



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GENÉTICA**

**TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *Paulownia elongata*  
MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* Y POR  
BIOBALÍSTICA**

**CARLOS ROMAN CASTILLO MARTÍNEZ**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO  
2007**

La presente tesis titulada: **Transformación genética de *Paulownia elongata* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y por biobalística**, realizada por el alumno: **Carlos Roman Castillo Martínez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GENÉTICA  
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: \_\_\_\_\_  
DRA. MARÍA ALEJANDRA GUTIÉRREZ ESPINOSA

ASESOR: \_\_\_\_\_  
DR. MARCO TULIO BUENROSTRO NAVA

ASESOR: \_\_\_\_\_  
DR. AMALIO SANTACRUZ VARELA

ASESOR: \_\_\_\_\_  
DR. VÍCTOR MANUEL CETINA ALCALÁ

ASESOR: \_\_\_\_\_  
DR. EUGENIO PÉREZ MOLPHE BALCH

Montecillo, Texcoco, México, 26 de octubre de 2007

---

---

## TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *Paulownia elongata* MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* Y POR BIOBALÍSTICA

Carlos Roman Castillo Martínez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2007

Se establecieron las condiciones más propicias para transformar genéticamente mediante sistemas directos (biobalística) e indirectos (*Agrobacterium tumefaciens*), *Paulownia elongata*. Se partió desde su propagación *in vitro*, a través de organogénesis indirecta y directa, encontrando como mejor explante inicial para dicha respuesta segmentos internodales de 0.5 a 1.0 cm de longitud, con una combinación de reguladores de crecimiento de 4 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0.2 mg L<sup>-1</sup> de ANA, generándose 1.33 brotes por explante en promedio. Para la formación de callo a partir de este tipo de tejido el mejor balance fue con TDZ 4 mg L<sup>-1</sup>, donde más de 80% de explantes forman callo a los 10 días. Se estableció como dosis óptima para el medio de selección 15 mg L<sup>-1</sup> de kanamicina. Se pudieron obtener plantas transformadas tanto por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, con 2 horas de incubación, 48 horas de co-cultivo y densidad óptica de 0.9; así, como por biobalística, con 120 PSI de presión de disparo a una altura del nivel 6 (16 cm) del sistema y una presión de vacío de 22 mm Hg, usando el sistema de aceleración de partículas de baja presión (PIG). Con los dos sistemas se obtuvieron transformantes confirmados por prueba histoquímica de X-GLUC y por PCR, de ésta última, 14 positivos generados por *A. tumefaciens* de 26 ensayos y 10 obtenidos por biobalística de 30 ensayos, en ambos casos se usó una construcción que contenía los genes de interés quitinasa y glucanasa, el gen de selección NPT II y el gen reportero GUS. Este es el primer reporte de la integración de los genes quitinasa y glucanasa en *P. elongata*.

Palabras clave: árboles transgénicos, *Agrobacterium tumefaciens*, transformación por aceleración de partículas.

---

---

GENETIC TRANSFORMATION OF *Paulownia elongata* MEDIATED BY  
*Agrobacterium tumefaciens* AND BIOBALLISTICS

Carlos Roman Castillo Martínez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2007

The most appropriate conditions for genetic transformation through direct (biobalistic) and indirect (*Agrobacterium tumefaciens*) transformation systems in *Paulownia elongata*, were established. Starting from *in vitro* propagation through both direct and indirect organogenesis, internodal stem segments with 0.5 to 1.0 cm in length were determined as the best explant for such a response, in combination with growth regulators at doses of 4 mg L<sup>-1</sup> BA and 0.2 mg L<sup>-1</sup> ANA, resulting in 1.33 shoots per explant as an average; whereas for callus formation with the same type of explant the best balance was obtained with TDZ 4 mg L<sup>-1</sup>, producing more than 80% of explants with callus after 10 days. The optimum dose for selection media was determined to be 15 mg L<sup>-1</sup> of kanamycin. It was possible to obtain transgenic plants under both transformation systems. In the case of *Agrobacterium tumefaciens*, 2 hours of incubation, 48 hours of co-cultivation and optical density of 0.9 were used; while in the biobalistics case, the best conditions were 120 PSI of shot pressure, shot height in level 6 and vacuum of 22 Hg mm, with the particle inflow gun system (PIG). Both systems produced complete transformants as well as chimeras as, confirmed by histochemical analysis X-GLUC and PCR, producing a total of 14 positive plants by *A. tumefaciens* transformation from 26 trials and 10 positive plants by the biobalistics system from 30 trials; a construction with chitinase and glucanase genes, NPT II selection gene and the GUS reporter gene was used in both systems. This is the first report so far that includes integration of chitinase and glucanase genes into *P. elongata*.

Key words: transgenic trees, *Agrobacterium tumefaciens*, particle acceleration transformation.

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por darme la suficiente fuerza para no rendirme y permitirme seguir adelante.

Al Pueblo de México quien a través del CONACYT, me apoyó para realizar los estudios de Doctorado.

Al Fondo Sectorial CONAFOR-CONACYT, quien aportó los recursos financieros que permitieron realizar la presente investigación.

Al Colegio de Postgraduados, Programa de Recursos Genéticos y Productividad, Genética por darme los conocimientos y herramientas para una formación académica de excelencia.

Al COMECyT por el apoyo para la realización de esta tesis.

A mi consejera Dra. Alejandra Gutiérrez Espinosa, por sus consejos, paciencia y apoyo.

Al Dr. Marco Tulio Buenrostro Nava, que pese a la distancia, siempre estuvo presente a través de sus consejos.

Al Dr. Amalio Santacruz Varela, por sus sugerencias y paciencia.

Al Dr. Víctor Manuel Cetina Alcalá, por sus palabras de aliento y apoyo.

Al Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch, por su amable apoyo, pese a la distancia.

Al personal técnico del laboratorio del Laboratorio de Biotecnología de Fruticultura, Sr. Guillermo Arellano y Sra. Alejandra Herrera, por su valiosa ayuda.

A las secretarias Sras. Dalila y Elsa, por su amabilidad y gran disposición para ayudar.

A la familia Martínez Pérez, M.C. Salvador, Sra. Ma. Eugenia y Sandra, por su incondicional apoyo.

Al Dr. Carlos Hugo Avedaño Arrazate, por su amistad y atinados consejos.

A mis compañeros y amigos: Alberto, Carlos, Edwin, Elisa, Emiliano, Ernesto, Esmeralda, Francisco, Hilda Patricia, Leo, Luis y Manuel, por todos los momentos compartidos durante la estancia como estudiantes.

**Dedico esta tesis a:**

**A mi esposa Mireya, por todo su amor y paciencia**

**A mi madre y mi abuela en su memoria**

**A todos y cada uno de los miembros de mi familia que han estado siempre conmigo**

**A mis amigos**

## ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	2
Hipótesis.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Descripción botánica de <i>Paulownia elongata</i> .....	4
2.1.1. Características morfológicas.....	5
2.2. Ecología de la especie.....	6
2.2.1. Requerimientos ecológicos.....	8
2.2.1.1. Temperatura.....	8
2.2.1.2. Humedad.....	10
2.2.1.3. Condiciones de luminosidad.....	10
2.2.1.4. Viento.....	11
2.2.1.5. Suelo.....	11
2.2.2. Principales problemas fitosanitarios del género <i>Paulownia</i> .....	12
2.3. Aplicación de técnicas de cultivo de tejidos en especies forestales.....	13
2.3.1. Micropropagación en coníferas.....	13
2.3.2. Micropropagación en especies forestales tropicales.....	14
2.3.3. Avances en la micropropagación del genero <i>Paulownia</i> .....	16
2.4. Objetivos de la ingeniería genética en especies forestales.....	18
2.4.1. Aumento en la producción de la biomasa.....	19

2.4.2. Modificación del contenido y de la composición de lignina.....	20
2.4.3. Tolerancia a herbicidas.....	21
2.4.4. Resistencia a insectos.....	21
2.4.5. Tolerancia a estrés abiótico.....	21
2.4.6. Fitorremediación.....	22
2.5. Avances en la transformación genética del género <i>Paulownia</i> .....	23
2.6. Transformación genética con los genes quitinasa y glucanasa.....	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1. Material vegetal .....	27
3.2. Desinfección del material inicial.....	28
3.3. Establecimiento <i>in vitro</i> del material inicial.....	29
3.4. Establecimiento del medio de cultivo para inducción de organogénesis directa e indirecta.....	29
3.4.1. Selección del tipo de tejido y combinación de reguladores de crecimiento.....	30
3.4.3. Diseño experimental .....	30
3.4.4. Variables evaluadas.....	31
3.4.5. Análisis estadístico.....	31
3.5. Dosis de antibiótico para medio de selección.....	32
3.6. Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	32
3.6.1. Cepas y plásmidos.....	33
3.6.2. Segmentos de tejido .....	34



3.6.3. Medio de crecimiento para cepas de <i>A. tumefaciens</i> .....	34
3.6.4. Medio de co-incubación.....	35
3.6.5. Tratamientos de transformación.....	35
3.6.6. Condiciones de selección de segmentos co-incubados.....	36
3.6.7. Evaluación de brotes obtenidos en medio de selección.....	36
3.7. Transformación por aceleración de partículas.....	37
3.7.1. Plásmidos.....	37
3.7.2. Tipo de explante usado para transformación.....	38
3.7.2.1. Entrenudos.....	38
3.7.2.2. Callos.....	38
3.7.3. Ajustes del sistema de aceleración.....	39
3.7.4. Tratamientos de transformación y procedimiento de disparo.....	39
3.7.5. Condiciones de recuperación de segmentos bombardeados.....	41
3.7.6. Condiciones de selección de segmentos bombardeados.....	42
3.7.7. Evaluación de los brotes obtenidos en medio de selección.....	42
3.8. Evaluación de los brotes obtenidos en medio de selección por técnicas moleculares.....	43
3.8.1. Extracción de ADN.....	43
3.8.2. Análisis por PCR de las muestras de ADN.....	44

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
4.1. Establecimiento <i>in vitro</i> , sobrevivencia y contaminación del material inicial.....	46
4.2. Inducción de organogénesis directa .....	47
4.2.1. Explantes con brotes y brotes por explante.....	48
4.2.2. Área foliar y materia seca.....	50
4.2.3. Respuesta de diferentes tipos de tejidos y dos concentraciones de TDZ en la formación de callos.....	51
4.3. Medios de selección, efecto de dosis en la sobrevivencia de tejidos .....	53
4.4. Transformación genética mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	55
4.5. Transformación genética de entrenudos por biobalística.....	58
4.6. Transformación genética en callos por biobalística.....	61
4.7. Evaluación histoquímica de brotes obtenidos en medio de selección después de transformación genética por métodos indirectos y directos.....	63
4.8. Prueba de PCR de brotes obtenidos en medio de selección después de transformación genética por métodos directos e indirectos.....	67
V. CONCLUSIONES.....	71
VI. LITERATURA CITADA.....	73
ANEXO.....	79

## INDICE DE CUADROS

	Pagina
Cuadro 1. Ecología y distribución de la <i>Paulownia</i> en China.	9
Cuadro 2. Tratamientos de transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	35
Cuadro 3. Condiciones de transformación evaluadas con el sistema de aceleración de partículas.	41
Cuadro 4. Secuencia de los iniciadores para el gen quitinasa	45
Cuadro 5. Medios y explantes evaluados para determinar la mejor respuesta de organogénesis directa	48
Cuadro 6. Área foliar por análisis de imagen y materia seca	51
Cuadro 7. Respuesta de formación de callo en tres tipos de tejidos de <i>Paulownia elongata</i> en tres concentraciones de TDZ	52
Cuadro 8. Respuesta de tejidos de <i>P. elongata</i> (entrenudos) después de 30 días a diferentes dosis de kanamicina agregados al medio de multiplicación.	55
Cuadro 9. Respuesta de los ensayos con segmentos de tallo de <i>P. elongata</i> , en medio de selección a los 30 días, posterior a la transformación mediada por <i>A. tumefaciens</i> .	56
Cuadro 10. Respuesta de los ensayos con segmentos de tallo de <i>P. elongata</i> , en medio de selección a los 30 días, posterior a la transformación por biobalística (PIG).	60
Cuadro 11. Respuesta de los ensayos con callo de <i>P. elongata</i> , en medio de selección a los 30 días, posterior a la transformación por biobalística (PIG). Condiciones de disparo (PSI=120, A=7, PL1).	63
Cuadro 12. Respuesta de los ensayos con muestras de tallo y callo de <i>P. elongata</i> , en sustrato X-GLUC, para detección histoquímica de la expresión GUS en material transformado.	66
Cuadro 13. Respuesta de los ensayos con muestras de tallo y callo de <i>P. elongata</i> , por PCR para determinar la integración del gen quitinasa en material transformado	69

## INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Distribucion de varias especies de <i>Paulownia</i> en China. (1) <i>P. tomentosa</i> ; (2) <i>P. elongata</i> ; (3) <i>P. catalpifolia</i> ; (4) <i>P. fortunei</i> ; (5) <i>P. kawakamii</i> ; (6) <i>P. fargesii</i> ; (7) <i>P. albiphloea</i> ; (8) <i>P. australis</i> ; (9) <i>P. taiwaniana</i> . (Zhu, 1981).	7
Figura 2. Construcción del plásmido pCAMBIA2301-CHIT-GLU	33
Figura 3. Respuesta de diferentes tipos de tejido al medio MS2. a) hoja, b) pecíolo y c) entrenudo.	49
Figura 4. Formación de callo a 10 días de establecerse tejido de pecíolo (A), hoja (B) y tallo (C), en medio con 4 mg L <sup>-1</sup> de TDZ.	53
Figura 5. Expresión del gen GUS en sustrato X-GLUC de tejidos transformados. (A, E y F) respuesta parcial de materiales transformados por <i>Agrobacterium</i> , C) respuesta total de materiales transformados por <i>Agrobacterium</i> , B) respuesta total de tallo transformado por biobalística y D) respuesta total de callo transformado por biobalística.	64
Figura 6. Gel de agarosa al 1.5 % mostrando los resultados de la prueba de PCR para la integración del gen quitinasa en materiales transformados de <i>P. elongata</i> , por sistemas directos e indirectos de transformación. Carril 1, escalera 1 Kb, carril 2, control positivo para el gen quitinasa, carril 3, control negativo. Del carril 4 al 25 muestras de ADN de tejidos obtenidos en medios de selección.	68

## I INTRODUCCIÓN

La actividad forestal actualmente requiere de nuevas opciones que le permitan ser más rentable y aprovechar los recursos de manera sustentable. Una de las opciones para lograr estos objetivos es a través de la introducción de nuevas especies que puedan adaptarse a las condiciones geográficas del país y con características deseables para la producción y calidad de la madera que permitan su aprovechamiento interno o su exportación. *Paulownia elongata* es una especie con gran potencial derivado de su rápido crecimiento y de las cualidades de la madera que ésta produce, aunado a que puede reproducirse de manera masiva por micropropagación, conservando así las características de los mejores clones seleccionados. Estos atributos dieron lugar a que existan 202 hectáreas plantadas de forma comercial en México<sup>1</sup>.

No obstante las bondades que esta especie posee, hoy en día la ingeniería genética abre las posibilidades para incrementar la eficiencia de los sistemas biológicos de tal manera que gracias al estudio de los genes quitinasa (RCH10) y  $\beta$ -1-3-glucanasa (AGLU), se ha podido establecer que la inserción de estos genes en otras especies; por ejemplo en arroz ha generado fenotipos con tolerancia a patógenos como *Rhizoctonia solani*, (Mao, et al. 2003) Esta información ha capturado la atención de los investigadores interesados en el mejoramiento de especies forestales mediante técnicas de ingeniería genética, que pudieran conducir a beneficios diversos tales como resistencia a patógenos con una

---

<sup>1</sup> Comunicación personal Ing. Saúl Monreal Rangel. CONAFOR 2006

consecuente disminución de la pérdida de plantas por patógenos del suelo en las plantas transformadas obtenidas. Por lo anterior, se plantean los siguientes objetivos e hipótesis:

### **Objetivo general**

Establecer protocolos para la transformación genética directa e indirecta en *P. elongata*, integrando genes que pudieran conferir resistencia a patógenos del suelo.

### **Objetivos específicos**

Establecer las condiciones para una eficiente regeneración de brotes vía organogénesis directa, seleccionando los tejidos y medios de cultivo adecuados.

Evaluar dos sistemas comúnmente usados para transformación genética, uno de forma directa a través de un sistema de biobalística o aceleración de partículas (pistola de genes) y otro de forma indirecta mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

Realizar la integración y expresión de los genes quitinasa y glucanasa en *Paulownia elongata*.

## **Hipótesis**

Se pueden generar nuevas plantas a través de organogénesis directa e indirecta partiendo de diferentes órganos de *Paulownia elongata*, como explantes iniciales.

Es posible integrar genes de interés en la especie *Paulownia elongata* a través de algunos de los sistemas usados para la transformación genética, generando líneas con los genes integrados.

## INDICE DE CUADROS DEL ANEXO

	Pagina
Cuadro 1. Mezcla de reacción para un volumen de 50 microlitros.	76
Cuadro 2. Programa de PCR para el gen quitinasa.	76



## II REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Descripción botánica de *Paulownia elongata*

*Paulownia* es el único género arborescente en la familia *Scrophulariaceae* que es principalmente herbáceo. El nombre en latín *Paulownia* para este género se dio por el botánico suizo Thunberg (citado por Hu,1959) y se publicó en la “Flora Japonesa” en 1781. Ubicando el género en la familia *Bignoniaceae* reconociendo la especie *Bignonia tomentosa* que hoy día se conoce *Paulownia tomentosa*. En 1835, Zuccarini y Siebold (citado por Hu,1959) transfirieron el género a la familia *Scrophulariaceae* después de estudiar más detalles. Desde entonces se publicaron nuevas especies basadas en esta clasificación, reconociéndose un total de 23 especies, muchas de las cuales son sinónimos, Hu (1959). Posteriormente se llevó a cabo investigación extensa en el género y se corrigieron algunas de las confusiones pasadas. Actualmente se han clasificado nueve especies para el género *Paulownia*, que desde 1973 han sido reportadas por miembros de la Academia Forestal como Zhu (1981) además de otros científicos enfocados al estudio de género *Paulownia*, logrando un estudio sistemático del género y aumentando detalles técnicos generando una extensa revisión taxonómica del género e identificación correcta de especies.

### 2.1.1. Características morfológicas

Las especies de *Paulownia* generalmente su tallo de color gris, café o negro opaco, el tallo es suave pero conspicuo, lenticelado cuando es una planta joven y con tallos agrietados cuando alcanza a ser un árbol adulto. Las hojas son en su primera etapa de crecimiento grandes y cubiertas de tricomas mucilaginosos, algunas especies poseen ramas de tipo dicotómico que en invierno se secan. Las hojas en árboles maduros son de menor tamaño con márgenes suaves y ondulados. La inflorescencia es una cima de dos a cinco flores pedunculadas o sub sésiles y son generadas a partir de pequeñas ramas axilares del verano al otoño. Las flores son pediceladas y articuladas en la parte apical, el cáliz es carnosos, campanulado, con cinco sépalos lobulados y triangulares. La corola es grande de color púrpura a blanco, con dos lóbulos labiados. El tubo campanulado de la corola es generalmente curvado después de los primeros 5 mm. Dentro de ella se encuentran estigmas de color púrpura y estambres de color amarillo. Los estambres son bífidos y casi de la mitad de lo largo de la corola. El pistilo puede ser tan largo o mayor como los estambres. El ovario es bilocular. Los frutos son loculados dando lugar a una cápsula de forma ovoide o elipsoidal. El pericarpio varía de delgado a espeso, a veces leñoso. La superficie interna del pericarpio es lisa o áspera. La placenta es carnosos, rugosa y variable en su forma, posee numerosas semillas elipsoidales muy pequeñas. La testa de la semilla consiste en dos capas de células, una capa interna de células lignificadas y una capa transparente exterior (Zhu, 1981).

## 2.2. Ecología de la especie

*Paulownia* tiene una amplia gama de distribución en su centro de origen en China. Su límite al norte está aproximadamente en Liaoning, Beijing, Taiyuan, Yianan y el área de Pinglian (Figura 1). Se extiende en Kwangtung y Kwangsi en el sur, en Taiwán en el este Gansu oriental, Szechuan y la mayoría de las áreas de Yunnan. En China del sur y en las montañas en el sudoeste, *Paulownia* puede encontrarse alrededor de 2,400 msnm, en las colinas. En los valles, en Honan occidental alcanza los 1900 msnm. La distribución va río abajo del Río de Yangtze; por ejemplo, se encuentran *P. fortunei*, *P. australis*, *P. elongata*, *P. tomentosa* de *P.*, *kawakamii* de *P.*, *fargesii* y *P. albiphloea*. En la Provincia de Hupeh occidental y de Szechuan oriental, sólo se han encontrado *P. catalpifolia* y *P. taiwaniana*; Siendo muy probable que esta área sea el centro de origen para estas especies. También debe señalarse que éste podría no ser el único centro de variación. Algunas especies pueden producir una serie de variaciones durante el proceso de expansión debido a la adaptación del sitio y las condiciones del medio ambiente. Así, se forman centros secundarios de origen para algunas especies. Por ejemplo, en Sheng Jia, la región montañosa y la provincia de Hupeh, se encuentra variación en las poblaciones de *P. tomentosa* de forma compleja. Esto podría ser considerado como otro centro para esta especie. Situaciones similares existen en otras áreas montañosas (Zhu, *et. al.*, 1986).

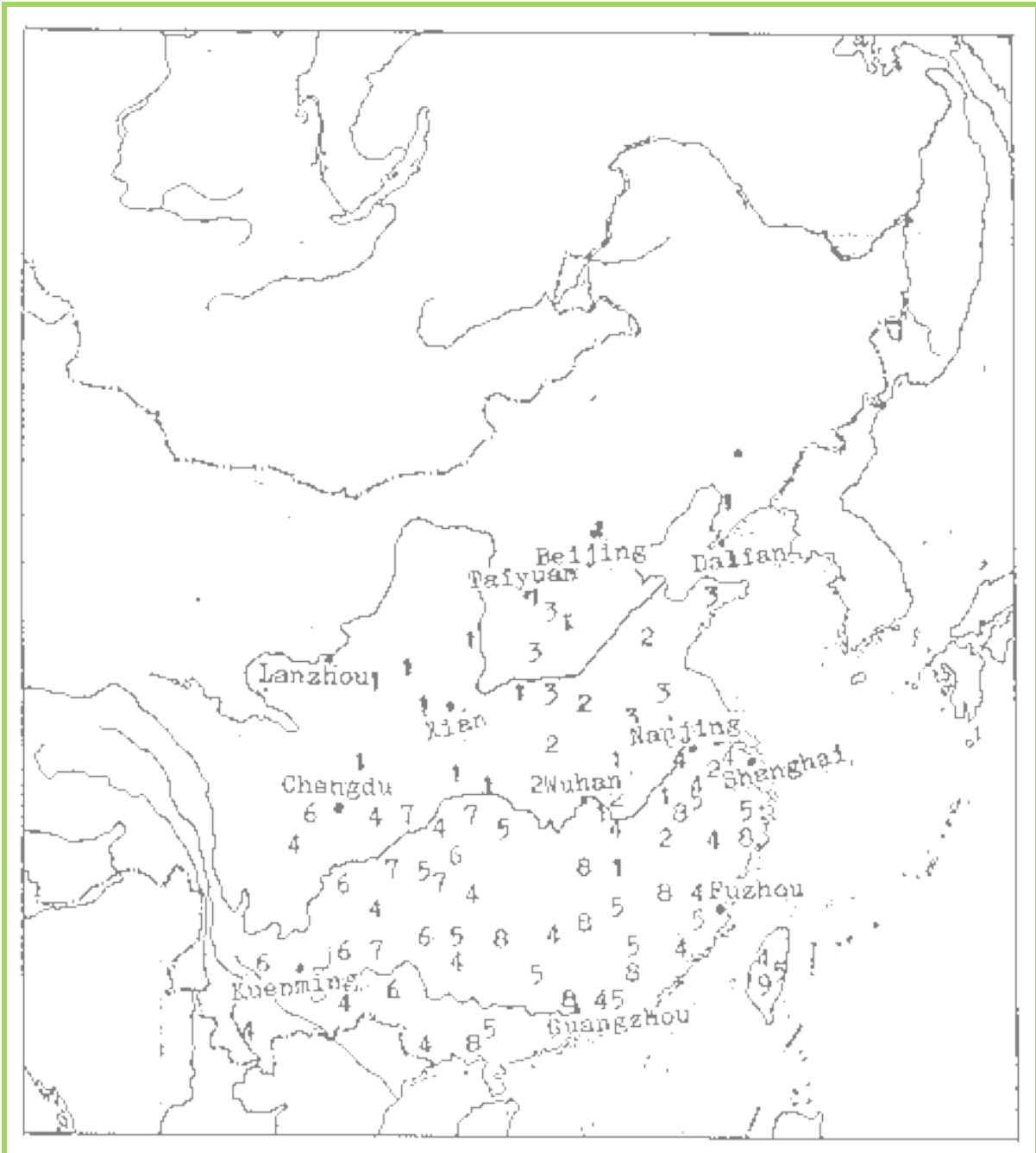


Figura 1. Distribucion de varias especies de *Paulownia* en China. (1) *P. tomentosa*; (2) *P. elongata*; (3) *P. catalpifolia*; (4) *P. fortunei*; (5) *P. kawakamii*; (6) *P. fargesii*; (7) *P. aliphloea*; (8) *P. australis*; (9) *P. taiwaniana*. (Zhu, 1981).

## 2.2.1. Requerimientos ecológicos

### 2.2.1.1. Temperatura

*Paulownia* puede adaptarse a un amplio rango de temperatura. Las especies que se distribuyen en el límite norte de China pueden soportar hasta  $-10^{\circ}\text{C}$  así por ejemplo el caso de *P. fargesii* que puede crecer cerca de los 1000 metros donde pueden presentarse temperaturas tan bajas como  $-10^{\circ}\text{C}$ . Otro ejemplo interesante es el caso de *P. tomentosa* que se presume como libre de daño por frío; sin embargo *P. elongata* y *P. catalpifolia* pueden sufrir daños por frío y *P. taiwaniana* tanto como *P. kawakami* sufren daños severos por frío y para el caso de *P. fargesii* la planta muere completamente (Zhu *et. al.*, 1986). Experimentos realizados para evaluar la temperatura óptima de crecimiento tanto en diámetro como en altura mostraron que para todas las especies es aproximadamente similar y se puede encontrar entre  $24$  y  $29^{\circ}\text{C}$  (Cuadro 1), por lo tanto se puede aseverar que el crecimiento será mejor en un régimen de temperatura alto.

El rango de temperatura en donde las especies detienen su crecimiento puede variar grandemente; así, por ejemplo, *P. elongata* puede detener su crecimiento en octubre cuando las temperaturas se encuentran en un promedio de  $18^{\circ}\text{C}$ , en la región central de China (Zhu *et al.*, 1986).

Cuadro 1 Ecología y distribución de *Paulownia* en China

Especies	Distribución			Temperatura (°C)			Humedad	Suelo	
	LAT ° N	LONG ° E	ALT (msnm)	Max	Min	Media	Precipitación (mm)	pH	Textura
<i>P. tomentosa</i>	28 - 40	105 - 128	1500	40°C	-20°C	17 - 11°C	1500 - 500	5 - 8.5	arcilla ligera - arenoso
<i>P. elongata</i>	28 - 36	112 - 120	1200	40°C	-15°C	17 - 12°C	1500 - 600	5 - 8.5	Limoso pesado - arenoso
<i>P. catalpifolia</i>	32 - 36	113 - 120	800	38°C	-15°C	15 - 12°C	1300 - 700	6 - 8.0	arcilla ligera - arenoso
<i>P. fortunei</i>	18 - 30	105 - 122	1100	40°C	-10°C	23 - 15°C	2500 - 1200	4.5 - 7.5	arcilla ligera - arenoso
<i>P. taiwaniana</i>	22 - 25	120 - 122	1000	39°C	2°C	20 - 23°C	2300 - 1800	4.5 - 7.0	arcilla ligera - arenoso
<i>P. albiphloea</i>	28 - 30	100 - 110	600	41°C	-3°C	18 - 20°C	900 - 1400	4.5 - 7.5	arcilla media-arenoso
<i>P. australis</i>	22 - 30	110 - 122	700	38°C	-6°C	14 - 20°C	900 - 2100	4.5 - 7.0	arcilla ligera - arenoso
<i>P. kawakamii</i>	22 - 30	110 - 122	800	38°C	-8°C	14 - 20°C	1100 - 2200	4.5 - 7.5	arcilla media - arenoso
<i>P. fargesii</i>	23 - 31	100 - 110	2000	34°C	-11°C	13 - 18°C	1200 - 1900	4.5 - 6.5	arcilla media - arenoso

Fuente: Zhu, et. al., 1986

### **2.2.1.2. Humedad**

*Paulownia* posee hojas largas con un área grande lo que significa altas tasas de transpiración, por lo que su sistema radical está bien desarrollado, por ello la humedad es un factor importante en el crecimiento de la *Paulownia*; así, dependiendo de la región donde naturalmente crece o se cultiva y de la especie en cuestión, puede variar desde los 500 mm hasta los 3000 mm de precipitación anual, por ejemplo, *P. elongata* bien puede desarrollarse con 500 mm al igual que *P. tomentosa*, esto debido principalmente a que la lluvia coincide con los meses más calientes del año que es cuando más requiere la humedad, y por el contrario, las especies más cercanas a la costa requerirán mayores niveles de humedad como es el caso de *P. kawakami* y *P. australis* (Zhu et al., 1986).

### **2.2.1.3. Condiciones de luminosidad**

Las especies de *Paulownia* producen ramas separadas al igual que las hojas arregladas de tal manera que permite la penetración de la luz. Esto es importante a tal grado que experimentos realizados demostraron que con una sombra del 70% se producía un efecto fatal en las plantas (Wang y Shogren, 1992). Otro efecto notorio se ha encontrado en el comportamiento de las semillas y de las plántulas germinadas las cuales requieren de luz intensa; así, en áreas naturales en aquellas que son sombreadas habrá una regeneración natural únicamente en áreas abiertas y expuestas al sol; de tal manera, que el punto de saturación de luz en *P. elongata* y *P. taiwaniana* es de 60000 lux, lo cual es

bastante alto considerando que en la mayoría de las especies fluctúa entre 20000 a 30000 lux (Zhu *et al.*, 1986).

#### **2.2.1.4. Viento**

La semilla de *Paulownia* es alada, de forma que el viento juega un papel importante en la dispersión, llegando a viajar las semillas hasta medio kilómetro de donde se encuentra la planta madre. Los árboles jóvenes que se encuentren aislados pueden sufrir daños severos cuando hay presencia de vientos fuertes (Wang y Shogren, 1992).

#### **2.2.1.5. Suelo**

El género *Paulownia* tiene un amplio rango natural de distribución a lo largo de China, además de haber sido introducido exitosamente en diferentes países. De manera general crece muy bien en suelos ricos en humus. Siendo *P. elongata* la que mejor se adapta a diferentes tipos de suelos. Suelos que presenten arcillas pesadas y que puedan generar inundaciones no son recomendables ya que *Paulownia* es muy sensible a las inundaciones. El rango de tolerancia al pH varía de acuerdo con la especie, así por ejemplo, *P. elongata* y *P. tomentosa* tienen un rango que va de 5 a 8.9 mientras *P. fortuneii* prefiere suelos entre 5 y 8 y *P. fargesii* con pH entre 5 y 6. El género *Paulownia* tiene cierta tolerancia a los suelos pobres; sin embargo para tener incrementos apropiados en el diámetro es preferible tenerla en suelos fértiles (Zhu, 1981).



### 2.2.2. Principales problemas fitosanitarios del género *Paulownia*

Como cualquier otra especie vegetal, el género *Paulownia* se ve afectado por la acción de varios organismos patógenos, destacando por su importancia el problema llamado “escoba de bruja”. Este es causado por un fitoplasma PWB, mismo que genera pérdidas cuantiosas en plantaciones comerciales en toda Asia, esta enfermedad puede ser detectada en etapas tempranas de las plantas mediante análisis por PCR (Nakamura *et al.*, 1996). Aún cuando es un género originario de China, varias especies se cultivan en el mundo, de forma que se interrelaciona con diversos ambientes y por ende con patógenos. En el oeste de Australia se reportó daño severo por *Alternaria* sp en hojas de *P. fortunei* (Ray *et al.*, 2005). Daños al tronco del árbol comunes son los canchales ocasionados por *Dothiorella gregaria*, causando la muerte lenta de los individuos afectados (Li *et al.*, 1989). También se han reportado daños por virus como el virus del mosaico del pepino y el del mosaico del tabaco, reportados por (Sun, 1986). Otro hongo fitopatógeno común es *Fusarium*, que puede causar daños tanto a plantas adultas como a plántulas de vivero, en Nueva Zelanda se reportó la presencia de *Fusarium merismoides* por (Gadgil *et al.*, 2003), mientras que en Paraguay fueron aislados *F. Oxysporum* y *F. Solani* de plantaciones establecidas (Watanabe *et al.*, 1987). Otro patógeno reportado y que causa muchas pérdidas de plántulas en vivero durante las primeras dos semanas, es *Rhizoctonia*, responsable del ahogamiento en la base del tallo. (Mehrotra, 1994). Estos dos últimos hongos

fitopatógenos pueden actuar de manera asociada generando damping off (Mehrotra, 1997).

## **2.3. Aplicación de técnicas de cultivo de tejidos en especies forestales**

### **2.3.1. Micropropagación en coníferas**

El principal grupo de árboles forestales maderables está constituido por las coníferas, dentro de las que destaca el género *Pinus*, en éste se ha puesto particular interés por desarrollar metodologías que permitan su multiplicación *in vitro*, para diferentes fines como programas de mejoramiento convencional, establecimiento de huertos clonales a partir de individuos superiores clonados y para sistemas de transformación genética (Rao y Bapat, 1993).

La principal vía de micropropagación empleada en pinos es la embriogénesis somática, ejemplo de ello son los trabajos de investigación realizados en *Pinus strobus* donde a través de cultivo de callos derivados de embriones cigóticos inmaduros pudieron obtenerse embriones somáticos que posteriormente se maduraron para obtener nuevas plántulas (Tang y Newton, 2005). Por otro lado, se formaron embriones somáticos a partir de ápices de árboles maduros de *Pinus patula*, para ello ocuparon ápices de entre 0.05 y 1 mm obteniéndose callo friable y posteriormente los embriones (Malabadi y Staden, 2005). En *Pinus sylvestris* se lograron generar 166 líneas de callos embriogénicos preservados por periodos de 6 meses y madurados por periodos de 6 semanas para dar origen a embriones

somáticos de cada una de estas líneas de genotipos paternos diferentes (Niskanen *et al.*, 2004).

Otro camino menos explorado es la obtención de brotes por organogénesis directa a partir de diferentes tipos de tejidos, ejemplo de esto son los trabajos realizados en *Pinus pinea* donde a partir de cotiledones y con diferentes tratamientos de bencilamino purina (BA) se pudieron regenerar brotes en períodos de 35 días encontrando que el periodo inicial de organogénesis se podía generar entre los 8 y los 12 primeros días en los que se empezaban a diferenciar los tejidos para dar origen a los brotes (Moncaleán *et al.*, 2005). En esta misma especie utilizando de igual manera cotiledones e hipocótilos lograron obtener brotes en medio MS descrito por Murashige y Skoog (1962) y una combinación de BA y ácido naftalenacético (ANA) que dio como resultado en el mejor tratamiento 20 brotes por cotiledón, no encontrando respuesta significativa en los hipocótilos (Sul y Korban, 2004).

En *Pinus tadea* se lograron obtener brotes a partir de embriones maduros, empleando el medio WV5 suplementado con una combinación de BA y ABA, dando origen en el mejor tratamiento a 20 brotes por explante en un periodo de 10 semanas (Niella y Rocha, 2003).

### **2.3.2. Micropropagación en especies forestales tropicales**

Gran interés ha despertado el uso de especies tropicales de rápido crecimiento para el establecimiento de plantaciones comerciales donde en

algunos casos se llegan a emplear líneas mejoradas de alto valor genético, características que se desean mantener y para ello una práctica común es la propagación vegetativa a nivel macro o la micropropagación. Algunos ejemplos de estas técnicas aplicadas a especies tropicales son los siguientes: en *Tectona grandis* (teca), especie muy apreciada por su madera, se logró formar callos a partir de segmentos internodales en medio MS, suplementado con 1  $\mu\text{M}$  de tidiazuron (TDZ), de los callos generados se obtuvieron brotes después de 15 días en medio MS, adicionado con 10  $\mu\text{M}$  de BA y 1  $\mu\text{M}$  de ácido giberelico (AG), los brotes se lograron adaptar hasta etapa de invernadero con una sobre vivencia del 85%. (Widiyanto *et al.*, 2005).

En *Melia azedarach*, fue posible multiplicar y conservar por periodos prolongados materiales selectos a partir de meristemas apicales de 2 a 3 mm, en medio MS, agregando 0.5  $\mu\text{M}$  de BA a 4° C durante un periodo de 12 meses, resultando en una respuesta favorable en el 67% de los meristemas. Los brotes de más de 3 cm se disectaron y transfirieron a medio MS, con la mitad de las sales y sin reguladores por 30 días para enraizar y posteriormente se adaptaron en invernadero (Scocchi y Mroginski, 2004).

Otra de las especies de alto interés es el eucalipto, ampliamente utilizado en plantaciones comerciales para la producción de pulpa para papel. En varias especies del género *Eucalyptus* se han desarrollado protocolos para su micropropagación con diferentes enfoques y algunos de ellos son los siguientes:

Con objeto de reproducir de manera clonal árboles derivados de la F<sub>1</sub> de *E. grandis* x *E. tereticornis*, se probaron diferentes explantes, es importante aclarar que los árboles poseían más de 30 años, se usó como medio base el MS con una combinación de reguladores de crecimiento de 1 mgL<sup>-1</sup> BA y 0.1 mgL<sup>-1</sup> de ANA, al obtenerse los brotes se enraizaron en un ½ de las sales del medio MS suplementado con 1 mgL<sup>-1</sup> de AIB (Joshi *et al.*, 2003).

En *E. grandis* se logró la organogénesis directa a partir de hipocótilos, utilizando medio H suplementado con 1 mgL<sup>-1</sup> de BA y 0.5 mgL<sup>-1</sup> de ANA; sin embargo, no obstante que se generaron brotes, se presentaron dificultades para la elongación de los mismos, además de observarse malformaciones en las hojas (Shi *et al.*, 2003).

### **2.3.3. Avances en la micropropagación del genero *Paulownia***

Al generarse el interés particular por este género, causado por sus características de rápido crecimiento y propiedades específicas de su madera, se requirió de la producción masiva de plántulas para soportar la demanda de los plantadores; sin embargo, algunos materiales provienen de cruza inter específicas, dando lugar a semilla no viable. En otros casos el déficit de semilla, dio lugar al estudio de formas de propagación vegetativa, siendo la micropropagación objeto de importancia en este sentido. Cabe resaltar que en varias especies de este género se han probado diferentes metodologías para la regeneración de plántulas. Así por ejemplo, se ha logrado iniciar la multiplicación

*in vitro* de *P. elongata* a partir de nudos con yemas axilares, partiendo de plántulas con tres meses de edad, disectando los nudos y colocándolos en medio MS adicionado con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BA y  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, obteniendo los nuevos brotes en 25 días (Yaicili y Alikamanoglu, 2005) misma vía utilizada por (Song *et al.*, 1990), en *P. catalpifolia*. y en *P. fortunei* por (Sharma *et al.*, 2003).

Otro camino para generar nuevas plántulas es a través de embriogénesis somática, explorándose la vía indirecta partiendo de segmentos internodales y foliares de *Paulownia elongata*, en medio MS, adicionado con  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ y  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  de cinetina, este medio dio lugar a la formación de callo friable, que posteriormente fue transferido a medio MS más  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ y  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de Cinetina, para la maduración de los embriones de los que se formaron un promedio de 50.7 por cada 100 mg de callo. Los embriones maduros se desarrollaron en medio MS sin reguladores de crecimiento, para dar origen a las nuevas plántulas (Ipekci y Gozukirmizi, 2003). Estos mismos investigadores continuando con la línea de embriogénesis somática pero de forma directa lograron generar no solamente embriones; sino semillas sintéticas a través del encapsulamiento de los embriones en una solución de 3% de alginato de potasio, una vez encapsulados fueron evaluados periodos de almacenamiento a  $4^{\circ} \text{ C}$  por 30 y 60 días, encontrando frecuencias de germinación de 73.7% y 53.3%, respectivamente (Ipekci y Gozukirmizi, 2004).

Otra de las formas en que se pueden generar nuevas plántulas a partir de un tejido es mediante organogénesis directa, en *P. tomentosa* fue posible formar

brotos a partir de segmentos nodales en medio MS con una combinación de 4.4  $\mu\text{M}$  de BA y 1.34  $\mu\text{M}$  de ANA, logrando obtener un total de 81 plántulas por cada explante después de 12 semanas (Rout *et al.*, 2001). En ese mismo sentido se generaron brotes a partir de segmentos foliares en *P. kawakamii*, con condiciones similares a las encontradas en *P. tomentosa*. (Low *et al.*, 2001). Este tipo de respuesta fue reportada a partir de segmentos de hoja y peciolo en *P. catalpifolia* por (Song *et al.*, 1991).

En el caso del híbrido  $F_1$  de *P. fortunei* x *P. tomentosa*, fue posible clonarlo mediante la generación de brotes de segmentos internodales, con una tasa de multiplicación de 5.7 brotes cada 4 semanas usando medio MS, adicionado con 2  $\text{mg L}^{-1}$  de BA y 1  $\text{mg L}^{-1}$  de ANA. (Sharma y Dhiman, 1998).

Respuestas similares se encontraron en *P. elongata*, utilizando segmentos foliares de plántulas establecidas *in vitro*, los segmentos fueron cortados en forma de discos y colocados en medio MS, con una combinación de BA y ANA observándose aparición de brotes después de 25 días de cultivo, los brotes se transfirieron a un medio diluido al 50% de MS con AIB para promover formación de raíces cuando alcanzaron una longitud de 3 cm o más y finalmente se adaptaron en invernadero (Bergman y Moon, 1997).

#### **2.4. Objetivos de la ingeniería genética en especies forestales**

Las dos finalidades más importantes en la investigación de ingeniería genética forestal son el aumento en la producción de biomasa y los cambios en la

estructura de la madera según los diferentes objetivos. Respecto a la estructura maderable la investigación se enfoca en modificar el contenido y la composición de lignina. La lignina tiene que ser removida en un proceso con alto consumo energético que involucra el uso de químicos contaminantes en la producción de pulpa y papel. Un menor contenido de lignina a favor de un mayor contenido de celulosa abarataría los costos de producción de papel. Otros propósitos son la resistencia a insectos, la tolerancia a herbicidas y a estrés abiótico como sequía, heladas, inundaciones, alta salinidad, etc. (Tang y Newton, 2003).

#### **2.4.1. Aumento en la producción de biomasa**

Obviamente aumentar los niveles de crecimiento y los volúmenes del tronco, como también acortar los niveles de rotación de los bosques son, objetivos interesantes económicamente hablando. Las fases de crecimiento y desarrollo en las plantas son reguladas por hormonas, especialmente el grupo de las giberelinas desempeñan un papel clave en estos procesos. Los genes reguladores clave en la biosíntesis de estas hormonas del crecimiento, incluyendo el gen que codifica la giberelina-20-oxidasa, han sido identificados en *Arabidopsis*. (Eriksson *et al.*, 2000). Además, Israelsson *et al.* (2003), transformaron con el gen de la *Arabidopsis* que codifica la giberelina-20-oxidasa híbridos de álamos. Los álamos transgénicos se distinguieron de los álamos no transgénicos por el aumento en los niveles de crecimiento. Adicionalmente, los árboles transgénicos tenían fibras del xilema en mayor cantidad y tamaño. Las fibras largas son deseadas en la producción de papel grueso. Otro procedimiento, que



probablemente resulte en una mayor producción de madera, hecho por (Strauss *et al.*, 1995), es causar esterilidad por medios transgénicos. La esterilidad transgénica ahorraría la energía que normalmente es utilizada en la floración y, por ende, sería utilizada en mayores niveles de crecimiento.

#### **2.4.2. Modificación del contenido y de la composición de lignina.**

La lignina se produce en grandes cantidades en las paredes celulares secundarias de las fibras y en el sistema de transporte de agua en las plantas, los vasos y traqueidas, que les dan soporte mecánico y ayudan en el sistema de defensa de la planta contra organismos patógenos. Durante el proceso de producción de papel, la lignina tiene que ser removida calentando las fibras vegetales en sulfito para obtener celulosa pura. La remoción de lignina es el paso más costoso, más intensivo energéticamente hablando y más contaminante en el procesamiento de la madera para la producción de pulpa y papel; por ello, la industria del papel tiene un enorme interés en reducir el contenido de lignina en los árboles. Distintos equipos de investigación han tratado de reducir el contenido de lignina en los árboles sin mayor éxito. Estos intentos sólo resultaron en cambios sorprendentes en la composición de lignina, pero no en el contenido de la misma (Sederoff, 1999). Finalmente, (Hu *et al.*, 1999) transformaron álamos con *Agrobacterium tumefaciens*, la cual llevaba una construcción genética antisentido que regulaba la síntesis de lignina sin modificar la composición de

misma, estos álamos transgénicos exhibieron hasta un 45% de reducción de lignina y hasta un 15% de aumento en la celulosa.

#### **2.4.3. Tolerancia a herbicidas**

Los cultivos resistentes a herbicidas son considerados como uno de los mayores éxitos de la ingeniería genética. La aplicación de herbicidas en los bosques es únicamente útil para favorecer el crecimiento de plántulas arbóreas al eliminar la competencia de las plantas herbáceas. Esta es la razón por la que genes que dan resistencia a diferentes herbicidas como el glifosato o el Basta han sido transferidos a los árboles (Tzfira *et al.*, 1998).

#### **2.4.4. Resistencia a insectos**

Los insectos son responsables de pérdidas sustanciales en especies forestales; adicionalmente, la práctica común de sembrar plantaciones densas de árboles favorece el aumento rápido de los tamaños de población de insectos. Hasta ahora se han producido varios árboles resistentes a insectos. Estos llevan el gen de *Bacillus thuringiensis* el cual codifica una toxina contra lepidópteros (Tzfira *et al.*, 1998 y Hu *et al.*, 2001).

#### **2.4.5. Tolerancia a estrés abiótico**

En general, la mayoría de especies naturales de árboles están bien adaptadas a su medio ambiente, exhibiendo una alta competencia ecológica; sin embargo, ciertas características de tolerancia a estrés abiótico pueden hacerse

importantes para la reforestación en determinados lugares, como sitios con problemas de contaminación del aire, o para plantar especies arbóreas exóticas no adaptadas. En este contexto (Strohm *et al.*, 1999) investigaron si los álamos transgénicos que sobre-expresaban ciertas enzimas eran menos sensitivos a zonas críticas de estrés por ozono que el tipo silvestre. Los álamos transgénicos exhibieron mayor actividad de ambas enzimas: glutamato sintetasa y glutamato reductasa, las cuales probablemente juegan un papel importante en la protección contra moléculas de oxígeno extremadamente reactivas como el ozono. Sin embargo, los árboles transgénicos y no-transgénicos fueron dañados por el ozono por igual, pues no hubo diferencia en la extensión de lesión foliar entre los álamos modificados y no modificados.

#### **2.4.6. Fitorremediación**

Otro posible objetivo de los árboles transgénicos es la fitorremediación, la remoción mediante plantas de desechos tóxicos del suelo contaminado. Contaminantes diferentes, principalmente iones de metales pesados o compuestos orgánicos, son degradados o acumulados por muchas bacterias y especies vegetales. Por ejemplo, las plantas transgénicas de *Arabidopsis*, que sintetizan un cierto producto codificado por el gen *merApe9*, demostraron una mayor resistencia a los iones de mercurio  $Hg^{2+}$  durante la germinación y el crecimiento (Rugh *et al.*, 1996). También se han hecho investigaciones en la fitorremediación de contaminantes orgánicos; un estudio referente a este caso particular se reportó en un álamo híbrido que fue modificado genéticamente

utilizando un gen humano del citocromo, *P450 2E1* descrito por Doyle *et al.* (2000) para desintoxicar un químico tóxico industrial muy extendido, el tricloroetileno (TCE). Se usó el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. El producto genético modifica una serie de compuestos, incluyendo el TCE, el dibromo etileno, el benceno, el estireno, el cloroformo y otras sustancias menos tóxicas o no tóxicas mediante una reacción oxidativa. Los productos de la reacción son finalmente transportados a los tallos y a las hojas.

## **2.5. Avances en la transformación genética en *Paulownia***

Estudios para determinar la susceptibilidad de *P. elongata* a *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* demostraron que inoculando brotes generados *in vitro*, era posible la formación de la agalla de la corona con una frecuencia del 83% cuando se inoculaban con la cepas 542, A281 y C58, además de generarse una rápida proliferación de callos. Por otro lado se logró una abundante formación de raíces en las partes dañadas de los brotes inoculados con *A. rhizogenes* cepa R1601. Los análisis de la presencia de opinas fueron positivos, al igual que las pruebas Southern blot que confirmaron, tanto en callo como en raíces la existencia de T-DNA (Bergmann *et al.*, 1999).

Uno de los aspectos estudiados en *P. kawakamii*, fue el aislamiento de un gen bZIP, que codifica para un factor de transcripción tipo cremallera de leucina, el cual se expresa esencialmente durante la regeneración de brotes adventicios y la presencia de éste se observa principalmente en los meristemos apicales y en

los primordios foliares, donde los niveles son seis veces mayores que en callos o tejidos no diferenciados, lo que sugiere que este gen está asociado con el desarrollo de brotes y yemas (Prakash *et. al.*, 2001).

En *P. fortunei*, se obtuvo callo transformado después de co-cultivar segmentos de peciolo con *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA 4404 con un vector binario (pB121), que incluía los genes reportero GUS y de selección NPT II, resistencia a Kanamicina, la transformación se confirmó mediante pruebas histoquímicas de la expresión del gen GUS y la detección de la incorporación del gen de selección al genoma de los callos transformados; sin embargo la frecuencia de regeneración resultó sumamente baja (Mohri *et al.*, 2003). Trabajos de transformación ya enfocados a la integración de genes con fines de conferir alguna característica se realizaron en un híbrido de *P. tomentosa* x *P. fortunei*, el cual fue transformado vía *Agrobacterium tumefaciens* con el vector p43 8PRSI el cual contenía el gen *shiva-1* que codifica un péptido bactericida, controlado por el gen promotor CaMV35S. Los análisis moleculares, como PCR, Southern blotting, mostraron la integración exitosa del gen *shiva-1* en el genoma de la planta. La transcripción del gen se confirmó mediante RT-PCR. Se realizaron bioensayos en el invernadero mostrando que se logró una resistencia significativa contra el fitoplasma que causa la enfermedad, denominada “escoba de bruja” (PWB), También se pudo comprobar que a mayor expresión del gen *shiva-1* menor presencia del fitoplasma y por lo tanto de los síntomas de la enfermedad (Tao *et al.*, 2005). Esta investigación muestra la aplicabilidad de estas formas de

mejoramiento para problemas puntuales como puede ser la resistencia a enfermedades.

## **2.6. Transformación genética con los genes quitinasa y glucanasa**

Con objeto de conferir tolerancia a varios organismos fitopatógenos se han aislado y utilizado de manera separada o como una construcción doble los genes quitinasa y glucanasa. Ejemplos de la actividad del gen quitinasa para generar tolerancia a enfermedades fue reportado por (Gentile *et al.*, 2007), quienes después de transformar plantas de limón con un gen de quitinasa aislado de *Trichoderma harzianum* lograron generar tolerancia en pruebas *in vitro* e *in vivo* a *Botrytis cinerea* y *Phoma tracheiphila* al ser inoculadas con conidios de estos hongos. En cuanto al gen glucanasa de manera independiente se lograron transformar genéticamente vía *A. tumefaciens* plantas de jitomate, con una construcción que contenía el glucanasa, dando lugar a varias líneas transgénicas que mostraron una alta resistencia a *B. Cinerea*, comparadas con plantas no transformadas (Chen *et al.*, 2006). Gran parte de las investigaciones enfocadas a generar plantas tolerantes a diversos agentes fitopatógenos se han realizado mediante dobles construcciones, es decir, que contienen ambos genes quitinasa y glucanasa en una sola unidad, de estos casos se pueden mencionar los siguientes, en plátano se incorporaron estos dos genes a través de biobalística, para lo cual se incorporaron los genes de manera separada y conjunta, encontrando que cuando los genes quitinasa y glucanasa se encontraban en una

construcción doble incrementaban de manera significativa la tolerancia a varias sepas del género *Fusarium* (Sreeramanan *et al.*, 2006). Una investigación realizada en 41 líneas transgénicas homocigóticas de arroz que contenían los genes quitinasa (*RC24*) y 946;-1,3-glucanasa (*946;-1,3-Glu*) inoculadas con *Rhizoctonia solani* mostró diferentes grados de tolerancia mediante un análisis de conglomerados generando varias categorías, tolerantes moderadamente tolerantes moderadamente susceptibles y susceptibles, donde un 92.1 % se concentró en el tipo moderadamente tolerantes, encontrándose además que esta respuesta estaba altamente correlacionada con la actividad de éstos genes (Li *et al.*, 2004). En cuanto a la utilización de éstos genes para transformar especies forestales se han realizado investigaciones en *Populus deltoides* que fue transformado vía *Agrobacterium* con el gen quitinasa (*CH5B*) logrando obtener 6 plantas transgénicas confirmadas por análisis histoquímico, PCR y Southern blot (Zou *et al.*, 2006). Otro caso similar se logró en *Betula pendula* transformada con el gen quitinasa IV, dio origen a 15 líneas que fueron sometidas a la infección de *Pyrenopeziza betulicola* y *Melampsorium betulinum* patógenos que causan daños severos a las hojas, al ser evaluadas se encontraron diferentes niveles de expresión del gen, observándose que las líneas que mostraban una expresión alta o intermedia fueron más resistentes a la infección causada por éstos (Pasonen *et al.*, 2004).

### III MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Material Vegetal

Se utilizó material proveniente de una plantación comercial de *Paulownia elongata* ubicada en la localidad el Aguaje, Municipio de Aguililla en el estado de Michoacán. La plantación está bajo condiciones de riego por goteo, fertilización y una densidad de plantación de 1100 árboles por hectárea. La procedencia original de las plántulas deriva de un clon generado en Estados Unidos de Norteamérica y comercializado por una empresa filial en México, el cual fue reproducido a través de micropropagación en un laboratorio comercial. La plantación tenía una edad de 2 años y tres meses a la fecha de colecta, con árboles que poseían en promedio una altura de 6.5 metros y un diámetro aproximado de 12 cm en la parte basal del tronco, con un número promedio de 28 entrenudos, teniendo en cada nudo 2 yemas axilares que de manera general dan origen a dos brotes (por prácticas de manejo los brotes laterales deben ser eliminados). Se realizó una selección de los individuos más sobresalientes dentro de la plantación. Para recolectar los brotes fueron seleccionados aquellos que tenían más de 5 cm y menos de 15 cm de largo y que estaban localizadas en el segundo tercio de la base del tronco, que no presentaran daño alguno, fuera mecánico o por insectos. Los brotes fueron disectados de manera manual par evitar daños a la corteza, y etiquetados, para ser colocados en bolsas de plástico con cierre hermético. Posteriormente, las bolsas fueron almacenadas en una hielera que contenía un tercio de hielo y una



franela entre el hielo y las bolsas para evitar el contacto directo del hielo con el material vegetal, siendo de este modo transportadas hasta el laboratorio para su manejo posterior.

### **3.2. Desinfección del material inicial**

Una vez que el material llegó al laboratorio de Biotecnología de Fruticultura del Programa de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados, fue lavado inicialmente con jabón líquido y agua corriente, para eliminar residuos de polvo y otros contaminantes que pudieran estar presentes en las muestras. Posteriormente se eliminaron las hojas de los brotes para únicamente dejar los nudos y los entrenudos, los que fueron nuevamente lavados con agua corriente y jabón líquido esta vez con un cepillo de cerdas finas, ya que esta especie posee tricomas en los que pueden quedar adheridas diversas partículas. Una vez realizado esto, los brotes fueron disectados con un bisturí en segmentos más pequeños separando los ápices de las yemas laterales y fueron colocados en frascos tipos Gerber<sup>MR</sup> con tapa previamente esterilizados, a los que se les agregó una solución de alcohol etílico al 70% v/v dejándola actuar durante 30 segundos. Al término de este paso se eliminó la solución y de forma inmediata se agregó una nueva solución de hipoclorito de sodio al 3% con una duración de 20 minutos para yemas laterales y de 15 minutos para meristemas, en virtud de que estos tejidos son más suculentos y delicados. Finalizado el tiempo de exposición se les dieron tres enjuagues en campana con agua destilada y estéril.

### **3.3. Establecimiento *In vitro* del material inicial**

Al término de la desinfección y con objeto de establecer el material inicial en condiciones *in vitro*, los segmentos de los brotes fueron nuevamente cortados con la finalidad de eliminar el tejido de la parte basal del nudo, que generalmente presenta afectación por la propia acción del hipoclorito de sodio en el tejido. Los nudos disectados se transfirieron a un medio de cultivo constituido por las sales y vitaminas propuestas por Murashigue y Skoog en 1962 (MS), con 3% de sacarosa y 0.7% de agar como agente gelificante y un pH de 5.8, incubándose en condiciones de temperatura controlada de 25° C con una luminosidad de 47.8  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proveniente de una lámpara fluorescente de luz blanca y con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad. Cada 30 días los brotes generados de las yemas axilares fueron subcultivados, una vez que se establecieron en condiciones *in vitro*, se hicieron los subcultivos necesarios para obtener una cantidad de plántulas suficiente para la realización de las pruebas subsecuentes.

### **3.4. Establecimiento del medio de cultivo para Inducción de organogénesis directa e indirecta**

Para lograr los objetivos planteados en la presente investigación fue necesario definir las condiciones óptimas para generar organogénesis directa de algún tejido de *P. elongata*, con la finalidad de generar un sistema eficiente para la inducción de brotes que pudiera servir como base para la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*.

### **3.4.1. Selección del tipo de tejido, medios y combinación de reguladores de crecimiento**

Con base en investigaciones previas en el género *Paulownia*, se determinó que los tejidos con mayor posibilidad para generar brotes vía organogénesis directa o indirecta serían segmentos foliares, entrenudos y pecíolos, los cuales han sido probados en otras especies o han dado respuestas por otras vías organogénicas como lo encontrado por Ipecki y Gozukirmizi (2003, 2004) y por Bergmann y Moon (1997). Por otra parte, el medio base usado fue el Murashige Skoog que fue probado en todos los trabajos realizados en el género de interés y la combinación de reguladores de crecimiento evaluadas fueron para organogénesis directa BA y ANA y TDZ para organogénesis indirecta y caulogénesis, en diferentes concentraciones y combinaciones. Estos reguladores de crecimiento fueron los que mejor respuesta dieron en diferentes investigaciones como las realizadas por Ipecki y Gozukirmizi (2003, 2004) y por Bergmann y Moon (1997), para ambas vías organogénicas.

### **3.4.2. Diseño experimental**

Los tratamientos se establecieron bajo un diseño completamente al azar, con las siguientes combinaciones: 3 tipos de explantes y 13 diferentes tipos de medio incluyendo un testigo y 4 repeticiones, dando lugar a 39 tratamientos a evaluar; dispuestos en un arreglo factorial siendo tipo de explante un factor y los medios el segundo factor. Se establecieron 4 cajas Petri con 25 explantes por

tratamiento cada una equivalentes a las repeticiones dando un total de 100, cada explante se evaluó como unidad experimental.

### 3.4.3. Variables evaluadas

Con objeto de evaluar las respuestas de los tejidos a las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, se determinaron como variables el número de explantes con respuesta (formación de brote), el número de brotes por explante, la longitud de brotes, el contenido de materia seca de los brotes y el área foliar de los brotes. Estas pruebas últimas involucraron la pérdida del material evaluado.

### 3.4.4. Análisis estadístico

Para analizar la información obtenida de las variables evaluadas y poder encontrar las diferencias que permitiera determinar las soluciones óptimas buscadas se utilizó el programa de análisis SAS (Statistical Analysis System). Bajo un modelo completamente al azar con arreglo factorial y con una comparación de medias de Duncan al 5%.

Modelo estadístico usado:

$$Y_{ij} = \mu + E + M + E*M + e$$

E = Explante

M = Medio de cultivo

E\*M = interacción entre tipo de explante y medio de cultivo

e = Error experimental

### **3.5. Dosis de antibiótico para el medio de selección**

Cuando se determinó el tipo de tejido a usar, el medio y la combinación de reguladores para obtener la formación de brotes por organogénesis directa se generó el protocolo para la regeneración *in vitro*, primer paso requerido para poder establecer un sistema de transformación genética mediada por *Agrobacterium*. Con el objetivo de determinar el medio de selección para el proceso de transformación se procedió a definir la concentración de antibiótico necesaria para inhibir crecimiento de brotes. El antibiótico empleado fue kanamicina. Las dosis evaluados fueron de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150 y 200 mg L<sup>-1</sup> de kanamicina. Como en el caso anterior se utilizaron 4 cajas Petri con 25 explantes cada una bajo un diseño experimental completamente al azar. La única variable evaluada fue la sobrevivencia del explante en el medio con antibiótico, este análisis previo no involucra ningún tejido transformado, razón por la que se esperaba observar una severa disminución en la respuesta de brotación de los explantes involucrados.

### **3.6. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

Cuando se establecieron las condiciones para la formación de brotes y se obtuvo el medio de selección se procedió al establecimiento de las pruebas de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* siguiendo el método de transformación con los principios establecidos por Horsch *et al.*, (1985).

### 3.6.1. Cepas y plásmido

Se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 conteniendo el plásmido pCAMBIA 2301-CHIT-GLU que poseía los genes de interés quitinasa, glucanasa, el gen reportero GUS, el gen de selección NPTII (resistencia a kanamicina) con un tamaño total de 11621 pares de bases, además de contener un gen de selección para la cepa bacteriana al antibiótico rifampicina (Figura 2).

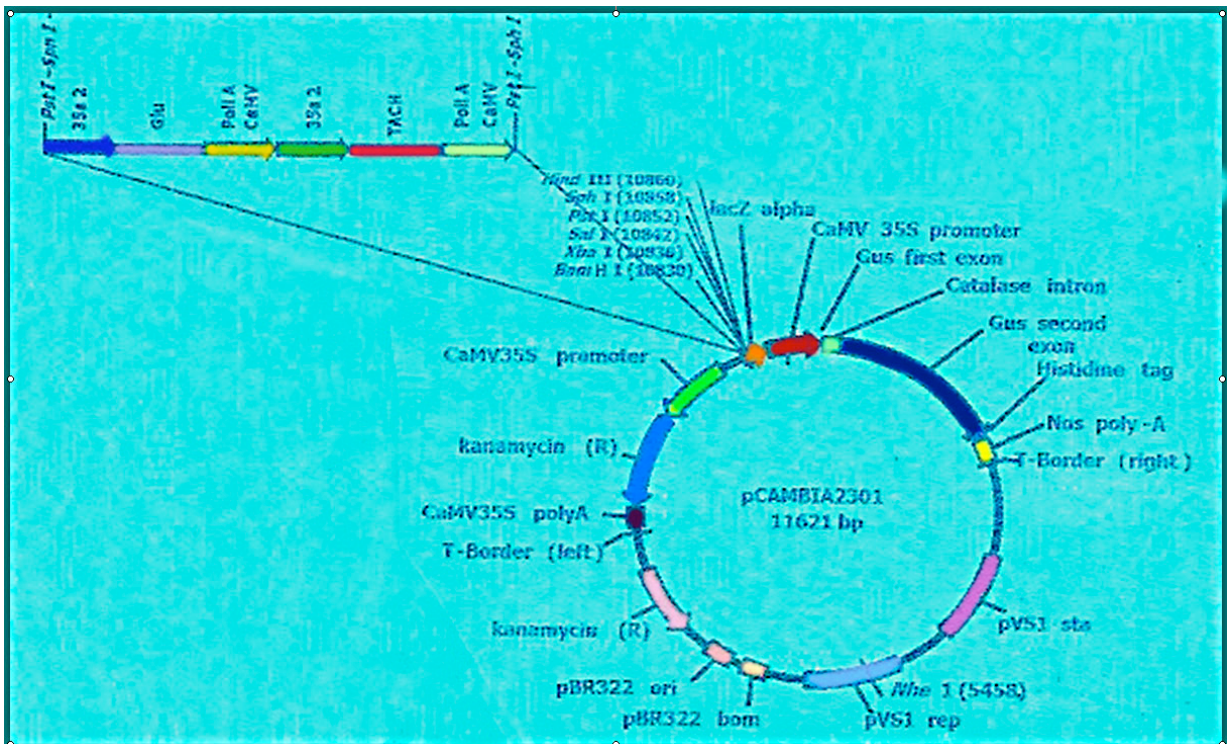


Figura 2 Construcción del plásmido pCAMBIA2301-CHIT-GLU

### **3.6.2. Tipo de explante usado para transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

Para realizar los ensayos de transformación fueron usados segmentos de entrenudos con una longitud de 0.5 cm, generados en medio MS, sin reguladores de crecimiento, cultivados durante 35 días para favorecer la máxima elongación posible de los entrenudos, dentro del recipiente de cultivo, generándose en promedio brotes con 8 cm de longitud, los segmentos disectados fueron colocados en medio líquido MS, previo a su inoculación con la cepa de *Agrobacterium*.

### **3.6.3. Medio de crecimiento para cepas de *A. tumefaciens***

Para el crecimiento de la cepa de *Agrobacterium* se utilizó el medio de cultivo YEP, en forma sólida y líquida, constituido por extracto de levadura 5 g L<sup>-1</sup>, bacto peptona 10 g L<sup>-1</sup>, cloruro de sodio 5 g L<sup>-1</sup>, agar (para medio sólido) 12 g L<sup>-1</sup>, y pH de 6.8, pasados por autoclave por 15 min. a 1.8 kg/cm<sup>2</sup> de presión. Posterior a la esterilización se dejó enfriar hasta bajar la temperatura a 40° C, para agregar los antibióticos de selección kanamicina 50 mg L<sup>-1</sup> y rifampicina 50 mg. L<sup>-1</sup>, agregando 25 mL de medio en cajas Petri o 50 mL en frasco con tapa.

### 3.6.4. Medio de co-incubación

Posterior a la incubación de los entrenudos con la cepa de *Agrobacterium*, los tejidos tratados con la bacteria se colocaron en un medio de cocultivo, el medio MS, adicionado con 0.1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y acetosiringona 1 mg L<sup>-1</sup>, más 3% de sacarosa, pH de 5.7 y esterilizado por 15 minutos a 1.8 kg/cm<sup>2</sup> de presión.

### 3.6.5. Tratamientos de transformación

Se establecieron diferentes condiciones de transformación por medio de variaciones en los tiempos de incubación con la bacteria, concentración de la bacteria, medida a través de la densidad óptica del cultivo y tiempos de co-incubación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Concentración de la <i>Agrobacterium</i> (OD)	Tiempo de incubación (horas)	Tiempo de co-cultivo (horas)
0.6	1	12
0.7	1.5	24
0.8	2	36
0.9	2.5	48
1	3	72



### 3.6.7 Condiciones de selección de segmentos co-incubados

Al término de la inoculación y tiempo de incubación de los segmentos de entrenudos, éstos fueron transferidos a medio de selección fresco. Este consistió de medio MS, adicionado con 4 mg L<sup>-1</sup> de BA, 0.2 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 15 mg L<sup>-1</sup> de kanamicina, 250 mg L<sup>-1</sup> de cefatoxina, 3% de sacarosa, 0.7% de agar y pH de 5.8. Previo a la transferencia se eliminó el exceso de bacteria crecido en la periferia de los explantes, colocándolos en papel estéril, para posteriormente transferirlos al medio de selección, donde permanecieron por un periodo de 35 días, tiempo promedio en que se inició la formación de brotes.

### 3.6.8. Evaluación de brotes obtenidos en medio de selección

Los brotes obtenidos mayores a 1.5 cm fueron disectados eliminando un segmento de aproximadamente 2 mm, utilizado para realizar la prueba histoquímica X-GLUC y observar la expresión del gen GUS en los tejidos. Como fue sugerido por primera vez por (Jefferson *et al.*, 1987), quienes integraron el gen GUS fusionado con el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, transformando plantas de tabaco y evaluando los posibles brotes putativos, mediante esta prueba histoquímica.

Posteriormente el resto del brote fue transferido al medio de selección fresco para permitir su crecimiento y poder obtener material suficiente para la extracción de

ADN, requerido para el análisis de PCR confirmatorio de la integración de los genes de interés al genoma de los brotes transformados.

### **3.7. Transformación por aceleración de partículas**

El sistema de aceleración de partículas utilizado es el conocido por sus siglas en inglés PIG (Particle Inflow Gun) diseñado y reportado por primera vez por Vain *et al.* (1993); sistema que opera con gas helio y partículas de tungsteno como agentes proyectiles y acarreadores de plásmidos, funciona a baja presión (40 a 120 psi) y requiere una bomba de vacío que al menos llegue de 25 a 30 pulgadas de mercurio.

#### **3.7.1. Plásmidos**

Se utilizó el plásmido pCAMBIA 2301-CHIT-GLU con los genes de interés quitinasa y glucanasa, el gen reportero GUS, el gen de selección NPTII (resistencia a kanamicina) con un tamaño de 11,621 pares de bases, además de contener un gen de selección para la cepa bacteriana al antibiótico rifampicina. Para poder aislar el plásmido de la cepa bacteriana, ésta fue crecida en medio líquido YEP con antibióticos de selección durante 12 horas en agitación continua a 250 rpm, del cual se obtuvo un cultivo con una densidad óptica entre 0.4 y 0.7, de éste se tomaron 3 mL para extraer y purificar el plásmido mediante un sistema comercial (QIAprep Spin Miniprep Kit<sup>MR</sup>). El plásmido obtenido se diluyó en 50  $\mu$ L,

de los que se tomaron 3  $\mu$ L para cuantificar mediante un gel de calidad de agarosa al 0.8 %.

### **3.7.2. Tipo de explante usado para transformación por biobalística**

#### **3.7.2.1. Entrenudos**

Se emplearon segmentos de entrenudos con una longitud de 0.5 cm, generados en medio MS, sin reguladores de crecimiento, cultivados durante 35 días para favorecer la máxima elongación posible de los entrenudos dentro del recipiente de cultivo, generándose en promedio brotes con 8 cm. de longitud, los segmentos disectados fueron colocados en medio sólido MS sin reguladores de crecimiento, previo al bombardeo de partículas.

#### **3.7.2.2. Callos**

Para la transformación por aceleración de partículas también fueron usados callos, los cuales se obtuvieron de entrenudos cultivados en medio MS suplementado con 4 mg L<sup>-1</sup> de TDZ, 3% de sacarosa, 0.7% de agar y pH de 5.8; dejándose en crecimiento por un periodo de 2 semanas a 26° C en oscuridad total, desarrollándose callos con un promedio de 1 cm<sup>2</sup>, siendo los más apropiados para ser transformados por aceleración de partículas.

### **3.7.3. Ajustes del sistema de aceleración**

El sistema de aceleración de partículas (PIG) fue ajustado, mediante pruebas preliminares para determinar la distancia de disparo. Para ello se utilizó un plásmido que sólo contenía el gen GUS, realizando disparos a una presión constante de 120 PSI y únicamente modificando la distancia de disparo, se usaron segmentos foliares como objeto para transformación. Posterior a los disparos los segmentos foliares se dejaron en cuarto de incubación por 6 horas y al término de este tiempo se realizaron pruebas con X-GLUC dejando que el sustrato reaccionara por tiempo de 12 horas a 36° C, observando los tejidos al microscopio.

### **3.7.4. Tratamientos de transformación y procedimiento de disparo**

Se establecieron diferentes condiciones de transformación por medio de variaciones en las presiones utilizadas regulando la salida del gas helio y en la velocidad de disparo, manteniendo constantes la concentración de plásmido en las partículas y la distancia de disparo (Cuadro 3). La operación de disparo consiste de los siguientes pasos: a) ajuste de la presión de disparo a través de las válvulas la cual no debió en ningún caso exceder de 140 PSI, en ese momento se encendió la bomba de vacío, b) en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL se agregaron 50 mg de partículas de tungsteno, en las que se precipitó el ADN, agregando 25  $\mu$ L de agua destilada y esterilizada, mezclando en ella las partículas, a esta mezcla se adicionaron 5  $\mu$ L del ADN plasmídico con una

concentración de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , después se agregaron  $25\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  2.5 M y  $10\mu\text{L}$  de espermidina 100 mM y toda la mezcla se colocó en hielo durante 5 minutos; transcurrido este tiempo se retiraron  $50\mu\text{L}$  del sobrenadante y se regresó el tubo al hielo. La mezcla restante fue suficiente para realizar 5 disparos de  $2\mu\text{L}$ , c) en un filtro para jeringa se colocó una gota de  $2\mu\text{L}$ , de la mezcla de partículas y ADN al fondo del mismo, al tiempo que los tejidos previamente cortados y dispuestos en caja Petri, fueron destapados y cubiertos con un filtro de protección, se trasladaron al centro de la cámara de disparo, el filtro con la mezcla se colocó en la parte superior de la cámara de disparo, justo encima de los tejidos y se ajustó al tornillo de sujeción, cerrando en ese momento la puerta de la cámara de disparo por medio de presión de vacío, al abrir las válvula que permite que pase éste a la cámara de disparo, hasta que llegó a 22 pulgadas de mercurio, d) al alcanzar el vacío se presionó el botón de disparo ubicado en el solenoide del PIG, donde se encuentra el regulador de velocidad de disparo, al realizar este paso se descargó la presión de helio que dispara las partículas a los tejidos acarreado con ellas el ADN de interés, e) finalmente se liberó el vacío abriendo ligeramente la válvula de vacío, lo que permitió abrir la puerta y retirar el material bombardeado.

Cuadro 3. Condiciones de transformación evaluadas con el sistema de aceleración de partículas para entrenudos y callos.

Tipo de explante	Presión de helio (PSI)	Nivel de disparo*
Entrenudo	40	6, 7 y 8
Entrenudo	60	6, 7 y 8
Entrenudo	80	6, 7 y 8
Entrenudo	90	6, 7 y 8
Entrenudo	100	6, 7 y 8
Entrenudo	120	6, 7 y 8
Callo	40	6, 7 y 8
Callo	60	6, 7 y 8
Callo	80	6, 7 y 8
Callo	90	6, 7 y 8
Callo	100	6, 7 y 8
Callo	120	6, 7 y 8

\*La distancia al primer nivel de disparo es de 10 cm y cada nivel de 1cm

### 3.7.5. Condiciones de recuperación de segmentos bombardeados

Posterior al bombardeo de los tejidos, los segmentos fueron transferidos a un medio de recuperación (MSRECU1) constituido por medio MS, adicionado con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de TDZ para segmentos de entrenudo y de 4 mg L<sup>-1</sup> de TDZ para callos (MSRECU2). En ambos casos los tejidos permanecieron en este tratamiento durante siete días, para permitir en primer lugar la recuperación de los mismos, después del daño y estrés generado a las células, además de permitir la formación de nuevas células sin la presión inmediata de un medio de selección.

### **3.7.6. Condiciones de selección de segmentos bombardeados**

Posterior a la recuperación de los tejidos, los segmentos fueron transferidos a un medio de selección constituido por medio MS, adicionado con 4 mg L<sup>-1</sup> de BA, 0.2 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 15 mg L<sup>-1</sup> de kanamicina, 3% de sacarosa, 0.7% de agar y pH de 5.8, tanto los segmentos de tallo, como los callos, donde permanecieron por un periodo de 35 días, tiempo promedio en que se inició la formación de brotes.

### **3.7.7. Evaluación de los brotes obtenidos en medio de selección**

Los brotes obtenidos mayores a 1.5 cm fueron disectados eliminando un segmento de aproximadamente 2 mm, utilizado para realizar la prueba histoquímica XGLUC y observar la expresión del gen GUS en los tejidos. Posteriormente, el resto del brote fue transferido al medio de selección fresco para permitir su crecimiento y poder obtener material suficiente para la extracción de ADN requerido para el análisis de PCR confirmatorio de la integración de los genes de interés al genoma de los brotes transformados.

### **3.8 Evaluación de brotes obtenidos en medio de selección por técnicas moleculares.**

A la par que se tomó tejido de los brotes en medio de selección, para pruebas histoquímicas con el sustrato X-Gluc, se tomó una porción de tejido con un promedio de 3 mm, para obtener una cantidad de 20 mg, con objeto de realizar extracción de ADN de estas muestras para ser analizadas por la técnica de PCR, usando pares de iniciadores específicos para cada uno de los genes integrados al genoma de las posibles plantas transformadas (Cuadro 4)

#### **3.8.1 Extracción de ADN**

Se procedió colocando tejido disectado (20 mg) de las plantas en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL y transfiriéndolos a nitrógeno líquido por 30 segundos. Posteriormente la muestra se molió con un pistilo, hasta formar un polvo fino, al cual se le agregaron 400  $\mu$ L de buffer de extracción (Cuadro 1 del anexo) y se agitó por 10 segundos en el vortex. Al término de este paso la muestra se colocó a baño maría durante 90 minutos a 60° C, al finalizar el tiempo se dejó reposar la muestra por 2 minutos, se agregaron 400  $\mu$ L de cloroformo agitándose suavemente para mezclar y centrifugándose durante 5 minutos a 12000 rpm en este paso se observaron dentro del tubo dos fases acuosas; de éstas, la superior se transfirió a un nuevo tubo y se le agregó un volumen igual de isopropanol, dejándola reposar por 20 minutos a -20° C para ser centrifugada durante 10 minutos a 12,000 rpm. Concluido el tiempo se decantó el tubo



eliminando el sobrenadante y rescatando la pastilla formada en el fondo, a la cual se le dieron dos lavados con 200  $\mu\text{L}$  etanol al 70 % y al 96 %, centrifugando a 10,000 rpm por 5 minutos en cada lavado. Finalmente se dejó evaporar el exceso de etanol a temperatura ambiente por 30 minutos. La pastilla se resuspendió en 25  $\mu\text{L}$  agua destilada y estéril. Para poder observar el resultado de la extracción, se siguió la cuantificación de la calidad según lo recomendado por Bohorova *et al.*, (1999), razón por la que se corrieron 2 $\mu\text{L}$  de la muestra en un gel de agarosa al 0.8% por 60 minutos a 100 voltios. El gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio durante 15 minutos y la imagen del gel se capturó en un fotodocumentador de geles con transiluminador de luz UV integrado. Mediante este procedimiento se pudo conocer la calidad del ADN aislado y la cantidad aproximada de éste.

### **3.8.2. Análisis por PCR de las muestras de ADN**

Al conocer la concentración de ADN se procedió a estandarizar todas las muestras haciendo diluciones con la finalidad de que las muestras estuvieran a una concentración de 100 ng/ $\mu\text{L}$ , condición requerida para una correcta reacción de PCR. Para poder realizar este análisis se utilizaron los iniciadores específicos para cada uno de los genes encontrados en la construcción de *A. tumefaciens*, es decir, NPTII, GUS, quitinasa y glucanasa. Previamente, se programó el termociclador (MJ Reserch <sup>TM</sup>) para condiciones específicas para estos genes, antes de proceder a preparar la reacción (Cuadro 4). Se preparó una mezcla de reacción contemplando todas las muestras de ADN, más los testigos positivo y negativo. La mezcla se dividió en el número total de reacciones a evaluar, en

tubos para PCR de 0.5 mL, agregando 23.5  $\mu$ L de mezcla de reacción y 1.5  $\mu$ L de muestra de ADN, para un total de 25  $\mu$ L por tubo. Finalmente los tubos se colocaron en el termociclador y se dio inicio a correr el programa específico (Cuadro 2 del Anexo).

Cuadro 4. Secuencia de los iniciadores para el gen quitinasa

<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia</b>
207 5'	TCT AGA ATG GAG TTT TCT GGA TCA C
208 3'	GGA TCC CTA GCC TTG GGC GAA GTT C

## IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Establecimiento *in vitro*, sobrevivencia y contaminación del material inicial

El establecimiento del material inicial proveniente de campo es un reto ya que factores como la contaminación de los tejidos tanto de manera exógena como endógena, pueden ser una limitante muy grande, al igual que la baja sobrevivencia causada por la oxidación del tejido en el medio de cultivo. En el caso particular de *Paulownia elongata* se obtuvo una respuesta muy favorable ya que la sobrevivencia fue mayor al 90 % y la contaminación menor al 15%, ya que de 950 entrenudos procesados, 102 se contaminaron y 848 tuvieron un desarrollo normal, por lo que se pudo obtener un buen número de brotes establecidos en esta etapa inicial, mismos que pudieron ser subcultivados 4 veces para tener una base de material vegetal suficiente para las pruebas posteriores. En esta primera etapa los investigadores que han trabajado con especies del género *Paulownia* describen el manejo de los materiales, partiendo siempre de material previamente cultivado *in vitro*. Sólo hacen referencia en algunos casos que el material inicial empleado, eran plántulas de 3 meses provenientes de semilla, sin referir de manera alguna los tratamientos de desinfección (Ipekci y Gozukirmizi, 2003).

---

## 4.2. Inducción de organogénesis directa

Respecto a los medios probados, se constató que sólo hubo respuesta cuando fueron usados como explantes pecíolos, hoja con pecíolo y entrenudos (segmentos de tallo); siendo el entrenudo el explante que mejor respuesta dio tanto para el número de explantes con brote como el de brotes por explante. En lo referente a los medios no se observó respuesta en el medio testigo (sin reguladores de crecimiento) ni en los medios que contenían alta concentración de reguladores de crecimiento como el caso particular de aquellos con más de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA (Cuadro 5). Lo anterior concuerda con respuestas similares encontradas por investigadores como (Bergmann y Moon 1997), quienes obtuvieron brotes a partir de segmentos foliares utilizando en principio los mismos reguladores de crecimiento; pero a diferencia de ellos, se observó que los mejores explantes fueron los entrenudos y la mejor respuesta se encontró con un balance de reguladores de crecimiento de 4 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0.2 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Con base en estas pruebas se determinó que el explante a utilizar para transformación sería el entrenudo y el medio MS2 (Cuadro 5, Figura 3 ).

Cuadro.5 Medios y explantes evaluados para determinar la mejor respuesta de organogénesis directa

Medio	BA (mg 1 <sup>-1</sup> )	ANA (mg 1 <sup>-1</sup> )	Número de explantes con brote			Número de brotes por explante		
			Pecíolo	Hoja Pecíolo	Entrenudo	Pecíolo	Hoja- Pecíolo	Entrenudo
MS1	-	-	-	-	-	-	-	-
MS2	4	0.2	-	-	0.83a	-	-	1.22a
MS3	4	0.5	-	-	0.47b	-	-	0.71b
MS4	4	1	-	-	0.31e	-	-	0.47cd
MS5	5	0.2	-	-	0.40d	-	-	0.41d
MS6	5	0.5	0.41b	-	0.48b	0.46b	-	0.41d
MS7	5	1	0.53a	0.50a	0.47b	0.62a	0.61a	0.55c
MS8	7	0.2	0.37c	0.36b	0.55b	0.44b	0.38b	0.66c
MS9	7	0.5	0	-	0.46bc	-	-	0.71b
MS10	7	1	0	-	0.18f	-	-	0.57c
MS11	10	0.2	0.36c	-	0.83a	0.70a	-	1.06a
MS12	10	0.5	-	-	-	-	-	-
MS13	10	1	-	-	-	-	-	-

Valores de la media acompañados por la misma letra en la columna no son estadísticamente diferentes  $P \leq 0.05$  de acuerdo a la prueba de agrupamiento de Duncan.

- Sin respuesta

#### 4.2.1. Explantes con brotes y brotes por explante

En los tratamientos evaluados, se pudieron observar respuestas contrastantes, desde una nula formación de brote, hasta formación de brotes y raíces en el mismo explante. La mejor respuesta en la formación de brotes y el número de éstos por explante se obtuvo en segmentos de entrenudos, con un promedio de 83% con brotes y 1.22 brotes por explante (Cuadro 5). En ese sentido Ipecki y Gozukirmizi (2003, 2004), probaron tanto segmentos foliares como entrenudos para formación de callo y embriones somáticos, encontrando que para embriogénesis somática directa el mejor explante era el entrenudo; pero para embriogénesis somática indirecta los segmentos foliares.

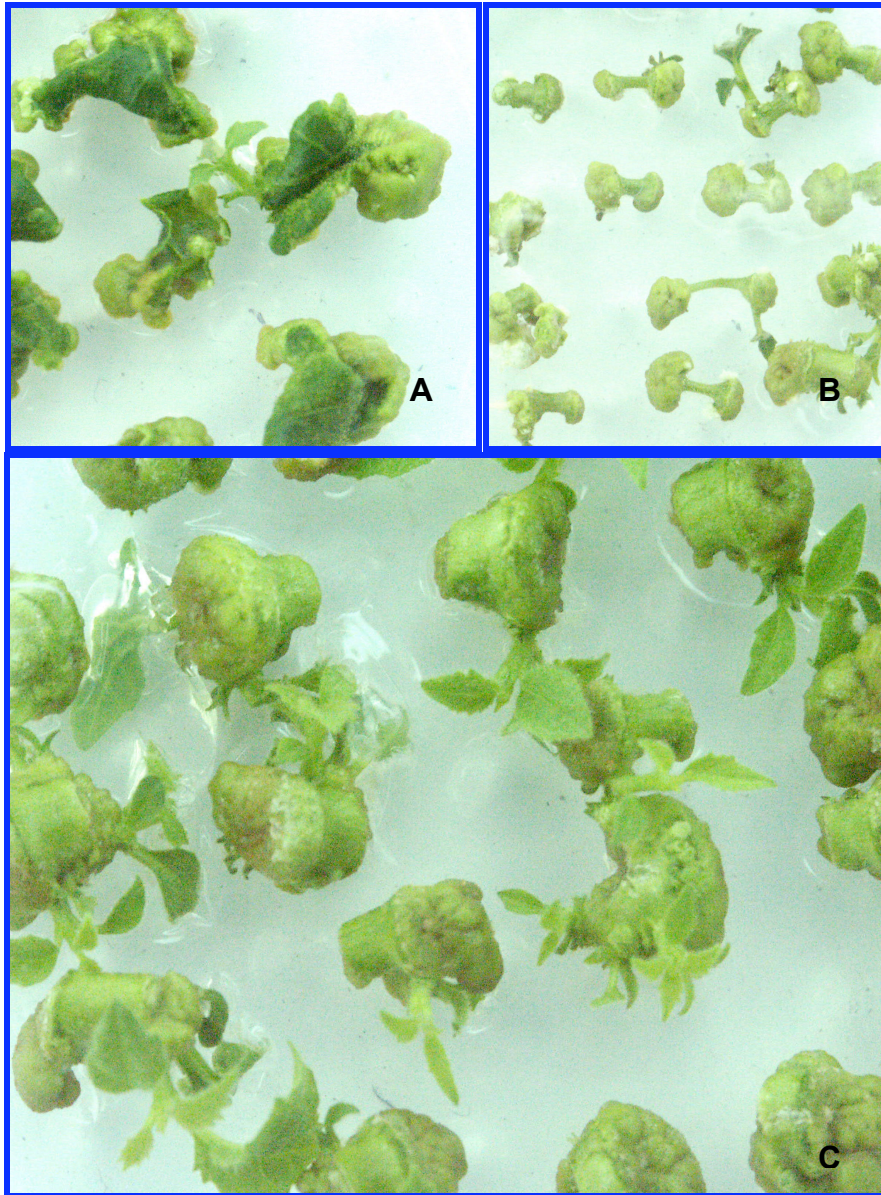


Figura 3 Respuesta de diferentes tipos de tejido al medio MS2.  
a) hoja, b) pecíolo y c) entrenudo

Por otra parte, (Bergmann y Moon 1997), encontraron buena respuesta en segmentos foliares para formación de brotes por organogénesis directa, pero no usaron entrenudos, por lo que no es posible hacer una comparación directa entre las respuestas, más que únicamente para segmentos foliares, observándose que

en los resultados obtenidos en la presente investigación no fue este tipo de tejido el que mostró la mejor respuesta, aun cuando se formaron brotes (Cuadro 5).

#### **4.2.2. Área foliar y materia seca.**

Con respecto a estos parámetros evaluados, cabe resaltar que se obtuvieron respuestas en general antagónicas a las mejores respuestas obtenidas para número de brotes por explante, ya que las mejores respuestas de área foliar y materia seca se encontraron en los medios que dieron origen a un porcentaje bajo de brotes con explante, y a su vez de número de explantes por brote, así por ejemplo la mayor área foliar fue encontrada en un brote proveniente de pecíolo, de un tratamiento que obtuvo apenas el 41% de explantes con brote y un promedio de 0.46 brotes por explante. En este sentido, la respuesta de mayor área foliar pudo haberse generado a causa de que los pocos brotes a los que se dio origen tuvieron una menor competencia, pudiendo desarrollar a su capacidad máxima las hojas que en estos brotes se desarrollaron, dando origen a hojas hasta 4 veces mayores que las que se originaron en los medios con un alto número de brotes donde la competencia fue mayor y por ende la expansión foliar fue limitada. De la misma forma se presentó la tendencia con respecto a la acumulación de materia seca, ya que los medios que en general dieron origen a un menor número de brotes, tales brotes denotaron mayor vigor al presentar un incremento en longitud, diámetro y expansión foliar generando más acumulación de materia seca comparada con aquellos brotes obtenidos en medios en donde

hubo una mayor multiplicidad, en los que no obstante el mayor número de brotes estos fueron de menor tamaño y vigor, dando por ende una menor acumulación de materia seca, como se aprecia en el (Cuadro 6).

**Cuadro 6 Área foliar por análisis de imagen y materia seca**

Medio	Área folia (cm <sup>2</sup> )			Materia seca (mg)		
	Pecíolo	Hoja-Pecíolo	Entrenudo	Pecíolo	Hoja-Pecíolo	Entrenudo
MS1	-	-	-	-	-	-
MS2	-	-	2.08b	-	-	0.0075b
MS3	-	-	1.21d	-	-	0.0039c
MS4	-	-	0.43g	-	-	0.0014f
MS5	-	-	1.37cd	-	-	0.0035c
MS6	2.54a	-	1.13e	0.0060 <sup>a</sup>	-	0.0024de
MS7	0.72c	2.08a	0.71f	0.0022bc	0.0038a	0.0019f
MS8	1.14b	0.94b	2.87a	0.0023bc	0.0029b	0.0109a
MS9	-	-	1.56c	-	-	0.0026d
MS10	-	-	1.19e	-	-	0.0029d
MS11	0.79c	-	0.65f	0.0026b	-	0.0022e
MS12	-	-	-	-	-	-
MS13	-	-	-	-	-	-

Valores de la media acompañados por la misma letra en la columna no son estadísticamente diferentes  $P \leq 0.05$  de acuerdo a la prueba de agrupamiento de Duncan.

- Sin respuesta

#### **4.2.3. Respuesta de diferentes tipos de tejidos y dos concentraciones de TDZ en la formación de callos.**

Con la finalidad de explorar el proceso de organogénesis indirecta se realizaron dos experimentos usando las dos concentraciones de TDZ, 4 y 10 mg L<sup>-1</sup>, utilizados por Ipekci y Gozukirmizi (2003). Para la formación de callo y embriones somáticos, 10 días después de estar en estos medios de cultivo los tejidos mostraron resultados favorables en ambos tratamientos (Figura 4), para todos los tipos de tejidos expuestos a los tratamientos, hojas, tallos y pecíolos; sin



embargo, existieron diferencias entre ellos, obteniéndose la mejor respuesta de vigor en tallo, seguido por hoja, mostrando el menor vigor pecíolo. Con respecto al porcentaje de explantes que mostraron formación de callo, siempre fue mayor para todos los tejidos con la concentración de 10 mg L<sup>-1</sup> de TDZ, misma respuesta observada por (Ipekci y Gozukirmizi 2003); no obstante, hay que señalar que con esta elevada concentración se puede incrementar la vía de embriogénesis somática, mientras que a baja concentración la ruta organogénica inducida está encaminada a la organogénesis directa, lo cual se aproxima más a los intereses planteados para el uso de callos con objeto de ser transformados (Cuadro 7).

Cuadro 7. Respuesta de formación de callo en tres tipos de tejidos de *Paulownia elongata* en tres concentraciones de TDZ.

Tipo de explante	Concentración de TDZ (mg L <sup>-1</sup> )	Porcentaje explantes con callo	Apariencia del tejido o callo
Tallo	0	0	Sin formación de callo
Tallo	4	90	Callos vigorosos
Tallo	10	94	Callos vigorosos
Pecíolo	0	0	Sin formación de callo
Pecíolo	4	74	Callos vigorosos
Pecíolo	10	88	Callos vigorosos
Hoja	0	0	Sin formación de callo
Hoja	4	96	Callos vigorosos
Hoja	10	98	Callos vigorosos

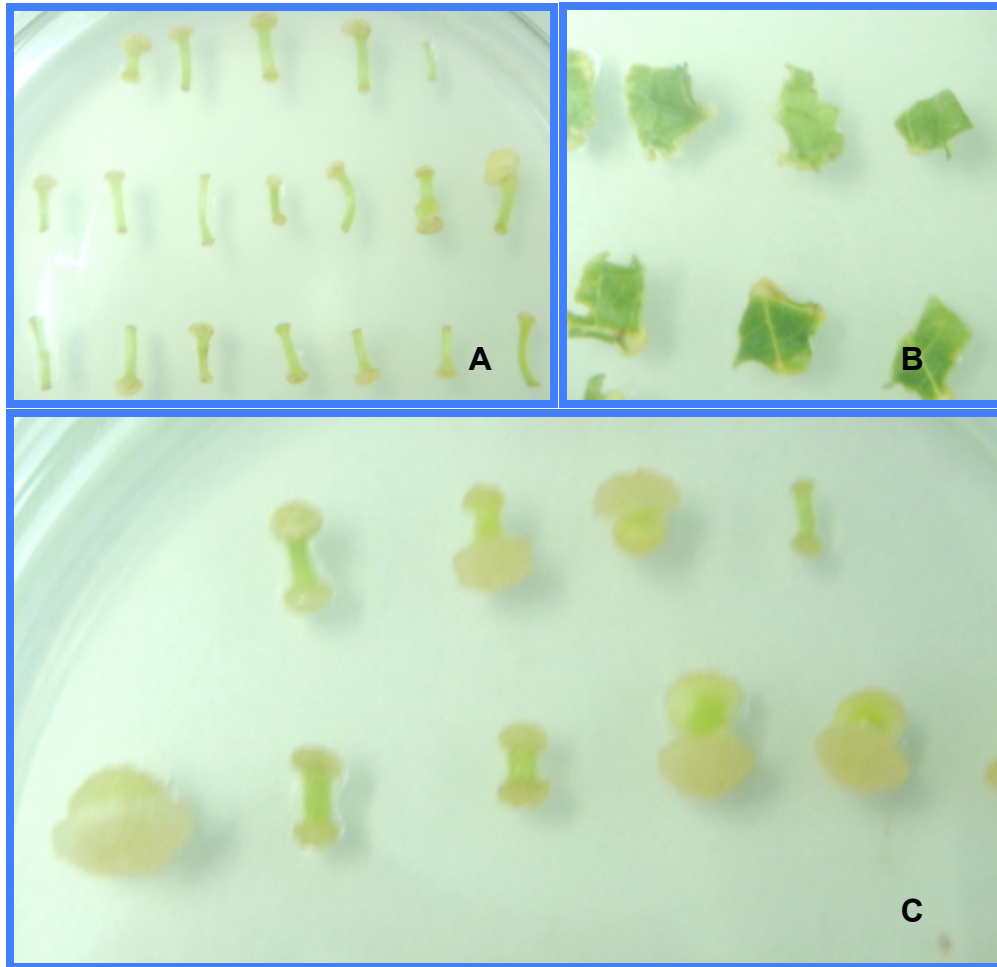


Figura 4. Formación de callo a 10 días de establecerse tejido de pecíolo (A), hoja (B) y tallo (C), en medio con  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ.

#### 4.3. Medios de selección, efecto de dosis en la sobrevivencia de tejidos

Con objeto de determinar el medio adecuado de selección, se llevó a cabo un ensayo con diferentes dosis de kanamicina, donde se pudo observar que solo el medio que contenía  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de kanamicina presentó una respuesta favorable, conceptualizada como la permanencia del tejido vivo ya que con todas las demás dosis después de 35 días todos los tejidos se necrosaron y

finalmente murieron (Cuadro 8). Esta respuesta no era la esperada ya que con base en los resultados obtenidos por Mohri *et al.*, (2003) se esperaba que la mejor dosis fuera aproximadamente de 50 mg L<sup>-1</sup>, pues en los experimentos de transformación realizados por estos autores reportaron tal concentración como la óptima para su medio de selección, para transformar *Paulownia fortunei*; sin embargo, en los resultados encontrados a partir de 20 mg L<sup>-1</sup> se presentaba necrosamiento y muerte del tejido, y con las dosis de 5 y 10 mg L<sup>-1</sup> se formaban brotes de manera tal que si fueran utilizados para selección se presentaría el problema de la generación de un gran número de escapos, que en definitiva es algo no deseado en un medio de selección. Por lo anterior se tomó como dosis óptima 15 mg L<sup>-1</sup> ya que ofrecía la posibilidad de que se generaran brotes en tejidos inoculados con *Agrobacterium* o sometidos a biobalística a la par se minimizaba el riesgo de la formación de escapos que hubiese conllevado a la pérdida de tiempo, esfuerzo y reactivos, dificultando la evaluación de los posibles brotes transformados.

Cuadro 8. Respuesta de tejidos de *P. elongata* (entrenados), después de 30 días a diferentes dosis de kanamicina agregados al medio de multiplicación.

Concentración de kanamicina (mg L <sup>-1</sup> )	Número de brotes en 25 explantes	Apariencia del tejido o brote
0	42	Tejido y brotes vigorosos
5	21	Disminución de crecimiento
10	15	Reducción significativa en el número de brotes
15	0	Tejido sin desarrollo aparente pero vivo
20	0	Tejido necrosado y muerto
30	0	Tejido necrosado y muerto
40	0	Tejido necrosado y muerto
50	0	Tejido necrosado y muerto
70	0	Tejido necrosado y muerto
100	0	Tejido necrosado y muerto
100	0	Tejido necrosado y muerto

#### 4.4. Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Posterior al cultivo de los tejidos transformados en medio de selección (MSSA) durante 30 días, se evaluó la formación de brotes en cada experimento. Cada brote formado conlleva a la posibilidad de tener un transformante. Un total de 26 ensayos fueron realizados lo que representó el manejo de 7984 explantes sometidos al proceso de transformación mediado por *Agrobacterium*. De todos ellos sólo se obtuvieron 37 brotes lo cual arroja una frecuencia promedio de transformación de 1.12, del total de ensayos con brotes (Cuadro 9); sin embargo, cada experimento que formó brotes tuvo su porcentaje particular.

Cuadro 9. Respuesta de los ensayos con segmentos de tallo de *P. elongata*, en medio de selección a los 30 días, posterior a la transformación mediada por *A. tumefaciens*.

No. de Ensayo	Condiciones	No. de Explantes	No. de Brotes	Porcentaje de transformación	Apariencia del tejido o brote
1	H1=2 H2=12 OD=0.8	325	--	--	Contaminado sobrecrecimiento de la bacteria
2	H1=2 H2=18 OD=0.6	300	--	--	Contaminado sobrecrecimiento de la bacteria
3	H1=1.5 H2=6 OD=0.9	295	--	--	Contaminado sobrecrecimiento de la bacteria
4	H1=1.5 H2=12 OD=0.7	320	--	--	Contaminado sobrecrecimiento de la bacteria
5	H1=2 H2=18 OD=0.9	318	--	--	Tejido necrosado
6	H1=2 H2=40 OD=1.1	275	4	1.45	Brotes vigorosos
7	H1=2 H2=40 OD=0.8	290	--	--	Tejido necrosado
8	H1=2.5 H2=40 OD=0.8	315	--	--	Tejido necrosado
9	H1=2 H2=48 OD=0.9	300	5	1.66	Brotes vigorosos
10	H1=2 H2=48 OD=0.9	345	1	0.28	Brotes vigorosos
11	H1=1.5 H2=40 OD=0.8	319	2	0.62	Brotes vigorosos
12	H1=2 H2=36 OD=0.7	312	--	--	Tejido necrosado
13	H1=2 H2=24 OD=0.8	320	--	--	Tejido necrosado
14	H1=2 H2=12 OD=0.8	356	--	--	Tejido necrosado
15	H1=3 H2=40 OD=0.8	325	--	--	Contaminado sobrecrecimiento de la bacteria
16	H1=2 H2=48 OD=0.9	298	8	2.68	Brotes vigorosos
17	H1=1.5 H2=48 OD=1.1	265	2	0.75	Brotes vigorosos
18	H1=2 H2=48 OD=0.8	312	1	0.32	Brotes vigorosos
19	H1=2 H2=48 OD=0.8	256	--	--	Tejido necrosado
20	H1=2 H2=24 OD=1.2	300	--	--	Contaminado sobrecrecimiento de la bacteria
21	H1=2 H2=40 OD=0.8	324	--	--	Tejido necrosado
22	H1=2 H2=48 OD=0.8	318	4	1.25	Brotes vigorosos
23	H1=2 H2=48 OD=0.9	302	5	1.65	Brotes vigorosos
24	H1=2 H2=48 OD=0.7	309	3	0.97	Brotes vigorosos
25	H1=1.5 H2=48 OD=0.8	289	2	0.60	Brotes vigorosos
26	H1=2 H2=48 OD=0.8	296	--	--	Tejido necrosado
<b>TOTAL</b>		<b>7984</b>	<b>37</b>		

H1 = Horas de co-incubación con la bacteria en medio líquido

H2 = Horas de co-cultivo en medio sólido

OD = Densidad óptica del cultivo bacteriano

-- Sin respuesta

Comparar estos resultados con trabajos similares en *P. elongata* resulta complicado en principio, porque en el caso de Mohri *et al.*, (2003), lograron tener tejido transformado en líneas de callo, de las cuales después de la inducción de los callos para formar brotes, de 500 probados sólo 6 brotes fueron recuperados y por otro lado, Bergmann, *et al.*, (1999), sólo reportan formación de callo y raíz, ya que transformaron con *Agrobacterium rhizogenes*.

Es importante resaltar que las mayores frecuencias de transformación de los experimentos independientes se obtuvieron con dos horas de incubación con la bacteria, más de 40 horas de co-cultivo y una densidad óptica de 0.8 a 1.1, ya que es muy probable que una densidad óptica mayor coincida con la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, dando lugar a una menor actividad de las cepas y por lo tanto a una baja eficiencia de transformación, al igual que si se trabaja con una densidad óptica baja de 0.5 o menos, es probable que la cepa este en la fase de crecimiento lag y el tiempo de co-cultivo, no sea suficiente para que la bacteria infecte debidamente los tejidos. Por estas razones los resultados obtenidos coinciden parcialmente con lo reportado por Mohri, *et al.*, (2003), quienes encontraron mejores respuestas después de 48 horas de co-cultivo; sin embargo, sus tiempos de incubación no excedieron de 30 minutos y su densidad óptica fue de 0.5, destacando que utilizaron segmentos foliares, de tallo, pecíolo y raíz, obteniendo la mejor respuesta con las condiciones antes mencionadas en pecíolos, mientras que la presente investigación se realizó con entrenudos, determinado por la respuesta de

---

organogénesis directa obtenida con este tipo de órgano. También se determinó esta vía como la más apropiada, al tener en cuenta que los trabajos previos de transformación con especies del género *Paulownia*, habían derivado en la obtención de callos y raíces, no de brotes o plantas completas, siendo este factor el más importante de los resultados esperados. Aun cuando se tuvo que utilizar un gran número de explantes iniciales, tanto en el total de los ensayos, como en cada uno en particular, en ningún caso se utilizaron menos de 250 segmentos de tallo. En principio se esperaba obtener un número mayor de brotes, partiendo de la ruta organogénica elegida; sin embargo, esto no sucedió, en parte por el hecho de que aún cuando la dosis de kanamicina no fue mayor de  $15 \text{ mg L}^{-1}$  y ésta era la más apropiada para evitar escapos, es probable que tuviera efectos indirectos en la disminución de la capacidad para formar brotes, incluso en los tejidos transformados.

#### **4.5. Transformación genética de entrenudos por biobalística**

Una vez cultivados los tejidos transformados en medio de selección (MSBio) durante 30 días, se evaluaron la formación de brotes en cada experimento. La formación de cada brote genera la posibilidad de tener un transformante. Un total de 20 ensayos fueron realizados lo que representó el manejo de 6474 explantes sometidos al proceso de transformación por aceleración de partículas, a través del (PIG). Se obtuvieron 19 brotes lo cual generó un porcentaje promedio de transformación de 1.19, del total de ensayos

con brote (Cuadro 10); sin embargo, cada experimento que formó brotes tuvo su porcentaje particular, equiparar estos resultados con trabajos similares en *P. elongata*, como especie presenta dificultad, ya que hasta el momento no se ha explorado la transformación genética a través de aceleración de partículas. No obstante, hay información en otras especies forestales de la familia de las coníferas, como en *Pinus roxburghii* donde se realizó el bombardeo directamente a embriones maduros, para la incorporación del gen *bar*, obteniendo plantas transformadas de epicótilos y brotes adventicios. Esto se acerca al sistema usado en el presente trabajo, debido a que después del bombardeo aún cuando se parte en un principio de tejido sexual, finalmente se recuperan los transformantes a partir de organogénesis; sin embargo, el camino comúnmente preferido para la transformación por aceleración de partículas en coníferas en un 70% es a través del embriogénesis somática (Tang y Newton, 2003). Lo anterior se debe principalmente al incremento de células bombardeadas cuando se realiza en un callo de tipo embriogénico y que además incrementa la posibilidad de transformación una vez que se forman los embriones somáticos, derivados de las células transformadas, también es sabido que esta vía organogénica está asociada con cambios genéticos por variación somaclonal lo que en este caso particular sería un riesgo alto, partiendo del hecho que el material original, en este estudio es un híbrido de alta plasticidad y rendimiento, no se desea alterar estas características, pues el objetivo teórico es únicamente integrar los genes de interés, sin alterar la condición original.



Cuadro 10. Respuesta de los ensayos con segmentos de tallo de *P. elongata*, en medio de selección a los 30 días, posterior a la transformación por biobalística (PIG).

No. de Experimento	Condiciones	No. de Explantes	No. de Brotes	Porcentaje de transformación	Apariencia del tejido o brote
1	PSI= 120/ A=7 PL 1	301	--	--	Tejido necrosado
2	PSI= 120/ A=7 PL 1	296	--	--	Tejido necrosado
3	PSI= 120/ A=7 PL 1	314	--	--	Tejido necrosado
4	PSI= 120/ A=7 PL 1	290	--	--	Tejido necrosado
5	PSI= 120/ A=7 PL 1	225	--	--	Tejido necrosado
6	PSI= 120/ A=7 PL 1	335	--	--	Tejido necrosado
7	PSI= 120/ A=6 PL 1	389	--	--	Tejido necrosado
8	PSI= 120/ A=6 PL 1	316	1	0.31	Brote vigoroso
9	PSI= 120/ A=6 PL 1	333	7	2.10	Brotes vigorosos
10	PSI= 120/ A=6 PL 1	295	8	2.71	Brotes vigorosos
11	PSI= 120/ A=6 PL 1	346	--	--	Tejido necrosado
12	PSI= 120/ A=6 PL 1	267	--	--	Tejido necrosado
13	PSI= 120/ A=6 PL 1	358	--	--	Tejido necrosado
14	PSI= 120/ A=6 PL 1	279	--	--	Tejido necrosado
15	PSI= 120/ A=6 PL 1	302	--	--	Tejido necrosado
16	PSI= 120/ A=6 PL 1	312	--	--	Tejido necrosado
17	PSI= 120/ A=6 PL 1	333	2	0.60	Brotes vigorosos
18	PSI= 120/ A=6 PL 1	405	--	-	Tejido necrosado
19	PSI= 120/ A=6 PL 1	388	--	--	Tejido necrosado
20	PSI= 120/ A=6 PL 1	390	1	0.25	Tejido necrosado
<b>TOTAL</b>		<b>6474</b>	<b>19</b>		

PSI: Presión de disparo

A 6: Altura de disparo

PL1: Plásmido 1 quitinasa, glucanasa

-- Sin respuesta

#### 4.6. Transformación genética en callos por biobalística

Posterior al proceso de transformación (disparar las partículas con el plásmido a través del PIG), los callos transferidos a medio de recuperación sin antibióticos por siete días, fueron subcultivados en medio de selección (CALLO-SEL) durante 30 días y se evaluó la formación de brotes en cada experimento. El número total de ensayos realizados, fue de 10 y con un promedio de 24 callos por cada uno (Cuadro 11); pero con el porcentaje de transformación más alto del orden de 21.21, lo que está relacionado al hecho de que, aún cuando se trataba de un número reducido de callos, cada callo poseía en promedio 1.5 cm de diámetro, presentado mayor superficie de impacto, para las partículas de tungsteno, que a su vez representaban un mayor número de posibles células transformadas, aún cuando se siguió la vía de organogénesis indirecta. Es importante resaltar que en el caso de transformación por aceleración de partículas en especies forestales como las coníferas, la embriogénesis somática es en un 70 % la vía preferida (Tang y Newton, 2003). No obstante este camino presenta la desventaja de llegar a producir cambios a nivel genético por variación somaclonal. Por ejemplo, Marcotrigliano y Jagannathan (1988), reportaron la generación de una variante somaclonal derivada de embriones somáticos obtenidos del subcultivo de callos formados a partir de hipocótilos de *Paulownia tomentosa*. Es por este tipo de ejemplos que se decidió trabajar con la vía de organogénesis indirecta, ya que en teoría se partió de una línea mejorada de *P. elongata*, por lo

que se requería integrar los genes de interés, evitando producir otros cambios que pudieran alterar de manera radical el material original.

El empleo de callos y transformación genética en *P. elongata* se ha reportado con sistemas mediados por *Agrobacterium* (Mohri *et al.*, 2003), logrando obtener tejido transformado y derivando en líneas de callo. Por otro lado Bergmann *et al.*, (1999), reportan formación de callo y raíz, después de transformar con *Agrobacterium rhizogenes*; sin embargo, pese a estos avances no se han reportado a la fecha transformación completa y estable en *P. elongata* mediante sistemas de aceleración de partículas, pues sólo existen reportes de ensayos preliminares con expresión transitoria como lo realizado por Morí y Shinohara (1996), quienes utilizaron un sistema de transformación por aceleración de partículas para insertar el gen luciferasa en *P. fortunei*; sin embargo, no reportan expresión estable ni desarrollo de plantas completas.

Con base a los resultados positivos obtenidos, lo anterior es una alternativa viable, que debe probarse de una manera más extensiva, tanto por la vía de organogénesis indirecta como por embriogénesis somática, ya que existen protocolos descritos para esta vía en *P. elongata*.

Cuadro 11. Respuesta de los ensayos con callo de *P. elongata*, en medio de selección a los 30 días, posterior a la transformación por biobalística (PIG), con las condiciones de disparo (PSI=120, A=7, PL1).

No. de ensayo	No. de Callos	No. de Brotes	Porcentaje de transformación	Apariencia del tejido o brote
1	27	0	--	Callo sin respuesta ni desarrollo
2	30	0	--	Callo sin respuesta ni desarrollo
3	29	9	31.03	Vigoroso de coloración verde
4	32	0	--	Callo sin respuesta ni desarrollo
5	28	0	--	Callo sin respuesta ni desarrollo
6	25	7	28.00	Vigoroso de coloración verde
7	31	2	6.45	Vigoroso de coloración verde
8	25	0	--	Callo sin respuesta ni desarrollo
9	29	0	--	Callo sin respuesta ni desarrollo
10	31	6	19.35	Vigoroso de coloración verde
<b>TOTAL</b>	<b>287</b>	<b>24</b>		

PSI = Presión de disparo

A7:=Altura de disparo

PL1= Plásmido con genes de interés contenidos el mismo

-- Sin respuesta

#### 4.7. Evaluación histoquímica de brotes obtenidos en medio de selección después de transformación genética por métodos indirectos y directos

Todos los brotes generados en medio de selección se subcultivaron en medio fresco tomando muestras de tejido; la incubación de las muestras en sustrato X-GLUC, permitió evaluar la expresión del gen GUS, observándose una coloración azul en los tejidos con respuesta positiva a la expresión de éste gen (Figura 5). Esta prueba es el primer filtro para poder identificar tejidos transformados de manera parcial o total. Una vez que se ha logrado integrar el gen reportero GUS, se podrá realizar la evaluación histoquímica correspondiente.

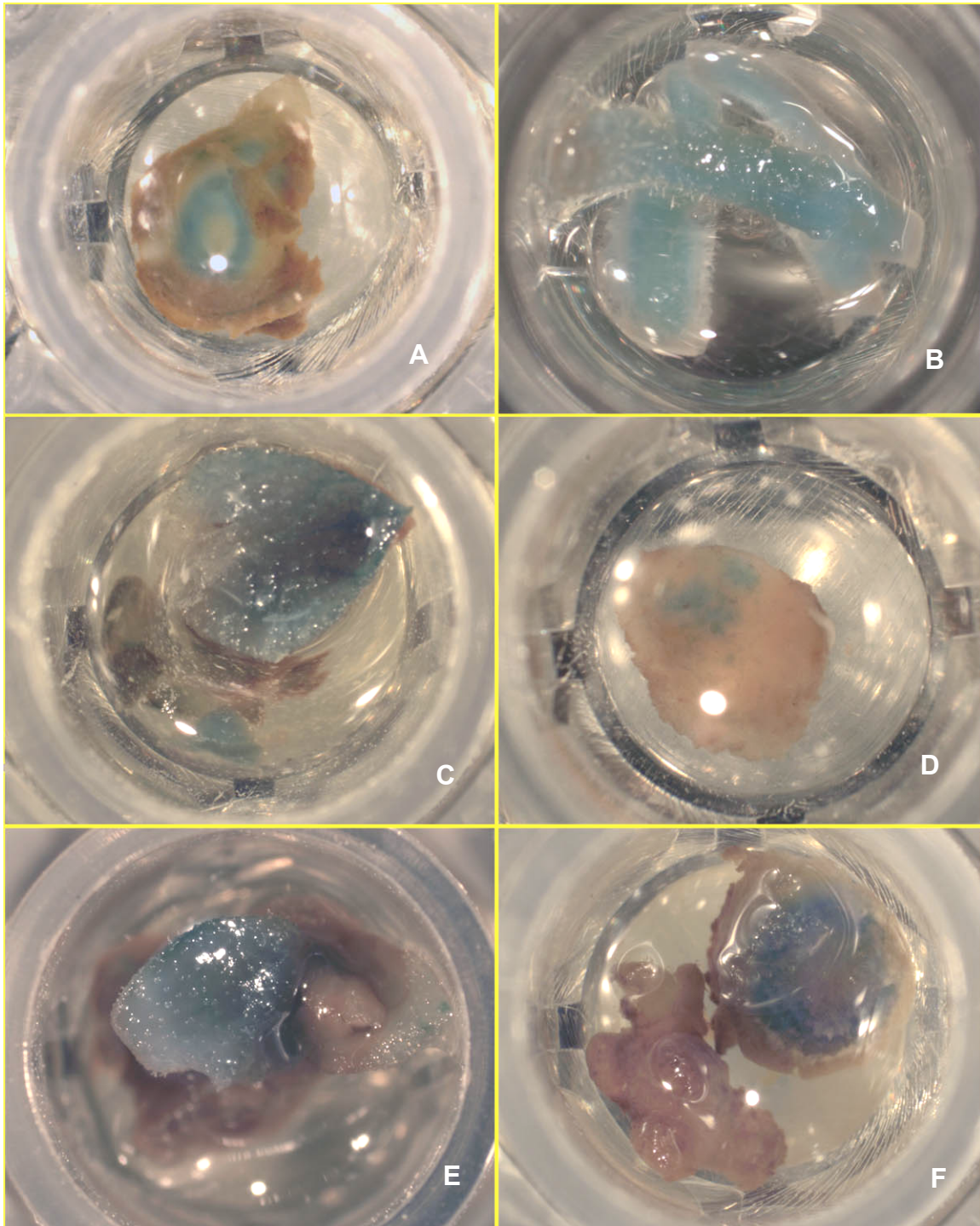


Figura 5. Expresión del gen GUS en sustrato X-GLUC de tejidos transformados (A, E y F) respuesta parcial de materiales transformados por *Agrobacterium*, C) respuesta total de materiales transformados por *Agrobacterium*, B) respuesta total de tallo transformado por biobalística y D) respuesta total de callo transformado por biobalística.

Cabe señalar como desventaja, el hecho de que ésta sea una prueba destructiva. Al término de la evaluación se pudo observar que de 67 brotes obtenidos y mantenidos en medio de selección sólo 35 dieron positivo para GUS y de éstos, 6 con expresión total y 29 parcial, el hecho de tener brotes con tejido parcialmente transformado (Cuadro 12), nos indica la presencia mayoritaria de quimeras, que si bien no son individuos completamente transformados, es factible identificar los tejidos transformados y generar individuos completos a partir de ellos. Para el caso de *P. fortunei* se reportaron callos con expresión total (Mohri *et al.*, 2003), mientras que todos los callos obtenidos en esta investigación tuvieron expresión parcial. Se debe aclarar que en el caso de *P. fortunei* fue transformada con *Agrobacterium* y en este caso con *P. elongata* se realizó la transformación a través de aceleración de partículas. Los callos mantenidos en medio de selección en su mayoría dieron positivos al menos de manera parcial. En este sentido, y como ejemplo, en *Pinus roxburghii* se transformaron embriones maduros mediante aceleración de partículas, obteniendo en general transformantes parciales, de los cuales se identificaron y se generaron individuos completos a partir de estos tejidos transformados, por medio de la inducción de brotes adventicios (Parasharami *et al.*, 2006). Por esta razón, tanto los brotes como los callos se mantiene en medio de selección para posteriormente identificar los tejidos transformados y generar individuos completos. Con el análisis histoquímico de X-GLUC fue posible identificar de manera preliminar los individuos posiblemente transformados.

Cuadro 12. Respuesta de los ensayos con muestras de tallo y callo de *P. elongata*, en sustrato X-GLUC, para detección histoquímica de la expresión GUS en material transformado.

No. de Ensayos	Condiciones	No. de Brotes	Positivos en X-GLUC	Expresión total o parcial
6 A	H1=2 H2=40 OD=1.1	4	2	parcial
9 A	H1=2 H2=48 OD=0.9	3	1	parcial
10 A	H1=2 H2=48 OD=0.9	1	--	----
11 A	H1=1.5 H2=40 OD=0.8	2	2	parcial
16 A	H1=2 H2=48 OD=0.9	6	3	total
17 A	H1=1.5 H2=48 OD=1.1	7	2	parcial
18 A	H1=2 H2=48 OD=0.8	1	1	parcial
22 A	H1=2 H2=48 OD=0.8	2	--	----
23 A	H1=2 H2=48 OD=0.9	5	4	parcial
24 A	H1=2 H2=48 OD=0.7	3	--	----
25 A	H1=1.5 H2=48 OD=0.8	2	2	parcial
<b>Subtal con A. tumefaciens</b>		<b>36</b>	<b>17</b>	
8 Bio	PSI= 120/ A=6 /PL 1	1	--	----
9 Bio	PSI= 120/ A=6 /PL 1	5	3	total
10 Bio	PSI= 120/ A=6 /PL 1	4	4	parcial
17 Bio	PSI= 120/ A=6 /PL 1	2	1	parcial
20 Bio	PSI= 120/ A=6 /PL 1	1	1	parcial
3 Biocall	PSI= 120/ A=7 /PL 1	5	1	parcial
6 Biocall	PSI= 120/ A=7 /PL 1	7	6	parcial
7 Biocall	PSI= 120/ A=7 /PL 1	2	2	parciales
10 Biocall	PSI= 120/ A=7 /PL 1	4	--	----
<b>Subtotal con Biobalística</b>		<b>31</b>	<b>18</b>	
<b>TOTAL</b>		<b>67</b>	<b>35</b>	

A) Transformado con *Agrobacterium*

Bio) Transformado por Biobalística

Biocall) Callo transformado por Biobalística

H1 = Horas de co-incubación con la bacteria en medio líquido

H2 = Horas de co-cultivo en medio sólido

OD = Densidad óptica del cultivo bacteriano

PSI = Presión de disparo

A7:=Altura de disparo

PL1= Plásmido con genes de interés contenidos el plásmido

-- Sin respuesta

#### **4.8. Prueba PCR de brotes obtenidos en medio de selección después de transformación genética por métodos indirectos y directos**

El análisis molecular por PCR de las muestras permitió evaluar la incorporación de los genes de interés, en los transformantes, observándose presencia de bandas en los brotes con respuesta positiva o ausencia de bandas en los brotes no transformados (Figura 6). Es importante resaltar que en esta prueba se analizaron todos los brotes obtenidos aun cuando no fueran positivos para la prueba de GUS con sustrato X-GLUC. Este análisis de PCR como segundo filtro permitió evaluar brotes y callos para conocer la integración del gen de interés, quitinasa glucanasa del material obtenido y mantenido en medio de selección, en este caso particular no se realizó un análisis de PCR para los genes *vir* a las plántulas transformadas por *Agrobacterium*, debido a que los subcultivos de éstas se realizaron en un medio de cultivo que sólo contenía kanamicina y nunca se observó crecimiento de la bacteria en el medio, ni en los tejidos, reforzando la teoría de que el primer medio de selección que contenía cefatoxima logró eliminar los remanentes de la bacteria en los tejidos transformados.

Se destaca el hecho que de 67 elementos evaluados 24 mostraron respuesta positiva, el 35 % del total (Cuadro 13), Se pudieron observar situaciones interesantes como brotes que habían tenido respuesta positiva parcial para GUS y negativa para PCR o por el contrario materiales que fueron negativos para GUS y positivos para PCR. Una de las principales causas es el hecho que se



obtuvieran en su mayoría materiales parcialmente transformados (quimeras), tanto por *Agrobacterium* como por biobalística, lo cual propicia que se tomen partes de tejido para las pruebas en las que puede contener o no las porciones transformadas y esto produce tales respuestas en el momento del análisis.

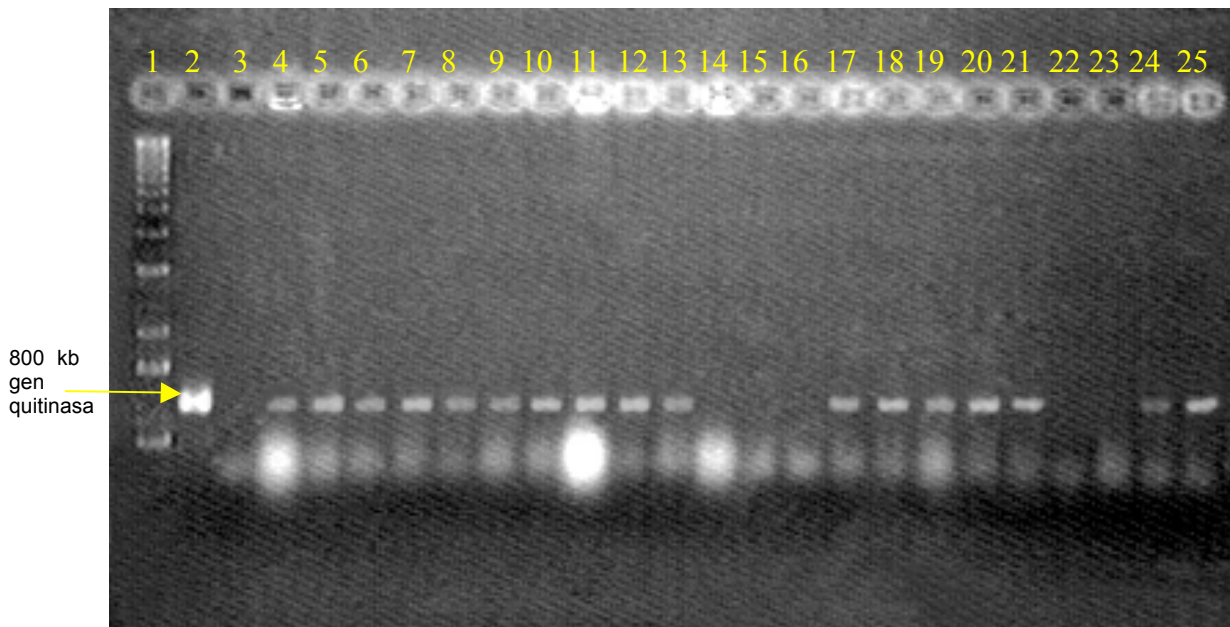


Figura 6. Gel de agarosa al 1.5 % mostrando los resultados de la prueba de PCR para la integración del gen quitinasa en materiales transformados de *P. elongata*, por sistemas directos e indirectos de transformación. Carril 1, escalera 1 Kb, carril 2, control positivo para el gen quitinasa, carril 3, control negativo. Del carril 4 al 25 muestras de ADN de tejidos obtenidos en medios de selección.

Cuadro 13. Respuesta de los ensayos PCR con muestras de tallo y callo de *P. elongata*, para determinar la integración del gen quitinasa en material transformado.

No. de Experimento	Tipo de transformación	No. de Brotes	Positivos por PCR para el gen quitinasa
6	<i>Agrobacterium</i>	4	2
9	<i>Agrobacterium</i>	3	--
10	<i>Agrobacterium</i>	1	--
11	<i>Agrobacterium</i>	2	2
16	<i>Agrobacterium</i>	6	3
17	<i>Agrobacterium</i>	7	2
18	<i>Agrobacterium</i>	1	1
22	<i>Agrobacterium</i>	2	--
23	<i>Agrobacterium</i>	5	2
24	<i>Agrobacterium</i>	3	--
25	<i>Agrobacterium</i>	2	2
<b>Subtotal por <i>Agrobacterium</i></b>		<b>36</b>	<b>14</b>
8	Biobalística	1	--
9	Biobalística	5	3
10	Biobalística	4	2
17	Biobalística	2	1
20	Biobalística	1	1
3	Biobalística-callo	5	1
6	Biobalística-callo	7	2
7	Biobalística-callo	2	--
10	Biobalística-callo	4	--
<b>Subtotal por Biobalística</b>		<b>31</b>	<b>10</b>
<b>TOTALES</b>		<b>67</b>	<b>24</b>

-- Sin respuesta

Por medio de las pruebas de PCR se pueden evaluar las diferentes porciones de los brotes y/o callos para poder identificar los tejidos que poseen los genes y generar a partir de ellos individuos completos y estables, de manera similar a lo realizado por Parasharami *et al.* (2006), quienes seleccionaron tejidos completos de quimeras al aplicar el herbicida, recuperando individuos con expresión completa a partir de la generación de brotes adventicios de estos tejidos en *Pinus roxburghii*. El tener quimeras, aunque no es lo más deseable, proporciona la posibilidad de finalmente obtener individuos transformados completos.

---

## V CONCLUSIONES

Es posible obtener organogénesis directa a partir de segmentos internodales, de segmentos foliares y de pecíolos con un balance de reguladores de crecimiento y concentraciones de 4 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0.2 mg L<sup>-1</sup> de ANA, para los entrenudos y 5 mg L<sup>-1</sup> de BA y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de ANA, para hojas y pecíolos.

Los explantes iniciales con mejor respuesta organogénica y mejores candidatos para ser usados en sistemas de transformación genética son los segmentos internodales, mostrando la mejor respuesta tanto en explantes con brote, como brotes por explante.

La concentración más adecuada para la selección de brotes con kanamicina se logra con 15 mg L<sup>-1</sup>, reduciendo el número de escapos y permitiendo rescatar brotes putativos.

Es posible transformar genéticamente *Paulownia elongata* por el método directo de aceleración de partículas y por indirecto, mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para incorporar genes de interés.

Las condiciones más favorables para transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, son incubación no menor de dos horas, cocultivo no menor de 48 horas y densidad óptica entre 0.8 y 0.9.

Las condiciones más favorables para transformación genética por aceleración de partículas mediante el sistema PIG, son: presión de disparo de 120 PSI, presión de vacío de 22 milímetros de mercurio y una altura de disparo del nivel 6 para tallo y nivel 7 para callo.

En ambos sistemas es posible obtener transformantes tanto completos como parciales (quimeras) por la vía de organogénesis directa o indirecta, para el caso de callos transformados.

---

---

## VI LITERATURA CITADA

- Bergmann, B.A., and H.K. Moon. 1997. *In vitro* adventitious shoot production in *Paulownia*. Plant Cell Reports 16:315-318.
- Bergmann, B.A., X. Lin., and R. Whetten. 1999. Susceptibility of *Paulownia elongata* to *Agrobacterium* and production of transgenic calli and hairy roots by *in vitro* inoculation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 55:45-51.
- Bohorova, N., S. Fenelli, S. McLean, A. Pellegrineschi and D. Hoisington. 1999. Laboratory Protocols. CIMMYT Applied Genetic Engineering Laboratory. CIMMYT México, D.F.
- Chen, S., A. Liu and Z. Zou. 2006. Transgenic tomatoe plants expressing glucannase and defensin genes and their resistance to *Botrytis cinerea*. Acta Phytophylacica Sinica 33 (4): 357-362.
- Eriksson, M.E., M. Israelsson, O. Olsson and T. Moritz. 2000. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. Nature Biotechnology 18: 784-788.
- Gadgil, P. D., M. A. Dick and K. Dobbie. 2003. Fungi Silvicolae Novazelandiae. New Zeland Journal of Forestry Sciencie 33 (2): 265-272.
- Gentile, A., Z. Deng, S. Malfa, G. Distefano, F. Domina, A. Vitale, G. Polizzi, M. Lorito and E. Tribulato. 2007. Enhanced resistance to *Phoma tracheiphila* and *Botrytis cinerea* in transgenic lemon plants expressing a *Trichoderma harzianum* chitinase gene. Plant Breeding 126 (2): 146-151.
- Horsch, R. B., J. E. Fry, N.L. Hoffman, D. Eichholtz, S.G. Rogers and R.T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. Science 227: 1229-1231.
- Hu, S.Y. 1959. A monograph of the genus *Paulownia*. Taiwan Museum XII, (1-2).
- Hu, W., S. A. Harding, J. Lung, J. L. Ralph, D. D. Stokke, T. ChunJui and V. L. Chiang. 1999. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose acumulation and growth in transgenic trees. Nature Biotechnology. 17 (8):808-812.
- Hu, J. J., Y. C. Tian, Y. F. Han, L. Li and B. E. Zhang. 2001. Field evaluation of insect resistant transgenic *Populus nigra* trees. Euphytica 121 (2): 123-127.

- 
- Ipecki, Z., and N. Gozukirmizi. 2003. Direct somatic, embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. *Plant Cell Reports* 22:16-24.
- Ipecki, Z., and N. Gozukirmizi. 2004. Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and internodal explants of *Paulownia elongata*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 79:341-345.
- Israelsson, M., M.E. Eriksson, M. Hertzberg, H. Aspeborg, P. Nilsson and T. Moritz. 2003. Changes in gene expression in the wood-forming tissue of transgenic hybrid aspen with increased secondary growth. *Plant Molecular Biology* 52 (4): 893-903.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh and M.W. Bevan. 1987. GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6 (13):3901-3907.
- Joshi, I., P. Bisht., V. K. Sharma, and D.P. Uniyal. 2003. *In vitro* propagation of mature F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* SM. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). *Silvae Genetica* 52:3-4, 110-113.
- Li, A., X. Xu, Z. Dai, Z. Chen, B. Li, H. Zhang and X. Pan. 2004. Resistance evaluation to sheath blight in transgenic rice lines. *Rice Science* 11 (1): 95-100.
- Li, X. S., J. H. Liu, J. B. Li, G. Q. Yang, G. F. Jin and H. M. Wei. 1989. Preliminary studies on *Paulownia* cranks. *Forest Pest and Disease* 3: 35-36.
- Low, R., A. Prakash, C. Swarup, J. Goh and P. Kumar. 2001. A differentially expressed bZIP gene is associated with adventitious shoot regeneration in leaf cultures of *Paulownia kawakamii*. *Plant Cell Reports* 20(8):696-700.
- Mao, B., D. Li, Q. Li and Z. He. 2003. Transgenic rice with double defense genes exhibiting resistance to sheath blight *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*.29(4):322-326.
- Malabadi, R.B., and J.V. Staden. 2005. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula*. *Tree Physiology* 25(1):11-16
- Marcotrigiano, M., and L. Jaganatan.1988. *Paulownia tomentosa* Steud. Somaclonal Snowstorm. *Hort Sciencie* 23:226-227.
- Mehrotra, M. D. 1994. Basal and root rot of *Paulownia fortunei* caused by *Rhizoctonia*. *Indian Forester* 120 (6): 544-549.

- 
- Mehrotra, M. D. 1997. Diseases of *Paulownia* and their management. Indian Forester 123 (1): 66-72.
- Mohri, T., and K. Shinohara. 1996. A biolistic approach for the transfer and expression of a luciferase gene in Paulownia (*Paulownia fortunei*) Journal of Forest Research 1(1): 65-66.
- Mohri, T., T. Igasaki and K. Shinohara. 2003. *Agrobacterium*-mediated transformation of paulownia (*Paulownia fortunei*) Plant Biotechnology 20(1): 87-91.
- Moncaleán, P., P. Alonso, M.L. Centeno, M. Cortizo, A. Rodríguez, B. Fernández and R. J. Ordás. 2005. Organogenic responses of *Pinus pinea* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. Tree Physiology. 25(1): 1-9.
- Murashige, I. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473- 497
- Nakamura, H., N. Yoshikawa, T. Takahashi, N. Sahashi, T. Kubono and T. Shoji. Evaluation of primer pairs for the reliable diagnosis of *Paulownia* witches'-broom disease using a polymerase chain reaction. Plant Disease 80 (3): 302-305.
- Niella, F. y P. Rocha. 2003. Factores que afectan la formación de brotes adventicios a partir de embriones maduros de *Pinus taeda* L. via organogénesis. Novenas Jornadas Técnicas Forestales. INTA-FCF-MEYRNYT El Dorado, Misiones, Argentina. pp. 41-45.
- Niskanen, A-M. J. Lu, S. Seitz, K. Keinoent, K. Von Weissenberg and A. Pappinen. 2004. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*). Tree Physiology. 24 (11): 1259-1265.
- Parasharami, V.A., V.B. Naik, S. Von Arnold, R.S. Nadgouda and D.H. Clapham. 2006. Stable transformation of mature zygotic embryos and regeneration of transgenic plants of chir pine (*Pinus roxburghii*). Plant Cell Reports 24: 708-714.
- Pasonen, H. L., S. K. Seppänen, Y. Degefu, A. Rytönen, K. V. Weisseberg and A. Pappinen. 2004. Field performance of chitinase transgenic silver birches (*Betula pendula*): resistance to fungal diseases. Theoretical and Applied Genetics 109 (3): 562-570.



- 
- Rao P. S. and V. A. Bapat. 1993. Micropropagation of sandalwood (*Santalum album* L.) and mulberry (*Morus indica* L.). In: M. R. Ahuja (ed.). Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp. 317-345.
- Ray, J. D., T. Burguess, N. Malajczuk and G. E. Hardy. 2005. First report of *Alternaria blight* in *Paulownia* sp. Australasian Plant Pathology 34 (1): 107-109.
- Rout, G.R., G.M. Reddy and P. Das. 2001. Studies on *in vitro* clonal propagation of *Paulownia tomentosa* Steud and evaluation of genetic fidelity through RAPD marker. Silvae Genetica 50: 208-212.
- Rugh, C., H. Wilde, N. Stack, D. Thompson and R. Meagher. 1996. Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93: 3182-3187.
- Scocchi, A. and L. Mroginski. 2004. *In vitro* conservation of apical meristem-tip of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) under slow-growth conditions. Phytomorphology 137-143.
- Sederoff, R. 1999. Building better trees with antisense. Nature Biotechnology 17: 750-751.
- Sharma, S. K. and R. C. Dhiman. 1998. *In vitro* clonal propagation of F<sub>1</sub> hybrid of *Paulownia* (*P. fortunei* x *P. tomentosa*). Phytomorphology 48(2):167-172.
- Sharma, S.K., S. Charan and R.C. Dhiman. 2003. Regeneration and multiplication of *Paulownia fortunei* (CO20 clone) through shoot tip culture. Indian Journal of Soil Conservation.31: 276-280.
- Shi, D., Y. Shi., T. Wang and D. Li. 2003. Shoot organogenesis and plantlet regeneration from callus culture of *Eucalyptus grandis* hypocotyls. Journal of Sichuan Agricultural University 20(3):232-234.
- Song, S. L., T. Sato, K. Ishii, A. Saito and K. Ohba. 1990. *In vitro* mass propagation by meristem culture of two mature trees of *Paulownia catalpifolia*. Journal of the Japanese Forestry Society 72(6):495-498.
- Song, S.L., K. Suda, K. Ishii, A. Saito and K. Ohba. 1991. Plantlet regeneration from leaf and petiole explants of *in vitro* cultured *Paulownia catalpifolia*. Journal of the Japanese Forestry Society 73(1): 60-63.

- Strauss, S. H., W. H. Rottmann, A. M. Brunner and L. A. Sheppard. 1995. Genetic engineering of reproductive sterility in forest trees. *Molecular Breeding* 1: 5-26.
- Strohm, M., M. Eiblmeier, C. Langebartels, L. Jouanin, A. Polle, H. Sandermann, and H. Rennenberg. 1999. Responses of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase or glutathione reductase to acute ozone stress: visible injury and leaf gas exchange. *Journal of Experimental Botany* 50(332): 363-372.
- Sreeramanan, S. M., Mezhiah, M. N. Rosli, M. Seriah and R. Xavier. 2006. Enhanced tolerance against a fungal pathogen *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sp.* and *Fusarium cubense* (race 1) in transgenic silk banana. *International Journal of Agricultural Research* 1 (4): 342-354.
- Sun, L. J. 1986. Identification of two viruses isolated from *Paulownia tomentosa*. *Scientia Silvae Sinicae* 22 (2): 142-146.
- Sul, I.W., and S.S. Korban. 2004, effects of salt formulations, carbon sources, cytokinins, and auxin on shoot organogenesis from cotyledons of *Pinus pinea* L. *Plant Growth Regulation* 43 (3): 197-205.
- Tang, W., and R. J. Newton. 2003. Genetic transformation of conifers and its application in forest biotechnology. *Plant Cell Reports* 22: 1-15.
- Tang, W., and R. J. Newton. 2005. Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Reports* 24 (1): 1-9
- Tao D., W. Yao., Q Hu., S. Liu and W. Huang. 2005. Transgenic *Paulownia* expressing *shiva-1* gene has increased resistance to witches broom disease. *Journal of Integrative Plant Biology* 47(12):1500-1506.
- Tzfira, T., A. Zuker and A. Altman. 1998. Forest tree biotechnology: genetic transformation and its application to future forests. *Trends in Biotechnology* 16(10): 439-446.
- Vain, P., N. Keen, J. Murillo, C. Rathus, C. Nemes and J. Finer. 1993. Development of the particle inflow gun. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33:237-246.
- Wang Q. L., L. Ling, H. Yifan, H. Suying and D. Ewald. 2001. Study on induction of embryogenic callus of *Larix principis-rupprechtii* by 311-A regression design. *Forest Research, Beijing*. 14 (3):251-257.

- Wang, Q and J. F. Shogren.1992. Characteristics of the *crop-Paulownia* system in China. *Agriculture Ecosystems and Environment* 39: 145-152.
- Watanabe, T., R. N. B. Shinoda and M. E. Ramírez.1987. Fungi isolated from declining *Paulownia* trees in Paraguay and Argentina. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 28 (4): 453-468.
- Widiyanto, S. N., D. Erytrina and H. Rahmania. 2005. Adventitious shoot formation on teak (*Tectona grandis* L.f.) callus cultures derived from internodal segments. *Acta Horticulturae* 692: 153-157.
- Yaicili, O. and S. Alikamanoglu. 2005. The effect of magnetic field on *Paulownia* tissue culture. *Plant Tissue and Organ Culture* 83(1):109-114.
- Zhu, Z. H. 1981. Exploration on the distribution centre and flora structure of the genus *Paulownia* plant. *Forestry Science in China* 3:271-280.
- Zhu, Z. H., C.J. Chao., X.Y. Lu and Y.G. Xiong. 1986. *Paulownia* in China: cultivation and utilization. Asian Network of Biological Sciences, Singapore and International Developmental Research Centre, Canada pp.1-65.
- Zou, W., Q. Zhao, D. Cui and B. Wang. 2006. Transformation of *Populus deltoides* with anti-*PLD947* gene and chitinase gene. *Scientia Silvae Sinicae* 42(1): 37-42.

## ANEXO

Cuadro 1. Mezcla de reacción para un volumen de 50 microlitos.

Reactivo	Concentración y cantidades
Buffer de PCR	(10X) 5 $\mu$ L
Mg <sub>2</sub> Cl	50 mM 1.5 $\mu$ L
Mezcla dNTP's	10 mM c/u 1 $\mu$ L
Mezcla oligos F y R TACH	(10X) 2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O dest. estéril	38 $\mu$ L
DNA	(0.1 $\mu$ g / $\mu$ L) 2 $\mu$ L
Taq Pol	0.5 $\mu$ L

Cuadro 2. Programa de PCR para amplificación del gen quitinasa.

Ciclos	Temperaturas y tiempos
1	94°C 5 min.
30	94°C 30 seg. 55°C 30 seg. 72°C 45 seg
1	72°C 10 min
	4°C