



OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Phalaenopsis amabilis* (ORCHIDACEAE) RESISTENTES A *Fusarium oxysporum*.

Luz María Malagón Quintana, Rodolfo López Gómez y Rafael Salgado Garciglia. Edif. B-3, 58060, Ciudad Universitaria, IIQB-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán. MÉXICO. Tel.-Fax. (443) 3 26 57 88, rsalgado@zeus.umich.mx.

Palabras clave: Orquídea, transformación genética, resistencia.

Introducción. Las orquídeas son unas de las flores de gran demanda comercial a nivel mundial. Diversas especies que se cultivan con este fin presentan un lento desarrollo hasta la floración (4 a 6 años), por ello se ven amenazadas principalmente por hongos durante su cultivo en invernadero. A pesar del uso de fungicidas, uno de los hongos que más atacan a las orquídeas *Phalaenopsis* spp. es *Fusarium oxysporum*. Una alternativa para evitar el uso desmedido de fungicidas es la obtención de plantas resistentes a hongos y la biotecnología vegetal moderna ofrece métodos de mejoramiento genético, como la transformación genética. Con el fin de obtener plantas de *P. amabilis* que presentaran resistencia a *F. oxysporum*, en el presente trabajo se desarrolló un método de transformación genética (vía *Agrobacterium tumefaciens*), para insertar el gen de la β -1,3-glucanasa de tabaco.

El objetivo fue obtener y caracterizar molecularmente plantas transgénicas de esta orquídea, resistentes a *F. oxysporum*.

Metodología. La transformación genética se realizó bajo el método de co-cultivo con *A. tumefaciens* (pCambia2301) con el gen de β -1,3-glucanasa de tabaco (1) y discos de hoja de plántulas de *P. amabilis* Luchia Lady establecidas *in vitro* (2). Los explantes se cultivaron en medio de cultivo para regeneración de protocormos en presencia de kanamicina, para posteriormente ser sujetos a la verificación de la transformación: ensayo de la β -glucuronidasa (GUS) (3) y detección del gen de la glucanasa (*glucIII*) por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se diseñaron oligos específicos para amplificar fragmentos del transgen (tamaño de amplificación de 476bp). La extracción de ADN se realizó por el método CTAB modificado (4). Las pruebas de resistencia se realizaron con discos de hojas en cultivos *in vitro* (medio MS), inoculando 1×10^4 esporas/ml de *F. oxysporum*, cada dos días se determinaron síntomas de la enfermedad (necrosamiento de tejido) y aparición de micelio sobre el tejido (germinación de esporas).

Resultados y discusión. Después de 45 días de cultivo de los explantes de *P. amabilis* (25°C, 1200 lux) infectados con *A. tumefaciens*, en medio de regeneración de protocormos (MS, 0.5 mg/L ANA, 1.0 mg/L GA₃)(2) con 500 mg/L de cefatoxima, se logró eliminar la bacteria y se desarrollaron 3-5 protocormos/explante. Éstos fueron recultivados en medio de desarrollo de plántulas (MS 0.05 mg/L BA) en presencia de 100 mg/L del antibiótico de selección (kanamicina), dosis previamente conseguida para inhibir el 100% de los

protocormos o plántulas. De esta manera pudieron seleccionarse un total de 25 protocormos supuestos transgénicos, que fueron cultivados y propagados de manera individual por 45 días en medio de producción de protocormos (2) en presencia de kanamicina y cefatoxima con el fin de propagar 25 diferentes líneas y realizarles las pruebas de verificación de la transformación. A las líneas con mejor desarrollo de plántulas en medio de selección, se les realizó la prueba de GUS, detectando como positivas (tinción de azul) 7 de ellas, denominadas LM04, OLM07, LM09, LM12, LM13, LM17 y LM21; a éstas se les realizó la detección del transgen con la técnica de PCR, encontrando su presencia clara en todas ellas. Debido a que las plántulas de las líneas LM07 y LM21 presentaron crecimiento *in vitro* vigoroso (5cm de altura, más de 4 hojas y con más de dos raíces) en un tiempo relativamente corto (45 días), éstas fueron sometidas a pruebas de resistencia al hongo bajo cultivo *in vitro*, encontrando un alto grado de resistencia de los tejidos inoculados con esporas de *F. oxysporum*, ya que se evitó la germinación de éstas y no se obtuvieron síntomas de la enfermedad. En todos los experimentos se utilizaron como control, tejidos de plántulas no transformadas, las cuales fueron sensibles a kanamicina (>50 mg/L), dieron prueba negativa de GUS y no se detectó el gen *glucIII*. En las pruebas de infección con el hongo, a las 72 h se observaron los primeros síntomas de la enfermedad (puntos negros) y después de 7 días del cultivo, se observó desarrollo de micelio, sobre tejidos de plantas no transformadas.

Conclusiones. Con la inserción del gen de la β -1,3-glucanasa de tabaco en el genoma de *P. amabilis*, pudieron obtenerse plántulas que mostraron resistencia *in vitro* a *F. oxysporum*. Es determinante realizar las pruebas de resistencia en plantas transgénicas cultivadas en invernadero.

Agradecimiento. Proyecto 2.10/RSG (CIC/2005-2006 UMSNH). Otorgamiento de Beca Posgrado CONACYT (2003-2005). Dr. Miguel A. Gómez-Lim (CINVESTAV).

Bibliografía.

1. Payne, G, Ward, E, Gaffney, T, Ahl-Goy, P, Moyer, M, Harper, A, Meins, F Jr, Ryals, J. (1990). *Plant Mol. Biol.* 15: 797-808.
2. Malagón-Quintana, L.M, y Salgado-Garciglia, R. (2005). *X Congreso Nacional y III Internacional de Horticultura Ornamental*, Fac. de Agrobiología, UMSNH, Uruapan, Michoacán, México. 3-7 Octubre.
3. Iida, A, Seki, M, Kamada, M, Yamada, Y, Morikawa, H. (1990). *Theor. Appl. Genet.* 80:813-816.
4. Kuhnle, A,R, N, Sugii (1992). *Plant Cell Rep.*, 11:484-488.