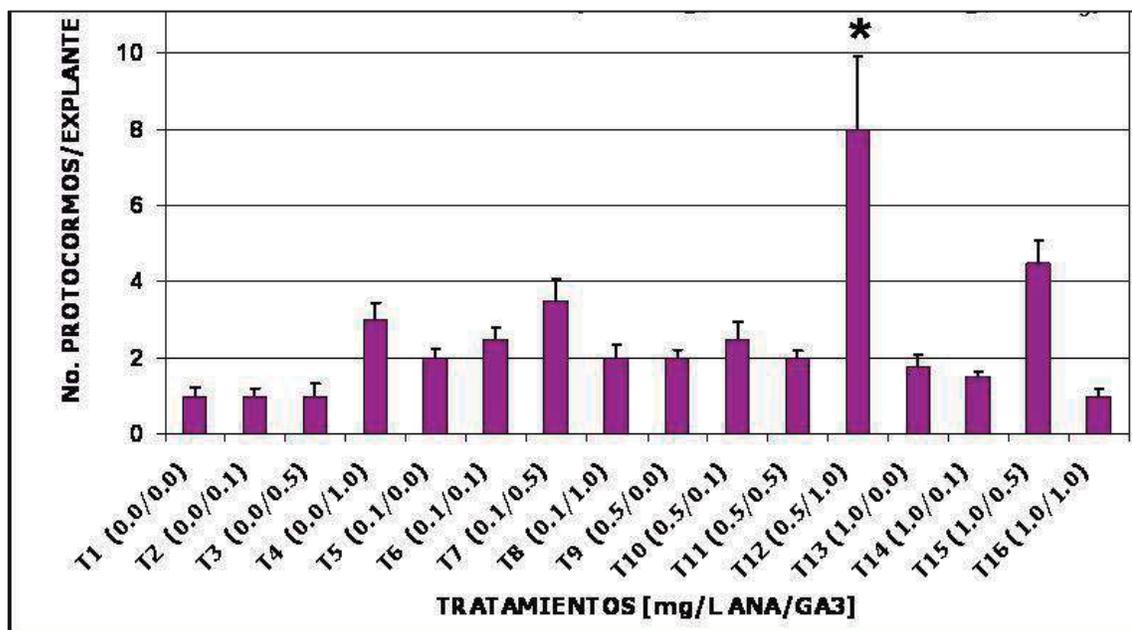


Figura 6. Número de protocormos en segmentos de hojas de *P. amabilis* var. Luchia Lady cultivadas *in vitro*, a los 60 días de cultivo. (*) Indica diferencia significativa (n=10, Tukey $\alpha = 0.05$).

Las plántulas cultivadas en el tratamiento 11 (0.5 mg/l de GA₃) sin auxina y citocinina, presentaron el mejor desarrollo, con un promedio de hasta 4 hojas y 3 raíces por plántula, valores significativamente mayores a los del resto de los demás tratamientos, donde en general las plántulas tenían 2 hojas y de 1 a 2 raíces (Figura 7).

La altura observada en las plántulas tratadas con reguladores de crecimiento fluctuó entre los 3.2 y 4 cm, aunque fueron valores superiores al de las plántulas no tratadas (T1), con sólo 2.8 cm, no se encontraron diferencias significativas (Figura 7). Sin embargo, se seleccionó al tratamiento T11 como el mejor para que los protocormos generen plántulas de óptimos crecimiento y desarrollo. Este medio de cultivo fue denominado como MS GRO (medio para crecimiento y desarrollo de plántulas).

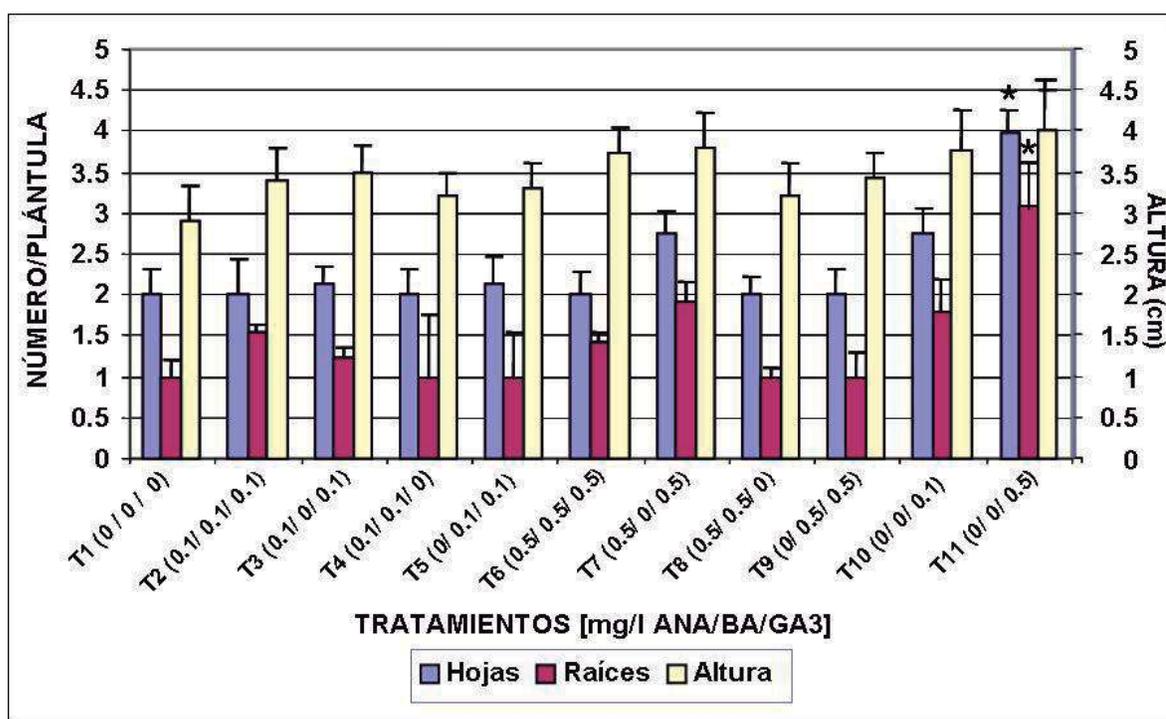


Figura 7. Crecimiento (altura), número de hojas y de raíces de plántulas micropropagadas de *P. amabilis* var. Luchia Lady, después de 60 días de cultivo. (*) Indica diferencias significativas (n=10, Tukey $\alpha=0.05$).

6.2. OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *P. amabilis*

La transformación genética de *P. amabilis* se realizó por el método de cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens*, como se establece en la sección de Materiales y Métodos. Después de 60 días de cultivo en MS PRO los explantes produjeron protocormos, de los cuales se regeneraron plántulas, que fueron sometidos a los ensayos de resistencia al antibiótico de selección (kanamicina), al de la β -glucuronidasa y a la detección del gen *PR-Q'* por el método de Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR).

6.2.1. Resistencia a kanamicina

Previa la infección con *A. tumefaciens*, se realizó el ensayo *in vitro* de resistencia de las plántulas de *P. amabilis* al antibiótico de selección kanamicina, determinando a los 30 días de cultivo en MS GRO al 25% el porcentaje de supervivencia. Las plántulas control (sin antibiótico) y con 50 mg/l de kanamicina mostraron un 100% de supervivencia (Figura 8A y 8B), las cultivadas en 100 mg/l de kanamicina tuvieron una supervivencia del 50% (Figura 8C) y las plántulas en 150 mg/l de este antibiótico no sobrevivieron, con un 100% de mortalidad (Figura 8D).

La concentración de 150 mg/l de kanamicina fue considerada como la CL100 y se utilizó para la selección de transformantes.

6.2.2. Selección de transformantes

De tres eventos de co-cultivo realizados (50 explantes por co-cultivo), los explantes se mantuvieron por 8 días en el medio MS PRO con 500 mg/l de carbenicilina, hasta verificar la muerte de la bacteria. Éstos después fueron subcultivados en MS PRO con 500 mg/l de carbenicilina y 150 mg/l de kanamicina, a los 60 días de cultivo se observó un 77% de explantes muertos, presentándose

clorosis y necrosis (Figura 8E). Solamente 34 de ellos (23%) sobrevivieron y a este tiempo se obtuvo la formación de protocormos, de 3 a 5 por explante, los cuales presentaron un crecimiento y desarrollo similar a los de explantes no infectados con *A. tumefaciens* (Figura 8F).

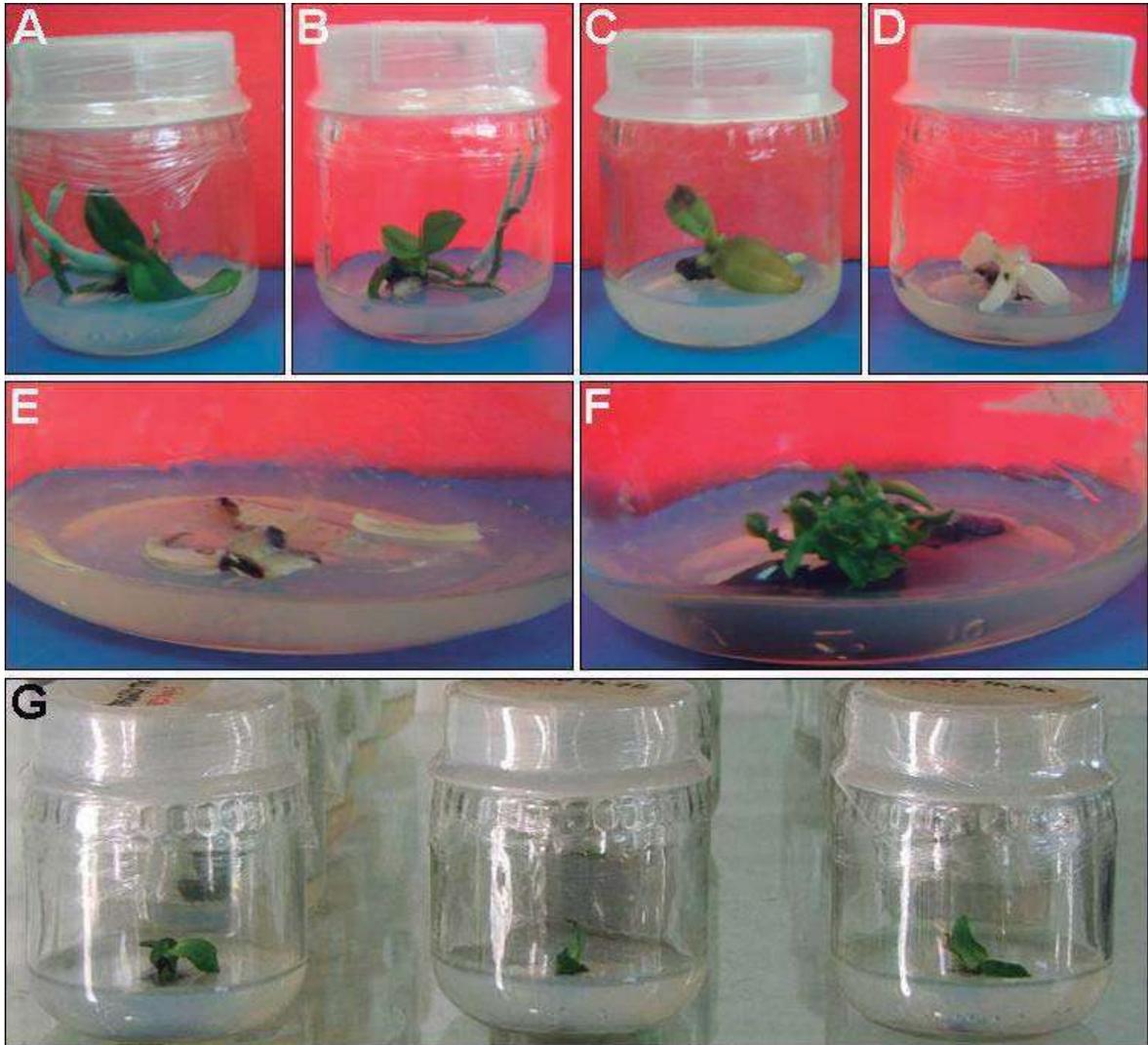


Figura 8. Ensayos de resistencia a kanamicina: A – D. Plántulas de *P. amabilis* en concentraciones de 0, 50, 100 y 150 mg/l de kanamicina respectivamente; E, explantes no transformados que no sobrevivieron en medio MS con 150 mg/l de Kanamicina; F, protocormos en explantes sometidos a cocultivo resistentes a kanamicina; G, plántulas regeneradas de protocormos resultantes del cocultivo, resistentes a 150 mg/l de kanamicina.

Los protocormos resistentes a kanamicina fueron sembrados individualmente en medio MS GRO más antibióticos (carbenicilina y kanamicina) durante 60 días para producir plántulas transgénicas que después pudieran ser micropropagadas (Figura 8G). De esta forma se obtuvieron 115 diferentes líneas, que fueron analizadas por otros métodos moleculares y demostrar la transgénesis.

6.2.3. Actividad histoquímica de β -glucuronidasa

Debido a que las líneas cultivadas en MS GRO presentaron diferencias en su tasa de crecimiento, se seleccionaron las 12 con mejor desarrollo y crecimiento, con el mayor número de hojas y raíces. De éstas, al someter tejido foliar al ensayo de GUS, se obtuvieron ocho líneas positivas, presentando la coloración típica azul del ensayo positivo, como se muestra en la figura 9. Las líneas 64, 69, 79 y 115 fueron las que presentaron mayor expresión del gen *uidA* por lo que se escogieron como fuente de material para detectar la presencia del gen *PR-Q'*, ensayo de glucanasas y de actividad antifúngica.

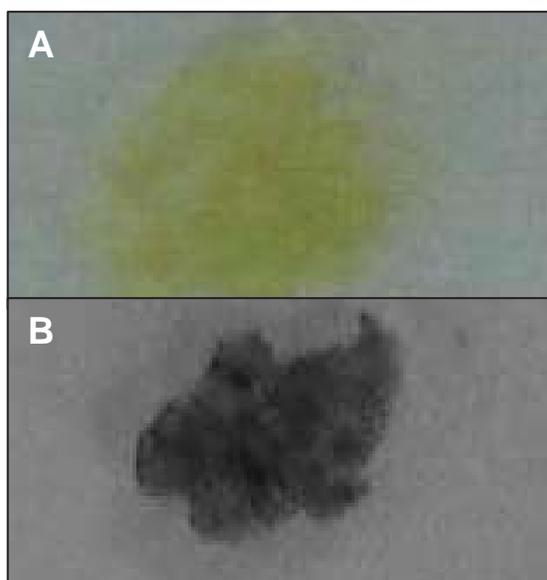


Figura 9. Ensayo de GUS. A, Segmento de hoja de plántulas de *P. amabilis* no transformadas (Control), respuesta negativa; B, Segmento de hoja de plántula regenerada de explante infectado con *A. tumefaciens*, respuesta positiva.

6.2.4. Detección del gen *PR-Q'*

Una vez estandarizado el método de extracción de ADN, alícuotas de ADN de las 4 plantas transgénicas y de una plántula no transformada, fueron sometidas a amplificación del gen *PR-Q'* por la técnica de PCR, esperando la detección de éste en una banda de alrededor de 1195 pb.

En la figura 10 se muestra una fotografía del gel de agarosa (1%), donde en los carriles correspondientes a las plántulas transformadas (carriles 3-7) y el control positivo (carril 2), se observan las bandas de aproximadamente 1200 pb, que concuerda con el tamaño del gen *PR-Q'*. La planta no transformada (carril 1, control negativo) no dio positiva la presencia del gen, ya que no aparece ninguna banda.

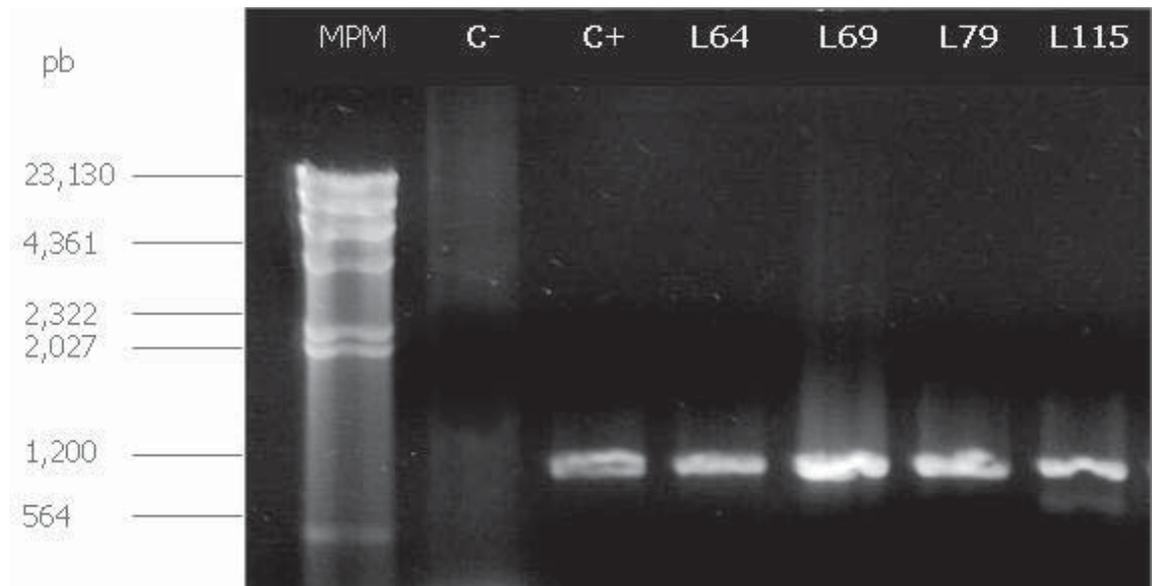


Figura 10. Amplificación del gen *PR-Q'* a través del método de PCR. Las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1% en el orden que sigue: MTM, Marcador de Tamaño Molecular; C-, Control Negativo, planta no transformada; C+, Control Positivo, plásmido que contiene el gen *PR-Q'*. El resto de los carriles corresponden a las plantas transformadas (L64, L69, L79 y L115).

Dado que el tamaño de las bandas concuerda con el del gen *PR-Q'*, se concluyó que el gen de β -1,3-glucanasa Clase III está efectivamente presente en las plántulas transformadas de *P. amabilis*, prueba fehaciente de la transformación genética por *A. tumefaciens*.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GLUCANASAS

El ensayo de actividad de glucanasas totales fue realizado con el fin de determinar la existencia de diferencias en la actividad al compararse con extractos enzimáticos de plantas no transformadas y verificar que el transgen *PR-Q'* pudiera estar expresándose. Los resultados arrojaron que no hubo diferencias en la actividad de glucanasas totales al comparar la de plantas de *P. amabilis* no transformadas con las transformadas, con valores en un rango de 2.22 a 3.07 mol glucosa/min por mg de proteína (Cuadro 8).

Por lo tanto, con este procedimiento no fue posible determinar que el gen *PR-Q'* pudiera estarse expresando en las plantas transformadas de *P. amabilis* var. Luchia Lady.

Cuadro 8. Actividad enzimática de glucanasas totales de plantas control y plantas transformadas de <i>P. amabilis</i> (n=3, Tukey p < 0.5).	
LÍNEA CELULAR	Mol glucosa min⁻¹ mg proteína⁻¹
Control	2.6 ± 0.488
L64	2.3 ± 0.366
L69	3.07 ± 0.333
L79	2.22 ± 0.311
L115	2.77 ± 0.455

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *in vitro*

A pesar de no haber observado cambios en la actividad de glucanasas totales, las plantas transformadas sí arrojaron resultados positivos en los ensayos *in vitro*, presentando una inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* tanto en segmentos de hojas cultivadas *in vitro* como por los extractos enzimáticos.

6.4.1. Ensayo antifúngico en disco de hojas

Los discos de hoja de plantas no transformadas no presentaron inhibición ya que se observó sobre éstos la germinación de esporas y desarrollo de micelio de *F. oxysporum*, mostrándose necrosis y muerte de los tejidos, a los 6 días del cultivo (Figura 11A). A este tiempo de cultivo, los discos de hojas de las plantas transformadas (Líneas 64, 69, 79 y 115) presentaron entre un 90 y un 100% de inhibición del crecimiento de micelio de *F. oxysporum*., no permitiendo el desarrollo del hongo sobre los segmentos de hoja (Figura 11 B-E). Estos explantes de plantas transformadas se mantuvieron verdes con la aparición ocasional de pequeñas lesiones necróticas.

6.4.2. Ensayo antifúngico con discos impregnados

Los discos embebidos con extracto obtenido de plantas control (no transformadas), fueron invadidos por el micelio del hongo después de 8 días de cultivo, considerado como 0% de inhibición (Figura 12A). Este crecimiento del hongo también fue observado sobre discos impregnados con el buffer de extracción del extracto proteico (Figura 12B). Una inhibición del 100% se obtuvo al sembrar inóculo de esporas sobre discos con el fungicida comercial Tecto 60 (Figura 12C), y se puso observar una respuesta similar en los discos embebidos con los extractos proteicos de las plantas transformadas (Líneas 64, 69, 79 y 115), con 100% de inhibición (Figura 12 D-G).

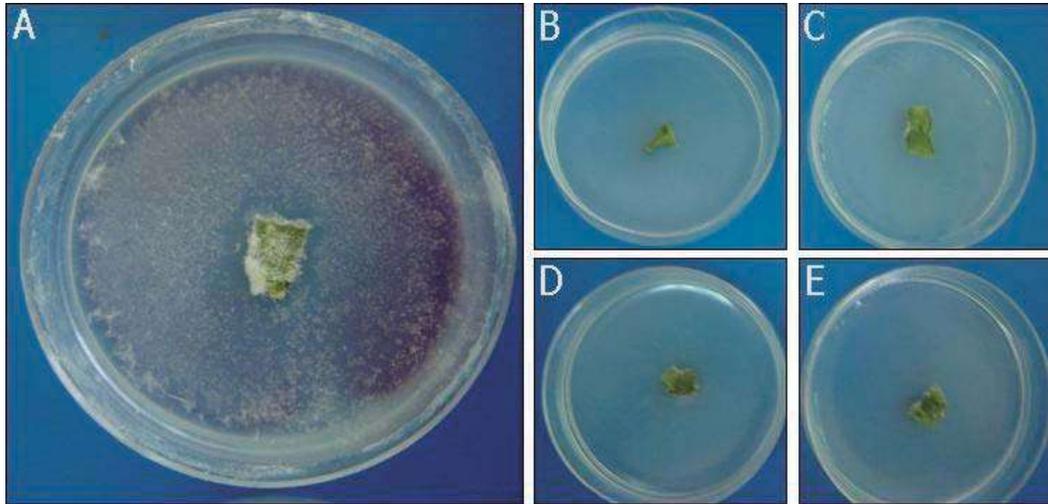


Figura 11. Ensayo antifúngico en discos de hojas. Inhibición del crecimiento de micelio de *F. oxysporum* en explantes de *P. amabilis*. **A**, Control, planta no transformada, el micelio creció normalmente sobre el explante; **B**, línea 64; **C**, línea 69; **D**, línea 79; **E**, línea 115. El Micelio no creció en ninguna de los explantes de líneas transformadas.

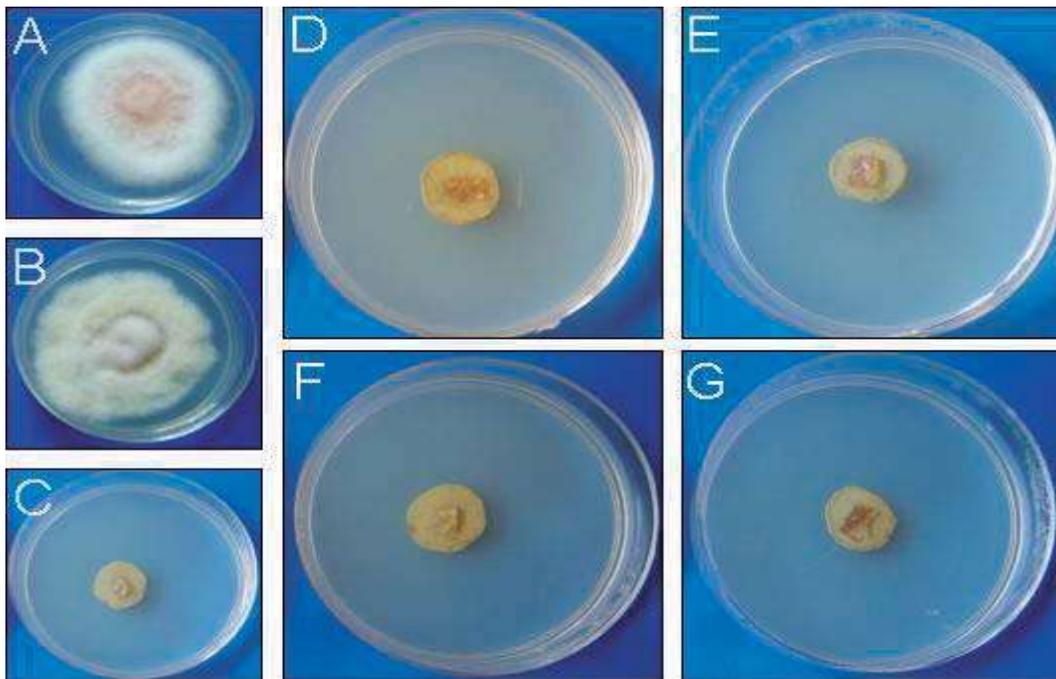


Figura 12. Ensayo antifúngico con discos impregnados. Inhibición del crecimiento de micelio de *F. oxysporum* en discos de papel embebidos con extractos enzimáticos de *P. amabilis*. **A**, Control, extracto de planta no transformada; **B**, Buffer de Extracción, control negativo; **C**, Benomilo (100 mg/l) como control positivo; **D**, Extracto de la línea 64; **E**, Extracto de la línea 69; **F**, Extracto de la línea 79; **G**, Extracto de la línea 115.

6.2.5. Difusión en placa

Finalmente, los extractos enzimáticos de plantas transformadas generaron una inhibición del 92 al 100% en el crecimiento de micelio de *F. oxysporum* a los 8 días del cultivo, a diferencia de los extractos de plantas control no transformadas, como se muestra en el cuadro 9.

Cuadro 9. Porcentajes de inhibición de extractos enzimáticos de <i>P. amabilis</i> en el crecimiento de micelio de <i>F. oxysporum</i> a los 8 días de cultivo.		
EXTRACTO	HALO DE INHIBICIÓN (cm)	INHIBICIÓN (%)
Benomilo (100 mg/l)	1	100
Buffer de extracción	0	0
Control	0	0
L64	1	100
L69	0.98	98
L79	0.92	92
L115	1	100

El extracto enzimático de las plantas control (no transformadas) no presentó inhibición en el crecimiento del micelio de *F. oxysporum*, similar al resultado obtenido cuando se aplicó el buffer de extracción. Sin embargo, los extractos enzimáticos de las líneas transformadas inhibieron con éxito el crecimiento del micelio en un alto porcentaje, equivalente al ejercido por el fungicida comercial, con un 100% de inhibición. Lo anterior es consistente con los resultados obtenidos en los ensayos de discos de hojas y de sensidiscos antes descritos.

7. DISCUSIÓN

Actualmente la necesidad de nuevas alternativas para el mejoramiento genético de plantas, han llevado al desarrollo de técnicas biotecnológicas para la generación de plantas transgénicas, que muestren características agronómicas importantes, entre una de ellas la resistencia a hongos fitopatógenos. Esto implica el establecimiento de sistemas de cultivo *in vitro* de las plantas, la transformación genética y la regeneración de las mismas.

Uno de los métodos mayormente utilizados para la transformación genética de plantas es con el vector biológico *Agrobacterium tumefaciens*, por su capacidad de transformar células vegetales debido a la inserción de un segmento propio de ADN hacia el genoma de la planta infectada (Zupan y Zambryski, 1995).

En este trabajo se utilizó el sistema de transformación genética de *A. tumefaciens* para transformar plantas de la orquídea *Phalaenopsis amabilis* mediante la inserción del gen *PR-Q'* de tabaco, el cual codifica para la enzima antifúngica β -1,3-glucanasa, con el fin de generar plantas que expresen la proteína y poder conferir resistencia a hongos que la atacan, específicamente contra *Fusarium oxysporum*. La razón de utilizar *A. tumefaciens* se debe principalmente a que es el más sencillo de utilizar, actúa de forma natural y, respecto a los demás, su utilización no requiere de una mayor implementación de equipo.

7.1. MICROPROPAGACIÓN DE *Phalaenopsis amabilis*

La micropropagación de *Phalaenopsis* se practica desde hacia varias décadas en diferentes países, con excelentes resultados para la producción masiva de este género; sin embargo, los medios de cultivo idóneos para la producción de callos, protocormos y plántulas se encuentran protegidos por patentes. Esto ha llevado a la necesidad de establecer un sistema propio ya sea para comercializar las

plántulas o para realizar investigaciones con esta especie como es el mejoramiento genético moderno, que requiere se cultivos *in vitro*.

En el 2005, Malagón y Salgado-Garciglia desarrollaron dos medios de cultivo especialmente diseñados para la producción de protocormos y la regeneración de plántulas de *P. amabilis*; en el presente trabajo, se retomaron esos medios de cultivo con la intención de optimizarlos para tales fines.

Aunque las citocininas se han usado ampliamente en cultivos *in vitro* de una gran variedad de plantas, entre ellas las orquídeas, debido a que aumenta la proliferación de brotes y de protocormos (Krikorian *et al.*, 1990; Lam *et al.*, 1991; Arditti, 1993), en nuestra especie en estudio no fue esencial ya que solo con la combinación de auxina y giberelina se obtuvo el desarrollo de dichas estructuras en segmentos de hoja de *P. amabilis*. Lo anterior concuerda con lo reportado por Tokuhara y Mii (2001), quienes demostraron que BA inhibe el desarrollo de protocormos en explantes de *Phalaenopsis*.

En orquídeas micropropagadas (*Laelia speciosa* HBK Schl., *Cattleyopsis lindenii* Hamlyn y *Euchile citrina* Llave y Lex) en el laboratorio de biotecnología vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, la adición de citocininas para estimular la producción de protocormos no ha tenido un efecto positivo, mientras que la combinación ANA/GA₃ ha brindado los mejores resultados (Guzmán, 2000; Sarabia, 2001; Becerril, 2003). Resultados similares han sido obtenidos en *Cattleya* y en *Dendrobium* (Mujib y Jana, 1994; Kusomoto, 1997).

Generalmente en las plantas micropropagadas la formación de brotes se logra al adicionar citocininas, en bajas concentraciones de éstas o en ausencia de auxinas. Algunos ejemplos de ello son la papaya, el bambú, algunas bromelias y las violetas. Existen reportes de muchas plantas que reaccionan de esta manera, entre ellas algunas orquídeas del género *Dendrobium* que producen brotes con 2

mg/l de benciladenina (Arditti *et al.* 1973); no es este el caso de *Phalaenopsis*, ya que la citocinina no ha probado ser necesaria para promover el desarrollo en ninguna fase de crecimiento *in vitro*, como se ha observado en trabajos previos (Malagón y Salgado-Garciglia, 2005).

El medio MS PRO (MS con 0.5 mg/l de ANA y 1.0 mg/l de GA₃) demostró ser el tratamiento más exitoso para promover la formación de protocormos en explantes de *P. amabilis* de manera directa (Figura 6), sin pasar por la etapa de formación de callo. Los protocormos son estructuras globulares de color verde de entre 0.5 y 1mm de diámetro que se diferencian a partir de una sola célula, por un proceso similar a la embriogénesis somática de las orquídeas, los que una vez diferenciados dan lugar al primordio apical y rizoides que gradualmente desarrollan una plántula. Debido a que las estructuras protocórmicas están relacionadas con el desarrollo de embriones y no de brotes, las auxinas en combinación con las giberelinas presentan este efecto positivo, mayor formación de embriones y desarrollo de plántulas.

En diversas especies de plantas, la organogénesis o embriogénesis directa en explantes es un método mejor de propagación, ya que el período de tiempo de desarrollo hasta plántulas es más corto, si se compara con la forma indirecta (a partir de la formación de callos). Además se ha registrado que las plántulas con mayor capacidad de supervivencia son las que se originan directamente en el explante (Vij *et al.*, 1986), lo cual coincide con lo obtenido por Lakshmanan y col. (1995), con plántulas de protocormos en segmentos de hoja de la orquídea *aranda deborah*.

Los reportes señalan que para conseguir un óptimo desarrollo de plántulas *in vitro* es necesario eliminar las auxinas, ya que inhiben el desarrollo del tallo y la expansión de las hojas, lo cual solamente se logra con la aplicación de citocininas y ácido giberélico (Nayak *et al.*, 1997). El medio MS GRO (MS con 0.5 mg/l de GA₃) permitió el desarrollo de plántulas de *P. amabilis* adecuadas para

aclimatación (Figura 7). En ausencia de auxinas adicionales, la giberelina pudo estimular la elongación de los tallos y la expansión de un buen número de hojas, de manera que fue posible obtener plántulas fuertes que sobrevivieron a la aclimatación *ex vitro* en un 100%.

7.2. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Para la obtención de las plántulas transformadas se requiere de sistemas elaborados de selección. Un agente de selección permite detectar las células transgénicas de las no transformadas. Puede ser un antibiótico (higromicina, kanamicina, geneticina) o un herbicida (bialafos, glifosato). La actividad de cada uno de ellos está dada por un gen marcador de selección. Las células transformadas deben presentar un alto nivel de resistencia al agente de selección, antibiótico o herbicida, y este debe inhibir completamente a las células no transformadas. Esto facilita la selección de los organismos transformados del resto de la población (Lindsey y Jones, 1989). Un gen reportero informa si el gen de interés transferido se ha integrado o no al genoma tratado, ya que este gen se integra de forma conjunta con el gen de interés, puesto que ambos forman parte del vector de transformación (Brown 1986; Cabrera, 2001).

En este trabajo el marcador de selección utilizado para llevar a cabo la selección de las plántulas fue el gen de resistencia al antibiótico kanamicina, al cual las plantas normales (no transformadas) no resisten más de una o dos semanas en presencia de una concentración elevada. Asimismo, la construcción utilizada para la inserción de genes hacia *P. amabilis*, contenía el gen reportero *uidA*, que codifica para la expresión de la enzima β -glucuronidasa, que fue determinada mediante ensayo colorimétrico.

La transformación genética de *P. amabilis* con *A. tumefaciens* fue exitosa, obteniendo explantes resistentes a kanamicina y positivos al ensayo de GUS. Se obtuvo un 23% de supervivencia en medio con antibiótico de selección para los

explantes sometidos a cocultivo. De 150 explantes, 34 sobrevivieron normalmente en medio MS al 25% con 150 mg/l de kanamicina (Figura 8) La infección por *Agrobacterium* puede en algunos casos producir necrosis y degradación de material genético nuclear en tejidos vegetales, tanto en dicotiledóneas (Pu y Goodman, 1992; Deng *et al.*, 1995) como en monocotiledóneas (Hansen, 2000). Los explantes que murieron en presencia del antibiótico presentaban necrosis, por lo que es factible que esta pequeña proporción de material, en su mayoría proveniente de bases de tallo, haya sido más susceptible a este fenómeno debido a su tamaño o a la cantidad de compuestos fenólicos de defensa que producen ante el estrés por herida y que conllevan a la oxidación del tejido.

Todos los protocormos obtenidos de explantes resistentes al antibiótico de selección fueron cultivados individualmente en medio MS GRO, obteniendo así 115 líneas con un adecuado desarrollo en altura y número de hojas y raíces. Fueron seleccionadas doce porque su grado de desarrollo se destacaba entre las demás para realizar los ensayos de GUS.

Ocho de las doce líneas resistentes a kanamicina, presentaron una reacción positiva al ensayo de GUS (Figura 9), lo cual representa un porcentaje alto en comparación a reportes previos de transformación genética de orquídeas con *Agrobacterium* (Belarmino y Mii, 2000; Chan *et al.*, 2003; Mii *et al.*, 2006) y con biolística (Anzai *et al.*, 1996) usando genes marcadores y reporteros como los empleados en este trabajo.

Las cuatro líneas resistentes a kanamicina y positivas al ensayo de GUS que fueron seleccionadas al azar para realizar la amplificación del gen *PR-Q'* produjeron bandas que concuerdan en tamaño con el mismo (Figura 10). Por lo tanto, el sistema de cocultivo con *A. tumefaciens* fue exitoso ya que fue posible obtener plantas transgénicas de *P. amabilis* que contienen el gen de β -1,3-glucanasa clase III. Con la observación de un óptimo desarrollo *in vitro* de las plántulas transformadas, se descarta que la inserción del gen foráneo haya

interferido con el crecimiento y sería de gran interés observar la floración de las plantas transformadas en busca de alteraciones morfológicas en flores o en otras estructuras de las plantas maduras.

Estos resultados demuestran que la transformación genética de *P. amabilis* fue exitosa, pues es posible observar la expresión de los genes *nptII* y *uidA*, comprobado con la resistencia a kanamicina y respuesta positivas al ensayo de GUS, respectivamente.

7.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GLUCANASAS

Las plantas transformadas de *P. amabilis* no presentaron diferencias significativas en su tasa de actividad de glucanasas totales con respecto a las plantas control no transformadas (Cuadro 8). Ya que el gen *PR-Q'* que codifica para la glucanasa clase III se encuentra bajo un promotor fuerte constitutivo 35S, se esperaba observar niveles elevados en la actividad enzimática de glucanasas totales en las plantas transformadas.

En trabajos previos realizados para medir la actividad de glucanasas en tabaco, se ha observado que dentro de la categoría de glucanasas clase II, que comparten hasta un 90% de identidad en su estructura primaria, miembros como PR-2a y PR-2b tienen una menor actividad específica al degradar la laminarina en comparación a PR-2c (Linthorst *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1991), resultados similares han sido reportados por Kauffmann y col. (1987). Dado que la estructura primaria de la glucanasa clase III PR-Q' difiere en un 43% de las clases I y II (Leubner-Metzger y Meins, 1999), y ya que no se han realizado estudios para saber la efectividad de la clase III para degradar la laminarina, se puede suponer que las glucanasas clase II que se encuentren presentes en *P. amabilis* podrían disminuir los niveles globales de actividad de glucanasas totales, haciendo imposible saber con exactitud el rango de actividad de .

Por otra parte, Sela-Buurlage y col. (1993) reportan que la actividad enzimática que muestran las glucanasas al degradar un sustrato como la laminarina no guarda necesariamente relación con la actividad antifúngica que pueden mostrar *in vitro*. Es posible que la glucanasa clase III insertada en las plantas transformadas actúe de manera sinérgica con otras proteínas antifúngicas, como se ha observado en trabajos previos en que glucanasas de soya pueden liberar carbohidratos inductores activos de las paredes fúngicas (Keen y Yoshikawa, 1983).

Por último, la actividad enzimática fue medida en plántulas de alrededor de seis meses de edad que se encuentran en pleno desarrollo. Como ya se ha mencionado en los antecedentes, las glucanasas juegan un papel de gran importancia no solo en la defensa de la planta ante el ataque de hongos, sino que además intervienen en procesos fisiológicos vitales para el crecimiento de los organismos vegetales (Leubner-Metzger y Meins, 1999). Es posible que debido a la corta edad de las plantas, los niveles de glucanasas totales observados en los ensayos se encuentren enmascarados por niveles elevados de glucanasas clase I y II, vitales para el desarrollo.

La falta de antecedentes para la actividad enzimática de glucanasas en plantas transformadas, la carencia de glucanasas clase III en su forma pura para observar su actividad como referencia, y la dificultad que representa el aislar y purificarlas, no permitieron dilucidar si efectivamente existe un incremento en la actividad de la glucanasa clase III en las plantas transformadas. Sin embargo, los ensayos de resistencia *in vitro* a *F. oxysporum* fueron de gran ayuda para sugerir que debido a la transformación genética con este gen, se pudo conferir dicha resistencia.

7.4. ENSAYOS ANTIFÚNGICOS *in vitro*

Los ensayos en discos de hojas de *P. amabilis* provenientes de plántulas transformadas presentaron una inhibición del crecimiento del micelio de *F.*

oxysporum hasta en un 100% (Figura 11), al igual que los ensayos con extractos enzimáticos de las plantas transgénicas de *P. amabilis* (Figura 12, Cuadro 9). Esto sugiere que los eventos de transformación genética con la construcción utilizada (pCAMBIA-2301, PR-Q) confirió de alguna manera la resistencia al hongo, posiblemente a la expresión de gen de la β -1,3-glucanasa Clase III.

Las plantas control que no fueron sometidas a transformación genética no fueron capaces de contener la infección, y el micelio proliferó sobre los explantes y los discos embebidos con extractos enzimáticos. Lo anterior comprueba que la resistencia *in vitro* de los explantes y extractos enzimáticos de las plantas transgénicas se debe al evento de la transformación genética.

Los explantes que fueron inoculados con esporas de *F. oxysporum* presentaron en algunos casos pequeñas manchas necróticas, indicativas de la respuesta que produce la planta ante el ataque de un organismo fitopatógeno. La necrosis se produce para contener la infección en sitios muy localizados, dificultando la penetración del micelio en el tejido vegetal.

Plantas transgénicas con la inserción de genes antifúngicos, en especial con los de las β -1,3-glucanasas han demostrado ser resistentes a diversos hongos fitopatógenos, entre ellos a diferentes especies de *Fusarium*, los ensayos de resistencia *in vitro* de manera directa en segmentos de plantas (discos de hojas), en plántulas *in vitro* o crecidas en invernadero y con el uso de extractos, son métodos con los cuales se ha confirmado la resistencia adquirida por la transformación genética (McMullen *et al.*, 1997). Sin embargo, los métodos moleculares como los análisis tipo Southern, Northern y Western, son útiles para determinar de manera concreta la expresión del o los genes de resistencia antifúngica transferidos a las plantas (Anzai *et al.*, 1996; Dede, 1998; Belarmino y Mii, 2000).

El plásmido pCAMBIA 2301 con el gen *PR-Q'* de la β 1,3-glucanasa clase III, el gen *nptII* de resistencia a kanamicina y el gen *uidA* que codifica para la enzima β -glucuronidasa, fue insertado con éxito en plántulas de *P. amabilis* transformadas a través de *A. tumefaciens*, lo cual fue comprobado a través del análisis de PCR, ensayos de GUS y de resistencia al antibiótico de selección. Los ensayos *in vitro* mostraron que tanto los explantes como los extractos enzimáticos de las plantas transformadas son eficaces para inhibir el crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* hasta en un 100%.

8. CONCLUSIONES

Se determinaron los medios más adecuados para la producción de protocormos (MS PRO 0.5 mg/l ANA + 1.0 mg/l GA₃) y desarrollo de plántulas (MS GRO 0.5 mg/l GA₃) de *Phalaenopsis amabilis* var. Luchia Lady.

Se obtuvieron plantas transgénicas de *P. amabilis* y con la inserción del gen de la β-1,3-glucanasa (*PR-Q*) se logró conferir resistencia a *Fusarium oxysporum* en bioensayos *in vitro*.

9. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N.** 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Elviesier Academic Press. London, UK. 530 p.
- Anand, A., Zhou T., Trick H.N., Gill B.S., Bockus W.W. y Muthukrishnan S.** 2003. Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. J. Exp. Bot.; 54(384):1101-11.
- Anfoka, G. y Buchenauer H.** 1997. Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus Physiol. Mol. Plant. Pathol. 50: 85-101.
- Anzai, H., Ishii Y., Shichinohe M., Katsumata K., Nojiri C., Morikawa H. y Tanaka M.** 1996. Transformation of *Phalaenopsis* by particle bombardment. Plant Tissue Cult. Lett 13:265–271.
- AOS**, 2002. American Orchid Society Guide: Orchid Pests and Diseases. Revised Edition, 124 pp.
- Ardila, H. e Higuera B.L.** 2005. Inducción diferencial de polifenoloxidasas y β -1,3-Glucanasa en clavel (*Dianthus Caryophyllus*) durante la infección por *Fusarium oxysporum* F. Sp. *Dianthi* Raza 2. Acta Biológica Colombiana, 10(2):61.
- Arditti, J.** 1982. Orchid seed germination and seedling culture. En: Orchid Biology, review and perspectives II (Arditti J., Ed.), Cornell Univ. Press, Londres. pp. 243-270.
- Arditti, J. y Ernst R.** 1993. Micropropagation of Orchids. Eds. J. Wiley and Sons. pp. 1-86.
- Arditti, J., Mosich S.K. y Ball E.A.** 1973. *Dendrobium* node culture: a new means of clonal propagation. Aust. Orchid Rev. 38:175–179.
- Ávila, D. I.** 1996. Orquídeas Michoacanas. <http://www.ccu.umich.mx>
- Becerril, T. R.** 2003. Micropropagación de *Euchile citrina* (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura, Fac. de Biología, U.M.S.N.H. 45 p.
- Beffa, R. S., Neuhaus J. M. y Meins F. Jr.** 1993. Physiological compensation in antisense transformants: specific induction of an "ersatz" glucan endo-1,3-beta-glucosidase in plants infected with necrotizing viruses. Proc., Natl. Acad. Sci. U S A; 90(19): 8792–8796.
- Belarmino, M.M. y Mii M.** 2000. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Phalaenopsis* orchid. Plant Cell Reports, 19(5):435-442.
- Bliffeld, M., Mundy J., Potrykus I. y Fütterer J.** 1999. Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. Theor. Appl. Genet. 98:1079–1086.
- Bol, J. F. , Buchel A. S. , Knoester M., Baladin T., Van Loon L. C. y Linthorst H. J. M.** 1996. Regulation of the expression of plant defense genes. Plant Growth Regulation, 18(1-2):87-91.
- Bradford, MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 7(72):248–254.
- Brenner, C.** 1991. Biotechnology and developing country agriculture: the case of maize. OECD, Paris, France. 102 p.
- Brown, T. A.** 1986. Cloning and Introduction. Van Nostrand Reinhold (internacional) University of Manchester. Institute of Science and Technology. 234 p.

- Bucciaglia, P.A y Smith A.G.** 1994. Cloning and characterization of *Tag1*, a tobacco anther β -1,3-glucanase expressed during tetrad dissolution. *Plant Molecular Biology*, 24(6):903-914.
- Burow, M.D., Chlan C.A., Sen P., Lisca A. y Murai N.** 1990. High-frequency generation of transgenic tobacco plants after modified leaf disk cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 8:124-139.
- Cabrera, P. J.L.** 2001. Desarrollo de un método para la transformación genética del maíz (*Zea mays* L.) de interés agronómico mediante la ingeniería genética. Tesis de doctorado, Universidad de Colima. pp. 3-38.
- Camadro, E.L.** 2000. Cultivos transgénicos: soluciones... ¿o problemas? *Nexos* 12: 10-13.
- Carvajal, D.A., y Chaparro A.** 2004. Estudios orientados a la transformación de papa criolla (*Solanum phureja*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Biológica Colombiana*, 9(2):2-5.
- Chen, Q., Kawchuk L.M., Lynch D.R, Goettel M.S. y Fujimoto D.K.** 2003. Identification of late blight, Colorado potato beetle, and blackleg resistance in three Mexican and two South American wild 2x (1EBN) *Solanum* species. *American Journal of Potato Research*, 80(1): 9-19.
- Chen, W. y Punja Z.** 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of American ginseng with a rice chitinase gene. *Plant Cell Reports*, 20(11):1039-1045.
- Cheong, Y.H., Kim C.Y., Chun H.J., Moon B.C., Park H.C., Kim J.K., Lee S.H., Han C.D., Lee S.Y. y Cho M.J.** 2000. Molecular cloning of a soybean class III β -1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection. *Plant Science*, 154(1):71-81.
- Chye, M.L. y Cheung K.Y.** 1995. β -1,3-glucanase is highly-expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol. Biol.* 29:397-402.
- Clives, J.** 2004. Preview: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2004. Executive Summary. ISAAA. www.isaaa.org. No.32: 11 p.
- Cohen, J.** 2005. Poorer Nations turn to Public Developer GM Crops. *Nature Biotechnology*, 23 (1): 27-33.
- Cohen, J., Komen, J. y Falck J.** 2004. National Agricultural Biotechnology Research Capacity in Developing Countries. FAO/ESA. Working paper, www.fao.org/esa 18p.
- Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. y Jarvis W. R.** 1980. *The Biology of Botrytis*. Academic Press, London. pp. 11-17.
- Cordero, M.J., Raventos D. y Segundo B.S.** 1994. Differential expression and induction of chitinase and β -1,3-glucanases in response to fungal infection during germination of maize seeds. *Mol. Plant-Microbe Interact* 7: 23–31.
- Cruz-Hernández, A., Litz R.E., Gómez Lim M. y Witjaksono T.** 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 17(6-7):497-503.
- De Loose, M., Alliotte T., Gheysen G., Genetello C., Gielen J., Soetaert P., Van Montagu M. e Inze D.** 1988. Primary structure of a hormonally regulated β -glucanase of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Gene*, 70:13-23.
- Dede, Y.** 1998. Development of the downy mildew pathogen *Bremia lactucae* on transgenic lettuce expressing a bacterial β -1,3-Glucanase. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 22: 313-321.

- Deng, W., Pu X.A., Goodman R.N., Gordon M.P. y Nester E.W.** 1995. T-DNA genes responsible for inducing a necrotic response on grape vines. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 8:538–548.
- Dixon, R.A., Lamb C.J., Masoud S., Sewalt V.J.H. y Paiva N.L.** 1996. Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses—a review. *Gene (Amst.)*, 179: 61–71.
- Dong, L. K., Raghothama G-, Hasegawa P.M. y Bressan R.A.** 1994. Osmotin over expression in potato delays development of disease symptoms *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:1888-1892.
- Dressler, R. L.** 1981. *The orchids. Natural history and classification.* Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts. pp. 1-332.
- Duvick, D. N.** 1996. Plant breeding, an evolutionary concept. *Crop Sci.*, 36: 539-548.
- Fanfani, A.** 1990. *Guía de orquídeas.* Grijalbo (Grijalbo Mondadori, S.A.), Barcelona, España. pp. 9-43.
- Felix, G. y Meins, F. Jr.** 1986. Developmental and hormonal regulation of β -1,3-glucanase in tobacco. *Planta* 167: 206–211.
- Fincher, G.B., Lock P.A., Morgan M. M., Lingelbach K., Wettenhall R.E.H., Mercer J.F.B., Brandt A. y Thomsen K.K.** 1986. Primary structure of the (1→3, 1→4)- β -D-glucan 4-glucohydrolase from barley aleurone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:2081–2085.
- George, E. F. y Sherrington, P. P.** 1984. *Plant propagation by tissue culture.* Exegetics. Ltd. Basingstoke. 709 p.
- Gonsalves, D.** 1998. Transgenic virus resistant papaya: new hope for controlling papaya ringspot virus in Hawaii. APSnet Feature article, September 1 through September 30.
- Goto, F., Yoshihara T., Shigemoto N., Toki S. y Takaiwa F.** 1999. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology*, 17(3):282-86.
- Gutiérrez, E. M.A., Luth D. y Moore G.A.** 1997. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports*, 16(11): 745-753.
- Guzmán, G. M.** 2000. Establecimiento de un sistema de micropropagación de la orquídea *Cattleyopsis lindenni*. Tesis de Licenciatura, Fac. de Biología, UMSNH. 46 p.
- Ham, K.S., Kauffmann S., Albersheim P. y Darvill A. G.** 1991. Host-pathogen interactions: A soybean pathogenesis-related protein with β -1.3-glucanase activity releases phytoalexin elicitor-active heat-stable fragments from fungal walls. *Molecular Plant-Microbe Interac.*, 4 (6):545-552.
- Hansen, G.** 2000. Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 13:649–657.
- Herrera, T y Ulloa M.** 1998. *El reino de los hongos, micología básica aplicada.* Instituto de Biología, UNAM. Fondo de Cultura Económica, Primera Edición. pp 195- 376.
- Ho, M.W., Ryan A. y Cummins J.** 2000. Hazards of transgenic plants with the cauliflower mosaic viral promoter. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11:194-197.
- Huang, S.Y.** 1997. Establishment of the transformation system of *Phalaenopsis* and construction of an antisense gene for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. M.S. Thesis, National Taiwan

University, Taipei, Taiwan. 106 p.

Jach, G., Görnhardt B., Mundy J., Logemann J., Pinsdorf E., Leah R., Schell J. y Mass C. 1995. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* 8: 97–109.

James, C. 1999. Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 1999. Ithaca, NY: ISAAA. Briefs No.12.

Jeknic, Z., Lee S.P., Davies J., Ernst R.C. y Chen T.H.H. 1999, Genetic transformation of *Iris germanica* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *The Journal of the American Society of Horticultural Science*, 124(6):575-580.

Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric gene in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405.

Jiang, X.L., He Z.M., Peng Z.Q., Qi Y., Chen Q. y Yu S.Y. 2004. Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice. *Transgenic Research*, 16(2):169-175

Jones, S. 1986. *Sistemática Vegetal*. Segunda Edición. Editorial McGraw-Hill. 94:469-470.

Jongedijk, E., Tigelaar H., Van Roekel J.S.C., Bres-Vloemans S.A., Dekker I., Van den Elzen P.J.M., Cornelissen B.J.C. y Melchers L.S. 1995. Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica*, 85: 173–180.

Jung, H.W. y Hwang B.K. 2000. Isolation, partial sequencing, and expression of pathogenesis-related cDNA genes from pepper leaves infected by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Plant-Microbe Interact.*, 13(1):136–142.

Kathuria, H., Giri J., Tyagi H. y Tyagi A. K. 2007. Advances in transgenic rice biotechnology. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 26(2):65-103.

Kauffmann, S., Legrand M., Geoffroy P. y Fritig B. 1987. Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have β -1,3-glucanase activity. *EMBO J* 6: 3209–3212.

Keen, N.T. y Yoshikawa M. 1983. β -1,3-Endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. *Plant Physiol.*, 71(3): 460–465.

Klarzynski, O., Plesse B., Joubert J.M., Yvin J.C., Kopp M., Kloareg B. y Fritig B. 2000. Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.*, 124(3): 1027–1038.

Knudson, L. 1922. Non-symbiotic germination of orchid seeds, *Bot Gaz.*, 73: 1-25.

Kramer, K. y Muthukrishnan S. 1997. Isolation and characterization of a genomic clone for the gene of an insect molting enzyme, chitinase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(1):37-47.

Krikorian, A. D., Kelly K. y Smith D. L. 1990. E 18 hormones in tissue culture micropropagation. *Plant Hormones and their role in plant growth and development*. P. J. Davis de Kluwer Academic Publisher. The Netherlands, pp. 30-37.

Krishnaveni, S., Muthukrishnan S., Liang G.H., Wilde G. y Manickam A. 1999. Induction of chitinases and β -1,3-glucanases in resistant and susceptible cultivars of sorghum in response to insect attack, fungal infection and wounding. *Plant Science*, 144(1): 9-16.

Kuehnle, A. R., Fuji T., Mudalige R. y Alvarez A. 2004. Gene and genome mélange in breeding of *Anthurium* and *Dendrobium* Orchid. *Acta Hort.* (ISHS), 651:115-122.

- Kusomoto, M.** 1997. Effect of combination of growth regulators and organic supplements on the growth of *Cattleya* plantlets cultured in vitro. J. Jap. Soc. Hort. Sci., 47: 492-501.
- Lakshmanan, P., Loh C.S. y Goh C.J.** 1995. An *in vitro* method for rapid germination of a monopodial orchid hybrid *Aranda deborah* using this section culture. Plant Cell Rep., 14 (8): 510-514.
- Lam, T. W., Ernst R., Arditti J. e Ichihashi S.** 1991. The effects of complex additives and 6-(γ,γ -dimethylallylamino)-purine on the proliferation of *Phalaenopsis* protocorms. Lindleyana, 6(1):24-26.
- Laurel Glen Publishing.** 2002. Botanica's Orchids. Over 1200 species listed. 608 p.
- Lawrence, C.B., Joosten M.H.A.J. y Tuzun S.** 1996. Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. Physiol. Mol. Plant Pathol., 48(6):361-377.
- Leubner-Metzger, G. y Meins F. Jr.** 1999. Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2) Review in: Pathogenesis-related proteins in plants. Datta SK, Muthukrishnan S (eds), CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, pp 49-76.
- Li, Q., Lawrence C.B., Xing H.-Y., Babbitt R.A., Bass W.T., Maiti I.B. y Everett N.P.** 2001. Enhanced disease resistance conferred by expression of an antimicrobial magainin analog in transgenic tobacco. Planta, 212: 635-639.
- Li, Y. y Pei Y.** 2007. Plant biotechnology in ornamental horticulture. Haworth Food & Agric. Products, Book News, Inc. 517 pp.
- Liau, C.-H., You S.-J., Prasad V., Hsiao H.-H., Lu J.-C., Yang N.-S. y Chan M.-T.** 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an *Oncidium* orchid. Plant Cell Rep., 21:993-998.
- Light, H. S. M.** 2004. Orchid Diseases: Part II - Problems and Solutions. www.orchidsafari.org
- Lin, W.C., Lu C.F., Wu J.W., Cheng M.L., Lin Y.M., Yang N.S., Green S.K., Wang J.F. y Cheng C.P.** 2004. Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis NPR1* gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. Transgenic Research, 13(6):567-581.
- Lin, K.C.** 1999. Genetic transformation of *Phalaenopsis* orchids via *Agrobacterium tumefaciens*. The 22nd Annual Meeting of the Botanical Society of the Republic of China. P57.
- Linthorst, H.J.M., Melchers L.S., Mayer A., Jeroen S. C., van Roekel, B., Cornelissen J.C. y JBoI J.F.** 1990. Analysis of gene families encoding acidic and basic β -1,3-Glucanases of tobacco Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87(22):8756-8760.
- Linthorst, H.J. M., Brederode F.T y Bol J.F.** 1991. Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. Plant Mol. Biol., 17(6):1117-1125.
- Liu, D., Raghothama K.G., Hasegawa P.M. y Bressan R.** 1994. Osmotin over expression in potato delays development of disease symptoms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91:1888-1892.
- Löffler, H.J.M., Mouris J.R., van Harmelen M.J. y van Tuyl J.M.** 2000. Transformation of gladioli for *Fusarium* resistance. ISHS Acta Hort., 508: XIX International Symposium on Improvement of Ornamental Plants.

- Lozovaya, V.V., Waranyuwat A. y Widholm J.M.** 1998. β -1,3-Glucanase and resistance of *Aspergillus flavus* infection in maize. *Crop Science*, 38:1255–1260.
- Lucca, P.** 1999. Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. General Meeting of the International Program on Rice Biotechnology, Phuket, Thailand, September 20-24.
- Lusso, M. y Kuc J.** 1995. Evidence for transcriptional regulation of β -1,3 glucanase as it relates to induced systemic resistance of tobacco to blue mold. *Mol Plant-Microbe Interact.*, 8(3):473-475.
- Lusso, M. y Kuc J.** 1996. The effect of sense and antisense expression of the *PR-N* gene for β -1,3-glucanase on disease resistance of tobacco to fungi and viruses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 49: 267–283.
- Mace, M.E. y Bell A.A.** 1981. Biochemistry and physiology of resistance. En: *Fungal Wilt Diseases of Plants* (Mace, M.A., Bell, A.A. y Beckman, C.H., eds). New York, USA: Academic Press, pp. 431–486.
- Maddaloni, M., Lohmer S., Mauri I., Martegani E., Salamini F., Thompson R. y Motto M.** 1991. Tolerance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* AG4 of transgenic tobacco expressing the maize ribosome-inactivating protein b-32. *Transgenic Research*, 6(6):393-402.
- Malabadi, B. y Nataraja K.** 2007 Genetic transformation of *Vanilla planifolia* by *Agrobacterium-tumefaciens* using shoot tip sections. *Research Journal of Botany*, 2 (2): 86-94.
- Malagón-Quintana, L.M. y Salgado-Garciglia R.** 2005. Micropropagación de *Phalaenopsis amabilis* Luchia Lady (Orchidaceae) por el cultivo de segmentos de hoja y tallo. X Congreso Nacional y III Internacional de Horticultura Ornamental, Fac. de Agrobiología, UMSNH, 3 – 7 Octubre.
- Malik, V.S. y Saroha M.K.** 1999. Marker gene controversy in transgenic plants. National Karnal Bunt: A fungal disease of wheat. *The Forum-Biotech Issues*, USDA-aph IS Plant Protection and Quarantine, 58p.
- Masoud, S.A., Zhu Q., Lamb C. y Dixon R.A.** 1996. Constitutive expression of an inducible β -1,3-glucanase in alfalfa reduces disease severity caused by the oomycete pathogen *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*, but does not reduce severity of chitin-containing fungi. *Transgenic Res.* 5: 313–323.
- Mattsson, J., Borkird C. y Engström P.** 1992. Spatial and temporal expression patterns directed by the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA gene 5 promoter during somatic embryogenesis in carrot. *Plant Molecular Biology*, 18:629- 637.
- Mauch, F. y Staehelin L.A.** 1989. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β - 1,3-glucanase in bean leaves. *Plant Cell*, 1: 447–457.
- McMullen, M., Jones R. y Gallenberg D.** 1997. Scab of wheat and barley: A reemerging disease of devastating impact. *Plant Dis.*, 81:1340-1348.
- Meins, F Jr., Neuhaus J.M., Sperisen C. y Ryals J.** 1992. The primary structure of plant pathogenesis-related glucanohydrolases and their genes. En: *Genes Involved in Plant Defense* (T. Boller, F. Meins Jr., Eds.), Springer Verlag, Vienna, Austria, pp 245–282.
- Melchers, L.S., Sela-Buurlage M.B., Vloemans S.A., Woloshuk C.P., Van Roekel J.S.C., Pen J., Van den Elzen P.J.M. y Cornelissen B.J.C.** 1993. Extracellular targeting of the vacuolar tobacco proteins AP24, chitinase and β -1,3-glucanase in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, 21:

583–593.

Men, S.Z., Ming X.T., Liu R.W., Wei CH. y Li Y. 2003. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 75: 63-71.

Mii, M., Sjahrili R., Chin D.P., Sher Khan R., Yamamura S., Nakamura I. y Amemiya Y. 2006. Transgenic *Phalaenopsis* plants with resistance to *Erwinia carotovora* produced by introducing wasabi defensin gene using *Agrobacterium* method. *Plant Biotechnology* 23, 191–194.

Mii, M., Chin D.P. y Mishiba K.I. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of protocorm-like bodies in *Cymbidium*. *Plant Cell Rep.*, 26:735-743.

Ming, T. CH., Lee T.S. y Chang H.H. 1992. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant and Cell Physiology*, 33(5):577-583.

Mishiba, K.I., Chin D.P. y Mii M. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination. *Plant Cell Rep.*, 24: 297–303.

Mitsuma, S., Ishigaki E., Sugiyama R., Asamizu T., Yamada K. y Kurosaki F. 2004. Activation of phenylpropanoid metabolism in sesame by over-expression of carrot calmodulin gene. *Pharmaceutical Bulletin*, 27(10):1621-1625.

Mor, T.S., Moon Y.S., Palmer K.E. y Mason H.S. 2002. Geminivirus vectors for high-level expression of foreign proteins in plant cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(4):430-437.

Mora-Avilés, A. 2000. Resistance to *Alternaria brassicicola* in transgenic broccoli expressing a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene. *Molecular Breeding*, 8: 1-9.

Mujib, A. y Jana B.K. 1994. Clonal propagation of *Dendrobium* “Madam Pompadour” through epical meristem culture. *Ad. Plant Sci.*, 7(2): 340-346.

Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15:473-497.

Nakajima, H., Muranaka T., Ishige F., Akatsu K. y Oeda K. 1997. Fungal and bacterial disease resistance in transgenic plants expressing human lysozyme. *Plant Cell Rep.*, 16: 674–679.

Nakamura, Y., Sawada H., Kobayashi S., Nakajima I. y Yoshikawa M. 1999. Persimo transformation by *A. tumefaciens*. *Plant Cell Rep.*, 18: 527–532.

Nan, G.L., Kuehnle A.R. y Kado C.I. 1998. Transgenic *Dendrobium* orchid through *Agrobacterium*-mediated transformation. *Ma-lay Orchid Rev.*, 32:93–96.

Nan, G.L., Tang C.S., Kuehnle A.R. y Kado C.I. 1997. *Dendrobium* orchids contain an inducer of *Agrobacterium* virulence genes. *Physiol Mol.Plant Pathol.*, 51:391–399.

Nayak, N. R., Patnaik S. y Rath S. P. 1997. Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann. *Plant Cell Reports*, 16: 583-586.

ONU, 1997. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. Conservación y utilización sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. En: Plan de Acción Mundial; fundamentos y aplicaciones. Cali, CIAT, Publicación N° 151, 969 p.

Ori, N., Sessa G., Lotan T., Himmelhoch S. y Fluhr R. 1990. A major stelar matrix polypeptide (sp41) is a member of the pathogenesis-related protein superclass. *EMBO J* 9: 3429–3436.

- Ovadis, M., Zuker A., Tzfira T., Shklarman E., Scovel G., Itzahki H., Ahroni A., Ben-Meir H. y Vainstein A Y.** 2000. A highly efficient procedure for regenerating carnation plants with novel traits Proc. XIX International Symposium Improvement Ornamental Plants. Ed. Cadic, A. Acta Hort. ISHS, 508: 49-51.
- Payne, G., Ward E., Gaffney T., Goy P.A., Moyer M., Harper A., Meins F. Jr. y Ryals J.** 1990. Evidence for a third structural class of β -1,3-glucanase in tobacco. Plant Mol. Biol., 15(6):797-808.
- Pelczar, M. J., Reid R. D. y Chan E. C. S.** 1982. Microbiología. 4ª edición. McGraw-Hill.
- Peng, J., Richards D. E., Hartley N.M., Murphy G.P., Devos K.M, Flintham J.E., Beales J., Fish L.J., Worland A.J., Pelica F. Sudhakar D., Christou P., Snape J.W., Gale M.D. y Harberd N.P.** 1999. Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. Nature, 400(6741):256-61.
- Peumans, W.J., Barre A., Derycke V., Rougé P., Zhang W., May G.D., Delcour J.A., Van Leuven F., Van Damme E.J.M.** 2002. Purification, characterization and structural analysis of an abundant β -1,3-glucanase from banana fruit. FEBS Journal, 267(4):1188-1195.
- Pu, X.-A. y Goodman R.N.** 1992. Induction of necrosis by *Agrobacterium tumefaciens* on grape explants. Physiol. Mol. Plant Pathol., 41:245–254.
- Ramesh, S., Nagadhara D., Pasalu I. C., Padma Kumari A., Sarma N. P., Reddy V. D. y Rao K. V.** 2004. Development of stem borer resistant transgenic parental lines involved in the production of hybrid rice. Journal of Biotechnology, 111(2):131-141.
- Ranadive, A. S.** 1994. Vanilla – Cultivation, curing, chemistry, technology and commercial products En: Spices, Herbs and Edible Fungi, Developments in Food Science 34, Elsevier, Amsterdam. pp 517-577.
- Robson, P.R.H. y Smith H.** 1997. Fundamental and biotechnological applications of phytochrome transgenes. Plant Cell Environ., 20:831–839.
- Rommens, C.M.T., Shah D.M. y Beachy R.N.** 1995. Resistance to diseases and insects in transgenic plants: progress and applications to agriculture. Trends in Biotechnology, 13(9):362-368.
- Rosati, C., Cadic A., Reu J.P. y Duron M.** 1996. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Forsythia x intermedia* 'Spring Glory'. Plant Cell Reports, 16:114-117.
- Runge, F.** 2004. The Global Diffusion of Plant Biotechnology: International Adoption and Research in 2004. USA. Council on Biotechnology Information. <http://www.apec.umn.edu/faculty/frunge/globalbiotech04.pdf>.
- Runkle, E., Wang Y.T., Blanchard M. y Lopez R.** 2007. Growing the best *Phalaenopsis*. Part 2 : Media, Transplanting, Water and Nutrient Requirements. AOS "Orchids". Originally published in Greenhouse Grower magazine.
- Sanjaya, T. y Chan M.T.** 2007. Genetic transformation as a tool for improvement of orchids. En: Orchid Biotechnology (W. H. Chen y H.H. Chen, Eds.), World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore. Chapter 12.
- Sarabia, O. M. E.** 2001. Reproducción asexual *in vitro* de *Laelia speciosa* "H.B.K" Schlechter. Tesis de Lic., Facultad de Biología. UMSNH. México. 50 p.
- Schwekendiek, A., Horlemann C., Spring O., Stanke M., Höhnle M. y Weber G.** 2005. Hop (*Humulus lupulus* L.) Transformation with Stilbene Synthase for Increasing Resistance against

Fungal Pathogens. Acta Hort., 668, 101-107.

Sela-Buurlage, M.B., Ponstein A.S., Bres-Vloemans S.A., Melchers L.S., Van den Elzen P.M.J. y Cornelissen B.J.C. 1993. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. Plant Physiol., 101:857–863.

Selitrechnikoff, C.P. 2001. Antifungal Proteins. Appl. Env. Microb., 67:2883-2894.

Shin, Y.M., Park H.J., Yim S.D., Baek N.I., Lee C.H., An G. y Woo Y.M. 2006. Transgenic rice lines expressing maize *C1* and *R-S* regulatory genes produce various flavonoids in the endosperm. Plant Biotechnology Journal, 4 (3):303–315.

Silos-Espino, H., Valdez-Ortiz A., Rascón-Cruz Q., Rodríguez-Salazar E. y Paredes-López O. 2006. Genetic transformation of prickly-pear cactus (*Opuntia ficus-indica*) by *Agrobacterium tumefaciens*, Plant Cell Tissue and Organ Cult., 86(3): 397-403.

Simmons, C.R. 1994. The physiology and molecular biology of plant 1,3- β -d-glucanases and 1,3;1,4- β -d-glucanases. Crit Rev Plant Sci., 13: 325–387.

Smith, M.S. y Paliwal R.L. 1996. Contributions of genetic resources and biotechnology to sustainable productivity increases in maize. En: Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity (K. Watanabe y E. Pehu, Eds.), New York, NY, USA, R.G. Landers, Academic Press. 171 p.

Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem., 160: 61-73.

Song, G.Q., Loskutov A. y Sink K. 2007. Highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of celery (*Apium graveolens* L.) through somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 88(2):193-200.

Souza, M. T. Jr. 1999. Analysis of the resistance in genetically engineered papaya against papaya ringspot potyvirus, partial characterization of the PRSV.Brazil.Bahia isolated, and development of transgenic papaya for Brazil. Cornell University.

Steward, J. y Button J. 1976. Rapid vegetative multiplication of *Epidendrum O'brienianum in vitro* and in the greenhouse. Am. Orchid Soc. Bull., 45:922–930

Sweeth, H. R. 1980. The Genus *Phalaenopsis*. Day Printing Corp., Pomona (California), 1-128.

Tabei, Y., Kitade S., Nishizawa Y., Kikuchi N., Kayano T., Hibi T. y Akutsu K. 1999. Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). Plant Cell Rep. 17: 159–164.

Takeuchi, Y., Yoshikawa M., Takeba G., Tanaka K., Shibata D. y Horino O. 1990. Molecular cloning and ethylene induction of mRNA encoding a phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase, in soybean. Plant Physiol., 93 673-682.

Thanavala, Y., Yang Y.F., Lyons P., Mason H.S. Arntzen C. 1995. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92(8):3358-61.

Tokuhara, K. y Mii M. 2001. Induction of embryogenic callus and cell suspension cultures from shoot tips excised from flowers stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). In vitro Cell, Dev. Biol.-Plant, 37:457-461.

Tuzun, S., Rao M.N., Vogeli U., Scharde C.H. y Kuc J. 1989. Induction of systemic resistance to blue mold: Early induction and accumulation of β -1,3- glucanases, chitinases, and other pathogenesis-related proteins (b proteins) in immunized tobacco. *Phytopathology*, 7: 979-983.

USDA, United States Department of Agriculture. 2006. Agricultural Statistics.

Vain, P., De Buyser J., Bui Trang V., Haicour R. y Henry Y. 1995. Foreign Gene Delivery into Monocotyledonous Species. *Biotechnology Advances*, 13(4): 653-671.

Van Den Bulcke, M., Bauw G., Castresana C., van Montagu M. y Vandekerckhove J. 1989. Characterization of vacuolar and extracellular β (1,3)-glucanases of tobacco: Evidence for a strictly compartmentalized plant defense system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:2673-2677.

Van Loon, L.C., Pierpoint W.S., Boller T. y Conejero V. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 12:245-264.

Vázquez-Ávila, R. 2000. Plagas y enfermedades de las Cattleyas, Parte II. Boletín Informativo Agosto Del 2000. Asociación Costarricense De Orquideología. 1-5 pp.

Vega, J.C, y Rivera R. 2001. Los virus: Cómplices para descifrar procesos moleculares en las plantas. *Avance y Perspectiva*, Vol. 20.

Vij, S.P., Sood A. y Sharma M. 1986. *In vitro* leaf segment culture of *Vanda testacea* (Lindl), *V. parifolra* L. (Orchideaceae). *Curr. Sci.*, 52(21): 1100-1110.

Wan, Y.F., Yen C., Yang J.L. y Liu F. 1997. Evaluation of *Roegneria* for resistance to head scab caused by *Fusarium graminearum* Schwabe. *Genet. Res. Crop Eval.*, 44:211–215.

Ward, E.R., Payne G.B., Moyer M.B., Williams S.C., Dincher S.S., Sharkey K.C., Beck J.J., Taylor H.T., Ahl-Goy P., Meins F.Jr. y Ryals J.A. 1991. Differential Regulation of β -1,3-Glucanase Messenger RNAs in Response to Pathogen Infection. *Plant Physiol.*, 96(2):390–397.

Wiard, L. A. 1987. An introduction to the orchids of Mexico. Cornell Univ. p. 55

Lorito, M., Woo S.L., Garcia I., Colucci G., Harman G.E., Pintor-Toro J.A., Filippone E., Muccifora S., Lawrence C.B. y Zoina A. 2001. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* , 95: 7860–7865.

Yamaguchi, T., Nakayama K., Hayashi T., Tanaka Y. y Koike S. 2002. Molecular cloning and characterization of a novel β -1,3-Glucanase gene from rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66:1403-1406.

Yang, J, Lee H.J., Shin D.H., Oh S.K., Seon J.H., Paek K.Y. y Han K.H. 1999. Genetic transformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment. *Plant Cell Rep.*, 18:978:984.

Ye, X., Al-Babili S., Klott A., Zhang J., Lucca P., Beyer P. y Potrykus I. 2000. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287(5451):303-305.

Yoshikawa, M., Tsuda M. y Takeuchi Y. 1993. Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase, from soybean. *Naturwissenschaften*, 80: 417–420.

Yun, D.J., Bressan R.A. y Hasegawa P.M. 1997. Plant antifungal proteins. En: *Plant breeding reviews* (J. Janick. Ed.), Wiley and Sons, New York. , 14: 39–88.

Zambryski, P. 1983. Ti plasmid vector for introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2:2143-2150.

- Zemanek, A.B., Ko T-S., Thimmapuram J., Hammerschlag F.A. y Korban S.S.** 2002. Changes in β -1,3-glucanase mRNA levels in peach in response to treatment with pathogen culture filtrates, wounding, and other elicitors. *Journal of Plant Physiology*, 159(8): 877-889.
- Zhang, X., Zhou S., Fu Y., Su Z., Wang X. y Sun C.** 2006. Identification of a drought tolerant introgression line derived from Dongxiang common wild rice (*O. rufipogon* Griseb.). *Plant Mol Biol* 62:247–259.
- Zheng, Z. L., Yang Z. B., Jang J. C. y Metzger J. D.** 2001. Modification of plant architecture in *Chrysanthemum* by ectopic expression of the tobacco phytochrome B1 gene. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.*, 126:19-26.
- Zhu, Q., Maher E.A., Masoud S., Dixon R.A. y Lamb C.J.** 1994. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio-technology (N.Y.)*, 12: 807–812.
- Zhu, B., Chen T.H.H. y Li P.H.** 1995. Activation of two osmotin-like protein genes by abiotic stimuli and fungal pathogen in transgenic potato plants. *Plant Physiol.*, 108: 929–937.
- Zupan, J. R. y Zambryski P.** 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.*, 107(4): 1041–1047.
- Zupan, J., Muth T.R., Draper O. y Zambryski P.** 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J.*, 23:11-28.