



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**“OBTENCIÓN DE UN SISTEMA DE REGENERACIÓN *IN VITRO* DE
CEDRO ROJO (*Cedrela odorata* L.), MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS
SOMÁTICA”**

JOSÉ LUIS JERÓNIMO PÉREZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO

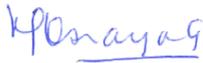
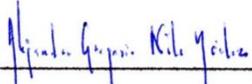
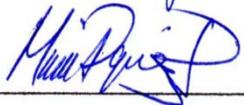
2014

La presente tesis, titulada: **Obtención de un sistema de regeneración *in vitro* de Cedro rojo (*Cedrela odorata* L.), mediante embriogénesis somática**, realizado por el alumno: **José Luis Jerónimo Pérez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

Consejero	 _____ Dr. Juan Manuel Zaldívar Cruz
Directora de Tesis	 _____ Dra. Elizabeta Hernández Domínguez
Asesor	 _____ Dra. María Mónica Osnaya González
Asesor	 _____ Dr. Alejandro Gregorio Nila Méndez
Asesor	 _____ Dr. Julián Pérez Flores
Asesor	 _____ Dra. Marivel Domínguez Domínguez

CARDENAS, TABASCO. A 29 DE AGOSTO DEL 2014

“OBTENCIÓN DE UN SISTEMA DE REGENERACIÓN *IN VITRO* DE CEDRO ROJO (*Cedrela odorata* L.), MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA”

José Luis Jerónimo Pérez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014

Este trabajo consistió en establecer un sistema de regeneración *in vitro* en *Cedrela odorata* mediante Embriogénesis Somática (ES), se evaluaron diversos factores: tipo de explante (hipocótilo y cotiledones), tipo de medio de cultivo (MS y WPM), efecto y concentración (0.5 mgL^{-1} – 3 mgL^{-1}) de Regulador de Crecimiento Vegetal RCV (dicamba y 2,4-D), mediante el diseño de dos barridos hormonales experimentales. Los resultados del primer experimento, muestran que se logró la formación de callos en un 100 % con el tratamiento MS adicionado con 0.5 MgL^{-1} de dicamba mismo que además indujo los primeros embriones somáticos en cedro rojo, después de ~26 semanas de cultivo *in vitro*. El segundo experimento se tuvo como resultado la inducción de callos embriogénicos en ambas formulaciones de medios, después de ~17 semanas, identificando posteriormente los diversos estados de la ES (preglobular, globular, corazón, torpedo y cotiledonar). Siendo, por lo tanto una las técnicas más apropiadas que puedan solventar la necesidad de una producción clonal, hasta propagar especies forestales elite. Por otro lado, una de las ventajas de contar con este sistema eficiente de producción es utilizarla en un futuro para la ingeniería genética en esta especie forestal tropical de gran interés para industrial forestal internacional. Esto, se ha utilizado en otras especies forestales de clima templado, como eucalipto y álamo, donde se han generado variedades con ciertas ventajas agronómicas, como resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia el estrés, sequia, en la composición de lignina, celulosa para producción de papel. La transformación genética puede integrar el gen extraño mediante dos mecanismos: vía indirecta o directamente, ya sea a través de *Agrobacterium tumefaciens* por Biobalística. Cabe mencionar que con esto se cubrió un prerrequisito, como es contar con el sistema de regeneración *in vitro* (ES) de cedro rojo.

Palabras clave: Embriogénesis Somática (ES), cotiledones, hipocótilos, embrión cigótico, Cedro rojo

Obtaining a system *in vitro* regeneration of red cedar (*Cedrela odorata* L.), through somatic embryogenesis

José Luis Jerónimo Pérez, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2014

This work was to establish a system of *in vitro* regeneration in *Cedrela odorata* by Somatic Embryogenesis (ES), several factors were evaluated: type of explant (hypocotyl and cotyledons), type of culture medium (MS and WPM) effect and concentration (0.5 mgL⁻¹-3 mgL⁻¹) Plant Growth Regulator RCV (dicamba and 2,4-D), by means design 2 hormonal swept pilot (a) and (b). The results of the first experiment show that callus formation was achieved in 100% treatment with the MS supplemented with 0.5 mgL⁻¹ also induced dicamba same as the first somatic embryos red cedar ~26 weeks after *in vitro* culture. The second experiment resulted in the induction of embryogenic callus in both media formulations after ~17 weeks later identifying the various states of the ES (preglobular, globular, heart, torpedo and cotyledonary). Being thus one of the most suitable techniques that can address the need for a clonal production to propagate elite forest species tropical. On the other hand, one of the advantages of having this efficient production system for future use of genetic engineering in this tropical forest species of great interest to international forest industry. This has been used in other temperate forest species such as eucalyptus and poplar that have created varieties with certain agronomic benefits such as pest and disease resistance, stress tolerance, drought in the composition of lignin, cellulose production paper. Genetic transformation may integrate the foreign gene by two mechanisms: direct or indirect way, either through *Agrobacterium tumefaciens* by biolistics. It is worth mentioning that this prerequisite is covered, as is having the *in vitro* regeneration system (ES) red cedar.

Key words. Somatic Embryogenesis (SE), cotyledon, hypocotyls, zygotic embryos, Red Cedar

DEDICATORIA

A DIOS PADRE YAVHÉ

Te dedico mi tesis, para honra y gloria tuya, porque en los momentos difíciles no me abandonaste, me diste pruebas para saber cuánto te amo, amén.

A MI ESPOSA†

EL día que partiste de mi vida, vi en el cielo azul, una cruz hermosa dibujada con las nubes, en el costado izquierdo de esa cruz vi una paloma acercándose al corazón de Jesús y supe en ese momento que estarías con el creador, sé que desde el cielo me observas con mi hijo a tu lado, te dedico nuestro triunfo, te amaré y te llevaré por siempre en mi corazón, QEPD. Gloria Rendón Bautista.

A MIS PADRES Y HERMANOS

Con su amor y paciencia me apoyaron incondicionalmente, porque siempre me han dado un respaldo para reclinar mi cabeza, comparto mi felicidad con ellos.

A MIS SUEGROS

Doy gracias a Dios, por tan hermosa hija les concedió del cual quede enamorado y tuve la dicha de estar a su lado hasta los últimos días de su partida de este mundo.

A LA 12ª IGLESIA PENTECOTÉS UNIDAD CRISTIANA NACIONAL

Al pastor Williams Enrique Alejo Fausto y la pastora Aracely Osorio Martínez, quienes me apoyaron espiritualmente en los momentos más difíciles de mi vida.

A MIS ORGANIZACIONES CIVILES

Chogosteros en Acción AC. A los integrantes de mi asociación civil Tapalehui Toj Nehuan AC. Prof. José Antonio González, maestra Magdalena Cisneros Degante, Prof. Alfredo Cortés y a toda su familia, Antropóloga Catalina Arias Mayo y su esposo Juan Carlos Martínez Hernández, María Guadalupe Lemarroy Martínez, Ángel Velazco

A MIS COMPAÑEROS DEL PROPAT 2011

Rosalba Chablé Pascual, a mis amigos Carlos Ramos, Roberto Loyo, Bety Godínez, Alex Olivera, Neto, Gloria Esperanza, Guille y Capetillo, Jenner y Verónica, Verónica Gerónimo, Chuy y Pascual, todos ellos muchas gracias por apoyarme en tan difícil momento. A mi compañero, el MC. José Alberto Naranjo por su apoyo incondicional en el formato de la tesis.

COLEGIO DE POSTGRADUADOS CAMPUS TABASCO

Quienes apoyaron incondicionalmente en todo momento de mi carrera, Lic. Elsi Del C. Olán, Lic. Celia Acosta, Sr. Don Mario Antonio Domínguez de la Cruz (Marioni).

MIS HERMANOS DE NUEVA EVANGELIZACIÓN

A mi psicóloga Rosa Isela Fitz Sapiens.

AGRADECIMIENTOS

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA CONACyT

Por la beca otorgada durante el estudio Maestría en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico PROPAT 2011, en el Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, que también pude usarlo para comprar los medicamentos de mi esposa.

A FONDOS MIXTOS CONACyT

Por el financiamiento del proyecto, Veracruz 2008/01 Proyecto 96183.

A MI CONSEJO PARTICULAR

EL Dr. Juan Manuel Zaldívar Cruz y mi directora de tesis la Dra. Elizabeta Hernández Domínguez, por estimularme a salir adelante y tener toda la paciencia del mundo con mi trabajo.

A MIS MAESTROS DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE ACAYUCAN

La Dra. Elizabeta Hernández Domínguez

El Dr. Alejandro Gregorio Nila Méndez

A la Ing. Bioquímica Sughey Guillen Vergara

A todos ellos, gracias por apoyarme y por sus buenos consejos.

A MIS PROFESORES DE LA MAESTRÍA

La Dra. Marivel Domínguez Domínguez y su esposo el Dr. Pablo.

Dr. Julián Pérez Flores que siempre tuve su apoyo incondicional.

Dr. Mepivoset Castelán Estrada por tan gran consejo y apoyo.

Dr. Apolonio Valdez Valero que siempre sabe cómo sacar una sonrisa.

Dra. María Elena Suarez Oporta que está en el cielo junto con mi esposa, por sus sabios consejos.

CONTENIDO

DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS.....	VI
CONTENIDO.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
OBJETIVOS.....	3
Objetivo general.....	3
Objetivo particular	3
HIPÓTESIS.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Problemática de cultivo	4
Alternativa de solución a la problemática de cultivo.....	5
Cultivos de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	6
Embriogénesis somática y organogénesis.....	7
Embriogénesis somática	8
Inducción de embriones somáticos.....	10
Desarrollo de la embriogénesis somática	10
Proliferación	10
Maduración	11
Germinación y conversión en plantas	11
Tipos de embriogénesis somática.....	12
Embriogénesis somática directa	12
Embriogénesis somática indirecta	13
Uso de biotecnología moderna	13
Transformación genética por la vía de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
Uso de Proteínas insecticidas para conferir resistencia.....	17
Proteínas <i>Cry</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
Modo de acción de las toxinas <i>Cry</i>	19

Proteínas Lectina de <i>Gallanthus nivallis</i> (Aglutininin)	21
Recapitulando	23
LITERATURA CITADA.....	24
CAPITULO I. OBTENCIÓN DE UN SISTEMA DE REGENERACION <i>IN VITRO</i> DE CEDRO ROJO (<i>Cedrela odorata</i>), MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	30
RESUMEN	31
ABSTRACT	32
1.1 INTRODUCCIÓN	33
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
1.2.1 Material biológico	35
1.2.2 Axenificación de semillas de cedro rojo y germinación <i>in vitro</i>	35
1.2.3 Establecimiento de ES por los barridos hormonales.....	36
1.2.4 Proliferación de embriones somáticos (mantenimiento y proliferación de cultivos embriogénicos).....	37
1.3 RESULTADOS.....	37
1.3.1 Material biológico empleado para inducir ES	37
1.3.2 Efecto de dicamba en la inducción de la embriogénesis somática sobre diferentes tipos de explantes: hipocótilos y cotiledones.....	38
1.3.3 Inducción en la embriogénesis somática, efecto de Dicamba y 2,4-D	41
1.3.4 Proliferación de embriones somáticos	47
1.4 DISCUSIÓN	48
1.5 CONCLUSIÓN	50
1.6 LITERATURA CITADA.....	51
CAPÍTULO II TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN ESPECIES FORESTALES MADERABLES.....	55
RESUMEN	56
ABSTRACT	57
2.1 INTRODUCCIÓN	58
2.2 REVISIÓN DE LITERATURA	60

2.2.1 Problemática actual de las especies forestales maderables	60
2.2.2 Inicios de la transformación genética en especies forestales maderables	62
2.2.3 Importancia de la transformación genética	63
2.2.4 Avances en transformación genética	63
2.2.5 Avances en el rendimiento de las enfermedades de árboles mediante la introducción de nuevas características defensivas	66
2.2.6 Composición de lignina.....	69
2.2.7 Resistencia a insectos	69
2.2.8 Usos de las toxinas <i>Cry</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> como bioinsecticidas ..	71
2.2.9 Fusión de genes quiméricos	72
2.3 CONCLUSIÓN	73
2.4 LITERATURA CITADA.....	74
3. CONCLUSIONES GENERALES	79

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Diferentes alternativas contra el ataque de <i>H. grandella</i>	5
---	---

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de la embriogénesis somática y embriogénesis cigótica, la morfología y desarrollo de ambos embriones y sus diferentes etapas se muestran son muy similares.	9
Figura 2 Mecanismo de acción de la proteína <i>Cry</i> , cuando la larva lepidóptera se alimenta de una planta modificada genéticamente. Fuente: imagen tomada de internet y modificada.....	21
Figura 3. Germinación <i>in vitro</i> de <i>C. odorata</i> . A) Semillas germinadas de cedro rojo B) embrión cigótico inmaduro C) plántula germinada <i>in vitro</i> . Barras B) 0.5 mm, C) ~10 cm.	38

Figura 4 Efecto del explante sobre la inducción de callos. A) Explantes de hipocótilos con callos, observando uno de los tratamientos donde se obtuvo embriones somáticos, MS adicionado con 0.5 de dicamba. B) Explantes cotiledones sobre el cual se forman callos. C) Callos en los extremos de explantes de hipocótilos y C) Uno de los pocos callos embriogénicos obtenidos en cedro rojo.	39
Figura 5 Porcentaje de inducción de callos empleando la auxina dicamba sobre dos tipos de explantes de (hipocótilos (H) y cotiledones (C) cultivados en medios MS y WPM.	40
Figura 6. Matriz hormonal de cedro rojo cultivado en un medio con WPM con diferentes reguladores de crecimientos (Dicamba y 2,4-D), adicionados con agua de coco (0, 10, 20, 30 %). Ac= agua de coco	42
Figura 7. Matriz hormonal de cedro rojo cultivado en medio MS con diferentes reguladores de crecimiento (Dicamba y 2,4-D), adicionados con agua de coco (0, 10, 20, 30%).. Ac= Agua de coco.....	43
Figura 8. El porcentaje de la inducción de la ES en los callos obtenidos en la matriz hormonal para los tratamientos con MS. En donde se puede observar que los tratamientos con respuesta embriogénica fueron pocos: T4, T10, T11, T12, T13, T16, T17, concluyendo que el mejor tratamiento para esta inducción de ES resulto ser en T12 (MS con 0.5 mg/L 2,4D y 20% de agua de coco), con el 30%.....	44
Figura 9. El porcentaje de la inducción de la ES en los callos obtenidos en la matriz hormonal para los tratamientos con WPM. En donde se puede observar que los tratamientos con respuesta embriogénica fueron T25, T26, T27, T34, siendo el T27 en donde el porcentaje fue el máximo en la inducción de la ES con el 15%.....	45
Figura 10. Diferentes estadios de la embriogénesis somática de cedro rojo. A) y B) embriones somáticos de cedro rojo en estado globular y pre-globular, C) estadio de corazón, D) Embrión somático en estado de torpedo, E) embriones somáticos torpedo-cotiledonar, F) estadio de cotiledón.....	47

INTRODUCCIÓN GENERAL

El Cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) pertenece a la familia meliácea, se considera una especie forestal maderable preciosa en el continente americano (Cintrón 2004). Debido a las características de su madera: como la dureza, color, durabilidad y aroma, esto ha detonado desde hace mucho tiempo que esta especie tenga una elevada demanda a nivel mundial (OIMT 2006).

Actualmente, se ha reportado que en las plantaciones comerciales y en poblaciones naturales de cedro rojo, son atacada por un gusano barrenador de la meliáceas *Hypsiphyla grandella* (Zeller). Este ataque de *H. grandella* se realiza principalmente en los tres primeros años de vida del árbol de cedro rojo. El gusano barrenador devora el meristemo apical, rompiendo esta dominancia y llevando a la ramificación y/o bifurcación del fuste (Navarro 2002). Esto tiene como consecuencia que la esta madera pierda su valor en el mercado nacional y/o internacional (Macías 2001). Sin embargo, se ha observado que en las poblaciones naturales se da una cierta tolerancia a este ataque, debido que existen ejemplares donde tiene un fuste recto de ~10 m de altura, con edades de 25 a 30 años, cuya propagación es difícil por técnicas tradicionales de silvicultura. Por lo tanto, se proponen alternativas ante este problema, como son uso de la Biotecnología, cuya ciencia despliega diferentes técnicas que pudieran solventar la baja propagación vegetal de árboles adultos, las especies sensibles al ataque del barrenador, entre otras. En esta investigación se plantea el establecimiento de un sistema de regeneración *in vitro* como medio para lograr la multiplicación clonal de individuos que se encuentran en poblaciones naturales de cedro rojo (CITES 2001), con la finalidad de iniciar su conservación *ex situ*.

El uso de las técnicas de propagación por Cultivo de Tejidos Vegetales CTV, mediante el desarrollo de la embriogénesis somática, donde a partir de cualquier célula somática (cualquier parte de la planta) se puede regenerar una planta completa, mediante uso de CTV. Esta técnica proporciona la ventaja de producir grandes cantidades de plántulas de cedro rojo en poco espacio y tiempo. Además de material libre de patógenos. Aunque, bajo este sistema incluso, se pudieran reproducir variedades mejoradas mediante Ingeniería Genética (IG) que implica la inserción de uno o más genes foráneos que le pudieran conferir resistencia, por ejemplo ante el ataque del barrenador de las meliáceas. Sin embargo, como se ha establecido para llevar a cabo este proceso es necesario cumplir con ciertos requisitos: generar un constructor, como los genes *Cry* de *Bacillus thuringiensis* y las proteínas Lectinas de *Galanthus nivallis* (Aglutininin), que han demostrado poseer características insecticida contra las especies de lepidópteros. Con base a estos genes entomotóxicos, se pudiera diseñar una fusión de ambos genes, es decir generar un gen quimérico que posteriormente se introduzca al genoma del árbol, en un proceso de transformación genética y de esta manera, obtener árboles de cedro rojo genéticamente modificada (Mayer 2001).

OBJETIVOS

Objetivo general

1. Establecer un sistema de regeneración y propagación clonal eficiente en cedro rojo, que pueda ser utilizado en futuros eventos de transformación genética.

Objetivo particular

1. Realizar germinación *in vitro* de semillas de cedro rojo para generar plántulas, que posteriormente serán utilizados como explantes en experimentos de barrido hormonal.
2. Analizar diversos factores: tipo de explante (hipocótilo y cotiledones), tipo de medio de cultivo (MS y WPM), efecto y concentración de RCV: dicamba y 2,4-D (0.5 mgL^{-1} - 3 mgL^{-1}), mediante el diseño de dos barridos hormonales experimentales para inducir a embriogénesis somática.
3. Establecer un sistema de regeneración a través del cultivo *in vitro* (cultivo de callos, cultivo de brotes, embriones somático y plántulas germinadas) de cedro rojo para la obtención de material biológico necesario para transformar.

HIPÓTESIS

La inducción de embriogénesis somática en cedro rojo pudiera ser un proceso es factible, debido a que en otras especies forestales mediante la manipulación de las formulaciones de medios de cultivo, coadyuvado con la adición de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, detonarían la competencia de las células somáticas para iniciar reprogramación hacia la embriogénesis somática.

REVISIÓN DE LITERATURA

Problemática de cultivo

La familia meliácea es considerada maderas preciosas tropicales más importantes, uno de sus miembros es el cedro rojo. El uso de la madera de cedro rojo marca su elevado interés comercial, debido que se utiliza principalmente en la construcción y fabricación de muebles, paneles decorativos, etc., (Hilje y Cornelius 2002). Sin embargo, esta especie ha tenido limitaciones en el momento de la propagación en vivero y/o plantaciones comerciales, debido a que es atacado constantemente por una plaga barrenadora llamada *Hypsiphyla grandella* Zeller (Lepidóptera: Pyralidae), este insecto en su estado larval ataca varias partes del árbol como: raíz, follaje, fustes y frutos. Sin embargo, el mayor daño es ocasionado en la perforación del meristemo apical en árboles jóvenes, como consecuencia se producen ramificaciones y cuando los ataques son continuos, los árboles de cedro rojo pueden morir o resultar en deformaciones marcadas del fuste que imposibilita el crecimiento para alcanzar la talla comercial, situación que desalienta algunos productores forestales quienes optan por la siembra de otras especies (Macías 2001, Hilje y Cornelius 2002).

Alternativa de solución a la problemática de cultivo

El alto valor comercial de la madera de cedro rojo ha motivado de interés en esta especie y ha hecho que en los últimos años se establezcan plantaciones comerciales en nuestro país, con dos objetivos, para reducir el impacto del aprovechamiento en las poblaciones naturales y contar con la propagación de individuos con características que la industria forestal requiere en el mercado. Sin embargo, como se ha mencionado esto se ha limitado por el ataque del barrenador. Ante este panorama, se planteado diferentes estrategias utilizadas en campo para el control biológico de *H. grandella*, con el objetivo final del manejo integral de la plagas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diferentes alternativas contra el ataque de *H. grandella*.

Métodos de control	Productos	Referencia
Químicos	Insecticidas	Wilkins <i>et al.</i> 1976, Grijpma y Ramalho 1969
Hongos entomopatógenos	<i>Metharrizhium anisoplae</i> y <i>Beauveria bassiana</i>	Duarte <i>et al.</i> 1988
Bacterias	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Sánchez y Velázquez 1998
Insecticidas orgánicos	Neem (<i>Azadirachta indica</i>), ruda (<i>Ruta chapelensis</i>)	Taveras 1999, Mancebo <i>et al.</i> 2001.
Practicas silvícolas	Combinación con otras especies forestales maderables y no maderables, disminución de las densidades de cedro rojo y caoba utilizando sombra, poda de árboles dañado e enjertación de varetas	Cornelius <i>et al.</i> 2004, Pérez <i>et al.</i> 2010
Insectos con actividad repelente	coleópteros (varias especies de Scolytidae), homópteros (varias especies de áfidos) y dípteros (<i>Musca domestica</i>)	Huber <i>et al.</i> 2001
Atrayentes	Feromona sexual de la hembra de <i>H. grandella</i> .	Hilje <i>et al.</i> 2002

Las estrategias actuales para el establecimiento de plantaciones comerciales de cedro rojo, comprenden la selección de árboles tolerantes entre una progenie de padres selectos, que por lo tanto en especies forestales involucra un proceso que lleva mucho tiempo por los ciclos biológicos tan largo de estas especies. Cabe mencionar que el uso del mejoramiento entre árboles resulta ser un proceso poco infructuoso y demasiado tardado, que en nuestro país es poco lo que se ha realizado en esta área. Finalmente, las plantaciones forestales con fines comerciales, deberían estar orientadas a la propagación de los mejores individuos dentro de una población forestal, es decir que tengan ventajas estos individuos como una resistencia al ataque de plagas, enfermedades y mejoras en las características del fuste, mayor producción de lignina, crecimiento rápido, entre otros (Gleeson *et al.* 2005, Israelson *et al.* 2004, Balocchi y Valenzuela 2004, Baucher *et al.* 2003, Tang y Tian 2001, Xiao-Hua *et al.* 2003, Newton *et al.* 1993).

Cultivos de tejidos vegetales *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales es una rama de la biotecnología vegetal consistente en técnicas para promover la multiplicación o la regeneración de plantas u órganos de plantas en condiciones totalmente asépticas, haciendo crecer explantes de tejido vegetal (como hojas, tallos, embriones cigóticos, anteras, meristemas, etc.) sobre un medio de cultivo, que es una receta precisa de nutrientes y suplementos en un recipiente estéril.

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta importante para solventar diversos problemas que presentan las plantas cultivadas bajo el sistema tradicional, bajo este contexto se usa para mejorar la calidad de las plantas, para la producción

masiva de diferentes especies vegetales, contar un producto de elevada calidad sanitaria y almacenar el germoplasma. En la actualidad la CTV es una de las técnicas más usadas tanto en la agricultura, como la silvicultura para propagar masivamente estas especies forestales mediante la multiplicación asexual, a través de diferentes metodologías que pueden involucrar la producción de brotes y/o embriogénesis somática (Thorpe *et al.* 1991).

Embriogénesis somática y organogénesis.

Dentro de los cultivos de tejidos vegetales existen dos principales vías para la obtención de plántulas que son la embriogénesis somática y la organogénesis, la primera se basa en la capacidad que tienen las células (somáticas) de generar estructuras bipolares o embriones sin la necesidad de una fusión gamética. Por otro lado, la organogénesis es la formación de nuevos órganos (*novo*) a partir de los explantes cultivados (tallos, hojas, o callos), regenerando órganos de la planta como flores, hojas, raíces y brotes adventicios, estos últimos son estructuras similares a una yema y tienen la capacidad de originar una nueva planta. Se ha observado que la organogénesis, suele facilitarse en presencia de concentraciones elevadas cuando se combinan las citocininas/auxinas; la mayor diferencia y la más significativa es el hecho de que la embriogénesis somática conserva el material genético idéntico a la planta madre o donante, facilitando así la micropropagación a gran escala de especies forestales (Simula *et al.* 2005, ITTO 2010).

Embriogénesis somática

La embriogénesis somática dentro de las técnicas de cultivo de tejidos, representa un método eficiente para la regeneración de plantas en comparación de otros métodos como el uso del mejoramiento genético. Debido a la dificultad que existe para regenerar tejidos por otras vías como la organogénesis o por el alto contenido de compuestos fenólicos que hay en los explantes de especies recalcitrantes (Manzanilla 2004), se opta por el uso de la embriogénesis somática como una vía de propagación clonal masiva que además, constituye una herramienta de trabajo en la conservación *in vitro* de germoplasma (Griga 2000) y en la obtención material biológico mejorado genético (Das *et al.* 2002). Además, la embriogénesis somática permite ser un modelo de estudio sobre la capacidad de división de las células somáticas, entender las bases moleculares y celulares de la planta y/o árboles, según sea el caso (Feher *et al.* 2003).

La embriogénesis somática tiene sus antecedentes desde que Steward (1958), realizó investigaciones en los tejidos de zanahoria, donde demostró que es posible llevar a cabo el desarrollo de estructuras embriogénicas *in vitro*, que inicia a partir de células somáticas que desarrollaron las diferentes etapas parecidas a la embriogénesis cigótico, como son: preglobular, globular, estado de corazón, de torpedo y finalmente, cotiledonar. Esta investigación permitió que más adelante se llevaran a cabo el desarrollo de protocolos con alta producción de embriones somáticos bien desarrollados, a partir de cualquier tejido somático vegetal: generalmente embriones cigótico, semillas germinadas, embriones inmaduros, cotiledones, brotes, inflorescencias inmaduras, óvulos, hojas, estigma, estilo, raíz entre otras (Manzanilla 2004), aprovechando su capacidad de la totipotencialidad, es decir que pueden

desarrollar un organismo similar del que provienen bajo el control de las condiciones de cultivo *in vitro* y la aplicación de reguladores de crecimiento (Figura 1).

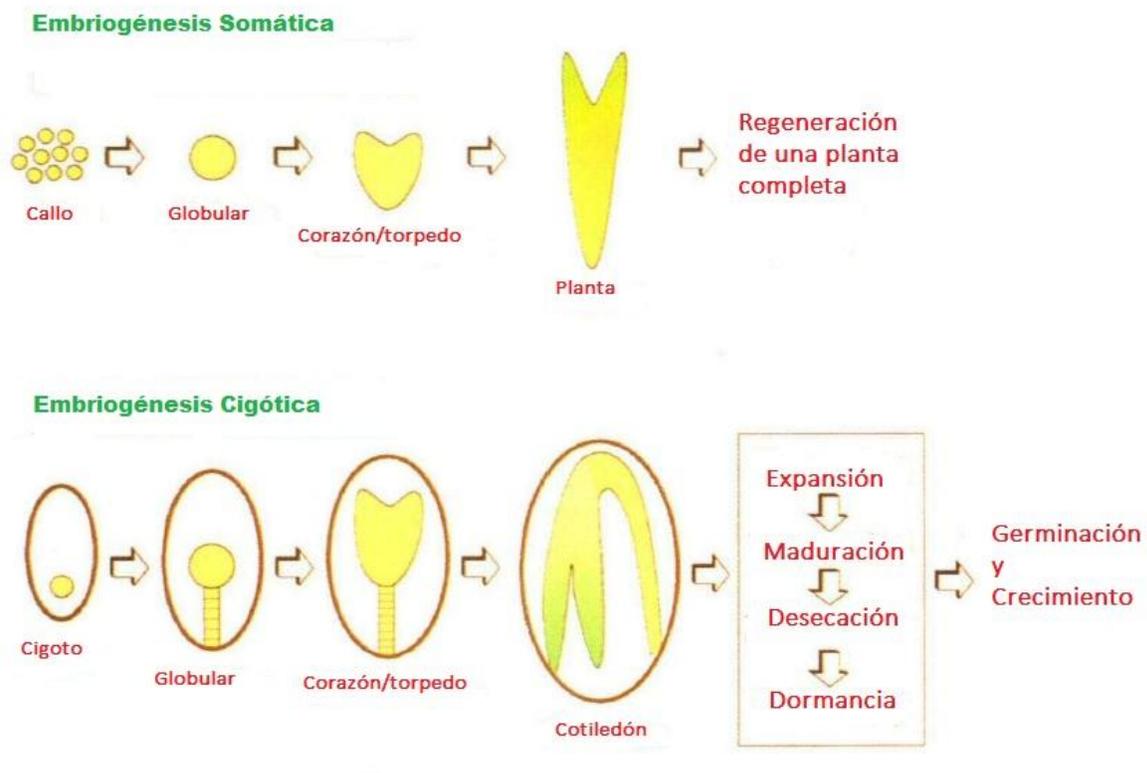


Figura 1. Comparación de la embriogénesis somática y embriogénesis cigótica, la morfología y desarrollo de ambos embriones y sus diferentes etapas se muestran son muy similares.
Fuente: Modificado de (Zimmerman 1993).

La embriogénesis somática presenta diferentes etapas, donde se llevan a cabo procesos de crecimiento, elongación, división celular, diferenciación entre otros:

- Inducción de embriones somáticos
- Desarrollo de embriones somáticos
- Proliferación
- Maduración

- Germinación y conversión en plantas (Freire 2003).

Inducción de embriones somáticos

Para lograr la embriogénesis somática de especies forestales es necesario lograr la inducción de esta en los explantes, que es una parte de la planta donada (hojas, tallos, meristemos apicales, embriones cigóticos) o de los callos (aglomerado de células), en la cual las células forman los embriones somáticos iniciales, en presencia de fitohormonas adicionadas en el medio de cultivo, principalmente auxinas/citocininas, aunque también se puede generar una embrión adventicia a partir de explantes inmaduros sin el uso de estas (Fernández-Guijarro 1997). Diversos experimentos han demostrado, que los embriones cigóticos como explantes iniciales, parecen dar un mayor rendimiento en la producción de embriones somáticos en comparación con el uso de otros explantes (Klimaszewska y Cyr 2002).

Desarrollo de la embriogénesis somática

En esta etapa se llevan a cabo una serie de fases en la cual ocurre que las células se aíslan y pasan por divisiones celulares continuas hasta formar los agregados celulares de características embriogénicas (pre-globulares), esto en presencia generalmente de auxinas en el medio de cultivo, cuando la hormona es retirada del medio de cultivo, se presenta la ocurrencia de agregados celulares que ganan la capacidad de continuar con su desarrollo (Freire 2003).

Proliferación

En esta fase de la ES, se deberá demostrar toda su capacidad de propagación a gran escala de plantas, ya que presenta una serie de ventajas en su aplicación frente a otros sistemas de cultivos de tejidos vegetales debido a la habilidad de transferencia y

conservación del germoplasma lo que permite multiplicarse indefinidamente a muchas especies de plantas. Se debe mencionar que esta prolifera en las células embriogénicas se ha asociado a la presencia de los reguladores de crecimiento, como las auxinas. Estos niveles de auxinas, son necesarios para mantener la embriogénesis repetitiva dependiendo de la especie (Merkle *et al.* 1991). Esta capacidad de multiplicación es aplicable a nivel industrial, permite obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente en semillas artificiales (Ramage *et al.* 1982/cit. por Gómez, 1998).

Maduración

La maduración es un paso en el desarrollo del embrión somático en el cual se desarrolla una expansión en la célula, para la acumulación de sustancias de reserva (Parrot 1993). Es de relevancia tener en cuenta los suplementos del medio de cultivo como las auxinas, los carbohidratos, el nitrógeno y el ácido abscísico (ABA) para lograr una buena obtención de embriones somáticos (Fernando y Gamage 2000), ya que una correcta acumulación de reservas conlleva a un incremento en la masa seca de los embriones somáticos lo cual indica una alta calidad en su posterior germinación. Los embriones en estado de torpedo pasarán a cotiledonar para estar totalmente preparados para germinar en plántulas.

Germinación y conversión en plantas

Cuando se habla de germinación en la embriogénesis somática solo se refiere al desarrollo de la raíz o del brote. Las reservas proteicas y lipídicas en el embrión somático bajan sustancialmente de nivel a partir del primer día (Cry *et al.* 1991). La degradación tan rápida de las sustancias de reserva en un embrión somático, en

comparación con un embrión cigótico, es probablemente por la falta del tejido nutritivo que rodea a la semilla; es por esto que se le suele adjudicar que las plantas de embriones somáticos son más pequeñas y débiles que las de semilla. La manipulación de los embriones cigóticos *in vitro* simulando los procesos que ocurren en las plantas de forma natural, es la mejor vía para optimizar la maduración y conversión en plantas de los embriones somáticos (Anandarajah y McKersie 1990, Senaratna *et al.* 1990).

Tipos de embriogénesis somática

Si bien se ha estudiado que la embriogénesis somática es una técnica del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, en este apartado se conocerá los tipos de embriogénesis somáticas que se conocen, según la vía por la que se obtienen:

Embriogénesis somática directa

Embriogénesis somática indirecta

Embriogénesis somática directa

Este es un proceso mediante el cual se obtienen embriones somáticos directamente del explante, células aisladas o grupo de células sin pasar por la formación de aglomerados celulares de rápido crecimiento o callos. Esta formación directa se debe a la acción de los componentes del medio del cultivo, principalmente de las fitohormonas, así como del origen del explante, ya que las células jóvenes como las que se encuentran en los meristemos apicales funcionan mejor para este propósito. Por lo que esta vía de obtención de embriones somáticos, muestra un sinnúmero de aplicaciones que van desde el aprovechamiento de la obtención de plantas clonadas directamente de especies económicamente importante, hasta en algunos casos su posterior venta como

plántulas jóvenes, con características elite para la siembra en campo. Otras aplicaciones sería la mejora genética, como la biobalística en embriones somáticos de cedro rojo para conferirle resistencia al gusano barrenador, la selección y conservación *in vitro* de germoplasma para futuras investigaciones como la ingeniería genética sería otro de los estudios para esta vía (Sondahl *et al.* 1991).

Embriogénesis somática indirecta

Este fenómeno se presenta cuando se obtienen/forman embriones somáticos a partir de callos celulares los cuales se forman por la acción de los compuestos del medio de cultivo, principalmente las fitohormonas, las cuales inducen en el explante un crecimiento celular acelerado o formación de callos que a su vez por la adición de otras fitohormonas son inducidos a la producción de embriones somáticos (Ammirato 1983). Este tipo de cultivo de tejidos *in vitro* tiene desventajas, si la comparamos con la embriogénesis somática directa ya que esta suele producirse en menor tiempo. Pero si hablamos de rendimientos ambas vías son factibles ya que producen un gran número de individuos genéticamente similares a la planta madre. Dentro de la embriogénesis somática indirecta se ha estudiado que se puede dar a través de dos vías (Sondahl *et al.* 1991).

En la actualidad para realizar cualquier técnica de ingeniería genética, se debe contar un sistema de regeneración eficiente *in vitro*, como es el desarrollo del cultivo de embriones somáticos para después intentar realizar transformación genética.

Uso de biotecnología moderna

En los últimos años con el auge de la nueva biotecnología moderna y con las diversas herramientas de las técnicas moleculares y los sistemas de cultivo *in vitro* ha surgido la

Ingeniería Genética (IG) de plantas, como una evolución de las técnicas de mejoramiento convencionales, los objetivos con esta nueva disciplina siguen siendo los mismos que el fitomejoramiento clásico.

Hoy en día la IG, permite el acceso y la manipulación directa de la información genética de cualquier ser vivo, posibilita la creación de genes sintéticos, además incrementa el rango de caracteres de interés a transferir a las especies vegetales, caracteres que no solamente están codificados por genes de origen vegetal, sino genes también de origen animal o microbiano (Sánchez, 2003).

El proceso de transformación en plantas permite la posibilidad de introducir genes foráneos ya sea de la misma planta o de algún otro organismo con la finalidad de mejorar las características de la planta. Las características que se obtienen de la transformación genética es la alteración de la forma de los árboles y rendimiento, tolerancia al estrés biótico y abiótico, resistencia a herbicidas e insectos, mejoramiento molecular mediante la resistencia a virus, el análisis, manipulación de aceleración de la floración.

Mediante el proceso de transformación genética se han obtenido muchas ventajas sobre la forma de combatir el ataque de insectos plaga, principalmente limita las fumigaciones periódicas, reduce de costos en aplicaciones de insecticidas que a su vez resultan contaminantes para el medio ambiente.

La biotecnología ha demostrado que los sistemas de modificación genética, se presenta como una herramienta segura y efectiva en el control de plagas, alternativa a los insecticidas químicos, permite que a su vez funcionen como un apoyo a los programas de reforestación en plantaciones forestales y en una visión futura no muy

lejana, podría aliviar la presión de la deforestación que enfrenta las poblaciones naturales y evitar la extinción de especies forestales en peligro (Verdeil *et al.* 1999).

Transformación genética por la vía de *Agrobacterium tumefaciens*

Básicamente, hay dos sistemas para introducir genes en el genoma de las plantas: la transferencia directa y la transferencia mediada por bacterias del género *Agrobacterium*. El primero consiste en la introducción directa de genes empleando técnicas como la microinyección o el bombardeo de partículas de oro con un acelerador de partículas. El segundo utiliza las propiedades biológicas del suelo, la especie *Agrobacterium sp* es una bacteria presente en la rizósfera y agente causal de la enfermedad conocida como “agalla en corona”, causante de tumores o agallas en la base de los tallo a nivel de la superficie del suelo en los tejidos vegetales, de amplia distribución mundial, capaz de afectar a más de ochenta familias de plantas herbáceas y forestales principalmente de la familia Rhizobiaceae (Arguedas 2009).

Es uno de los pocos organismos capaces de transformar genéticamente una célula vegetal, utilizando un sistema para transferencia e integración de genes heterólogos altamente evolucionado. En presencia de una herida o daño producido en la zona del cuello de una planta susceptible, esta bacteria es atraída por quimiotaxis en respuesta a sustancias liberadas al medioambiente por las células de la planta dañada.

Una vez dentro del hospedero la bacteria estimula a producir una gran cantidad de células, estas células continúan dividiéndose mucho más rápido de lo normal y aumentan considerablemente su tamaño, por lo tanto, el área afectada se transforma en un tumor o agalla. La transformación de las células de la planta después de ser infectadas por *Agrobacterium*, se debe a un plásmido de elevado peso molecular (200

kb) denominados plásmido-Ti, un fragmento del plásmido-Ti es transferido al genoma de la planta que más tarde será expresado. El fragmento transferido se llama ADN-T, en las células de la planta y región-T, en el plásmido bacteriano (Arguedas 2009).

Para la integración del ADN-T en el genoma de la planta es indispensable, primero una secuencia de 25 pares de bases (bp) de repetición directa que se encuentra a ambos lados de la región-T. El segundo componente indispensable para esa integración de la región-T son los denominados genes *vir*. Estos genes no son transferidos al genoma de la planta, sino que actúan en *trans* sobre la región-T para promover su transferencia. El ADN-T está conformado por dos grupos de genes: un grupo responsable de la morfología del tumor, y otro responsable de su crecimiento sin la necesidad de hormonas (Davies 2001).

Las células transformadas sintetizan hidratos de carbono característicos de las cepas de *Agrobacterium* con el fin de proveerles de alimento, en síntesis, el parásito transforma el genoma del huésped, en este caso las células vegetales, para convertirlas en fábricas de alimento (Davies 2001). Estas características propias de *A. tumefaciens* de infectar a la planta y producir un tumor de manera natural es lo que muchos investigadores han implementado para la transformación genética y la introducción de genes extraños o heterólogos en el genoma de una planta.

Considerando el proceso biológico de infección por *Agrobacterium* descrito, no todas las características de ese proceso son necesarias para llevar a cabo la transformación genética. Los conocimientos actuales sobre el proceso de transferencia y expresión del ADN-T en las plantas permite modificar los plásmidos-Ti para convertirlos en convenientes vectores de genes en plantas. Hoy en día se ha perfeccionado la

metodología utilizando cepas de *Agrobacterium* que portan dos vectores (sistemas binarios), uno de ellos con secuencias específicas para desarrollar el mecanismo de infección (sin la región codificante para los genes de tumores) y el otro vector, vector Ti, con la secuencia de ADN a ser transferidas al genoma de la planta.

En especies maderables se ha hecho la transformación en especies de pino, teca, eucalipto, por mencionar algunas especies, donde se ha utilizado la introducción de genes foráneos para obtener resistencia al ataque de insectos plaga (Tang y Newton 2003). En cedro rojo aún no se han reportado eventos de transformación genética mediante esta vía.

Uso de Proteínas insecticidas para conferir resistencia

Proteínas *Cry* de *Bacillus thuringiensis*

La habilidad de insectos plaga para sobreponerse y adaptarse al estrés ambiental hace que los métodos de control se vuelvan ineficientes, como sucede con el uso de algunos plaguicidas, hoy en día existe una necesidad crítica de contar con herramientas seguras y efectivas para el control de plagas, buscando alternativas al uso de insecticidas químicos (Fernández y Vega 2002), una alternativa es el uso de patógeno como agentes de biocontrol. El patógeno bioinsecticida más utilizado en el mundo y en cumplir expectativas como mantener el potencial para seguir desarrollándose es a partir de una bacteria llamado *Bacillus thuringiensis* (Sauka y Benintende 2008).

El descubrimiento de *B. thuringiensis* ha tenido el máximo impacto en el uso de biopesticidas en la silvicultura, así como en los sistemas de cosecha y de productos almacenados. *B. thuringiensis* perteneciente a la familia Bacillaceae, considerada una bacteria que puede existir en diversos hábitat como suelo, agua, hojas de plantas,

insectos muertos, entre otros (Bravo *et al.* 2007). Una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, que durante su ciclo de vida presenta dos fases principales: un crecimiento vegetativo, donde las bacterias se duplican por bipartición y esporulación, un programa de diferenciación de bacteria a espora (Fernández y Vega 2002). Caracterizado por producir un cuerpo paraesporal durante su fase de esporulación conocido como cristal, el cual es de naturaleza proteínica y posee propiedades insecticidas. El cristal proteínico está constituido por proteínas denominadas δ -endotoxinas (δ = delta endotoxinas) con un peso de 140 kDa también conocidas como proteínas *Cry* ó *Cyt*. Cuando estas δ -endotoxinas son ingeridas por los insectos, ejercen su toxicidad mediante la unión a células intestinales del tracto digestivo ocasionando una lisis osmótica. Estas proteínas manifiestan una actividad específica a diferentes grupos de insectos lepidópteros (polillas y mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros y nemátodos.

Su mecanismo de acción de infección hacia el insecto es a través del reconocimiento del lazo receptor del intestino del insecto, formando poros de membranas que rompe la permeabilidad selectiva de las células provocando la lisis osmótica de las células epiteliales y por consiguiente la muerte del insecto (Bravo *et al.* 2007, Brar *et al.* 2007, Ruud *et al.* 1999, Lorence *et al.* 1995). La especificidad de la delta endotoxina a un tipo de insecto en particular implica la presencia de receptores específicos, la toxina se inserta de forma irreversible a la membrana plasmática de las células intestinales y el próximo paso es la formación de un poro o lesión en esta membrana que conduce a una variación en su permeabilidad, alterando el transporte de los iones de potasio, lo cual trae como consecuencia la lisis celular, disrupción de la integridad del intestino y la

muerte del insecto. Por otra parte, las esporas bacterianas se multiplican en la hemolinfa y provocan una septicemia que incrementa el efecto de las toxinas insecticidas (Fernández y Vega 2002).

Modo de acción de las toxinas Cry

El mecanismo de acción de las proteínas Cry se describió principalmente en lepidópteros como un proceso de múltiples etapas. Los cristales de *B. thuringiensis* son ingeridos y luego solubilizados en el intestino medio del insecto que debe poseer un pH superior a 9.5 esencial para la disolución de muchas protoxinas, tras lo cual se liberan las proteínas cristalinas en forma de protoxinas. Estas no producirán el daño per se, sino que deberán ser procesadas por proteasas intestinales para generar las toxinas activas que llevarán a la muerte de la larva (Bravo *et al.* 2007). Bajo su forma monomérica, las toxinas atraviesan la membrana peritrófica y se unen de forma univalente a la caderina, con gran afinidad en la cara apical de la membrana epitelial (Bravo *et al.* 2007, Griko *et al.* 2007). Luego, de acuerdo con estudios realizados en cultivos de células de insectos, se inicia una cascada de señalización dependiente del ion magnesio que sería responsable de la muerte celular (Zhang 2006). Además, el inicio de esta cascada de señalización estimula la exocitosis de caderina desde vesículas intracelulares hacia la membrana apical de la célula y aumenta el número de receptores; por ende, recluta un número mayor de toxinas libres que amplificarían la señal inicial (Zhang 2006).

Los síntomas que se observan a partir de que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales y esporas de *Bt* son: cese de la ingesta, parálisis del intestino, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte. De manera general se acepta que las

toxinas *Cry* son toxinas formadoras de poro que ejercen su actividad tóxica al provocar un desequilibrio osmótico en las células epiteliales donde se insertan en la membrana (Bravo *et al.* 2007).

Este mecanismo de acción que ejerce *B. thuringiensis* como efecto bioinsecticida en especies de insectos plaga es lo que ha utilizado la ingeniería genética para dar resistencia a las plantas contra el ataque de ciertas plagas como lepidópteros (Tang y Tian 2001). Una vez que se realice la transformación de la planta, independientemente del método de transferencia utilizado, es necesario el desarrollo de plantas transformadas en la habilidad de regenerar el material transformado bajo selección (Walter 2004, MacRae y Van Staden 2000).

Proteína CRY

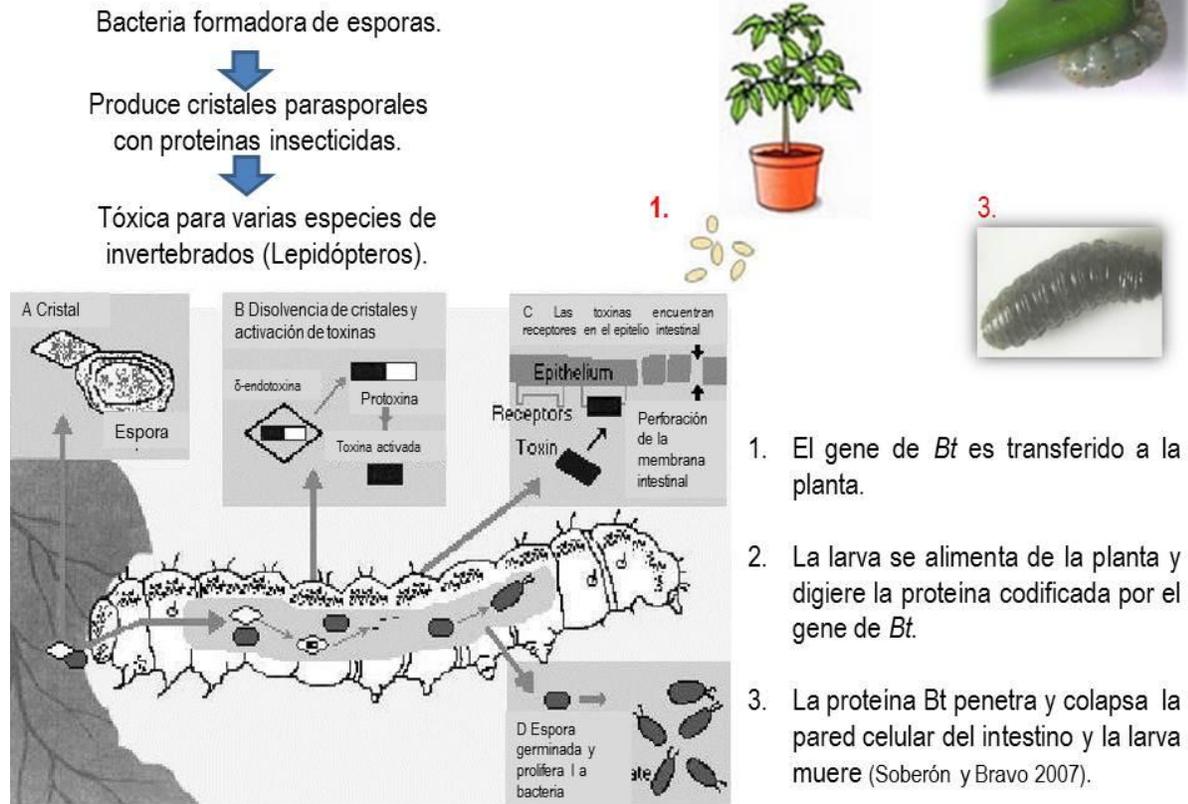


Figura 2 Mecanismo de acción de la proteína Cry, cuando la larva lepidóptera se alimenta de una planta modificada genéticamente. Fuente: imagen tomada de internet y modificada.

Proteínas Lectina de *Gallanthus nivallis* (Agglutinin)

Otro agente biológico insecticida contra insectos plaga se ha obtenido a partir de plantas como son las proteínas lectina GNA. La lectina (GNA) es una proteína aislada de los bulbos de la flor de la campanilla (*Gallanthus nivallis* Agglutinin), una planta monocotiledónea ornamental de la familia Amarydillaceae. La lectina es una proteína tetramérica compuestas de subunidades idénticas de 2500 Da y es depósito de carbohidratos (van Danme *et al.* 1991), son un grupo de proteínas de origen no-inmune que comparten propiedades de enlazarse de forma específica reversible a los

carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas. Estas proteínas usualmente tienen al menos dos sitios de unión por molécula: un azúcar específico y una molécula glicosilada. Como característica particular tienden a aglutinar a las células a las cuales se unen. Este tipo de moléculas se encuentra distribuida en la naturaleza, en diferentes organismos como microorganismos, hongos, animales y plantas. En las plantas, la mayoría de estas moléculas están presentes en los cotiledones y endospermos de las semillas y constituyen de 2-10 % del total de proteínas de estas. Se sugiere que dentro de la planta, estas proteínas pueden tener diferentes funciones como son: regulación fisiológica defensa mecánica contra el ataque de microorganismos, almacenamiento de proteínas, transporte de carbohidratos, estimulación mitogénica, reconocimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* y algunas más (Castillo-Villanueva y Abdullaev 2005, Chandra *et al.* 2006).

Estudios en alimentos de insectos han llevado a investigar la eficacia de un número de diferentes lectinas contra insectos plaga. La proteína GNA alimentado en una dieta artificial demostró ser toxico para un número importante insectos plaga: homópteros, coleópteros, y lepidópteros (Foissac *et al.* 2000).

(Gatehouse *et al.* 1995) diseñó una dieta artificial que contenía guisante, papa, germen de trigo, concaavalina A y lectina GNA de arroz; y encontró que la concentración efectiva a de 1 gL^{-1} de GNA presentó el 80 % de mortalidad efectiva. Numerosas investigaciones se han realizado en plantas transgénicas que expresan lectina y su resistencia contra insectos (Setamou *et al.* 2002). También se ha demostrado que la

proteína lectina GNA no posee efecto tóxico sobre animales superiores, llevándose a cabo en papaya transformada con lectina (McCafferty *et al.* 2008)

Se ha conocido poco sobre el modo de acción insecticida de las plantas lectinas. En otros sistemas animales sus efectos perjudiciales son atribuidos fuertemente a los lazos de las lectinas a las superficies de las células epiteliales intestinales, los lazos lleva a la interferencia con el digestivo, las funciones secretoras o protectoras del intestino. Otro efecto deletéreo de la ingestión de lectina incluye la inhibición de los bordes de las enzimas complemento del intestino medio de las ratas (Pusztai *et al.* 1996) la interferencia con la absorción de varios nutrientes y alteraciones en la estructura y metabolismo de la células epiteliales(Santiago *et al.* 1993). Las lectinas también inducen la apoptosis, una secuencia de eventos programados que normalmente incluyen la activación de endonucleasas endógenas, dirigiendo a la fragmentación del ADN y eventualmente la muerte celular (Kulkarni y McCulloch 1995).

La actividad anti-insecticida puede medirse endureciéndose la quitina en la matriz peritrófica o por la interacción de las glicoproteínas en las células epiteliales del intestino medio del insecto. Como un resultado la digestión y asimilación de alimentos nutritivos es reducido, causando hambre (Peumans y Van Damme 1995).

Recapitulando

Por todos los antecedentes mencionados, el cedro rojo siendo un árbol de la familia de las meliáceas, reviste gran importancia económica por la madera que produce después de la caoba. Esto ha provocado que esta especie enfrente diversos problemas, que van desde extracción de especies silvestres, tala ilegal y ataque de plagas. Recordando que como especie forestal la reproducción en vivero es lenta y en

ocasiones fallida y que por estas características es un especie que presenta lento crecimiento. Esto ha motivado a búsqueda de alternativas que amortigüen la presión a esta especie. Recurriendo, por lo tanto al uso de la biotecnología y en específico al cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, como solución para la propagación de esta especie acortando tiempo y con mayor cantidad. Esto, por lo tanto nos lleva a proponer que la embriogénesis somática sería ideal para alcanzar esta meta.

LITERATURA CITADA

- Ammirato PV (1983) Embryogenesis. En: Evans, DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y. (eds). Handbook of plant cell culture. Mac Millan Publishing, New York. 1: 82-123
- Anandarajah K, McKersie B (1990) Enhanced vigour of dry somatic embryo of *Medicago sativa* L. with increase sucrose. Plant science. 71: 261-266.
- Arguedas M (2009) La “corona de agallas” (*Agrobacterium tumefaciens*). Kurú: Revista Forestal. Plagas y enfermedades forestales. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. (6): 16 1-5.
- Balocchi C, Valenzuela S (2004) Introduction to GMOs and Biosafety in Forestry. Forestry Biotechnology in Latin America. Proceedings from the workshop biotecnología forestal. Institute of Forest Biotechnology. Universidad de Concepción. Concepción, Chile. Global Biotechnology Forum. 126-130.
- Baucher M, Halpin C, Petit C.M, Boerjan W. (2003) Lignin: genetic engineering and impact on pulping. Critical Review Biochem. Molecular Biology (38): 305-350.
- Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Surampalli RY, Barnabe S, Valero JR (2007) *Bacillus thuringiensis* proteases: Production and role in growth, sporulation and synergism. Universite du Quebec. Quebec, Canada. Process Biochem (42): 773-790.
- Bravo A, Gill SS, Soberón M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Insecticidal Toxins and their Potential for Insect Pest Control. Elsevier. Toxicon. (49): 423-435.
- Castillo VA, Abdullaev F (2005) Lectinas vegetales y su efecto contra el cáncer. Laboratorio de oncología Experimental. Laboratorio de ecología experimental. Instituto Nacional de Pediatría. Scielo. Revista de investigación clínica 57(1): 55-64.
- Chandra RA, Kumar N, Jeyakani J, Deepack SD, Gowda BS, Prathina MN (2006) Lectindb: a plant lectin database. Bioinformatics Centre and Supercomputer

Education and Research Centre. Raman Building, Indian Institute of Science, Bangalore. Karnataka, India. 10(16): 938-946.

- Cintrón B (2004) *Cedrela odorata* L. Cedro hembra, Spanish cedar. En Burns, Russell M.; Honkala, Barbara H., eds. *Silvics of North America: 2. Hardwoods*. Agric. Handb. 654. Washington, DC. U.S. departamento de Agricultura. Forest Service. 250-257.
- CITES (2001) Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de flora y fauna silvestre. Undécima reunión del comité de flora Langkawi, Malasia. 12.
- Cornelius JP, Wightman KE, Grogan JE, Ward SE (2004) *Swietenia* (*American Mahogany*). *Encyclopedia of Forest Sciences*, (ed. By J. Burley, J. Evans, and J.A. Youngquist). 4: 1720-1726.
- Cry D, Webster F, Roberts D (1991) Biochemical events during germination and early growth of somatic embryos and seed of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex). *Seed- Sct. Res.* 1: 91-104.
- Das D, Reddy M, Upadhyaya K, Sopory SK (2002) An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Springer Verlag. Plant Cell Report.* 20: 999-1005.
- Davies KG (2001) What makes genetically modified organism so distasteful? *Science and Society. Trends in Journal Biotechnology* (19): 424-427.
- Duarte A, Menendez J, Luján M (1988) Susceptibilidad de las larvas de *Hypsiphyla grandella* (Lepidoptera: Phycitidae) a biopreparados de *Metarrhizium anisoplae* en condiciones de laboratorio. *Revista Forestal Baracoa.* 18: 71-79.
- Feher A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Review of Plant Biotechnology and Applied Genetics. Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 74(3): 201-228.
- Fernández O, Vega L (2002) Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. Instituto de Investigación de Sanidad vegetal Playa. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (CATIE). Costa Rica. (64): 110-115.
- Fernandez-Guijarro B (1997) Embriogenesis somática en alcornoque (*Quercus suber* L.) Tesis doctoral. E.T.S. Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. 1-100
- Fernando SC, Gamage CKA (2000) Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Elsevier. Plant Science.* 2(151): 193-198.
- Foissac X, Loc NT, Christou P, Gatehouse AMR, Gatehouse JA (2000) Resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescens*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA). *Crop Protection Group, Department of Biological Sciences. University of Durham. South Road, Durham. J Insect Physiol* 46(4): 573-583.

- Freire MS (2003) Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Instituto de Biotecnología de Plantas. Universidad central "Martha Abreu" de las villas. Villa Clara, Cuba. Biotecnología Vegetal. 3(4): 195-209.
- Gatehouse JA, Powell K, Edmons H (1995) Genetic engineering of rice for resistance to homopteran insect pest. Rice genetics III. Manila, Philippines. 189-200.
- Gleeson D, Lelu WM, Parkinson M (2005) Overproduction of proline in transgenic hybrid larch (*Larix leptoeuropaea* (dengler)) cultures renders them tolerant to cold, salt and frost. Molecular Breeding 15(1): 21-29.
- Gómez A, Aravanopoulos PA, Alia R, Bueno MA (1999) *Pinus halepensis* RAPD markers: Linkage and genetic diversity. En Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed). 143-146.
- Griga M (2000) Morphological alterations in sterile mutant of *Pisum sativum* obtained via embryogenesis. Biología Plantarum 43(2):161-165.
- Grijpma P, Ramalho R (1969) Toona spp., Posibles alternativas para el problema del barrenador de las meliáceas *Hypsipyla grandella* en América Latina. Turrialba. 19(4): 531-547.
- Griko N, Rose YL, Carpenter L, Candas M, Ibrahim MA, Zhang X, Lee A, Bulla Junker M (2007) Univalent binding of the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* to a conserved structural motif in the cadherin receptor BT-R1. Biochemistry. Department of Molecular and Cell Biology. UniVersity of Texas 46(35): 10001-10007.
- Hilje L, Cornelius J (2002) ¿Es inmanejable *Hypsipyla grandella* como plaga? <http://www.catie.ac.cr>. Hoja Técnica de Manejo Integrado de Plagas (CATIE). 53-57.
- Hilje L, Oehlschlager C, Macias J (2002) Desarrollo comercial de la feromona sexual de *Hypsipyla grandella*: Informe final (CATIE). 14-25.
- Hubber D, Borden J (2001) Angiosperm bark volatiles disrupt response of Douglas-fir beetle, *Dendroctonus pscodtsugae*, to attractant-baited traps. Journal of Chemical Ecology. 27(2): 217-223.
- Israelson M, Mellerowicz E, Chono M, Gullberg J, Moritz T (2004) Cloning and overproduction of gibberellin 3-oxidase in hybrid aspen trees. Effects on gibberellins homeostasis and development. Umea Plant Science Centre, Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish University of Agricultural Sciences. Umea, Sweden American Society of Plant Biologists. 135(1): 221-230.
- ITTO (2010) International Timber Tropical Organization. Tropical Timber Market (TTM) Report. 2(15): 1- 25.
- Klimazewska K, Cyr DR (2002) Conifer somatic embryogenesis: I. Development. Dendrobiology 48: 31-39.
- Kulkarni GV, McCulloch CAG (1995) Journal Cell Physiology. (165): 119-133.

- Lorence A, Darszon A, Díaz C, Liévano A, Quintero R, Bravo A (1995) δ -endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membrane vesicles in suspension and in planar lipid bilayers. FEBS Lett. (360): 217-222.
- Macías J (2001) Interacciones químicas entre *Hypsipyla grandella* y sus hospedantes, Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 60:15-21.
- MacRae S, Staden VJV (2000) Transgenic eucalyptus. In: Bajaj. Y.P.S., ed. Transgenic trees: biotechnology in agriculture and forestry. Berlin: Springer Verlag. Plant Cell Reports 17: 675-680.
- Mancebo F, Hilje L, Mora G, Castro V, Salazar R (2001) Biological activity of *Ruta chalepensis* (Rutaceae) and *Sechium pittieri* (Cucurbitaceae) extracts on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. Revista de Biología Tropical. 49(2): 501-508.
- Manzanilla RMA (2004) Tesis de Maestría: Inducción de embriogénesis somática en tejido nucelar de tres variedades de mango (*Mangifera indica* JL).
- Mayer S (2001) International regulation and public acceptance of GM trees: demanding a new approach to risk evaluation. Proc 1st Int'l Symp on Ecological and Societal Apects of transgenic Plantations. Oregon State University. 105-110.
- McCafferty HRK, Moore PH, Zhu JY (2008) Papaya transformed with the *Galanthus nivalis* GNA gene produces a biologically active lectin with spider mite control activity. Hawaii Agriculture Research Center. Alea Heights Drive, Alea. HI 96701, USA. Plant Science 175: 385-393.
- Merkle SA (1991) Maturation of yellow poplar somatic embryos. School of Forest Resources. University of Georgia. Athena's, Georgia Woody Plant Biotechnology. Plenum Press. 210: 179-187.
- Navarro C (2002) Genetic resources of *Cedrela odorata* L., and their efficient use in Mesoamérica. PhD Disertation, University of Helsinki, Helsinki, Finland. 356-364.
- Newton AC, Baker P, Ramarine S, Mesen JF, Leakey RRB (1993) The mahogany shootborer: prospects for control. Forest Ecology and Management. 57: 301-328.
- OIMT (2006) Organización Internacional de las Maderas Tropicales. La Misión de México. 14(2): 12-15.
- Parrott W (1993) Cell culture Biotechnology applications for banana plantain improvement, En; Proceeding of the workshop on byotechnology applicationns for banana and plantain improvement. San José, Costa Rica. Reunion INBAP. 183-191.
- Perez J, Eingenbrode S, Hilje L, Tripepi R, Aguilar ME, Mesen F (2010) Leaves from grafted Meliaceae species affect survival and performance of *Hypsipyla grandella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. Cardenas, Tabasco. Journal Pest Science 83: 95-104.

- Peumans WJ, Van Damme EJM (1995) *Plant Physiology* (109): 347-352.
- Pusztai A, Koninkx J, Hendriks H, Kok W, Hulscher S, Van Damme EJM, Peumans WJ, Grant G, Bardocz S (1996) Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of Griffonia simplicifolia lectin II. Departments of Entomology and Horticulture. Purdue University. *Journal Nutrition Biochem* 7: 677-682.
- Ruud AM, Dir B, Willem S (1999) *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in plant Science*. Elsevier Science 4(1): 9-13.
- Sánchez M (2003) Biotecnología: Ventajas y desventajas para la agricultura. *Revista Científica UDO Agrícola* 3(1): 1-11.
- Sánchez MV, Velásquez EC (1998) Evaluación de dos insecticidas biológicos en el control de *Hypsiphylia grandella* (Zeller), barrenador de brotes de las meliáceas. *Revista Ciencia Forestal en México*. 23(83): 33-39.
- Santiago JG, Levy-Benshimol A, Carmona A, (1993) *Journal Nutrition Biochem*. 2(4): 426-430.
- Sauka HD, Benintende BG (2008) *Bacillus turingiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el control de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Área Bioinsumos Microbianos, Instituto de Microbiología y Zoología agrícola (IMYZA). Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 40: 124-140.
- Senaratna T, McKersie B, Bowlery S (1990) Artificial seeds of alfalfa (*Medicago sativa* L). Induction of desiccation tolerance in somatic embryos. *In Vitro Cell Developmental Biology*. 16: 85-93.
- Setamou M, Bernal JS, Legaspi JC, Mirkov TE, Legaspi Jr (2002) Evaluation of lectin-expressing transgenic sugarcane against stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae): effects of life history parameters. Evaluation of lectin-expressing transgenic sugarcane against stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae): effects of life history parameters. *Journal Economy Entomology*. 95: 469-77.
- Simula M, Siquiera G, Sosa CV, Synnott T (2005) Achieving the ITTO Objective 2000 and sustainable forest management in Mexico. *International Tropical Timber Organization*. ITTO (XXXIX) 4(135): 59-75.
- Sondahl MR, Nakamura T, Sharp W (1991) Propagación *in vitro* del café. En: Roca W, Mroginski L. (eds). *Cultivo de tejidos en la agricultura fundamentos y aplicaciones* 621-642.
- Steward FC, Mapes MO, Mears K (1958) Growth and organized development of culture cells. II Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. *American of Journal of Botanic*. 10(45): 693-703.
- Tang W, Newton RJ (2003) Genetic transformation of conifers and its application in forest biotechnology. Springer Verlag. *Plant Cell Report* 22: 1-15.
- Tang W, Tian Y (2001) Regeneration of transgenic loblolly pine (*Pinus taeda* L) plant expressing a modified (δ)-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* with

enhanced resistance to *Dendrolimus punctatus* Walker and *Crypyothelea formosicola* Staud. Journal of Experimental Botany. 54: 835-844.

- Taveras R (1999) Bioecological aspects and damage characterization of *Hypsipyla grandella* (Zeller) in mahogany in Turrialba, Costa Rica. Magister Science Thesis. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1-83.
- Thorpe TA, Harry IS, Kumar PP (1991) Application of micropropagation to forestry. In Deberg P.C., Zimmerman RH. (ed): Micropropagation. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. 311-336.
- van Danne EJM, Clercq ND, Claessens F, Hemshoote K, Peeters B, Peumans JW (1991) Molecular cloning and characterization of multiple isoforms of the snowdrop (*Galanthus nivallis* L.) lectin. Catholic University of Leuven, Faculty of Agronomy, Laboratory for Phytopathology and Plant Protection, Willem de Croylan 42(186): 35-43.
- Verdeil JL, Hormung R, Huet C, Jacobsen HJ, Rillo E, Oropeza C, Bourdeix R, N'cho YP, Hoche V, Hamon S, Sangare A (1999) Recent progress on coconut micropropagation through a joined effort involving different countries. En: Oropeza C, Verdeil JL, Ashburner GR, Cárdena R, Santamaría JM (Eds). Current advances in Coconut Biotechnology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 391-405.
- Walter C, Grace LJ, Donaldson SS, Moody J, Gemmel E. van der Maas S, Kvalen H, Lonnerborg A (2004) An efficient biolistic transformation protocol for *Picea abies* embryogenic tissue and regeneration plants. Canada, Journal Forest Research 29: 1539-1548.
- Wilkins R, Allan G, Gara R (1976) Protection of Spanish cedar with controlled release insecticides. In: Whitmore, JL (Ed.). Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep. Pyralidae. San José, Costa Rica. IICA Misceláneos Publication. 101(3): 63-70.
- Xiao-Hua S, Bing YZ, Qin JH, Lie JH, Xiang HZ (2003) Advances in tree genetic engineering in china. In: proceedings of the xii World Forestry Congress. Quebec City, Canada. www.fao.org/docrep/article/wfc/xii/0280-b2.htm.
- Zhang X, Candas M, Griko N, Taussig R, Bulla LJr (2006) A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. Procedure National Academic Science. USA. 103: 9897-902.
- Zimmerman LJ (1993) Somatic Embryogenesis: A model for early development in higher plants. Department of biological sciences. University Of Maryland Baltimore County. Baltimore, Maryland. American Society of Plant Physiologists. The plant cell. 5: 1411-1423.

CAPITULO I. OBTENCIÓN DE UN SISTEMA DE REGENERACION *IN VITRO* DE CEDRO ROJO (*Cedrela odorata* L.), MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue establecer un sistema de regeneración *in vitro* mediante embriogénesis somática (ES) en cedro rojo (*Cedrela odorata*). Para inducir ES fueron analizado diversos factores: tipo de explante, tipo de medio de cultivo, efecto y concentración de regulador de crecimiento vegetal (RCV). Se realizaron dos experimentos, el primero consistió en utilizar hipocótilos y cotiledones como explantes, cultivado en medios Murashige y Skoog (MS) y Woody Plant Medium (WPM) adicionados con dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico), con dosis de (0.5 mgL^{-1} y 3 mgL^{-1}). El segundo experimento consistió en utilizar como explante embrión cigótico, cultivado en medio MS y WPM, adicionado con las auxinas dicamba y 2,4-D (0.5 mgL^{-1} y 3 mgL^{-1}) y con agua de coco (AC: 0%, 10%, 20% y 30%). En el primer experimento se obtuvo la formación de callos, el tratamiento MS dicamba 0.5 mgL^{-1} generó el 100 % de formación de callos e indujo los primeros embriones somáticos en cedro rojo después de 16 semanas de cultivo. La formación de embriones fue mayor en cotiledones 2 % vs hipocótilos en 1%. En el segundo experimento se observaron callos embriogénicos en los dos medios evaluados, el mejor tratamiento con el 28 % de inducción embriogénica fue MS suplementado con 2,4-D 0.5 mgL^{-1} 20 % AC, después de 17 semanas de cultivo *in vitro* se observaron diversos estados de la ES (preglobular, globular, corazón torpedo y cotiledonar). Este trabajo presenta los primeros reportes de un sistema de regeneración *in vitro* de cedro rojo mediante embriogénesis somática.

Palabras clave: Embriogénesis Somática (ES), cotiledones, hipocótilos, embrión cigótico, Cedro rojo

ABSTRACT

This work was to establish a system of *in vitro* regeneration by Somatic Embryogenesis (ES), of red cedar (*Cedrela odorata*) several factors were evaluated: type of explant (hypocotyl and cotyledons), type of culture medium (MS and WPM) effect and concentration (0.5 mgL^{-1} - 3 mgL^{-1}) Plant Growth Regulator PGR (dicamba and 2,4-D), by means design 2 hormonal swept pilot (a) and (b). The results of the first experiment show that callus formation was achieved in 100% treatment with the MS supplemented with 0.5 mgL^{-1} also induced dicamba same as the first somatic embryos red cedar ~26 weeks after *in vitro* culture. The second experiment resulted in the induction of embryogenic callus in both media formulations after ~17 weeks later identifying the various states of the ES (preglobular, globular, heart, torpedo and cotyledonary). Being thus one of the most suitable techniques that can address the need for a clonal production to propagate elite forest species tropical. On the other hand, one of the advantages of having this efficient production system for future use of genetic engineering in this tropical forest species of great interest to international forest industry. This has been used in other temperate forest species such as eucalyptus and poplar that have created varieties with certain agronomic benefits such as pest and disease resistance, stress tolerance, drought in the composition of lignin, cellulose production paper. Genetic transformation may integrate the foreign gene by two mechanisms: direct or indirect way, either through *Agrobacterium tumefaciens* by biolistics. It is worth mentioning that this prerequisite is covered, as is having the *in vitro* regeneration system (ES) red cedar.

Key words. Somatic Embryogenesis (SE), cotyledon, hypocotyls, zygotic embryos, Red Cedar

1.1 INTRODUCCIÓN

En los bosques tropicales y subtropicales, abundan una enorme diversidad de especies, entre las que se encuentran el cedro rojo (*Cedrela odorata* L.), que pertenece a la familia de meliáceas. Esta especie de madera tropical, se encuentra entre las más valiosas para el comercio internacional de la maderas, debido a sus características que van desde el aroma, durabilidad conferidas por sus propiedades físico-mecánicas, hasta la resistencia ante el ataque de termitas, entre otras (Muñoz 2003, Hilje y Cornelius 2001, Martínez *et al.* 2010, Pijut *et al.* 2011). Cabe mencionar que esta especie de árbol está siendo amenazada y está en peligro de extinción (IUCN 2011) debido a las prácticas de explotación forestal ilegal, la conversión a tierras agrícolas, entre otras. Además, de diversos factores bióticos adversos, que han mermado su presencia, como el ataque de una plaga barrenadora, *H. grandella* (Zeller) (Insecta: Lepidóptera: Pyralidae: Phycitinae), que se alimenta de los brotes apicales de árboles juveniles rompiendo la dominancia apical, conduciendo a la ramificación, perdiendo todo valor comercial forestal (Cornelius y Watt 2003). Los métodos de propagación vegetativa de cedro rojo en campo y/o invernadero son a menudo difíciles de llevar a cabo, debido a las características biológicas de las especies leñosas (Park 2002). Ante este panorama, es necesario disponer de otros sistemas regeneración eficiente de plantas, por ello el uso de técnicas emergentes, como la biotecnología y entre ellas, las técnicas de cultivo *in vitro* como la embriogénesis somática (ES), solventarían y/o permitirían la multiplicación masiva de cualquier material genético (germoplasma idéntico al de la planta madre) desde aportar nuevas variedades con características que representen ventajas en campo, resistencia a plagas y/o factores abióticos, escases de agua entre otros. La embriogénesis somática es considerada como la

capacidad que poseen cualquier célula somática de formar estructuras bipolares o embriones sin la fusión de gametos, mediante la adición de reguladores de crecimiento como: auxinas y citocininas (Peña y Lezcano 2001). Estas estructuras bipolares, siguen un patrón de desarrollo idéntico al de embrión cigótico, pasando a través de diferentes estados morfológicos característicos (globular, corazón, torpedo y cotiledonar) y por generarse de células no gaméticas, se conserva íntegramente el genotipo de la planta donante (Sutton 2002, Merkle y Dean 2000). En el establecimiento de un protocolo de ES se reconocen dos vías: A) La embriogénesis somática directa, caracterizada por la formación de los embriones somáticos sobre el explante (Freire 2003); B) La embriogénesis somática indirecta, donde las células no logran ser competentes para formar los embriones y pasan por un estado de desdiferenciación celular, denominado callo y después con la adición RCV, principalmente auxinas forman embriones somáticos sobre estos callos (Trigiano y Gray 2004). Este tipo de cultivo de tejidos, tiene la ventaja de proveer de un sistema de regeneración y propagación eficiente y clonal, además de generar bancos de germoplasma utilizando un espacio limitado y con un gran número de genotipos (Maruyama *et al.* 2004). La propagación *in vitro* a través de la embriogénesis somática ha sido un sistema regeneración muy utilizado en forestales de clima templado, caso contrario, a lo que sucedido en las especies de clima tropical, como las latifoliadas tropicales, son pocos los reportes entre ellos: *Cedrela odorata* (Nunes *et al.* 2007, Cameron 2010, Peña-Ramírez *et al.* 2011), *Swietenia macrophylla* (Collado 2006) y *Melia azedarach* (Vila *et al.* 2007), aun cuando estas especies representan un gran potencial económico forestal (Financiera Rural 2008). Por lo tanto el presente trabajo tiene como objetivo establecer un sistema de

regeneración y/o propagación clonal eficiente, que pueda ser utilizado en futuros eventos de investigación como la transformación genética, entre otros.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Material biológico

Se localizó un árbol elite de cedro rojo en el municipio de Sayula de Alemán Veracruz, México (17°53'N 94°57'E 80 msnm) (Longman 1993), donde se colectaron frutos inmaduros de 9 semanas post-antesis, Realizados entre los meses de Marzo-Abril del 2011, posteriormente fueron trasladados a la Unidad de Investigación en Biotecnología Vegetal (UNIBVE) del Instituto Tecnológico Superior de Acayucan (ITSA).

1.2.2 Axenificación de semillas de cedro rojo y germinación *in vitro*

Los frutos inmaduros de cedro rojo colectados, fueron expuestos al sol para que ocurra la dehiscencia de los frutos y la liberación de semillas. Las semillas fueron axenificadas mediante un protocolo de desinfección que consistió en la utilización de fungicidas y bactericidas: 2 g de captan[®], 2 g de manzate[®], 2 g de agrimicin[®] y 5 gotas de Tween 20[®], con 1L de agua estéril en matraz Erlenmeyer[®] (Pyrex), por un tiempo de 12-24 h, después se realizaron varios enjuagues con abundante agua estéril para eliminar restos de pesticidas, bajo una campana de flujo laminar, posteriormente las semillas fueron colocadas en una solución de hipoclorito de sodio NaClO (Clorox[®]), a una concentración del 0.6 % de 15 a 20 min, finalizado el tiempo de inmersión fue decantado, enjuagando tres veces con agua estéril abundante. Posteriormente fueron sumergidas en una solución de etanol al 70 % por 10 min, al término se enjuagó con agua estéril varias veces hasta eliminar todos los residuos. Estas semillas de cedro rojo axénicas fueron sembradas en 25 mL de medio semisólido MS (Murashigue y Skoog,

1962) contenido en frascos Gerber® (10 semillas por frasco), adicionadas con vitaminas MS, 3 gL⁻¹ de Gelrite®, 15 gL⁻¹ de azúcar y 0.25 gL⁻¹ de ácido ascórbico y cítrico como antioxidantes a un pH de 5.75. Estos frascos fueron transferidos al cuarto de incubación, bajo condiciones controladas [temperatura de 25±2 °C, bajo un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad), intensidad lumínica de 140 μM.m⁻².s⁻¹ y humedad relativa del 40 %], durante 30 días de cultivo. Las plantas germinadas *in vitro* fueron disectados en dos porciones: hipocótilos (1-1.5 cm) y cotiledones, utilizados como explantes para inducir a embriogénesis somática.

1.2.3 Establecimiento de ES por los barridos hormonales

Para inducir ES a partir de diversos explantes se realizaron 2 experimentos: a) Tipo de explante y b) Tipo y concentración Regulador de Crecimiento Vegetal (RCV). El primer experimento, consistió en utilizar diferentes tipos de explantes (hipocótilos y cotiledones) que fueron cultivados en medio MS y Woody Plant Medium [(WPM) (Lloyd y McCown 1981)], adicionados con dicamba, bajo dos concentraciones (0.5 mgL⁻¹ y 3 mgL⁻¹), adicionados con vitaminas MS, 3 gL⁻¹ de Gelrite®, 15 gL⁻¹ de azúcar y 0.25 gL⁻¹ de ácido ascórbico y cítrico como antioxidantes, a un pH de 5.75 esterilización en autoclave de 115 a 120 °C por 20 min y fueron incubadas con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, intensidad lumínica de 140 μM.m².s⁻¹, temperatura de 25 °C y humedad relativa del 40%.

El segundo experimento consistió en utilizar embriones cigóticos, obtenidos de las semillas axenificadas. Estos fueron cultivados en dos formulaciones de medios diferentes: MS y WPM (colocando 5 embriones por cada frasco y se realizaron 5

repeticiones por cada tratamiento), los tratamientos salieron de la combinación de dos hormonas: Dicamba y 2,4-D, a dos concentraciones (0.5 mgL^{-1} y 3 mgL^{-1}), agua de coco (0 %, 10 %, 20 % y 30 %), el medio se adicionó con vitaminas MS, 3 gL^{-1} de Gelrite®, 15 gL^{-1} de azúcar y 0.25 gL^{-1} de ácido ascórbico y cítrico, como antioxidantes, pH de 5.75 esterilización en autoclave de 115 a $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min y fueron incubadas con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, intensidad lumínica de $140 \mu\text{M.m.s}^{-1}$, temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa del 40%.

1.2.4 Proliferación de embriones somáticos (mantenimiento y proliferación de cultivos embriogénicos)

Para promover la proliferación, los tejidos embriogénicos fueron transferidos a un medio fresco MS suplementado con una citocinina 6-BAP (0.5 mgL^{-1} y 3 mgL^{-1}) que contenía 0.5 mgL^{-1} , adicionado con vitaminas MS, 3 gL^{-1} de Gelrite®, 15 gL^{-1} de azúcar y 0.25 gL^{-1} de ácido ascórbico y cítrico como antioxidantes, a un pH de 5.75 esterilización en autoclave de 115 a $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min, [temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, bajo un fotoperiodo de 16/8-h (luz/oscuridad), intensidad lumínica de $140 \mu\text{M m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y humedad relativa del 40%].

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Material biológico empleado para inducir ES

Las semillas de cedro rojo sembradas *in vitro*, después de 7-10 días de cultivo, emergió la radícula (raíz primaria), primer indicio de la germinación. Creciendo y desarrollando posteriormente, los cotiledones, el epicótilo y el hipocótilo (altura de $\sim 7\text{-}10 \text{ cm}$) (Figura

3). El porcentaje de germinación *in vitro* de estas semillas tuvo un rango de 80-90 %, con ello se generó suficiente material biológico para llevar a cabo el desarrollo de experimentos posteriores. Nuestros resultados muestran que el tiempo de germinación coincide con los reportados en otros trabajos (Ivanova 1981/ citado por Roca y Mroginski 1991), siendo este tiempo de germinación de dos semanas aproximadamente.



Figura 3. Germinación *in vitro* de *C. odorata*. A) Semillas germinadas de cedro rojo B) embrión cigótico inmaduro C) plántula germinada *in vitro*. Barras B) 0.5 mm, C) ~10 cm.

1.3.2 Efecto de dicamba en la inducción de la embriogénesis somática sobre diferentes tipos de explantes: hipocótilos y cotiledones

La inducción de ES se realizó mediante la variación de los siguientes factores: Tipo de regulador de crecimiento (RCV), concentración de RCV, tipo de medio de cultivo y finalmente, tipo de explante.

En nuestro primer resultado, se puede observar que después de 4 semanas de cultivo, los tratamientos fueron evaluados la mayoría de los explantes respondieron a la formación de callos, mientras que el tratamiento testigo (control) que fue el medio MS o WPM sin reguladores de crecimiento, siguieron su germinación normal.

Una vez cultivados, los explantes presentaron oxidación de los tejidos, posteriormente se formaron callos tanto de los explantes de hipocótilos y cotiledones, los cuales fueron diferentes en forma, color y entre otras características (Figura 4).



Figura 4 Efecto del explante sobre la inducción de callos. A) Explantes de hipocótilos con callos, observando uno de los tratamientos donde se obtuvo embriones somáticos, MS adicionado con 0.5 de dicamba. B) Explantes cotiledones sobre el cual se forman callos. C) Callos en los extremos de explantes de hipocótilos y C) Uno de los pocos callos embriogénicos obtenidos en cedro rojo.

En la (Figura 5), se muestra que existe diferencia en la respuesta inducción de callo, utilizando como explantes los cotiledones, donde al parecer responden mejor a la presencia de dicamba, debido a que tienden a formar hasta 5 veces más callos en comparación con explantes de hipocótilos. En la formulación del medio se puede concluir que el medio MS favoreció en su totalidad a esta formación de callos en

comparación con el medio WPM, donde fue mucho menor. Finalmente, las concentraciones bajas de dicamba favorecen esta respuesta, que el uso de las concentraciones mayores. De todos los tratamiento, cabe mencionar que el medio MS adicionado con dicamba 0.5 mgL^{-1} y teniendo como explantes los hipocótilos, después de varios subcultivo logró desarrollar la formación de embriones somático, sin embargo el porcentaje fue muy bajo de 1-2 %. Esto indica la baja frecuencia de respuesta de las células somáticas para llegar a ser competentes y desarrollar los embriones somáticos. Este callo embriogénico, mostraba una consistencia semidisgregable y color beige claro sobre las porciones del explante completamente oxidadas, evidenciando algunas estructuras preglobulares (Fig. 4), siendo uno de los indicativo primordiales la presencia de la embriogénesis somática en cedro rojo.

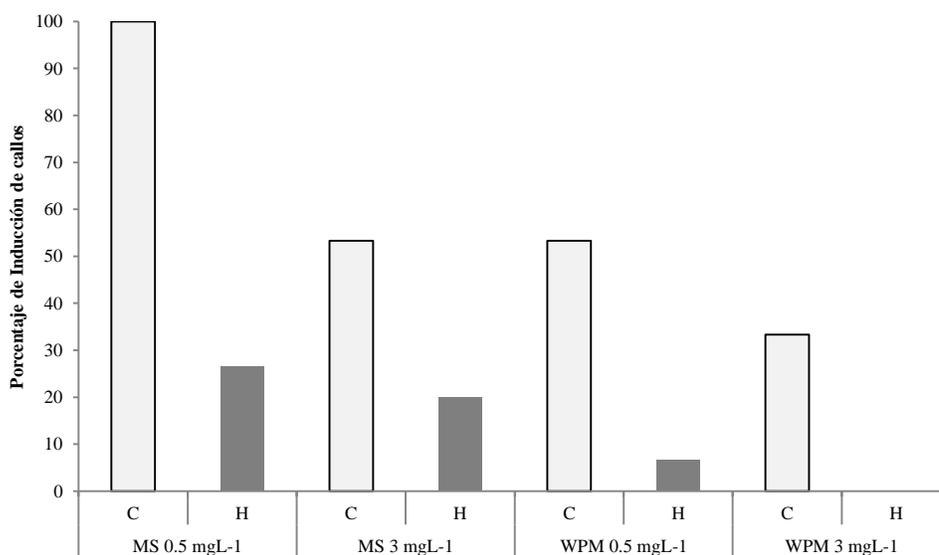


Figura 5 Porcentaje de inducción de callos empleando la auxina dicamba sobre dos tipos de explantes de (hipocótilos (H) y cotiledones (C) cultivados en medios MS y WPM.

1.3.3 Inducción en la embriogénesis somática, efecto de Dicamba y 2,4-D

Debido a la baja inducción de ES obtenido en el primer experimento, se diseñó otro barrido hormonal. El cual consistió en utilizar como explante el embrión cigótico de cedro rojo, cultivado en dos formulaciones de medios semisólidos MS y WPM, adicionado con dos auxinas: dicamba y 2,4-D (0.5 mgL^{-1} - 3 mgL^{-1} respectivamente), además de la presencia del agua de coco (0, 10, 20 y 30%). Nuestros resultados, muestran que después de 4 semanas de cultivo *in vitro*, se obtuvo un 100 % de formación de callos (Figura 6 y 7), mientras que el tratamiento testigo (control) que fue el medio MS o WPM sin reguladores de crecimiento, siguieron su germinación normal. Los callos formados variaron en sus características (Figura 5), dependiendo principalmente del tratamiento del que se formaron (regulador de crecimiento que se utilizó para su inducción, así como la concentración del mismo, si en su caso se utilizó agua de coco y en qué porcentaje, finalmente el tipo de medio de cultivo). Con fines prácticos se dividió en dos partes el experimento: A) WPM (Figura 6) y B) MS (Figura 7).

De forma general se tiene como resultados de la caracterización de los callos formados tres grandes tipos: 1) los callos de apariencia compacta, endurecida y poco friable, de colores blanco, verde, 2) Los callos presentaron unas estructuras aparentemente pre-globulares de color amarillo claro, densas, disgregables y 3) callos organogénicos, es decir con formación de hojas y/o raíces. Cabe mencionar que estos se definieron a partir de la tercera semana, donde el explante, empezó a desarrollar estructuras indefinidas (amorfas), establecidos las formulaciones de los medios MS y WPM (Figura 8 y 9).

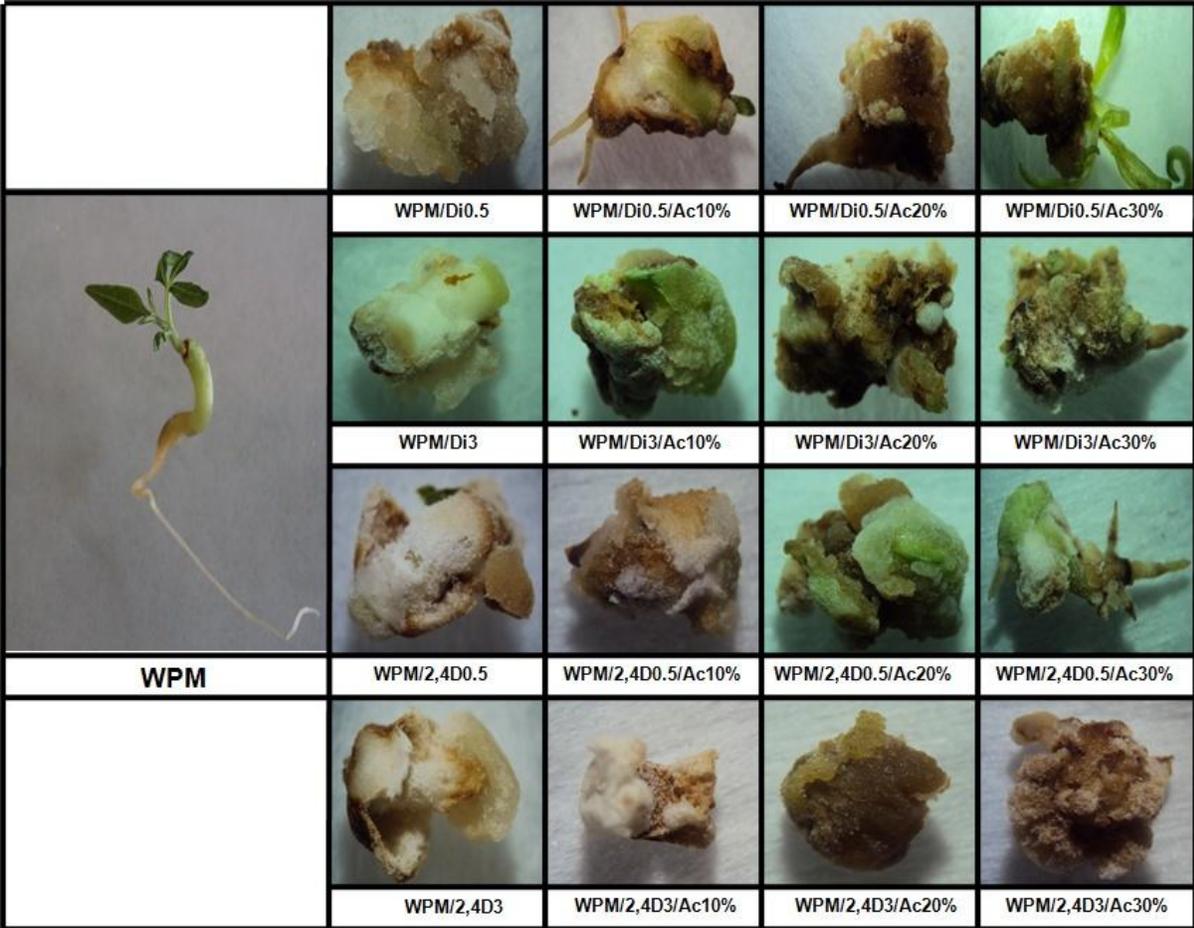


Figura 6. Matriz hormonal de cedro rojo cultivado en un medio con WPM con diferentes reguladores de crecimiento (Dicamba y 2,4-D), adicionados con agua de coco (0, 10, 20, 30 %). Ac= agua de coco

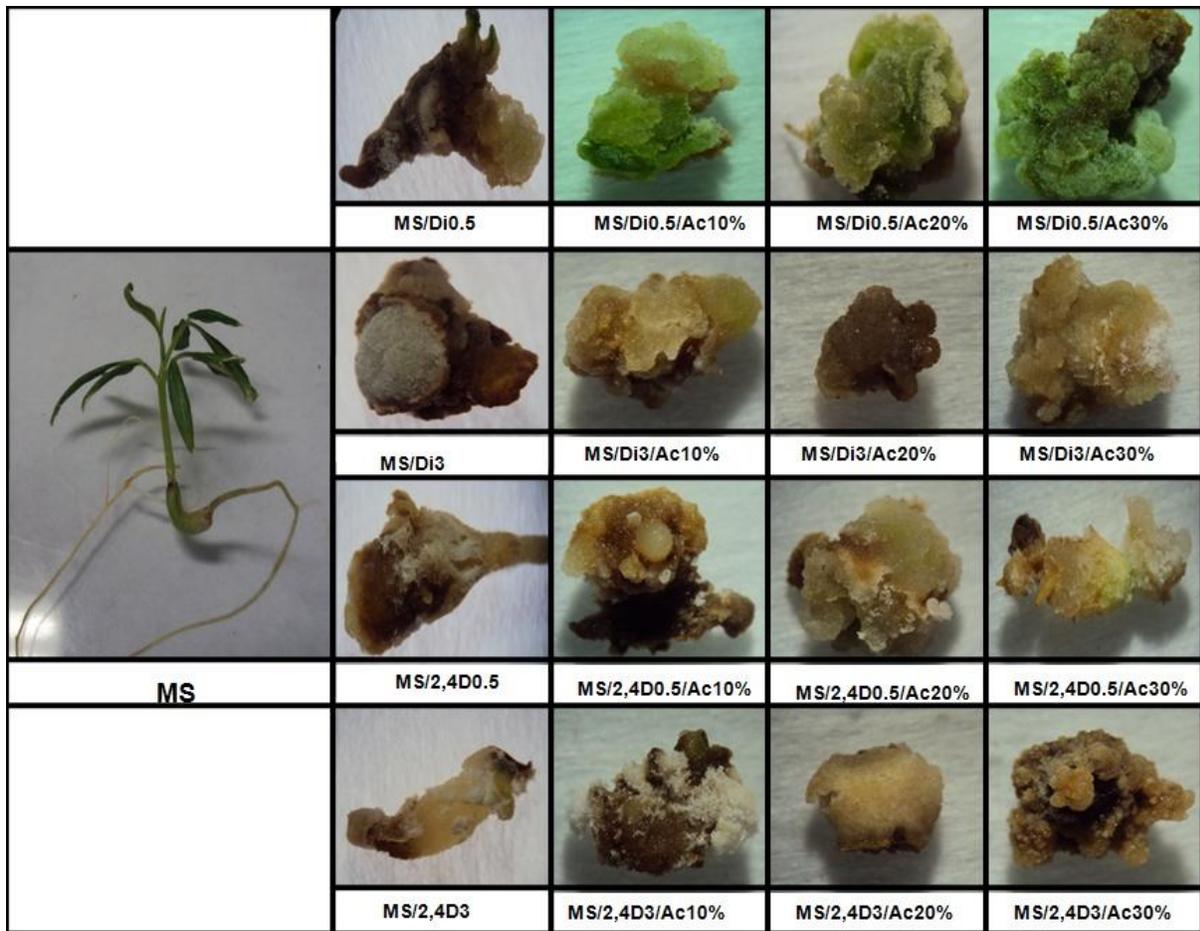


Figura 7. Matriz hormonal de cedro rojo cultivado en medio MS con diferentes reguladores de crecimiento (Dicamba y 2,4-D), adicionados con agua de coco (0, 10, 20, 30%).. Ac= Agua de coco.

Se generaron aproximadamente 34 tratamientos, incluyendo 2 tratamientos control, de los cuales 17 tratamientos fueron cultivados en medio MS y los restantes, 17 tratamientos en el medio WPM.

La (Figura 6) muestra los resultados obtenidos en la inducción de ES en cuando se cultivaron en la formulación del medio MS adicionado con dos auxinas (2,4-D y dicamba), además de agua de coco (10, 20 y 30 %). En general se puede observar que solo siete tratamientos lograron responder favorablemente a la formación de ES. Sin embargo, el mejor tratamiento fue T12 que consiste en medio MS, adicionado con 2,4-D a una concentración de 0.5 mgL^{-1} debido a que logro obtener una respuesta de ~30%

en esta inducción a la embriogénesis somática en cedro rojo. De los restantes 6 tratamientos los resultados en la inducción de ES fueron decrementado de 28 hasta 4% en presencia de 2,4-D y dicamba, adicionado con o sin agua de coco.

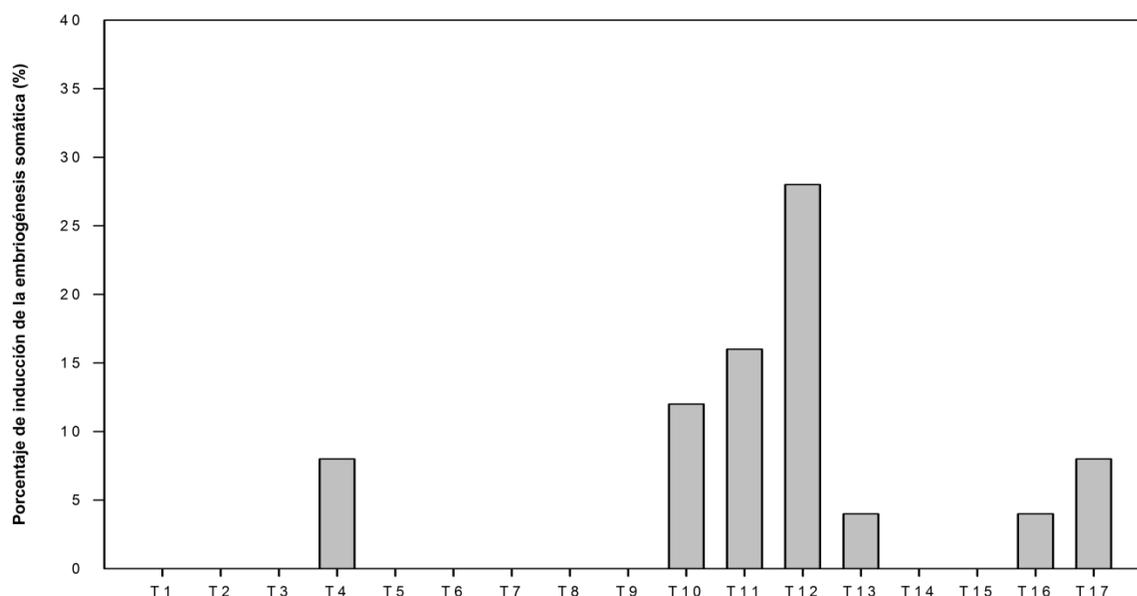


Figura 8. El porcentaje de la inducción de la ES en los callos obtenidos en la matriz hormonal para los tratamientos con MS. En donde se puede observar que los tratamientos con respuesta embriogénica fueron pocos: T4, T10, T11, T12, T13, T16, T17, concluyendo que el mejor tratamiento para esta inducción de ES resulto ser en T12 (MS con 0.5 mg/L 2,4D y 20% de agua de coco), con el 30%.

El experimento que corresponde a los explantes cultivados en medio WPM (Figura 9) se puede observar que hubo una inducción de la embriogénesis somática, solo en cuatro tratamientos de los 17 realizados. De manera general, bajo este medio cultivo, se puede concluir que el tratamiento T27 (que consistió en medio WPM adicionado con 2,4-D a una concentración de 0.5 mg L^{-1} , siendo el de mayor relevancia por tener un promedio de entre 10-15% en la inducción de esta embriogénesis somática, seguido del tratamiento T34 (el cuál consistió en medio WPM adicionado con 2,4 D a 3 mg L^{-1} , además de 30% de agua de coco) con un promedio de 8-10% de inducción de ES, aproximadamente después de 30 días de cultivo en cedro rojo. Si comparamos esto

resultados con los obtenidos en la formulación de medio MS, observamos que esta inducción tan solo logro la mitad del porcentaje de inducción de Es. Basados en nuestros resultados, podemos decir que el mejor tratamiento para la inducción de la ES en cedro rojo es utilizar el medio MS adicionado con bajas concentraciones de 2,4-D.

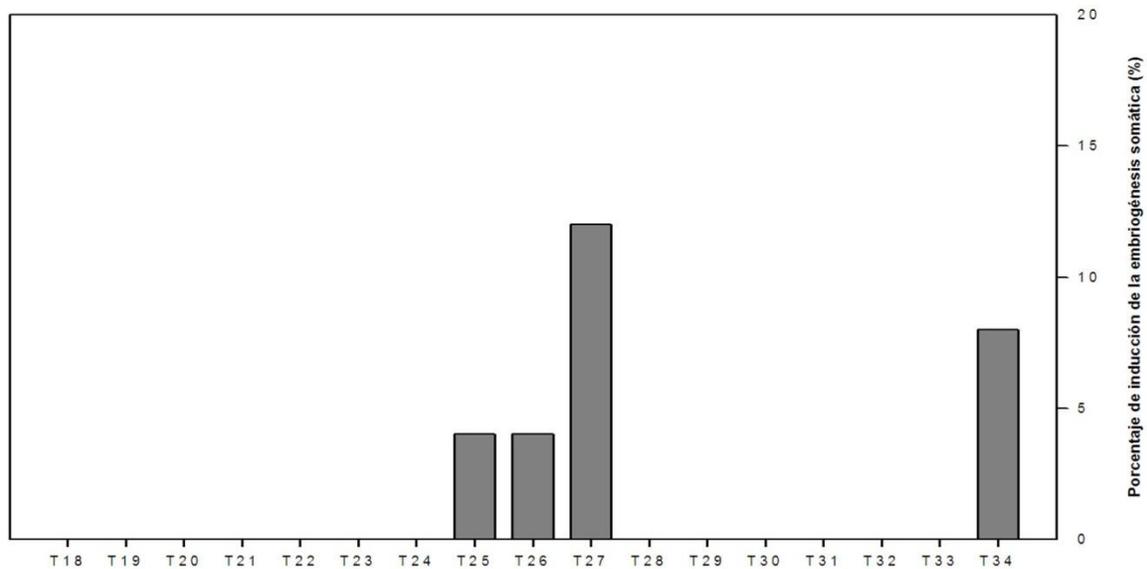


Figura 9. El porcentaje de la inducción de la ES en los callos obtenidos en la matriz hormonal para los tratamientos con WPM. En donde se puede observar que los tratamientos con respuesta embriogénica fueron T25, T26, T27, T34, siendo el T27 en donde el porcentaje fue el máximo en la inducción de la ES con el 15%.

La embriogénesis somática como se ha reportado es un proceso por el cual las células somáticas bajo condiciones de inducción, pueden generar células embriogénicas, las cuales presentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos resultando en la formación de un embrión somático, el cual puede eventualmente desarrollarse en una planta. Como ha sido el caso de esta embriogénesis somática en cedro rojo. Muchos reportes además, mencionan que los embriones somáticos de las dicotiledóneas pasan a través de estados morfológicos característicos, los cuales son: preglobulares,

globular, torpedo, acorazonado y cotiledonar, como se ha identificado claramente en el cultivo *in vitro* de cedro rojo (Kato y Takeuchi 1963, Halperin 1966, Figura 10). Nakamura *et al.* (1992) también reportó que son cinco estados de desarrollo de la embriogénesis somática *C. arabica*, similar a nuestros resultados. De manera general, en todos los tratamientos que tuvieron efecto positivo en la inducción de la embriogénesis somática, el regulador de crecimiento utilizado fue una auxina sintética como el 2,4-diclorofenoxi-acético (2,4-D). Otros autores han mencionado que el procedimiento base para la producción de los embriones somáticos involucra el uso de medio de cultivo suplementado con un regulador sintético, como una auxina, *e.g.*, 2,4-diclorofenoxi-acético (2,4-D), citocininas *e.g.*, cinetina (kin), o combinación de dos o varios reguladores de crecimiento [(citocininas, ácido abscísico (ABA); Gallo-Meagher and Green 2002, Feher *et al.* 2003]. En cedro rojo, se necesitó el suplemento de 2,4-diclorofenoxi-acético (2,4-D) en baja concentración. Reportes similares, se encontraron en la embriogénesis somática, el tejido inicial requiere de una auxina y más tarde son transferidos a un medio de cultivo con baja concentración (Vargas-Loyola 2002). Además de otros autores que reportaron resultados similares (Steward 2010 y Villa *et al.* 2009).

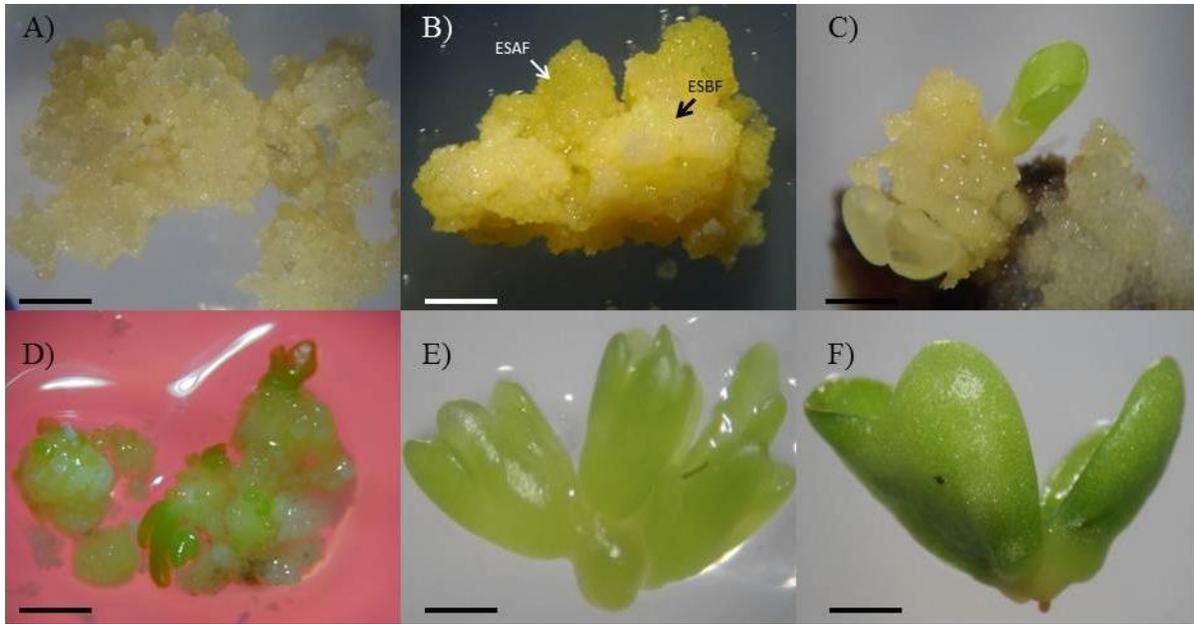


Figura 10. Diferentes estadios de la embriogénesis somática de cedro rojo. A) y B) embriones somáticos de cedro rojo en estado globular y pre-globular, C) estadio de corazón, D) Embrión somático en estado de torpedo, E) embriones somáticos torpedo-cotiledonar, F) estadio de cotiledón.

1.3.4 Proliferación de embriones somáticos

Por lo tanto, la siguiente etapa en este desarrollo de los embriones somáticos es la proliferación, para ello se decidió utilizar una mezcla de auxinas y citocininas. Como se ha reportado las auxinas son factores determinantes que han sido asociados con la proliferación continua, de las células embriogénicas (Gómez 1998). Esta etapa se logró a través de la siembra de estos los embriones somáticos en medios de cultivos adicionados con los reguladores de crecimiento: El ácido indolbutírico (IBA) y 6-benzilamino-purina (BAP) con 1 mg L^{-1} , obteniéndose un alto rendimiento (aumento del casi 30% de las cajas Petri en los sub-cultivos con estas hormonas) en la formación de las masas embriogénicas, su tamaño incremento considerablemente, presentando el color amarillo-crema, característico de la embriogénesis somática generada y manteniéndose, la individualidad de las células en estados pre-globulares y globular, principalmente. A continuación se presenta la gráfica 6, en donde podemos observar

que esta proliferación presento un crecimiento exponencial durante todos estos sub-cultivos, característico de la embriogénesis somática. Cabe mencionar que durante este experimento, se presentó la sincronización del cultivo es decir, la mayoría de callos embriogénicos se encontraban en estado preglobular y/o globular.

1.4 DISCUSIÓN

Diversos autores como Muñoz 2003, Vila *et al.* 2007, mencionan que existen varios factores como concentración de RCV, estado y tipo del explante, fuente de carbohidratos, agente gelificante, luz y tiempo, que afectan el proceso de inducción de la embriogénesis somática. Como pudimos observar, nuestros resultados confirman estas aseveraciones, cuando se utiliza cotiledones o hipocótilos, el tipo de regulador dicamba o 2,4-D, pueden eventualmente hacer que las células somáticas sean competentes para llevar a cabo la formación de los embriones somáticos en cedro rojo. Además se debe mencionar que de los 34 tratamientos, aquellos que lograron responder hacia este proceso de la ES, iniciaron con fenolización de los explantes y los callos, similar a la observación de Muñoz (2003) donde menciona que en algunos casos la oxidación del tejido ocasionado por el estrés producto de la activación de compuestos fenólicos, puede actuar como un inductor de la embriogénesis somática.

Los RCV resultan un factor determinante en este proceso, Titón (2007) utilizo bajas concentraciones de dicamba (0.5 mgL^{-1} y 2 mgL^{-1}) en explantes de hipocótilos y cotiledones de la especie *E. grandis* para inducir ES, después de 30 días de cultivo mostraron una respuesta del 100 % de formación de callos embriogénicos. Sin embargo, en cedro rojo no tuvo es efecto, teniendo tan solo un ~15 % en la inducción

de la embriogénesis somática. Sin embargo, cuando se utilizó el 2, 4-D este porcentaje en la inducción de ES se duplicó. Similar a lo que han mencionado otros autores como Puigderrajos *et al.* (2001) donde resaltan que la auxina 2,4-D como eficiente y de uso común, en la promoción de la embriogénesis somática debido a que: 1) estimula una rápida división celular, 2) estimula una división celular sincronizada que da como resultado células proembriogénicas y 3) estimulan la división de células proembriogénicas.

Cabe mencionar que la presencia del endospermo líquido de coco aun cuando se ha reportado que contiene con una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos tales como: aminoácidos, azúcares, compuestos nitrogenados, vitaminas, ácidos orgánico, capacidad de amortiguadora etc., en nuestro resultados no mostró efecto marcado.

El tipo de explante tiende además marcar la competencia de las células somática para inducción de los embriones somáticos, nuestros resultados muestran que cuando se utilizó como explante los embriones cigóticos inmaduras el porcentaje de esta inducción fue de al menos 25 veces más. Como se ha reportado en diversos trabajos donde mencionan al embrión cigótico como el explante apropiado para efectuar eventos de embriogénesis somática, en especies forestales ha sido reportado para *Eucalyptus globulus* (Pinto *et al.* 2002), *Loblolly pine* (Vales *et al.* 2006), en especies de *Neem* (Su *et al.* 1997, Murty y Saena 1998, Akula *et al.* 2003, Vila *et al.* 2003, Chaturvedy *et al.* 2004), en árbol de paraíso [(*Melia azederach* L.) Vila *et al.* 2003], en *Cedrela fissilis* Well (Vila *et al.* 2009), en *Cedrela odorata* (Peña-Ramírez *et al.* 2011, Cameron 2010) y *Swietenia macrophylla* (Collado 2006), y en otras especies de

meliáceas como *Azadirachta excelsa* (Giagnacovo *et al.* 2001) y *Azadirachta indica* (Salvi *et al.* 2001).

1.5 CONCLUSIÓN

En los tratamientos con Dicamba, para la inducción de la embriogénesis somática, se logró establecer que la concentración de 0.5 mgL^{-1} fue la óptima para inducir la formación de embriones somáticos en explantes de hipocótilos, sin embargo fue de 1-2 % de inducción de ES en cedro rojo. Por otro lado, Al usar la formulación del medio MS y como resultado de los tratamientos se puede concluir que el mayor porcentaje en la formación de los embriones somáticos se observaron cuando se utilizó el 2,4 a una concentración de 0.5 mgL^{-1} con o sin agua de coco, obteniendo hasta un 30% aproximadamente en cedro rojo. En comparación con los tratamientos donde la formulación del medio cambio a WPM, se mostró menor porcentaje de hasta el 15%, en la formación de masas embriogénicas somáticas, utilizando el mismo regulador de crecimiento, el 2, 4 D concentraciones bajas de 0.5 mgL^{-1} .

Finalmente, esta embriogénesis somática indirecta se caracterizó por observar todas sus etapas: preglobular, globular, de corazón, torpedo y cotiledonar temprano y tardío en esta especie forestal tropical de enorme importancia económica para industria de las maderas internacionales.

1.6 LITERATURA CITADA

- Akula C, Akula A, Drew R (2003) Somatic embryogenesis in clonal neem, *Azadirachta indica* A. Juss and analysis for *in vitro* azadiracthin production, *in vitro* cell Device Biology Plantarum. (39): 304-310.
- Cameron SI (2010) Plant regeneration in Spanish cedar, *Cedrela odorata* L., using zygotic embryo explants from mature seed and improvement of embryogenic nodule initiation by heat shock. Natural Research Canada. *In Vitro* Cell. Development Biology Plantarum (46): 126-133.
- Chaturvedy R, Razdan MK, Bhowani SS (2004) *In vitro* morphogenesis in zygotic embryo cultures of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). Plant Cell Report (22): 801-809.
- Collado R, Barbón R, Agramonte D, Jiménez TF, Pérez M, Gutiérrez O (2006) Embriogénesis somática directa en *Swietenia macrophylla* King. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Martha Abreu de Las Villas, Villa Clara, Cuba. Artículo científico. 6(2): 67-71.
- Cornelius JP, Watt A (2003) Genetic variation in a *Hypsipyla*-attacked clonal trial of *Cedrela odorata* under two pruning regimes. Elsevier. Centre for Research and Higher Education in Tropical Agriculture (CATIE). Elsevier. Forest Ecology Manager. 183(1): 341-349.
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell Tissue and Organ Culture. (74): 201-228.
- Financiera Rural (2008) Sector Forestal en México. Dirección Ejecutiva de Coordinación y Evaluación Regional. México.1-14.
- Freire MS (2003) Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Instituto de Biotecnología de Plantas. Universidad central "Martha Abreu" de las villas. Villa Clara, Cuba. Biotecnología Vegetal. 3(4): 195-209.
- Gallo MM, Green J (2002) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of saw palmetto, an important landscape and medicinal plant. Plant Cell Tissue Organ Culture. 68: 253-256.
- Giagnacovo G, Pasqua G, Monacelli B, Van S, Maccioni O, Vitali F (2001) Organogenesis and embryogenesis from callus cultures of *Azadirachta excelsa*. Plant biosystems. 135:13-18.
- Gómez A, Aravanopoulos PA, Alía R, Bueno MA (1999) *Pinus halepensis* RAPD markers: Linkage and genetic diversity. En Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Espinel S., Ritter E. (Ed). 99: 143-146.
- Halperin W (1966) Alternative morphogenic events in cell suspensions. American Journal Botany. 53: 443-453.
- Hilje L, Cornelius J (2001) ¿Es inmanejable *Hypsipyla grandella* como plaga forestal? Unidad de Fitoprotección. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Técnico de

- Investigación y Enseñanza (CATIE). Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas (38): 1-4.
- IUCN (2011) International Union for Conservation of Nature. Red list of threatened species, Version 2011.2 Acces: <http://www.iucnredlist.org>. Fecha de consuta 30 de Enero de 2012.
- Ivanova Z (1981) Rapid vegetative propagation of conifers. *Scientia Horticulturae*. 14: 347-355.
- Kato H, Takeuchi M (1963) Mhorphogenesis *in vitro* starting from single cells of carrot root. Department of botany. Faculty of Science. Oxford Journal. *Plant and Cell Physiol*. 4: 243-245.
- Lloyd G, and McCown B (1981) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use shoot tip culture. *Comb. Proc. Intern. Plant Proc. Soc.* (30): 421-427.
- Longman KA (1993). Rooting cuttings of tropical trees. *Tropical trees: propagation and planting manuals*. Common wealth Science Council. London, (1): 1-137.
- Loyola VVM (2002) Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports* 20: 1141-1149.
- Martínez RR, Azpiroz RSH, Rojo MR (2010) Biotecnología aplicada a los recursos forestales. *Libros Técnicos: Serie Forestal*. Ed. Universidad Autónoma Indígena de México. Sinaloa, México. (1): 83-86.
- Maruyama E, Hosoi Y, Ishii K (2004) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seeds of *Pinus armandi* var. *amaniana*, a species threatened with extinction. *Trans, Annual Meet. Japón. Forest Society* 115-162.
- Merkle SA, Dean JFD (2000) Forest tree biotechnology. *Current Opinion Biotech* (11): 298-302.
- Muñoz TS (2003) Embriogénesis somática en cedro (*Cedrela odorata* Linneaus) a partir de cotiledones. Tesis para optar el título de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Agraria La Molina (UANLM). Lima, Perú. 43-46.
- Murashigue T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*(1) 473-497.
- Murthy BNS, Saena PK (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration of neem (*Azadiractha indica* A. Juss). *Plant Cell Report*. (17): 469-475.
- Nakamura T, Taniguchi T, Maeda E (1992) Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope. *Japan Journal Crop Science*. 61: 476-486.
- Nunes DCE, Volkmer de CC, Netto F, Viana A (2007) *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (*Meliaceae*). *Plant Cell Tissue and Organ. Culture* (70): 259-268.

- Park YS (2002) Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. Natural Resources Canada. *Annal Forest Science* (59): 651-656.
- Peña J, Lezcano J (2001) Cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King x *Swietenia mahogani* Jacq. Trabajo de diploma en opción al título de Ing. Forestal, Universidad de Pinar del Rio Hermanos Zais Montes de Oca, Pinar del Rio.
- Peña RYJ, García SI, Hernández EA, Domínguez FAB, González PJAR, Robert ML (2011) Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in the tropical timber tree Spanish red cedar (*Cedrela odorata* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*. (105): 203-209.
- Pijut PM, Lawson SS, Michler CH (2011) Biotechnological efforts for preserving and enhanceing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity. *In vitro Celular and Developmental Biology Plant* 47: 123-147.
- Pinto G, Santos C, Neves AC (2002) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell Report*. 3(21): 208-213.
- Puigderrajols P, Mir G, Molinas M (2001) Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Quercus suber* L.) *Annals of Botany*. 87(2): 179-189.
- Roca WM, Mroginski LA (1991) Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 969 p.
- Salvi D, Singh H, Tivarekar S, Eapen S (2001) Plant regeneration from different explants of neem. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 65: 159-162.
- Steward IC (2010) Plant regeneration in Spanish cedar, *Cedrela odorata* L., using embryos explants from mature seed and improvement of embryogenic nodule initiation by heat shock. Natural Resources Canada, Canadian Forest Service 46:126-133.
- Su WW, Hwang WI, Kim SY, Sagawa Y (1997) Induction of somatic embryogenesis in *Azadirachta indica*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* (50): 91-95.
- Sutton B (2002) Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantations using somatic embryogenesis. *Annal of Forest Science* (59): 657-661.
- Titon M, Xavier A, Campos OW, Yshimitsu MS (2007) Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na Embriogenese Somática em *Eucalyptus grandys*. Programa de Pós-Graduacao em Ciencia Florestal da Universidad Federal de Vicosa. Sociedade de investigacoes florestalis Vicosa-MG. 31(3): 417-426.
- Trigiano N, Robert GJ, Dennis (2004) *Plant Development and Biotechnology*. Editorial CRC PRESS. London, New York. (1): 87-95.

- Vales T, Feng X, Ge L, Xu N, Cairney J, Pullman GS, Gary FP (2006) Improved somatic maturation in loblolly pine monitoring ABA-responsive gene expression. Institute of Paper Science and Technology. *Plant Cell Report* (26): 133-143.
- Vila KS, Rey YH, Mroginski AL (2007) Factors affecting somatic embryogenesis induction and conversion in "Paradise Tree" (*Melia Azedarach* L.). Instituto de Botánica del Nordeste. Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE). Argentina. *Journal Plant Growth Regulator*. (26) 268-277.
- Vila S, Gonzalez A, Rey H, Mroginski L (2003) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of *Melia azedarach* (Meliaceae). *In vitro* cell dev. *Biology Plantarum*. (39) 283-289.
- Vila S, Gonzalez A, Rey H, Mroginski L (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cedrela fissilis*. Instituto de Botánica del Nordeste. Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE). Corrientes, Argentina. *Biology Plantarum* 53(2): 383-386.

CAPÍTULO II TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN ESPECIES FORESTALES MADERABLES

RESUMEN

El crecimiento demográfico avanza constantemente y la demanda de productos forestales maderables es mayor en la población, en los próximos 30 años se estima que la demanda de productos maderables pondrá en peligro diversas poblaciones naturales de diversas especies forestales, ocasionado por la sobreexplotación, la erosión genética, el cambio de uso de suelo apto para el establecimiento de plantaciones forestales por cultivos y terrenos destinados a la cría de ganado. Es necesario buscar técnicas apropiadas que puedan solventar esta necesidad en diversas partes de mundo. Para satisfacer esta demanda también se requieren de diseño y estrategias que obtengan mejoras en las especies forestales como: rápido crecimiento, resistencia a plagas y enfermedades. El uso de diversas herramientas biotecnológicas como la Ingeniería Genética (IG) proporciona nuevas características modificando el genoma de la planta como: tolerancia al estrés biótico y abiótico, resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a sequía, mejoras en la composición de lignina, etc.; características que son integradas mediante vías de transformación genética como *Agrobacterium thumefaciens* y/o Biobalística, etc. Actualmente el mecanismo de resistencia más utilizado es a partir del uso de cristales de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*, con efecto insecticida. Para llevar a cabo estas características en el genoma de la planta, es necesario disponer de un sistema de regeneración (Embriogénesis Somática), mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales CTV *in vitro*, asociado directamente como uno se los requerimientos esenciales en eventos de transformación genética.

Palabras Clave: Transformación genética, Biotecnología, árboles forestales, *Agrobacterium thumefaciens*, Biobalística

ABSTRACT

The demographic growth constantly advances and the demand of products forest timber is bigger in the population, in next 30 years it's considered that the demand of products timber will put in danger diverse natural populations of diverse forest species, caused by the under exploitation, the genetic erosion, the change of use of capable soil for the establishment of forest plantations for cultivations and lands dedicated to the livestock breeding. It's necessary to search for appropriate techniques that can solve this necessity in diverse world parts. To satisfy this demand they are also required of design and strategies that you/they obtain improvements in the forest species as: quick growth, resistance to plagues and disease. The use of diverse biotechnical tools as the Genetic Engineering (GE) it provides new characteristics modifying the genome of the plant like: tolerance to the stress biotic and abiotic, resistance to plagues and disease, tolerance to drought, improvements in the lignin composition, etc.; characteristic that are integrated by means of roads of genetic transformation as *Agrobacterium tumefaciens* y/o Biolistic, etc. at the moment the used resistance mechanism is starting from the use of glasses of the proteins Cry of *Bacillus thuringiensis*, with insecticide effect. To carry out these characteristics in the genome of the plant, it is necessary to have a regeneration system (Somatic Embryogenesis), by means of technical of cultivation of vegetable fabrics CTV *in vitro*, associate directly like one you the essential requirements in events of genetic transformation.

Key Words: Genetic transformation, Biotechnology, Forest Trees, *Agrobacterium Thumefaciens*, Biolistic

2.1 INTRODUCCIÓN

El consumo de madera se está incrementando con el aumento de la población y el desarrollo económico, sobreviene la demanda de productos forestales maderables, por consiguiente existe la necesidad en conservar los ecosistemas forestales, por su alto valor estético y ecológico, situación que conlleva a realizar grandes esfuerzos alrededor del mundo obtener un mantenimiento forestal sostenible (FAO 2004). La demanda de productos madereros se encuentra vinculada con el aumento de la población y al desenvolvimiento económico. Conocer la productividad de los bosques de plantaciones comerciales es necesario para entender la demanda mundial de madera y productos que de ella se obtienen de manera sustentable, que conserve las condiciones naturales y la biodiversidad, valorando los beneficios de desarrollo económico (Nehra *et al.* 2005). A partir de esta problemática existente surgen nuevas herramientas que permiten dar solución a la situación actual forestal. El desarrollo de técnicas de manipulación genética, como la transformación genética constituye un valioso apoyo a los sistemas de mejoramiento convencional, principalmente en aquellas situaciones en las cuales el acceso a genes de interés se encuentra limitado. Desde su aparición en 1980, la transformación genética se ha presentado como una herramienta biotecnológica que perfecciona las técnicas de mejoramiento convencional, perfeccionando las características deseadas en una planta, es decir que mediante la transformación genética se pueden obtener genotipos con mayor productividad y calidad, ya que la transformación genética consiste en la introducción controlada de un gen o fragmento de ADN en el genoma de una célula receptora y su expresión posterior, asumiendo la significancia adicional, dando nuevas perspectivas al mejoramiento genético de especies forestales, extendiendo y disponiendo nuevos

genes con características deseables, incorporados en un pequeño periodo de tiempo (Sartoretto *et al.* 2008, Diouf 2003). Los primeros reportes de plantas transgénicas en especies forestales se dieron a partir de 1983, significó un papel clave en la evolución de la Biología de plantas, con grandes beneficios, mostrando nuevas perspectivas en programas de mejoramiento genético, la disposición de nuevos genes que anteriormente estaban indisponibles debido a la incompatibilidad sexual o la variabilidad genética, ahora es posible gracias a la transformación genética (Stuart-Guimaraes *et al.* 2003). En especies forestales la transformación genética ha sido punto clave permitiendo su extensión en diversas partes del mundo desde que fue aprobado en 1994 (Hodson 2005). En reportes de la (FAO 2004), estimó que en 16 países se están realizando más de 210 ensayos, las especies forestales de mayor interés son del género *Populus* el más estudiado con 51 % de ensayos, *Pinus* con el 23%, liquidámbar 11% y en eucalipto 7 %. La mayoría de estas especies 64 % se están evaluando en países desarrollados como: Estados Unidos, Francia y Finlandia en Europa. Los ensayos comprenden básicamente: tolerancia a herbicidas 13 %, resistencia biótica 9 %, química de la madera o estudio de fertilidad 6 %. En países en desarrollo como China ha informado la liberación a escala comercial de *Populus* transgénico, con 1.4 millones de plantas establecidas en campo en el año 2003 (Valenzuela *et al.* 2006). La FAO estima que China es el país más grande importador de leños industriales y el segundo importador más grande en el mundo de productos forestales (Lu 2004). Como es notorio los programas de mejoramiento genético forestal existentes poseen fines propósitos como la obtención de árboles de crecimiento acelerado, adaptado y resistente a plagas. Con la convicción de que las propiedades de la madera posee un

efecto muy importante sobre la calidad y rendimiento de la mayoría de sus productos (Zobel y Jett 1995, Zhang *et al.* 2003). En este artículo de revisión de literatura, está enfocado al análisis sobre de las ventajas que se obtienen a partir de la transformación genética, la implementación de genes existentes en el combate a plagas y resistencia a insectos plagas por parte de la planta.

2.2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.2.1 Problemática actual de las especies forestales maderables

La demanda de productos maderables se encuentra vinculada al aumento de la población y al desenvolvimiento económico. En la próxima década se espera que esta demanda crezca en un 20 % obligando el crecimiento acelerado en corto tiempo de las áreas de plantaciones forestales comerciales y mitigar que la presión sobre los bosques nativos alcancen los 9.4 millones de ha al año (Boerjan 2005). Es preocupante la creciente demanda de productos forestales, por otro lado la conservación de los ecosistemas y la biodiversidad (Giri *et al.* 2004). Gracias a los adelantos biotecnológicos la transformación genética, considerada como una herramienta biotecnológica mantiene los mismos objetivos de mejoramiento convencional, el mejoramiento de características deseadas en una planta mediante la manipulación de genes, confieren nuevos caracteres en el genoma de la planta. Desde el punto de vista biológico es importante la preservación del ecosistema terrestre, porque los árboles son la biomasa más grande en la biosfera terrestre además y una fuente de sustentabilidad. La demanda a nivel mundial para energía renovable, papel y construcción de

materiales de madera está creciendo rápidamente y con ello la reducción de los bosques y selvas aumentando la presión sobre los bosques nativos, se estima que se necesitaran más árboles de alta calidad con la necesidad de ser plantados en menos espacio (Boerjan 2005).

El mejoramiento de árboles por métodos de plantación convencional se encuentra limitado por largos ciclos reproductivos, las características de muchas especies forestales, incluyen la autoincompatibilidad y altos grados de heterocigocidad (Peña y Séguin 2001). Actualmente estas limitantes han desaparecido, permitiendo que la transformación genética mejore vías de potencial para introducir genes útiles de otros organismos en el mejoramiento de caracteres en árboles (Rishi *et al.* 2001). Dentro de la transformación genética los requerimientos para la obtención de una planta genéticamente modificada es necesaria la aplicación de sistemas eficientes de transferencia de genes, se debe de contar con un sistema de regeneración como la embriogénesis somática un sistema eficiente preferido por aquellas instituciones, individuos que realizan transformación genética, también se debe de contar con métodos eficientes de transformación, como las técnicas de *Agrobacterium tumefaciens* y Biobalística. (Nehra *et al.* 2005). Mediante la transformación genética en especies forestales se han obtenido grandes beneficios como una mayor producción de biomasa, mejor calidad de madera, resistencia a insectos, tolerancia a herbicidas, reducción de costos eficientes en el mejoramiento y mantenimiento de plantaciones. etc. (Satoreto *et al.* 2008, Tzfira *et al.* 1998).

2.2.2 Inicios de la transformación genética en especies forestales maderables

Los acercamientos tradicionales en el mejoramiento de árboles incluyen la identificación de árboles maduros con fenotipos deseables, seguido de su incorporación en programas de plantación. La longitud del tiempo que necesitan los árboles para alcanzar su madurez reproductiva, a menudo son más de 20 años, antes de las cruces controladas era el factor limitante para el mejoramiento, además de que no representa una garantía que la progenie de fenotipos deseados sea identificada (Martin-Trillo y Martínez-Zapater 2002). Estos problemas y otros se presentaron en el año de los 80's, posteriormente las técnicas biotecnológicas vinieron a unirse al mejoramiento convencional permitiendo la obtención de genotipos con mayor productividad y calidad. Dentro de estas técnicas se destaca la transformación genética, la cual consiste en la introducción controlada de un fragmento de un gen de ADN en el genoma de una célula receptora y su posterior expresión (Diouf 2003). Dentro de estas líneas de transformación en especies forestales se obtuvieron las primeras especies transformadas de interés comercial, la especie del álamo híbrido *Populus alba* por *Populus grandidentata*, obtenido por la vía de *Agrobacterium tumefaciens* por (Fillatti *et al.* 1987), fue desarrollado por un equipo de científicos de la Universidad de Wisconsin, del Servicio Forestal de los Estados Unidos y la empresa de biotecnología Calgene (Monsanto), desde entonces numerosos protocolos han sido establecidos y optimizados para diferentes especies forestales. Por la vía de Biobalística se obtuvieron las primeras especies transformadas a partir de coníferas *Piceas glauca* (Ellis *et al.* 1993). Numerosos protocolos se han diseñado a partir de

estas dos vías, tomando en consideración que la actividad forestal posee gran importancia económica y social que dispone de una amplia gama de productos comerciales como papel, celulosa, madera aserrada, madera contrachapada, chapa, tableros, cartón, paneles laminados de fibra, etc. (Mora y García 2000).

2.2.3 Importancia de la transformación genética

La introducción controlada de genes exógenos se ha convertido en una técnica importante tanto en el área de investigación básica como la introducción de características de importancia económicas agroforestales (Tzfira *et al.* 1998). La transformación genética es importante para introducir genes resistentes en el genoma de la planta que se desea transformar, los beneficios proporcionados esta técnica es la reducción del tiempo para la creación de nuevos individuos resistentes. Independientemente del método de transferencia a utilizar (*Agrobacterium* y/o Biobalística), en el desarrollo de plantas transgénicas, la habilidad de regenerar el material transformado bajo selección (Pérez 2002). La aplicación de esta herramientas biotecnológicas contribuye a generar plantaciones forestales de crecimiento rápido y de mayor rendimiento, entre otras características se incluye la producción de biomasa a partir de la menor cantidad de lignina para facilitar el proceso de extracción de celulosa, la resistencia al ataque de insectos plaga, tolerancia a herbicidas, control de la floración y fitorremediación (Sharry 2008, Halpin y Boerjan 2003).

2.2.4 Avances en transformación genética

Como se mencionó anteriormente, el auge que representa la nueva herramienta biotecnológica ha provocado su implementación en varios países principalmente en vías de desarrollo como China y Brasil que se encuentran en proceso de desarrollo efectivo de infraestructura para la regulación de cultivos modificados genéticamente (Strauss 2003). Según (Marchandier y Sigaud 2005), la mayoría de las actividades biotecnológicas forestales se realizan en países desarrollados, los más activos: Estados Unidos, Francia y Canadá. La India y China son países en desarrollo y en transición. Aunque la biotecnología forestal se ha extendido a las actividades de por lo menos 140 géneros de árboles, la gran mayoría de los proyectos se ha centrado en sólo seis especies: *Pinus*, *Eucalyptus*, *Picea*, *Populus*, *Quercus* y *Acacia* (FAO 2004). Dentro de las especies transformadas, el álamo es el único árbol forestal genéticamente modificado que se ha desarrollado comercialmente; la Administración Forestal Estatal de China aprobó en el 2002 la plantación comercial de álamos genéticamente modificados y a finales del año 2002 se habían plantado más de 1,4 millones de álamos genéticamente modificados, con resistencia a insectos. (Campbell *et al.* 2003), reporta que las especies forestales de mayor interés para transformación genética son: *Pinus taeda*, *P. radiata*, *P. pinaster*, *Pseudotsuga menziesii*, *Picea abies*, *P. nigra* y *P. sitchiensis*. También los árboles del género *Populus* y sus híbridos de los árboles de eucalipto, como *Quercus robur*, *Q. patrea* y *Willow*. Realizando considerables avances en algunas de estas especies como la reducción o cambio en el contenido de lignina, aumento a la resistencia de insectos, tolerancia a herbicidas, control de la floración, limpieza de áreas contaminadas, entre otros (Valenzuela *et al.* 2006). En el continente americano también se están realizando diversos programas de

investigación mediante transformación genética. En Brasil, pionero en desarrollo de genómicas en la región, está realizando el proyecto Genolyptus (Red Brasileña de Investigación del Genoma del *Eucalyptus*). Uno de los grandes desafíos para generar bioenergía de manera sustentable en el futuro y la comprensión de las bases moleculares del crecimiento y adaptabilidad de plantas perennes, útiles para la producción de energía. Con más de 140 investigadores de 82 organizaciones públicas y privadas de 18 países participan de la red EUCAGEN posiblemente, el mayor proyecto internacional de secuenciamiento, aprobado y desarrollado. Otra de las investigaciones realizadas en Brasil, es la utilización de la tecnología del ADN recombinante permitiendo obtener álamos genéticamente transformados por parte de investigadores brasileños de la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria, (Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología) asociados con el INRA (Francia). (Brasileiro *et al.* 1992), pero aún no se han comercializado los ejemplares modificados. Actualmente, la CTNBio tiene 24 solicitudes de aprobación de eucaliptos transgénicos, no así de álamos (http://www.wrm.org.uy/boletin/126/Brasil_Chile.html).

En sauces, los trabajos se han centrado mayormente en la Micropropagación y caracterización molecular en países como Chile y Argentina. Aunque la mayoría de los sauces pueden ser propagados fácilmente, existen algunas especies o clones con dificultades para enraizar. Algunos autores latinoamericanos han reportado el éxito del uso del cultivo de tejidos vegetales para propagar diferentes especies de sauces (Pereira *et al* 2000, Santos 2001 y Santos *et al.* 2005, Chung y Carrasco 1998), el resultado que esperan obtener es la reducción del costo de formación de madera, el

aumento del atractivo de la forestación, ampliación de la base industrial, aumento de las exportaciones y empleos regionales.

2.2.5 Avances en el rendimiento de las enfermedades de árboles mediante la introducción de nuevas características defensivas

Para la industria maderera, la alta productividad relacionada con la tasa de crecimiento, el volumen de madera, la calidad de las especies forestales son características económicamente importantes y deseables para obtener productos maderables (Peña y Séguin 2001). Una de las vías de transformación para transferir genes en árboles más utilizadas es por la vía de *Agrobacterium tumefaciens*, mediante el cocultivo de células y tejidos, las especies de *A. tumefaciens*, caracterizados como patógenos de las plantas capaces de inducir una malformación llamada tumor de agalla. Esta bacteria penetra en los tejidos vegetales causando una proliferación celular (Zamora 2003, Carrasco 1999), durante el contacto con las células vegetales la bacteria transfiere a las células vegetales un plásmido llamado Ti (inductor de tumores). Este plásmido se integra en el ADN del cromosoma de la célula vegetal. El plásmido transferido o T-ADN contiene los genes tumorales cuya expresión provoca una mayor producción de hormonas de crecimiento, estas son las que inducen las divisiones celulares que dan origen a la formación del tumor o agalla. Por otra parte, un plásmido separadamente replica, conocido como vector binario, puede ser introducido y entregar genes deseados en la célula de la planta, del cual fenotípicamente y normalmente los árboles son regenerados (Gartland y Davey 1995). De esta forma, la bacteria establece con la

planta una especie de "colonización genética", obligándola a fabricar una sustancia de la que sólo se puede nutrir *Agrobacterium* (Tzifira y Zitovski 2002, Carrasco 1999).

La primera especie forestal transformada por la vía de *Agrobacterium* fue el álamo híbrido *Populus alba* x *Populus grandidentata* (Fillati *et al.* 1987) con resistencia a herbicida. Autores como (Meilan *et al.* 2001a) evaluó la estabilidad de la expresión transgénica en 40 líneas transgénicas (eventos independientes) de álamo híbrido (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) crecidos en tres sitios de campo durante cuatro años. Todas las líneas fueron transformadas con un vector binario que incluía dos genes que confieren tolerancia al glifosato (*GOX* y *CP4*), la transformación se realizó mediante la vía de *Agrobacterium tumefaciens*, callogénesis y organogénesis bajo selección con Kanamicina. Para probar la estabilidad de la expresión transgénica, se aplicaron repetidamente herbicidas a todas las líneas después de la plantación, desafiando las líneas previamente sin tratar durante su cuarta estación de crecimiento vegetativo, los datos mostraron alta tolerancia en cuatro años. En especies de coníferas también se ha realizado transformación genética aunque presenta dificultades por la vía de *A. tumefaciens*, se han logrado transformar algunas especies como: larch (*Larix decidua*) (Huang y Karnosky 1991), pino (*Pinus radiata*) (Grant-Cooper y Dalr 2004, Charity *et al.* 2005) y en especies de abeto (*Picea* spp.) (Klimaszewska *et al.* 2001, Le *et al.* 2001) también se ha reportado por (Henderson y Walter 2006). Aquellas especies que no han resultado ser de éxito en la transformación por la vía de *A. tumefaciens*, se han realizado por la vía de Biobalística (Trontin *et al.* 2007).

La Biobalística es uno de los métodos directos de transformación más usados en la actualidad. Se basa en disparar hacia el núcleo de las células a transformar, con alta aceleración, pequeños microproyectiles de oro o tungsteno cubiertos con ADN (<1µm de diámetro) adheridos en su superficie, son disparados hacia el tejido blanco, algunos de los microproyectiles disparados penetran en el núcleo de la célula y expresan su maquinaria celular, permitiendo así la incorporación del ADN foráneo al ADN de la planta posteriormente resulta en la regeneración de plantas transgénicas (Petruccelli 2002, Ellis *et al.* 1993, Sanford 1993). En especies forestales la primera metodología utilizando el bombardeo de partículas fue descrita para especies de coníferas *Picea glauca* (Ellis *et al.* 1993), desde entonces numerosos protocolos han sido establecidos utilizando la transformación genética de especies forestales. Por esta vía los objetivos que se han cumplido han sido la expresión exitosa de genes que son de interés comercial demostrados en laboratorio y campos experimentales. Las principales características incluyen la modificación de biosíntesis de lignina y celulosa (Hu *et al.* 1999; Pilate *et al.* 2002), resistencia a herbicidas (Grace *et al.* 2005). Las pruebas en campos de plantas transgénicas de pino producidas mediante la técnica de biobalística han demostrado larga estabilidad del gen introducido con edad de ocho años. La transferencia de genes en plantas regeneradas en especies de coníferas fueron reportadas en cuatro especies: *Larix decidua*, *Picea glauca*, *P. mariana* y *Pinus radiata* (David y David, 1995).

2.2.6 Composición de lignina

Las ligninas son polímeros tridimensionales fenólicos que se encuentran integrados en la pared celular de células secundarias especializadas en tipos de células específicos. Las células del xilema que constituyen la madera, tiene altas paredes celulares lignificadas. Las funciones de la lignina como un intra y pegamento intramolecular, cruza varios componentes de la pared celular y se incrusta a las microfibrillas de celulosa dentro de la matriz densa (Campbell y Sederof 1996). Autores como (Halpin *et al.* 1994) obtuvieron por primera vez plantas transgénicas de tabaco con la composición de lignina alterado, por la expresión del gene antisentido CAD. La misma estrategia se puso a prueba en álamo híbrido (*Populus tremula x Populus alba*) donde la actividad del gen fue suprimida como cosupresión antisentido (Baucher *et al.* 1996). Las plantas transgénicas de álamo obtenidas a partir del gen antisentido de la OMT mostraron una reducción de la actividad de la enzima y un cambio en la composición de la lignina (Jouanin *et al.* 2000) por otro lado (Hu *et al.* 1999) obtuvo plantas transgénicas de álamo a partir de baja regulación de la enzima 4CL y CAD estas plantas mostraron una reducción del 45% del contenido de lignina y el aumento de la celulosa en 15%.

2.2.7 Resistencia a insectos

La producción de plantas resistentes a insectos vía transformación genética tiene dos propiedades. La primera propiedad es el uso de las toxinas *Bt* de *Bacillus thuringiensis*, esta toxina daña el mecanismo digestivo de la larva que se alimenta de esta. La toxina específicamente afecta a insectos que pertenecen al orden lepidóptera, díptera y

coleóptera, el cual incluye un número mayor de herbívoros de especies de árboles forestales. Los genes de las toxinas Bt fueron usados por primera vez álamo híbrido por (McCown *et al.* 1991) por la vía directa de transferencia de genes (Biobalística). La introducción de los genes Bt resultaron en una reducción significativa en la oruga de campaña (*Malacosoma disstria*), sobrevivencia y tasas de crecimiento de la larva polilla gitana (*Lymantra dispar*). (Ellis *et al.* 1993) utilizó el mismo enfoque para producir insecticida resistente al abeto blanco (*Picea glauca*). El abeto transgénico muestra resistencia al gusano del abeto (*Chorisonera fumiferuna*). Y el abeto europeo con resistencia mejorada al defoliador común barrenador de la nuez (*Coleophora laricella*) (Hbn) que fue producida mediante transformación mediada por *Agrobacterium*. Wang *et al.* (1996) utilizaron la transformación mediada por *Agrobacterium* para introducir la delta endotoxina truncada de Bt en fragmentos de álamo, *Populus nigra*, para conferir resistencia contra la polilla del álamo looper (*Apocheima cineraius* Erscheff). En China estos dos insectos contaban con el 40 % de daños en 1989. Varios clones resistentes fueron seleccionados a gran escala evaluados en campo. Meilan *et al.* (2000) demostró altos niveles de defoliación por el escarabajo de la hoja en los ensayos con álamo híbrido transgénico en el Oeste USA. Debido a los altos niveles de presión natural de los insectos, los árboles transgénicos tuvieron daños menores y crecieron considerablemente más rápido que los árboles no transgénicos. Los árboles contenían el gene sintético *Cry3a* que fue impulsado por el virus del mosaico de la coliflor (CaMV) promotor 35S y flanqueado por regiones matriz de uniones (Meilan *et al.* 2000). El asunto de introducir nuevas características defensivas en árboles se ha dado con un claro ejemplo obtenido de la transformación de *Populus ssp.* con la toxina del gene *Cry*

de *B. thuringiensis* obtenido por (Hu *et al.* 2001). Las plantas transgénicas de *Populus nigra* que expresa el gen de *B. thuringiensis* fueron obtenidas por (Wang *et al.* 2003), las plantas transformadas mostraron resistencia a *Apochemia cineraus* y *Lymantria dispe*. (Harcourt *et al.* 2000), a su vez obtuvieron plantas transgénicas de *Eucalyptus camaldulensis* expresando el gen *cry3A* mostrando resistencia a las larvas de *Chrysophthata bimaculata*, *C. agrícola*, *C. variicolis*. Las plantas de *Pinus taeda* también fueron transformados a través de biobalística con una versión sintética del gene *cry1Ac* de *Bt*, aumentando la resistencia a *Dendrolimus punctatus* y *Crypyothelea formosicola* (Tang y Tian 2003).

2.2.8 Usos de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* como bioinsecticidas

Desde su descubrimiento, los insecticidas químicos han representado una alternativa en el control de numerosos insectos plaga. Sin embargo el uso excesivo provoca graves daños al medio ambiente y a los seres vivos. Por lo que a principio del siglo pasado una nueva forma de combatir a las plagas sin causar daños al medio ambiente es a partir del control biológico basado en la utilización de enemigos naturales, la aplicación de formulaciones bioinsecticidas que se componen de ingredientes naturales, todas ellas forman una combinación correcta de materiales o ingredientes de tal manera que el ingrediente activo, junto con otros componentes, formen un producto estable, seguro y fácil de aplicar (Sawicka y Couch 2002). *Bt* es el organismo más empleado como ingrediente activo en los diseños de estas formulaciones por su alta efectividad en los insectos plaga. Este agente microbiano es muy utilizado en la

agricultura para el control de un gran número de plagas, principalmente pertenecientes al orden Lepidóptera, las toxinas *Cry* presentan algunas características importantes que justifican su uso, como la ausencia de toxicidad en los seres humanos, en muchos de los enemigos naturales de diversas plagas, en otros vertebrados y en las plantas, así como un espectro de acción reducido, lo que indica que puede ser altamente específico para una plaga determinada. Descubierta por Shigetane Ishiwata en 1901 (Aizawa 2001), y redescubierta por Berliner en 1911. El primer registro que se tiene del uso de *B. thuringiensis* para el control de insectos fue en Hungría a finales de 1920, y en Yugoslavia a principios de 1930 para el control del gusano europeo del maíz *Ostrinia nubilalis* (Lord 2005).

2.2.9 Fusión de genes quiméricos

Otros genes utilizados para la transformación genética, es a partir de la lectina de los genes la flor de la campanilla (*GNA1-Galanthus nivalis* aglutininin) y el gene *BtCry3* específico contra escarabajos. Los experimentos en semilleros y pruebas de campo confirmaron la influencia duradera del alimento de estas plantas transgénicas (*BtCry1Ac* + API) en el crecimiento del insecto. Los efectos de las líneas transgénicas utilizando la combinación de dos genes en algunos de los principales insectos defoliadores en el norte de China fueron probados y publicado por (Yang *et al.* 2003). Los bioensayos en la larva de la polilla gitana (*Lymantria dispar* L.), Scarce Chocolatetip (*Clostera anacoreta* F.), Fall webworm (*Hyphantria cunea* D.), Vapourer moth (*Orgyia antiqua* L.) y *Micromelalopha troglodita* (G), mostraron que los clones transgénicos tenían alta resistencia a estos insectos pero la actividad insecticida fue

diferente en diferentes años y en diferentes especies de insectos dentro del periodo de observación de cuatro años (Liu *et al.* 2004a). Las prácticas de silvicultura convencional y técnicas de plantación han contribuido significativamente al mejoramiento de especies forestales de bosques, en el pasado y continúa teniendo un impacto sustancial en la ganancia genética y productividad de especies de árboles de importancia económica proveyendo de mejores gemoplasmas y mejorando las prácticas de mantenimiento para plantaciones forestales. Los métodos de plantaciones tradicionales son a menudo encogidos por los ciclos reproductivos largos de muchas especies de árboles y la dificultad en mejoras significativas. La biotecnología es un adjunto a las prácticas de mejoramiento tradicional y que utiliza descubrimientos fundamentales en el campo de plantas de cultivo de tejidos para bosques clonales, técnica de transferencia de genes, biología molecular y genómica (Nehra *et al.* 2005).

2.3 CONCLUSIÓN

El trabajo de diversos grupos de investigación en diversas especies forestales maderables con fines comerciales, visualiza un mejor aspecto en la disposición de las herramientas biotecnológicas como la IG. Mismas son de gran utilidad para aquellas especies que se encuentran amenazadas o en peligro de extinción, recuperar el material genético y modificar las características de la especie forestal. Aunque sin bien solo la especie *Populus* transgénico ha sido liberada para ser establecido en plantaciones comerciales, el número de especies es todavía restringido en programas de cultivo *in vitro* y en condiciones de invernadero. Su aplicación con fines comerciales de cada una de las especies forestales donde son ejecutados eventos de transformación genética, tendrá que esperar un poco más, la incertidumbre en la

población de posible peligro de cruzas y la pérdida de especies nativas ha propiciado un rezago en los adelantos científicos.

2.4 LITERATURA CITADA

- Aizawa K (2001) Shigetane Ishiwata: His discovery of sotto-kin (*Bacillus thuringiensis*) in 1901 and subsequent investigations in Japan. Proceedings of a Centennial Symposium Commemorating Ishiwata's Discovery of *Bacillus thuringiensis*. Kurume, Japan. 1-14.
- Baucher M, Brigitte C, Cilles P, Jan VD, Marie TT *et al.* (1996) Red xylem and higher lignin extractability by down-regulation a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. *Plant Physiology*. (112): 1479-1490.
- Boerjan W (2005) Biotechnology and the domestication of forest trees. Elsevier. *Plant Biotechnology*. (16): 159-166.
- Brasileiro ACM, Tourneur C, Leple JC, Combes V, Jouanin L (1992) Expression of the mutant *Arabidopsis thaliana* acetolactate synthase gene confers chlorsulfuron resistance to transgenic poplar plants. Springer Link. *Transgenic Research*. (1): 133-141.
- Campbell MM, Sederoff RR (1996) Variation in lignin content and composition: mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiol*. (110): 3-13.
- Campbell, MM, Brunner MA, Jones M, Strauss SH (2003) Forestry's fertile crescent: the application of biotechnology to forest trees. *Plant Biotechnology Journal* (1):141-154.
- Carrasco JF (1999) Plantas transgénicas. Butlletí Centre de Estudios de la Natura del Barcelonès Nord., IV (3): Sta. Coloma de Gramenet. Página consultada en Internet. <http://www.xtec.es/~jcarrasc/transgénicas.htm>. Fecha de consulta 4 de Agosto de 2009.
- Charity JA, Holland L, Grace LJ, Walter C (2005) Consistent and stable expression of the *nptII*, *uidA* and *bar* genes in transgenic *Pinus radiata* after *Agrobacterium*-mediated transformation using nurse cultures. *Plant Cell Reports*. (23): 606-616.
- Chung GP, Carrasco GB (1998) Cultivo *in vitro*: Micropropagación de *Salix* spp a través de meristemas foliares. Ciencia e Investigación forestal. Instituto Forestal/Chile. 1(12): 64-75.

- David AEL, David L (1995) Somatic embryogénesis in *Pinus caribean*. In Somatic Embryogenesis in Wood Plants. LII Gymnosperms (eds S M Jain *et al*), pp 145-181. Kluwer Academic Publishers.
- Diouf D (2003) Genetic transformation of forest trees. African Journal of Biotechnology, 2(10): 328-333.
- Ellis DD, McCa OE, McInni S, Ramachandran R, Russel RO, McCown' BH (1993) Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. Department of agriculture. Bio/Technology, (11): 84-89.
- FAO (2004) Preliminary review of biotechnology in forestry including genetic modification. Forest Resources Development Service Working Paper FGR/59E. Forest Resources Division. Rome, Italy. <http://www.fao.org/docrep/008/ae574e/ae574e00.htm>.
- Fillatti JJ, Sellmer J, McCown B, Haissig B, Comai L (1987) *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. Molecular and General Genetics. 2(206): 192-199.
- Gartland KMA, Davey MR (1995) *Agrobacterium* Protocols. Methods in Molecular Biology. (EDS) Human Press. 44.
- Giri C, Shyamkumar B, Anjaneyulu C (2004) Progress in tissue culture, genetic transformation and application of biotechnology to trees: an overview. Springer Verlag. Trees. 18(2): 115-135.
- Grace LJ, Charity JA, Gresham B, Kay N, Walter C (2005) Insect-resistant transgenic *Pinus radiata*. Plant Cell Reports 24(2): 103-111.
- Grant JE, Cooper PA, Dalr TM (2004) Transgenic *Pinus radiata* from *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of cotyledons. Plant Cell Reports. 108(6): 1177-1181.
- Halpin C, Boerjean W (2003) Stacking transgenes in forest trees. Trends in Plant Science, 8(8): 363-365.
- Harcourt RL, Kyozuka J, Floyd RB, Bateman KS, Tanaka H, Decroocq D, Llewellyn DJ, Zhu X, Peacock WJ, Dennis ES (2000) Insect and herbicide resistant transgenic *Eucalyptus*. Molecular Breeding. (6):307-315.
- Hodson de JE (2005) Transformación genética de plantas para resistencia a virus. Biotecnología. Facultad de Ciencias, Pontificias Javeriana. Revista Académica Colombiana de Ciencia 29(110): 5-24.
- Huang Y, Diner AM, Karnosky DF (1991) *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation and regeneration of a conifer: *Larix decidua*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 27: 201+207.
- Hu JJ, Tian YC, Han YF, Li L, Zhang BE (2001) Field evaluation of insect-resistant transgenic *Populus nigra* trees. Euphytica (121):123-127.

- Hu WJ, Harding SA, Lung J, Popko JL, Ralph J, Stokke DD, Tsai CJ, Chiang VL (1999) Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature Biotechnology* (17): 808-815.
- Huang Y, Diner AM, Karnosky DF (1991) *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation and regeneration of a conifer: *Larix decidua*. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. (27): 201-207.
- Klimaszewska K, Lachance D, Pelletier G, Lelu AM, Seguin A (2001) Regeneration of transgenic *Picea glauca*, *P. mariana* and *P. abies* after co-cultivation of embryogenic tissue with *Agrobacterium tumefaciens*. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 37(6): 748-755.
- Jouanin L *et al.* (2000) Lignification in transgenic poplar with extremely reduced caffeic acid O-methyl transferase activity. *Plant Physiology Rockville* (123): 1363-1374.
- Le VQ, Belles IJ, Dusabenyagasani M, Tremblay FM (2001) An improved procedure for production of white spruce (*Picea glauca*) transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Experimental Botany*. 364: 2089-2095.
- Liu JX, Gao BJ, Zhang JH, Wang YF, Wang JM (2004a) Influence of temperature on insect resistance of transgenic hybrid poplar. *Chine Journal Applied Ecology* (15): 853-855.
- Lord JC (2005) From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *J. Invertebr. Pathol.* 89: 19-29. Lord, J.C. Undeen, A.H. 1990. Inhibition of the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxin by dissolved tannins. *Environment Entomology* (19):1547-1551.
- Lu WM (2004) China's growing role in world timber trade. *Unasylva* 219(55): 27-31.
- McCown BH, McCabe DE, Russell DR, Robinson DJ, Barton KA, Raffa KF (1991) Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. *Plant Cell Report*. 9: 590-594.
- Marchandier H, Sigaud (2005) P Los álamos en la investigación biotecnológica. *Unasylva* 221(56): 38-39.
- Martin TM, Martinez ZJM (2002) Growing up fast: Manipulating the generation time of trees. *Current Optional. Biotechnology* (13): 151-155.
- Meilan RDJ, Auerbach CM, DiFazio SP, Strauss SH (2001a) Stability of herbicide resistance and GUS expression in transgenic hybrid poplars (*Populus*, sp.) during several years of field trials and vegetative propagation. *Horticulture Science* (in press). 122-250.
- Meilan R, Ma C, Cheng S, Eaton JA, Miller LK, Crockett RP, DiFazio SP, Strauss SH (2000) High levels of Roundup™ and leaf-beetle resistance in genetically engineered hybrid cottonwoods. In: *Hybrid Poplars in the Pacific Northwest: Culture, Commerce and Capability* (Blatner, K.A., Johnson, J.D. and

- Baumgartner, D.M., eds), pp. 29-38. Pullman. WA: Washington State University Cooperative Extension Bulletin MISC0272.
- Mora AL, García CH (2000) Eucalyptus cultivation in Brazil. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura. 112-118.
- Nehra SN, Becwar RM, Rottman HW, Pearson L, Chowdhury K, Chang S, Wilde DH, Kodrzycki JR, Zhang C, Gause CK, Parks WD, Hinchee AM (2005) Forest Biotechnology: Innovative Methods, Emerging Opportunities. Society for *In Vitro* Biology. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. (41): 701-717.
- Petrucci S (2002) Aplicaciones de la biotecnología en el sector agropecuario y agroalimentario. Métodos de Obtención de Plantas genéticamente modificadas. Centro de Investigación y desarrollo en criotecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas UNLP. 45-47.
- Peña L, Séguin A (2001) Recent advance in the genetic transformation of trees. Elsevier. *Trends In Biotechnology* (19): 500-506.
- Pereira AM, Bertoni S, Moraes BW, Franca SC (2000) Micropropagation of *Salix humboldtiana* Hild. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. (2):17-21.
- Pérez FJ (2002) *Cedrela odorata* L. transformation. Genetic Engineering. University Idaho. 1-10.
- Pilate G, Guiney E, Holt K, Petit CM, Lapierre C, Leple JC, Ppillet B, Mila I, Webster EA, Marstrop HG, Hopkins DW, Jouanin L, Boerjan W, Schuch W, Cornu D, Halpin C (2002) Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nature Biotechnology* 20(6): 558-560.
- Rishi AS, Nelson ND, Goyal (2001) A Genetic modification for improvement of *Populus*. *Physiol Mol Biol Plants* 7: 7-21.
- Studart GC, Cristiano L, Miranda BCA (2003) Transformação genética em espécies florestais. *Ciência Florestal*. 1(13): 167-178.
- Santos BR (2001) Propagação *in vitro* e abordagem fitoquímica em *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd.). Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. 1-89.
- Sanford JC (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Method Ezymol*. 217:483-509.
- Santos BR, Paiva R, Martinotto NCR, Duarte P (2005) Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). *Ciência Rural, Santa Maria*. 35(3): 510-514.
- Sartoretto ML, Saldanha CW, Pimentel MMC (2008) Transformação genética: Estratégias e aplicaciones para o melhoramento genético de espécies florestais. *Laboratório de Biotecnologia Forestal. Universidad Federal de Santa Maria. Santa Maria, Brasil*. 38(3): 861-871.

- Sawicka EM, Couch TL (2002) Formulations of entomophatogens. Pesticides Formulations and Application System. Philadelphia. American Society for Testing and Materials. 15: 5-11.
- Sharry S (2008) http://www.fbmc.fcen.uba.ar/~23-1-2007/18_AGBT08%20Biotechnologia%20Forestal.pdf. Fecha de Consulta 06 de Febrero de 2011.
- Strauss SH (2003) Genomics, genetic engineering, and domestication of crops. American Association for the Advancement of Science (300): 61-62
- Tang W, Tian Y (2003) Transgenic loblolly pine (*Pinus taeda* L.) plants expressing a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* with enhanced resistance to *Dendrolimus punctatus* Walker and *Crypyothelea formosicola* Staud. Journal of Experimental Botany. 54(383): 835-844.
- Trontin JF, Walter C, Klimaszewska K, Park YS, Walter MA (2007) Recent progress in genetic transformation of four *Pinus* spp. Transgenic Plant Journal 1(2): 314-329.
- Tzifira T, Zuker A, Altman A (1998) Forest-tree biotechnology: genetic transformation and its application to future forests. Tibtech. Cell Press. Trends in Biotechnology 16: 439-446.
- Valenzuela S, Balochi C, Rodríguez J (2006) Transgenic trees and forestry biosafety. University Catholic of Valparaiso. Chile. Scielo. Electronic Journal Biotechnology. 9(3): 335-339.
- Wang W, Basia V, Arie A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Plant Physiology. 218(1): 1-14.
- Yang MS, Lang HY, Gao BJ, Wang JM, Zheng JB (2003) Insecticidal activity and transgene expression stability of transgenic hybrid poplar clone 741 carrying two insect-resistant genes. Silvae Genetica 52:197-201.
- Zamora A (2003) Ingeniería genética en la agricultura. Página consultada en Internet. <http://www.arrakis.es/~ibrabida/vigplantas.html> (Fecha de consulta 17/08/09).
- Zhang SY, Yu Q, Chauret G, Koubaa A (2003) Selection for both growth and wood properties in hybrid poplar clones. Forest Science 49(6): 901-908.
- Tzfira T, Vaidya M, Citoski V (2002) Increasing plant susceptibility to Agrobacterium infection by overexpression of the Arabidopsis nuclear protein VIP1. In: Proceedings of the Natural Academy of Sciences. 16(99): 10435-10440.
- Zobel BJ, Jett JB (1995) Genetic of wood production. ISBN 3-540-58841-8. Springer-Verlag. 337-340.

3. CONCLUSIONES GENERALES

El diseño de estrategias biotecnológicas mediante un sistema de regeneración *in vitro* (embriogénesis somática), permitirá la apertura de futuros eventos de investigación con finalidades de realizar transformación genética. Sin embargo para la especie *C. odorata* representa uno de los principales aportes en la propagación de esta especie de clima tropical. Los resultados demostraron que se indujo los primeros embriones somáticos en diversos estados de desarrollo. Para llevar a cabo embriogénesis somática se recomienda el tratamiento $MS+2,4-D+0.5 \text{ mgL}^{-1}$. Por otro lado el diseño de herramientas biotecnológicas ha permitido que en este trabajo de investigación se dé a conocer los adelantos y avances sobre la mejora de diversas características de las especies maderables, así como en las especies que poseen gran interés comercial. Es necesario conocer las estrategias utilizadas y como diversos organismos que no son de la misma especie pueden estar integrados en un mismo gene, principalmente en especies forestales, lo que anteriormente no se podía realizar con los anteriores métodos convencionales como cruza de variedades, el injerto y el tiempo de espera en obtener el genotipo deseado. Ahora es posible y son aprovechadas esta capacidad para la mejora de especies forestales que poseen gran importancia.