



**Universidad Nacional de La Plata**



**Facultad de Ciencias  
Agrarias y Forestales**

**Tesis para aspirar al título de Doctora de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata.**

**“ Optimización de un sistema de modificación genética de  
*Populus* sp para la incorporación de genes inductores de  
floración temprana y androesterilidad ”**

**Ingeniera Forestal María Valentina Briones**

**Directora: Dra. Sandra Elizabeth Sharry**

**Codirectora: Dra. María Laura García**

La Plata

Marzo 2017

El presente trabajo de Tesis para optar por el grado de Doctora de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, ha sido realizado en el Centro Experimental de Propagación Vegetativa (CEProVe-UNLP, La Plata) bajo la dirección de la Dra. Sandra, E. Sharry y la co-dirección de la Dra. Ma. Laura García y en el Instituto Thünen de Genética Forestal (Grosshansdorf, Alemania), bajo la supervisión del Dr. Matthias Fladung y el Dr. Hans Hoenicka.

Lo que caracteriza al hombre de ciencia  
no es la posesión del conocimiento o  
de verdades irrefutables,  
sino la búsqueda desinteresada  
e incesante de la verdad

**- Karl Popper-**

## **Dedicatoria**

*A Dios, nuestro Señor,*

*A mis queridos padres, Carolina y Juan Manuel,*

*A mis inolvidables abuelos, Tito y Consuelo (Q.E.P.D.),*

*A Javi, mi amor.*

## **Mi reconocimiento,**

A la facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de la Plata, por posibilitarme la realización del doctorado dentro de la institución.

Al CEProVe-UNLP y al Instituto Thünen de genética forestal de Alemania, por brindarme un cálido lugar de trabajo y los recursos necesarios para llevar adelante el presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y al DAAD, por las becas otorgadas.

## **Mi agradecimiento,**

A Dios por haberme acompañado y guiado en todo el camino y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias, amor y felicidad.

A mis padres, quienes me infundieron los valores que guían mi transitar por la vida. Por sus sabios consejos y su amor incondicional. Me han enseñado a pasar las adversidades sin perder nunca la dignidad y a luchar para alcanzar mis objetivos. Por ser mi ejemplo de vida a seguir, por enseñarme que todo esfuerzo es al final recompensa.

A Javi, mi futuro esposo, por su amor, su apoyo, su comprensión. Por su ayuda y su paciencia en cada etapa de este trabajo.

A mi sobrina Oli, mi nuevo gran amor. Para que vea en mí un ejemplo a seguir.

A mis hermanos Juan y Manu, por ser una parte muy importante de mi vida.

A mi tía Lola y primas Emi y Euge, por su cariño, apoyo y preocupación.

A la Dra. Sandra Sharry, mi directora, mi “mamá académica”, por confiar en mí desde el primer día. Sin su inestimable apoyo, conocimientos y enseñanzas, este trabajo no hubiese sido posible. Gracias por los consejos y por no dejarme bajar nunca los brazos.

A la Dra. María Laura García, mi co-directora, por sus consejos, aportes y enseñanzas.

Al Prof. Dr. Matthias Fladung, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme sus conocimientos, apoyo, experiencias y enseñanzas desde el primer día.

Al Dr. Hans Hoenicka, por su inmensurable aporte en este trabajo, por sus enseñanzas y experiencias compartidas. Por su apoyo, su cariño y su amistad.

A todo el grupo del CEProVe: Walter, Claudia, Alejandra, Gabriel y Pedro. Por su colaboración, apoyo, consejos y cariño.

A Marina, Blanca y María, por ser las mejores compañeras de laboratorio, por su ayuda y apoyo desde los comienzos. Por ser muy buenas amigas.

A todo el equipo del Instituto Thünen, Katharina, Stefan, Tobias, Olaf, Maike, Doris, Susane J, Susane B, Lasse, Vivi, Katrin, Olca, Henry, Angelika, Anke, Laura, An Christine, Celine, Stefi, Birte, Lennart, Markus, a todos los técnicos y al grupo encargado de los invernáculos. Por hacerme sentir como en casa, por integrarme y ayudarme en cada momento, no solo en las enseñanzas y en lo académico, sino también en lo personal y emocional. Sin ellos mi estadía allí no hubiese sido tan amigable y fructífera.

A los evaluadores, Dr. Alejandro Escandón, Dra. Marisa Lopez Bilbao y Dra. Viviana Echenique, por su tiempo dedicado a la corrección del documento. Por sus valiosos aportes y consejos para enriquecer esta tesis.

A mis amigos, porque, lejos o cerca, siempre están. Por su apoyo, consejos y cariño. Por todos los momentos compartidos en este camino. Muy en especial a Ana, Lu, Martín y Caro.

A mi amiga Lu, porque al estar en la misma situación que yo, me ha comprendido más que nadie. Por su ayuda en el armado final del documento y la contención en el proceso.

A todas aquellas personas que, de una forma u otra, me han ayudado y apoyado durante este camino.

A todos, ¡muchas gracias!

Valentina

## Tabla de contenidos

Lista de tablas .....	11
Lista de figuras .....	14
Lista de Anexos .....	16
Abreviaturas .....	17
Resumen .....	21
Summary.....	23
Capítulo I: Introducción y antecedentes .....	25
1- El género <i>Populus</i> (álamos).....	26
2- <i>Populus</i> sp en el contexto mundial.....	30
Plantaciones y árboles fuera de los bosques.....	31
Tendencias de la producción.....	32
3- <i>Populus</i> en Argentina .....	32
4- Biotecnología Forestal .....	36
Modificación genética de árboles.....	38
5- Modificación genética del género <i>Populus</i> .....	39
Transformación genética del género <i>Populus</i> .....	39
Expresión de genes transferidos.....	43
Modificación de la floración.....	43
PsEND1:: <i>barnase</i> .....	49
HIPOTESIS .....	53
OBJETIVOS .....	53
Objetivo general.....	53
Objetivos particulares .....	53
Capítulo II: Materiales y métodos .....	54
Equipo de laboratorio y materiales .....	55
<i>Químicos</i> .....	55
<i>Material vegetal</i> .....	55
Esterilización de envases y utensilios .....	56
Cultivo in vitro.....	57
Desinfección del material vegetal .....	57
Método 1: .....	57
Método 2: .....	58
Medios de cultivo.....	58
• Medios 601, 601 ½, 601 ¼.....	59

<b>Vectores de transformación.....</b>	<b>60</b>
<b>Agrobacterias.....</b>	<b>60</b>
<b>Plásmidos de transformación .....</b>	<b>61</b>
<b>Vectores de transformación empleados .....</b>	<b>61</b>
<b>Cultivo de Agrobacterium .....</b>	<b>62</b>
<b>Medio LB (Caldo de Lisogenia o Lysogeny Broth).....</b>	<b>62</b>
<b>Medios de pre-cultivo para las cepas de los vectores de transformación EHA101- p6i62</b>	<b>62</b>
<b>Medio de precultivo para los vectores de transformación de la cepa GV2260-pb110163</b>	<b>62</b>
<b>Medio de precultivo para los vectores de transformación de la cepa EHA105- pK2GW7</b>	<b>63</b>
.....	
<b>Stocks de glicerina .....</b>	<b>63</b>
<b>Transformación de <i>E. coli</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>Purificación del plásmido de ADN .....</b>	<b>63</b>
<b>Mini-Preparación de plásmidos .....</b>	<b>63</b>
<b>Transformación de Agrobacterium.....</b>	<b>64</b>
<b>Transformación de álamos mediada por <i>Agrobacterium</i> .....</b>	<b>65</b>
<b>Pre-cultivo de las agrobacterias.....</b>	<b>65</b>
<b>Cultivo principal y transformación.....</b>	<b>65</b>
<b>Regeneración .....</b>	<b>66</b>
<b>Eliminación y limpieza de los materiales utilizados en la transformación genética...</b>	<b>67</b>
<b>Extracción de ácidos nucleicos .....</b>	<b>69</b>
<b>Búfer TE.....</b>	<b>69</b>
<b>Extracción de ADN .....</b>	<b>69</b>
<b>Medición espectrofotométrica de la concentración de ácidos nucleicos .....</b>	<b>70</b>
<b>Análisis de ADN .....</b>	<b>70</b>
<b>Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de genes de resistencia. ....</b>	<b>70</b>
<b>Gel de electroforesis.....</b>	<b>72</b>
<b>Southern Blots .....</b>	<b>73</b>
<b>Restricción .....</b>	<b>73</b>
<b>Electroforesis .....</b>	<b>74</b>
<b>Preparación del gel.....</b>	<b>75</b>
<b>Blotting .....</b>	<b>76</b>
<b>UV-“Crosslinking” .....</b>	<b>76</b>
<b>Prehibridización.....</b>	<b>77</b>
<b>Hibridización .....</b>	<b>77</b>
<b>Quimioluminiscencia .....</b>	<b>78</b>

El revelado de la película y la evaluación .....	80
"Stripping" .....	81
<b>Síntesis de sondas para Southern Blots .....</b>	<b>81</b>
Electroforesis .....	82
Elución del gel .....	83
Cuantificación .....	83
<b>Extracción de ARN .....</b>	<b>84</b>
Digestión del ARN extraído con ADNasas.....	85
<b>Análisis de expresión.....</b>	<b>86</b>
Control de la calidad del ARN en el Bioanalyzer .....	86
Transcripción inversa .....	87
Análisis de expresión por PCR semicuantitativa qRT-PCR .....	87
<b>Cultivo de álamos en invernáculo .....</b>	<b>89</b>
Protección de las plantas .....	90
<b>Inducción de flores fértiles en Populus- HSP::AtFT + PsEND1::barnase .....</b>	<b>91</b>
<b>Evaluación de la viabilidad del polen.....</b>	<b>92</b>
<b>Microscopía de anteras .....</b>	<b>92</b>
<b>Capítulo III: Cultivo de tejidos <i>in vitro</i> de <i>Populus</i>.....</b>	<b>93</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>94</b>
Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> de <i>Populus deltoides</i> e híbridos de <i>Populus x euramericana</i> .....	94
1- Recolección del material vegetal.....	94
2- Desinfección del material colectado .....	96
3- Organogénesis <i>in vitro</i> .....	99
4- Enraizamiento de los brotes obtenidos.....	101
<b>Capítulo IV: Transformación genética de <i>Populus tremula</i> L., <i>Populus deltoides</i> y <i>Populus x euramericana</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....</b>	<b>105</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>106</b>
Constructos utilizados en las transformaciones genéticas:.....	106
Transformación de <i>E. coli</i> con el constructo PsEND1::barnase .....	106
Células competentes de <i>Agrobacterium</i> GV2260 .....	107
Transformación de la cepa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV2260 .....	108
Transformación genética de <i>Populus sp.</i> .....	109
Fase 1: <i>Populus tremula</i> L e híbrido: clones W52 y T89 .....	109
Cultivo <i>in vitro</i> de las líneas transgénicas.....	112
Extracción de ADN de las líneas regenerantes .....	112

<i>Fase 2: Transformaciones genéticas de P. deltoides y P. xeuramericana</i> .....	115
Cultivo <i>in vitro</i> de las líneas transgénicas.....	116
Extracción de ADN de las líneas regenerantes .....	117
Southern Blot.....	119
Resultados Southern blots con sonda HSP:: <i>AtFT</i> .....	123
Resultado del Southern blot con sonda PsEND1.....	124
Análisis de expresión del gen <i>barnase</i> .....	125
<b>Capítulo V: Evaluación de las líneas transgénicas en invernáculo y cámaras climáticas.</b>	<b>133</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>134</b>
Crecimiento de las plantas transgénicas en invernáculo .....	134
Inducción de la floración precoz en <i>Populus</i> –HSP:: <i>AtFT</i> positivos .....	137
Desarrollo de polen viable: tratamiento con bajas temperaturas .....	139
Evaluación de vitalidad y recuento de polen .....	141
Microscopía de anteras y polen.....	146
<b>Conclusiones .....</b>	<b>149</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>153</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>179</b>

## **Lista de tablas**

Tabla 1.1 Principales países con bosque naturales de álamos. Fuente: Ball et al., 2005

Tabla 1.2 Principales países con bosque de cultivo de álamo. Fuente: Ball et al., 2005

Tabla 2.1: Composición de medio de cultivo WPM (tomado de Lloyd & McCown 1980). La concentración de micro y macroelementos, incluyendo las vitaminas están utilizadas en 2462,60 mg/L, según lo indicado por el fabricante.

Tabla 2.2 Secuencia de *NPTII* y los primers utilizados para codificar el gen.

Tabla 2.3 Secuencia de *HPT* y los primers utilizados para codificar el gen.

Tabla 2.4 Para la detección del gen *NPTII*.

Tabla 2.5 Para la detección del gen *HPT*.

Tabla 2.6: Composición de la PCR para la detección de los genes de resistencia.

Tabla 2.7: Perfil térmico de la PCR para los marcadores de selección.

Tabla 2.8: Primers para la detección de los genes de las líneas transgénicas regenerantes.

Tabla 2.9: Composición de la para la detección de los genes blanco.

Tabla 2.10: Perfil térmico de PCR para la detección de los genes objetivos.

Tabla 2.11: Enzima de restricción utilizada para los Southern blots.

Tabla 2.12: Composición del búfer de carga para la electroforesis del Southern blot.

Tabla 2.13: Para la preparación del gel, se utilizaron búfers y soluciones.

Tabla 2.14: Composición de la solución de prehibridización.

Tabla 2.15: Soluciones y búfers utilizados.

Tabla 2.16: Soluciones de revelado.

Tabla 2.17: Mix de reacción para la síntesis de sondas.

Tabla 2.18: Perfil térmico de PCR para la síntesis de sondas.

Tabla 2.19: Combinacion de primers para la síntesis de sonda.

Tabla 2.20: Perfil de temperatura para qRT-PCR.

Tabla 2.21: Primer para la qRT-PCR.

Tabla 2.22: Composición del sustrato y nutrientes (Fa. Gramoflor, Vechta).

Tabla 2.23: Plagas y medidas tomadas en el invernadero.

Tabla 3.1. Resultado de la desinfección de las yemas vegetativas apicales y segmentos nodales de los clones de *P. Deltoides* e híbridos, utilizando el método de desinfección nº 2.

Tabla 3.2 Resultado de la brotación In vitro de los diferentes clones de *P. deltooides* e híbridos.

Tabla 4.1: Detalle de la PCR con primers para NPT con *E. coli* transgénica con el constructo PsEND1::*barnase*

Tabla 4.2. Detalle de la PCR con diferentes primers de las colonias transformadas de GV2260 con PsEND1::*barnase*.

Tabla. 4.3 Detalle de las transformaciones con A168.

Tabla 4.4. Resultados de PCR de las líneas regenerantes de las transformaciones con A168.

Tabla 4.5 Detalles de la PCR del plásmido de A168 con primers específicos para el gen *FT* e higromicina.

Tabla 4.6 Transformaciones genéticas utilizando en simultáneo las agrobacterias A168 y A249 en el co-cultivo.

Tabla 4.7 Detalle de las transformaciones genéticas utilizando en simultáneo las agrobacterias A113 y A249 en el co-cultivo con los clones de *P. tremula L.*

Tabla 4.8 Resultados de las PCR de líneas transgénicas, con primers específicos para los genes *AtFT* y *barnase* y los promotores HSP y PsEND1.

Tabla 4.9 Detalle de las transformaciones con *P. deltooides* y *P. x euramericana*.

Tabla 4.10 Detalle de las líneas regeneradas de las transformaciones con *P. deltooides* y *P. x euramericana*.

Tabla 4.11 Resultado de las PCRs con los primers específicos para *FT* y *NPTII*.

Tabla 4.12 Resultados de las PCRs de las líneas de *P. deltooides* e híbridos con resultado positivo.

Tabla 4.13 Detalle de los primers utilizados para la PCR de la sonda y tamaños de los fragmentos.

Tabla 4.14 Cuantificación de la sonda PsEND1 con Nanodrop.

Tabla 4.15 Comparación de los resultados de la cuantificación de la sonda PsEND1 con gel y con el Nanodrop.

Tabla 4.16 Valores de ARN medidos con Nanodrop, para cada línea doble en los diferentes tejidos.

Tabla 4.17 Resultados de la digestión del ARN con ADNasas. Valores de RIN y concentraciones finales.

Tabla 4.18 Detalle de la síntesis del ADNc de las pruebas de ARN.

Tabla 5.1. Cantidad de plantas por línea llevadas a invernáculo.

Tabla 5.2 Recuento de flores de las plantas control-*AtFT*

Tabla 5.3: Evaluación de vitalidad y recuento de polen en plantas control-*AtFT*

Tabla 5.4: Evaluación de vitalidad y recuento de polen en Línea N435-15.

Tabla 5.5: Evaluación de vitalidad y recuento de polen en Línea N430-11.

Tabla 5.6: Evaluación de vitalidad y recuento de polen en N441-21.

Tabla 5.7 Presencia o ausencia de granos de polen en anteras y granos de polen viables, en líneas transgénicas simples (HSP::*AtFT*, control de floración) y dobles (HSP::*AtFT* and PsEND1::*barnase-barstar*).

## Lista de figuras

Figura 1.1: Taxonomía interna del género *Populus*. El género *Populus* se divide en seis secciones (Brüggemann, 2011).

Figura 2.1: *Populus tremula* L “w52” en cultivo in vitro (A) plantas jóvenes de 8 semanas de invernáculo (B, C).

Figura 2.2. a y b. Desinfección del material vegetal utilizando lupa, pinza y bisturí para la remoción de la corteza, en campana de flujo laminar, en el Instituto Thünen, Alemania.

Figura 2.3. Estructura química del Thidiazuron (Lu 1993).

Figura 2.4. a. Enjuagues de los explantos transformados, con la solución de agua con cefotaxima. b. Distribución de los explantes en las cajas de Petri con medio de cultivo y el antibiótico correspondiente, dentro de la cabina de flujo laminar.

Figura 2.5: Esquema de selección de los regenerantes de la transformación.

Figura 2.6: Marcador de fragmentos de AND “Smart” (Fa. Eurogentec, Köln)

Figura 2.7: Estructura esquemática del Southern blot.

Figura 2.8: Sandwich de hibridización (Fladung & Ahuja 1995).

Figura 2.9: Tamaños de las bandas de la longitud de los fragmentos marcadores de ARN de cadena simple (Fa. New England Biolabs, Frankfurt am Main).

Figura 3.1.a y b Colección de *Populus* del Arboretum del Instituto de genética forestal Thünen, Alemania. c y d. Recolección del material vegetal.

Figura 3.2 a. yema apical del clon D7 luego de la desinfección en medio 460. b. Secciones nodales del clon híbrido DN5 luego de la desinfección, sembrado en medio 601. c. Yema apical del clon D7 contaminada. d. Secciones nodales del clon híbrido DN5 ennegrecidas.

Figura 3.3.a y c. Brotes regenerados in vitro a partir de secciones nodales de *P. x euroamericana* DN5. b. Brotes regenerados in vitro, de secciones nodales de *P. deltoides* D25. Todos en medio 601.

Figura 3.4. a. Brotes enraizados de *P. deltoides* D25. b. Plantas completas de *P. x euroamericana* DN5. c. Brotes enraizados de *P. x euroamericana* DN5.

Figura 3.5 Diagrama del CTV partiendo de secciones nodales de los clones D25, DN1 y DN5

Figura 4. Análisis de PCR de agrobacterias transformadas con el constructo *PsEND1::barnase*

Figura 4.2 Gel de electroforesis para las bandas correspondientes a *barnase*, *nos* y *NPTII*

Figura 4.3 Resultado de PCR para hygromicina y *FT* del plásmido de la A168.

Figura 4.4. Análisis de PCR de las líneas transgénicas dobles, con primers específicos.

Figura 4.5.a y b Brotes regenerados de *P. tremula* L. luego de la transformación en medio 601<sub>KC</sub>.

Figura 4.6 a. y b. Placas con los explantos transformados en medio con antibiótico. Se observan pequeños brotes regenerando. c y d explantos regenerantes separados, creciendo en un nuevo medio 601 con kanamicina y cefotaxima.

Figura 4.7. Resultados de análisis de PCR para los dos pares de primers diseñados para la sonda PsEND1::*barnase*.

Figura 4.8. Gel de PCR con diferentes concentraciones de ADN marcado con DIG-sonda.

Figura 4.9. Gel de agarosa para calcular la cantidad de sonda en cada banda.

Figura 4.10. Film resultado del revelado del southern blot con sonda HSP.

Figura 4.11. Film revelado resultado del Southern blot con sonda PsEND1 para las líneas transgénicas dobles de *P. tremula* L.

Figura 4.12. Gel resultado de la RT-PCR con los primers específicos para el gen de interés barnase

Figura 4.13. Gel de agarosa resultado de la RT-PCR con los primers específicos para el gen de referencia Ubiquitina.

Figura 5.1.a.b y c. Crecimiento de las líneas transgénicas dobles y las plantas control en invernáculo.

Figura 5.2.a.b. Plantas en cámara climática. Tratamiento con calor. b. Floración línea N435-15.

Figura 5.3. a. Planta control (izq.) Planta transgénica (der.). b. Floración línea N430-11.

Figura 5.4. a. Morfología normal de plantas transgénicas en invernáculo. b. Floración Línea N441-21.

Figura 5.5. a. b Plantas en cámaras climáticas en el tratamiento de bajas temperaturas.

Figura 5.6.a.b Flores de las líneas T193-2 control-*AtFT* en las cámaras de clima.

Figura 5.7 a Morfología normal de la antera de la línea control- *AtFT* vista con lupa, b. granos de polen viables de la línea control-*AtFT*, según el test FDA visto al microscopio electrónico.

Figura 5.8 a y b. Detalle de la morfología de las anteras de la línea transgénica N435-15.

Figura 5.9. a. Detalle de las anteras anormales de la línea N430-11, b. Polen no vital según el FDA test visto al microscopio electrónico.

Figura 5.10 a y b. Detalle de las anteras anormales de la línea transgénica N441-21.

Figura 5.11 a y b. Estudio microscópico de anteras y granos de polen de línea transgénica simple (HSP::*AtFT*) (a) y doble (HSP::*AtFT* and PsEND1::*BARNASE-BARSTAR*) (b).

## **Lista de Anexos**

Anexo 2.1 Los equipos de laboratorio utilizados en este trabajo de investigación se detallan por orden alfabético.

Anexo 2.2 Esquema de los vectores utilizados para las transformaciones.

Anexo 3.1 Informe de Avance de beca tipo I de CONICET, año 2013.

Anexo 4.1 Regenerantes de las transformaciones con de *P. tremula* L. con A113 + A249.

Anexo 4.2 Resultados de las PCRs con los primers para detectar la presencia de los genes *FT* y *barnase*, y los promotores HSP y END1, en las regenerantes de las transformaciones genéticas con *P. tremula* L.

Anexo 4.3 Primers para sonda PsEND1.

Anexo 4.4 Primers para sonda PsEND1.

## Abreviaturas

∞	infinito
35S	35S tamaño del ARN del virus del mosaico del tabaco
°C	grados Celsius
μE	microeinstains
μg	microgramo(s)
μl	microlitro(s)
μM	micromolar
ADN	ácido 2' desoxirribonucleico
ADNc	ácido 2' desoxirribonucleico copia
ADNg	ácido 2' desoxirribonucleico genómico
ADN-T	ácido 2' desoxirribonucleico de transferencia
A	adenina
A	como aditivo de numeración de <i>Agrobacterium</i>
A.	<i>Arabidopsis</i> o <i>Agrobacterium</i>
ANA	ácido naftalenacético
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
BrEt	bromuro de Etidio
C	cefotaxima
CaMV	virus del mosaico del coliflor
Cap.	capítulo
Carb.	carbenicilina
cm	centímetro(s)
CN	control negativo
CP	control positivo
CSPD	dinatrium-3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetan- 3,2'-(5'-chloro)tricyclodecan]-4-yl)fenyl-
	Fosfato
DIG	digoxigenin
DEPC	diethylpyrocarbonat
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTPs	2'-deoxirribonucleósidos 5-trifosfato
DTT	dithiothreitol

DO	densidad óptica
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	ácido etilen diamine tetra acético
<i>et al.</i>	y otros
Fa.	fábrica
FAO	Organización para la agricultura y la alimentación
Fig.	figura/s
g	gramo(s)
GM	genéticamente modificado
h	hora(s)
H	higromicina
ha	hectárea
HPLC-H2O	high- performance liquid chromatography
HPT	higromicinphosphotransferasa
K	kanamicina
Kan	kanamicina
kDa	kilodaltons
Kg	kilogramo
L	litro
LB	left border (borde izquierdo)
LB	Lysogeny Broth
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
M	molar
m	metro
mg	miligramo
min	minuto(s)
ml	mililitro(s)
mM	milimolar
mmol	milimol
ms	milisegundo
N	normal- número de transformación
NPTII	neomicinfosfotransferasa II
Na-Citrat	Citrato de sodio
ng	nanogramo(s)
nm	nanómetro(s)
nt	nucleótido(s)

OD600	densidad óptica 600 nm
OPD	orto-fenilendiamina
P.	<i>Populus</i>
p35S	promotor 35S
pb	pares de bases
PBS	búfer fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PGR	reguladores de crecimiento
pH	potencial Hidrógeno
Plásmido-Ti	plásmido inductor de tumor
PM	peso molecular
PVP	polyvinylpyrrolidon
qRT-PCR	Real-Time PCR cuantitativa
RB	right border (borde derecho)
Rif	rifampicina
RIN	número de integridad del ARN
RNasa	ribonucleasa
RCF	fuerza centrífuga relativa
rpm	revoluciones por minuto
RT	transcripción reversa
ROX	rhodamin X
SDS	sodium dodecil sulfate
Seg/s	segundo(s)
Spec	spectomicina
SSC	salt sodium citrate
SSTE	natriumdodecylsulfat-Tris-HCl-EDTA
Strep	streptomicina
T	timina
Ta	temperature de Annealing
TA	temperature ambiente
Tab.	tabla
TBE	tris-borato-EDTA
TBS	tris buffer saline
TDZ	thidiazurón
TE	tris-EDTA
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano

ubiq.	ubiquitina
UDP	uridindifosfato
UMSP	Universal-Microscope-Spectrophotometer
USA	Estados unidos de América
UV	ultravioleta
V	volts
Vol	volúmen
WPM	Woody Plant Medium
WT	Wild type
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## **Resumen**

El álamo se ha convertido en un organismo forestal modelo para estudios fisiológicos, genómicos y moleculares. Se considera un árbol ideal en los estudios de genética forestal y biotecnología, por su rápido crecimiento, su capacidad de reproducción vegetativa, genoma relativamente pequeño y facilidad de transformación con *Agrobacterium*, sumados a su importancia económica a nivel mundial y nacional. La liberación al medio de álamos genéticamente modificados (GM) tiene limitantes, tanto desde el punto de vista ambiental, como comercial y de percepción pública. En lo relacionado al impacto ambiental, muchos cuestionan el largo tiempo que estará presente el árbol GM en el medio, por lo que existirían riesgos asociados con flujo génico. Si fuese posible obtener árboles GM estériles, se evitarían estos riesgos, dado que el árbol no produciría polen, con la ventaja adicional de redireccionar la energía en el crecimiento vegetativo, lo cual implicaría un menor tiempo de rotación. Sin embargo, para poder evaluar la esterilidad, es necesario que estos individuos florezcan. La mayoría de los álamos no florecen antes de los siete años de edad, y a muchos les toma más tiempo. Esto no sólo impone una restricción de la aplicabilidad de técnicas genéticas experimentales convencionales, sino que, una vez introducido un gen de esterilidad, el tiempo para poder evaluarlo es muy largo. Esta tesis tuvo el propósito de trabajar con *Populus tremula* L. como árbol modelo y con *P. deltoides* e híbridos derivados. La hipótesis planteada fue que se puede acortar el tiempo de evaluación de álamos GM androesteriles mediante la modificación del tiempo de la floración, a través de la expresión conjunta de dos transgenes. El objetivo general fue optimizar un sistema de modificación genética de *Populus sp* para la incorporación de los genes de floración precoz y androesterilidad (HSP::*AtFT* y PsEND1::*barnase*), acelerando el tiempo de obtención de líneas transgénicas dobles. Se logró ajustar un método eficiente de regeneración de plantas *in vitro* de clones recalcitrantes de *Populus deltoides* y clones del híbrido *Populus x euramericana*. Se obtuvieron importantes avances en la transformación de *P. deltoides* y *P. x euramericana*, obteniéndose líneas transgénicas portadoras del gen de floración precoz para ambas especies, que regeneraron en plantas completas. Este estudio representa un gran avance en la transformación del *P. deltoides* y *P. x euramericana* siendo éstos los primeros álamos de estas dos especies con la característica de floración precoz. Se obtuvieron líneas transgénicas dobles de *P. tremula*

L., conteniendo tanto el gen de floración precoz como el de androesterilidad (HSP::*AtFT* y PsEND1::*barnase*) a partir de la transformación genética en simultáneo, con dos diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens*. Esto permite acelerar notoriamente el tiempo de transformación cuando se quiere incorporar más de un gen de interés a una planta. Todas las líneas transgénicas fueron corroboradas por PCR con diferentes primers específicos para cada gen y sus promotores respectivos y/o el gen de selección. Los análisis de Southern blot han servido para confirmar las transformaciones y cuantificar el número de copias en algunas de las líneas transgénicas. Se evaluó el desarrollo de la floración precoz inducida por el constructo HSP::*AtFT* , al mismo tiempo que la androesterilidad, inducida por la expresión del constructo PsEND1::*barnase* en plantas de *Populus tremula* L. transgénicas. Confirmamos que el sistema HSP::*AtFT* en álamos combina una inducción de la floración precoz con un normal crecimiento vegetativo. La extracción y tinción de los granos de polen obtenidos confirma la fertilidad de las flores obtenidas con este sistema. La combinación del tratamiento de altas temperaturas con el tratamiento de bajas temperaturas permite la obtención de álamos transgénicos con flores fértiles, independientemente de la estación del año. Este sistema mostró ser eficiente incluso en plantas muy pequeñas. La etapa no reproductiva en esta especie es generalmente de 7-10 años, y pasó a ser de 4-6 meses. Este sistema también nos permitió realizar estudios relacionados a la esterilidad masculina. Con estos resultados podemos inferir que el sistema PsEND1::*barnase* es efectivo para obtener álamos masculinos transgénicos estériles. Se logró mediante el sistema barnase disminuir/anular la calidad y cantidad de polen viable en las plantas transgénicas. Este estudio tiene relevancia para ensayos de contención genética. Disponer de este protocolo eficiente de transformación con genes de androesterilidad permitirá en un futuro modificar genéticamente clones de álamo de interés local para introducir, junto con esta característica, caracteres de importancia silvicultural, de forma controlada. También se podrán desarrollar clones de álamos con floración precoz para programas de mejora genética. Los resultados obtenidos nos permiten aceptar las hipótesis planteadas.

## Summary

The Poplar has become a model tree for physiological, genomic and molecular studies. It is considered an ideal tree in forest genetics and biotechnology studies, because of its rapid growth, its vegetative reproduction capacity, relatively small genome and easy *Agrobacterium* transformation, added to its economic importance at world level. The release of the genetically modified (GM) poplars into the environment has limitations from an environmental, commercial and public perception points of view. In terms of environmental impact, there are many question about the long term that de GM tree will be in the environment, so there would be risks associated with gene flow. If it were possible to obtain sterile GM trees, these risks would be avoided, since the tree would not produce pollen, with the additional advantage that they could re-direct the energy to the vegetative growth, which would imply a less forest rotation time. However, in order to assess sterility, the flowering is necessary. Most poplars do not flower before the age of seven, and many of them take longer. This not only imposes a restriction on the applicability of experimental conventional breedings, but, once introduced a sterility gene, the time to evaluate it is very long. This thesis worked with *Populus tremula* L. as a model tree and with *P. deltoides* and their derived hybrids. The hypothesis was that the time of evaluation of steril GM poplars could be shortened with early flowering induction, through the simultaneous expression of two transgenes. The general objective was to optimize a *Populus* sp. genetic modification system for the incorporation of the early flowering and male sterility genes (HSP::*AtFT* and PsEND1::*barnase*), accelerating the time of obtaining double transgenic lines. An efficient *in vitro* plant regeneration method for recalcitrant *Populus deltoides* clones and *Populus x euramericana* clones was adjusted. Significant advances in the transformation of *P. deltoides* and *P. xeuramericana* were obtained, obtaining transgenic lines carrying the gene of early flowering for both species, which regenerated in complete plants. This study represents a great advance in the *P. deltoides* and *P. euramericana* transformation, being these the first poplars of these two species with the precocious flowering characteristic. Double transgenic lines of *P. tremula* L. were obtained, with both the early flowering gene and the male sterility gene (HSP::*AtFT* and PsEND1::*barnase*) from the simultaneous genetic transformation, with two different *Agrobacterium tumefaciens* strains. This allows an important acceleration of the

transformation time when more than one gene of interest is incorporated into a plant. All transgenic lines were corroborated by PCR with different specific primers for each gene and their respective promoters and / or selection gene. Southern blot analyzes have been used to confirm the transformations and to quantify the number of copies in some of the lines. The development of early flowering induced by the HSP::*AtFT* construct, along with androesterylity, induced by the expression of the construct PsEND1::*barnase* in transgenic *Populus tremula* L. plants was evaluated. We confirm that the HSP::*AtFT* system in poplars combines an induction of early flowering with normal vegetative growth. The pollen grains extraction and tinsion has confirmed the fertility of the flowers obtained with this system. The combination of the high temperatures treatment with the low temperatures treatment allows the obtaining of transgenic poplars with fertile flowers, independently of the year season. This system proved to be efficient even on very small plants. The non-breeding stage in this species is generally 7-10 years, and went on to be 4-6 months. This system also allowed us to carry out studies related to male sterility. With these results we can infer that the Psend::*barnase* system is effective to obtain sterile transgenic male poplars. It was achieved through the barnase system to decrease / negate the quality and quantity of viable pollen in transgenic plants. This study is very important for genetic containment studies. Having this efficient transformation protocol with male sterility genes the local poplars clones can be genetically modified with other characters with silvicultural importance, in a controlled way. Poplar clones with early flowering may also be developed for breeding programs. The results obtained allow us to accept the hypotheses raised.

## **Capítulo I: Introducción y antecedentes**

## 1- El género *Populus* (álamos)

El género *Populus sp.*, vulgarmente conocido como “Álamos”, comprende unas 40 especies entre árboles y arbustos, típicas de zonas templadas y frías septentrionales.

Taxonómicamente, según Engler (1964), se clasifica como se indica a continuación:

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Dicotyledoneae

Subclase: Archychlamydeae

Orden: Salicales

Familia: Salicaceae

Género: *Populus* Las especies de éste género son árboles de un solo tronco, deciduos o semiperennes. Muchas de ellas se reproducen clonalmente mediante la emisión de brotes de sus raíces gemíferas (propiedad poco frecuente en árboles) o el enraizamiento de tallos aéreos (estacas), característica de gran importancia en el establecimiento y manejo de sus plantaciones. Son dioicos y florecen antes de la emergencia de las hojas. Esta sincronización garantiza la máxima polinización por el viento (Eckenwalder, 1996). La forma de la hoja varía sustancialmente entre las especies de *Populus*. Son siempre simples, pero varían su forma: lanceoladas, estrechas a oval ancha o en forma de corazón (Dickmann *et al.*, 2001). Son probablemente los árboles de clima templado que crecen más rápido, un rasgo congruente tanto con su papel de especie pionera como con el de su hábito heterofílico de crecimiento. En su mayoría son colonizadoras de áreas disturbadas por inundaciones, fuego o hielo, en humedales, riberas, orillas de lagos y tierras elevadas como sistemas fluviales de alta montaña o planicies de pie de montaña (Rood *et al.*, 2007; Braatne *et al.*, 1996).

Prefieren suelos limosos, fértiles, profundos y aireados, con menos de 20-30% de arcilla, de pH neutro (6,5 a 7) y sus requerimientos hídricos varían entre 2.000 y 8.000 m<sup>3</sup>/ha/año, dependiendo de las condiciones de sitio (Sanhueza, 1998). Las semillas son no-

durmientes y se dispersan por el viento y el agua. Tienen altas tasas de germinación, pero sólo son viables durante un par de semanas debido a sus escasas reservas, por lo que si fracasan en germinar, perecen en pocos días (Braatne *et al.*, 1996).

Las especies de álamos pueden ser agrupadas de acuerdo a criterios morfológicos y ecológicos en categorías conocidas como Secciones. Tradicionalmente se ha reconocido la existencia de 6 secciones a saber: Turanga, Leucoides, Aigeiros, Tacamahaca, Abaso y Populus o Leuce.

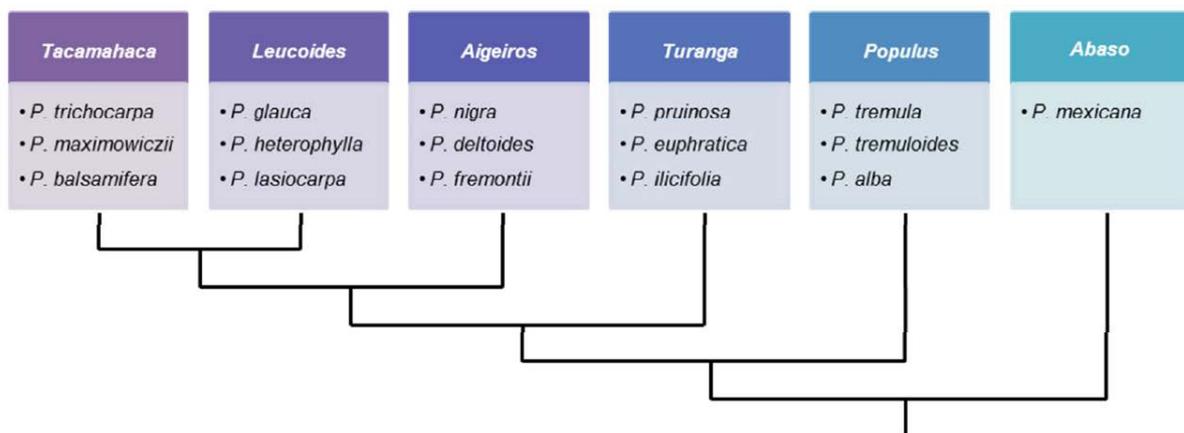


Figura 1.1: Taxonomía interna del género *Populus*. El género *Populus* se divide en seis secciones (Brüggmann, 2011).

Las especies utilizadas en este trabajo de investigación, *P. deltoides* y el híbrido *P. x euramericana* (*P. deltoides* x *P. nigra*), pertenecen a la sección Aigeiros, mientras que el *P. tremula* pertenece a la sección Populus. La primera secuencia del genoma disponible de un álamo fue derivado del clon Nisqually-1 de la especie *P. trichocarpa*. Se trata de un representante de la sección Tacamahaca. El tipo más antiguo filogenéticamente es el *P. mexicana*, único miembro de la Sección Abaso, en el extremo basal del género y tiene una alta similitud con la hermana del género *Salix* (Eckenwalder, 1996).

La sección Aigeiros y Populus son las más interesantes desde el punto de vista forestal para Argentina. La sección Aigeiros contiene a las especies e híbridos más importantes del género *Populus* en todo el mundo. La sección incluye dos álamos de los más conocidos: el álamo negro, *Populus nigra* y el *Populus deltoides* Marshall, álamo oriental.

- **Usos de su madera**

La madera de álamo es muy apreciada a nivel mundial debido a su alta versatilidad y a sus principales propiedades, tales como liviandad, color claro, facilidad para ser descortezada, encolada y todas aquellas tareas de remanufactura final (Castro, 2006).

En términos generales, según Calderón (2006), sus usos se pueden resumir en:

- Usos rurales

- Construcciones rurales

- Postes

- Usos industriales

- Madera para aserrado

  - Carpintería, cajonería, vigas laminadas, lápices, etc.

- Madera debobinada

  - Contrachapados, embalajes livianos, fósforos, palitos para helados, palitos para arroz, etc.

- Madera triturada

  - Tableros aglomerados, OSB, pasta para papel

- Virutas de madera

- Usos medioambientales

- Tratamiento y reutilización de aguas residuales

- Fitorremediación

- Estabilización de riberas

- Dunas

- Retención de carbono

- Usos energéticos

- Sistemas agroforestales

- Otros usos

- Ornamental y forrajera

En Europa, la pasta, el papel y el cartón son los usos preferentes del álamo. Otros usos importantes en Europa son embalajes (palets, cajas y jaulas) y tableros de madera reconstituidos; estos últimos son también un uso importante en Argentina y América del Norte. Muchos países producen contrachapados con especies de Salicaceas (álamos y sauces). En Chile, la Federación de Rusia, India, la República de Corea y Suecia se utilizan para producir fósforos. La madera de construcción es un importante uso final en Turquía, Finlandia y Argentina. En los Estados Unidos, un auge en la construcción de casas a raíz del descenso de los tipos de interés, ha hecho que aumente la demanda de tableros compuestos a base de álamo. La artesanía y los trabajos con mimbre son usos importantes en Chile y la Federación de Rusia. En Bélgica y Chile, se utilizan también en la fabricación de muebles. El uso de madera de álamo como leña o para producción de bioenergía ha atraído alguna atención, sobre todo en Europa, aunque actualmente solo es importante en Suecia, Reino Unido y Turquía. En Egipto se utiliza localmente como leña el *Populus euphratica*, que crece naturalmente en tierras salinas recién saneadas. En Nueva Zelanda se está promoviendo la poda baja (trasmochos) de álamos y sauces para producir ramas jóvenes y follaje que se utilizan como forraje alternativo, en especial en épocas de sequía.

En varios países se utilizan álamos y sauces principalmente con fines medioambientales, tales como protección del suelo y el agua, que constituyen servicios valiosos más bien que productos forestales. Juegan un rol de importancia en la mejora y conservación del ambiente, especialmente en la protección de las cuencas y cultivos; en la remediación de aguas y suelos contaminados, y en el balance de dióxido de carbono (Isebrand and Karnosky, 2001; Pilipovic *et al.*, 2006; Schultz *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1999).

## **2- *Populus sp* en el contexto mundial**

Alrededor de 70 países cultivan álamos y sauces en combinación con otras especies forestales naturales, en plantaciones y como árboles separados en el paisaje (incluidos sistemas agroforestales) (Ball *et al.*, 2005). Se los puede encontrar en bosques nativos en el hemisferio norte y en plantaciones en latitudes templadas de ambos hemisferios, ya sea en macizos, cortinas o pequeños grupos de árboles aislados, según cuál sea el objetivo, o en sistemas silvopastoriles (Pincemin *et al.*, 2007; Dickmann, 2006). Los informes de los países a la Comisión Internacional del Álamo (CIA), en 2004, indicaron que cubren una superficie de más de 80 millones de hectáreas en todo el mundo. La Federación de Rusia, Canadá y los Estados Unidos de América son los países con más extensas superficies de bosques naturales de álamos y sauces, mientras que China, India y Pakistán cuentan con las más extensas plantaciones.

La gran mayoría de los álamos y los sauces crecen en bosques y arboledas naturales. En todo el mundo, el 91 por ciento de los álamos están en bosques naturales, el 6 por ciento en plantaciones y el 3 por ciento en sistemas agroforestales y como árboles fuera de los bosques. La superficie total ocupada por los álamos en condición natural, que dan cuenta los informes de los países, es de más de 70 millones de hectáreas. El 97 por ciento de ellas en Canadá, la Federación de Rusia y los Estados Unidos, donde se utilizan sobre todo para la producción de madera. En los otros países principales con bosques naturales de álamos (Tabla 1.1), se cultivan principalmente con fines medioambientales como conservación *in situ*, protección del suelo y del agua y restauración del paisaje.

País	Superficie (1 000 ha)
Canadá	28 300
Federación de Rusia	21 900
Estados Unidos	17 700
China	2 100
Alemania	100
Finlandia	67
Francia	40
India	10
Italia	7

Tabla 1.1 Principales países con bosque naturales de álamos. Fuente: Ball *et al.*, 2005

### **Plantaciones y árboles fuera de los bosques.**

Básicamente, los álamos son endémicos en el hemisferio norte. Tal cómo se describe en Willing & Pryor (1976) y el IPC (2004), las plantaciones de álamo antropogénicas también se pueden encontrar en el hemisferio sur, especialmente en Argentina (63.500 ha), Chile (15.000 ha), pero también en África del Sur, Australia y Nueva Zelanda. La superficie mundial de plantaciones de álamos (para producción de madera o con fines medioambientales, o en sistemas agroforestales) era 6,7 millones de hectáreas, de las cuales 3,8 millones de hectáreas (56 por ciento) se destinaban principalmente para producción de madera y 2,9 millones de hectáreas para fines medioambientales. El 30 por ciento de la superficie total plantada estaba en sistemas agroforestales, a los que corresponde también el 40 por ciento de la producción mundial de madera de álamo. China tiene el 73 por ciento de la superficie total mundial de plantaciones de álamos (Tabla 1.2), lo que incluye el 53 por ciento de las plantaciones mundiales para la producción de madera, casi todas las plantaciones con fines medioambientales y el 49 por ciento de las plantaciones en sistemas agroforestales. India tiene también el 49 por ciento de las plantaciones agroforestales. Más de la mitad de las plantaciones de álamos y sauces en sistemas agroforestales y fuera de los bosques son de propiedad pública.

País	Superficie (1 000 ha)
China	4 900
India	1 000
Francia	236
Turquía	130
Italia	119
Argentina	64

Tabla 1.2 Principales países con bosque de cultivo de álamo. Fuente: Ball *et al.*, 2005.

### Tendencias de la producción

Las extracciones anuales de alamedas naturales fueron importantes, según los informes, se extrajeron en la Federación de Rusia 100 millones de m<sup>3</sup> y en Canadá, 16 millones de m<sup>3</sup>. Cinco países (Turquía, China, Francia, Italia y la India) informaron sobre extracciones anuales de más de un millón de metros cúbicos de madera de álamo de plantaciones. Todas las extracciones de la India procedían de sistemas agroforestales. La producción agroforestal fue también importante en Italia (0,5 millones de m<sup>3</sup>) y en China (0,2 millones de m<sup>3</sup>). En el país asiático se prevé una importante expansión de las plantaciones de álamos como parte del plan nacional para aumentar considerablemente la producción de pasta de madera. Además, seis proyectos de plantaciones para producción de madera y protección de la tierra, iniciados en 2002, incluyen álamos y sauces. Estas plantaciones cobrarán más importancia frente a los bosques naturales en el suministro de madera. (IPC, 2004).

### 3- *Populus* en Argentina

En Argentina, la superficie de bosques plantados, se estima en 1.200.000 ha aproximadamente, de las cuales, un 10% están representadas por salicáceas (*Populus* sp y *Salix* sp). Se cultivan alrededor de 64.000 ha, 23.500 ha bajo sistemas agroforestales y 40.500 ha en macizos, ocupando así, el tercer y décimo lugar de importancia a nivel mundial respectivamente (Cortizo, 2011; Ball *et al.*, 2005). Con un valor destacado en la producción forestal Argentina, las salicáceas ocupan el tercer lugar respecto a volúmenes de madera extraídos anualmente y a cantidad de superficie plantada, por debajo de los

géneros *Pinus* y *Eucalyptus*. Según las estadísticas del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (MAGyP, 2010), la extracción de productos forestales totales de bosques plantados en Argentina puede dividirse en: 60% pertenecientes a especies de coníferas, 32% a latifoliadas del género *Eucalyptus*, 7% a latifoliadas pertenecientes a Salicáceas y 1% a la extracción de otras especies. Del total del consumo aparente de rollizos de bosques plantados, aproximadamente el 50 % tiene como destino la elaboración de pasta celulósica, el 30 % la industria de la madera aserrada y el resto se distribuye entre la producción de chapas de madera mediante corte a la plana (faqueado) - desenrollo (debobinado) y la producción de tableros.

Entre las especies del género *Populus*, la variedad *deltoides* y los cultivares de la variedad híbrida euramericana son los más representativos (MAGyP, 2014; Marquina *et al.*, 2006).

Las principales áreas productivas son el Delta del Río Paraná, Cuyo, Patagonia y zonas de secano de la Provincia de Buenos Aires, cada una con particularidades que definen las especies utilizadas, las características de las plantaciones y su finalidad (Cortizo, 2011). En las regiones áridas de Mendoza y el Alto Valle del Río Negro (Neuquén y Río Negro), además de las provincias de La Pampa y Santiago del Estero, los álamos son cultivados en un ambiente que se caracteriza por un déficit hídrico y un suelo suelto de textura arenosa, con provisión de agua en forma de riego (Comisión Nacional del Álamo, 2000). En estas áreas se ha desarrollado una actividad foresto-industrial que atiende la demanda de cajonería y materiales de empaque. Por ejemplo, en Mendoza, el 50% de la producción actual de madera se destina a aserrado y cajonería, y el resto a la producción de tableros aglomerados (ocasionalmente se registra un 10% destinado a pastas que es consumido en Buenos Aires) (Comisión Nacional del Álamo, 2000). En el Alto Valle, el 90% de la madera rolliza producida se destina a la industria del aserrío (principalmente para cajonería de empaque de frutas) y el 10% restante se destina al debobinado (Comisión Nacional del Álamo, 2000). En Patagonia, las Salicáceas, con una superficie de unas 20.000 ha, aportan alrededor del 80% del volumen de madera extraída de bosques plantados, superando también a las principales especies nativas, como la lenga (*Nothofagus pumilio*) y el ciprés de la cordillera (*Austrocedrus chilensis*) (Valor agregado, 2005). La madera extraída se utiliza principalmente en la elaboración de envases y embalajes (42%); tableros multilaminados y aglomerados (25%); en la construcción

(26,5%); y en la extracción de celulosa (6,5%) (Davel *et al.*, 2008). Se estima que la superficie de álamo en la región se va a mantener e incluso a incrementar, debido a la existencia de un área con condiciones ecológicas y de sitio aptas para producir madera de alta calidad y con altos rendimientos por hectárea. A lo anterior, se suman la disponibilidad de planes de promoción de plantaciones forestales y la recuperación de la competitividad de los envases de madera. (Serventi y García, 2004).

El Delta, debido a su cercanía a los centros de consumo y a su aptitud productiva, ha sido y es la principal región de cultivo de Salicáceas, contando en la actualidad con la mayor superficie forestada (Borodowski y Suarez, 2005), de aproximadamente 57.539 ha (MinAgri, 2012). En la región pampeana, los mayores emprendimientos forestales con el género *Populus* se localizan en el centro-norte de la provincia de Buenos Aires y sur de la provincia de Santa Fé (Achinelli *et al.*, 2004). Tradicionalmente, la pulpa, el papel y el cartón han sido los destinos principales de la producción de álamo. En los últimos años se ha incrementado su uso para obtención de productos de madera sólida, como madera de construcción, contrachapado, tablero de partículas y chapa laminada, además de palets y cajones (Ball *et al.*, 2005; Stanton *et al.*, 2002).

Actualmente, en nuestro país, las plantaciones comerciales están constituidas principalmente por cuatro clones de *Populus deltoides*: 'Australiano 129/60', 'Australiano 106/60', 'Stoneville 67' y 'Carabelas INTA'; y un clon de *P. x euramericana* (*P. x canadensis*) el 'Ragonese 22 INTA' (EX 568-1). Son clones con buenos rendimientos volumétricos y resistentes a roya y a cancrisis. La tolerancia a la sequía varía significativamente entre los diferentes genotipos de *Populus deltoides* (Wullschleger *et al.*, 2009). En general, estos clones necesitan suficiente humedad para mantener las altas tasas de crecimiento características de este género (Wullschleger *et al.*, 2009). El *Populus deltoides* y otras especies de *Populus* de crecimiento rápido, producen biomasa máxima bajo riego o cuando están creciendo en hábitats ribereños (Wullschleger *et al.*, 2009).

Los avances relevantes en el mejoramiento genético de estos clones se dirigieron principalmente a la resistencia a epifitias de efectos devastadores, que obligaron a la búsqueda permanente de nuevos materiales. Sin embargo, se hace necesario continuar con la producción de material mejorado que asegure la adaptabilidad, productividad y sostenibilidad de las plantaciones de álamos a situaciones cambiantes (Cortizo y

Monteverde 2006). Estas plantaciones, presentan ciertas limitantes y restricciones, debidas a factores bióticos y abióticos. La competencia de las malezas tiene un pronunciado efecto en la disminución de los dos parámetros de mayor significancia silvicultural: la supervivencia y el crecimiento inicial de los árboles jóvenes. Estos aspectos adquieren especial relevancia en los álamos, los cuales son considerados exigentes en cuanto al suministro de agua y nutrientes, y muy sensibles a la interferencia por malezas en la fase de establecimiento (Achinelli *et al.*, 2003). Actualmente, existe una gran preocupación por la aparición de dos nuevas plagas en el Delta, la “avispa taladradora de las latifoliadas” (*Tremex fuscicornis*, Himenóptera, Siricidae), y los “escarabajos de ambrosía” de la tribu Xyleborini (*Xyleborus spp.*; *Xylosandrus crassisculus* y *Ewalacea validus*); todos catalogados de carácter exótico cuarentenario e invasivo para la región del Delta del Paraná (AFoA, 2013) y también a nivel internacional. Disminuyen la calidad de la madera con destino a debobinado o aserrado, impactando en la cadena foresto industrial, siendo mayormente afectados los pequeños y medianos productores, que terminan obligados a vender la madera a precios menores y con destino hacia la industria del triturado. (Buenos Aires Forestal, 2013). No existen actualmente, clones resistentes a estas plagas. Otra de las grandes amenazas de las plantaciones actuales son los daños producidos por el taladro grande de los forestales (*Platypus mutatus Chapuis*) y su expansión a nuevas áreas de cultivo, por la falta de conocimiento del cultivo, de los sitios y clones adecuados.

Existe la necesidad de mejorar e incrementar las plantaciones como forma de contribuir a satisfacer las necesidades futuras de madera y como parte de las estrategias nacionales y mundiales de ordenación forestal. Las plantaciones suministran actualmente sólo el 7 al 10% de la producción mundial de madera comercial, y la extensión de superficie plantada debe incrementarse. El establecimiento de plantaciones que puedan suministrar eficientemente productos de madera y pasta de papel y, por lo tanto, reducir la demanda de madera procedente de bosques vírgenes es un método potencial para disminuir las tasas de deforestación. Sin embargo, para que las plantaciones cumplan con esta demanda, deben ser mucho más productivas que los bosques naturales, por lo que es esencial generar programas de mejoramiento forestal para la selección de individuos genéticamente superiores de grandes poblaciones y su multiplicación mediante el uso de semillas o por reproducción asexual (Fenning y Gershenzon, 2002). Este objetivo

encuentra diversos inconvenientes, entre ellos, la necesidad de obtener árboles mejorados en corto tiempo. Lamentablemente, la mejora de árboles requiere mucho más tiempo que las plantas anuales. Los principales límites a un mejoramiento rápido son: a) el largo intervalo generacional, asociado con la baja correlación entre formas juveniles y adultas, y la prolongada fase juvenil con respecto a la fase de floración; b) la reducida eficacia de la selección en lo que respecta a muchos caracteres, debido a la baja heredabilidad o a la dificultad para realizar una evaluación; c) el hecho de que sólo se explote una parte de la variación genética disponible debido a la utilización de huertos de polinización libre; d) la ardua labor que implica la selección de las especies más promisorias.

El proceso del mejoramiento genético forestal necesario para obtener árboles que tengan las características deseadas para realizar una plantación comercial, implica el desarrollo de poblaciones genéticamente superiores en una o varias características (por ejemplo, crecimiento, forma, calidad de madera, etc.), respecto de las corrientemente utilizadas y su utilización operativa a través de la producción de semillas o clones de individuos mejorados. Como tal, el proceso implica una constante evolución para dar respuesta a factores bióticos (aparición de nuevas plagas y enfermedades, etc.) y abióticos (factores climáticos, demandas por desarrollo de nuevos productos, etc.) cambiantes.

#### **4- Biotecnología Forestal**

Para el año 2050 se estima que se triplicará la demanda de madera de los bosques y plantaciones (WWF, 2015). Este incremento está relacionado con el incremento global de la población mundial, que ejercerá una presión importante sobre la biodiversidad forestal y los productos a base de madera.

Los avances tecnológicos en silvicultura, manejo de tierras y la generación de herramientas biotecnológicas contribuirán para mejorar la productividad y la sostenibilidad de los bosques naturales y plantados.

La biotecnología moderna ofrece alternativas tecnológicas para superar las limitaciones del mejoramiento tradicional de especies forestales, anteriormente citadas y contribuye

a cumplir los dos objetivos básicos y clásicos de la gestión forestal: el mantenimiento y la ordenación de la diversidad de los bosques naturales, y la mejora genética de las plantaciones forestales. Los beneficios potenciales de la biotecnología son aún mayores en la silvicultura que en la agricultura, ya que en muchos casos permitirá acelerar los procesos de mejoramiento de especies arbóreas. Los problemas de producción o de rendimiento con que tropiezan los silvicultores no son menos urgentes que los que enfrentan los agricultores. Sin embargo, la biotecnología moderna debe considerarse como un conjunto de instrumentos que complementan las tecnologías convencionales. Aunque ofrece oportunidades interesantes, sobre todo para la conservación genética y para aumentar la producción de madera, se necesita un enfoque prudente que examine, caso por caso, su integración en los programas de conservación y mejoramiento a largo plazo.

Las aplicaciones biotecnológicas en especies forestales se basan en tres grandes áreas de actividad, frecuentemente interconectadas (Haines, 1994):

a) Técnicas de cultivo de tejidos, que aumentan la tasa de multiplicación vegetativa y permiten la producción a gran escala de materiales uniformes. b) Técnicas basadas en marcadores moleculares, que pueden usarse, entre otras cosas, para: i) cuantificar la diversidad genética entre poblaciones y árboles individuales; ii) identificar genotipos en estudios taxonómicos, estudios biológicos y de "identificación genética"; y iii) localizar genes que determinan características cuantitativas económicamente importantes; c) Técnicas de ADN recombinante, para la transformación genética de especies forestales.

El álamo se ha convertido en un organismo forestal modelo para estudios fisiológicos, genómicos y moleculares (Jansson y Douglas, 2007; Taylor, 2002; Wullschleger et al., 2002). Se considera un árbol ideal en los estudios de genética forestal y biotecnología, en regiones templadas y boreales, por su rápido crecimiento, su capacidad de reproducción vegetativa, genoma relativamente pequeño y facilidad de transformación con *Agrobacterium*, sumados a su importancia económica a nivel mundial (Strauss et al., 2003, Xia Ye, et. al., 2011; Marchadier y Sigaud, 2005). Entre 1994 y 2004 el *Populus* fue el segundo género arbóreo más usado en los estudios de biotecnología en general (después del *Pinus*) y, el más utilizado en la modificación genética en todo el mundo. La primera especie arbórea forestal para la que se determinó la secuencia del genoma

completo fue un álamo, el *P. trichocarpa*, trabajo que se realizó en el año 2004 (Oak Ridge National Laboratory, 2004; JGI, 2004).

Un estudio realizado por FAO (2004), identificó 76 países que realizan investigación aplicación de biotecnología forestal. La mayoría se realiza en países desarrollados (68%). Regionalmente, las actividades de biotecnología forestal son muy numerosas en Europa (39%), Asia (24 %) y América del Norte (23 %), y menos numerosas en Oceanía (6 %), América del Sur (5 %), África (3 %) y resto del mundo (menos de 1%). La investigación abarca por lo menos 140 géneros, la gran mayoría de los trabajos (62 %) se ha enfocado en sólo seis (*Pinus*, *Eucalyptus*, *Picea*, *Populus*, *Quercus* y *Acacia*).

### **Modificación genética de árboles**

La ingeniería genética, amplió considerablemente los límites de disponibilidad de genes impuestos por la incompatibilidad sexual en el mejoramiento convencional de plantas. Permite introducir genes provenientes no sólo de otras especies vegetales muy alejadas desde el punto de vista de la evolución, sino incluso de hongos, virus, bacterias y animales, lo que representa un medio versátil y preciso para producir variedades mejoradas en un corto plazo. Mediante la tecnología de ADN recombinante se puede modificar el genoma de los árboles. Para introducir nueva información genética, deben satisfacerse dos requisitos: disponer de un método para la regeneración *in vitro* de la especie de interés y contar con un método de transformación genética eficiente. Por lo que concierne a la regeneración, con las técnicas de cultivo de tejidos pueden obtenerse, en teoría, plantas completas a partir de cualquier célula o tejido. Su uso resulta, pues, indispensable para la regeneración de árboles modificados genéticamente que contengan la nueva información genética.

La introducción de genes en árboles se realiza a menudo usando sistemas de transformación basados en *Agrobacterium tumefaciens*. En dichas especies, la transformación se obtiene generalmente por bombardeo con micropartículas (método directo). La transformación genética en especies forestales ha sido más limitada que en cultivos agrícolas. Los éxitos en este tipo de especies son hasta el momento limitados debido a los problemas asociados a la regeneración de las plantas, especialmente si se

considera que muchas especies forestales son aún consideradas recalcitrantes al cultivo *in vitro* y que la transformación de una nueva especie depende de su capacidad de regeneración en plantas completas (Marcucci *et al.*, 2010).

Los dos objetivos más importantes en la investigación en ingeniería genética forestal son el aumento en la producción de biomasa y los cambios en la estructura de la madera. Otros objetivos se relacionan con la introducción de resistencia o tolerancia a los estreses bióticos y abióticos (como sequías, heladas, inundaciones, alta salinidad, plagas y enfermedades, etc.). La utilización de árboles transgénicos se debería limitar a las plantaciones comerciales, mientras que, como criterio general, esta tecnología no debería aplicarse en la mayor parte de los bosques naturales (Marcucci *et al.*, 2010; Fladung & Ewald, 2006; Sharry, 2005).

## **5- Modificación genética del género *Populus***

### **Transformación genética del género *Populus***

El álamo fue el primer árbol forestal genéticamente modificado (GM) liberado comercialmente; la Administración Forestal Estatal de China aprobó en 2002 la plantación comercial de álamos GM, y a fines de ese año se habían plantado en China más de 1,4 millones de álamos GM resistentes a insectos (Marchadier y Sigaud, 2005). El segundo árbol modificado genéticamente aprobado para su comercialización es un eucaliptus GM, desarrollado en Brasil, por la empresa FuturaGene Brasil Tecnología Ltda., tras 14 años de investigación. Al mismo se le incluyó un gen de la especie *Arabidopsis thaliana* que acelera su crecimiento. La Comisión Nacional Técnica de Bioseguridad (CTNBio) aprobó el 9 de abril de 2015 su liberación al medio. Sin embargo en nuestra región aún no hay reportes de álamos modificados genéticamente liberados.

El primer álamo transgénico (tolerante a herbicidas), fue obtenido utilizando métodos indirectos (mediado por *Agrobacterium*) por Fillati y colaboradores en 1987. A partir de ese trabajo numerosos genes fueron utilizados para transformar distintas especies de *Populus* con diversas variantes, que incluyen el genotipo, el tipo de explante, el procedimiento de selección, los genes introducidos *in vitro*, el objetivo y la cepa de *A. tumefaciens* o de *A. rhizogenes* utilizada (sin ser exhaustivos: Hai *et al.*, 2016; Min *et al.*,

2014; Zhou *et al.*, 2014; Molina Rueda *et al.*, 2013; Shim *et al.*, 2013; Yan Huang *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2011; Voelker *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2006; Fladung, *et al.*, 2004; Campbell, *et al.*, 2003, 1997; Meilan., *et al.*, 2002, 2000; Brunner *et al.*, 2000; Eriksson *et al.*, 2000; Confalonieri, *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 1999; Rotino, 1997; Strauss, *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1996; Tuominen *et al.*, 1995; Brasileiro *et al.*, 1992, 1991; Leplé *et al.*, 1992), que permitieron mejorar la eficiencia de transformación (Xi Ye *et al.*, 2011; Busov *et al.*, 2010; Meilan & Ma, 2006).

Actualmente la tendencia en la modificación de álamos es hacia la obtención de bioetanol, dendroenergía (Costa *et al.*, 2013; Dubouzet *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2011) o para fitorremediación (Lee *et al.*, 2012; Guerra *et al.*, 2011). Se ha avanzado en el impacto ambiental que podrían tener los árboles modificados genéticamente, estudiando plantaciones experimentales a campo de álamos GM, que han permitido obtener información sobre las interacciones de este tipo de árboles con los distintos compartimientos de un ecosistema (Danielsen *et al.*, 2013; Winder *et al.*, 2013). También en la estabilidad de los genes incorporados, teniendo en cuenta la longevidad de estas especies, y la permanencia en el campo de estos organismos, que los diferencian de otros cultivos GM ya comercializados. Todos estos estudios se dirigen a investigar cuestiones relacionadas con la bioseguridad de árboles genéticamente modificados. (Fladung *et al.*, 2013; Vettori *et al.*, 2016).

Los últimos avances en transformación genética de árboles tienen el foco en la liberación segura al medio de estos organismos (bioseguridad), para luego poder insertar otros genes de interés y evitar la transferencia de polen al medio. En este sentido, se han probado estrategias para promover la floración precoz y acortar los tiempos de los árboles para alcanzar la fase reproductiva no sólo para poder acelerar los programas convencionales de mejoramiento, sino también evaluar la transferencia vertical de genes para estudios de bioseguridad (Hoenicka *et al.*, 2012; Hoenicka *et al.*, 2006).

## **Manipulación genética de células vegetales usando *Agrobacterium tumefaciens***

### **-Vectores Binarios**

Estos son los vectores más usados para la transformación de plantas y se encuentran en una gran variedad. En este sistema *Agrobacterium* tiene dos vectores: uno que contiene la región del T-ADN con el gen de interés y otro vector que contiene la región vir. Los vectores binarios Ti tienen sitios de replicación para *Escherichia coli* y *A. tumefaciens*, permitiendo el desarrollo de técnicas de manipulación in vitro en *E. coli* (Hellens y Mullineaux, 2000). Dentro de los vectores simples binarios se encuentran pBIN 19, pC22, pGA482, pPCV001, pGreen y pCAMBIA entre otros. Su principal diferencia radica en el tamaño, el número de sitios de restricción del ADN-T, la presencia de genes reporteros, los orígenes de replicación y el antibiótico de selección en bacterias y plantas (Hellens y Mullineaux, 2000). Se han realizado modificaciones de estos vectores mediante la introducción en el cromosoma de *Agrobacterium* ya sea la región del ADN-T o la región vir. Cuando la región T está integrada en el cromosoma, la región vir es parte del plásmido Ti y viceversa. Otras modificaciones también han permitido obtener cepas hipervirulentas de *Agrobacterium* capaces de mediar la transformación de cereales. Las cepas hipervirulentas contienen en el vector binario un cassette extra de genes vir B, C y G (Khanna y Daggard, 2003). La construcción de vectores binarios con sitios de reconocimiento de endonucleasas permite el ensamblaje de cassettes flanqueados por estas secuencias, para la construcción de vectores de transformación de plantas que contienen múltiples cassettes de expresión. Este sistema permitió la transformación y expresión de seis genes en *Arabidopsis thaliana* (Goderis et al., 2002). En la actualidad están disponibles una amplia variedad de vectores Ti que los investigadores pueden escoger de acuerdo a sus necesidades y capacidad tecnológica. (Valderrama Fonseca et al., 2005).

### **- Vectores binarios con tecnología GATEWAY™**

En el campo de la biología molecular, la tecnología de clonación se ha convertido en una herramienta indispensable permitiendo el análisis funcional y/o de expresión de genes; en los últimos años esta tecnología ha tenido avances considerables, al desarrollarse un nuevo sistema de clonación llamado GATEWAY® (Invitrogen), que provee una forma

más fácil, rápida y eficiente para clonar genes o fragmentos de ADN de interés. El sistema de clonación GATEWAY® reemplaza las endonucleasas de restricción y la ligasa, por una serie de recombinaciones de sitios específicos, a través de las cuales se pueden transferir segmentos de ADN entre diferentes vectores. Este sistema se basa en las reacciones de recombinación que el bacteriófago  $\lambda$  lleva a cabo en la bacteria *E. coli*, mediadas por enzimas codificadas por ambos microorganismos. Los sitios de recombinación se denominan attP, attB, attR y attL, dichos sitios solo se pueden recombinar en una forma específica: los sitios attB se recombinan con los sitios attP, y los sitios attL se recombinan con los sitios attR; por lo que las reacciones de recombinación se conocen como: reacción BP y reacción LR respectivamente. La reacción LR es la recombinación entre un vector DE ENTRADA y un vector DESTINO, realizada por una mezcla de enzimas llamadas CLONASA LR, esta reacción transfiere fragmentos de ADN del vector DE ENTRADA al vector DESTINO para crear un vector DE EXPRESIÓN. El vector DESTINO además del gen de resistencia a algún antibiótico, contiene un gen letal para *E. coli* denominado ccdB, la proteína codificada por éste gen interfiere con el reconocimiento de la ADN girasa, causando que el cromosoma se corte en pedazos por lo que, al no ser llevada a cabo de manera correcta la recombinación, las bacterias transformadas morirán, garantizando una eficiencia de hasta el 99%. La reacción BP es lo inverso a la reacción LR, transfiriendo fragmentos de ADN de un vector DE EXPRESIÓN a un vector DONADOR, para producir nuevamente un vector DE ENTRADA, creando de esta manera un ciclo. Esta reacción es catalizada por una mezcla de enzimas llamada CLONASA BP. Este sistema de clonación cuenta con ventajas interesantes como: transferir uno o más fragmentos de DNA dentro de diferentes tipos de vectores de manera paralela, mantiene el marco de lectura y la orientación del segmento de ADN transferido, debido a su alta eficiencia minimiza la necesidad de chequeo de colonias transformadas; prácticamente cualquier vector se puede convertir en un vector compatible con este sistema creando un vector DESTINO; el proceso de clonación es más fácil y rápido. Todas estas características hacen del sistema GATEWAY® una herramienta útil en el proceso de clonación, por lo que actualmente, es empleado ampliamente en la biología molecular.

## **Expresión de genes transferidos**

La expresión de genes foráneos en una planta transformada con *Agrobacterium*, puede estar controlada por promotores constitutivos (Graham, et al., 1998) o por promotores específicos o inducibles (Barton y Dracup, 2000). Dentro de este grupo de promotores constitutivos, se incluyen los pocs y pnos de los genes del ADN-T de octopina y nopalina, respectivamente, y los de tipo viral como el 19S y el 35S del virus mosaico del coliflor (CaMV) (Graham, et al., 1998). Particularmente, el promotor CaMV 35S, es muy utilizado ya que se caracteriza por un mayor y más estable nivel de expresión que los promotores de opinas, hecho que se traduce en un incremento en la eficiencia de los genes marcadores reporteros y de selección (Orozco y Narváez, 1994). Por otro lado, los promotores específicos pueden determinar la expresión del ADN foráneo en ciertos tejidos; de esta forma se restringe esta expresión a raíces, hojas u otras áreas en donde es deseada (Lai y Lai, 1993), o pueden ser inducidos durante el ciclo de vida de la planta; así, ciertos promotores responden a señales químicas, estrés hídrico, temperatura, daño mecánico y luz entre otros. Por ejemplo, un promotor inducible con la luz es del gen *cab*, que codifica para la mayoría de las proteínas de la clorofila a/b (Barton y Dracup, 2000). Además de los promotores, se incluyen secuencias de terminación de la transcripción, que pueden ser la del gen nopalina sintetasa del ADN-T de *Agrobacterium*. Adicionalmente, los plásmidos portan sitios de corte para enzimas de restricción, este conjunto debe ser insertado entre secuencias borde del ADN-T (Graham, et al., 1998; Grierson y Covey 1991).

## **Modificación de la floración**

Las especies forestales alcanzan la madurez reproductiva sólo después de muchos años o incluso décadas de crecimiento juvenil (Weigel and Nilsson 1995; Hoenicka and Fladung 2006). Por lo tanto, los árboles de floración precoz, ya sean naturales o transgénicos, son muy importantes como herramienta tanto para el mejoramiento de estas especies como para la investigación en bioseguridad. Lograr sistemas eficientes de álamo de floración temprana permitiría estudios más rápidos sobre contención génica. Sin embargo, los primeros estudios de bioseguridad que siguieron esta estrategia,

mostraron la importancia de mejorar los sistemas de floración temprana de los álamos. (Hoenicka et al., 2006, Hoenicka et al., 2012).

La modificación de la floración (promoción, inhibición y determinación del sexo) es también un objetivo interesante para acelerar la mejora genética de especies leñosas. La inducción de la floración precoz en álamo transgénico con el gen de FLORACIÓN LOCUS T, procedente de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (pHSP: *AtFT*), permitió obtener algunas flores fértiles, acortando la fase reproductiva de los habituales 7-10 años a aproximadamente sólo 1 año (Hoenicka et al., 2014). La mayoría de los genes implicados en la regulación de la floración fueron descubiertos en *Arabidopsis* (revisado en Liu et al., 2009). Sin embargo, los genes del momento de la floración también han sido estudiados en plantas leñosas, como el abedul (Elo et al., 2007, 2001), el álamo (Böhlenius et al., 2006, Hsu et al., 2006; Rottmann et al., 2000,) y la manzana (Wada et al., 2002). Diferentes estrategias de floración temprana basadas en la transferencia genética de un gen del tiempo de floración impulsado por un promotor de genes, como el promotor por choque térmico (HSP) y el promotor 35S, fueron propuestos para el álamo. Los genes de *Arabidopsis* de tiempo de floración *Leafy* (Schultz & Haughn, 1991) y el locus T de floración (Blázquez & Weigel, 1999) permitieron la inducción de la floración precoz en *Populus* (Zhang et al., 2010 Rottmann et al., 2000; Weigel & Nilsson 1995). Además, se ha demostrado que los transgenes pueden inducir una floración precoz en los árboles de manera más eficiente que los cisgenes (Flachowsky et al., 2010, Tränkner et al., 2010; Rottmann et al., 2000). Posiblemente, los transgenes son menos propensos a los "represores endógenos" que los cisgenes.

La transformación genética de *Populus* con los genes *AtLFY* (Weigel & Nilsson, 1995), *AtFT* (Zhang et al., 2010), PTLF (Rottmann et al., 2000), PtFT1 (Boehlenius et al., 2006), PtFT2 (Hsu et al., 2006) y MdFT2 (Tränkner et al., 2010) promovieron de forma exitosa el desarrollo de la floración. El gen-constructo HSP::*AtFT* indujo de manera eficiente la floración precoz en *Populus* (Hoenicka et al., 2012; Zhang et al., 2010). Sin embargo, estos y otros modelos, presentan una alta esterilidad en las flores obtenidas. El estrés por calor producido para la activación de los genes de floración, en algunos de los constructos, han sido propuestos como la causa de estos resultados (Hoenicka et al., 2014).

La morfogénesis de las plantas se basa en intrincadas interacciones entre señales ambientales y desarrollo de programas genéticamente codificados. El desarrollo reproductivo en las plantas también está influenciado por muchos factores ambientales. Se han estudiado las alteraciones inducidas por el estrés en el programa reproductivo, la esporogénesis (micro y megasporogénesis) y la gametogénesis (micro y megagametogénesis) en muchas especies de plantas (De Storme and Geelen 2014, Sakata *et al.*, 2014; Sharma and Nayyar 2014; McDowell *et al.*, 2013, Su *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2010, Oshino *et al.*, 2007). Estudios similares están disponibles en unas pocas especies forestales (Huang *et al.*, 2010; Webber *et al.*, 2005; Issarakraisila and Considine, 1994). Mientras que el desarrollo reproductivo dura sólo unas pocas semanas en plantas anuales, en especies de árboles forestales el desarrollo requiere varios meses (Jansson y Douglas 2007). La vernalización, que es el requisito frío para la inducción de flores, y la latencia de invierno (Rohde y Bhalerao, 2007) han permitido la adaptación de las especies de árboles forestales a los cambios estacionales en las regiones templadas. En los álamos, la iniciación floral ocurre en la primavera tardía (Böhlenius *et al.*, 2006). Los brotes florales hibernan en invierno y la antesis se produce en la próxima temporada de crecimiento (Hanke *et al.*, 2012; Böhlenius *et al.*, 2006.). En *Populus deltoides* Bartram ex Marshall, se ha propuesto un ciclo de floración de 3 años (Yuceer *et al.*, 2003). El ciclo de latencia de crecimiento de los árboles que crecen en las zonas templadas es impulsado por señales ambientales, como el fotoperiodo y la temperatura, e implica la división celular de las células meristemáticas en brotes y tallo (Olsen *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2009). Los efectos de estas señales ambientales sobre la actividad de los meristemas han sido ampliamente explorados (Gricar *et al.*, 2006; Oribe *et al.*, 2001, Oribe y Kubo 1997). El módulo regulador de CO / FT, que controla el tiempo de floración en las plantas anuales en respuesta a variaciones en la longitud del día, también controla la floración; el cese del crecimiento inducido por días cortos ocurre durante el otoño en árboles de álamo (Böhlenius *et al.*, 2006). Sin embargo, los eslabones conectivos entre las señales ambientales y el inicio de la esporogénesis y la gametogénesis siguen siendo desconocidos en las especies arbóreas.

Los análisis genéticos han demostrado la función de algunos genes que regulan el desarrollo del polen (revisado en Wilson *et al.*, 2011; Ma 2005), por ejemplo, DESARROLLO DEFECTUOSO TAPETAL Y FUNCIÓN1 (TDF1) (Zhu *et al.*, 2008), BARELY

ANY MERISTEM1 (BAM1) Y BAM2 (Hord *et al.*, 2006, Feng y Dickinson 2007), SPOROCTELESS (SPL) (Yang *et al.*, 1999), KINASES 1 y 2 (SERK1 / 2) de EMBRYOGENESIS SOMÁTICA RECEPTORLIKE (Albrecht *et al.*, 2005, Colcombet *et al.*, 2005 ) Y MALE STERILITY1 (MS1) (Wilson *et al.*, 2001).

La microsporogenesis (Wang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008, Boes y Strauss 1994; Smith 1943) y megasporogénesis (Xi *et al.*, 2014) se han estudiado en diferentes especies de *Populus*, pero no a nivel molecular. La influencia de los factores ambientales en el desarrollo del polen, su regulación genética y las interacciones con otros reguladores relacionados, incluyendo floración y latencia, permanecen ampliamente desconocidas en el álamo.

La expresión del gen homólogo *FT* de la manzana (MdFT2) induce flores fértiles en la manzana (*Malus × domestica* Borkh.) pero no en el álamo (*P. tremula* L.) (Tränkner *et al.*, 2010). La transformación genética de Citrange (*Citrus sinensis* L. Osbeck × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) (Peña *et al.*, 2001) y álamo (Weigel y Nilsson 1995) con 35S::*AtLFY* promovió el desarrollo de flores fértiles sólo en citrange. Curiosamente, tanto la expresión constitutiva como la inducible por calor de *PtFT1*, de *P. trichocarpa* Hook., permitieron una inducción muy fiable de flores fértiles en otras especies arbóreas como *Prunus domestica* L. (Srinivasan *et al.*, 2012) y manzana (Wenzel *et al.*, 2013), pero nuevamente no en álamo (Zhang *et al.*, 2010). Los resultados reportados por Hoenicka *et al.*, (2016) muestran que las temperaturas de enfriamiento, luego de etapa de calor, tienen una clara influencia en la promoción de la fertilidad de las flores en los álamos macho y hembra pHSP::*AtFT*. Se requiere una fase de tratamiento térmico para inducir la expresión de *AtFT* en plantas transgénicas pHSP::*AtFT*. Se sabe que el calor prolongado es perjudicial para el desarrollo del polen en el álamo de tipo “wild type” (Hoenicka *et al.*, 2014) y muchas otras especies de plantas (De Storme y Geelen, 2014; Jain *et al.*, 2010; Sakata *et al.*, 2010, Endo *et al.*, 2009). Esto puede explicar las dificultades previamente reportadas por muchos grupos para la inducción de flores fértiles en álamo con diferentes construcciones de genes (Shen *et al.*, 2012; Hoenicka *et al.*, 2014, Xiaoming y Huanling 2014; Xiaoming *et al.*, 2011, Tränkner *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Böhlenius *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2006; Rottmann *et al.*, 2000; Weigel y Nilsson, 1995). El requisito de un período de enfriamiento no ha sido reportado en ninguna otra especie de árbol

transgénico de floración precoz. Esta diferencia podría deberse a la diversidad de los períodos de floración natural de esas especies. La incidencia de los amentos revertidos (que habían reanudado el desarrollo vegetativo) fue muy baja. Se ha reportado el efecto positivo de un período de tratamiento térmico más prolongado (Zhang *et al.*, 2010) para prevenir la reversión de amentos de álamo de floración precoz a estructuras vegetativas. Sin embargo, el desarrollo de muchos amentos permaneció incompleto. La microsporogénesis vegetal puede incluso ser desviada de la vía normal de desarrollo del polen hacia una vía embriogénica después de la exposición a pretratamientos de estrés (revisado en Islam y Tuteja, 2012). Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado en el impacto del estrés ambiental en el desarrollo reproductivo de las plantas anuales.

El desarrollo reproductivo es muy sensible a ambientes adversos y al estrés biótico (revisado en De Storme y Geelen, 2014). Los tratamientos térmicos indujeron la actividad del gen *AtFT* a través de la activación del promotor de choque térmico. Los granos de polen se obtuvieron en condiciones de días largos y cortos, por lo tanto, el fotoperíodo no mostró una influencia similar en la fertilidad de las flores, lo que se confirmó en flores de plantas masculinas y femeninas. Las bajas temperaturas también pueden causar la esterilidad del polen en el arroz y otras especies de plantas que crecen en las regiones subtropicales del mundo (Sharma y Nayyar 2014; Oliver *et al.*, 2007). El desarrollo de los óvulos perturbados fue reportado para varias especies cuando se cultivó bajo temperaturas bajas (McDowell *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2005), salinidad (Sun *et al.*, 2004) y el estrés por sequía (Su *et al.* 2013).

En los álamos, sin embargo, el polen y los óvulos se desarrollan normalmente durante el invierno y la primavera, cuando las temperaturas son bajas. Por lo tanto, no es sorprendente que las temperaturas altas en lugar de bajas tengan un efecto perjudicial sobre el desarrollo de flores en esta especie. Los cruzamientos se realizaron con éxito con el álamo transgénico femenino de floración temprana y todas las flores maduras obtenidas después de 8 semanas de tratamientos inductivos fueron fértiles. Las temperaturas frías influyeron en la expresión de genes de álamo homólogos a los genes de desarrollo de polen de *Arabidopsis thaliana*. Los patrones de homología y expresión génica sugirieron un papel para PtTDF1, PtBAM1, PtSERK1 / 2 y PtMS1 en el desarrollo de anteras y polen en flores de álamo. Usando este sistema rápido y confiable, la fase no

reproductiva que generalmente demora entre 7 y 10 años se puede acortar a 6-10 meses, y se pueden obtener flores fértiles independientemente de la temporada. (Hoenicka et al. 2016).

### **Promoción de la androesterilidad para “contención genética”**

Para liberar en forma segura árboles transgénicos, es necesario desarrollar una estrategia para mitigar el riesgo de dispersión del transgén en el ambiente. Una manera de satisfacer este requisito es inducir la esterilidad reproductiva en forma genética.

Por otro lado, al contrario de las especies herbáceas y anuales, los árboles no han sido totalmente domesticados y, por consiguiente, tienen parientes silvestres con los que pueden ser interfértiles. También son plantas perennes longevas que producen cantidades copiosas de polen y semillas que se diseminan a menudo por el viento a distancias considerables.

El desarrollo de una estrategia de “contención de genes” utilizando ingeniería genética es una solución promisoriosa para evitar el flujo génico, no solo desde árboles GM. La incorporación de genes de esterilidad en líneas de árboles transgénicos fue propuesta para reducir o abolir el flujo de genes de las transgénicas a las no transgénicas (Brunner et al. 2007; Strauss et al., 1995). Una ventaja adicional de árboles estériles podría ser la reducción del costo energético necesario para desarrollar las estructuras reproductivas (Brunner et al., 1998, Mouradov et al., 1998). La esterilidad masculina ingenierizada, se ha logrado tanto en árboles de Angiospermas como en Gimnospermas mediante la expresión del gen *barnase* de *Bacillus amyloliquefaciens* (Paddon y Hartley 1986) bajo el control de diferentes promotores específicos del tejido reproductivo. Varios constructos de genes de esterilidad han sido probados con diferentes niveles de éxito en cultivos, como por ejemplo, la expresión de genes deletéreos en órganos de flores, como *barnase* (García-Sogo et al., 2010; Mariani et al. 1990, Paddon & Hartley 1986), *orfH522* (Nizampatnam et al., 2009), *monooxigenasa* (MNX) (Gan et al., 2010), *stilbene sintasa* (STS) (Höfig et al., 2006; Fisher et al., 1997), el gen para la inactivación de la proteína del ribosoma (Palmiter et al., 1987), y la interferencia del ARN (Nawaz-ul-Rehman et al., 2007). En diferentes cultivos se han encontrado promotores específicos de regulación floral para la expresión directa de genes en estructuras reproductivas, por ejemplo, el

promotor TA29 de *Nicotiana tabacum* (Koltunow *et al.*, 1990, Mariani *et al.*, 1990) y en especies de árboles forestales, por ejemplo PrMALE1 de *Pinus radiata* (Höfig *et al.*, 2003) y PTD de álamo (Skinner *et al.*, 2003). El número de publicaciones sobre la inducción de la esterilidad en árboles forestales es todavía muy bajo (Hoenicka *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2006; Lemmetyinen *et al.*, 2004; Fladung & Hoenicka 2004; Skinner *et al.*, 2003; Meilan *et al.*, 2001). La mayoría de los métodos de esterilidad reportados hasta ahora estaban basados en construcciones genéticas usadas con éxito en cultivos agrícolas. Los promotores heterólogos específicos florales pueden dirigir la actividad de la expresión génica citotóxica en tejidos vegetativos no-blanco (expresión "permeable"), lo que genera en algunos casos una menor productividad de plantas transgénicas (Lemmetyinen *et al.*, 2004; Skinner *et al.*, 2003). Se ha propuesto el uso de promotores específicos florales de árboles. Además, la fertilidad masculina se puede restaurar en plantas que muestran esterilidad inducida por *barnase* cruzando con una línea transgénica que alberga el gen *barstar*, que codifica un potente inhibidor de la barnasa (Hartley 1988; Mariani *et al.* 1992). Para evitar los efectos indeseables de una posible expresión ectópica de este gen, Gardner *et al.* (2009) propuso su uso en combinación con el gen *barstar*, protegiendo así contra la expresión inapropiada de esta ribonucleasa activa. s forestales para paliar tales desventajas (Skinner *et al.*, 2003).

El factor principal que obstaculiza la investigación en bioseguridad sobre los árboles forestales es la fase vegetativa prolongada. Esta fase es bastante variable en algunas especies de árboles hasta 40 años (por ejemplo, *Fagus sylvatica* L.) (Meilan, 1997). Por lo tanto, los árboles de floración precoz, ya sean naturales o transgénicos, son herramientas muy importantes para la investigación en bioseguridad.

### **PsEND1::*barnase***

PsEND1 (*Pisum sativum* ENDOTHECIUM 1) es un gen específico de anteras de guisante que muestra una expresión muy temprana en las células de anteras primordiales. Este patrón de expresión se ha evaluado tanto en plantas modelo (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*) como en cultivos (tomate, colza, tabaco, arroz, trigo) utilizando construcciones genéticas que llevan el promotor PsEND1 impulsado por el gen reportero *uidA* (Gómez *et al.* 2004). Este promotor fusionado con el gen *barnase* produce una

ablación completa de anteras en las primeras etapas de desarrollo, evitando la producción de granos de polen maduros en todas las especies de plantas analizadas (Roque et al. 2007; Beltrán et al. 2007; Pistón et al. 2008; García-Sogo et al. 2010, 2012; Medina et al. 2013). También se han descrito efectos adicionales producidos por la ablación de anteras temprana en las plantas PsEND1::*barnase*, con interesantes aplicaciones biotecnológicas, como la producción de semillas híbridas, la bioconfinación transgénica en cultivos genéticamente modificados, la redirección de recursos para aumentar el crecimiento vegetativo (Beltrán et al. 2007), eliminación de alérgenos de polen en plantas ornamentales transgénicas como *Kalanchoe* (García-Sogo et al. 2010) o *Pelargonium* (García-Sogo et al. 2012) y producción de tomates partenocarpicos sin semillas (Medina et al. 2013; Rojas -Gracia et al. 2017). La construcción PsEND1::*barnase* no se ha ensayado hasta ahora en especies de plantas leñosas.

La competitividad de la cadena forestal depende entre otros factores de la productividad. Los desarrollos tecnológicos, innovaciones y conocimientos que puedan incorporarse o producirse para alcanzar mejores eficiencias o para generar nuevos valores agregados diferenciadores en los productos intermedios y finales permitirán expandir los mercados existentes nacionales e internacionales. La incorporación de conocimiento en los sistemas productivos y en la producción, redundará en un aumento en la eficiencia del manejo de recursos, en la productividad y en la competitividad, aumentando la rentabilidad y los beneficios económicos y sociales para las comunidades involucradas. Los proyectos de investigación forestal tienen características particulares, basadas fundamentalmente en los largos tiempos insumidos para obtener resultados concretos que luego podrán ser traspasables a la industria. Están vinculados con una gran variedad de actividades económicas como la industria, la energía, la agricultura, el pastoreo y la conservación de suelo y agua. Su desarrollo, suele desencadenar situaciones que luego influyen en aspectos más amplios del desarrollo, como el empleo, la asignación de recursos y los valores de los servicios ambientales. Sharry (2013) señala como una posible área de intervención mediante la innovación en Argentina a la Silvicultura Clonal (el uso de clones probados y validados en campo) y a la Silvicultura de Precisión que es encontrar un clon-sitio. Para ello es necesario el uso de material desarrollado en programas de mejoramiento genético de especies forestales. Por años el sector forestal ha incrementado la frecuencia de expresión de genes favorables en las plantaciones

comerciales, a través del uso de la genética clásica. Los objetivos han sido incrementar la productividad, incrementar la calidad del producto y expandir las plantaciones a otros lugares y condiciones climáticas diferentes a las originales. El sector forestal puede capitalizar los beneficios que la biotecnología le ha proporcionado al sector agrícola para mejorar los árboles bajo cultivo.

Como se mencionó, la modificación genética de árboles puede aplicarse en la producción de árboles con tolerancia a herbicidas, resistencia a plagas y enfermedades, mejora de la calidad de la madera, modificación reproductiva para plantaciones comerciales y fitorremediación. Por otro lado, la biotecnología puede proporcionar los medios para acelerar la adaptación de las especies forestales en respuesta a la aparición de nuevos patógenos, al cambio climático u otras perturbaciones.

La utilización de biotécnicas (cultivo de tejidos y tecnología de ADN recombinante), permitiría obtener clones de *Populus* de uso regional con características deseables que no están disponibles en el acervo genético de esta especie y que no se pueden incorporar por mejora genética tradicional. Sin embargo, la capacidad de desarrollar árboles modificados genéticamente en Argentina es incipiente, de ahí la importancia de la formación de recursos humanos en esta área, para contar con la posibilidad de desarrollar, si fuera necesario, árboles GM con diferentes características (MINCyT, Plan Argentina Innovadora 2020).

La liberación al medio de árboles GM tiene limitantes, tanto desde el punto de vista ambiental, como comercial y de percepción pública. En lo relacionado a la percepción pública y al impacto ambiental, muchos cuestionan el largo tiempo que estará presente el árbol GM en el medio, por lo que existirían riesgos asociados con flujo génico y posible daño a organismos no blancos. Si fuese posible obtener árboles GM estériles, se evitarían estos riesgos, dado que el árbol no produciría polen, con una ventaja adicional ya que podrían redireccionar la energía en el crecimiento, lo cual implicaría un menor tiempo de rotación. Para poder evaluar la esterilidad, es necesario que estos individuos florezcan. Los tiempos generacionales en los árboles son largos. El amplio intervalo de generación es un impedimento para la selección y el cultivo práctico y el desarrollo de pedigrees informativos (Ceulemans, 2011). Esto no sólo impone una restricción de la aplicabilidad de técnicas genéticas experimentales convencionales, tales como la mutagénesis

inducida, sino que, una vez introducido un gen de esterilidad, el tiempo para poder evaluarlo sería muy largo.

Hasta el momento no ha sido posible transformar los clones y regenerar plantas GM de *Populus deltoides* e híbridos derivados de esta base genética, de interés para Argentina, ni se ha logrado un protocolo eficiente de regeneración *in vitro*. Tampoco se han desarrollado otros álamos modificados genéticamente a nivel nacional.

Por todo lo expuesto, esta tesis tuvo el propósito de trabajar con *Populus tremula* L. como árbol modelo para la incorporación de los genes inductores de la floración y androesterilidad. La estrategia fue probar transformaciones genéticas dobles y de esta forma alcanzar un árbol GM que revista importancia para bioseguridad (androesterilidad) y para acortar el tiempo de evaluación de estos árboles GM (floración precoz). Disponer de un protocolo eficiente de transformación con genes de androesterilidad permitirá en un futuro modificar genéticamente clones de álamo de interés local para introducir, junto con esta característica importante para bioseguridad, caracteres de importancia silvicultural de forma controlada. También se podrán desarrollar clones de álamos con floración precoz para programas de mejora genética. En paralelo, se buscó optimizar un protocolo de regeneración *in vitro* de clones de *Populus deltoides* y sus híbridos, para su posterior transformación genética, ya que como se mencionó anteriormente, este es un genotipo recalcitrante al CTV y a la modificación genética, pero de interés en Argentina. Por último se pensó estratégicamente en contar con la capacidad de establecer una plataforma de transformación de árboles nacional, teniendo en cuenta que esta capacidad ya está instalada en países como Brasil y USA.

## **HIPOTESIS**

La utilización de biotécnicas (cultivo de tejidos y tecnología de ADN recombinante), permitirá obtener clones de *Populus* de uso regional con características deseables (floración precoz y androesterilidad), que no están disponibles en el acervo genético de esta especie y que no se pueden incorporar por mejora genética tradicional.

Se puede acortar el tiempo de evaluación de álamos GM androestériles, mediante la modificación del tiempo de la floración, con la incorporación de dos transgenes en forma simultánea.

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo general***

*Optimizar un sistema de cultivo de tejidos in vitro que permita la mejora de clones de Populus deltoides e híbridos mediante transformación genética para la introducción de caracteres de interés.*

### ***Objetivos particulares***

- A-** Ajustar un sistema de regeneración *in vitro* de clones de *Populus sp*
- B-** Ajustar un protocolo de transformación genética de explantes de *Populus sp.* mediada por *Agrobacterium* utilizando genes de floración precoz y androestirilidad
- C-** Análizar molecularmente las líneas regenerantes de las transformaciones
- D-** Evaluar las líneas transgénicas en invernáculo/cámaras climáticas.vg

## **Capítulo II: Materiales y métodos**

## **Equipo de laboratorio y materiales**

Los equipos de laboratorio utilizados en este trabajo de investigación se detallan por orden alfabético en el ANEXO 2.1

Los insumos tales como puntas de pipetas, tubos de ensayo, placas de petri, pipetas serológicas, toallas de precisión, etiquetas adhesivas, papel aluminio, parafilm, folios adhesivos, fueron suministrados por las siguientes compañías: Sarstedt (Nümbrecht), Biolab Products (Hamburgo), Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf) y Starlab (Hamburgo).

### **Químicos**

En el marco de esta tesis, para todos los experimentos e investigaciones se utilizaron químicos y sustancias de alta calidad, como Carl Roth (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) y Merck (Darmstadt). Los antibióticos y los componentes de los medios fueron suministrados por Duchefa Biochemie (Haarlem, NL). Las enzimas de restricción fueron suministradas por New England Biolabs (Frankfurt am Main) y Thermo Scientific (Waltham, USA). A menos que se indique lo contrario, la sede de fabricación es Alemania.

### **Material vegetal**

Se utilizaron clones de *Populus deltoides* Bartr. ex Marsh e híbridos de *Populus x euramericana* provenientes de la colección de *Populus* sp. de la Universidad de Minnesota/USA, disponibles en el Arboretum del Instituto Thünen de Genética forestal en Großhansdorf, Alemania y clones de *Populus tremula* L. obtenidos de material *in vitro* del Instituto Thünen de genética forestal.

Los clones fueron:

- *Populus deltoides* Bartr. ex Marsh "D6", "D7", "D25"
- *Populus deltoides* x *euroamericana* "DN1" y "DN5"
- *Populus tremula* L. "W52" y el híbrido *tremula* x *tremuloides* "T89"

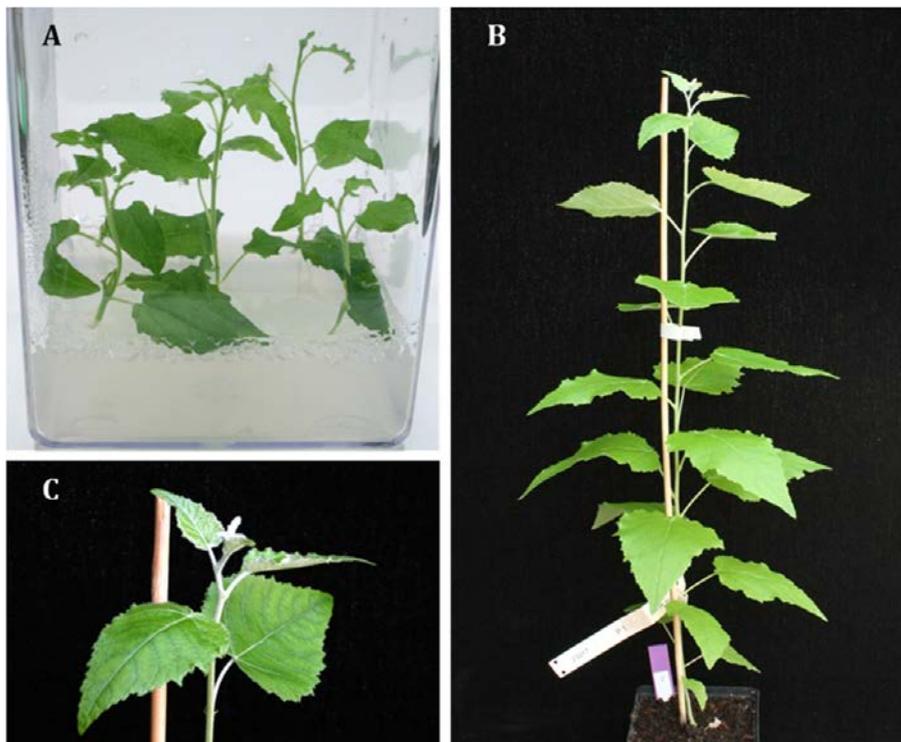


Figura 2.1: *Populus tremula* L "w52" en cultivo *in vitro* (A) plantas jóvenes de 8 semanas de invernáculo (B, C)

### **Esterilización de envases y utensilios**

Los envases y utensilios para el cultivo *in vitro* fueron autoclavados a 121 °C por 20 minutos en autoclave automático o a 180 °C por 6 h por esterilización térmica. Tijeras, pinzas, porta bisturí y herramientas similares de mano fueron esterilizadas en esterilizador de perlas de vidrio por 10-40 s a 260 °C.

## **Cultivo *in vitro***

Los clones de álamos establecidos *in vitro*, utilizados como material vegetal de partida se mantuvieron en condiciones controladas constantes. La cámara climatizada se mantuvo a 23 °C, la humedad del aire a 50% ( $\pm 5\%$ ). El fotoperíodo fue de 24 horas/día. La irradiancia normal para el cultivo de estos álamos es de  $8 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la máxima irradiancia es de  $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mientras que en el rango óptimo es de  $18 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para el cultivo de las transformantes, se eligió un rango más oscuro de irradiancia de  $2,5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Las plantas se cultivaron en recipientes de cultivo traslúcidos ("envases Magenta", Tipo GA-7, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Estos contenedores tienen una base de  $7,7 \times 7,7$  cm y una altura de 9,7 cm. con una tapa transparente que permite el paso de la luz y en estado cerrado son permeables al paso del aire, de modo que permiten el intercambio gaseoso. Para evitar la entrada de organismos contaminantes (bacterias, hongos, insectos), el área de contacto entre el recipiente y la tapa fue sellada con doble vuelta de film de cierre ("Parafilm", Fa. Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA). La cantidad de medio de cultivo semisólido por recipiente fue de 50-70 ml.

## **Desinfección del material vegetal**

### **Método 1:**

a – Lavado con hipoclorito de sodio 12 M al 10% con 3 gotas de tween 80, durante 10 minutos.

b- Lavado con agua de la canilla esterilizada (cada yema y sección nodal individual) y remoción de la corteza externa de los explantos utilizando lupa binocular, con la ayuda de una pinza y bisturí nº5.

c- Lavado con hipoclorito de sodio al 5 % durante 5 minutos.

d- Repetición punto b.

e- Lavado con hipoclorito de sodio al 2,5% durante 2 minutos y 30 segundos.

d- Enjuague con agua de la canilla estéril por 1 minuto y 30 segundos.

## Método 2:

a - Lavado con hipoclorito de sodio 12 M al 10% con 3 gotas de tween 80, durante 10 minutos.

b- Lavado con agua de la canilla esterilizada (cada yema y sección nodal individual) y remoción de la corteza externa de los explantos utilizando el binocular, con la ayuda de una pinza y bisturí nº5.

c- Lavado con hipoclorito de sodio al 5 % durante 5 minutos.

d- Repetición punto b.

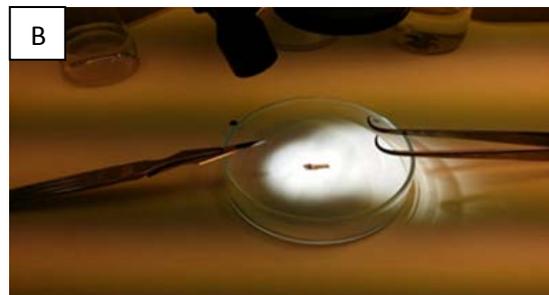


Figura 2.2. a y b. Desinfección del material vegetal utilizando lupa, pinza y bisturí para la remoción de la corteza, en campana de flujo laminar, en el Instituto de Genética Forestal Thünen, Alemania.

## Medios de cultivo

Se utilizaron los medios de cultivo denominados en el Laboratorio del Instituto de Genética Forestal Thünen como 460, 601, 601 ½, 601 ¼, que se detallan a continuación.

- Medio “460”, es el medio WPM que es estandarizado para el cultivo *in vitro* de *Populus sp.* y otras especies forestales (Lloyd & McCown 1980). Un litro de este medio se compone de 2.46 g de del medio de crecimiento “McCown Woody Plant Medium” (abreviado WPM fabricado por Duchefa Biochemie), 20 g de sacarosa y 6g de agar. El pH fue ajustado a 5,8 con el uso de NaOH (Tabla 2.1).

Macroelementos	mg/L	mM	Microelementos	mg/L	μM	Vitaminas	mg/L	μM
CaCl <sub>2</sub>	72,50	0,65	CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	0,25	1,00	Glycina	2,00	26,64
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	471,26	2,35	FeNaEDTA	36,70	100,00	Myo-Inositol	100,00	554,94
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	1,25	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	100,27	Ac nicotínico	0,50	4,06
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990,00	5,68	MnSO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O	22,30	131,94	Pyridoxina HCl	0,50	2,43
MgSO <sub>4</sub>	180,54	1,50	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O	0,25	1,03	Thiamina HCl	1,00	2,96
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400,00	5,00	ZnSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O	8,60	29,91			

Tabla 2.1: Composición de medio de cultivo WPM (tomado de Lloyd & McCown 1980). La concentración de micro y macroelementos, incluyendo las vitaminas están utilizadas en 2462,60 mg/L, según lo indicado por el fabricante.

- **Medios 601, 601 ½, 601 ¼.**

El medio 601 fue utilizado para la regeneración de los tejidos de álamo. Fue suplementado con Thidiazuron (N-fenil-N-1, 2,3, tiodiazol-5-il-urea). Esta fitohormona fue utilizada pues tiene un efecto similar a las citoquininas (Lu 1993) y da lugar a múltiples brotes en álamos (Bonga & von Aderkas 1992, Huetteman & Preece 1993). Un litro de medio “601” está compuesto de 1L de medio “460” con la adición de 1ml Plironic F-68 (concentración final 100 mg/L) y 10 μL Thidiazuron (concentración final 0,0022 mg/L).

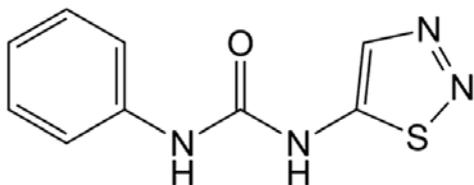


Figura 2.3. Estructura química del Thidiazuron (Lu 1993).

El Thidiazuron es una citoquinina sintética que induce los brotes adventicios. Fue utilizado para la regeneración de los explantes luego de la transformación genética mediada con *Agrobacterium*.

En los medios 6011/2 y 6011/4, las concentraciones de Pluronic F-68 y Thidiazuron fueron reducidas a la mitad y un cuarto, respectivamente. Estos medios se utilizaron para la transición de las plantas cuando pasaban de un medio con Thidiazuron a un medio con la ausencia de este.

Para la selección, luego de la transformación, se utilizó 1 L de medio 601 con 4 mL Cefotaxima (125 mg/mL, Cefotaxim-Natriumsalz, concentración final 500 mg/L) y para cada marcador de selección se adicionó o 1 mL de Kanamicina (50 mg/mL, Kanamicina-Monosulfato, concentración final 50 mg/L) o 2 mL Higromicina (10 mg/mL, Higromicina B, concentración final 20 mg/L). Estos medios se rotularon agregando una ``C“ para Cefotaxima, ``K“ para Kanamicina y una ``H“ para Higromicina.

## **Vectores de transformación**

### **Agrobacterias**

Se utilizó la cepa de *Agrobacterium* GV2260, basada en la cepa genética de *Agrobacterium tumefaciens* C58. Esta cepa fue "desarmada", es decir, se quitaron de los genes para la síntesis hormonal y de liberación de opinas (Clark y Pazdernik 2009), y se agregaron como gen marcador en el cromosoma bacteriano, un gen de resistencia al antibiótico Rifampicina (Goodner *et al.* 2001, Wood *et al.* 2001, Hellens *et al.* 2000). Las bacterias fueron equipadas con el plásmidos inductores de tumores pBI101, que llevan la resistencia a kanamicina como gen marcador.

Otra de las cepas utilizadas fue la EHA105. Esta se desarrolló sobre la base de la EHA101, cepa en la que se eliminó la resistencia a la kanamicina del plásmido Ti. Por esta supresión, fue posible colocar un gen de resistencia a kanamicina en el ADN-T para su uso como marcador seleccionable en la transformación genética de las plantas (Hood *et al.*, 1993). El fondo cromosómico fue la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58 descrita anteriormente (Hellens *et al.*, 2000). Esta cepa fue equipada con el plasmido inductor de tumores pK2GW7 (Karimi, *et al.*, 2002), que lleva la resistencia a la kanamicina como gen marcador.

Las bacterias de la cepa EHA101, de la cepa genética C58, se equiparon con el plásmido p6i, llevando la resistencia a la hygromicina como agente de selección en la plantas. Los esquemas de los vectores de transformación utilizados se muestran en el Anexo 2.2

## Plásmidos de transformación

Como promotores se utilizaron el promotor 35S y el promotor NOS. El promotor 35S es un promotor de expresión constitutiva, el cual es originario del virus del mosaico de la coliflor (Inglés "virus mosaico de la coliflor", o "CaMV") (Benfey y Chua, 1990). El promotor NOS es originado de *Agrobacterium tumefaciens* y regula aquí la expresión de la sintasa de nopalina NOS.

Como terminador de la transcripción se utilizó el Terminador 35S- del CaMV y el terminador NOS- de *A. tumefaciens*. Para la selección de las sublíneas transgénicas se utilizaron antibióticos. Como marcadores de selección para la transformación de álamo se utilizó el gen *nptII*, que codifica la *neomicina* fosfotransferasa II y confiere resistencia al antibiótico kanamicina, y el gen *hpt* (*higromicina fosfotransferasa*), que para la resistencia a la higromicina, (Fladung *et al.*, 1997; Howe *et al.*, 1991). Ambos genes son originarios de *Escherichia coli* (Gritz & Davies 1983; Beck *et al.*, 1982,).

## Vectores de transformación empleados

Para las transformaciones genéticas de los álamos se utilizaron 3 vectores diferentes, solos o combinados, los cuales se detallan a continuación.

Los vectores de transformación fueron identificados con la la letra A y un número consecutivo, por ej. A113. También se detallan la cepa bacteriana, el marcador de selección de la planta, el vector con el promotor y el terminador correspondientes.

Tres diferentes cepas de *Agrobacterium* fueron empleadas: GV2260, EHA101 y EHA105.

- Vector de transformación A168. Constructo: 555p6:HSP::*AtFT*. Cepa de agrobacterias (*Agrobacterium tumefaciens*): EHA101. Marcador de selección en *Agrobacterias*: kanamicina, Macador de selección en plantas: Hygromicina. Vector p6i: Promotor 35S-; terminador -35S Clonación: DNA cloning service, Hamburgo.

-Vector de transformación A113. Constructo: pk2GW7:HSP::*AtFT*. Cepa de agrobacteria (*Agrobacterium tumefaciens*): EHA105. Selección en plantas kanamicina (NPT). Vector

pK2GW7: promotor 35S-; terminador -35S (Gateway binary vector Karimi et al., 2002).  
Clonación: grupo de Ove Nilsson (Umeå Plant Science Centre/Suecia).

- Vector de transformación A249. Constructo: pbi101:PsEND::*barnase*. Cepa de agrobacteria (*Agrobacterium tumefaciens*): GV2260. Selección en plantas kanamicina (*NPTII*). Vector PBI101: promotor constitutivo nos-; temrinador -nos. (Provisto por. Beltrán/Canas / España). Clonación: Roque et al. 2007. En la construcción pBI101:END1::*barnase-barstar* la utilización combinada de ambos genes se hace para evitar la acción citotóxica del gen *barnase* en los microorganismos utilizados como vectores (*Agrobacterium*) ya que en dichos organismos la expresión del gen *barstar* (inhibidor de la barnasa) se realiza sin dificultad. Sin embargo, dicho gen no se expresa en la planta.

Esquemas de los vectores (Anexo 2.2)

## **Cultivo de *Agrobacterium***

### **Medio LB (Caldo de Lisogenia o Lysogeny Broth)**

Para la preparación de 1 l de medio LB se mezclaron 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio y se completó con agua desionizada hasta un volumen de 1 L. El pH se ajustó a 7.

### **Medios de pre-cultivo para las cepas de los vectores de transformación EHA101-p6i**

El medio de pre-cultivo que se utilizó para los vectores de transformación de la cepa EHA101-p6i, se compuso de medio LB, al que se le añadieron los siguientes antibióticos con sus respectivas concentraciones: Rif(50), Carb(50), Spec. (100), Strep. (300).

### **Medio de precultivo para los vectores de transformación de la cepa GV2260-pb1101**

El medio de pre-cultivo utilizado para los vectores de transformación de la cepa GV2260 se compuso de medio LB, al que se le añadieron los siguientes antibióticos con sus respectivas concentraciones medio: Rif. (50)+ Carb. (100).

### **Medio de precultivo para los vectores de transformación de la cepa EHA105-pK2GW7**

El medio de pre-cultivo utilizado para los vectores de transformación de la cepa EHA105 se compuso de medio LB, al que se le añadieron los siguientes antibióticos con sus respectivas concentraciones: Strep. (300), Spec. (100).

### **Stocks de glicerina**

Para el almacenamiento a largo plazo de los cultivos bacterianos se prepararon stocks con glicerol. Se colocaron 200 ul de glicerol (99,5%, en autoclave) y 800 ul de pre-cultivo bacteriano. Se mezcló enérgicamente y se congelaron en nitrógeno líquido. Se almacenaron a -70 ° C.

### **Transformación de *E. coli***

El constructo del gen PsEND1::*barnase*, presente en el vector binario pbi101, fue transformado dentro de *E. coli* (L1) según el método químico (Sambrook *et al.*, 1989).

### **Purificación del plásmido de ADN**

El ADN fue aislado de *E. coli* transgénicas de acuerdo al método descrito en Sambrook *et al.*, 1989. Cold Spring Harbor Laboratory.

### **Mini-Preparación de plásmidos**

La miniprep para la extracción de plásmidos se basó en el protocolo descrito por Knight and Monroe:

([http://csmbio.csm.jmu.edu/biology/courses/bio480\\_580/mblab/miniprep.html](http://csmbio.csm.jmu.edu/biology/courses/bio480_580/mblab/miniprep.html)  
Zugriff am 15.08.2015).

Fueron preparados tres búferes con la siguiente composición:

Búfer 1: 50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNase A, pH 8, 0

Búfer 2: 1% SDS; 0,2 M NaOH

Búfer 3: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

Para la mini-preparación, se pipeteó 1 ml de suspensión celular en un recipiente de reacción y se centrifugó durante 20 s a la velocidad máxima. El sobrenadante se descartó. El residuo se trató con 100 µL de búfer 1 y las células se resuspendieron mediante agitación con vórtex. Se añadieron doscientos µL del búfer 2. La suspensión se mezcló invirtiendo varias veces y se incubó durante al menos cinco minutos en hielo. Después, se añadieron 150 µL del búfer 3 frío en hielo y la muestra se mixtura nuevamente por inversión. Luego de otros cinco minutos de incubación en hielo, la prueba se centrifugó a velocidad máxima por 5s. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se mezcló con un volumen igual de isopropanol. Transcurridos 2 minutos de incubación a temperatura ambiente, se centrifugó a velocidad máxima. Se quitó el sobrenadante y se añadieron 200 µL de etanol absoluto. Se mixturó nuevamente por inversión. Después de 2 minutos de centrifugación, se volvió a retirar el sobrenadante y se dejó secar el residuo. Una vez seco, se adicionaron 20 ul de Búfer TE.

## **Transformación de *Agrobacterium***

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 fue transformada con el plasmido pBI101-PsEND1::*barnase*, aislado anteriormente de *E. coli*, utilizando el método químico ([www.yeastlab.vbiol.slu.se/WCN/DAagrotransf](http://www.yeastlab.vbiol.slu.se/WCN/DAagrotransf)).

## **Transformación de álamos mediada por *Agrobacterium***

La transformación mediada por *Agrobacterium* se dividió en 3 pasos, que se llevaron a cabo secuencialmente: el precultivo de las agrobacterias, el cultivo principal y la transformación, y la regeneración de las plantas transgénicas. El protocolo especificado aquí se basa esencialmente en Fladung *et al.* (1997) y ha sido ampliamente modificado por el autor, como se detalla a continuación.

### **Pre-cultivo de las agrobacterias**

A partir de los stocks de glicerol, con una punta de espátula se raspó la suspensión bacteriana congelada y se transfirió a un tubo de cultivo celular que contiene 4 ml de medio de pre-cultivo. El cultivo se incubó durante la noche a 28 ° C, con agitación continua a 900 rpm para la ventilación.

### **Cultivo principal y transformación**

Se tomaron 1-1.5 ml del pre-cultivo de toda la noche de bacterias y se colocaron en 50 ml de medio LB y se volvieron a colocar a 28 °C bajo continua agitación a 200 rpm.

Durante el período de incubación, el material vegetal se preparó para la transformación. Para ello se utilizaron plantas de cultivo *in vitro*. Estas se cortaron por encima de la hoja inferior y se almacenaron, hasta su ulterior procesamiento, en agua estéril o, con un tiempo de espera más largo (más de 30 min), en medio 460 líquido estéril para evitar la deshidratación.

Al llegar a una OD 600 de 0,3 a 0,8 (por lo general después de 4,5-6 horas), la suspensión de agrobacterias se mezcló con 18 µL de acetosiringona y se incubó durante otros 30 min, en agitación. Durante este tiempo las plantas de *in vitro* fueron cortadas con tijeras y bisturí.

Los trozos de hoja tenían un tamaño máximo de 7 mm y los trozos de brotes una longitud máxima de 7 mm. Se añadió el material vegetal, después de la incubación de

30 minutos con acetosiringona, a la suspensión bacteriana y se cultivó en oscuridad durante más de 15 minutos a 28 ° C y 200 rpm.

Luego de la incubación, la suspensión se vertió a través de un colador de metal fino para drenar el medio y colocar los residuos vegetales sobre papel de filtro estéril. El material vegetal se distribuyó en placas de Petri con medio 460 y se incubaron durante uno a tres días a 22 ° C y en la oscuridad.

## Regeneración

Después de uno a tres días de incubación, se recogió el material vegetal utilizado y se lavó con solución de cefotaxima. Se disolvieron 2ml de dicho antibiótico (125 mg / ml, sal de sodio cefotaxima) en 500 ml de agua corriente estéril para alcanzar una concentración final de 500 mg / L. El lavado se llevó a cabo en seis etapas: tres veces durante tres minutos en 150 ml de agua corriente estéril y tres veces durante dos minutos en 150 ml de solución de cefotaxima. Después del último lavado, el material vegetal se secó en papel de filtro estéril y, a continuación, se colocó en el medio de regeneración 601, al cual se le agregó cefotaxima con uno o más antibióticos adicionales de selección (dependiendo del vector de transformación)(Figuras 2.4. a y b).

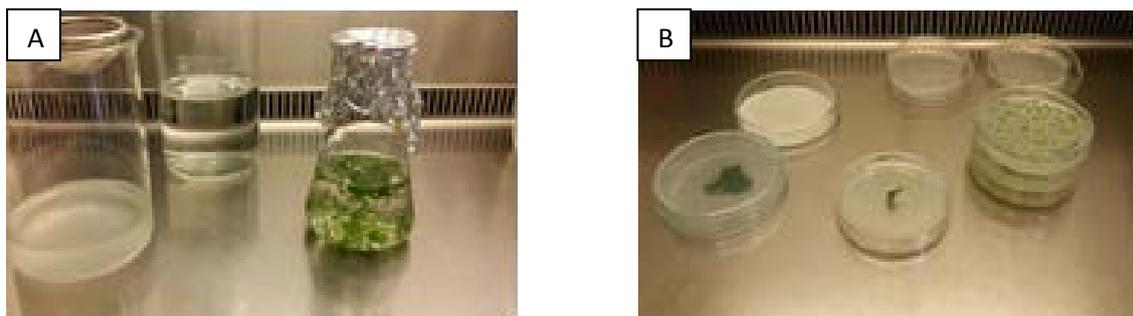


Figura. 2.4. a. Enjuagues de los explantes transformados, con la solución de agua con cefotaxima. b. Distribución de los explantes en las cajas de Petri con medio de cultivo y el antibiótico correspondiente, dentro de la cabina de flujo laminar.

A partir de los explantes, se aislaron las regenerantes y se transfirieron a un medio de regeneración nuevo 601, con los mismos antibióticos, en cajas de Petri, para mantener

la presión de selección y evitar la contaminación ulterior con la persistencia de agrobacterias.

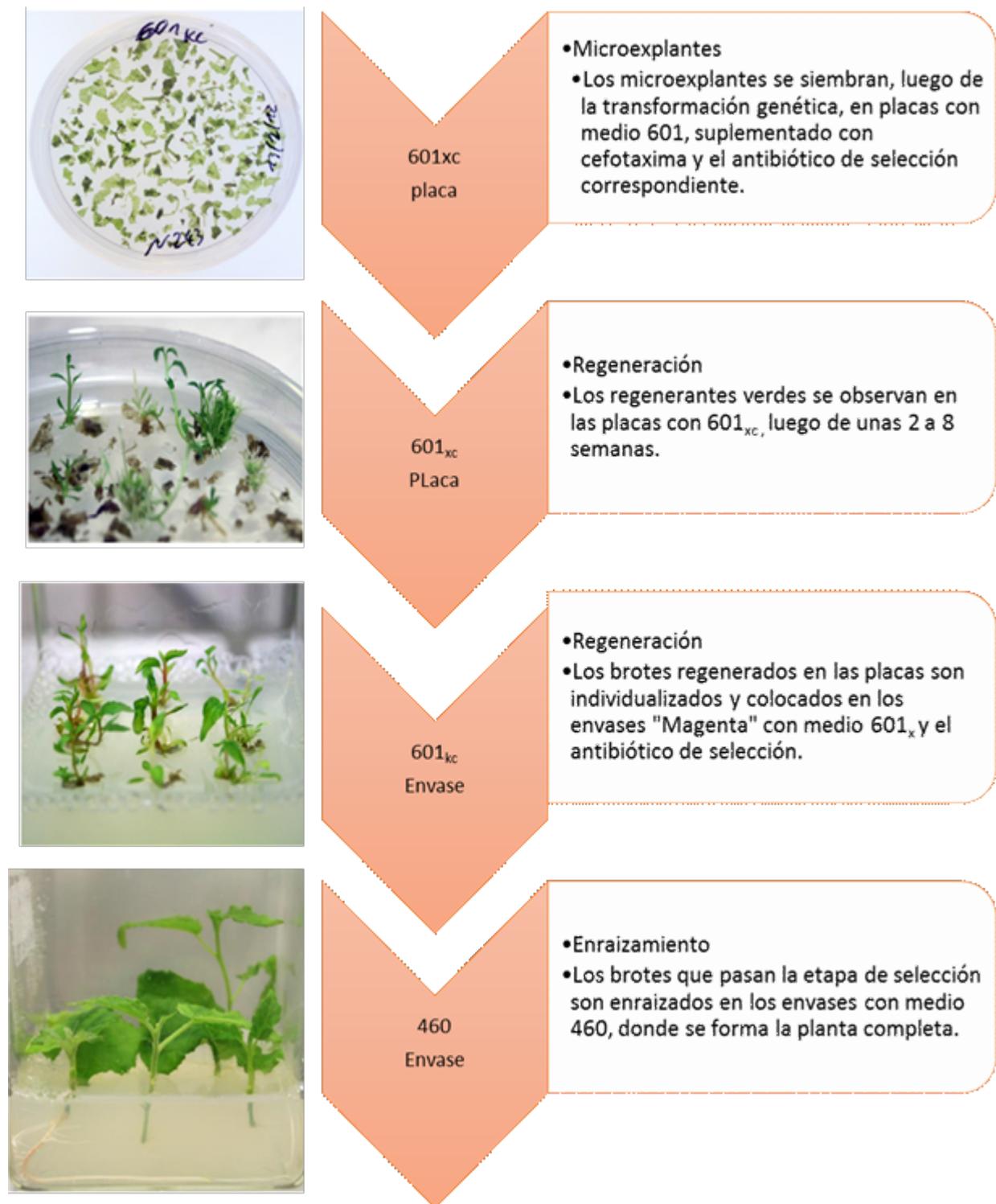
Una vez que los regenerantes crecieron (entre 5 y 10 mm), se transfirieron a tubos de cultivo con medio de regeneración (601) y la adición del antibiótico correspondiente.

Se observó el inicio de la múltiple brotación. Cada vez que se regeneró un vástago se cortó y se transfirió a los envases con medio 460 y los antibióticos, según fue necesario.

*En esta etapa, cada brote regenerado fue tratado como sublínea independiente de una línea de transformación.*

### **Eliminación y limpieza de los materiales utilizados en la transformación genética**

El material genéticamente modificado y el medio en contacto con él, fue descontaminado en autoclave a 121 ° C durante 20 minutos y se desechó. Herramientas de metal de preparación tales como pinzas, tijeras o bisturí fueron esterilizados en el esterilizador de perlas de vidrio por 1 min. 10s a una temperatura de 260 ° C. Las superficies se limpiaron con 70% de etanol.



**Figura 2.5: Esquema de selección de los regenerantes de la transformación.**

Los regenerantes de la transformación fueron seleccionados en dos etapas. La "X" en la información de los medios de cultivo, indica el antibiótico de selección de las plantas, por ejemplo, 601<sub>xc</sub>, "X" es por lo hygromicina y / o kanamicina y "C" para la cefotaxima.

## Extracción de ácidos nucleicos

### Búfer TE

El ADN extraído se almacenó en búfer TE, ya que aquí es más estable que en el agua. El búfer TE se compone de Tris 10 mM y 1 mM sal disódica de EDTA a un valor de pH de 8,0 (Sambrook *et al.*, 1989). Para la producción de 1 x TE + RNasa 99,99 ml se mezclaron con 10  $\mu$ L de RNasa A (100 mg /  $\mu$ L).

### Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de Dumolin *et al.* (1995) como base, con algunas modificaciones. El búfer de extracción (1 L) estaba compuesto por 20 g de alquiltrimetilamonio (ATMAB), 10 g de PVP (M = 40.000 g / mol), 5,8 g EDTA II, 12,1 g de Tris HCl y 81,8 g de NaCl. El volumen se completó con agua desionizada hasta 1 litro.

Las muestras de material para la digestión se colocaron en recipientes de reacción eppi de 2 ml, con dos bolas de acero (diámetro 5 mm) por recipiente. Se congelaron con nitrógeno líquido (-196 ° C). Bajo la acción de las bolas de acero, en un molino vibratorio (Sres. Retsch, Haan) las muestras fueron trituradas (2 min a 19 Hz). Antes de su posterior procesamiento, las bolas de acero se retiraron de los recipientes de reacción. Con el material todavía congelado, hecho polvo, se adicionó 1 ml de búfer de extracción, que se calentó previamente a 55 ° C. Se mezcló a fondo con un Vortex, con lo que se disolvió todo el material de la muestra congelada. Luego se añadieron 50  $\mu$ L de ditioneitol (DTT, 1 M) y las muestras se mezclaron brevemente.

La mezcla se incubó a 1h a 55 ° C y 400 rpm. A continuación, 10 min en hielo, seguido por la precipitación con fenol cloroformo, añadiendo 400  $\mu$ l a cada muestra. Estas se mezclaron invirtiéndolas varias veces y se centrifugaron a 13.000 rpm a 4 ° C durante 20 min. La fase superior, acuosa, se transfirió a un nuevo recipiente de reacción.

Para la posterior precipitación con isopropanol se añadieron 600  $\mu$ l (-20 ° C en frío) y se mezcló. Se centrifugó durante 20 minutos a 13.000 rpm y 4 ° C. El sobrenadante se descartó. Para limpiar el sedimento, se utilizó 1 ml de etanol 70% (-20 ° C en frío) y se recogieron de nuevo por centrifugación durante 20 min a 13.000 rpm y 4 ° C.

Después de desechar el sobrenadante, el residuo se secó y se disolvió en 30 a 60  $\mu$ L 1 x TE + RNasa. El volumen utilizado fue dependiente del tamaño del sedimento y la concentración de ADN deseada. Después de la incubación durante toda la noche a  $-4^{\circ}$  C, las muestras se colocaron durante 30 minutos a  $37^{\circ}$  C para digerir las RNasas.

### **Medición espectrofotométrica de la concentración de ácidos nucleicos**

Las concentraciones de las soluciones de ácidos nucleicos, de ambas soluciones de ADN y ARN, se midieron con el espectrofotómetro NanoDrop 1000 3.7.1 (Fa. Thermo Scientific). El dispositivo crea un espectro de absorbancia y calcula a partir de la concentración del ácido nucleico. La pureza de los ácidos presentes puede evaluarse por los cocientes de absorbancia E260/280 y E260/230.

Para la medición de la concentración se utilizaron 2,0  $\mu$ L de solución en la placa de ensayo. Como muestra control (valor cero), dependiendo de que ácidos nucleicos se disolvieron, se utilizó agua desionizada, 1 x TE + RNasa o bufer PEB (equivalente a 10 mM Tris-HCl, pH 8,5). Después de cada medición, se limpió la placa de medición.

- Para mejorar la calidad del ADN se probaron los siguientes métodos:
  - Precipitación del ADN con acetato de sodio y etanol
  - Precipitación con fenol/cloroformo
  - Purificación de ADN con los kits: Genomic DNA Clean & Concentrator and the PCR Inhibitor Removal Kits (Zymo Research)

### ***Análisis de ADN***

#### **Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de genes de resistencia.**

El éxito de transformación se ha documentado no sólo con la detección del marcador de resistencia, sino también con la detección del gen “blanco” del ADN-T. En este trabajo se han diseñado cebadores para detectar la presencia de los genes “objetivo” a través

de las PCRs (Tabla 2.8). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa.

Nr.-Primer	Secuencia	Largo del primer	Annealing-Temperatura T <sub>A</sub> [°C]
#282	TAT CAA CAC GTT TGA CGG GGT	21 bp	58
#283	TGT AAA GGT CTG ATA ATG GTC	21 bp	54
#2080	GCA GTC TTG GTT GCT TCC CT	20 bp	56
#2081	GAC TCT GAA TGC CTT AGC GC	20 bp	55
#2098	ATC GTA GCA CCA CAC CAG TC	20 bp	55
#2099	TGA CAG TTG AAA CCG CCA CA	20 bp	56
#2100	TGC GCT AAG GCA TTC AGA GT	20 bp	56
#2101	CGG ATG CGC AAA GAA ATG CT	20 bp	56
#1978	CTC ACC TCC GAG AAT ATC TCC	21 bp	51
#1979	CAT ACA CTG TTT GCC TGC C	19 bp	51
#1980	AAG TCC TAG CAA CCC TCA CCT C	22 bp	55/56
#1981	TGT TTG CCT GCC AAG CTG TC	20 bp	55 / 56
# 1151	GAC CAA TCC TAA CCA ATG TCT G	22 bp	58/59
#1152	ATA CGA TGC CTT CAC TTC TTT CTG	24 bp	58/59
#423	GTT GGA GAC GTT CTT GAT CCG	21 bp	60
#424	TCT TCT TCC TCC GCA GCC ACT	21 bp	62
#417	AAA CGC TCA ACG TGC CAA GG	20 bp	58

Tabla 2.8: Primers para la detección de los genes de las líneas transgénicas regenerantes

La temperatura de “Annealing” T<sub>A</sub>, varió dependiendo del par de cebadores utilizados (Tabla 2.8). El número de ciclos varió entre 35 y 40.

La composición de la PCR (Tabla 2.9) y el perfil de temperatura se muestran a continuación (Tabla 2.10):

Componentes	Concentración Stock	Concentración PCR	Volumen [μL]
PCR-Búfer BD	10×	1×	2,50
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,8 mM	1,8
dNTP-Mix	5 mM	0,2 mM	1,00
Forward-Primer	10 μM	0,4 μM	1,00
Reverse-Primer	10 μM	0,4 μM	1,00
DMSO	100%	2%	0,50
ADN-Polymerasa	5 U/μL	0,65 U/μL	0,13
H <sub>2</sub> O			17,07
Volumen total			25,00

Tabla 2.9: Composición de la para la detección de los genes blanco

Temperatura [°C]	Tiempo [min]	Proceso
94,0	2:00	Desnaturalización inicial
72,0	5:00	Elongación-finalización
8,0	∞	Almacenamiento

Tabla 2.10: Perfil térmico de PCR para la detección de los genes objetivos.

## Gel de electroforesis

La composición del búfer de funcionamiento 0,5 × Tris-borato-EDTA (TBE) en el gel de electroforesis y la solución básica de los geles de agarosa fue basado en Sambrook et al. (1989). La solución de TBE fue preparada a 10 × de concentración, compuesta de la siguiente manera: 60,5 g de Tris, 30,9 g de ácido bórico, 3,7 g de EDTA. El pH se ajustó con HCl a 8,3 y el volumen se completó con agua desionizada hasta 1 litro. La solución madre se diluyó 1:20 hs antes de su uso.

Para la preparación del gel de la electroforesis, la cantidad calculada de agarosa fue entre 2,0 y 3,0%. Se pesó y se añadió al volumen previsto de 0,5 x búfer TBE. En un horno de microondas, la solución de agarosa se llevó a ebullición y se enfrió a 60 ° C. A continuación se adicionaron 2,5 µL Roti Gel Stain (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) por cada 100 ml de gel. Este colorante intercalante fluorescente de ADN permite el control posterior de los resultados de la electroforesis y la identificación del producto separado de la PCR. La mezcla preparada se vierte en la cuba de electroforesis donde se enfría y solidifica.

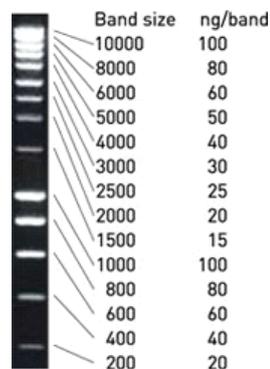


Figura 2.6: Marcador de fragmentos de ADN "Smart" (Fa. Eurogentec, Köln)

Para cargar el gel de agarosa ya sólido, se utilizó el búfer de carga Orange G. Para este búfer se preparó una solución madre concentrada 6× de 30% de sacarosa y 1% de tinta Orange G (Fa. Sigma, St. Louis, EE.UU.). Los sólidos se disolvieron en agua desionizada.

La solución lista fue una dilución de 1 µL de solución madre y 5 µL de agua. A partir de este 1 × Orange G búfer de carga, se mezclaron 5 µL con 5 µL de producto de PCR. El volumen total de 11 µL por muestra se aplicó al gel de electroforesis. Como marcador de los fragmentos de ADN se utilizaron 5 µL del marcador "Smart Leder" Fa. Eurogentec (Fig. 2.7).

La electroforesis fue cargada hasta la separación deseada, pero por lo menos 1 hora, a 110-130V. Luego, el gel se registró fotográficamente bajo irradiación UV, en un aparato documental del Fa. Intas (Göttingen).

## **Southern Blots**

Para cuantificar el número de copias del ADN-T integrado por los vectores de la transformación en el genoma de la planta, se realizaron los Southern blots (Southern 1975).

### **Restricción**

Al comienzo del Southern Blot, el ADN se cortó con enzimas de restricción, en fragmentos más pequeños. La selección de las enzimas se determinó por las secuencias de restricción en la secuencia del ADN-T. Para la enzima seleccionada, sólo una interfaz debe estar disponible y esta, a su vez, fuera de la región de la secuencia en la que se coloca la sonda utilizada más tarde.

Se buscó obtener los fragmentos más pequeños posibles, los cuales con la electroforesis subsiguiente bajan hasta el medio del gel y no permanecen en la parte superior del mismo, ya que aquí estos fragmentos más grandes podrían confundirse fácilmente con el ADN no digerido. Con el fin de obtener los fragmentos de ADN más pequeños posibles, se seleccionaron enzimas en el genoma de *P. trichocarpa* (Version 3.0).

Enzimas de restricción	Tº de incubación	Secuencia de corte	frecuencia de corte
<i>SacI</i>	37 °C	GAGCT C	49.957

Tabla 2.11: Enzima de restricción utilizada para los Southern blots.

La frecuencia de los sitios de restricción en el genoma de *P. trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006) fue determinada por B. Kersten (Instituto de Genética Forestal Thünen, no publicado). La línea vertical en la secuencia marca la interfaz de la enzima de restricción.

Para la restricción se mezclaron 20 µg de ADN con 2 µL de bufer de reacción 10x y 2 µL de enzima de restricción a la restricción. La concentración final de la enzima debe ser de 1 U por 1 µg de ADN. El lote se llenó con agua desionizada a 20 µL. El ADN de los plásmidos de las transformaciones fue utilizado en los southern blots, como control positivo.

Del ADN del plásmido, se utilizaron solo 100 ng para la restricción. Aquí, el volumen de la enzima de restricción se redujo 1 µl por lo que el volumen de agua fue ajustado. La incubación se llevó a cabo a la temperatura predeterminada de la enzima de restricción, durante 16 horas en un bloque de calentamiento.

## Electroforesis

Para la electroforesis en gel se vertió 1,5% agarosa-TBE (200 ml) con 5 µL de Roti gel stain (véase la Sección electroforesis en gel). La mezcla de restricción se mezcló con 2 µL de búfer de carga (Tab. 2.12) y el volumen total de la muestra (22 µL) se aplicó al gel. Además se colocó en la primera y en la última celda 5 µL del marcador DIG II, el cual se verá más adelante en el film bioluminiscente.

La electroforesis se dividió en una fase de calentamiento de 15 minutos a 50 V y una fase principal arriba de 100 V (120-130 V). Después de la corrida del gel, se tomó una foto bajo irradiación UV para asegurar el éxito de la separación electroforética y las digestiones de restricción.

Volumen	Componente
2 mL	Glicerina (100%)
16 µL	EDTA (0,5 M)
32 mg	Xylencyanol
32 mg	bromo fenol azul
Ad. 8 mL	H2O desionizada

Tabla 2.12: Composición del búfer de carga para la electroforesis del Southern Blot.

### Preparación del gel

Antes del blotting, el gel de la electroforesis fue incubado en diferentes búfers y soluciones que se describen a continuación (Tabla 2.13.). Todas las incubaciones se llevaron a cabo en un agitador de volteo a temperatura ambiente. Para despurinización del ADN, el gel de electroforesis se incubó en M HCl 0,25 durante 7-10 min.

La despurinización completa se logró con un cambio de color, de azul a amarillo, de la banda inferior del marcador del búfer de carga. Esto fue seguido por la desnaturalización del ADN, para lo cual el gel se incubó 30 min, dos veces, en el búfer de desnaturalización.

Se continuó con dos etapas de neutralización de 30 minutos cada una, en el búfer de neutralización. En preparación para el blotting, el gel de electroforesis se lavó durante 5 minutos en 10x SSC.

Solución de desnaturalización, 1 L	Búfer de neutralización, 1 L	Ácido clorhídrico HCl, 1 M
20,0 g NaOH-Perlas	121,14 g Tris	83 mL HCl (37%)
87,6 g NaCl	87,6 g NaCl	917 mL H <sub>2</sub> O desionizada
ad. 1 L H <sub>2</sub> O, desionizada	ad. 1 L H <sub>2</sub> O,	
La solución se ajustó a pH 13.	desionizada El búfer se ajustó a pH 7 con ácido clorhídrico concentrado.	Para lograr la concentración utilizada de 0,25 M, se añadió 250 ml de HCl 1M y se mezcló con 750 ml de H <sub>2</sub> O.

Tabla 2.13: Para la preparación del gel, se utilizaron búfers y soluciones

## Blotting

En el blotting, el ADN del gel de electroforesis se transfirió a una membrana de nylon por presión de líquido por capilaridad. Para ello se llenó una cámara de electroforesis con 10 x SSC y se sumergió un papel de filtro en los dos depósitos de la cámara con la solución 10 x SSC. Luego se colocaron 4 papeles de filtro sobre la hoja grande de papel, que también se mojaron con la solución 10 x SSC. Sobre éstos se colocó el gel de agarosa con la cara superior hacia abajo. Sobre el gel se colocó la membrana de nylon y sobre esta 4 nuevos papeles de filtro, enbebidos en la solución 10 x SSC. Luego, toallas de papel absorbente seco se apilaron y se colocaron sobre los papeles de filtro de celulosa. Se colocó una placa de vidrio y un peso de plomo (Fig. 2.7). El Blotting se llevó a cabo durante la toda noche, por lo menos durante 16 h. Al día siguiente, las toallas de papel empapadas fueron reemplazadas por toallas secas y se continuó con un “re blotting” durante aproximadamente 2-4 horas.

## UV-“Crosslinking”

Con el fin de fijar el ADN de manera irreversible en la membrana de nylon, se la irradió de ambos lados con radiación UV. Se realizó el auto crosslinking con el Stratalinker 2400 (Stratagene). Se irradió el plazo de 45 s con 120 mJ.

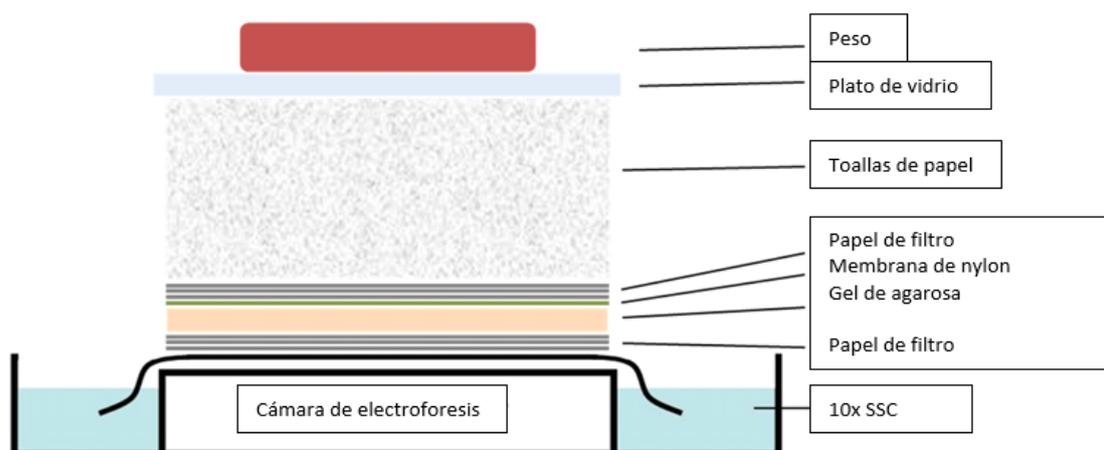


Fig. 2.7: Estructura esquemática del Southern blot. A través de la acción capilar, la solución altamente concentrada de SSC 10 x se extrae del depósito a las toallas de papel. Aquí, el ADN se transfirió a una membrana de nylon desde el gel de agarosa después de la electroforesis. La placa de vidrio proporciona una distribución uniforme de la presión, que se transmite al conjunto de transferencia.

## Prehibridización

La solución de prehibridación (Tabla 2.14) se calentó a 42 ° C antes de su uso. La membrana se colocó en una bandeja de plástico, se cubrió con la solución de prehibridación y se tapó con una tapa de plástico. Se dejó en agitación en el horno de hibridación a 42 ° C, durante 3-6 h. Con el fin de evitar la fuga de gases nocivos, la bandeja se envasó en una bolsa de plástico, completamente cerrada.

### Volumen Componente

25 mL	20× SSC
20 mL	10% <i>Solución Blocking</i>
1 mL	10% Lauroilsarcosina
1 mL	0,5% ARN de levadura
50 mL	Formamida
2 mL	10% SDS
1 mL	agua desionizada

Tabla 2.14: Composición de la solución de prehibridización

## Hibridización

Durante la hibridación, la sonda se une a los fragmentos de secuencias complementarias. La sonda se preparó tal como es descrita en la Sección 2.10.6 y se añadió para uso directo en solución de prehibridación. Se mezclaron 50 ng de sonda con 1 ml de solución de pre-hibridación y se almacenó a -20 ° C.

Para llevar a cabo la hibridación, una alícuota de 1 ml de la sonda se descongeló y se desnaturalizó durante 5 min a 95 ° C, posteriormente se enfrió al menos 1 min en hielo. Al mismo tiempo se preparó el llamado "sandwich de hibridación " (Fig. 2.8). La membrana se colocó sobre una película de plástico y se humedeció toda la superficie con la alícuota de la solución de la sonda.

A continuación, el sándwich de hibridación fue sellado con ganchos metálicos y envuelto en una bolsa de plástico sellada, para impedir el escape de vapores nocivos. De esta manera, se incubó durante toda la noche en el horno de hibridación a 42 ° C. (Fladung y Ahuja 1995).



Figura 2.8: Sandwich de hibridación (Fladung & Ahuja 1995).

En esta construcción, la membrana de nylon quedó entre dos placas de vidrio. Se utilizaron espaciadores, dando un espacio libre entre la membrana y la placa superior. La estructura se incubó con la sonda de hibridación. Los ganchos de metal se utilizaron para prevenir el deslizamiento de las placas de vidrio.

## Quimioluminiscencia

Antes de comenzar con la reacción quimioluminiscente, fue necesario preparar la membrana y para ello se realizaron varias etapas de lavado. Las soluciones búfer necesarias se enumeran en la Tabla 2.15. Todos los lavados se realizaron en bandejas de plástico limpias, sobre un agitador basculante o en un baño de agua con movimiento. La membrana se humedece siempre completamente con el líquido.

<b>Ác. Maleico búfer (4× concentrado, 1 L)</b>	<b>Ácido maleico búfer (1× concentrado, 1 L)</b>	<b>DIG-lavado búfer, 1 L</b>
46,40 g Ác. maleico 35,08 g NaCl 30,00 g NaOH ad. 1 L H <sub>2</sub> O, desionizada pH 7,5 con NaOH oder HCl.	250 mL Ác. Maleico búfer 4× concentrado 750 mL H <sub>2</sub> O, desionizada	997 mL Ác. Maleico búfer, 1× concentrado 3 mL Tween 20
<b>Blocking Solution (10%) para 100 mL</b>	<b>Blocking-búfer para 400 mL</b>	
10 g <i>Blocking Reagent</i> ad. 0,1 L 1× Ác. Maleico búfer	40 mL <i>Blocking Solution</i> (10%) 360 mL 1× Ác. Maleico búfer	
<b>MgCl<sub>2</sub> (1 M, 100 mL)</b>	<b>NaCl (5 M, 1 L)</b>	<b>Tris (1 M, pH 7,5/8,0/9,5, 1 L)</b>
20,33 g MgCl <sub>2</sub> ad. 0,1 L H <sub>2</sub> O, desionizada	292 g NaCl ad. 1 L H <sub>2</sub> O, desionizada	121,1 g Tris 800 mL H <sub>2</sub> O, desionizada pH-7 con ácido clorhídrico 8,0 oder 9,5
<b>Búfer dedeteci</b>	<b>SSC (20× concentrado, pH 7,0, 1 L)</b>	<b>SDS (10%, pH 7,2, 100 mL)</b>
50 mL Tris, 1 M (pH 9,5) 10 mL NaCl, 5 M 25 mL MgCl <sub>2</sub> , 1 M ad. 0,5 L H <sub>2</sub> O, deionisiert	175,3 g NaCl 88,2 g Na-Citrat ad. 1 L H <sub>2</sub> O, deionisiert Der pH-Wert wurde mit NaOH oder HCl auf pH 7,0 eingestellt.	10 g SDS 80 mL H <sub>2</sub> O, desionizada ad. 0,1 L H <sub>2</sub> O, desionizada pH- 7,2 con ác. Clorhídrico concentrado.
<b>2× SSC / 0,1% SDS (1 L)</b>	<b>0,5× SSC / 0,1% SDS (1 L)</b>	<b>0,1× SSC / 0,1% SDS (1 L)</b>
100 ml 20× SSC 10 ml 10% SDS 890 ml H <sub>2</sub> O, d.d	25 mL 20× SSC 10 mL 10% SDS 965 mL H <sub>2</sub> O, d.d	5 mL 20× SSC 10 mL 10% SDS 985 mL H <sub>2</sub> O, d.d

Tabla 2.15: Soluciones y búfers utilizados para la quimiolumiscencia

Primero se lavó la membrana dos veces durante 10 min. con 2 x SSC / 0,1% SDS a temperatura ambiente, para lavar las moléculas de sonda que no se unieron. Esto fue seguido por un lavado de 10 min. con 0,5 x SSC / 0,1% SDS a 65 ° C para eliminar los desajustes, y por último un lavado de alta astringencia durante 15 minutos con 0,1 x SSC / 0,1% de SDS a 65 ° C.

Para equilibrar la membrana, se la lavó durante 5 min con ácido maleico 1 × a temperatura ambiente. A continuación, se incubó durante 45 min en blocking búfer a

temperatura ambiente. Esto fue seguido por la incubación durante 30 min con la solución de anticuerpo. Esta solución de anticuerpo consistió en 15  $\mu$ l anti-digoxigenina-AP ("fragmento Fab", de Roche Diagnostics, Mannheim.) Y 150 ml de blocking búfer, es decir, una dilución 1: 10.000.

La solución madre de fragmento-FAB se centrifugó previamente por 5 min; sólo el sobrenadante se utilizó para la solución de anticuerpo. La solución de anticuerpo ya preparada se agitó durante al menos 15 min. Luego de la incubación, la membrana se lavó tres veces durante 15 minutos con búfer de lavado DIG a temperatura ambiente, después se equilibró durante 5 min en búfer de detección.

La membrana se transfirió a una película de plástico, se humedeció con 1,01 ml de solución de sustrato CSPD, la que consiste en 1 ml de búfer de detección y 10  $\mu$ L de CSPD (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim), y se distribuyó ampliamente en toda la membrana. La lámina de plástico se selló herméticamente, se transfirió a un casete de película, donde se incubaron en ella durante 5 min a temperatura ambiente. El cassette, con la membrana, se incubó en un horno de calentamiento a 37 ° C durante 15 min.

Después de esto, en el cuarto oscuro, se colocaron entre dos y cuatro películas quimioluminiscentes ("Película de detección quimioluminiscente", Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) en la parte superior de la membrana y se incubó, con el cassette cerrado, en oscuridad. El período de incubación varió de cuatro horas a tres días.

### **El revelado de la película y la evaluación**

Para revelar la película se necesitaron las soluciones que se indican en la Tab. 2.16. En el cuarto oscuro, la película se retiró y se sujetó con ganchos metálicos. Posteriormente se comenzó con la inmersión completa en las diferentes soluciones:

5 min en revelador, 1 min en ácido acético y 10 minutos en el fijador.

Luego las películas se enjuagaron bien con agua del grifo y se secaron en estufa a 60 ° C. Sobre la base de las bandas claramente diferenciadas se determinó el número de copias del transgén. Cada banda correspondió a una copia diferente. La membrana se almacenó a -20 ° C.

Revelado		Ácido acético		Fijador	
1,25 L	Concentrado de revelado	0,34 L	Ácido acético 100%	1,50 L	Concentrado de fijador
6,25 L	H2O desionizada	8,16 L	H2O desionizada	6,00 L	H2O desionizada
7,50 L	Total	8,50 L	Total	7,50 L	Total

Tabla 2.16: Soluciones de revelado

El concentrado de revelado G150 y el concentrado del fijador G354 fueron producidos por la empresa Agfa (Dübendorf, Suiza).

### "Stripping"

Para hibridar el ADN ya hibridado con una sonda en una membrana de nylon, con otra sonda, fue necesario someter la membrana a un "stripping". Aquí, la primera sonda se separa, por lo que se puede continuar luego con la etapa de "prehibridación" (véase Sur blot / prehibridación).

Para comenzar con el "stripping", la membrana se enjuagó en agua desionizada durante 1min a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se lavó dos veces durante 15 min a 37 ° C en M NaOH / 0,1% SDS 0,2. Para asegurar una buena humectación, la membrana se incubó en un baño de agua con movimiento de giro activado.

Después de equilibrar la membrana durante 5 min a temperatura ambiente en 2 x SSC, quedó lista para su posterior procesamiento. Si la membrana no se procesa directamente, se puede guardar humedeciéndola con 2 x SSC y sellándola herméticamente en una película de plástico.

### Síntesis de sondas para Southern Blots

Las sondas para los Southern Blots se sintetizaron con el kit PCR DIG Probe Synthesis Fa. Roche Diagnostics (Mannheim). Se sintetizaron siguiendo las instrucciones del fabricante (Tab. 2.17 a 2.18). Los cebadores utilizados se enumeran en la Tab. 2.19.

Componente	Concentracion stock	Concentración-PCR	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
PCR-búfer mix	10×	1×	5,00
dNTP-Mix	2 mM	0,2 mM	5,00
Forward-Primer	10 $\mu\text{M}$	0,4 $\mu\text{M}$	2,00
Reverse-Primer	10 $\mu\text{M}$	0,4 $\mu\text{M}$	2,00
DNA-Polimerasa	3,5 U/ $\mu\text{L}$	1,8 U	0,80
ADN	100 ng/ $\mu\text{L}$	200 ng	2,00
H2O			33,20
Volumen total			50,00

Tabla 2.17: Mix de reacción para la síntesis de sondas.

La temperatura de *Annealing* TA varía según los cebadores utilizados.

#### Temperatura [°C] Tiempo [min] Proceso

95,0	2:00	Denaturalización inicial
72,0	7:00	Terminación-Alargamiento
4,0	$\infty$	Almacenamiento

Tabla 2.18: Perfil térmico de PCR para la síntesis de sondas

2100 (PsEND1, forward,  $T_m=59$ , 8°C)

2101 (PsEND1, reverse,  $T_m=60$ , 2°C)

Tamaño del fragmento: 833 bp

Tabla 2.19: Combinacion de primers para la sintesis de sonda

#### Electroforesis

50  $\mu\text{L}$  de producto de PCR fueron mezclados con 10  $\mu\text{L}$  de búfer marcador Orange G. Se dividió en un volumen más pequeño y se colocó en un gel de agarosa 1,5%. A

continuación se corrió la electroforesis por 1,20h a 115 V y fue fotografiado bajo irradiación UV.

### **Elución del gel**

Las bandas con el producto de PCR deseado se colectaron con las columnas de plástico ("X-Tracta Generación II", Fa. Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf) lixiviada a partir del gel bajo iluminación UV y con la ayuda del kit de agarosa "Gelextract Mini Kit" (Fa. 5Prime, Hilden). Para este procedimiento se prosiguió de acuerdo con el protocolo del fabricante:

Los fragmentos de gel se mezclaron con 300 ml de búfer PS en recipientes eppi de 1,5 ml y se incubaron hasta la disolución de la estructura del gel a 55 ° C con agitación constante. Una columna de purificación del kit se colocó a un recipiente de recogida y se equilibró con 500 µL de búfer BL. El búfer fue depositado por 1 min de centrifugación a 16.060 G.

Después de completar la incubación, la muestra se colocó en una columna de purificación y se centrifugó durante 1 min a 16.060 G. El fluido que pasó a través de la columna se descartó. 700 µL de búfer PW se añadieron a la columna de purificación y esto se centrifugó nuevamente durante 1 min.

Posteriormente, 500 µL de búfer PW se adicionó a la columna y se centrifugó durante 1 min. El flujo que se filtró se desechó y la columna se centrifugó de nuevo durante 2 minutos para eliminar todos los restos del búfer. El flujo filtrado también se descartó. Las tapas de la columna se abrieron con el fin de secar durante varios minutos.

Para la elución del ADN por purificación, se añadió en la columna de 50 µL de búfer PEB (equivalente a 10 mM Tris-HCl, pH 8,5), se incubaron durante 2 min y luego se centrifugó durante 1 min. Para aumentar el rendimiento, el resto de flujo se pipeteó de nuevo a la columna, se incubó y se centrifugó nuevamente.

### **Cuantificación**

Como la medición de la concentración de la sonda por espectrofotometría no fue posible debido a que el DIG está marcado, la sonda se cuantificó en un gel de agarosa. Se preparó un gel de agarosa TBE 1,5% como se describe en "electroforesis en gel". Se cargó con un

volumen de muestra de 10  $\mu$ L, de 5  $\mu$ L de la sonda y 5  $\mu$ L de búfer de carga Orange G. También se colocó en el gel de agarosa el marcador Smart (Fig. 2.6). Las bandas de las sondas se cuantificaron después de su aparición.

Para dejar alícuotas preparadas de sondas, se mezclaron 50 mg de sonda en 1 ml de solución de prehibridación y se almacenaron hasta su uso a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **Extracción de ARN**

Para la extracción de RNA se cosechó el material vegetal fresco. Se seleccionaron flores, hojas, tallos y raíces tanto de las líneas transgénicas como de la "Wild type", se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80$ .

Entre 50 y 70 mg de material congelado en nitrógeno líquido, se pulverizó en tubos Eppendorf con dos bolas de acero (5 mm de diámetro), utilizando un molino vibratorio (Sres. Retsch) durante al menos 2:30 min a 21-23 Hz.

El protocolo para la extracción de ARN se basó en el de Chang *et al.* (1993). El búfer de extracción requerido para la extracción de ARN se compuso de 2% de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio, 2% de polivinilpirrolidona (PVP), 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), EDTA 25 mM y 2 M NaCl. Las sustancias se disolvieron en agua libre de RNasas. La solución SSTE consistió en 1 M NaCl, 0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) y EDTA 1 mM. Todos los componentes se disolvieron en agua libre de RNasas.

El búfer de extracción se calentó a  $65^{\circ}\text{C}$  y se añadió 1 ml con 20  $\mu$ L  $\square$  mercaptoetanol y 0,54  $\mu$ L de espermidina. A partir de esta mezcla, se pipeteó 1 ml a cada muestra y se mezcló bien con un Vortex.

Las muestras se incubaron, a continuación, durante 10 min a  $65^{\circ}\text{C}$  a 400 rpm. Luego, las muestras se mezclaron de nuevo con el Vortex y se centrifugaron durante 2 minutos a 16.500 G. El sobrenadante se retiró y se transfirió a un nuevo recipiente de reacción de 2 ml.

Se agregó el mismo volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1) y se mezcló por inversión. Esto fue seguido por una centrifugación de la muestra durante 20 minutos a 16.500 G. El sobrenadante acuoso se separó, se transfirió a un nuevo recipiente de

reacción de 2 ml. Nuevamente se añadió el mismo volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1), se mezcló y se centrifugó durante 20 min a 16.500 G. Se tomó el sobrenadante acuoso y se transfirió a un recipiente de reacción de 1,5 ml. Este volumen se mezcló con  $\frac{1}{3}$  volumen de LiCl 8 M y se mezcló suavemente por inversión. El RNA se precipitó a 4 °C, durante toda la noche.

El día siguiente, los ácidos nucleicos precipitados se centrifugaron durante 20 min, a 18.000 g, a 4 °C. El sobrenadante se descartó. El precipitado se disolvió en 200  $\mu$ L SST. Para una mejor solubilidad, la suspensión se incubó durante 2:30 min a 400 rpm.

Se añadieron 200 de cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1) y se mezclaron por inversión con el volumen de carga inicial. Se centrifugó por 20 min a 16.500 G y 4 ° C. Se separaron las fases, se tomó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo recipiente de reacción de 1,5 ml. Se añadió el doble del volumen de etanol (absoluto, -20 ° C en frío), se mezcló por inversión y se precipitó el ARN incubándose durante toda la noche a -20 ° C.

A continuación, las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 18.000 G y 4 ° C. El sobrenadante se retiró cuidadosamente sin tomar el sedimento frágil. El sedimento se lavó con 1 ml de etanol 70% y se centrifugó a 18.000 g a 4 ° C durante 10 min. Se retiró cuidadosamente de nuevo el líquido.

Los ácidos nucleicos precipitados se secaron con el recipiente abierto en una campana de flujo laminar limpia, durante al menos 1h. Luego se añadieron 30  $\mu$ L de agua libre de RNAsas. Las muestras se midieron por espectrofotometría y se almacenaron a -70 ° C.

### **Digestión del ARN extraído con ADNAsas**

El ARN aislado fue sometido a la extracción del ADNg, a través de una digestión con DNAsas, por lo que el ADNg no podría servir como una plantilla en el QRT-PCR (Udvardi et al. 2008). Para esto, se utilizó el kit libre de ADN TURBO (Fa. Ambion / Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.), ya que todos los componentes de la reacción son separados por la "Solución de inactivación" y al final queda el ARN puro.

Para la digestión con DNAsas se utilizó una mezcla de reacción de RNA aislado de 28  $\mu$ L, búfer de reacción 3,3  $\mu$ L y se preparó una solución de 1,0  $\mu$ L DNasa. Se incubó a 37 ° C

en un bloque de calentamiento. Luego de 30 minutos de incubación se adicionó 1  $\mu$ L de DNasa I a cada muestra. Se continuó con la incubación durante 30 min más. Se añadió 6,6  $\mu$ L de la Solución de Inactivación y se mezcló con la muestra.

Después de cinco minutos de incubación a temperatura ambiente, durante la cual las muestras se mezclaron de nuevo suavemente, estas fueron centrifugadas a 10.000 g durante 1:30 minutos. La solución de inactivación se recoge en el fondo del recipiente de reacción. Se retiró el sobrenadante, se midió por espectrofotometría OD<sub>260</sub> utilizando el Nanodrop 1000. La calidad se midió con los ratios OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> y OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> (mantenidos entre 1.8 y 2.1) y Se almacenó a -70 ° C.

## **Análisis de expresión**

### **Control de la calidad del ARN en el Bioanalyzer**

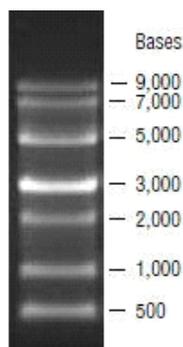
Como se requiere un molde de ARN conservado para obtener resultados reproducibles en el QRT-PCR, se realizó un control de calidad del ARN.

Para comprobar la integridad del ARN-ARN se utilizó el Bioanalyzer "Agilent 2100" (Fa. Agilent Technologies, Waldbronn). El contenido de ADN fue removido del ARN utilizando el kit Ambion turbo DNA-free (Ambion, Austin, TX, USA), utilizando el protocolo especificado por el fabricante.

El ARN extraído y tratado con DNasa se llevó a la concentración en la relación de 1:3 o 1:4, diluyéndose con agua libre de RNasa. Se desnaturalizó durante 2 min a 70 ° C y después se analizó.

El marcador de gran tamaño utilizado fue el ARN Leder del kit (Figura 2.9), que también se desnaturalizó a -70 ° C y se almacenó. Las muestras de ARN con un valor de RIN de 7,0 o superior se utilizaron para la síntesis de cADN y análisis de la expresión posterior (Udvardi *et al.*, 2008).

Figura 2.9: Tamaños de las bandas de la longitud de los fragmentos marcadores de ARN de cadena simple (Fa. New England Biolabs, Frankfurt am Main)



## Transcripción inversa

A partir del ARN aislado y mediante la transcripción inversa, se sintetizó el ADNc. Para esto, se utilizó el kit “Síntesis de ADNc SuperScript VILO” (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU. Fa.).

- **Kit de Síntesis ADNc SuperScript VILO**

Para las reacciones de transcripción inversa se preparó la mezcla de reacción a partir de 4  $\mu$ L de la mezcla de reacción 5x VILO, 2  $\mu$ L de 10 $\times$  mezcla de enzimas supermix SuperScript y un volumen variable de ARN total. La primera reacción contenía, además del búfer de reacción, el primer aleatorio, MgCl<sub>2</sub> y dNTPs. Hasta 2500 ng de ARN se utilizaron para la síntesis. Con agua tratada con DEPC se completa el volumen hasta 20  $\mu$ L. Las mezclas de reacción se incubaron secuencialmente durante 10 min a 25 ° C, durante 60 minutos a 42 ° C y durante 5 min a 85 ° C.

## Análisis de expresión por PCR semicuantitativa qRT-PCR

Para llevar a cabo la PCR se utilizaron 200 ng de ADNc, que fue sintetizado como se describe anteriormente. El protocolo de PCR utilizado es el descrito anteriormente (reacción en cadena de la polimerasa para la detección de los genes blanco). Los productos de PCR se separaron en un gel de electroforesis de agarosa como se describe en la sección “electroforesis en gel”.

La planificación y ejecución de los experimentos qRT-PCR fueron atados a las directrices reconocidas MIQE- para fijar normas mínimas científicas (Bustin *et al.*, 2009). La qRT-

PCR se realizó con la unidad de Mx3000P Fa (Santa Clara, EE.UU.), platos de reacción de 96 celdas (Eppendorf LoBind® twin.tec® PCR Plates, Eppendorf, Hamburgo, Alemania), con el software asociado MxPro -. Mx3000P v4.10 (Stratagene, Santa Clara, EE.UU.).

El dispositivo requiere el uso de un kit de PCR incluyendo ROX, un colorante que niveló la señal de fondo. En estas circunstancias se utilizó el kit "baja Rox rápida Plus EvaGreen qPCR Master Mix" de la empresa Biotium (Hayward, EE.UU.). El perfil de temperatura fue proporcionado por el fabricante (Tabla 2.20) para su uso con el kit.

Temperatura [°C]	Tiempo [min]	Etapa	ciclos
95,0	2:30	Desnaturalización inicial y Activación de la enzima	
95,0	0:10	Desnaturalización	40
60,0	0:30	Primer-Annealing y elongación	
95,0	0:10	Desnaturalización	
60,0	Llegando a 95,0	Curva fusión	
4,0	∞	Almacenamiento	

Tabla 2.20: Perfil de temperatura para qRT-PCR. El perfil de temperatura se compone de una combinación de repetición de dos pasos juntos (la desnaturalización y la hibridación con la elongación) y una curva de fusión final.

El diseño de los primers diseño se basó en las políticas que Udvardi et al. (2008) ha realizado y la elección de los primers se llevo a cabo utilizando el software en línea "Quant Prime" (<http://www.quantprime.de>, Arvidsson *et al.*, 2008) que se basó en la secuencia de bases de datos de *P. trichocarpa*. Los primers utilizados se enumeran en la Tab. 2.21.

Primer	Secuencia	Gen
#282	ATA TCA CCA CAT CCA CCT GCT TG	Barnase
#283	TCA CTT TGA TCC ATG GAG ATA TCG	barnase
#575	GCT CGA ACG GAC TTG GGA ACT TTG	Ubiq.
#576	TTC ACT CCG THG CTG CAT CTC CAC	Ubiq.

Tabla 2.21 Primer para la qRT-PCR

Como gen de referencia se utilizó la ubiquitina UBQ7 (Potri 0056198700.1). Los primers para este gen, detallados en la tabla 2.21, generan un amplicón de 108 pb.

## **Cultivo de álamos en invernáculo**

Las plantas transformadas seleccionadas del cultivo de tejidos se transfirieron al vivero. Las mismas fueron retiradas de sus envases, liberadas del medio de cultivo y establecidas con las raíces en el un sustrato de tierra tamizada.

La adaptación de la humedad (100% en los recipientes de cultivo) a la humedad no controlada en el invernadero se realizó poco a poco: las plantas recién retiradas de los envases de in vitro, fueron cubiertas en bandejas plásticas, con lo que se aseguró un alto grado de humedad. Se llevo a cabo la abertura sucesiva de las bandejas durante al menos cinco días, por lo que las plantas se adaptaron a la humedad del medio ambiente.

En los invernaderos, se instaló control de la temperatura. En verano se regula con la ventilación usando las ventanas de techo. En invierno, los invernaderos se mantuvieron por encima de 0 °C (Grosshansdorf, Alemania 53°39'42.2"N 10°15'10.9"E).

Como sustrato de suelo, colocado en contenedores, se utilizó el fabricado por Gramoflor (Vechta). Los valores nutricionales se enumeran en la Tab. 2.22. Las plantas en el invernadero se suplementaron con fertilizante Plantosan (Fa. Maná, Ammerbuch-Pfäffingen) con una concentración de 1-3 g / L, para garantizar el suministro de nutrientes.

En el invernadero, las plantas se regaron con agua del grifo. Esta agua se encuentra a una dureza total promedio de 12.3 ° dH, en el rango de dureza media (Comunicación con Fa. Depuradora de Hamburgo, com., 02/04/2015).

Las plantas se cultivaron en macetas con un diámetro de 7, 12, 16, 19, 21 y 26 cm. El exceso de agua puede fluir a través de agujeros en el piso de las macetas. El trasplante siempre se lleva a cabo en las primeras etapas del cultivo según fue necesario, en la primavera. Aquí el cepellón fue aflojado manualmente. En la superficie de las macetas se eliminó crecimiento de musgos.

### Componentes

pH	pH 5,8
Sales	1,4 g/L
Turba [H2-H4 und H4-H8 in Vol. %]	100
Otros materiales	carbón de cal, fertilizante NPK
Constituyentes menores	quelato de Fe, agente humectante

### Contenido de nutrientes

Nitrógeno	170 mg/L
Fosfatos	190 mg/L
Potasio	210 mg/L
Magnesio	150 mg/L
Sulfato	120 mg/L

Tabla 2.22: Composición del sustrato y nutrientes (Fa. Gramoflor, Vechta)

Se utilizaron pesticidas para reducir la infestación de plagas en los invernaderos, y se trató cada álamo de forma individual cuando presentaron daños por insectos y arácnidos. Para ejecutar todas estas operaciones se consideraron las normas de las operaciones biotecnológicas en Alemania, los requisitos legales, que están reguladas por la Ley de ingeniería genética, 16.12.1993 (Purves *et al.*, 2006).

Los álamos modificados genéticamente se cultivaron utilizando macetas de diferentes tamaños, dentro de los invernáculos.

### Protección de las plantas

En el monocultivo de álamo, por la alta humedad fueron indispensables las medidas para mantener las plantas saludables. Las plagas importantes y las medidas utilizadas se enumeran en la Tab. 2.23.

<b>Organismo</b>	<b>Daño</b>	<b>Medida</b>
Mosca blanca de invernadero <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Lesiones en las hojas, en plantas jóvenes daños severos.	Uso de Neudosan (Fa. Neudorff, Emmerthal) y Neem-Azal (Fa. Trifolio-M, Lahnau)
Araña roja <i>Panonychus ulmi</i>	Lesiones en las hojas, hojas palmeadas, en plantas jóvenes daños severos	Uso de Vertimec (Fa. Syngenta, Basilea, Suiza), Neudosan y Neem Azal Einsatz (Fa. Syngenta, Basel, Schweiz)
Avispones <i>Sesia apiformis</i>	Las larvas se alimentan de la zona del cuello de la raíz, provocando la muerte de todo el árbol.	Uso de Perfekthion (Fa. BASF, Ludwigshafen), trampas de feromonas y Raupenleim el cuello de la raíz.
Avispa arrolladora de hojas <i>Blennocampa pusilla</i>	Hojas y puntas de los brotes enrolladas, daño menos perjudicial.	Uso de Perfekthion
Cenicillas <i>Erysiphales</i>	Capa blanca en las superficies de las hojas, provocando la desecación de las hojas y la planta entera.	Uso de Netzschwefel 80 WG (Fa. Stähler Agrochemie, Stade)

Tabla 2.23: Plagas y medidas tomadas en el invernadero.

Las trampas de feromonas colgadas utilizadas fueron solo moderadamente eficaces, ya que pocos insectos pudieron ser capturados.

### **Inducción de flores fértiles en *Populus*- HSP::*AtFT* + PsEND1::*barnase***

La inducción de la floración se llevó a cabo en cámaras de crecimiento (Weiss Technik BioClim, Reiskirchen, Germany). Plantas de 4-6 meses fueron trasladadas del invernáculo a las cámaras de crecimiento en donde se les aplicó un tratamiento con calor para promover la floración. Tratamiento: 40 °C, durante 90 min, 1–6 semanas. Condiciones de crecimiento: 5–22 °C, luz/oscuridad: 8–16/16–8 h. Luego las plantas se sometieron a un tratamiento de frío, requerido para la formación de flores fértiles: 11°C., durante 4 semanas aproximadamente. (Hoenicka, *et. al.* 2016).

## Evaluación de la viabilidad del polen

Las anteras obtenidas en floración precoz se observaron bajo el microscopio óptico de fluorescencia (Olympus BH-2, Tokyo, Japan) para confirmar la presencia o ausencia de los granos de polen.

Para evaluar y estimar la viabilidad de las microsporas se realizaron las pruebas FDA, realizando las tinciones con diacetato de fluoresceína (Wildholm, 1972).

El número de microsporas fue determinado mediante la siguiente fórmula:

$$Nm = Df \times Lm \times Vol / Vs$$

Df: Factor de dilución=2. Dilución de la microspora en la solución de tinción FDA. Lm: Microsporas vivas contadas dentro de 10 cuadrados del hemocitómetro.

Vol: Volumen de la solución de microsporas= 10 ml.

Vs: Volumen de 10 cuadrados= 0.002 ml.

## Microscopía de anteras

En la Universidad de Hamburgo, se realizaron cortes microscópicos de las anteras, tanto en las líneas transgénicas con floración precoz y androesterilidad, como de las plantas controles, *HSP::AtFT* positivas.

Las muestras se fijaron (paraformaldehído 4% + GA 1% en 50 mM de bufer MSB, pH 6.8; 24h, 4 °C), se lavaron (3x con 50mM de búfer MSB) y se deshidrataron, usando series de etanol (etanol 6x 30%-100%, 4°C, 30 min/paso). La resina blanca-LR (London Resin co., Basingstoke, UK) fue utilizada para rodear los tejidos. Cápsulas de gelatina rellenas con resina y las muestras permitieron la polimerización en una atmósfera libre de oxígeno (2h TA + 36h 50°C). Las muestras se seccionaron en secciones de 1 micrón de espesor, con un cuchillo de vidrio, utilizando el ultramicrotomo Ultracut E (Leica-Reichert-Jung, Nussloch, Germany) y fueron montadas en láminas de vidrio. Las secciones de tejido se fijaron en láminas de vidrio sobre un plato caliente a 70°C. La tinción se llevó a cabo con azul de tolueno al 0.05% por 3-4 minutos.

### **Capítulo III: Cultivo de tejidos *in vitro* de *Populus***

## RESULTADOS Y DISCUSION

El cultivo *in vitro* es una etapa crucial para poder regenerar plantas completas a partir de los explantes transformados genéticamente. En este trabajo de investigación se ajustaron protocolos de regeneración *in vitro* para los clones D25 de *P. deltoides* y DN1 y DN5 de *P. x euroamericana*, de interés comercial para Argentina. Para *P. tremula* L. se adoptó el protocolo de cultivo *in vitro* utilizado por Fladung *et al.* (2004).

### **Cultivo de tejidos vegetales *in vitro* de *Populus deltoides* e híbridos de *Populus x euramericana***

El CTV en este trabajo de investigación, tuvo como objetivo obtener material vegetal susceptible de ser transformado genéticamente. Cabe destacar que se realizaron ensayos exploratorios de ajuste del CTV con diferentes clones plantados en Argentina, en el CEProVE-UNLP, entre los años 2008 y 2013, (Abedini *et al.*, 2008 y Adema *et al.*, 2009; Briones, M. V., *et al.*, 2012; Briones, M. V., *et al.*, 2013: Informe de avance CONICET 2013). Los resultados de estos trabajos previos se encuentran en el Anexo 3.1. Los avances logrados en Argentina, junto con la experiencia del grupo de investigación del Dr Fladung, Matthias del Instituto Thünen de Grosshansdorf, Alemania, permitieron obtener plántulas y material *in vitro* de *Populus* sp. para su transformación genética y posterior regeneración.

#### **1- Recolección del material vegetal**

La época del año adecuada para recolectar el material de partida para los cultivos *in vitro* de *Populus* sp, fue el invierno tardío. La época de recolección se determinó en base a la experiencia de trabajos previos realizados en el Instituto de Genética Forestal (Bueno *et al.*, 1992; Dr. Fladung y Dr. Hoenicka, 2015, comunicación personal). Las yemas vegetativas y las secciones nodales fueron colectadas a partir de febrero 2015 (finalizando la fase de dormancia) (Figuras 3.1.a, b, c y d). Esto concuerda con lo indicado por Kamali *et al.* (2001) y Hammerschlag (1982), que recomiendan que la colecta se realice durante el crecimiento vegetativo activo.



Fig. 3.1.a y b Colección de *Populus* del Arboretum del Instituto de genética forestal Thünen, Alemania. c y d. Recolección del material vegetal.

En este trabajo los clones de *P. deltoides* e híbridos de *P. x euroamericana*, fueron obtenidos de la colección de Cottonwood de la universidad de Minnesota/USA, disponibles en el *Arboretum* del Instituto Thünen en Grosshansdorf, Alemania. El material colectado se almacenó a 5°C en cámaras de frío, hasta su uso posterior. Marquínez (1998), recomienda utilizar un banco de plantas controladas *ex vitro*, manteniendo estas plantas madres, es decir, las plantas donadoras de los explantes, en un invernadero bajo condiciones controladas. Así la planta madre se mantiene en un medio sanitario óptimo y con un control de nutrición y riego adecuados, que le van a permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo, 2004). Por su parte, Adema (2016) indica que la iniciación de todo proceso de cultivo de tejidos sólo tiene sentido cuando se emplea un material de partida adecuado. El estado fisiológico es de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo, reportándose diferencias en los requerimientos nutricionales y hormonales (Villalobos y Thorpe, 1991). Precisamente para uniformar el estado fisiológico de las plantas donantes, o sea de los explantes, es que se incluyen en esta etapa una serie de pretratamientos como la selección y crecimiento de la planta madre bajo condiciones higiénicas, que reduce notablemente los contaminantes, principalmente fúngicos, ya que la mayor fuente de contaminación primaria en los cultivos *in vitro* provienen de la planta madre. Es importante también, tener un banco de plantas *ex vitro* juvenilizadas. En el caso del género *Populus* se realiza utilizando estacas recolectadas de

árboles sanos y de procedencia genética conocida. El estaquero también permite mantener la juvenilidad del material (Ramilo, 2014).

El material vegetal de partida fueron yemas vegetativas apicales y secciones nodales de clones de *Populus deltoides*: D6, D7 and D25 y clones de *Populus x euramericana*: DN1 and DN5. Es decir, se utilizó material joven. Se sabe que los explantes con mejores resultados para la morfogénesis *in vitro*, son los tomados de las plantas jóvenes (López-Gómez, 2010; Roque y Ardisana, 2006; Collado *et al.*, 2004; Mroginski *et al.*, 2003; Marquínez, 1998) debido a que la capacidad de regenerar órganos y tejidos a partir de un explante inicial es más rápida. La propagación *in vitro* de la mayoría de las plantas leñosas requiere de la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles (Dodds, 1982).

## 2- Desinfección del material colectado

El método de desinfección nº 2 permitió obtener mayor cantidad de explantes libres de contaminantes y menores muertes de tejido por oxidación y daño por exposición a los agentes desinfectantes (86% de explantes libres de contaminación para el clon D7).

Los resultados de desinfección con el método de desinfección nº2, se muestran en la tabla 3.1

Clon	Yemas apicales				Secciones nodales		
	Total	Libres de contaminación			Total	Libres de contaminación	
DN 1	25	0	0%	51	38	74.5%	
DN5	17	0	0%	41	18	44%	
D6	30	1	3.4%	51	30	58.8%	
D7	32	6	18.8%	58	50	86.2%	
D25	25	1	5.9%	62	50	80.6%	

Tabla 3.1. Resultado de la desinfección de las yemas vegetativas apicales y segmentos nodales de los clones de *P. Deltoides* e híbridos, utilizando el método de desinfección nº 2.

Los resultados muestran una respuesta diferencial de cada genotipo. Para las yemas apicales y las secciones nodales, el mayor porcentaje se obtuvo para el clon de *P. deltoides* D7. Rebolledo Camacho y Cruz Jiménez (2006) también encontraron resultados diferentes usando el mismo método de desinfección para dos genotipos de pino. Observaron mejores porcentajes de sobrevivencia en *Pinus pseudostrobus* que en *Pinus*

*jaliscana* utilizando hipoclorito de sodio al 10% durante 15 minutos. La respuesta a la desinfección fue dependiente del genotipo para distintas variedades de *Coffea sp.* (López Gómez *et al.*, 2011). Los autores indican que es necesario aplicar un método de desinfección específico para cada genotipo durante el establecimiento aséptico, ya que existe variabilidad en la tolerancia a los desinfectantes, dependiendo del genotipo y el agente desinfectante evaluado. En este trabajo, para algunos clones (D7 y D25), el sistema de desinfección fue altamente eficiente, siendo los resultados obtenidos altamente significativos.

En la Tabla también se observan diferencias en el grado de contaminación respecto al tipo de explante. Con ambos métodos, el porcentaje de secciones nodales contaminadas fue menor que el de las yemas apicales. Según Folgueras (2000), dependiendo del tipo de explante utilizado, los microorganismos superficiales o endofíticos de las plantas pueden ser introducidos al cultivo *in vitro*. Este resultado es diferente al obtenido para otras especies leñosas. Según Roca y Mroginsky, 1993) el tamaño del explante es otra de las causas que incrementa la presencia de contaminantes *in vitro*, pues mientras mayor sea el explante, más difícil es de desinfectar (Surga, J. G. y Guevara, 1994). Del mismo modo, las irregularidades ubicadas en la superficie del explante afectan el éxito de la desinfección superficial, ya que pueden servir de depósito de esporas y polvo, y los productos empleados no logran llegar y desinfectar las áreas de interés (Ramírez *et al.*, 2005; Roca y Mrogrinski, 1993). Sin embargo, en este trabajo fueron mejores los resultados obtenidos con secciones nodales, que con ápices. Gonzáles (2007) utilizó secciones nodales y yemas apicales, provenientes de estacas cultivadas en el invernadero, que fueron sometidas a tratamiento con fungicida y bactericida, por 30 días, no logrando controlar la contaminación. Esto demuestra la dificultad de limpiar el material para establecerlo *in vitro*, siendo este uno de los cuellos de botellas de la técnica, y que además depende de varios factores Ordoñez M., MA (2005), trabajando con *Aloysia tripillia* (L'herit) Brito, no logró controlar los microorganismos contaminantes en los explantes nodales, obteniendo porcentajes muy elevados de contaminación, entre el 89 y el 100%. Sin embargo en los explantes foliares si se logró reducir la contaminación, obteniéndose el menor porcentaje de contaminación (44 %), al utilizar NaOCl al 2 % por 5 minutos. La mayor contaminación de los ápices puede deberse a la presencia de hongos y bacterias contaminantes en ellos. Se ha detectado la presencia de hongos contaminantes en ápices

de plantas adultas de *Annona muricata* (Ramirez *et al.*, 2005), los cuales correspondieron a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryodiplodia*, *Curvularia* y *Helmithosporium*. Otros identificaron los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Aspergillus* (Acosta *et al.*, 2002) Acosta, M.; En el cultivo *in vitro* de yemas apicales de mango (*Mangifera indica* L.), se identificaron como géneros de hongos contaminantes a *Fusarium* sp., *Botryodiplodia* sp., *Alternaria* sp. y *Aspergillus* sp. (Borges *et al.*, 1997); sin embargo, en segmentos nodales solo se han identificado los géneros *Alternaria* sp. y *Curvularia* sp., siendo este último el que mayor número de explantes contaminados presentó, señalándose que las diferencias con respecto al resultado anterior puede atribuirse al procedimiento de desinfección, el explante seleccionado y la época del año, entre otras causas (Isea *et al.*, 2004).

Con el método de desinfección nº 1, se oxidaron el 70% de las secciones nodales y el 90% de las yemas apicales. Sin embargo, la eliminación del último paso con el agente desinfectante, sumado a remoción de la corteza y del tejido directamente afectado por el agente desinfectante permitió obtener buenos resultados, reduciéndose así la oxidación de los explantes luego de la desinfección. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Das y Mitra (1990), que en el cultivo *in vitro* de *Eucalyptus tereticornis*, encontraron que las yemas de brotes apicales terminales del tronco principal presentaron mayor propensión a oxidar que sus iguales ubicadas en las ramas laterales basales. Un comportamiento similar fue reportado en el cultivo de uva por Dalal *et al.* (1999), quienes indican que la respuesta observada se debe al mayor contenido de sustancias fenólicas en los brotes apicales. Degenhardt-Goldbach (2011) reporta la oxidación en el cultivo *in vitro* de Eucaliptus, y señala una reducción de la oxidación con el uso del medio WPM frente al MS. En el cultivo de tejidos *in vitro*, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (Abdelwahd *et al.* 2008; Tabiyeh *et al.* 2006, Van Staden *et al.* 2006; George, 1993). Diferentes factores como el genotipo, la ubicación, el tipo y tamaño del explante, la edad, así como la época del año en que se toma el material de la planta donadora influyen en los problemas del oscurecimiento (Azofeifa, 2009).

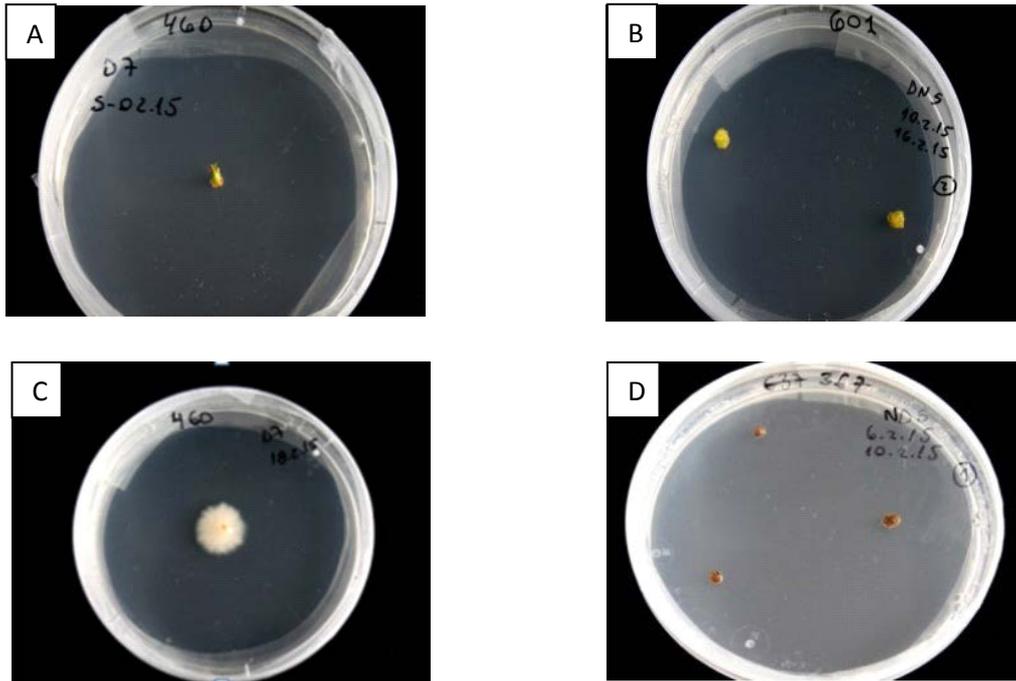


Figura 3.3 a yema apical del clon D7 luego de la desinfección en medio 460. b. Secciones nodales del clon híbrido DN5 luego de la desinfección, sembrado en medio 601. c. Yema apical del clon D7 contaminada. d. Secciones nodales del clon híbrido DN5 ennegrecidas.

### 3- Organogénesis *in vitro*

Los resultados de la brotación de los explantes desinfectados, de los diferentes clones de *Populus*, se detallan en la siguiente tabla 3.2.

Clones	Yemas			Secciones nodales		
	Total	Brotos		Total	Brotos	
DN 1	1	1	100%	34	27	79%
DN5	0	0	0%	21	5	23.8%
D6	1	1	100%	27	1	3.7%
D7	6	4	66.6%	54	0	0%
D25	1	1	100%	50	5	20.8%

Tabla 3.2 Resultado de la brotación *In vitro* de los diferentes clones de *P. deltoides* e híbridos.

Como se muestra en la tabla, los mejores resultados fueron obtenidos a partir de secciones nodales, excepto en el caso de *P. deltoides* D7. Ha habido muy pocas publicaciones reportando datos de cultivo *in vitro* de híbridos que tengan la base genética

“deltoides”, ya que *P. deltoides* y sus híbridos interespecíficos son conocidos por ser especialmente recalcitrantes para disparar la regeneración *in vitro*. (Coleman and Ernst 1990; Sellmer *et al.*, 1989). Noel *et al.* (2002) lograron obtener un método de micropropagación de seis variedades de álamo Europeo de interés económico – cuatro *Populus x interamericana* y dos *Populus x euramericana* utilizando un procedimiento de tres pasos, regenerando plántulas a partir de callo. Este protocolo no pudo ser reproducido en nuestro laboratorio.

Los primeros brotes *in vitro* aparecieron de las secciones nodales del híbrido *P. x euroamericana* DN5 luego de 25 días en el medio de cultivo 601 (Figura 4. a y c.). El mayor número de brotes fue obtenido del híbrido *P. x euroamericana* DN1. Los clones de *P. deltoides* mostraron un crecimiento más lento, pero obtuvieron brotes a partir de los 30 días de cultivo en el medio 601 (Figura 4. b), excepto el clon D7. Estos brotes no mostraron necrosis apical. De Block (1990), si bien pudo obtener brotes *in vitro* de *Populus alba x P. tremula* y del híbrido *Populus trichocarpax P.deltoides* utilizando un medio WPM modificado, los ápices se necrosaban. Según Lloyd and McCown 1980), aunque el WPM es comúnmente usado para establecer explantes de árboles *in vitro*, este a menudo da lugar a la necrosis de los ápices.

En este trabajo se utilizó el Thidiazurón como citoquinina, dando buenos resultados para la formación de brotes directos de las secciones nodales. El tidiazurón ha sido utilizado en otros trabajos con álamos como el de Bueno *et al.* (1992) donde el tidiazurón en combinación con ANA presentó los mejores resultados para la producción de yemas adventicias, a partir de callos, en *Populus alba*. En trabajos anteriores de *Populus deltoides* (Coleman and Ernst, 1989 y 1990), los mejores resultados se observaron con el uso de zeatina como citoquinina adicionada al medio de cultivo. En *Eucalyptus sp.* se han obtenido brotes *in vitro* usando el TDZ como regulador de crecimiento en diferentes medios (Degenhardt-Goldbach *et al.*, 2011).

El 37% de las secciones nodales del clon D6 se oxidaron, mientras que para el caso de D7 el porcentaje fue de 35,2%. Sólo el 8% de las secciones nodales del clon D25 se oxidaron y en el caso de los clones DN1 y DN5 no se visualizó oxidación. Los clones D6 y D7 mostraron baja o nula brotación de los explantes desinfectados. El establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, especialmente leñosas, está, en

gran medida, limitado por la ocurrencia de oxidación de los tejidos en los explantes. Esto, constituye un problema serio y frecuente, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* (Tang y Newton, 2004; Murkute, 2003; Cabrera, 2002; Laukkanen *et al.*, 2000; George, 1996).

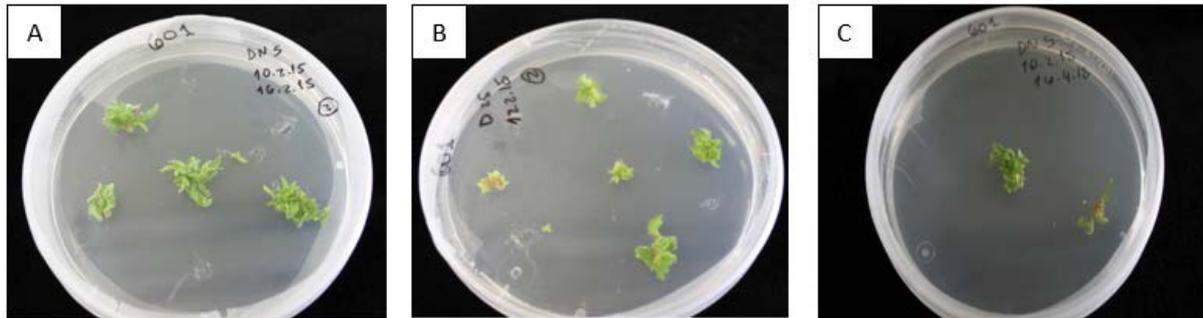


Fig. 3.4. a y c. Brotes regenerados *in vitro* a partir de secciones nodales de *P. x euroamericana* DN5. b. Brotes regenerados *in vitro*, de secciones nodales de *P. deltoides* D25. Todos en medio 601.

#### 4- Enraizamiento de los brotes obtenidos

Los brotes fueron individualizados y se colocaron en un nuevo medio para su enraizamiento. El 90% de los brotes enraizaron en el medio 460 (WPM sin reguladores de crecimiento) a partir de los 25 días de cultivo (Fig. 3.5.a). Los brotes cultivados en el medio 601  $\frac{1}{4}$ , mostraron un 70% de enraizamiento, pero luego de los 30 días de cultivo. Fig.3.5.b



Figura 3.5.a. Brotes enraizados de *P. deltoides* D25. b. Plantas completas de *P. x euroamericana* DN5. c. Brotes enraizados de *P. x euroamericana* DN5.

Los medios con menor contenido de sales como son 460 y el medio 601 $\frac{1}{4}$ , demostraron ser los más propicios para la producción de raíces en estos clones. Durante la propagación

*in vitro*, la etapa de enraizamiento se presenta a menudo como una fase crítica y difícil en la mayoría de las especies leñosas (Hartmann *et al.* 2002). La utilización exógena de auxinas naturales como ácido indol-3-acético (AIA) o sintéticas como ácido naftalenacético (ANA) y ácido 3-indolbutírico (AIB), permite manejar esta fase problemática estimulando células indiferenciadas que promueven la iniciación del enraizamiento o emergencia de raíces adventicias (Woodward & Bartel 2005, Flores *et al.* 2009). La presencia de PGR promotores del enraizamiento es esencial para muchas leñosas. La dificultad en la emisión de raíces adventicias, en los medios de cultivo descritos para otras especies de *Populus*, es el principal factor limitante para la regeneración de planta entera (Padró Simarro, 1992).

Hermoso Blanco *et al.* (2012) indican que existe una gran variabilidad clonal en todas las variables analizadas en el enraizamiento de *Populus tremula* L, presentando resultados muy diferentes entre ellos en los mismos medios. Asimismo, existe una gran interacción clon/medio. Para 4 clones de *P. tremula*, un medio de cultivo en ausencia de hormonas fue el medio menos indicado para la iniciación y el desarrollo de las raíces, crecimiento del tallo y número de hojas. Sin embargo según Uribe *et al.* (2012), la inducción de raíces en el medio libre de hormonas se podría explicar debido a la presencia de estructuras preformadas para la emergencia de primordios radiculares en la especie. De manera contraria a lo que se observa en estudios realizados por Martínez-Pastur *et al.* (2005) y Uribe *et al.* (2011) donde se evidencia la carencia de estructuras pre-radiculares en *Nothofagus nitida* (Phil.) Krasser y *Beilschmiedia berteriana* (Gay) Kosterm, lo que no permite el enraizamiento sin PGR. Por otro lado, el genotipo *P. deltoides* ha sido reportado como difícil de enraizar en la macropropagación (Galarco, comunicación personal) y esta característica se reproduce generalmente en el cultivo *in vitro*. Por ello, los resultados obtenidos en este trabajo son significativos.

Las condiciones de crecimiento detalladas en el Capítulo II, fueron óptimas para el desarrollo de las plantas *in vitro*.

A partir de estas plantas regeneradas y cultivadas *in vitro*, se obtuvo el material necesario para realizar parte de las transformaciones genéticas, del capítulo siguiente. A partir de

la información aquí generada las plantas transgénicas pudieron ser regeneradas y posteriormente evaluadas en invernáculo, con éxito.

En la siguiente figura (Fig. 3.6) se muestra un esquema del cultivo de tejidos a partir de secciones nodales de *P. deltoides* y *P. xeuroamericana*.

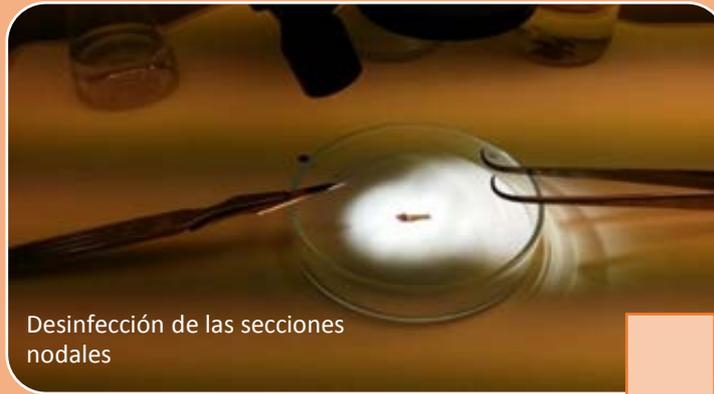


Fig. 3.6 Diagrama del CTV partiendo de secciones nodales de los clones D25, DN1 y DN5

**Capítulo IV: Transformación genética de *Populus tremula* L., *Populus deltoides* y *Populus x euramericana* mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Constructos utilizados en las transformaciones genéticas:

- Inductor de la floración: HSP::*AtFT* (A168 y A113). Disponible en el laboratorio del Instituto Thünen de genética forestal.
- Androesterilidad: PsEND1::*barnase*. Se ha incorporado con éxito a la A249, como se detalla a continuación.

### Transformación de *E. coli* con el constructo PsEND1::*barnase*

Se obtuvieron colonias transformadas de *E. coli*. Se incorporó con éxito en *E. coli* (xL1), el constructo PsEND1::*barnase*, presente en el vector binario pbi101. La presencia del plásmido fue confirmada en colonias selectas de *E. coli* usando PCR, con primers específicos que amplifican parte del gen *NPTII* (Fig. 4.1).

El plásmido incorporado fue aislado con éxito de las *E. coli* transgénicas (Sambrook *et al.*, 1989. Cold Spring Harbor Laboratory), para luego incorporarlo a las agrobacterias seleccionadas para la transformación de las plantas de *Populus sp.*

Primers:	16 (NPT-Primer, Kanamicina, forward, T <sub>m</sub> =64°C)
	17 (NPT-Primer, Kanamicina, reverse, T <sub>m</sub> =66°C)
T <sub>A</sub> :	62°C
Tamaño del fragmento:	780 bp
DNA-Polymerasa:	Taq
Gel:	1,3 % Agarosa, 1 x TAE, Roti-Safe (2,5µL/100mL Gel)
Electroforesis:	100 - 130V
Marcador:	Marcador Smart, 5 µL

Tabla 4.1: Detalle de la PCR con primers para *NPT* con *E. coli* transgénica con el constructo PsEND1::*barnase*

Primers 16/17				
	1	2	3	
Smart	H <sub>2</sub> O (CN)	# T195-1 (CP)	## PsEND1 Barnase	Smart

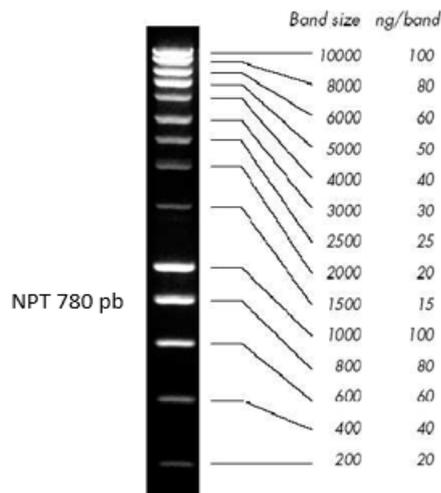
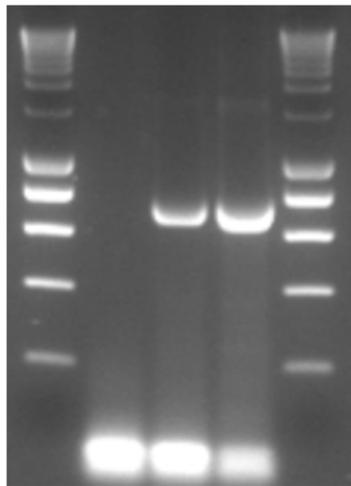


Fig. 4.1 Gel de PCR de *E. coli* transformadas con el constructo *PsEND1::barnase*.

### Células competentes de *Agrobacterium* GV2260

Para incorporar el T-ADN en la agrobacteria A259, células competentes de la cepa GV2260 (cepa genética C58) de *Agrobacterium tumefaciens* fueron obtenidas de acuerdo al protocolo descrito, de manera exitosa. La cepa GV2260 es una cepa con virulencia intermedia (Hamilton y Fall, 1971). En cuanto a la cepa de bacterias, la mayoría de los experimentos de transformación positivos en genotipos de *Populus* reportados, involucran el uso de cepas de *A. tumefaciens* de la familia de la C58 (Fillati *et al.*, 1987; Ahuja, 1988; Chung *et al.*, 1989; Klopfenstein *et al.*, 1991, 1993; Leple *et al.*, 1992; Nilsson *et al.*, 1992; Confalonieri *et al.*, 1994). Por ello se utilizó esta cepa.

## Transformación de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260

Las células competentes de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 fueron transformadas con el constructo PsEND1::*barnase* usando el método químico ([www.yeastlab.vbiol.slu.se/WCN/DAagrotransf](http://www.yeastlab.vbiol.slu.se/WCN/DAagrotransf)). Se obtuvieron colonias transformadas de manera exitosa. La presencia del plásmido se corroboró utilizando la técnica de PCR con los primers que amplifican para los genes *NPTII* y *barnase*, y en el promotor nos, como se detalla en la figura 4.2

Primers:	343(NPT-Primer, Kanamicina, forward, T <sub>m</sub> =66°C)
	344 (NPT-Primer, Kanamicina, reverse, T <sub>m</sub> =66°C)
	331 (Promotor nos, forward, T <sub>m</sub> =60°C)
	332 (Promotor nos, reverse, T <sub>m</sub> =60°C)
	282 (barnase, forward, T <sub>m</sub> =60°C)
	283 (barnase, reverse, T <sub>m</sub> =60°C)
Tamaño de los fragmentos:	737/599/292 pb
ADN-Polymerasa:	Taq
Electroforesis:	100 - 130V
Marcador:	Smart Ladder, 5 µL

Tabla 4.2. Detalle de la PCR, con diferentes primers, de las colonias transformadas de GV2260 con PsEND1::*barnase*.

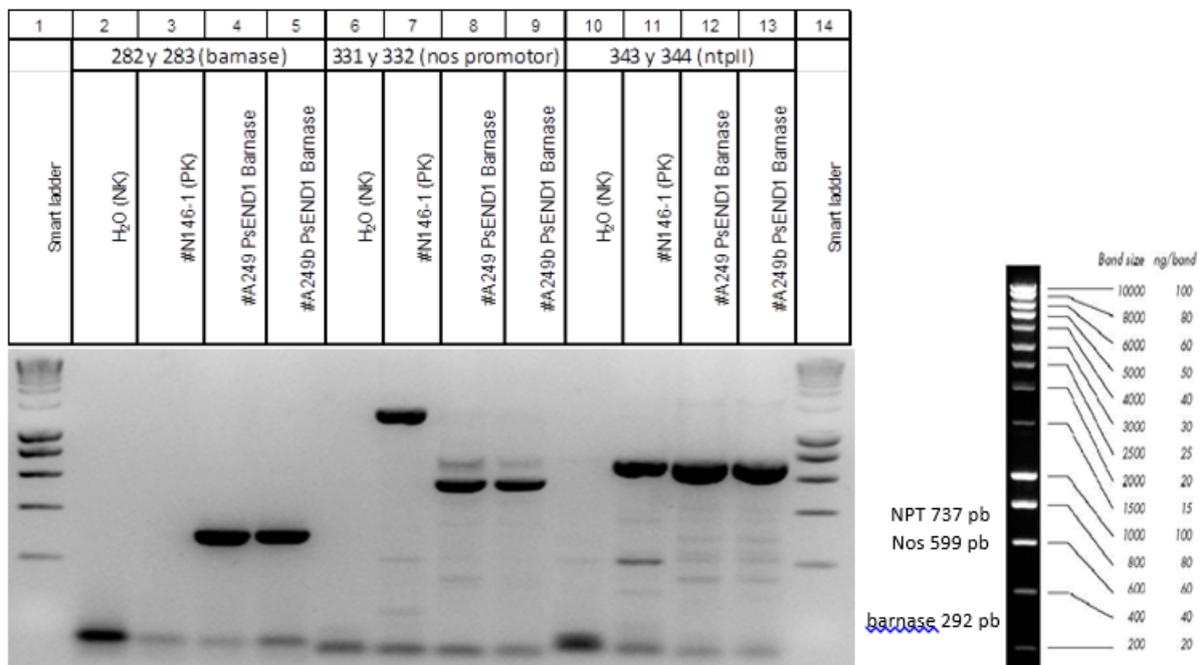


Figura 4.2 Gel de electroforesis para las bandas correspondientes a *NPTII*, *barnase* y nos

## Transformación genética de *Populus sp.*

La transformación genética, mediada por *A. tumefaciens*, se ha utilizado con éxito en muchos géneros forestales como *Pinus* (Tang et al 2006; Levée et al., 1999; Wenck et al., 1999), *Eucaliptus* (Aggarwal et al., 2011; Prakash et al., 2009; Ho et al., 1998; Serrano et al., 1996) y *Populus* (Song et al., 2006; Han 2000; Fladung et al., 1997; Confalonieri et al., 1994; Fillati et al., 1987). En este trabajo se ha logrado obtener con éxito líneas transgénicas dobles de *P. tremula* L, que presentan tanto floración precoz como androesterilidad masculina y líneas transgénicas, con floración precoz en clones de *P. deltoides* y *P. x euramericana*.

### Fase 1: *Populus tremula* L e híbrido: clones W52 y T89

1- Se llevaron a cabo 3 transformaciones genéticas con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* A168 (EHA101) portadora del constructo del gen para la floración precoz: HSP::*AtFT* y el gen marcador *aphII* (resistencia a hygromicina) (Tabla 4.3). La cepa EHA 101 proviene de la cepa EHA105 y tiene como cepa genética la cepa C58.

Transformac. N°	Agro N°	Constructo	Selección	Clon
N417	168	p6i:HSP::FT	Hyg (20)	W52
N418	168	p6i:HSP::FT	Hyg (20)	T89
N422	168	p6i:HSP::FT	Hyg (20)	W52

Tabla. 4.3 Detalle de las transformaciones con A168.

Los 13 regenerantes de estas 3 transformaciones y el resultado de la PCR para la resistencia a la higromicina, se muestran en la tabla 4.4.

Línea	Agro	Selección	Hyg (337/338)	Ft (1980/1981)
N417-1	A168	Hyg 20	+	-
N417-2	A169	Hyg 20	+	-
N417-3	A168	Hyg 20	+	-
N418-2	A168	Hyg 20	+	-
N422-1	A168	Hyg 20	+	-
N422-2	A168	Hyg 20	+	-
N422-3	A168	Hyg 20	+	-
N422-5	A168	Hyg 20	+	-
N422-6	A168	Hyg 20	+	-
N422-7	A168	Hyg 20	+	-
N422-8	A168	Hyg 20	+	-
N422-9	A168	Hyg 20	+	-
N422-10	A168	Hyg 20	+	-

Tabla 4.4. Resultados de PCR de las líneas regenerantes de las transformaciones con A168.

Todos los regenerantes dieron sólo banda para el gen de resistencia higromicina, pero no dieron banda para el gen de floración *FT*, en las pruebas de PCR. Por ello, con el método de miniprep se aisló el plásmido de la cepa A168 y se evaluó por PCR, tanto con los primers para amplificar la resistencia a la higromicina como para la región del *FT* (Figura 4.3). Los resultados indicaron la presencia del gen de resistencia a la higromicina, pero no se detectó la presencia del gen de la floración *HSP::FT*, con ninguno de los pares de primers. Es por ello que se decidió cambiar de agrobacteria y utilizar la A113. Es probable que en el proceso de transformación de la bacteria el plásmido se haya desarmado y sólo se incorporó a la bacteria una parte del mismo (Douglas, 1983).

Primers:	337 Hyg fw
	338 Hyg rew
	1980 Ft fw
	1981 Ft rew
	1978 Ft fw
	1979 Ft rew
T <sub>A</sub> :	59°C
Tamaño de los fragmentos:	988 bp / 130-170 bp
ADN-Polymerasa:	Taq
Electroforesis:	100 - 130V
Marcador:	Smart 5 µL

Tabla 4.5 Detalles de la PCR del plásmido de A168 con primers específicos para el gen *FT* e higromicina

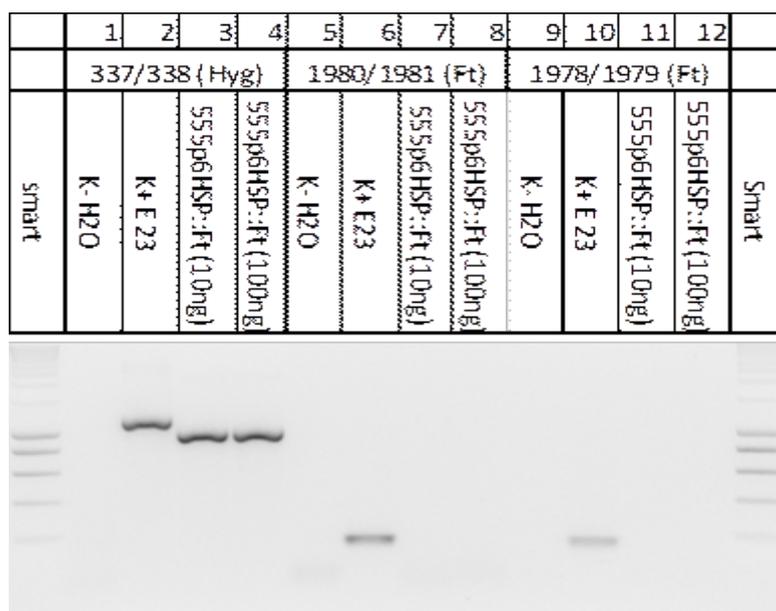


Fig 4.3 Resultado de PCR para higromicina y FT del plásmido de la A168.

2- Se realizaron 8 transformaciones genéticas dobles utilizando las cepas de *Agrobacterium* A168 (HSP::AtFT) y A249 (PsEND1::barnase), de forma simultánea en la fase de co-cultivo, para las transformaciones genéticas (Tab. 4.6).

Tabla

Transformac. N°	Agro N°	Construceto	Selección	Clon
N424	168+249	p6iHSP:FT + pbi101:PsEND::BARNASE	Kan(50)+Hyg(20)	W52
N425	168+249	p6iHSP:FT + pbi101:PsEND::BARNASE	Kan(50)+Hyg(20)	W52
N429	168+249	p6iHSP:FT + pbi101:PsEND::BARNASE	Kan(50)+Hyg(20)	W52
N433	168+249	p6iHSP:FT + pbi101:PsEND::BARNASE	Kan(50)+Hyg(20)	W52
N439	168+249	p6HSP:FT + pbi101:PsEND::BARNASE	Kan(50)+Hyg(20)	W52
N440	168+249	p6iHSP:FT + pbi101:PsEND::BARNASE	Kan(50)+Hyg(20)	W52
N443	168+249	p6i:HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	Kan(50)+Hyg(20)	W52

4.6 transformaciones genéticas utilizando en simultáneo las agrobacterias A168 y A249 en el co-cultivo.

No se obtuvieron líneas regenerantes de ninguna de estas 8 transformaciones.

3- Se realizaron 7 transformaciones genéticas dobles utilizando la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* A113 (EHA101) con el construceto de inducción de la floración: HSP::AtFT y el marcador genético *NTPII* (resistencia a kanamicina) y la agrobacteria A249 (PsEND1::barnase) de forma simultánea en la etapa de co-cultivo (Tab. 4.7).

Transformac. N°	Agro N°	Constructo	Selección	Clon
N426	113+249	pK2GW7:HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	Kan(50)	T89
N427	113+249	pK2GW7:HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	Kan(50)	T89
N430	113+249	pK2GW7:HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	Kan(50)	W52
N431	113+249	pK2GW7:HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	Kan(50)	W52
N435	113+249	pK2GW7:HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	Kan(50)	W52
N441	113+249	pK2GW7:HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	Kan(50)	W52
N442	113+249	pK2GW7:HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	Kan(50)	W52

Tabla 4.7. Detalle de las transformaciones genéticas utilizando en simultáneo las agrobacterias A113 y A249 en el co-cultivo con los clones de *P. tremula* L.

Las líneas regenerantes de estas 7 transformaciones dobles, se detallan en el Anexo 4.1. Es la primera vez que se reportan líneas transgénicas de *P. tremula* L. con floración precoz y androesterilidad, ambos caracteres incorporados en la misma transformación genética, acelerando ampliamente los tiempos de transformación cuando se desea incorporar mas de un carácter deseado.

### **Cultivo *in vitro* de las líneas transgénicas**

Todas las líneas que regeneraron se separaron de la placa de la transformación y se colocaron en un medio 601 con kanamicina y cefotaxima, bajo condiciones de esterilidad y bajo el flujo laminar. Luego de 10-15 días, si no había crecimiento de *Agrobacterium*, se repicaban a un medio 601 nuevo, adicionando sólo con kanamicina para continuar con la selección. Por último, luego de confirmar con PCR si la línea era efectivamente transgénica, se repicaron a un medio 601 sin antibiótico. Se obtuvieron de forma exitosa brotes de todas las líneas regenerantes transgénicas, que enraizaron en el medio 460. Una vez obtenida la planta completa se procedió el pasaje de estas a invernáculo para su evaluación (Cap. V).

### **Extracción de ADN de las líneas regenerantes**

De cada una de las líneas regenerantes de las transformaciones genéticas, se extrajo ADN de hojas y brotes *in vitro* y/o de invernáculo con el fin de realizar las PCRs y Southern blots necesarios para confirmar la presencia del constructo de interés y el número de copias en cada una de las líneas positivas.

Se obtuvo la cantidad y calidad de ADN requerida, según Dumolin *et al.*, 1995, para realizar las pruebas necesarias. Se utilizó el Nanodrop para la medición de las muestras.

La amplificación del ADN fue analizada en la electroforesis en gel de agarosa. Los resultados de las PCRs de las líneas regenerantes se muestran en el Anexo 4.2. Para cada una de las líneas se evaluó no sólo la presencia del gen de interés, sino también la presencia del promotor del gen, teniendo en cuenta lo ocurrido con la incorporación del ADN-T en la A168.

Se obtuvieron 121 líneas regenerantes de estas 7 transformaciones con *P. tremula* L. De las 121 líneas que regeneraron, 9 se contaminaron y 29 fueron escapes (falsos positivos), murieron cuando se colocaron en un medio renovado con antibiótico (Kan. 50mg/ml).

Se obtuvieron 83 líneas transgénicas, de las cuales 73 contienen sólo el gen de la floración, una línea contiene el gen *barnase* y 9 son líneas transgénicas dobles: gen *FT* + gen *barnase* (tabla 4.9), incorporados de forma simultánea en la misma transformación. En la siguiente tabla se detallan los resultados de las PCRs de las líneas dobles con los primeros, tanto para el gen de interés como para su respectivo promotor.



Figura 4.4. Análisis de PCR de las líneas transgénicas dobles, con primers específicos.

Linea	Agro	construct	Seleccion	Barnase 282/283	Ps END1 2080/2081	Ft 1980/1981	HSP 1151/1152
N430-4	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+
N430-11	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+
N435-15	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+
N435-33	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+
N441-3	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+
N430-19	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+
N441-15	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+
N441-21	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+
N441-7	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+

Tabla 4.8. Resumen de resultados de las PCR de líneas transgénicas, con primers específicos para los genes *AtFT* y *barnase* y los promotores HSP y PsEND1.

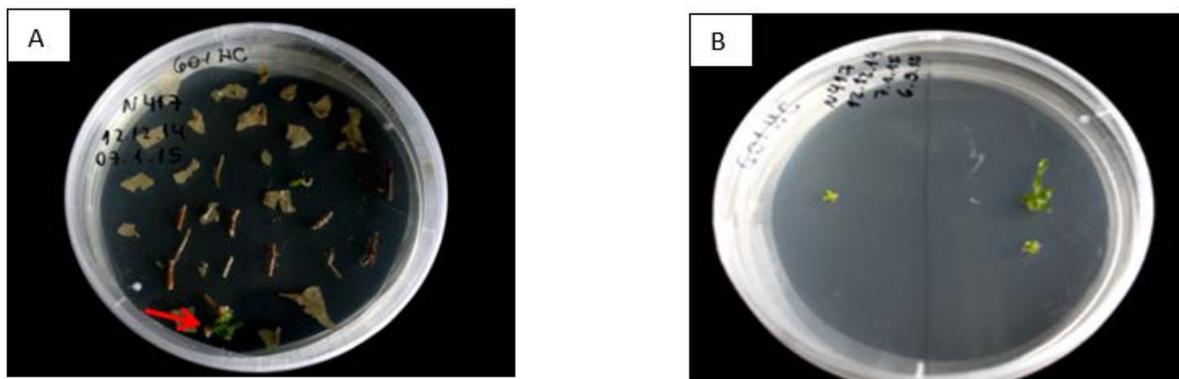


Figura 4.5. a y b Brotes regenerados de *P. tremula* L. luego de la transformación en medio 601<sub>KC</sub>.

Se lograron obtener con éxito 9 líneas transgénicas dobles de *P. tremula* L., que presentaron en simultáneo los genes de floración precoz (HSP::*AtFT*) (Hoenicka *et al.*, 2016) y androesterilidad (PsEND1::*barnase*), a partir de la transformación genética en simultáneo, con dos diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (A113 + A249). Esto permite acelerar notoriamente el tiempo de transformación cuando se quiere incorporar más de un gen de interés a una planta. Es la primera vez que se reportan transformaciones dobles de *P. tremula* L. con los genes HSP::*AtFT* y PsEND1::*barnase* de forma exitosa.

## **Fase 2: Transformaciones genéticas de *P. deltoides* y *P. xeuramericana***

En la siguiente tabla se detallan las transformaciones realizadas con los clones D25 de *P. deltoides*, DN1 y DN5 de *P. xeuramericana*.

Transformac. N°	Agro	Constructos	Selección	Clon
N444	A113 (LB7)	HSP:: Ft	K (50)	D25
N449	A113+A249 (LB7 + LB20)	HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	K (50)	DN1
N450	A113+A249 (LB7 + LB20)	HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	K (50)	DN5
N451	A113+A249 (LB7 + LB20)	HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	K (50)	D25
N452	A113+A249 (LB7 + LB20)	HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	K (50)	D25
N454	A113+A249 (LB7 + LB20)	HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	K (50)	D25
N459	A113+A249 (LB7 + LB20)	HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	K (50)	DN1
N460	A113+A249 (LB7 + LB20)	HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	K (50)	DN5
N461	A113+A249 (LB7 + LB20)	HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	K (50)	D25
N462	A113+A249 (LB7 + LB20)	HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	K (50)	DN5
N465	A113+A249 (LB7 + LB20)	HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	K (50)	DN1
N467	A113+A249 (LB7 + LB20)	HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	K (50)	DN5
N469	A113+A249 (LB7 + LB20)	HSP::FT + pbi101:PsEND::BARNASE	K (50)	DN1

Tabla 4.9 Detalle de las transformaciones con *P. deltoides* y *P. xeuramericana*.

Se llevaron a cabo 13 transformaciones. Una sola transformación simple con la A113 (*FT*) y las 12 restantes fueron transformaciones dobles (*FT + barnase*).

Las placas con los explantos provenientes de las transformaciones N450 y N451 se contaminaron con hongos y todas las placas debieron ser descartadas.

De las restantes 11 transformaciones en buen estado sanitario, se obtuvieron un total de 21 regenerantes (Tab. 4.11).

Línea	<i>Agrobacterium</i>	Constructos	Selección
N449-1	A113	HSP:: Ft	K (50)
N449-2	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N449-3	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N449-5	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N449-6	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N452-1	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N452-2	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N452-3	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N452-4	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N452-5	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N452-6	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N452-7	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N452-8	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N459-1	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N459-3	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N459-5	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N459-6	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N460-1	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N460-4	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N460-6	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)
N460-7	A113+A249	HSP::FT + PsEND::BARNASE	K (50)

Tabla 4.10. Detalle de las líneas regeneradas de las transformaciones con *P. deltooides* y *P. x euramericana*.

### **Cultivo *in vitro* de las líneas transgénicas**

Todas las líneas que regeneraron se separaron de la placa de la transformación y se colocaron en un medio 601 con kanamicina y cefotaxima como agentes selectivos, bajo condiciones de esterilidad y bajo el flujo laminar. Luego de 10-15 días, si no se observaba crecimiento de *Agrobacterium*, se repicaban a un medio 601 solo con kanamicina para continuar con la selección. Por último, luego de confirmar con PCR si la línea era efectivamente transgénica, se repicaron a un medio 601 sin antibiótico.

Se obtuvieron de forma exitosa brotes que enraizaron en el medio 460, de todas las líneas regenerantes transgénicas. Una vez obtenida la planta completa, se procedió el pasaje de estas a invernáculo para su evaluación (Cap. V).

## Extracción de ADN de las líneas regenerantes

De cada una de las líneas regenerantes de las transformaciones genéticas, se extrajo ADN de hojas y brotes *in vitro* y/o de invernáculo con el fin de realizar las PCRs y Southern blots necesarios para confirmar la presencia del constructo de interés y el número de copias en cada una de las líneas positivas.

Se obtuvo la cantidad y calidad de ADN requerida, según Dumolin *et al.*, 1995, para realizar las pruebas necesarias. Los valores obtenidos mediante el uso de Nanodrop se muestran en el ANEXO 4.1.

La amplificación del ADN fue analizada en la electroforesis en gel de agarosa. Los resultados de las PCRs de las líneas regenerantes se muestran en la siguiente tabla (Tab. 4.12). Para cada una de las líneas se evaluó no solo la presencia del gen de interés, sino también la presencia del gen de resistencia, parte también del ADN-T.

Clon	Lineas	FT (1980/1981)	nptII (16/17)
DN1	N449-1	-	-
DN1	N449-2	-	-
DN1	N449-3	+	+
DN1	N449-5	+	+
DN1	N449-6	-	-
D25	N452-1	-	+
D25	N452-2	+	+
D25	N452-3	+	+
D25	N452-4	+	+
D25	N452-5	-	+
D25	N452-6	-	-
D25	N452-7	-	-
D25	N452-8	-	-
DN1	N459-1	+	+
DN1	N459-3	+	+
DN1	N459-5	+	+
DN1	N459-6	+	+
DN5	N460-1	-	-
DN5	N460-4	-	-
DN5	N460-6	-	-
DN5	N460-7	-	-

Tabla 4.11. Resultado de las PCRs con los primers específicos para *FT* y *NPTII*.

Las líneas transgénicas positivas se detallan en la siguiente tabla y se muestran en las figuras 4.5. a.b.c.d:

Clon	Lineas	FT (1980/1981)	nptII (16/17)
DN1	N449-3	+	+
DN1	N449-5	+	+
D25	N452-2	+	+
D25	N452-3	+	+
D25	N452-4	+	+
DN1	N459-1	+	+
DN1	N459-3	+	+
DN1	N459-5	+	+
DN1	N459-6	+	+

Tabla 4.12. Resultados de las PCRs de las líneas de *P. deltoides* e híbridos con resultado positivo.

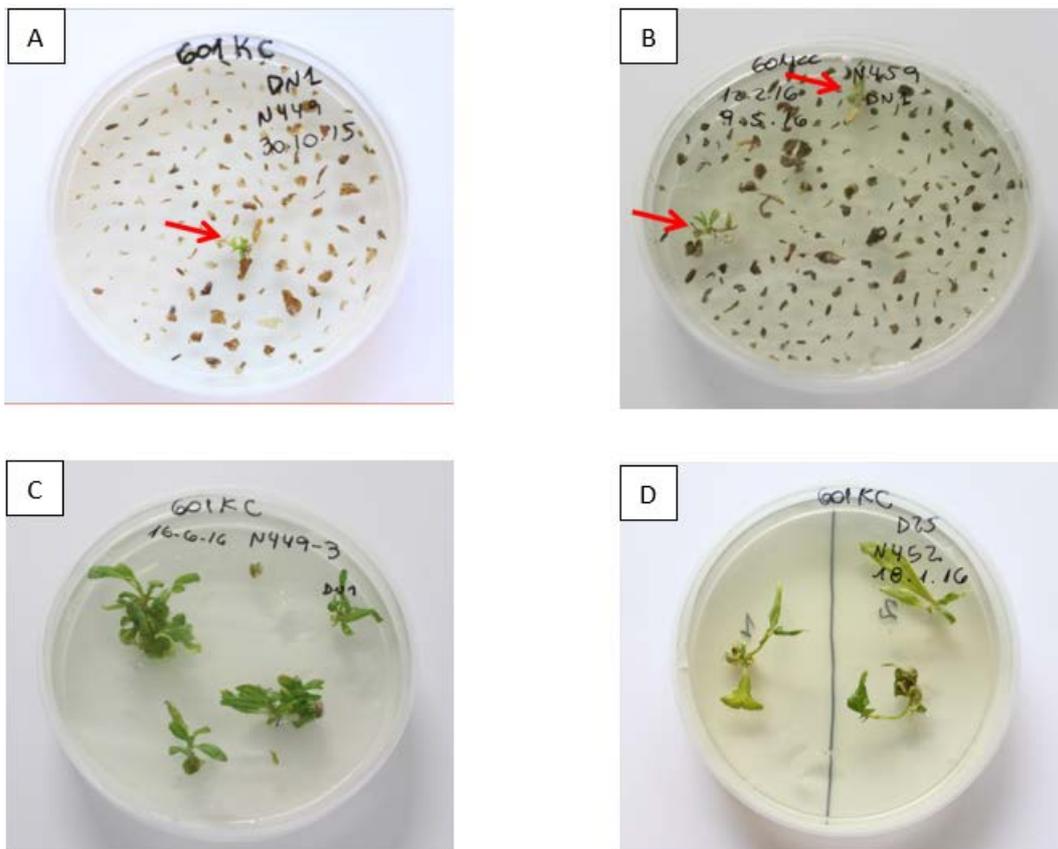


Figura 4.6 a. y b. Placas con los explantos transformados en medio con antibiótico. Se observan pequeños brotes regenerando. c. y d. Regenerantes separados, creciendo en un nuevo medio 601 con kanamicina y cefotaxima.

Se obtuvieron plantas completas de las líneas transgénicas tanto de *P. deltoides* como *P. x euramericana*. Confalonieri *et al.*, (1997) logró obtener regenerantes transgénicos, pero nunca logró regenerar las plantas transgénicas completas de estos clones. **Este es el primer reporte de plantas completas de *P. deltoides* GM regeneradas.**

### **Southern Blot**

Esta técnica molecular fue utilizada para determinar el número de copias del ADN-T de las diferentes líneas transgénicas dobles de *P. tremula* L. y líneas transgénicas de *P. deltoides* y *P. x euramericana*. El principio de esta técnica incluye la electroforesis del ADN en geles de agarosa, la transferencia del ADN a una membrana de nylon, un paso de pre-hibridización, la hibridización con ADN marcado-DIG (este paso es la clave de la técnica), la reacción de quimioluminiscencia (anti-DIG) y la autoradiografía (revelado). Si bien es la técnica más usada para esta función, es una técnica muy engorrosa y no siempre es sencillo obtener resultados (Nature protocols, 2006; Protocol-online).

Se realizaron pruebas de Southern blot para determinar el número de copias del T-ADN dentro cada una de las líneas transgénicas. Se evaluaron las líneas transgénicas dobles de *P. tremula* L., mientras que de *P. deltoides* y *P. x euramericana* solo obtuvimos líneas simples.

A continuación se detalla el procedimiento seguido y sus resultados.

### **Preparación de Sondas**

#### **-Sonda Hsp::*AtFT***

Se utilizó la sonda disponible en el laboratorio del Instituto Thünen, preparada por Denis Lehnhardt, año 2013.

#### **-Sonda para el gen PsEND1::*barnase***

#### Diseño de los primers:

1-

Primer izquierdo: tgcgctaaggcattcagagt

Tamaño: 20 pb      Tm: 59.8 C      GC: 50.0 %

Primer derecho: cggatgcgcaaagaaatgct (compl. rev. AGCATTTCTTTGCGCATCCG)

Tamaño: 20 pb Tm: 60.2 C GC: 50.0 %

Tamaño del producto: 833 pb

La secuencia se detalla en el Anexo 4.2.

2-

Primer izquierdo: atcgtagcaccacaccagtc

Tamaño: 20 pb Tm: 59.8 C GC: 55.0 %

Primer derecho: tgacagttgaaaccgccaca (Compl. rev.GTGGCGGTTTCAACTGTCA)

Tamaño: 20 pb Tm: 60.4 C GC: 50.0 %

Tamaño del producto: 922 pb. Cercano al borde derecho.

La secuencia se detalla en el Anexo 4.3.

A continuación se muestra el resultado de la PCR para los dos pares de primers diseñados (Fig. 4.6)

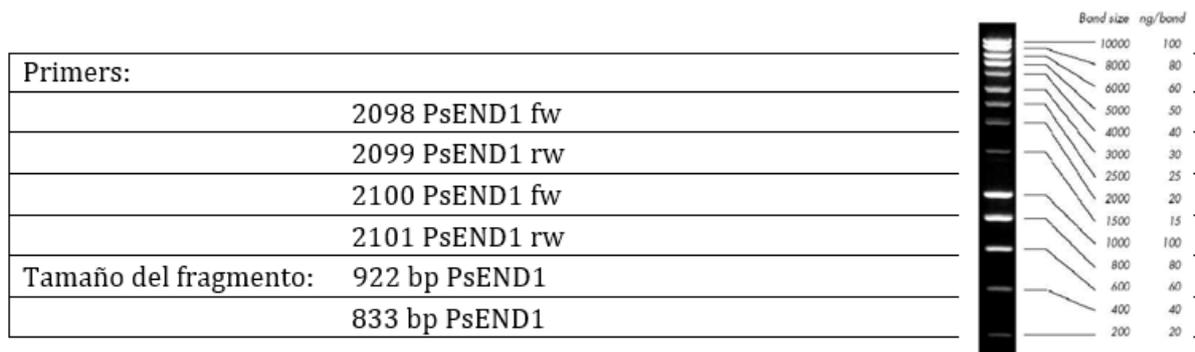


Tabla 4.13. Detalle de los primers utilizados para la PCR de la sonda y tamaños de los fragmentos

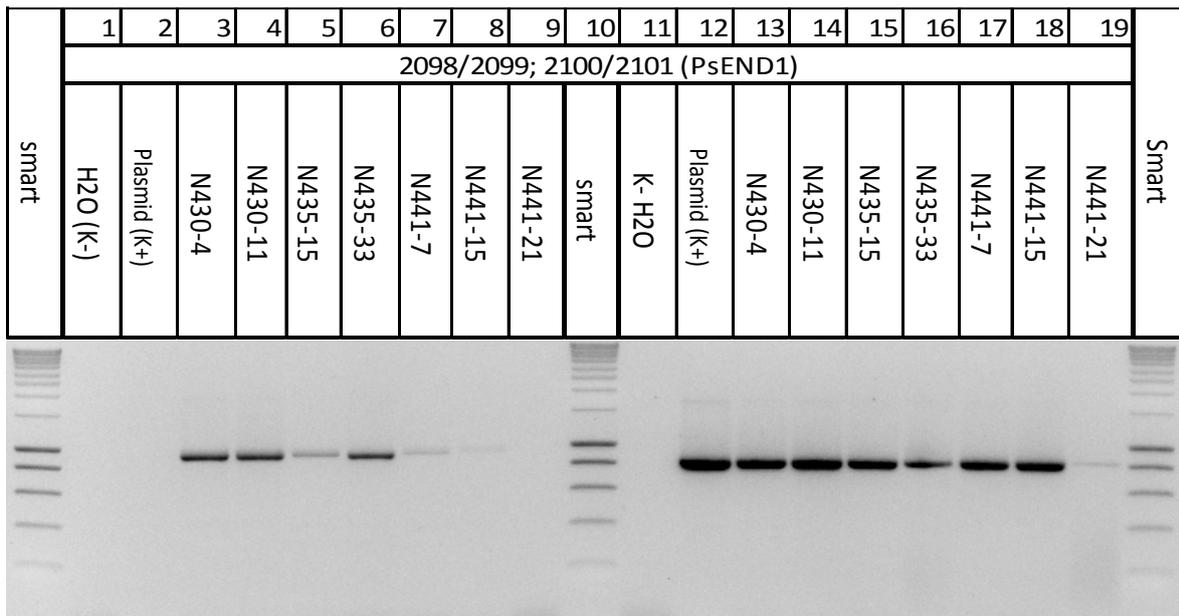


Figura 4.7. Resultados de análisis de PCR para los dos pares de primers diseñados para la sonda PsEND1::*barnase*.

Cómo se muestra en la figura 4.6 ambos pares de primers amplificaron para la región del promotor PsEND1, pero en el caso del par 2098/2099, no se observa la banda esperada en la muestra control positivo, así como tampoco se observa banda en la última muestra, N441-21. En el caso del par de primers 2100/2101, se observan bandas tanto para cada una de las muestras como para el control positivo. Es por ello que se eligió el par de primers número 2100/2101 para sintetizar la sonda.

Se utilizó el KIT “PCR DIG labelling” de Roche para generar la sonda PsEND1. Los resultados se muestran en la siguiente figura (Fig. 4.7)

Primers:	2100 (PsEND1, forward, Tm=59, 8°C)
	2101 (PsEND1, reverse, Tm=60, 2°C)
TA:	56, 2°C
Tamaño del fragmento:	833 bp
ADN-Polymerasa:	Taq.

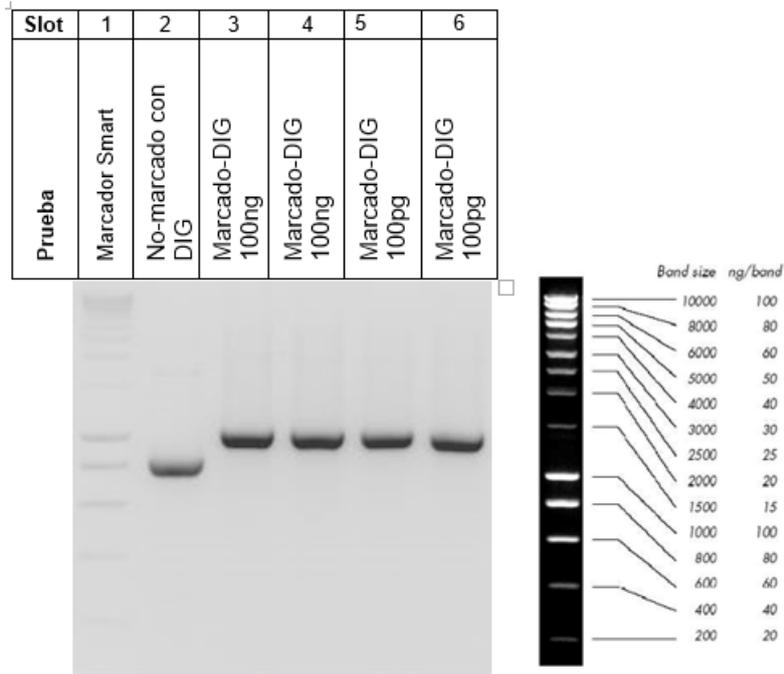


Figura 4.8. Gel de PCR con diferentes concentraciones de ADN marcado con DIG-sonda

Como se observa en la figura 4.7, la sonda se obtuvo de forma exitosa. Se observa la banda esperada en todas las repeticiones del ADN marcado con la sonda.

### Cuantificación de la sonda

La sonda se cuantificó utilizando dos métodos, uno fue midiendo con el Nanodrop (Tab. 4.15) y el otro con un gel de agarosa y comparando las bandas con el marcador (Fig. 4.8). En la Tabla 4.16 se muestran los resultados con ambos métodos

Sample ID	Date	ng/ul	A280	260/280	260/230
END1 DIG 2	13/05/2016	13,13	0,127	2,07	0,03
END1 DIG 3	13/05/2016	10,32	0,119	1,74	0,1
END1 DIG 4	13/05/2016	8,53	0,103	1,65	0,06
END1 DIG 5	13/05/2016	12,88	0,123	2,09	0,09

Tabla 4.14 Cuantificación de la sonda PsEND1 con Nanodrop.

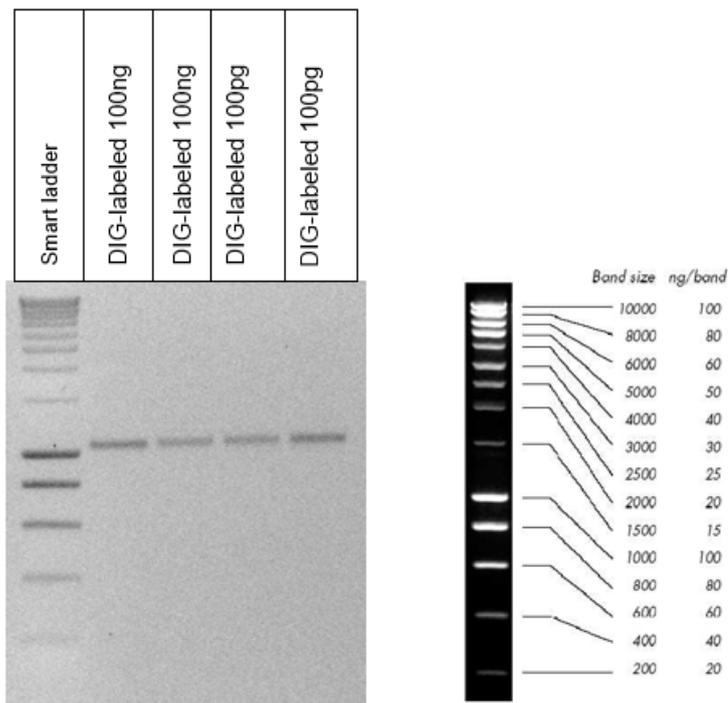


Figura 4.9. Gel de agarosa para calcular la cantidad de sonda en cada banda.

	Gel	Nanodrop	
2- 60 ng/Bande	12 ng/μl	13 ng/μl	
3- 40 ng/Bande	8 ng/μl	10 ng/μl	Sonda lista para usar
4- 40 ng /Bande	8 ng/μl	8 ng/μl	
5- 60 ng/Bande	12 ng/μl	12 ng/μl	

Tabla 4.15 Comparación de los resultados de la cuantificación de la sonda PsEND1 con gel y con el Nanodrop.

Por banda hay 5 μl, por lo tanto es 1/5 de la concentración.

### Resultados Southern blots con sonda HSP::*AtFT*

El resultado del análisis de Southern blot con sonda HSP en las líneas transgénicas de W52, T89, D25, DN1 y DN5, con la enzima de restricción *SacI* se observa en la figura 4.9.

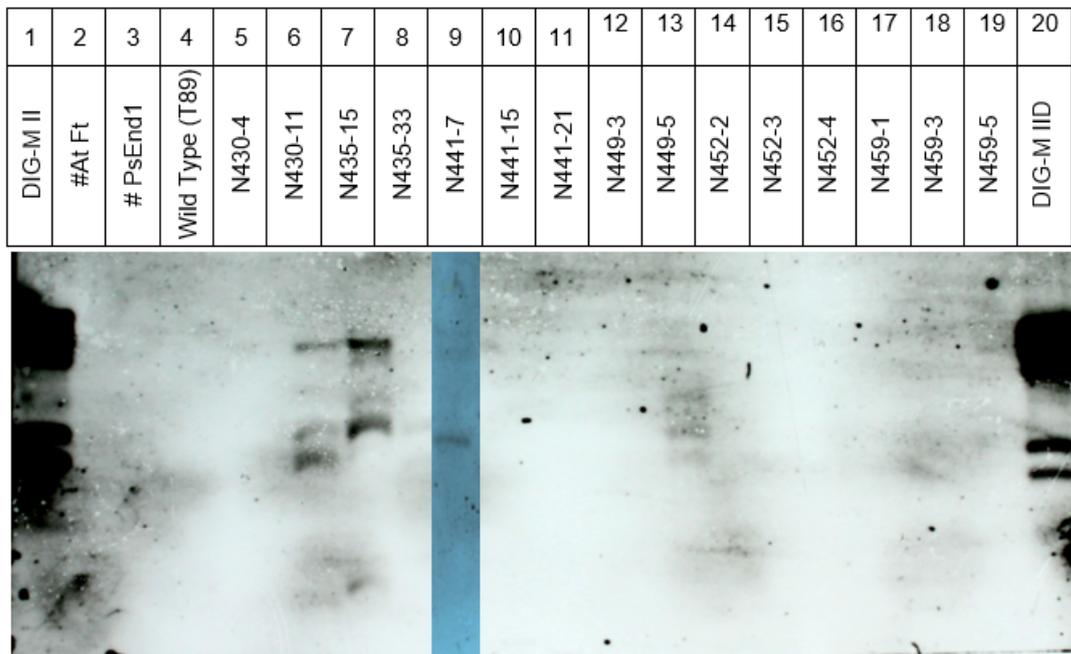


Figura 4.10. Resultado del análisis de Southern blot del ADN de diferentes líneas transgénicas, digerido con la enzima Sac I e hibridizado con sonda HSP.

A raíz del revelado de la película resultado del Southern blot, podemos inferir el número de copias del ADN-T para algunas de las muestras. Podemos ver que las líneas N435-11, N435-15 y N441-7 presentan 3 copias cada una y las líneas N435-33 y N449-5 tienen 2 copias cada una. Para una visualización más clara y completa de los resultados debería repetirse este experimento ya que hay muestras para las cuales no está claro el número de copias o incluso no se observan bandas.

### Resultado del Southern blot con sonda PsEND1

Se realizó el southern blot con la sonda PsEND1, con las líneas transgénicas dobles de *P. tremula L* digeridas con la enzima SacI. En la figura 4.10 se muestra el revelado del film resultado de esta técnica.

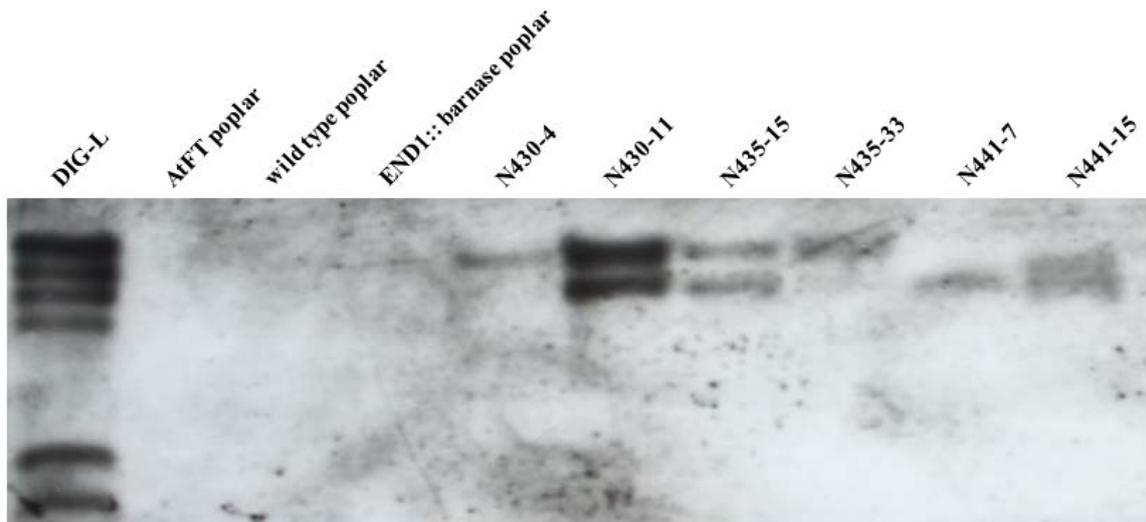


Figura 4.11. Resultado del análisis de Southern blot del ADN de diferentes líneas transgénicas, digerido con la enzima Sac I e hibridizado con sonda END1.

En base a los resultados revelados en la película de este Southern blot, podemos inferir el número de copias del gen *barnase* para las muestras descritas. Las líneas N430-4 y N441-7 presentan una sola copia del gen; la línea N430-11 presenta dos copias al igual que las líneas N435-15, N435-33 y N441-15. El resultado no es claro para la línea N441-21, donde no se logra visualizar ninguna banda.

## **Análisis de expresión del gen *barnase***

### **Extracción de ARN**

Se llevó a cabo la extracción de ARN de las líneas transgénicas dobles N430-4, N430-11, N435-15, N441-15 y N441-21 de *P. tremula* L., para luego medir la expresión de los genes incorporados en los diferentes tejidos de las líneas. En la siguiente tabla (4.17) se detallan los valores de la extracción por línea y por tejido, medido con el Nanodrop.

Número	Línea	Tejido	ng/ul	260/280	260/230
1)	N435-15	Flor	441,86	2,07	2,03
2)	N435-15	Flor	431,61	2,07	2,09
3)	N435-15	Flor	900,9	2,19	2,32
4)	N435-15	Flor	495,11	2,16	2,28
5)	N435-15	Flor	356,4	2,14	2,36
6)	N435-15	Flor	405,52	2,13	2,34
7)	N430-4	Flor	349,65	2,06	1,92
8)	N430-4	Flor	326,27	2,14	2,35
9)	N441-15	Flor	173,42	2,17	2,37
10)	N435-15	Tallo	263,17	2,07	1,86
11)	N435-15	Tallo	124,16	2,17	2,38
12)	N435-15	Hoja	272,59	2,08	1,97
13)	N435-15	Hoja	429,03	2,12	2,34
14)	N435-15	Hoja	327,92	2,16	2,37
15)	N430-4	Hoja	244,46	2,11	2,18
16)	N430-4	Hoja	123,61	2,2	2,32
17)	N430-4	Hoja	245,42	2,17	2,32
18)	N441-21	Hoja	303,26	2,08	1,89
19)	N441-21	Hoja	268,26	2,17	2,38
20)	N441-21	Hoja	235,16	2,16	2,32
21)	N430-4	Raíz	277,02	2,12	2,01
22)	N430-4	Raíz	234,79	2,17	2,33
23)	N430-4	Raíz	183,93	2,19	2,35
24)	N435-15	Raíz	287,91	2,09	2
25)	N435-15	Raíz	180,58	2,19	2,33
26)	N435-15	Raíz	205,2	2,18	2,31
27)	N430-11	Flor	475,25	2,07	2
28)	N430-11	Flor	365,79	2,15	2,31
29)	N441-21	Flor	271,06	2,17	2,35
30)	N435-15	Flor	90,76	2,1	1,39
31)	N435-15	Hoja	185,03	2,11	1,79
32)	N435-15	Hoja	220,33	2,13	1,84
33)	N435-15	Tallo	244,03	2,04	1,45
34)	N435-15	Tallo	107,1	1,83	0,92
35)	N435-15	Raíz	77,77	2,05	1,27
36)	N430-11	Flor	31,03	2,15	1,19
37)	N430-11	Hoja	43,68	2,08	0,94
38)	N430-11	Hoja	111,04	2,09	1,5
39)	N430-11	Tallo	169,6	2,06	1,41
40)	N430-11	Tallo	227,05	2,02	1,44
41)	N430-11	Raíz	80,73	1,99	1,3
42)	N441-15	Flor	95,85	2,08	1,44
43)	N441-15	Hoja	133,3	2,15	1,5
44)	N441-15	Hoja	152,61	2,1	1,67

45)	N441-15	Tallo	78,61	2,05	1,2
46)	N441-15	Tallo	77,05	2,12	1,1
47)	N441-15	Raíz	70,47	2,03	1,23
48)	N441-21	Flor	143,5	2,11	1,6
48)	N441-21	Hoja	96,86	2,03	1,59
50)	N441-21	Hoja	104,66	2,13	1,5
51)	N441-21	Tallo	61,39	2,08	1,05
52)	N441-21	Tallo	307,38	2,05	1,65
53)	N441-21	Raíz	87,07	1,96	1,29

Tabla 4.16. Valores de ARN medidos con Nanodrop, para cada línea doble en los diferentes tejidos.

En la tabla 4.17 se observa una concentración heterogénea de ARN de los diferentes tejidos de las distintas líneas. Se observa que los valores de calidad (260/280 y 260/230) son en su mayoría cercanos a 2, valor considerado como “puro” en el ARN medido con Nanodrop (<http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>).

#### **RT-PCR cuantitativa en tiempo real (Q-RT-PCR)**

La RT-PCR es una de las técnicas experimentales más sensibles para detectar y cuantificar el ARNm en tejidos. Esto hace que sea uno de los métodos más robustos y comúnmente usados para verificar la expresión de genes.

De todos los ARN extraídos se seleccionaron algunas pruebas, las de mayor cantidad de ARN, de cada línea y tejido para la realización de la RT-PCR. . Las muestras de ARN se digirieron con ADNasas como se muestra en la Tabla 4.19. Las muestras de ARN con un valor de RIN de 7,0 o superior (Tabla 4.18) se utilizaron para la síntesis de cDNA y análisis de la expresión posterior (Udvardi *et al.*, 2008)

Aslamiento de ARN	RNA#	Tejido	Conc. (ng/µL)	Volumen (µl)	Volumen (µl)	ARN (µL)	ng ARN(<10 µg) en 12,5 µl	ng ARN (<10µg) en 25 µl	ng RNA (<10µg) in 50µl	10X buffer (µl)	Agua (µl)	Turbo DNase (1+1µl) (30 + 30 min)	Volumen (µl)	Reactivo de inactivación 0,2 Vol. (µl)	Volumen final (µl)	Conc. Final prevista (ng/µl)	RIN	Conc. (ng/µl)
NA35-15	2	Flor	431,61	20	18	10,08	4350,00	8700	2,5	10,42	2	25	5	30	145,00	9,7	119	
NA35-15	3	Flor	900,9	15	13	4,83	4350,00	8700	2,5	15,67	2	25	5	30	145,00	9,6	126	
NA35-15	10	Tallo	263,17	20	18	16,83	4350,00	8700	2,5	3,97	2	25	5	30	145,00	8,8	129	
NA35-15	24	Raiz	287,91	20	18	15,11	4350,00	8700	2,5	5,39	2	25	5	30	145,00	9	116	
NA35-15	12	Hoja	272,59	20	18	15,96	4350,00	8700	2,5	4,54	2	25	5	30	145,00	8,1	128	
NA35-15	13	Hoja	429,03	15	13	10,14	4350,00	8700	2,5	10,36	2	25	5	30	145,00	7,5	163	
NA30-4	7	Flor	349,65	20	18	12,44	4350,00	8700	2,5	8,06	2	25	5	30	145,00	8,5	116	
NA30-4	15	Hoja	244,46	20	18	9,90	2175,00	8700	1,25	0,35	2	12,5	2,5	15	145,00	8,1	141	
NA30-4	21	Raiz	277,02	20	18	15,70	4350,00	8700	2,5	4,80	2	25	5	30	145,00	9,7	151	
NA41-21	18	Hoja	303,26	20	18	14,34	4350,00	8700	2,5	6,16	2	25	5	30	145,00	10	162	
NA41-21	29	Flor	271,06	15	13	16,05	4350,00	8700	2,5	4,45	2	25	5	30	145,00	9,7	129	
NA41-21	52	Tallo	307,38	15	13	7,08	2175,00	8700	1,25	2,17	2	12,5	2,5	15	145,00	8,8	124	
NA30-11	27	Flor	475,25	20	18	9,15	4350,00	8700	2,5	11,35	2	25	5	30	145,00	8,6	114	
NA30-11	28	Flor	365,79	15	13	11,89	4350,00	8700	2,5	8,61	2	25	5	30	145,00	8,1	99	
NA30-11	40	Tallo	227,05	15	13	9,58	2175,00	8700	1,25	-0,83	2	12,5	2,5	15	145,00	7,9	112	

Tabla 4.1.7. Resultados de la digestión del ARN con ADNasas. Valores de RIN y concentraciones finales

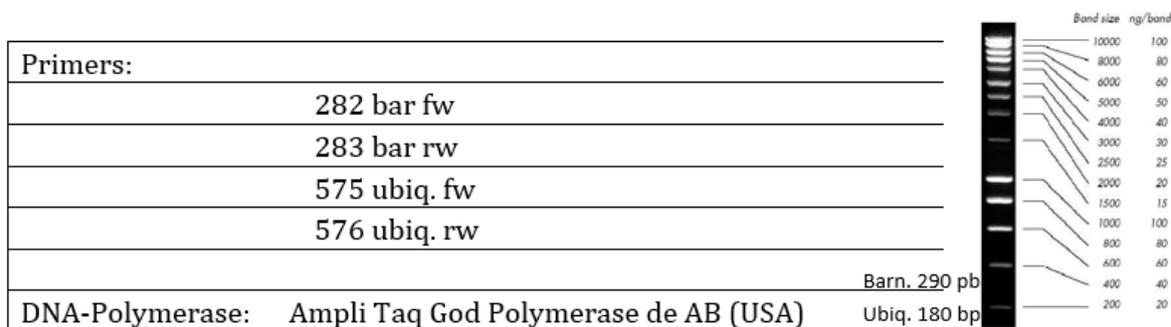
Los detalles de la síntesis del ADNc se muestran en la siguiente tabla (Tab. 4.19)

ARNA#	Tejido	cDNA µg ARN	ARN (µL)	Vilo-Enzym(µl)	Vilo-bufer (µl)	Agua (µl)	total prueba
2	Flor	1,3	10,9	2	4	3,1	20
3	Flor	1,3	10,3	2	4	3,7	20
10	Tallo	1,3	10,1	2	4	3,9	20
24	Raiz	1,3	11,2	2	4	2,8	20
12	Hoja	1,3	10,2	2	4	3,8	20
13	Hoja	1,3	8,0	2	4	6,0	20
7	Flor	1,3	11,2	2	4	2,8	20
15	Hoja	1,3	9,2	2	4	4,8	20
21	Raiz	1,3	8,6	2	4	5,4	20
18	Hoja	1,3	8,0	2	4	6,0	20
29	Flor	1,3	10,1	2	4	3,9	20
52	Tallo	1,3	10,5	2	4	3,5	20
27	Flor	1,3	11,4	2	4	2,6	20
28	Flor	1,3	13,1	2	4	0,9	20
40	Tallo	<b>1,3</b>	<b>11,6</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2,4</b>	<b>20</b>

Tabla 4.18. Detalle de la síntesis del ADNc de las pruebas de ARN.

Se sintetizó con éxito el ADNc para cada una de las pruebas de ARN, utilizando los kits descritos en el Cap. III y como se muestra en la tabla 4.18.

Con el ADNc listo se procedió a la realización de la RT-PCR utilizando la Ubiquitina como gen de referencia, con sus primers específicos (512/513) (Figura 4.11). Para el gen *barnase* se utilizaron los primers 282/283 y en la siguiente figura se muestran los resultados del gel de agarosa de la PCR (Figura 4.12).



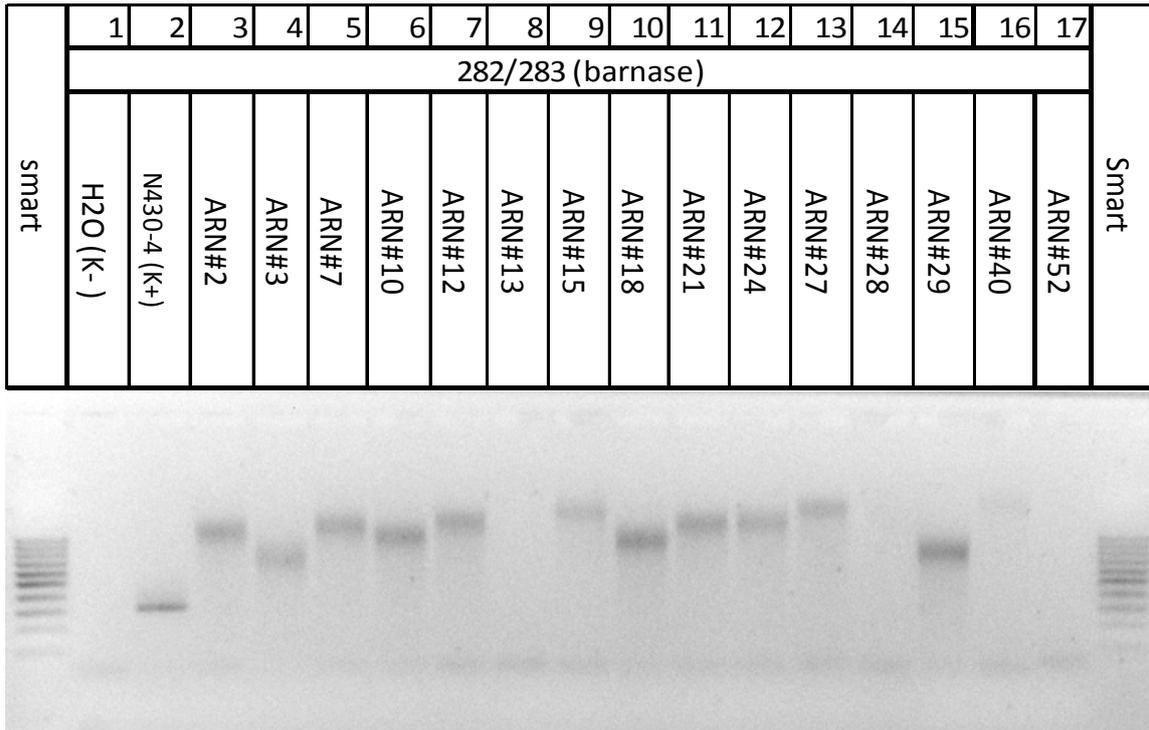


Figura 4.12. Gel resultado de la RT-PCR con los primers específicos para el gen *barnase*.

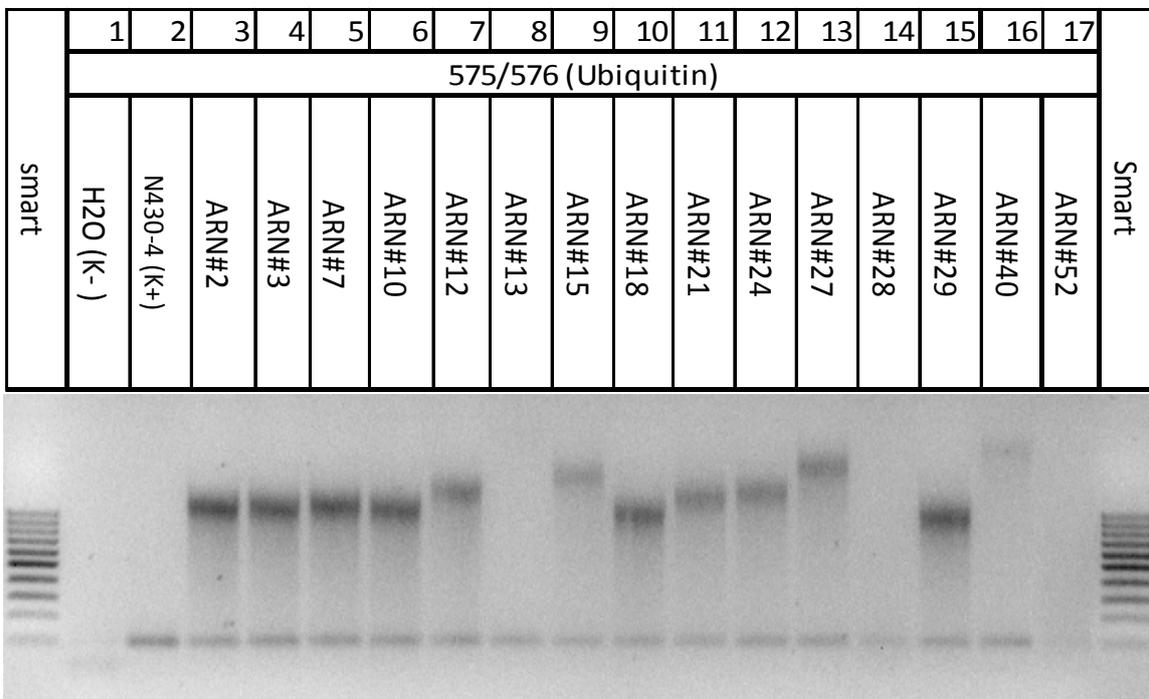


Figura 4.13. Gel de agarosa resultado de la RT-PCR con los primers específicos para el gen de referencia Ubiquitina.

Según los resultados obtenidos en el gel de agarosa para el gen *barnase*, se ha detectado una serie de bandas inespecíficas en las diferentes pruebas, que no corresponden al tamaño de la banda esperada para el gen *barnase*. En el caso del gen de referencia, se observa la banda esperada para este gen, en todas las pruebas y además se observan también algunas bandas inespecíficas. De acuerdo con estos resultados se hace necesario repetir la prueba, aumentando el número de muestras, y en diferentes momentos del año, como se ha reportado para los análisis de expresión del gen *AtFT* en álamo (Hoenicka *et al.*, 2016), donde ha sido muy difícil detectar la expresión del mencionado gen, necesitándose un gran número de flores y repeticiones para finalmente detectar la expresión. En general el RNA se degrada rápido, lo mismo sucede con el ARNm. La expresión de un gen puede suceder en un lapso de tiempo muy corto, por lo que puede ser difícil detectar su ARNm. La corta "vida" de un ARNm es necesaria para que la expresión de los genes sea muy puntual y desaparezca rápidamente cuando este gen ya no sea requerido. El ARNm puede expresarse en determinada época del año o bajo determinadas condiciones particulares. También podría ser que el promotor de *Arabidopsis* utilizado (END1) no funcione muy bien en el álamo, como ha ocurrido con otros promotores que han funcionado correctamente en otras especies pero no en álamos (Hoenicka *et al.*, 2012). Este tema requiere mayor estudio para ser esclarecido, por lo que se continúan los experimentos. Como las proteínas son más estables, una opción viable puede ser la utilización de anticuerpos monoclonales para detectar la proteína barnase.

En este trabajo se ha reportado la producción de líneas de álamos genéticamente modificados (*Populus tremula* L. y *Populus tremula x tremuloides*) que contienen dos construcciones genéticas: HSP::*AtFT* para inducción de floración temprana y PsEND1::*BARNASE-BARSTAR* para contención genética y álamos (*P. deltoides* y *P. x euroamericana*) con la construcción HSP::*AtFT* para inducción de floración temprana. La construcción HSP::*AtFT* combina un sistema confiable de inducción de flores con un crecimiento vegetativo normal (Hoenicka *et al.* 2016). La mitigación del flujo genético sexual, proporcionada por la construcción PsEND1::*BARNASE-BARSTAR* en *Populus tremula* podría permitir la producción de propágulos reproductivos fértiles y prevenir

o reducir el flujo de genes a través de la reproducción sexual, ofreciendo así alternativas de liberación más seguras y necesarias.

Este es el primer reporte sobre el uso de la construcción PsEND1::*BARNASE-BARSTAR* en especies de plantas leñosas. La combinación de tratamientos de choque térmico y enfriamiento permite la formación de flores fértiles masculinas en álamos transgénicos HSP::*AtFT*, independientemente de la temporada (Hoenicka et al. 2016). Este sistema es eficiente incluso en plantas muy jóvenes (4-6 meses), con un período muy corto considerando la larga fase vegetativa del álamo (7-12 años).

Las plantas transgénicas HSP::*AtFT* / PsEND1::*BARNASE-BARSTAR* presentaron un crecimiento vegetativo normal, en comparación con las plantas WT cultivadas *in vitro* y en invernadero. Klocko et al. (2016) informaron sobre la esterilidad masculina diseñada en árboles de pino, álamo y eucalipto cultivados en condiciones de campo mediante la expresión del gen *BARNASE* en las células tapetes de anteras. Sin embargo, los árboles transgénicos informaron que conservaron el desarrollo vegetativo normal. En nuestro enfoque combinado, el gen *BARNASE* se fusionó con el gen *barstar*, un inhibidor de la actividad barnase, con una secuencia no codificante entre ambos genes. Barnase es una ribonucleasa muy activa y la inclusión de la construcción del gen *barstar* evitará la expresión ectópica de barnase y los efectos indeseables en la regeneración y el desarrollo de las plantas transgénicas generadas. Las transformaciones genéticas se corroboraron mediante PCR con primers específicos y con análisis de Southern Blot. La expresión del gen *BARNASE* se verificó en las flores transgénicas HSP::*AtFT* / PsEND1::*BARNASE-BARSTAR* mediante análisis RT-PCR, lo que corrobora la utilidad de esta combinación transgénica en la contención de genes. Las líneas transgénicas de floración temprana son una herramienta eficiente y confiable para la investigación de la contención de genes en el álamo. La creciente disponibilidad de recursos genómicos y transcriptómicos para los árboles forestales que generan conocimiento de los procesos reproductivos y los genes candidatos para la modificación, combinados con la precisión de la mutagénesis dirigida basada en la edición de genes CRISPR-Cas9, sugieren que se lograrán innovaciones genéticas nuevas y más potentes en el campo de la ingeniería de la esterilidad de en el futuro cercano, al ofrecer modificaciones precisas y predecibles combinadas con estabilidad fenotípica.

**Capítulo V: Evaluación de las líneas transgénicas en invernáculo y cámaras climáticas.**

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Crecimiento de las plantas transgénicas en invernáculo

Una vez que se logró la introducción del gen de interés en la planta, se evaluó su función y estabilidad en el invernáculo. Según Vicien (2011), hay tres categorías en el desarrollo de plantas transgénicas:

- Trabajo contenido en laboratorios o invernáculos (dentro de una estructura física) aislados del ambiente
- Introducción limitada al ambiente bajo condiciones de confinamiento biológico (condiciones de aislamiento reproductivo) diseñados para prevenir cualquier impacto adverso en el ambiente.
- Liberación sin confinamiento en el ambiente, con frecuencia sin ningún requerimiento para segregación o minimización de la dispersión o persistencia en el ambiente.

En los dos primeros casos, el riesgo es minimizado a través de la imposición de medidas de manejo de riesgo estrictas (guías de contención, términos y condiciones para la autorización de ensayos a campo). Previo al estado de liberación no confinada, se requiere de una evaluación de riesgos rigurosa. En esta tesis se realizó una evaluación de las plantas en forma contenida en invernáculos. Los ensayos a campo no son posibles de realizar en Alemania, y se están diligenciando acciones para diseñar ensayos a campo de las plantas obtenidas en instalaciones de la FCyF-UNLP-Argentina.

Las plantas transformadas pasaron entre 3 y 5 meses en invernáculo, hasta superar la altura de 30cm y poder ser trasladadas a las cámaras de crecimiento para comenzar con el tratamiento de calor, inductor de la floración.

Para el cultivo de álamos en invernadero se tuvieron en cuenta diferentes parámetros que podrían afectar de forma individual el crecimiento de las plantas. Se consideraron

la ubicación del envase y la planta en el invernadero, en relación a la cantidad de luz que recibieron y la ubicación de las plantas en una bandeja de crecimiento.

La mayor influencia en el crecimiento de los álamos fue probablemente la ubicación en el invernadero. Plantas contenidas en las mismas bandejas, pero en distintas posiciones dentro de esta, recibieron diferentes cantidades de luz. Las fluctuaciones del sombreado contribuyeron principalmente en el extremo sur de los invernaderos, ya que la luz de la claraboya no llegó directamente a las plantas.

La influencia de la intensidad de la luz se trató de mantener baja, cultivando los álamos siempre juntos, en grupos. De todos modos, a cada planta pudo haberle llegado diferente intensidad de luz. La ubicación de la planta dentro de las bandejas también tuvo un impacto en el suministro de riego y nutrientes. La mayoría de las plantas en el borde posiblemente accedieron a más agua y fertilizante que los álamos ubicados en el medio de la cama de cría.

La infección con alguna de las plagas de invernáculo anteriormente detalladas (cap. III) en las plántulas pequeñas, recién salidas de *in vitro*, ha tenido un fuerte impacto en el crecimiento.

En la siguiente tabla (Tab.5.1) se detallan la cantidad de plantas, de cada una de las líneas transgénicas dobles, que fueron pasadas a invernáculo, luego de su cultivo *in vitro*. Las líneas T89 y W52 son los controles "wild type" (sin transformar) de *Populus tremula* L., mientras que la línea T193-2 es un control positivo, de esta misma especie, que contiene sólo el gen de promoción de la floración (constructo HSP::*AtFT*).

Línea	Nº de plantas
N430-4	26
N430-11	28
N435-15	22
N435-33	35
N441-7	10
N441-15	30
N441-21	29
W52	20
T89	20
T193-2	12

Tab. 5.1. Cantidad de plantas por línea llevadas a invernáculo.

En las Figuras 5.1 a, b y c se muestran las plantas en el invernáculo.



Figura 5.1. a. b y c. Crecimiento de las líneas transgénicas dobles y las plantas control en invernáculo

## Inducción de la floración precoz en *Populus* -HSP::*AtFT* positivos

Las transformaciones genéticas para la inducción de la floración precoz como se dijo anteriormente, se llevaron a cabo con el promotor HSP y el gen de floración *FT*. Este sistema de floración precoz ha mostrado buenos resultados en álamos (Hoenicka *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2010). Es por ello que para inducir el promotor, los álamos HSP::*AtFT* fueron sometidos a un tratamiento con calor “heat shock” (40°C durante 90 min/día), en cámaras climáticas (Hoenicka *et al.*, 2016). Todas las plantas que igualaron o superaron una altura de 30cm y que se encontraban sanas en el invernadero fueron sometidas a este tratamiento, para la inducción de la floración.

08-04-16 tratamiento con calor H1/16	
N430-4	26
N435-15	22
W52	3
T193-2	12

31-05-16 tratamiento con calor H2/16	
T89	4
W52	1
N430-11	3
N435-33	6
N441-15	1
N441-21	2

22-06-16 tratamiento con calor H3/16	
N435-33	6
N430-11	3
N441-15	2
N441-21	5

En total, en diferentes fechas, se sometieron al tratamiento con calor 26 plantas de la línea N430-4; 4 plantas de N430-11; 22 plantas de N435-15; 12 plantas de N435-33; 3 plantas de N441-15 y 7 plantas de N441-21; de los controles *AtFT* positivas se sometieron a calor 12 plantas de la línea T193-2 y de los controles sin transformar, 4 plantas de W52 y 4 plantas de T89.

El tratamiento con calor se llevó a cabo durante 4-6 semanas, ya que se ha reportado que un estrés por calor prolongado promueve la esterilidad en varias especies (De Storme and Geelen, 2013; Jain *et al.*, 2010; Sakata *et al.*, 2010; Endo *et al.*, 2009). Esto fue necesario para inducir la expresión del gen HSP::*AtFT* en las plantas transgénicas, con tan solo 4-5 meses en el invernáculo.

La expresión del gen *FT* regulada por el promotor inducible con calor, permitió una inducción de la floración y un normal fenotipo de las plantas en invernáculo, a diferencia de lo ocurrido en *Populus* cuando se utiliza este promotor con el gen *LFY*, dónde se visualiza un desarrollo vegetativo perturbado de las plantas (Hoenicka *et al.*, 2012). La temperatura juega un papel importante para el desarrollo de las flores fértiles. Luego del tratamiento con calor, se obtuvieron flores tanto en las plantas control-HSP::*AtFT*, cómo en las líneas con doble transformación (HSP::*AtFt* y PsEND1::*barnase*). Por el contrario, como era de esperar, los controles negativos (plantas sin transformar), no presentaron floración alguna.

Sólo una de las plantas de la línea N430-4, de 26 totales, floreció. El resto de las plantas se dejaron dos semanas más en el tratamiento con calor y luego se regresaron al invernáculo para poder repetir el ensayo en la primavera del año siguiente.

En la Figuras 5.2 a.b se se observan a las plantas de álamo en invernáculo que se sometieron a calor y las líneas con floración.

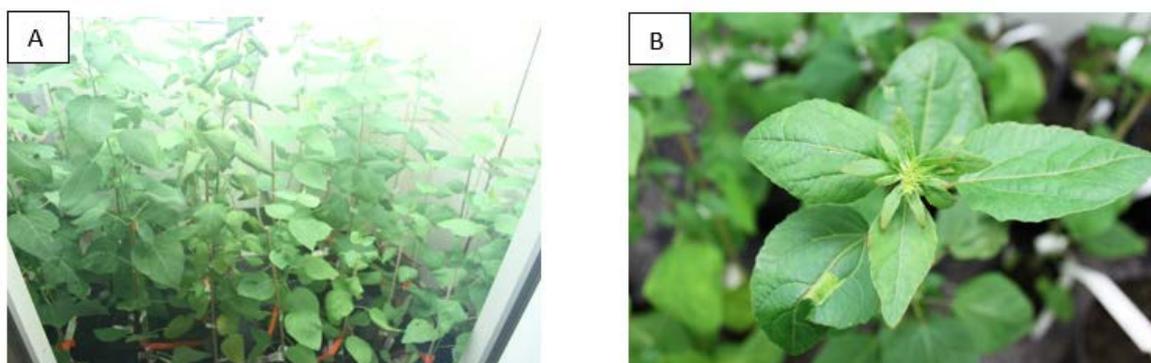


Figura 5.2.a.b. Plantas en cámara climática. Tratamiento con calor. b. Floración línea N435-15

Las plantas transformadas conservaron el fenotipo de la especie. En el aspecto morfológico no se visualizaron anomalías de las plantas transgénicas comparadas con las plantas control (W52 y T89) (Figura 5.3.a.b). Tampoco se observaron diferencias en el crecimiento. (Figura 5.4.a.b).

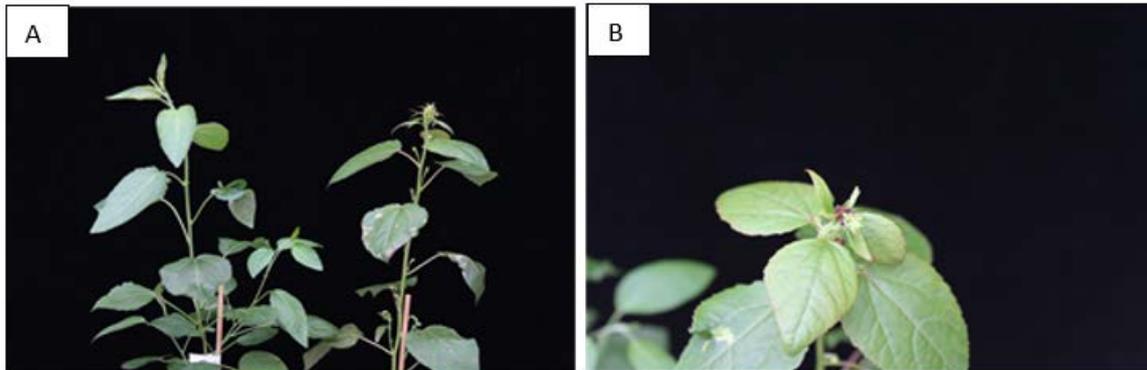


Figura 5.3.a Planta control (izq.) Planta transgénica (der.) b. Floración de la línea N430-11



Figura 5.4.a. Morfología normal de plantas transgénicas en invernáculo. b. Floración de la línea N441-21

### **Desarrollo de polen viable: tratamiento con bajas temperaturas**

Luego del tratamiento con calor, una vez obtenida la floración precoz, se aplicó el tratamiento de bajas temperaturas ( $11^{\circ}/7^{\circ}$  -día/noche), durante unas 4 semanas, con el fin de obtener un desarrollo normal de los granos de polen (Hoenicka *et al.*, 2016). El calor no es la causa fundamental de la alta esterilidad de los álamos con floración

precoz. Se ha demostrado que las bajas temperaturas son el factor clave para el desarrollo de las flores fértiles en los álamos con floración precoz (Hoenicka *et al.*, 2016).

La presencia de los granos de polen permitieron la rápida identificación de las posibles flores fértiles en los álamos control-HSP::*AtFT*, confirmando que el tratamiento fue efectivo para la formación de polen vital en el caso de éstas líneas.

Se sometieron a este tratamiento 1 planta de la línea N430-11; 20 plantas de la línea N435.15; 2 plantas de la línea N430-11, 6 plantas de la línea N441-21 y 2 plantas de N441-15. Estas líneas transgénicas dobles, portadoras del gen de androesterilidad, no presentaron polen cuando se las observó con lupa, luego del tratamiento de bajas temperaturas. Presentaron escaso a nulo polen, con un desarrollo morfológico anormal de las anteras que se visualizaron y fotografiaron también bajo lupa. En la figura 5.5 se muestra a las plantas tratadas con baja temperatura y el desarrollo anormal de las anteras.

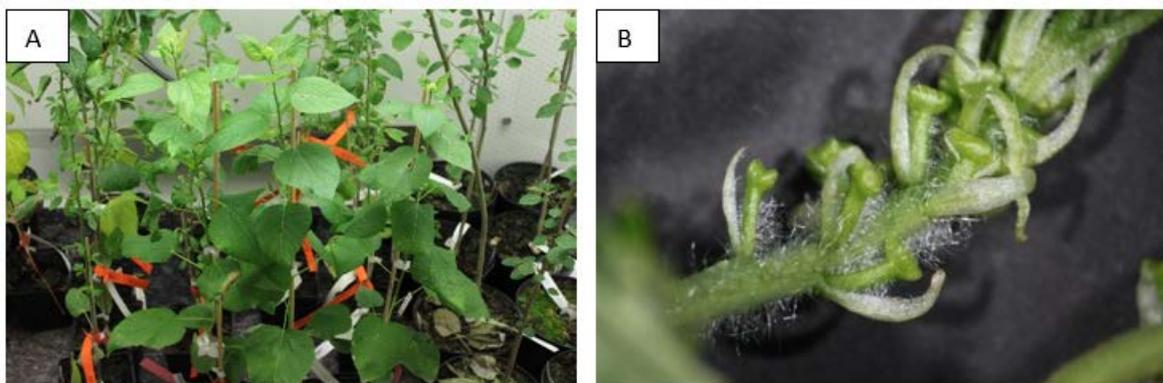


Figura 5.5. a. b. Plantas en cámaras climáticas en el tratamiento de bajas temperaturas.

#### **Recuento de flores y presencia de polen en las líneas Ft positivas (controles)**

En la tabla 5.2 se muestran los resultados del recuento de flores y presencia de polen en las líneas *FT* positivas (controles)

N° planta	fecha (edad)	Calor (Fecha)	Frío (Fecha)	Altura (m)	flores totales	flores desarrolladas		flores no desarrolladas
						con polen	sin polen	
22508	06/03/2015	08/04/2016	29/04/2014	2,4	30	23	0	7
22506	06/03/2015	08/04/2016	29/04/2014	2	28	23	0	5
22505	06/03/2015	08/04/2016	29/04/2014	2,43	41	31	0	10
22499	06/03/2015	08/04/2016	29/04/2014	2,14	31	29	1	1
22507	06/03/2015	08/04/2016	29/04/2014	2,35	29	26	1	2
22504	06/03/2015	08/04/2016	29/04/2014	1,7	27	26	0	1
22502	06/03/2015	08/04/2016	29/04/2014	2,2	27	18	0	9
22509	06/03/2015	08/04/2016	29/04/2014	2	19	17	0	2
22501	06/03/2015	08/04/2016	29/04/2014	2,38	33	31	0	2
22503	06/03/2015	08/04/2016	29/04/2014	2,34	30	25	0	5
22500	06/03/2015	08/04/2016	29/04/2014	1,67	33	31	1	1
22510	06/03/2015	08/04/2016	29/04/2014	1,75	29	27	0	2

Tabla 5.2 Recuento de flores de las plantas control-*AtFT*

En la línea control T193-2-HSP::*AtFT* se visualizó un normal y abundante desarrollo de flores y polen. Las anteras presentaron tamaño y forma normales, y, en algunos casos, el polen podía observarse a simple vista o con una lupa de mano. (Figura 5.6.a y b)

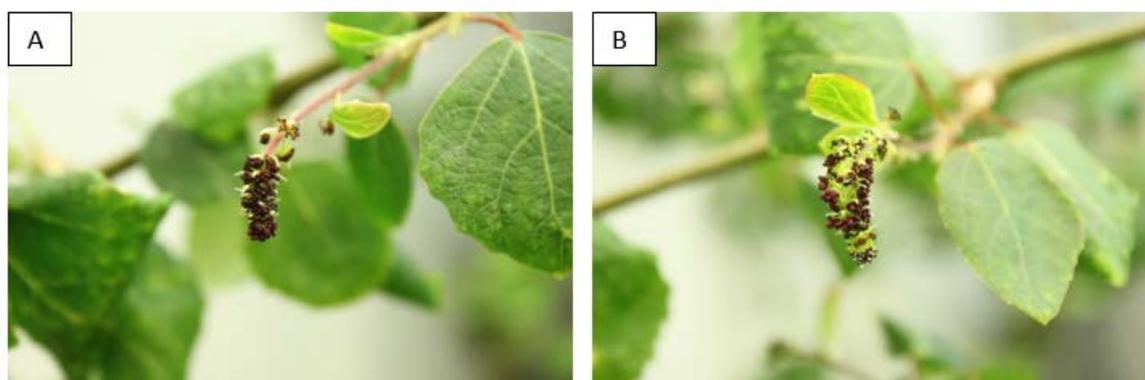


Figura 5.6.a.b Flores de las líneas T193-2 control-*AtFT* en las cámaras de clima en el tratamiento de frío.

### Evaluación de vitalidad y recuento de polen

Se evaluaron las líneas que contenían flores maduras y desarrolladas (N435-15; N430-11 y N441-21). En las tablas 5.3, 5.4, 5.5 y 5.6 se muestran los resultados de la evaluación de vitalidad y recuento de polen. La evaluación se realizó mediante las pruebas FDA, con el uso de microscopio electrónico.

Tabla 5.3: Evaluación de vitalidad y recuento de polen en plantas **control-6\*AtFT**

fecha	Antera#	polen vital	polen no vital	nada	Pollen Total	Pollen/Anthere
23/06/2016	1	6	2		8	160
23/06/2016	2	9	2		11	220
23/06/2016	3	11			11	220
23/06/2016	4	16	6		22	440
23/06/2016	5	14	4		18	360
23/06/2016	6	19	4		23	460
23/06/2016	7	8	3		11	220
23/06/2016	8	3	1	1	4	80
12/07/2016	9	11	3	2	14	280
12/07/2016	10	15	1		16	320
12/07/2016	11	16	1		17	340
12/07/2016	12	9		1	9	180
12/07/2016	13	8	2		10	200
12/07/2016	14	8	6		14	280
12/07/2016	15	15	4		19	380
12/07/2016	16	9	2		11	220
12/07/2016	17	8	4		12	240
12/07/2016	18	15	1		16	320
12/07/2016	19	7	3		10	200
12/07/2016	20	16	2		18	360

Volumen: 20µl=0,020ml (10µl FDA + 10 Mannitol)=>1:2 Dilución

20µl=0,02 ml

Volumen de 10 cuadrados=0,002 ml

La morfología de las anteras vistas bajo la lupa fue normal en forma y color. El test FDA para esta línea mostró la viabilidad de los granos de polen (Fig. 7. a y b). En la tabla 5.3 se observa la producción normal de polen de las anteras de esta línea *FT* positiva

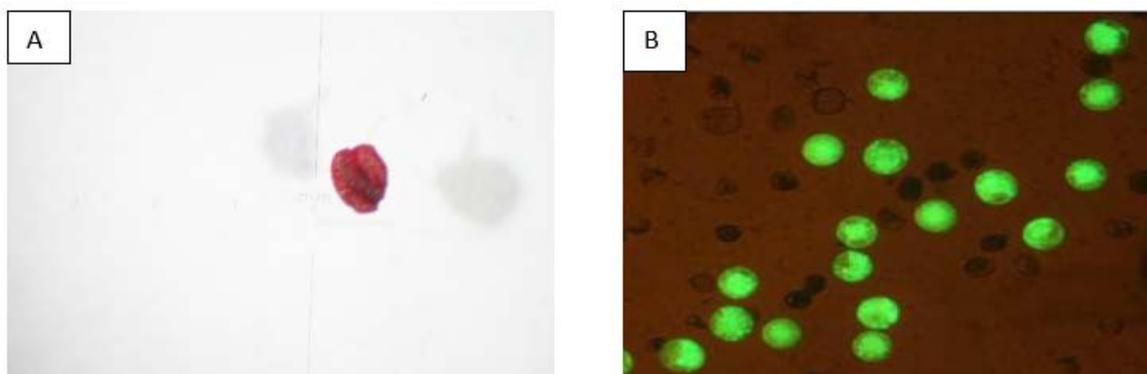


Figura 5.7 a Morfología normal de la antera de la línea control- *AtFT* vista con lupa, b. granos de polen viables de la línea control-*AtFT*, según el test FDA visto al microscopio electrónico.

Tabla 5.4: Evaluación de viabilidad y recuento de polen en **Línea N435-15**.

Antera#	polen vital	polen no vital	nada	Pollen Total	Polen/Antera
1	0	1		1	20
2	0	0		0	0
3	0	0		0	0
4	0	0		0	0
5	0	0		0	0
6	0	0		0	0
7	0	0		0	0
8	0	1		1	20
9	0	0		0	0
10	0	0		0	0
11	0	0		0	0
12	0	0		0	0
13	0	0		0	0
14	0	0		0	0
15	0	0		0	0
16	0	0		0	0
17	0	0		0	0
18	0	0		0	0
19	0	0		0	0
20	0	0		0	0

Las anteras presentaron un desarrollo anormal, observándose forma y tamaño alterados. El polen fue cercano a nulo, como se muestra en la tabla 5.4 y en las escasas anteras que se observaban granos de polen, éste es no viable según los test FDA (Figura 5.8 a y b)



Figura 5.8 a y b. Detalle de la morfología de las anteras de la línea transgénica N435-15

Tabla 5.5: Evaluación de vitalidad y recuento de polen en **Línea N430-11**.

Antera#	polen vital	polen no vital	nada	Pollen Total	Polen/Antera
1	1	6		7	140
2	1	8		9	180
3	3	0		3	60
4	0	0		0	0
5	0	0		0	0
6	2	3		5	100
7	0	0		0	0
8	0	0		0	0
9	0	0		0	0
10	0	0		0	0
11	0	0		0	0
12	0	2		2	40
13	0	0		0	0
14	0	0		0	0
15	1	3		4	80
16	0	0		0	0
17	1	3		4	80
18	0	0		0	0
19	0	1		1	20
20	0	0		0	0

La línea transgénica N430-11 presentó deformación de las anteras y se observó escaso polen no vital. Figuras 5.9 a y b.

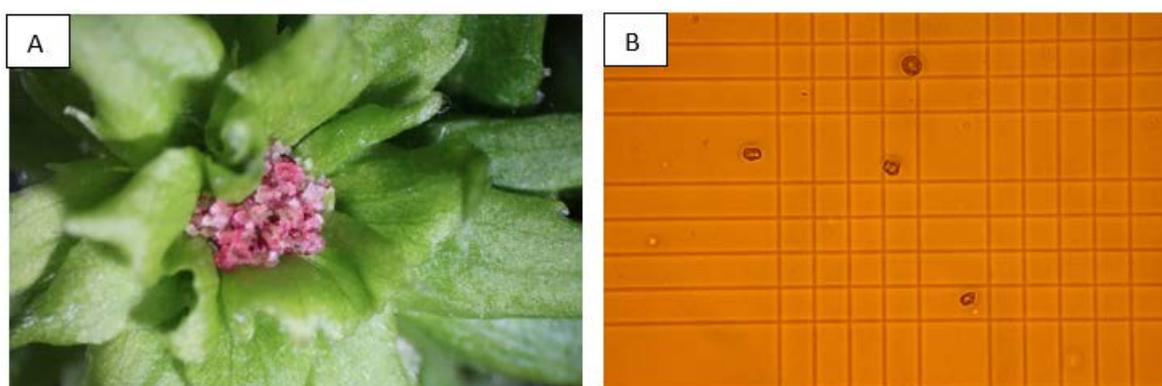
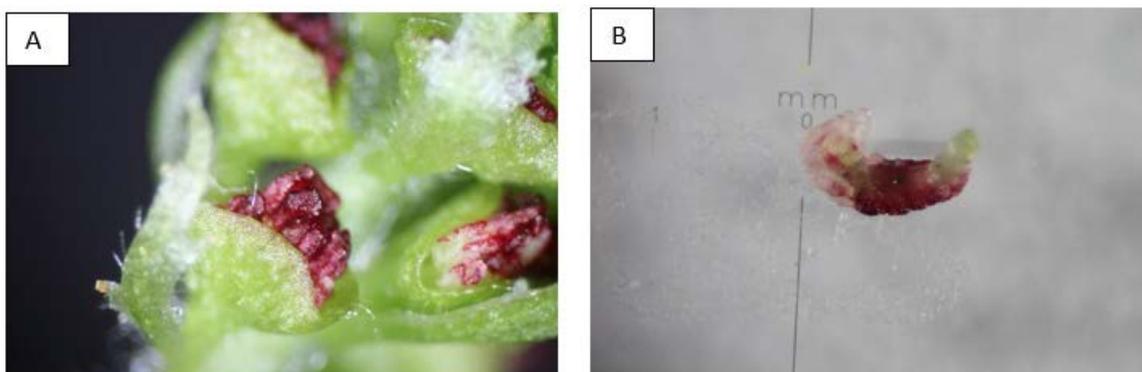


Figura 5.9. a. Detalle de las anteras anormales de la línea N430-11, b. Polen no vital según el FDA test visto al microscopio electrónico.

Tabla 5.6: Evaluación de vitalidad y recuento de polen en N441-21.

Antera#	polen vital	polen no vital	nada	Pollen Total	Polen/Antera
1	0	0		0	0
2	0	0		0	0
3	0	0		0	0
4	0	0		0	0
5	0	0		0	0
6	0	0		0	0
7	0	1		1	20
8	2	0		2	40
9	0	2		2	40
10	2	0		2	40
11	0	0		0	0
12	0	3		3	60
13	0	2		2	40
14	0	0		0	0
15	0	3		3	60
16	0	1		1	20
17	0	0		0	0
18	0	2		2	40
19	0	0		0	0
20	0	0		0	0

En esta línea también se visualizó deformación y anomalía de anteras, y la cantidad de polen fue escasa y sin viabilidad según los test FDA. (Fig. 5.10 a y b)



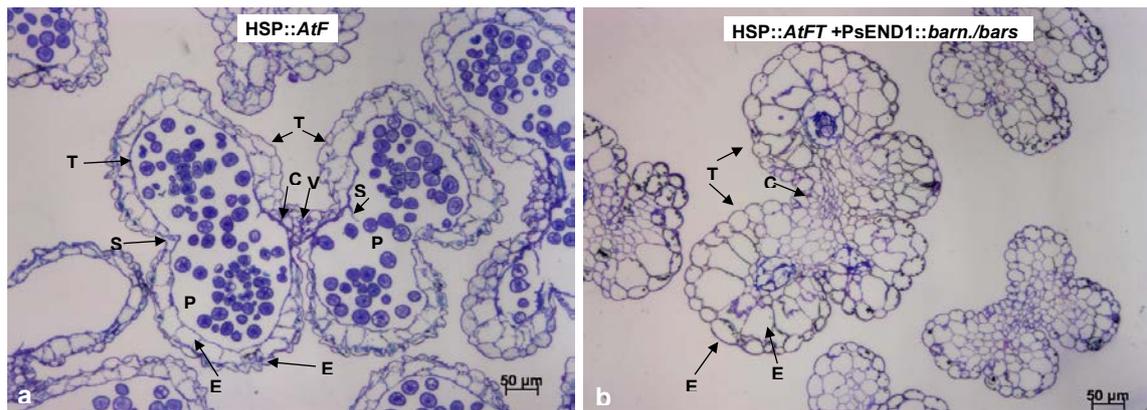
Figuras 5.10 a y b. Detalle de las anteras anormales de la línea transgénica N441-21

Líneas transgénicas	Gen constructo	Número de anteras con granos de polen	Número de graons de polen/antera*	Número de polen viable/antera*	Proporción de polen viable/antera (%)
T193-2	HSP:: <i>AtFT</i>	20**	274 (21.8)	226 (18.9)	82,5
N430-11	HSP:: <i>AtFT</i> PsEND1:: <i>barn./bars.</i>	8	35 (12.1)	9 (3.7)	25,7
N435-15	HSP:: <i>AtFT</i> PsEND1:: <i>barn./bars.</i>	1	2 (1.4)	0	0
N441-21	HSP:: <i>AtFT</i> PsEND1:: <i>barn./bars.</i>	8	18 (5.0)	4 (2.8)	22,2

**Tabla 5.7** Presencia o ausencia de granos de polen en anteras y granos de polen viables, en líneas transgénicas simples (HSP::*AtFT*, control de floración) y dobles (HSP::*AtFT* and PsEND1::*barnase-barstar*). El número de polen y la viabilidad se midieron en 20 anteras / línea transgénica. \* Valores medios y desviaciones estándar (SD) son mostrados. \*\* El número de anteras con granos de polen fue significativamente mayor en las líneas transgénicas simples en comparación con las dobles (chi-square test,  $p < 0.0001$ ).

### Microscopía de anteras y polen

Las diferencias morfológicas entre las plantas de álamo control-*AtFT* y las líneas que contienen PsEND1::*barnase*, fueron observadas a través de cortes en un microscopio electrónico. Los resultados de estos cortes nos indicaron que las plantas control-*AtFT* presentan un normal desarrollo de las anteras y polen, observándose la antera en el estadio 14 de desarrollo, según la escala propuesta para *A. thaliana* (Sanders *et al.*, 1999) (Fig 5.11. a). Los cortes de las anteras de las líneas transgénicas que contienen el constructo PsEND1::*barnase*, presentan escaso desarrollo y morfología anormal de las anteras, correspondiente a un estadio 4-5 de la escala de Sanders *et al.*, 1999 (Figura 5.11. b).



**Figura 5.11** Estudio microscópico de anteras y granos de polen de línea transgénica simple (HSP::AtFT) (a) y doble (HSP::AtFT and PsEND1::BARNASE-BARSTAR) (b). Las líneas transgénicas simples muestran un desarrollo normal de las anteras y polen (stage 14). Las líneas transgénicas dobles, muestran un fuerte disturbio en el desarrollo de las anteras, y en la regla, no se observaron granos de polen. Las anteras se fijaron e incrustaron en resina plástica LR-White y se cortaron en secciones transversales de 1  $\mu$ m. Las secciones de anteras se tiñeron con azul de toluidina. C: conectivo; E: epidermis; En: endotelio; Sm: tabique; St: estomio; PG: granos de polen; V: región vascular; Th: teca; Tp: Tapetum.

La construcción HSP::AtFT combina un sistema de inducción de flores confiable con un crecimiento vegetativo normal (Hoenicka et al. 2016). La mitigación del flujo sexual genético proporcionada por la construcción PsEND1::BARNASE-BARSTAR en *Populus tremula* podría permitir la producción de propágulos reproductivos fértiles y prevenir o reducir el flujo de genes a través de la reproducción sexual, ofreciendo así alternativas de liberación más seguras. En este estudio, el desarrollo de las plantas transgénicas fue anormal. El constructo PsEND1::BARNASE-BARSTAR produjo la ablación de las anteras en los tejidos de las anteras en las primeras etapas de desarrollo y, en consecuencia, la esterilidad masculina, según lo informado por Roque et al. (20076, 2019) en dos especies transgénicas de Solanaceae (*Nicotiana tabacum* y *Solanum lycopersicon*), dos especies de Brassicaceae (*Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus*) y dos plantas ornamentales (*Kalanchoe blossfeldiana* y *Pelargonium zonale*). Las estrategias que utilizan la ablación de células reproductivas o anteras de tejidos, o la inactivación o supresión de genes esenciales para los procesos reproductivos normales se han utilizado ampliamente en especies leñosas.

Esta evaluación se pudo llevar a cabo en muy poco tiempo, 7-8 meses, gracias a que las plantas transgénicas también contenían el constructo inductor de la floración precoz (HSP::*AtFT*), lo que permitió la evaluación de este sistema de “contención genética”.

Nuestros resultados mostraron que el promotor PsEND1 tiene un alto potencial para prevenir el flujo vertical indeseable de genes en esta especie de planta leñosa.

Este es el primer reporte de álamos transgénicos con el sistema inductor de la floración y el sistema inductor de la esterilidad masculina incorporados en una misma transformación, con resultados exitosos.

## Conclusiones

1. Se logró ajustar un protocolo de cultivo de tejidos *in vitro* que permitió contar con el material necesario para las transformaciones genéticas.
2. Se ha desarrollado un método eficiente de regeneración de plantas *in vitro* de clones recalcitrantes de *Populus deltoides* y clones del híbrido *Populus xeuroamericana*. Sin embargo, para los clones de *P. deltoides* D6 y D7 se recomiendan nuevos experimentos para optimizar el protocolo de regeneración *in vitro*.
3. El método de desinfección utilizado fue adecuado para establecer *in vitro* secciones nodales de diferentes genotipos de *Populus* sp.
4. El tidiazuron mostró ser efectivo a muy bajas concentraciones para la producción de brotes en los clones utilizados en este trabajo.
5. El enraizamiento se logró separando los brotes y colocándolos en un medio sin reguladores de crecimiento.
6. Se obtuvieron líneas transgénicas de *P. tremula* L., líneas transgénicas de *P. deltoides* y *P. x euroamericana*, que regeneraron plantas donde pudo confirmarse la presencia de los transgenes.
7. En las transformaciones genéticas, la cepa de *Agrobacterium* EHA101 resultó ser más virulenta que la cepa GV2260 para todos los clones de *Populus* transformados.
8. Todos los explantos transformados regeneraron con éxito en el medio 601 con kanamicina y cefotaxima.
9. Se lograron obtener con éxito líneas transgénicas dobles (HSP::*AtFT* y PsEND1::*barnase*) a partir de la transformación genética en simultáneo, con dos diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (A113 + A249). Esto permite acelerar notoriamente el tiempo de transformación cuando se quiere incorporar más de un gen de interés a una planta.

**10. Es la primera vez que se reportan transformaciones dobles de *P. tremula* L. con los genes HSP::*AtFT* y PsEND1::*barnase* de forma exitosa.**

11. Se obtuvieron 9 líneas dobles de *Populus tremula* L. las cuales se corroboraron por PCR con diferentes primers específicos para cada gen y sus promotores respectivos. Esto es importante ya que pudimos demostrar que durante la transformación puede ocurrir que en la transferencia sólo una parte del ADN-T sea incorporado en la planta y no todo el sistema completo.
12. Los análisis de Southern blot han servido para confirmar las transformaciones y cuantificar el número de copias, sólo en algunas de las líneas, por lo que se recomienda repetir este ensayo para el resto de las pruebas donde el resultado resultó ser confuso.
13. Los ensayos de expresión génica deben ser repetidos ya que no se obtuvieron las bandas buscadas en las muestras pertenecientes al tejido de flor, correspondientes al ARNm del gen *barnase*, sino que sólo se obtuvieron bandas inespecíficas para todas las muestras. Esto puede deberse a que el ARNm no se encuentre presente en todo momento en las líneas transgénicas.
14. Se lograron importantes avances en la transformación de *P. deltoides* y *P. x euramericana*, obteniéndose líneas transgénicas portadoras del gen de floración para ambas especies. Estas líneas fueron corroboradas con PCR con primers específicos tanto para el gen como para su promotor. No se lograron obtener líneas dobles para ninguna de estas dos especies. Este estudio representa un gran avance en la transformación del *P. deltoides* y *P. xeuroamericana* siendo éstos los **primeros álamos de estas dos especies con la característica de floración precoz.**
15. En este trabajo se evaluó el desarrollo de la floración precoz inducida por el constructo HSP::*AtFT*, al mismo tiempo que la androesterilidad, inducida por la expresión del constructo PsEND1::*barnase* en plantas de *Populus tremula* L. transgénicas. Confirmamos que el sistema HSP::*AtFT* en álamos combina una inducción de la floración precoz con un normal crecimiento vegetativo. La

extracción y tinción de los granos de polen obtenidos confirma la fertilidad de las flores obtenidas con este sistema.

16. La combinación del tratamiento de altas temperaturas con el tratamiento de bajas temperaturas permite la obtención de álamos transgénicos con flores fértiles, independientemente de la estación del año, confirmando lo reportado por Hoenicka *et al.*, 2016. Este sistema mostró ser eficiente incluso en plantas muy pequeñas. **La etapa no reproductiva en esta especie es generalmente de 7-10 años, y pasó a ser de 4-6 meses.**
17. Las flores fértiles pueden ser obtenidas independientemente de la estación del año.
18. Esta modificación genética en árboles es una herramienta muy importante para los programas de mejoramiento acelerado, tanto de los álamos como de otras especies forestales, y para estudios genómicos y de bioseguridad.
19. Este sistema también nos permitió realizar estudios relacionados a la esterilidad masculina, importante para análisis de bioseguridad, en lo que respecta a la liberación de plantas modificadas genéticamente al ambiente, así también como una importante estrategia de redistribución de la energía de la planta, al no llevar a cabo la fase reproductiva.
20. Con estos resultados podemos inferir que el sistema PsEND1::*barnase* es efectivo para obtener álamos masculinos transgénicos estériles. Se logró mediante el sistema *barnase* disminuir/anular la calidad y cantidad de polen viable en las plantas transgénicas. Como se dijo, este estudio es muy importante para estudios de contención genética. Esto cobra gran interés principalmente en aquellos países donde la liberación de los OGM no está permitida o está altamente regulada. Estas plantas al no tener polen, son no alergénicas, y al ser estériles, evitan el riesgo de flujo génico desde estas plantas transgénicas hacia otras especies de plantas relacionadas. Las plantas androestériles se utilizan como parentales femeninos en los programas de mejora. Éstas deben ser completamente estériles masculinas, pero la morfología de los órganos reproductores femeninos debe permanecer sin defectos para que, aunque estas

flores no puedan ser autopolinizadas, puedan cruzarse con otras fuentes de polen. En plantas autógamas la producción de híbridos a nivel comercial es difícil; el uso de la androesterilidad, permite a los fitomejoradores eliminar el tedioso proceso de la emasculación en estas especies autógamas.

*Este trabajo de investigación en álamos, si bien se ha realizado en colaboración con un laboratorio alemán, es el primero que se lleva a cabo en Argentina, para una especie forestal de interés regional. Para este desarrollo se utilizaron sólo fondos públicos (Becas CIC, CONICET, UNU-BioLac y DAAD), y pudo realizarse gracias a la colaboración entre laboratorios e institutos de Universidades públicas.*

## Bibliografía

- Abdelwahd, R., Hakam, N., Labhilili, M., UduPA, S. (2008). Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. African Journal of Biotechnology 7: 997-1002.
- Abedini W. Adema M., Amado Cattaneo R., De Francesco A., Ciocchini G., and Sharry S. (2008). In Vitro regeneration of *Populus deltoides* cv Australia 129-60. 23<sup>rd</sup> Session of IPC International Poplar Commission, Paper ID 112.
- Achinelli F. (2006). Silvicultura de álamos y sauces en la Pampa húmeda. Actas de las Jornadas de Salicáceas 2006. Buenos Aires, Argentina. 21-36.
- Achinelli, F., Denegri, G. y Marlats, R. (2004). Evolución y perspectivas del cultivo de salicáceas en la pampa húmeda argentina. SAGPyA Forestal, 32: 14-23.
- Achinelli, F., Francisco, M., Aparicio, A., Gennari, A., Prada, E., Giunchi, J. y Marlats, R. (2003). Análisis comparado de las respuestas de clones de álamo al control de malezas químico-mecánico, químico-total y a la fertilización de arranque con urea en plantaciones de la Provincia de Buenos Aires. XVIII Jornadas Forestales de Entre Ríos.
- Acosta, M., Alvarado, Y. y Caballero, I. (2002). Micobiota epifítica y contaminantes fungosos del establecimiento in vitro de la guayaba (*Psidium guajava* L.). Biotecnología Vegetal 2(2):67-71.
- Adema M., Villarreal B., Abedini W., Galarco S.; De Francesco A. y Sharry S. (2009). Uso de biotécnicas para la propagación y mejora de *Populus deltoides* cv Australia 129-60. XIII Congreso Forestal Mundial 2009. FAO.
- Adema, M. (2016). ¿Por dónde empezamos? Establecimiento de cultivos *in vitro*-plantas madre. Libro "Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro". Sharry, S.E., Adema, M., Abedini, W. Libros de Cátedra. FCAYF, UNLP. Págs. 81-91.
- Aggarwal P., Padmmanabhan B., Bhat A., Sarvepalli K., Sadhale P. P. y Nath U. (2011). The TCP4 transcription factor of *Arabidopsis* blocks cell division in yeast at G1/S transition. Biochem Biophys Res Commun 410 (2):276-81.
- Ahuja M. R., (1988). Gene transfer in forest trees. In: Hanover, J. E. and Keathley, D. E. (eds). Genetic Manipulation of Woody Plants. Plenum Press, New York, pp. 24-41.
- Albrecht, C., Russinova, E., Hecht, V., Baaijens, E. and de Vries, S. (2005). The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male sporogenesis. The Plant Cell 17:3337-3349.
- Álvarez Moreno C. (2009). Mercados para la madera de álamo de calidad y clones para ese destino. Actas de las Jornadas de Salicáceas 2009. Mendoza. Argentina. pp 1-14.

- Azcón-Brito, J. y Talón, M. (2000). Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill Interamericana, Barcelona. 522 p.
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía Mesoamericana 20:153-175.
- Baker, S.H., Frederick, D.L., Bloecher, A., Tatchell, K. (1997). Alanine-scanning mutagenesis of protein phosphatase type 1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 145(3):615-26.
- Ball, J., Carle, J., Del Lungo, A. (2005). Contribución de álamos y sauces a la silvicultura sostenible y al desarrollo rural. Unasyva 221 (56): 3 – 9.
- Barton, J., Dracup, M. (2000). Genetically modified crops and the environment. Agronomy Journal 92: 797-803.
- Baucher, M., Chabbert, B., Pilate, G., Van Doorselaere, J., Tollier, M.T., Petit-Conil, M., Cornu, D., Monties, B., Van Montagu, M., Inze, D., Jouanin, L., Boerjan, W. (1996). Red Xylem and Higher Lignin Extractability by Down-Regulating a Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase in Poplar. Plant Physiol. Dec; 112(4):1479-1490.
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B., Schaller, H. (1982). Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. Gene Volume 19, Issue 3, October, Pages 327–336.
- Benfey, P.N., Chua, N.H. (1990). The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. Science, Vol. 250, Issue 4983, pp. 959-966 DOI: 10.1126/science.250.4983.959.
- Blázquez, M.A., Weigel, D. (1999). Independent regulation of flowering by phytochrome B and gibberellins in *Arabidopsis*. Plant Physiology 120 (4): 1025-1032.
- Boes, T.K. and Strauss, S.H. (1994). Floral phenology and morphology of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Salicaceae) Am J Bot. 81:562–567.
- Böhlenius, H., Huang, T., Charbonnel-Campaa, L., Brunner, A.M., Jansson, S., Strauss, S.H., Nilsson, O. (2006). CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. Science. 2006 May 19; 312(5776):1040-3.
- Bonga, J.M. and von Aderkas, P. (1992). *In Vitro* Culture of Trees. Forestry Sciences. Kluwer Academic Publishers.
- Borodowski, E. D. y Suárez, R. O. (2005). Caracterización forestal de la región del Delta del Paraná. Documento NEF Delta – Proyecto Forestal de Desarrollo – SAGPyA. 8 pág.
- Borges, L., Morales, H.; Valero, Z.; León, S.; Santos, R.; Castro, C. y Del Villar, A. (1997). Comparación de métodos de esterilización superficial de yemas apicales de mango (*Mangifera indica* L.) variedad Haden. VII Jornadas Científico Técnicas. Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. 102 p.

- Braatne J. H., Hinckley T. M. y Stettler R. F. (1992). Influence of soil water on the physiological and morphological components of plant water balance in *Populus trichocarpa*, *Populus deltoides* and their F1 hybrids. *Tree Physiology* 11: 325-339.
- Braatne, J.H., Rood, S.B. and Heilman, P.E. (1996). Life history, ecology and conservation of riparian cottonwoods in North America. In: Stettler, R.F., Bradshaw, H.D. Jr, Heilman, P.E. and Hinckley, T.M. (eds) *Biology of Populus and Its Implications for Management and Conservation*. National Research Council of Canada Research Press, Ottawa, pp. 57–85.
- Brasileiro, A.C.M., Leplé, J.C., Muzzin, J., Ounnoughi, D., Michel, M.F. and Jouanin, L. (1991). An alternative approach for gene transfer in trees using wild-type *Agrobacterium strains*. *Pl. Mol. Biol.* 17, 441–52.
- Brasileiro, A.C.M., Tourneur, C., Leple, J.C. (1992). Expression of the mutant *Arabidopsis thaliana* acetolactate synthase gene confers chlorsulfuron resistance to transgenic poplar plants. *Transgenic Research* 1: 133. doi:10.1007/BF02528778.
- Briones, M.V., Adema, M., Basiglio, M.A., Villarreal, B., Abedini, W., García, M.L., Sharry, S. (2013). Estudios preliminares de la organogénesis de *Populus deltoides* cultivados en la provincia de Buenos Aires. VIII Encuentro Latinoamericano del Caribe de Biotecnología – REDBIO2013. Libro de Actas del Encuentro, resumen n° 304.
- Briones, M. V., Rangel Cano, R. M., Ciocchini, G., García M. L., Sharry, S. (2013). Avances en el cultivo *in vitro* de clones de *Populus deltoides* de interés para Argentina. 4to Congreso Forestal Argentino, Iguazú, Misiones, Argentina, del 23 al 27 de septiembre. Libro de Actas, resumen n° 404.
- Briones, M. V., Rangel Cano, R. M., Galarco, S., Ciocchini, G., Sharry, S. (2012). *In vitro* Rooting Induction and Tissue Culture of *Populus deltoides* and *Populus canadensis* in order to genetic transformation. 24 th Session of International Poplar Comision, Dehradun, India, 30 de octubre-2 de noviembre. ID-079.
- Briones, M. V.; Sharry, S.; Adema, M.; Basiglio Cordal, M. de los A.; Villareal, B.; Ciocchini, G.; Abedini W (2010). Aplicación de herramientas biotecnológicas para apoyar al sector forestal productivo. VII Encuentro Latinoamericano y del Caribe sobre Biotecnología Agropecuaria, REDBIO Guadalajara, México. 1-5 de noviembre. Exposición oral. Número de Folio: 379. <http://www.redbiomexico2010.org>.
- Brüggmann, T. (2011). Entwicklung molekularer Marker zur genetischen Charakterisierung von Genotypen verschiedener Arten der Gattung *Populus* L. Hamburg: Universität, 134 p, Hamburg, Univ, Fachber Biologie, Masterarbeit, 2011.
- Brunner, A.M. (1998). Structure and expression of two *Populus trichocarpa* homologs of the floral homeotic gene AGAMOUS. PhD Dissertation, Department of Forest Science, Oregon State University, Corvallis.
- Brunner, A., Rottmann, W., Sheppard, L, Krutovskii, K., DiFazio, L., Leonardi, S. and Strauss, S. (2000). Structure and expression of duplicate AGAMOUS orthologues in poplar. *Plant Molecular Biology*, 44:619-634.

- Brunner, A.M., Li, J., DiFazio, S. P., Shevchenko, O., Mohamed, R., Montgomery, B., Elias, A., Van Wormer, K., and Strauss, S. H. (2007). Genetic containment of forest plantations. *Tree Genetics and Genomes* 3: 75-100.
- Bueno M.A., Astorga R., Manzanera J.A., García de los Ríos M.D., (1992). Propagación clonal de árboles adultos de *Populus tremula* de la sierra de Madrid por cultivo de tejidos. In Padró A. Proceedings 19 Sesión de la Comisión Internacional del Álamo. Vol. I, pp. 523-530.
- Busov, V.B., Pilate, G., Strauss, S.H. (2010). Transformation as a Tool for Genetic Analysis in *Populus*. 2010. In: Genetics and Genomics of Populus. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models 8, DOI 10.1007/978-1-4419-1541-2\_6.
- Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J., Wittwer C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55 (4): 611-622.
- Cabrera, J. C. (2002). Desarrollo de activadores de las plantas de amplio espectro de acción. Informe Final de Proyecto. INCA. La Habana. 22 p.
- Calderón, A. (2006). Silvicultura y situación de los álamos en Cuyo. Actas Jornadas de Salicáceas 28-30 septiembre, Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Campbell, J. A., Davies G. J., Bulone, V., Henrissat B. (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarity, *Biochem. J.*, vol. 326 (pg. 929-942)
- Campbell, M. M., Brunner, A. M., Jones, H. M. and Strauss, S.H. (2003). Forestry's fertile crescent: the application of biotechnology to forest trees. *Forest Biotechnology*, 1:141-154.
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología INIA Las Brujas. Uruguay. 8p.
- Castro, G. (2006). Usos actuales y posibilidades futuras de la madera de álamo. Actas Jornadas de Salicáceas 2006, 28-30 Septiembre, Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Ceulemans, R. (2011). Silvicultura de rotación corta de álamos y sauces: aspectos ecológicos, de crecimiento y de producción Tercer Congreso Internacional de Salicáceas en Argentina Disertación disp. [http://www.agroindustria.gob.ar/new/0-0/forestacion/\\_archivos/\\_biblioteca/Ceulemans\\_castellano\\_D.pdf](http://www.agroindustria.gob.ar/new/0-0/forestacion/_archivos/_biblioteca/Ceulemans_castellano_D.pdf).
- Chang, Y.-Y., Wang, A. Y., Cronan, J. E. (1993). Molecular cloning, DNA sequencing, and biochemical analyses of *Escherichia coli* glyoxylate carboligase. An enzyme of the acetohydroxy acid synthase-pyruvate oxidase family. *J.Biol.Chem.* 268:3911-3919.
- Che, D., Meagher, R. B., Heaton, A. C. P., Lima, A., Rugh, C. L., Merkle, S. L. (2003). Expression of Mercuric Ion Reductase in Eastern Cottonwood (*Populus Deltoides*) Confers Mercuric Ion Reduction and Resistance. *Plant Biotechnol J* 1 (4), 311-319.

- Chilton, M. D.; Tepfer, D. A.; Petit, A.; David, C.; Casse-Delbart, F.; Tempé, J. (1982). *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295 (5848): 432. doi:10.1038/295432a0.
- Chung, H. S. ; Kim, C. W. ; Han, I. K. ; Choi, Y. J. ; Yu, D. J., (1989). Effect of feeding fish soluble absorbed briquette ash feed on the performance and economics of growing pigs. *Korean J. Anim. Sci.*, 31 (8): 513-518.
- Clark, D. P. and Pazdernik, N. J. (2009). *Molekulare Biotechnologie*, 1. Auflage, Springer-Verlag, Berlin.
- Colcombet, J., Boisson-Dernier, A., Ros-Palau, R., Vera, C. E., Schroeder, J. I. (2005). Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES1 and 2 are essential for tapetum development and microspore maturation. *The Plant Cell*. 17:3350–3361.
- Coleman G. D. and Ernst S. G. (1989). *In vitro* shoot regeneration in *Populus deltoides*: Effect of cytokinin and genotype. *Plant Cell Reports* 8:459-462.
- Coleman, G. D. and Ernst, S. G. (1990). Shoot induction competence and callus determination in *Populus deltoides*. *Plant Sci* 71:83– 92.
- Collado, R. Barbón, R., Agramonte, D., Jiménez, F., Pérez, M., Odalys G., Ramírez D. (2004). Establecimiento *in vitro* de ápices y segmento nodales de *Swietenia macrophylla* King, Universidad Central “Marta Abreu”, Cuba. *Biotecnología Vegetal* 4(3): 143- 146.
- Comisión Nacional del Alamo en Argentina (2000). Informe Nacional. <http://www.fao.org/forestry/6453-07841758e89afdb7009edfe498fb3b335.pdf>.
- Confalonieri F., Marsault J., Duguet M. (1994). SAV, an archaeobacterial gene with extensive homology to a family of highly conserved eukaryotic ATPases. *J Mol Biol*235 (1):396-401
- Confalonieri, M., Balestrazzi, A. y Cella, R. (1997). Genetic transformation of *Populus deltoides* and *P.x euramericana* clones using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 48: 53–61, 1997. 53.
- Confalonieri, M., Belenghi, B., Balestrazzi, A., Negri, S., Facciotto, G., Schenone, G. and Delledone, M. (2000). Transformation of elite white poplar (*Populus alba*) and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Reports*, 19:978-982.
- Cortizo S. (2011). Mejoramiento genético del álamo, una ciencia en apoyo a la producción forestal sostenible. Tercer Congreso Internacional de Salicáceas en Argentina. Neuquén, 16 al 19 de marzo.
- Cortizo, S. y Monteverde, S. (2006). Nuevos genotipos para diversificar las plantaciones de álamo del Delta del Paraná. Resultados de un ensayo comparativo clonal. Tercer Congreso Internacional de Salicáceas en Argentina.
- Costa, M. A., Marques, J. V., Dalisay, D.S., Herman, B., Bedgar, D. L., Davin, L. B. (2013). Transgenic hybrid poplar for sustainable and scalable production of the commodity/specialty chemical, 2- phenylethanol. *PLoS ONE* 8:e83169 10.1371/journal.pone.0083169.

- Dalal, M. A., Sahni, C. K., Khan, A. A., Surinder, K., Kumar, S. (1999). Effect of explant source and stock plant treatment on presenting total phenols and culture nutrient of grape wine in vitro. *Applied Biology Res.* 1(2) 95-98.
- Danielsen, L., Lohaus, G., Sirrenberg, A., Karlovsky, P., Bastien, C., Pilate, G., Polle, A. (2013). Ectomycorrhizal colonization and diversity in relation to tree biomass and nutrition in a plantation of transgenic poplars with modified lignin biosynthesis. *PLoS One.* 2013; 8(3):e59207. doi: 10.1371/journal.pone.0059207.
- Das, T. y Mitra, G.C. (1990). Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 22: 95. doi:10.1007/BF00043684.
- Davel, M.; Havrylenko, S. y Barbé, A. (2008). Estudio exploratorio para el desarrollo de forestaciones de Salicáceas en tres zonas de la patagonia. *Patagonia Forestal.* Año 2008, Nº 1 y Nº 2: 14 pp.
- DeBlock, M. (1990). Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium* –mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. *Plant Physiol*, 93:1110-1116.
- Degenhardt-Goldbach, J., Quoirin, M., Buss, S., de Oliveira, Y., Franciscan, L., Gerhardt, I. (2011). In vitro shoot organogenesis from *Eucalyptus* sp. leaf explants. From IUFRO Tree Biotechnology Conference: From Genomes to Integration and Deliver Arraial d’Ajuda, Bahia, Brazil. 26 June - 2 July.
- Dessaux, Y., Petit, A., Farrand, S. K., Murphy, P. J., (1998). Opines and opine-like molecules involved in plant-*Rhizobiaceae* interactions. In: H. P. SPAINK, Á. KONDOROSI and P. J. J. HOOYKAAS (Eds.): *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*, 173-197. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- De Storme N., Geelen D., (2013). Sexual polyploidization in plants--cytological mechanisms and molecular regulation. *New Phytol.* 198(3): 670-84.
- Dickmann, D. I., Isebrands, J. G., Eckenwalder, J. E. and Richardson, J. (2001). *Poplar culture in North America.* NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
- Dickmann, D.I. (2006). Silviculture and biology of short-rotation woody crops in temperate regions: then and now. *Biomass and Bioenergy* 30: 696 – 705.
- Dodds, J. A. (1982) Cross-protection and interference between electrophoretically distinct strains of cucumber mosaic virus in tomato. *Virology* 118: 235-240.
- Dubouzet, J.G., Strabala, T.J., Wagner, A. (2013) Potential transgenic routes to increase tree biomass. *Plant Science* Volume 212, Pages 72–101
- Dumolin S., Demesure B., Petit R.J.(1995) Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method, *Theor Appl Genet*, vol. 91 (pg. 1253-1256)

- Dumolin-Lapègue S., Petit R.J., Gielly L., Taberlet P. (1999). Amplification of DNA from ancient and modern oak wood. *Mol Ecol.* 8:2137–2140. doi: 10.1046/j.1365-294x.1999.00788.x.
- Dyé, F., Berthelot, K.V.J., Griffon, B., Delmotte, F.M. (1997). Alkylsyringamides, new inducers of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. *Biochimie* 79(1):3-6
- Eckenwalder J. E. (1996). Systematics and evolution of *Populus*. In R. F. Stettler, H. D. Bradshaw, Jr., P. E. Heilman, and T. M. Hinckley [eds.], *Biology of Populus and its implications for management and conservation*, 7–32. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
- Elo, A., Lemmetyinen, J., Turunen, M.L., Tikka, L., Sopanen, T. (2001). Three MADS-box genes similar to *APETALA1* and *FRUITFULL* from silver birch (*Betula pendula*). *Physiologia Plantarum* 112 (1): 95-103.
- Elo, A., Lemmetyinen, J., Novak, A., Keinonen, K., Porali, I., Hassinen, M., Sopanen, T. (2007). BpMADS4 has a central role in inflorescence initiation in silver birch (*Betula pendula*). *Physiologia Plantarum* 131 (1): 149-158. - doi: 10.1111/ppl.2007. 131.issue-1.
- Endo A., Nakamura T., Shima J. (2009). Involvement of ergosterol in tolerance to vanillin, a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 299(1):95-9.
- Engler, A. (1964). *Syllabus der Pflanzenfamilien* (ed. por M. MELCHIOR) 2. Berlin.
- Eriksson, M. E., Israelson, M., Olsson, O. and Moritz, T. (2000). Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nature Biotechnology*, 18:784-788.
- FAO (2004). *Synthetis of country progress reports- activities related to poplar and willow cultivation and utilization, 2000 through 2003*. 22º periodo de sesiones de la Comisión Internacional del Álamo, Santiago, Chile, 29 de noviembre-2 de diciembre de 2004. Documento de trabajo IPC/3. Roma.
- Feng, X., Dickinson, H.G. (2007). Packaging the male germline in plants. *Trends in Genetics* 23(10):503-10.
- Fenning, T. M. and Gershenzon, T. (2002). Where will the wood come from? Plantation forests and the role of biotechnology. *Trends in Biotechnology* 20(7):291-6.
- Fillati, J. J., Sellmer, J., McCown, B., Haissig, B. & Comal, L. (1987). *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Molecular and General Genetics* 206, 192-199.
- Fischer, R., Budde, I., Hain, R. (1997). Stilbene synthase gene expression causes changes in flower colour and male sterility in tobacco. *The Plant Journal* 11 (3): 489-498. - doi: 10.1046/j.1365- 313X.1997.11030489.
- Fladung, M. and Ahuja, M. R. (1995) Sandwich method for non-radioactive hybridization. *Biotechniques* 18:3-5.

- Fladung, M., Deutsch, F., Kumar S. (2004). Transformation of haploid and diploid poplar with different gene constructs and analysis of transgenic plants. *Genetics* 11, 203-212.
- Fladung, M., Ewald, D., (2006). *Tree Transgenesis: Recent Developments*. Springer Science & Business Media, Aug 26, 2006 - Nature - 360 pages.
- Fladung, M., Hoenicka, H., Ahuja M. R. (2013). Genomic stability and long-term transgene expression in poplar. *Transgenic Res.* 22(6):1167-78. doi: 10.1007/s11248-013-9719-2.
- Fladung, M., Kumar, S., Ahuja, M. R. (1997). Genetic transformation of *Populus* genotypes with different chimeric gene constructs: Transformation efficiency and molecular analysis. *Trans Res.* 6:111–121. doi: 10.1023/A:1018421620040.
- Flachowsky, H., Le Roux, P. M., Peil, A., Patocchi, A., Richter, K., Hanke, M. V. (2011). Application of a high-speed breeding technology to apple (*Malus domestica*) based on transgenic early flowering plants and marker-assisted selection. *New Phytologist* 192 (2): 364-377.
- Flachowsky, H., Peil, A., Sopanen, T., Elo, A., Hanke, V. (2007). Overexpression of BpMADS4 from silver birch (*Betula pendula*) in apple (*Malus x domestica*) induces early flowering. *Plant Breeding* 126: 137-145.
- Flachowsky, H., Szankowski, I., Fischer, T.C., Richter, K., Peil, A., Höfer, M., Dörschel, C., Schmoock, S., Gau, A. E., Halbwirth, H. (2010). Transgenic apple plants overexpressing the Lc gene of maize show an altered growth habit and increased resistance to apple scab and fire blight. *Planta.* 231:623–635. doi: 10.1007/s00425-009-1074-4.
- Flores, C. M., A. Cabañas, I. Peñalosa, R. Quintanar, Vázquez, J., Urzúa, M. (2009). Auxinas endógenas, AIA-Oxidasa y enraizamiento en *Vigna radiata* L. Wilczek inducido por auxina exógena libre y conjugada. *Revista Fitotecnia México* 32(1): 61-66.
- Folgueras, M. (2000). La contaminación microbiana en la micropropagación in vitro de las raíces y tubérculos tropicales/ Maryluz. Folgueras. Tesis para aspirar al título de Master en Agricultura Sostenible (Mención Sanidad Vegetal), L. Herrera, Tutor. Santa Clara, Villa Clara. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, 71 h.
- Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L., Brand, L. A., Fink, C. L., Fry, J. S., Gerald, Galluppi, R., Goldberg, S. B., Hoffmann, N. L., Woo, S. C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. NatL. Acad. Sci. USA* Vol. 80, pp. 4803-4807.
- Freiman, A., Shlizerman, L., Golobovitch, S. (2012). Development of a transgenic early flowering pear (*Pyrus communis* L.) genotype by RNAi silencing of PcTFL1-1 and PcTFL1-2. *Planta* 235:1239-1251.
- García-Sogo, B., Pineda, B., Castelblanque, L., Antón, T., Medina, M., Roque, E., Torresi, C., Beltrán, J.P., Moreno, V., Cañas, L.A. (2010). Efficient transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* and production of male-sterile plants by engineered anther ablation. *Plant Cell Reports* 29 (1): 61-77. - doi: 10.1007/s00299-009-0798-8.
- Galun, E. and Breiman, A. (1998). *Transgenic plants*. Imperial College Press, London. 220p.

- Gan, Y., Fan, Y., Yang, Y., Dai, B., Gao, D., Wang, X., Wang, K., Yao, M., Wen, H., Yu, W. (2010). Ectopic expression of MNX gene from *Arabidopsis thaliana* involved in auxin biosynthesis confers male sterility in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Molecular Breeding* 26 (1): 77-89. - doi: 10.1007/s11032-009-9378-4.
- Gelvin, S.B. (1998). *Agrobacterium* VirE2 proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm. *J Bacteriol* 180: 4300–4302.
- George, E. (1996). Plant propagation by culture tissue; part 2. In practice. 2 ed. Exegetics Limited. England.
- George E. F. (1993). Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. 2nd Edition. Exegetics Limited. Reino Unido. 555 p.
- Gómez, M. D., Beltrán, J. P., Cañas, L. A. (2004). The pea END1 promoter drives anther-specific gene expression in different plant species. *Planta* 219:967–981.
- Gonzáles, P. (2007). Evaluación de métodos de desinfección y tipos de explante de la especie vegetal *Piper oradendron* Trel. & Standl., para el establecimiento de su cultivo *in Vitro*. Tesis para optar al título de Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller N., Blanchard, M., Quorollo, B., Goldman, B., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, M., Scott, C., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, C., Cielo, C., Slater, S. (2001). Genome Sequence of the Plant Pathogen and Biotechnology Agent *Agrobacterium tumefaciens* C58.
- Graham, M., Ko, L., Ardí, V., Robinson, S., Sawyer, B., O'Hare, T., Jobin, M., Dalher, J., Underhill, S., Smith, M. (1998). The development of blackheart resistant pineapples through genetic engineering. In: Abstracts of third International pineapple symposium. Pattaya, Thailand. 11pp.
- Gricar, J., Zupancic, M., Cufar, K., Koch, G., Schmitt, U., Oven, P. (2006). Effect of local heating and cooling on cambial activity and cell differentiation in the stem of Norway spruce (*Picea abies*). *Annals of Botany* 97: 943–951.
- Grierson, D. y Covey, S.N. (1991). *Biología Molecular de las Plantas*. Acribia. Zaragoza.
- Gritz, L., Davies, J. (1983). Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. Nov; 25(2-3):179-88.
- Guerra, F., Gainza, F., Pérez, R., Zamudio, F. (2011). Phytoremediation of Heavy Metals using Poplars (*Populus spp*): A Glimpse of the Plant Responses to Copper, Cadmium and Zinc Stress pp. 387-414.
- Guo, R. X., Sun, D. F., Tan, Z. B., Rong, D. F., Li, C. D. (2006). Two recessive genes controlling thermoperiod-sensitive male sterility in wheat. *Theor Appl Genet* 112:1271-1276.

- Hai, G., Jia, Z., Xu, W. (2016). Characterization of the *Populus* PtrCesA4 promoter in transgenic *Populus alba* × *P. glandulosa* Plant Cell Tiss Organ Cult 124: 495. doi:10.1007/s11240-015-0909-x.
- Haines, R. J. (1994). Biotechnology in forest tree improvement: research directions and priorities. Forestry Paper No. 118. Rome.
- Hammerschlag, F. (1982). Factors affecting establishment and growth of peach shoots *in vitro*. HortScience 17:85-86.
- Hamilton, R. H. & Fall, M. Z. (1971). The loss of tumor-initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation at high temperature 27: 229. doi:10.1007/BF02145913.
- Han, K., Gordon, M. P. and Strauss, S. H. (1997). High-frequency transformation of cottonwoods (genus *Populus*) by *Agrobacterium rhizogenes*. Can. J. For. Res. 27: 464-470.
- Han R., Yang G., Wang M., Zhao Z. (2000). Nickel cation biosorbing studies by yeast with dimethylglyoxime spectrophotometry. Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi 20(5):739-40.
- Hanke, M.L., Powell, N.D., Stiner, L.M., Bailey, M.T., Sheridan, J.F. (2012) Beta adrenergic blockade decreases the immunomodulatory effects of social disruption stress. Brain Behav Immun. 26:1150-1159. doi: 10.1016/j.bbi.2012.07.011.
- Hartmann, J.M., Brodbeck, C., Flaud, P.M., Tipping, R.H., Brown, A., Ma, Q., Liévin, J. (2002) Collision-induced absorption in the ν<sub>2</sub> fundamental band of CH<sub>4</sub>. II. Dependence on the perturber gas. J. Chem. Phys., 116, 123-127, doi:10.1063/1.1424311.
- Hellens, R. P., Mullineux, P. M., Klee, H. (2000). A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. Trends in Plant Science 5(10):446-51.
- Hermoso Blanco, j., Otaño Llorente, A., Pando Fernández, V., Sierra de Grado, R. (2012). Estudio de la influencia de IBA (ácido indolbutírico) en la fase de enraizamiento en el cultivo *in vitro* de *Populus tremula* L. 6º Congreso Forestal Español. ISBN: 978-84-937964-9-5.
- Hibino, T., Waditee, R., Araki, E., Takabe, T. (2002). Functional Characterization of Choline Monooxygenase, an Enzyme for Betaine Synthesis in Plants. Journal of Biological Chemistry 277(44):41352-60.
- Ho C.K., Schwer B., Shuman S. (1998). Genetic, physical, and functional interactions between the triphosphatase and guanylyltransferase components of the yeast mRNA capping apparatus. Mol Cell Biol 18(9):5189-98.
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. y Schilperoort, R. A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* tiplasmid. Nature. 303, 179-180.
- Hoenicka, H., Fladung, M. (2006). Biosafety in *Populus* spp. and other forest trees: from non-native species to taxa derived from traditional breeding and genetic engineering. Trees 20:131-144.

- Hoenicka H, Nowitzki O, Debener T, Fladung M (2006). Faster evaluation of induced floral sterility in transgenic early flowering poplar. *Silvae Genetica* 55 (6): 285-291.
- Hoenicka H, Nowitzki O, Hanelt D, Fladung M. (2008). Heterologous overexpression of the birch FRUITFULL-like MADS-box gene BpMADS4 prevents normal senescence and winter dormancy in *Populus tremula* L. *Planta*. 227:1001–1011. doi: 10.1007/s00425-007-0674-0.
- Hoenicka H., Lehnhardt D., Polak O., Fladung M. (2012). Early flowering and genetic containment studies in transgenic poplar. *iForest* 5:138-146.
- Hoenicka, H., Lehnhardt, D., Nilsson, O., Fladung, M. (2014). Successful crossings with early flowering transgenic poplar: interspecific crossings, but not transgenesis, promoted aberrant phenotypes in offspring. *Plant Biotechnology Journal* 12:1066-1074.
- Hoenicka H., Lehnhardt D., Briones V., Nilsson O., Fladung M. (2016). Low temperatures are required to induce the development of fertile flowers in transgenic male and female early flowering poplar (*Populus tremula* L.) *Tree Physiol* (2016) 36 (5): 667-677.
- Höfig, K. P., Moyle, R. L., Putterill, J., Walter, C. (2003). Expression analysis of four *Pinus radiata* male cone promoters in the heterologous host *Arabidopsis*. *Planta* 217 (6): 858-867. doi: 10.1007/s00425-003-1057-9.
- Höfig, K. P., Moller, R., Donaldson, L., Putterill, J., Walter, C. (2006). Towards male sterility in *Pinus radiata* - a stilbene synthase approach to genetically engineer nuclear male sterility. *Plant Biotechnology Journal* 4 (3): 333-343. - doi: 10.1111/pbi.2006.4.issue-3.
- Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S., Hoekema, A. (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* 2:208–218. doi: 10.1007/BF01977351.
- Hooykaas, P. J. and Schilperoort, R. A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol Biol* 1992 Oct;20(1):175.
- Hooykaas, P. J. and Beijersbergen, A. G. M. (1994). The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annu Rev Phytopathol* 32 157-179.
- Hord, C.L., Chen, C., Deyoung, B.J., Clark, S.E., Ma, H. (2006). The BAM1/BAM2 receptor-like kinases are important regulators of *Arabidopsis* early anther development. *Plant Cell*. 2006;18:1667–1680.
- Howe, G. T., Strauss, S. H., Goldfarb, B. (1991). Insertion of the maize transposable element AC into poplar. In: Ahuja, M. R., ed. *Woody Plant Biotechnology*. New York. Plenum Press: 283-294.
- Hsu, C. Y., Liu, Y., Luthe, D. S. and Yuceer, C. (2006). Poplar FT2 shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering. *Plant Cell*, 18, 1846–1861.
- Hu, W., Harding, S., Lung, J., Popko, J., Ralph, J., Stokke, D., Tsai, Ch. and Chiang, V. (1999). Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature Biotechnology*, 17:808-811.

- Huang, G. T., Ma, S. L., Bai, L. P., Zhang, L., Ma, H., Jia, P. (2012). Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Mol. Biol. Rep.* 39, 969–987 10.1007/s11033-011-0823-1.
- Huang, X., Li, Y., Zhang, X., Zuo, J., Yang, S. (2010). The *Arabidopsis* LSD1 gene plays an important role in the regulation of low temperature-dependent cell death. *New Phytologist* 187: 301–312.
- Huetteman, C. A. and Preece, J. E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 33: 105. doi:10.1007/BF01983223.
- IPC: International Poplar Commission (2004): The contribution of poplars and willows to sustainable forestry and rural development, Santiago, Chile, 29 noviembre al 2 de diciembre.
- Isea, F.; Escalante, M.; Urdaneta, J. y Ramírez, M. (2004). Presencia de hongos contaminantes durante el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de mango (*Mangifera indica* L.) *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, vol. 21 no. 1, p. 193-199).
- Isebrands, J. G. and Karnosky, D. F. (2001). Environmental benefits of poplar culture. In *Poplar Culture in North America*. Eds. D. I. Dickmann, J. G. Isebrands, J. E. Eckenwalder and J. Richardson. NRC Research Press, Ottawa, Canada, pp 207–218
- Islam, S. M. S., Tuteja, N. (2012). Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plan Sci* 182:134-144.
- Issarakraisila, M., Considine, J. A. (1994). Effects of Temperature on Pollen Viability in Mango cv. 'Kensington'. *Annals of Botany* 73(3).
- Jain, M., Chourey, P. S., Boote, K. J., Allen, L. H. Jr. (2010). Short-term high temperature growth conditions during vegetative-to-reproductive phase transition irreversibly compromise cell wall invertase mediated sucrose catalysis and microspore meiosis in grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *Journal of Plant Physiology* 167, 578–582.
- Jansson, S. and Douglas, C. J. (2007). *Populus*: a model system for plant biology. *Annual review of Plant Biology* 58:435-58.
- Jin, S., Roitsch, T., Ankenbauer, R. G., Gordon, M. P., Nester, E. W. (1990a). The VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* is autophosphorylated and is essential for vir gene regulation. *J. Bacteriol.* 172, 525–530.
- Johnson, C. A., Barlow, A. L., Turner, B. M. (1998). Molecular cloning of *Drosophila melanogaster* cDNAs that encode a novel histone deacetylase dHDAC3. *Gene* 221(1): 127-134.
- Kalogeraki, V. S. and Winans, S. C. (1998). Wound released chemical signals may elicit multiple responses from an *Agrobacterium tumefaciens* strain containing an octopine-type Ti plasmid. *J. Bacteriol.* 180, 5660–5667.
- Kamali, K., Ostovan, H., Atamehr, A. (2001). A catalog of mites and ticks (Acari) of Iran. Islamic Azad University Scientific Publication Center.

- Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7 (5): 193-195. doi: 10.1016/S1360-1385 (02) 02251-3.
- Kim H. S., Oren R. y T. M. Hinckley. (2008). Actual and potencial transpiration and carbon assimilation in an irrigated poplar plantation. *Tree Physiol.* 28: 559-577.
- Kim, Y. H., Kim, M. D., Choi, Y. I., Park, S. C., Yun, D. J., Noh, E. W., Lee, H. S., Kwak, S. S. (2011). Transgenic poplar expressing *Arabidopsis* NDPK2 enhances growth as well as oxidative stress tolerance. Transgenic poplar expressing *Arabidopsis* NDPK2 enhances growth as well as oxidative stress tolerance. *Plant Biotechnol J.* 9(3):334-47. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00551.x.
- Klopfenstein, N. B.; Shi, N. Q.; Kernan, A.; McNabb, H. S., Jr.; Hall, R. B.; Hart, E. R.; Thornburg, R. W. (1991). Transgenic *Populus* hybrid expresses a wound-inducible potato proteinase inhibitor II-CAT fusion. *Can. J. For. Res.* 21: 1321-1328.
- Klopfenstein N.B. (1993). Transformation of *Populus* hybrids to study and improve pest resistance. *Biotechnology of Trees.* V Intern. Workshop of the IUFRO. p. 23.
- Knight & Monroe (2015) ([http://csmbio.csm.jmu.edu/biology/courses/bio480\\_580/mblab/miniprep.html](http://csmbio.csm.jmu.edu/biology/courses/bio480_580/mblab/miniprep.html), Zugriff am 15.08.2015).
- Koltunow, A. M., Truettner, J., Cox, K. H., Wallroth, M., Goldberg, R. B. (1990). Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* 2 (12): 1201-1224. - doi: 10.1105/tpc.2.12.1201.
- Lai, R., Lai, S. (1993). Genetic engineering of plants for crop improvement. CRC Press. Boca Ratón, F.L. 332 p.
- Laukkanen, H., Rautiainen, L., Taulavuori, E., y Hohtola, A. (2000). Changes of celular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiology.* England.
- Lee, K.Y., Strand, S.E., Doty, S.L. (2012). Phytoremediation of chlorpyrifos by *Populus* and *Salix*. *Int J Phytoremediation.* Jan;14(1):48-61.
- Lee, Y. C., J. M. Park, S. Min, S. J. Han and Y. J. Kim, (1999). An activator binding module of yeast RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2967–2976.
- Lemmetyinen, J., Keinonen, K., Sopanen, T. (2004). Prevention of the flowering of a tree, silver birch. *Molecular Breeding* 13 (3): 243-249. - doi: 10.1023/B:MOLB.0000022525.96200.53.
- Leplé, J. C., Miranda Brasileiro, A. C., Michel, M. F., Delmotte, F. Jouanin, L. (1992). Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs *Plant Cell Reports*, Volume 11, Issue 3, pp 137-141.
- Li, S., Lauri, A., Ziemann, M., Busch, A., Bhawe, M., Zachgo, S. (2009). Nuclear activity of ROXY1, a glutaredoxin interacting with TGA factors, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21: 429–441.

- Littlewood, J., Guo, M., Boerjan, W., and Murphy, R. J. (2014). Bioethanol from poplar: a commercially viable alternative to fossil fuel in the European Union. *Biotechnol. Biofuels* 7, 113. doi:10.1186/1754-6834-7-113.
- Liu, T., Ohashi-Ito, K., Bergmann, D. C. (2009). Orthologs of *Arabidopsis thaliana* stomatal bHLH genes and regulation of stomatal development in grasses. *Development* 136: 2265–2276.
- Lloyd, G., McCown, B.H. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Propagators Soc.* 30: 421-427.
- López Gómez, P.; Iracheta Donjuan, L.; Castellano Juárez, M.; Méndez López, I.; Sandoval Esquivel, A.; Aguirre Medina, J.; Ojeda Zacarías, M.; Gutiérrez Díez, A. (2010). Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 33 (3): 205-213.
- López-Gómez, P., Iracheta Donjuan, L., Castellano Juárez, M., Méndez López, I., Aguirre Medina, J.F., Gutiérrez Díez, A., Ojeda-Zacarías, M.C., Ribai Pérez-Pérez, B. (2011). Variación en la tolerancia a desinfectantes de genotipos élite de *Coffea* spp. Cultivados *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. Vol: 2(5), 645-657 pp. ISSN: 2007-0934.
- Lu, C.Y. (1993). *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. *Plant* 29: 92. doi:10.1007/BF02632259.
- Lu, X. -C., He, Y., Chen, M., Tian, S., Bai, S. -N. (2008). Daylength responses of various morphogenetic events after panicle initiation in late japonica rice (*Oryza sativa* L. sso. *Japonica*) *Plant Biol (Stuttg)* 10:365-373.
- Lyyra, S., Meagher R. B., Kim, T., Heaton, A., Montello, P. and Merkle, S. A. (2007). Coupling two mercury resistance genes in Eastern cottonwood enhances the processing of organomercury. *Plant Biotechnology Journal* 5, pp. 254–262.
- Ma, H. (2005). Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annual Review of Plant Biology* 56:393-434.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (1997) *Biology of Microorganisms* 8th edn. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.
- MAGyP, (2010). Costos de implantación. *Pinus*, Eucaliptos y Alamo región Cordoba y la Pampa. Estimación de costos en el marco del Régimen de Promoción Forestal, Ley 26060.
- MAGyP (2014). Dirección de Prod. Forestal. 'Sector Forestal, año 2013'.
- Marchadier, H. y Sigaud, P. (2005). Los álamos en la investigación biotecnológica. *Unasylla*, Vol. 556.
- Marcucci S., Sharry S. Torales, S, Zelener N y Gallo L. (2010). Biotecnología Forestal. En: *Biotecnología y Mejoramiento vegetal*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Editores: Dra. Viviana Echenique, Dra. Clara Rubinstein, Ing. Agr. Luis Mroginski y esteban HoppHopp.

- Mariani, C., Beuckeleer, M. D., Truettner, J., Leemans, J., Goldberg, R. B. (1990). Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347: 737-741. - doi: 10.1038/347737a0.
- Marquina, J.; Marlats, R.; y Núñez Cresto, M. (2006). Galerías producidas por *Platypus mutatus* Chapuis en *Populus deltoides* cv. Catfish-2 según el tamaño del fuste y el diámetro, altura y exposición del sector del fuste atacado. *Invest Agrar: Sist Recur For* 15(3), 321-328.
- Marquínez, J. (1998). Aporte a la recuperación de especies vegetales en extinción por micropropagación: Raque (*Vallea stipularis*). Bogotá. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca. CAR.
- Martínez-Pastur, G., Arena, M., Hernández, L., Curvetto, N., Eliasco E. (2005). Histological event during in vitro rooting of *Nothofagus nervosa*. *New Zealand Journal of Botany* 43: 61-70.
- McDowell, N. G., Fisher, R. A., Xu, C., Domec, J. C., Hölttä, T., Mackay, D. S., Sperry, J. S., Boutz, A., Dickman, L., Gehres, N., Limousin, J. M., Macalady, A., Martínez-Vilalta, J., Mencuccini, M., Plaut, J. A., Ogée, J., Pangle, R. E., Rasse, D. P., Ryan, M. G., Sevanto, S., Waring, R. H., Park Williams, A., Yezzer, E. A., Pockman, W. T. (2013). Evaluating theories of drought-induced vegetation mortality using a multimodel–experiment framework. *New Phytologist* Volume 200, Issue 2, Pages 304–321.
- Medina, C., Paredes, A., Rodríguez, M. E., Moreno, M., Belen-Camacho, D., Garcia, D., Ojeda, C., (2010). Evaluation of two starch extraction methods from cotyledons of mango. *Bioagro*, 22 (1): 67-74.
- Meilan, R. (1997). Floral induction in woody angiosperms. *New Forest* 14:179–202.
- Meilan, R., Han, K.H., Ma, C., James, R.R., Eaton, J.A., Stanton, B.J., Hoiem, E., Crockett, R.P. and Strauss, S.H. (2000). Development of glyphosate-tolerant hybrid cottonwoods. *TAPPI Journal*, 83:164-166.
- Meilan, R., Brunner, Skinner, J., Strauss, S. (2001). Modification of flowering in transgenic trees, In: “Molecular breeding of woody plants” (KomamineA, Morohoshi N eds). Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, pp. 247-256.
- Meilan, R., Auerbach, D. J., Ma, C., DiFazio, S. P. and Strauss, S. H. (2002). Stability of herbicide resistance and GUS expression in transgenic hybrid poplars (*Populus* sp.) during several years of field trials and vegetative propagation. *HortScience*, 37:1-4.
- Meilan, R., Ma, C. (2006) Poplar (*Populus ssp.*). In: Wang K (ed) *Methods in molecular biology*, vol 344. *Agrobacterium* protocols, 2nd edn. Humana Press, USA, pp 143–151.
- MINCyT. (2015) <http://www.argentinainnovadora2020.mincyt.gob.ar/wp-content/uploads/2013/03/Recursos-Forestales.pdf>.
- MINCyT, Plan Argentina Innovadora 2020. [http://www.argentinainnovadora2020.mincyt.gob.ar/?page\\_id=312](http://www.argentinainnovadora2020.mincyt.gob.ar/?page_id=312).

- Min, D., Chenmin Yang, B., Chiang, V., Jameel, H., Chang, H. -M. (2014). The influence of lignin-carbohydrate complexes on the cellulase-mediated saccharification II: Transgenic hybrid poplars (*Populus nigra* L. and *Populus maximowiczii* A.) Fuel 116 56–62
- MinAgri (2012). Elaboración de un mapa de plantaciones forestales de la República Argentina de actualización permanente. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. Presidencia de la Nación. Área SIG e Inventario Forestal. Dirección de Producción Forestal. <http://www.minagri.gob.ar/new/0-0/forestacion/inventario/mapa%20de%20planta.html>.
- Molina-Rueda, J. J., Tsai, C. J., Kirby, E. G (2013). The *Populus* superoxide dismutase gene family and its responses to drought stress in transgenic poplar overexpressing a pine cytosolic glutamine synthetase (GS1a). PLoS One: 8(2).
- Montoya, H. L. M. (1991). Cultivo de tejidos vegetales. Universidad Nacional de Colombia.
- Mouradov, A., Sawbridge, T., Hamdorf, B. (1998). Genetic engineering of reproductive sterility in *Pinus radiata*. Acta Horticulturae. 461:417–423.
- Mroginski, E., Rey, H.Mroginski, A. (2003). In vitro plantlet regeneration from Australian Red Cedar (*Toona ciliata*, Meliaceae). New Forests 25: 177-184.
- Murkute, A., y Shanti-patil, M. (2003). Exudation and browning in tissue culture of pomegranate. Agricultural Science Digest. India.
- Nawaz-ul-Rehman, M. S., Mansoor, S., Khan, A. A., Zafar, Y., Briddon, R. W. (2007). RNAi-mediated male sterility of tobacco by silencing TA29. Molecular Biotechnology 36 (2): 159-165. - doi: 10.1007/s12033-007-0025-1.
- Nilsson, O., Aldén T., Sitbon, F., Anthony Little C. H., Chalupa, V., Sandberg, S., Olsson, O. (1992). Spatial pattern of cauliflower mosaic virus 35S promoter-luciferase expression in transgenic hybrid aspen trees monitored by enzymatic assay and non-destructive imaging. 1: 209. doi:10.1007/BF02524751.
- Nizampatnam, N. R., Doodhi, H., Kalinati Narasimhan, Y., Mulpuri, S., Viswanathaswamy, D.K. (2009). Expression of sunflower cytoplasmic male sterility-associated open reading frame, orfH522 induces male sterility in transgenic tobacco plants. Planta 229 (4): 987-1001. - doi: 10.1007/s00425-009-0888-4.
- Noël, N., Leplé, J. C., Pilate, G. (2002). Optimization of *in vitro* micropropagation and regeneration for *Populus interamericana* and *Populus euramericana* hybrids (*P. deltoides*, *P. trichocarpa*, and *P. nigra*) Plant Cell Rep 20:1150–1155.
- Oak Ridge National Laboratory. (2004). Fall Creek Falls Conference: Delivering Computational Science for the Nation. October 17-19, 2004.
- Oliver, S. N., Dennis, E. S., Dolferus, R. (2007) ABA regulates apoplastic sugar transport and is a potential signal for cold-induced pollen sterility in rice. Plant Cell Physiol 48:1319-1330.

- Olsen, J. V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M. L., Jensen, L. J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T. S., Nigg, E. A., Brunak, S., Mann, M. (2010). Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal*. 12;3 (104):ra3. doi: 10.1126/scisignal.2000475.
- Ordoñez M., MA. (2005). Establecimiento del cultivo in vitro de hierba luisa, *Aloysia triphylla* (L'herriet) Brito. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Escuela de Post grado). Sp.
- Oribe, Y., Funada, R., Shibagaki, M., Kubo, T. (2001). Cambial reactivation in locally heated stems of evergreen conifer *Abies sachalinensis* (Schmidt) Masters. *Planta*. 212:684–691.
- Oribe, Y., Kubo, T. (1997). Effect of heat on cambial reactivation during winter dormancy in evergreen and deciduous conifers. *Tree Physiology*. 17:81–87.
- Orozco, M., Narváez, J. (1994). Genetic transformation techniques in plant biotechnology. Literatura complementaria curso-taller internacional de biología molecular en la investigación agropecuaria. Corpoica. Módulo II: Ingeniería genética y fitomejoramiento.
- Oshino, T., Abiko, M., Saito, R., Ichiishi, E., Endo, M., Kawagishi-Kobayashi, M., Higashitani, A. (2007). Premature progression of anther early developmental programs accompanied by comprehensive alterations in transcription during high-temperature injury in barley plants. *Mol Genet Genomics*. 2007 Jul;278 (1):31-42.
- Paddon, C. J., Hartley, R. W. (1986). Cloning, sequencing and transcription of an inactivated copy of *Bacillus amyloliquefaciens* extracellular ribonuclease (barnase). *Gene* 40 (2-3): 231-239. - doi: 10.1016/0378-1119(85)90045-9.
- Padró Simarro, A. (1992). Clones de Chopo para el valle medio del Ebro. Servicio de Investigación Agraria, Diputación General de Aragón. Zaragoza, España. 203 pp.
- Palmiter, R. D., Behringer, R. R., Quaife, C. J., Maxwell, F., Maxwell, I. H., Brinster, R. L. (1987). Cell lineage ablation in transgenic mice by cell-specific expression of a toxin gene. *Cell* 50: 435-443. - doi: 10.1016/0092-8674(87)90497-1.
- Parada Ponce, D. M., Villegas Monter, A (2009). Propagación *in vitro* del híbrido almendro x durazno H1. *Rev. fitotec. Mex* vol.32, n.2, pp.103-109. Disponible en: <[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018773802009000200005&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018773802009000200005&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0187-7380.
- Pawlowski, W. P. and Somers, D. A. (1996). Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. *Molecular Biotechnology*. Aug;6(1):17-30.
- Peña, L.; Martin-Trillo, M.; Juárez, J.; Pina, J. A.; Navarro, L.; Martinez-Zapater, J. (2001). Constitutive expression of *Arabidopsis* LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nature Biotechnology*, New York, v. 19, n. 3, p. 263-267.
- Pilipovic, A.; Orlovic, S.; Nikolic, N.; Galic, Z. (2006). Investigating potential of some poplar (*Populus sp.*) clones for phytoremediation of nitrates through biomass production.

Environmental Applications of Poplar and Willow Working Party. 18-20 May 2006, Northern Ireland.

- Pincemin, J. M., Monlezun, S. J., Zunino, H., Cornaglia, P. S., Borodowski, E. (2007). Sistemas Silvopastoriles en el Delta del Río Paraná: Producción de materia seca y estructura de gramíneas templadas bajo álamos. APPA ALPA- Cusco, Perú.

- Porsch, P., Janke, A., Düring, K. (1998). A plant transformation vector with a minimal T-DNA II. Irregular integration patterns of the T-DNA in the plant genome. *Plant Mol. Biol.* 37: 581-585.

-Potrykus, I., Bilang, R., Futterer, J., Sauter, C., Schrott, M., Spangenberg G. (1998). Genetic engineering of crop plants. In: *Agricultural Biotechnology*. Ed. by Arie Altman. Marcel Dekker, Inc. New York. 770 p.

- Prakash, R., Satory, D., Dray, E., Papusha, A., Scheller, J., Kramer, W., Krejci, L., Klein, H., Haber, J.E., Sung, P., Ira, G. (2009). Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: implications for crossover control in mitotic recombination. *Genes Dev* 23(1):67-79.

- Purves, W.K., Sadava, D., Orians, G.H., Heller, H.C. (2006). *Biologie*. 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- Qian, Z., Zhiyi, Z., Shanzhi, L. and Yuanzhen, L. (2004). Molecular detection and insect feeding test of 2-year old transgenic poplar with CPT1 gene. 22nd Session of the International Poplar Commission. FAO.

- Ramilo, D. (2014). Producción de Salicáceas, Módulo 3. Jornada de capacitación para municipios. Estación forestal Parque Pereyra Iraola, Vivero Darwin. 3 de Junio [http://www.maa.gba.gov.ar/2010/SubPED/Agricultura/archivos/Modulo3\\_Vivero\\_de\\_Salicaceas.pdf](http://www.maa.gba.gov.ar/2010/SubPED/Agricultura/archivos/Modulo3_Vivero_de_Salicaceas.pdf).

- Ramírez, M., Santos, R., Isea, F. (2000). Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava* L. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, vol. 17, p. 217-225.

- Ramírez, M.; Isea, F.; Santos, R.; León de Sierralta, S.; Urdaneta, A. (2005). Hongos contaminantes en el cultivo *in vitro* de ápices de plantas adultas de *Annona muricata* tratados con Hipoclorito de Sodio, en el estado Zulia, Venezuela. En: Acosta, M (eds.) *Micobiota epífita y contaminantes fungosos del establecimiento in vitro de Eucalyptus grandis*. Manejo integrado de plagas y agroecología, vol. 75, p. 60-63.

- Rebolledo-Camacho, V., Aparicio-Rentería, A., Cruz-Jiménez, H. (2006). Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pinos. *Foresta Veracruzana* 8(2):27-32.

- Roca, W., Mrogrinski, L. (1993). Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. 1993, 969p.

- Rohde, A., y Bhalerao, R. (2007). Plant dormancy in the perennial context. *Trends in Plant Science* 12(5):217-23.

- Rood, S. B., Goater, L. A., Mahoney, J. M., Pearce, C. M., Smith, D. G. (2007). Floods, fire, and ice: disturbance ecology of riparian cottonwoods The review is one of a selection of papers published in the Special Issue on Poplar Research in Canada. *Canadian Journal of Botany* 85: 1019–1032.
- Roque, A., y Ardisana, E. (2006). Obtención de posturas de Papaya (*Carica papaya* L.) cv. Maradol roja por cultivo *in vitro* de segmentos nodales de plantas jóvenes. Las Tunas, Cuba.
- Roque, E., Gómez, M. D., Ellul, P., Wallbraun, M., Madueño, F., Beltrán, J. P., Cañas, L. A. (2007). The PsEND1 promoter: a novel tool to produce genetically engineered male-sterile plants by early anther ablation. *Plant Cell Rep* 26:313-325.
- Rotino, G. L., Perri, E., Zottini, M., Sommer, H. and Spena, A. (1997). Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature Biotechnology*, 15:1398-1401.
- Rottmann, W. H., Meilan, R., Sheppard, L. A., Brunner, A. M., Skinner, J. S., Ma, C. P., Cheng, S. P., Jouanin, L., Pilate, G., Strauss, S. H. (2000). Diverse effects of overexpression of LEAFY and PTLF, a poplar (*Populus*) homolog of LEAFY/FLORICAULA, in transgenic poplar and Arabidopsis. *Plant Journal* 22: 235–245.
- Sakata, T., Oda, S., Tsunaga, Y., Shomura, H., Kawagishi-Kobayashi, M., Aya K. (2014). Reduction of gibberellin by low temperature disrupts pollen development in rice. *Plant Physiol.* 164 2011–2019. 10.1104/pp.113.234401.
- Sakata, Y., Nakamura, I., Taji, T., Tanaka, S., Quatrano, R.S. (2010). Regulation of the ABA-responsive Em promoter by ABI3 in the moss *Physcomitrella* patens: role of the ABA response element and the RY element. *Plant Signaling & Behavior* 5: 1061–1066.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Auflage, Band 3, Appendix E6, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanders, P. M., Bui, A. Q., Weterings, K., McIntire, K. N., Hsu, Y. C., Lee, P. Y., Truong, M. T., Beals, T. P., Goldberg, R. B. (1999). Anther developmental defects in Arabidopsis thaliana male-sterile mutants. *Sex. Plant. Reprod.* 11, 297-322.
- Sanhueza, A. (1998). Cultivo del álamo. (*Populus spp.*). Parte 2. Corporación Nacional Forestal. 214 pp.
- Schultz, E. A. and Haughn, G. W. (1991). LEAFY, a homeotic gene that regulates inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 3 (8): 771-781.
- Schulz, S.; Keatinge, J. D. H.; Wells, G. J.; Shrestha, R., (2000). Effect of legume management on forage production and residual effects on upland rice. *J. Agron. Crop Sci.*, 184 (3): 173-180.
- Sellmer, J. C., McCown, B. H., Haissig, B. E. (1989). Shoot culture dynamics of six *Populus* clones. *Tree Physiol* 5:219–227.
- Serrano, L., Rochange, F., Semblat, J. P., Marque, C., Teulieres, C., Boudet. A. M. (1996). Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistics: complementary development of

procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue. *J Exp Bot.* 47:285–290. doi: 10.1093/jxb/47.2.285.

- Serventi N. y García J. (2004). *Revista SAGPyA Forestal* N° 32: 24-27.

- Sharma, K. D., Nayyar, H. (2014). Cold stress alters transcription in meiotic anthers of cold tolerant chickpea (*Cicer arietinum* L.) *BMC Res Notes.* 11;7:717. doi: 10.1186/1756-0500-7-717.

- Sharry S. (2005). Avances en la transformación genética de árboles. En: Avances de la Biotecnología Agropecuaria y Forestal en México. Ed.: González Rosas H. Y Jacinto Hernández C. Asociación Nacional de Biotecnología Agrícola y Forestal A.C México, ISBN-968-02-0202-X. Pp 259-273.

- Sharry, S. (2013). “Plan Argentina Innovadora 2020: Producción y Procesamiento de Recursos Forestales”. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación.

-Shen, L., Chen, Y., Su, X., Zhang, S., Pan, H., Huang, M. (2012). Two *FT* orthologs from *Populus simonil* Carrière induce early flowering in *Arabidopsis* and poplar trees. *Plant Cell Tiss Org Cult* 108:371-379.

- Shim, D., Kim, S., Choi, Y. I., Song, W. Y., Park, J., Youk, E. S., Jeong, S.C., Martinoia, E., Noh, E. W., Lee, Y. (2013). Transgenic poplar trees expressing yeast cadmium factor 1 exhibit the characteristics necessary for the phytoremediation of mine tailing soil. *Chemosphere.* 90(4):1478-86. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.09.044.

- Skinner, J. S., Meilan, R., Ma, C., Strauss, S. (2003). The *Populus* PTD promoter imparts floral-predominant expression and enables high levels of floral-organ ablation in *Populus*, *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Molecular Breeding* 12:119-132. - doi: 10.1023/A:1026044927910.

- Smith, A. C. (1943). The American species of *Drimys*. *Journal of the Arnold Arboretum*, 24, 1-33.

-Smith, M. B., Horner, H. T., Palmer, R. G. (2001) Temperature and photoperiod effects on sterility in a cytoplasmic male-sterile soybean. *Crop Sci* 41:702-704.

- Song, J.; Lu, S.; Chen, Z.; Lourenco, L. and Chiang, V. (2006). Genetic Transformation of *Populus trichocarpa* Genotype Nisqually-1: A Functional Genomic Tool for Woody Plants. *Plant Cell Physiol.* 47(11): 1582–1589.

- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* Volume 98, Issue 3, 5 November, Pages 503-508, IN3-IN5, 509-517.

- Srinivasan, C., Dardick, C., Callahan, A., Scorza, R. (2012). Plum (*Prunus domestica*) trees transformed with poplar FT1 result in altered architecture, dormancy requirement, and continuous flowering. *PLoS ONE* 7: e40715.

- Stanton, B.; Eaton, J.; Johnson, J.; Rice, D.; Schuette, B.; Moser, B. (2002). Hybrid Poplar in the Pacific Northwest: The Effects of Market-Driven Management. *Journal of Forestry*, Volume 100, Number 4, 1 June 2002, pp. 28-33(6).
- Strauss, S. H., Rottmann, W. H., Brunner, A. M., Sheppard, L. A. (1995). Genetic engineering of reproductive sterility in forest trees. *Mol. Breeding*, **1**, 1-22.
- Strauss, S. H., Knowe S. and Jenkins J. (1997). Benefits and risk of transgenic, Roundup Ready® cottonwoods. *Journal of Forestry*, **95**:12-19.
- Strauss, S. H., DiFazio, S. and Meilan, R. (2003). Genetically modified poplars in context. *Forestry Chronicle*, **77**:1-9.
- Su, J., Chow, B., Boulianne, G. L., Wilde, A. (2013). The BAR domain of amphiphysin is required for cleavage furrow tip-tubule formation during cellularization in *Drosophila* embryos. *Mol. Biol. Cell* **24**(9): 1444-1453.
- Sun, K., Hunt, K., Hauser, B. A. (2004). Ovule abortion in *Arabidopsis* triggered by stress. *Plant Physiol* **135**:2358-2367.
- Sun, K., Cui, Y., Hauser, B. A. (2005). Environmental stress alters genes expression and induces ovule abortion: reactive oxygen species appear as ovules commit to abort. *Planta* **222**:632-642.
- Surga, J.G., Guevara, Y. (1994). Pruebas de desinfección para controlar la contaminación bacteriana en el cultivo in vitro de ápices caulinares de banano (*Musa AAA*). *Fitopatología Venez.*, vol. 7, no. 1, p. 14-17.
- Tabiyeh, D., Bernard F. y Shacker H. (2006). Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. *Acta Horticulturae* **726**: 201-204.
- Tang, W; Newton, R. (2004). Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science* **167**: 621-628.
- Tang, W, Newton R, Charles TM (2006). Plant regeneration through multiple adventitious shoot differentiation from callus cultures of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.). *Journal of Plant Physiology* **163**: 98-101.
- Taylor, G. (2002). *Populus: Arabidopsis* for forestry. Do we need a model tree? *Annals of Botany* Dec; **90**(6):681-9.
- Tempé, J, Petit, A., Holsters, M., Montagu, M., Schell, J. (1977). Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: Possible relation to transformation in crown gall. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. Jul; **74**(7):2848-9.
- Tinland, B. and Hohn, B. (1995). Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. In Setlow, J.K. (ed.) *Genetic Engineering*. Plenum Press, NY, USA, pp. 209–229.

- Tränkner, C., Lehmann, S., Hoenicka, H., Hanke, M.V., Fladung, M., Lenhardt, D., Dunemann, F., Gau, A., Schlangen, K., Malnoy, M., Flachowsky, H. (2010). Over-expression of an FT-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta* 232: 1309-1324.
- Tsai, C J., Podila, G. K. and Chiang, V. L. (1994). Agrobacterium-mediated transformation of quaking aspen (*Populus tremuloides*) and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 14:94-97.
- Tuominen H, Sitbon F, Jakobsson C, Sandberg G, Olsson O, Sundberg B (1995). Altered growth and wood characteristics in transgenic hybrid aspen expressing *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA indoleacetic acid-biosynthetic genes. *Plant Physiol* 109:1179–1189.
- Tuominen H, Puech L, Fink S, Sundberg B (1997). A radial concentration gradient of indole-3-acetic acid is related to secondary xylem development in *Populus*. *Plant Physiol* 115:577–585.
- Tuskan, G. A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R.R., Bhalerao, R.P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G.L., Cooper, D., Coutinho, P.M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroove, S., Déjardin, A., Depamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehrling, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjärvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leplé, J.C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D.R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouzé, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C.J., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y., Rokhsar, D. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*. 2006 Sep 15;313(5793):1596-604.
- Tzfira, T., Vainstein, A., and Altman, A. (1999). A rol-Gene expression in transgenic aspen (*Populus tremula*) plants results in accelerated growth and improved stem production index. *Trees - Structure and Function*, 14:49-54.
- Udvardi, M. K., Czechowski, T., Scheible, W. R. (2008). Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *Plant Cell* ;20:1736-1737.
- Uribe, M. E., Sandoval, M., Méndez, A., Mora, F., Delaveau, C. (2011). *In vitro* rooting of *Beilschmiedia berteroaana*, endemic to the South Central area of Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 38(1): 107-115.
- Uribe, M.E, Ulloa, J., Delaveau, C., Sáez, K., Muñoz, F., Cartes, P. (2012). Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana. Botánica*, 69(1), 105-112. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432012000100010>.

- Van Staden, J., Sparg, S.G., Kulkarni, M.G. and Light, M.E. (2006). Post-germination effects of the smoke-derived compound 3-methyl-2Hfuro[2,3-c]pyran-2-one, and its potential as a pre-conditioning agent. *Field Crops Res.* 98:98–105.
- Vettori, C., Gallardo, F., Häggman, H., Kazana, V., Migliacci, F., Pilate, G., Fladung, M. (2016). Biosafety of Forest Transgenic Trees: Improving the Scientific Basis for Safe Tree Development and Implementation of EU Policy Directives, Springer, Feb, 20- Nature – 337p.
- Vicien, C. (2011). En [gmc.org/files/cera/docs/colombia\\_2011/carmen\\_vicien.pdf](http://gmc.org/files/cera/docs/colombia_2011/carmen_vicien.pdf).
- Villalobos, V. M y Thorpe, T. A. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados En: Roca, W y Mroginski, L. A. (eds.). Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones CIAT, Cali, Colombia. pp. 127-141.
- Virmani S. S. & Ilyas-Ahmed M. (2001). Environment-sensitive genic male sterility in crops. In *Advances in Agronomy* (ed. D.L. Sparks) pp. 159–169. Elsevier Press, San Diego, CA, USA.
- Voelker, S. L., Lachenbruch, B., Meinzer, F. C., Kitin, P., Strauss, S. H. (2010). Transgenic poplars with reduced lignin show impaired xylem conductivity, growth efficiency and survival. *Plant, Cell & Environment*, 34: 655–668. doi:10.1111/j.1365-3040.2010.02270.
- Wada, M., Cao, Q., Kotoda, N., Soejima, J. y Masuda T. (2002). Apple has two orthologues of FLORICAULA/ LEAFY involved in flowering. *Plant Molecular Biology* ; 49:567–577.
- Wang, G., Castiglione, S., Chen, Y., Li, L., Han, Y., Tian, Y., Gabriel, D. W., Han, Y., Mang, K. and Sala, F. (1996). Poplar (*Populus nigra* L.) plants transformed with a *Bacillus thuringiensis* toxin gene: insecticidal activity and genomic analysis. *Transgenic Research*, 5:289-301.
- Wang, X.-R., Tsumura, Y., Yoshimaru, H., Nagasaka, K., and Szmidt, A. E. (1999). Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast rbcL, MATK, RPL20-RPS18 spacer, and TRNV intron sequences. *American Journal of Botany* 86: 1742-1753.
- Wang, M. C., Bohmann, D., Jasper, H. (2003). JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Dev. Cell* 5(5): 811--816.
- Wang, X. L. and Li, X. B. (2009). The GhACS1 gene encodes an acyl-CoA synthetase which is essential for normal microsporogenesis in early anther development of cotton. *Plant J.* 57:473–486.
- Weber, H., Bernhardt, A., Dieterle, M., Hano, P., Mutlu, A., Estelle, M., Genschik, P., Hellmann, H. (2005). *Arabidopsis* AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family *Plant Physiol*, 137, pp. 83–93
- Wei, H., Meilan, R., Brunner, A. M., Skinner, J. S., Ma, C., Gandhi, H. T., Strauss, S. H. (2006). Field trial detects incomplete barstar attenuation of vegetative cytotoxicity in *Populus* trees containing a poplar LEAFY promoter::barnase sterility transgene. *Molecular Breeding* 19 (1): 69-85. doi: 10.1007/s11032-006-9045.
- Weigel, D., Nilsson, O. (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 377: 95-500.

- Wenck A.R., Quinn M., Whetten R.W., Pullman G., Sederoff R. (1999). High-efficiency *Agrobacterium* mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*). *Plant Molecular Biology*, 39: 407–416.
- Wenzel, S., Flachowsky, H., Hanke, M. V. (2013). The Fast-track breeding approach can be improved by heat-induced expression of the FLOWERING LOCUS T genes from poplar (*Populus trichocarpa*) in apple (*Malus x domestica Borkh.*) *Plan Cell Tiss Org Cult* 115:127-137.
- Willing, R. R. and Pryor, L.D. (1976). Interspecific hybridization in poplar. *Theor. Appl. Genet.* 47:141-151.
- Wildholm, J. M. (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.*, 47 pp. 189–194.
- Wilson, M. E., Jensen, G. S., Haswell, E. S. (2011). Two mechanosensitive channel homologs influence division ring placement in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell* 23: 2939–2949.
- Wilson, Z.A., Morroll, S.M., Dawson, J., Swarup, R., Tighe, P.J. (2001) The *Arabidopsis* MALE STERILITY1 (MS1) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. *The Plant Journal* 28:27–39.
- Winans, S. C. (1992). Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol Rev.* 1992 Mar;56 (1):12-31.
- Winder, R. S., Lamarche, J., Constabel, C. P., Hamelin, R. C. (2013). The effects of hightannin leaf litter from transgenic poplars on microbial communities in microcosm soils. *Frontiers in Microbiology. Terrestrial Microbiology, Volume 4, Article 290.*
- Wood, V., Rutherford, K. M., Ivens, A., Rajandream, M. A., Barrell, B. (2001). A re-annotation of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Comp Funct Genomics* 2(3):143-54.
- Woodward, A. W., and Bartel, B. (2005). Auxin: Regulation, action, and interaction. *Ann. Bot. (Lond.)* 95, 707–735.
- Wullschleger S. D., Weston D. J., Davis J. M. (2009). *Populus* responses to edaphic and climatic cues: emerging evidence from systems biology research. *Crit. Rev. Plant Sci.* 28, 368–374 [10.1080/07352680903241246](https://doi.org/10.1080/07352680903241246).
- Xi, X., Guo, L., Xu, W., Zhang, J., Li, B. (2014). Megasporogenesis, megagametogenesis, and induction of 2n eggs with colchicine in poplar section Aigeiros, *Scandinavian Journal of Forest Research*, 29:6, 527-536, DOI: [10.1080/02827581.2014.935472](https://doi.org/10.1080/02827581.2014.935472).
- Xia, Y., Busov, V., Zhao, N., Meilan, R., McDonnell, L. M., Coleman, H. D., Mansfield, S. D., Chen, F., Li, Y., Cheng, Z. M (2011). Transgenic *Populus* Trees for Forest Products, Bioenergy, and Functional Genomics. *Journal: Critical Reviews in Plant Sciences - CRIT REV PLANT SCI*, vol. 30, no. 5, pp. 415-434.
- Xiang, C. (1999). A mini binary vector series for plant transformation. *Plant. Mol. Biol.* 40:711-717.

- Xiaoming, J. and Hualing, Z. (2014). FT gene with a CAMV35S promoter to control early flowering of transgenic poplar. *J Zhejiang AyF* 31:404-409.
- Xiaoming, J., Hualing, Z., Jungfeng, F. (2011). System optimization of precociously flowering of poplar induced by FT gene controlled by a heat shock promoter. *Sci Silvae Sin* 47: 37-43.
- Yan Huang, Liu, H., Jia, Z., Fang, Q., and Luo, K. (2012). Combined expression of antimicrobial genes (Bbchit1 and LJAMP2) in transgenic poplar enhances resistance to fungal pathogens *Tree Physiology* Volume 32, Issue 10Pp. 1313-1320.
- Yang, W. C., Ye, D., Xu, J., Sundaresan, V. (1999). The SPOROCTELESS gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes and Development* 15; 13(16):2108-17.
- Ye, X., Busov, V., Zhao, N., Meilan R., McDonnell, L. M., Coleman, H. D. (2011). Transgenic populus trees for forest products, bioenergy, and functional genomics. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 30, 415–434 10.1080/07352689.2011.605737.
- Yuceer, C., Land, S. B., Jr., Kubiske, M. E., and Harkess, R. L. (2003). Shoot morphogenesis associated with flowering in *Populus deltoides* (Salicaceae). *Am. J. Bot.* 90 194–204.
- Zambryski, P. C. (1992). Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mo1 Biol* 43: 465-490.
- Zhang, C., Norris-Caneda, K. H., Rottmann, W. H., Gullledge, J. E., Chang, S., Kwan, B. Y. H., Thomas, A. M., Mandel, L. C., Kothera, R. T., Victor, A. D., Pearson, L., Maud A. W. (2012). Hinchee Control of Pollen-Mediated Gene Flow in Transgenic Trees *Plant Physiology!*, Vol. 159, pp. 1319–1334.
- Zhang, L. Q., Chen, Q. J., Yuan, Z. W., Xiang, Z. G., Zheng, Y. L., Liu, D. C. (2008). Production of aneuploid and euploid sporocytes by meiotic restitution in fertile hybrids between durum wheat Langdon chromosome substitution lines and *Aegilops tauschii*. *Journal of Genetics and Genomics* 35:617–623.
- Zhang, M., Hanna, M., Li, J., Butcher, S., Dai, H., Xiao, W. (2010). Creation of a hyperpermeable yeast strain to genotoxic agents through combined inactivation of PDR and CWP genes. *Toxicol Sci* 113(2):401-11.
- Zhou, J., Wang, J., Yufang, B., Wang, L., Tang, L., Xiang, Y., Ohtani, M., Demura, T., Zhuge, Q. (2014). Overexpression of PtSOS2 Enhances Salt Tolerance in Transgenic Poplars. *Plant Mol Biol Rep* (2014) 32:185–197.
- Zhu, J., Chen, H., Li, H., Gao, J.F., Jiang, H., Wang, C., Guan, Y.F., Yang, Z.N. (2008). Defective in Tapetal development and function 1 is essential for anther development and tapetal function for microspore maturation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 55(2):266-77. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03500.

- Zou J. J., Wei F. J., Wang C., Wu J. J., Ratnasekera D., Liu W. X., Wu W. H. (2010). *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid- and Ca<sup>2+</sup>-mediated stomatal regulation in response to drought stress. *Plant Physiol.* 154: 1232–1243.
- Zupan, J. R. and Zambryski, P. (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* 1995 Apr; 107(4): 1041–1047.
- Reunión Plagas Forestales emergentes en el Delta del Paraná. Asociación Forestal Argentina (AFoA). [http://www.foa.org.ar/destacados\\_detalle.php?p=70](http://www.foa.org.ar/destacados_detalle.php?p=70).
- Reunión interinstitucional por plagas forestales en el Delta. Técnicos Regionales para Delta de la Dirección de Producción Forestal. <http://buenosairesforestal.blogspot.com.ar/2013/04/reunion-interinstitucional-sobre-plagas.html>.
- Nature protocols, 2006. Protocol-online
- [www.yeastlab.vbiol.slu.se/WCN/DAagrotransf](http://www.yeastlab.vbiol.slu.se/WCN/DAagrotransf)
- <http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>

# Anexos

## Anexo 2.1

### Equipo de laboratorio utilizado (orden alfabético)

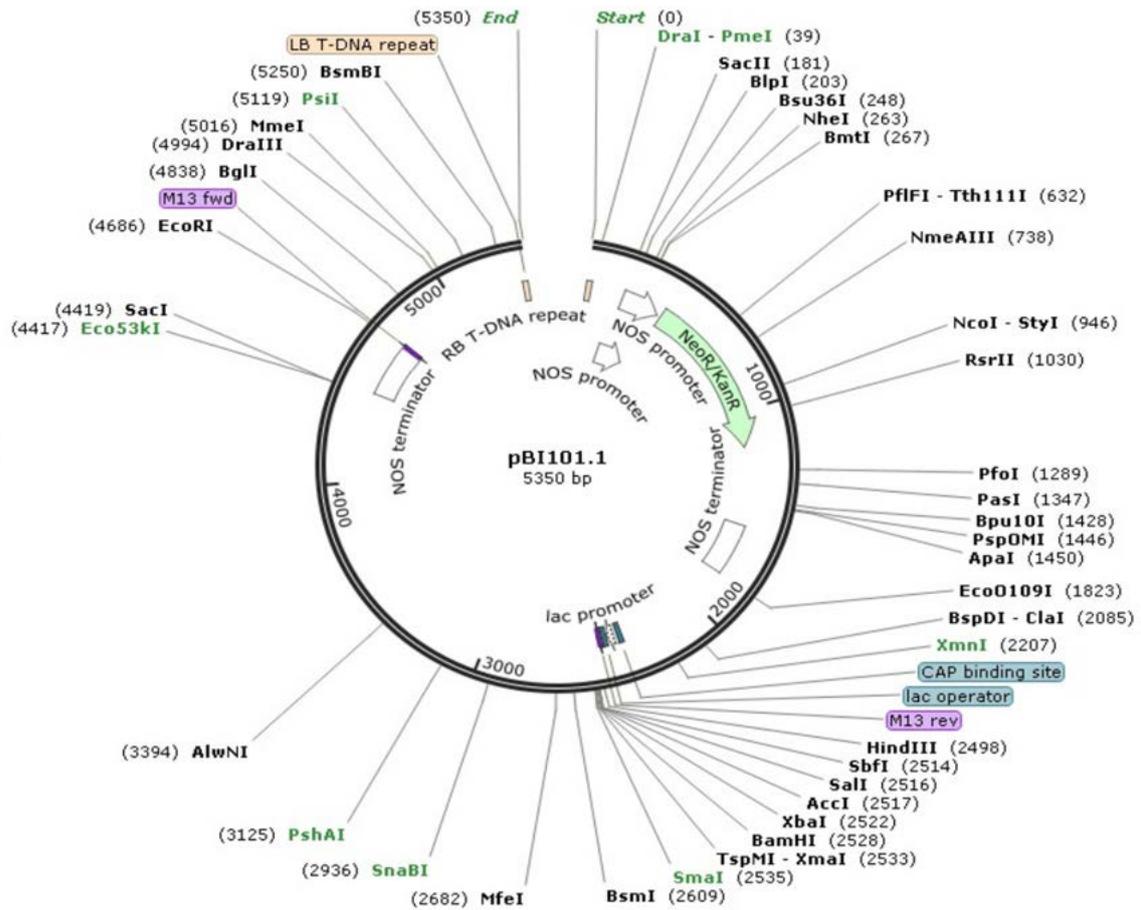
A menos que se indique lo contrario, la sede de fabricación es Alemania.

<b>Equipos</b>	<b>Fabricantes</b>
Agitador oscilante ``WT 17``	Biometra (Göttingen)
Aparato de documentación de geles	Intas (Göttingen)
Balanza de precisión	Sartorius (Göttingen)
Balanza de precisión ``Mettler P2000N``	Mettler-Toledo (Gießen)
Balanza de precisión ``PCB``	Kern (Balingen)
Baño de agua	GFL (Burgwedel)
Bioanalyzer ``Agilent 2100``	Agilent Technologies (Waldbronn)
Bloque caliente	Deelux Labortechnik (Gödenstorf)
Cámaras de electrophoresis y accesorios	Biometra (Göttingen)
Centrífuga ``Biofuge pico`` y ``Megafuge 1.0R``	Heraeus (Hanau)/Thermo Scientific (Waltham, USA)
Centrífuga de mesa ``Biofuge 13``	Heraeus (Hanau)/Thermo Scientific (Waltham, USA)
Centrífuga fría ``Biofuge 28 RS``	Heraeus (Hanau)/Thermo Scientific (Waltham, USA)
Centrífuga fría ``Fresco 21``	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Centrífuga fría ``Mikro 200R``	Hettich (Tuttlingen)
Concentrador al vacío ``Speed Vac Plus SC110A``	Savant/Thermo Scientific (Waltham, USA)
Espectrofotómetro ``NanoDrop 1000 3.7.1``	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Esterilizador de perlas de vidrio ``Steri350``	Keller (Burgdorf, Suiza)
Esterilizador de vapor ``Laboklav Eco``	SHP Steriltechnik (Detzel Schloss/Satuelle)
Esterilizador de vapor ``Varioklav``	HP Medizintechnik (Oberschleißheim)
Flujo laminar estéril	BDK/Weiss Technik (Sonnenbühl-Genkingen)
Flujo laminar estéril ``Herasafe``	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Flujo laminar estéril ``Mars Safety Class 2``	Scanlaf/Labogene (Lyngø, Dinamarca)
Fuentes de alimentación ``PHERO-stab. 500``	Biotec-Fischer (Reiskirchen)
Horno microondas	Panasonic (Kadoma, Japan) und Bosch (Stuttgart)
Incubador de hibridización ``GFL 3032``	GFL (Burgwedel)
Magnéticos ``Cimarec i Poly`` y ``Variomag Mono``	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Magnéticos ``Ikamag Reo`` y ``Ikamag Ret``	IKA Labortechnik (Staufen)
Medidor de luz ``LI-185B``	LI-COR (Lincoln, USA)
Micropipetas	Eppendorf (Hamburg)
Mini centrífuga ``Sprout``	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Moedor vibratorio ``MM300``	Retsch (Haan)
pH-Metro	WTW (Weilheim)
Pipetas multicanal	Biohit (Helsinki, Finlandia)
qRT-PCR ``Stratagene Mx3000P``	Stratagene (Santa Clara, USA)
Termoagitador ``HLC``	Ditabis (Pforzheim)
Termoagitador ``PocketBloc``	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf)
Termociclador ``LabCycler``	SensoQuest (Göttingen)
UV-Crosslinker ``UV Stratalinker 2400``	Stratagene (Santa Clara, USA)
Vortex-Mezclador ``VF2``	IKA Labortechnik (Staufen)

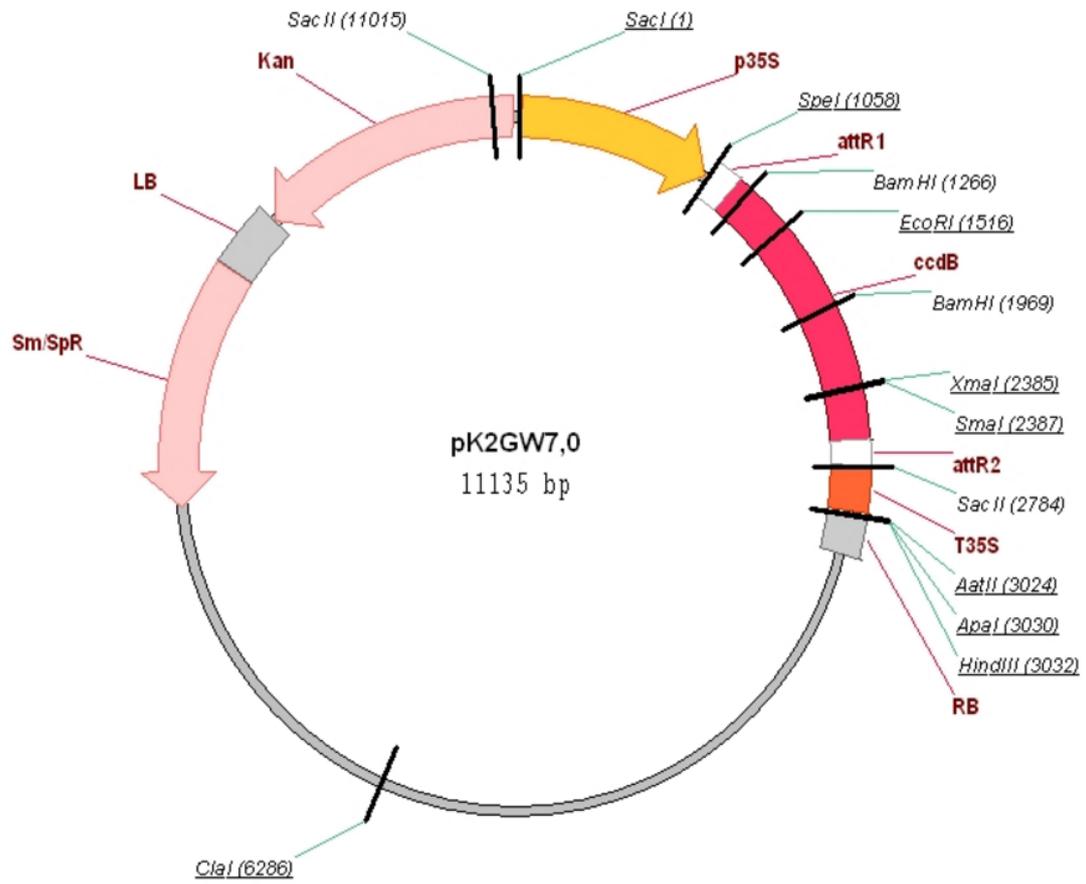
## Anexo 2.2

### Esquema de los vectores utilizados para las transformaciones

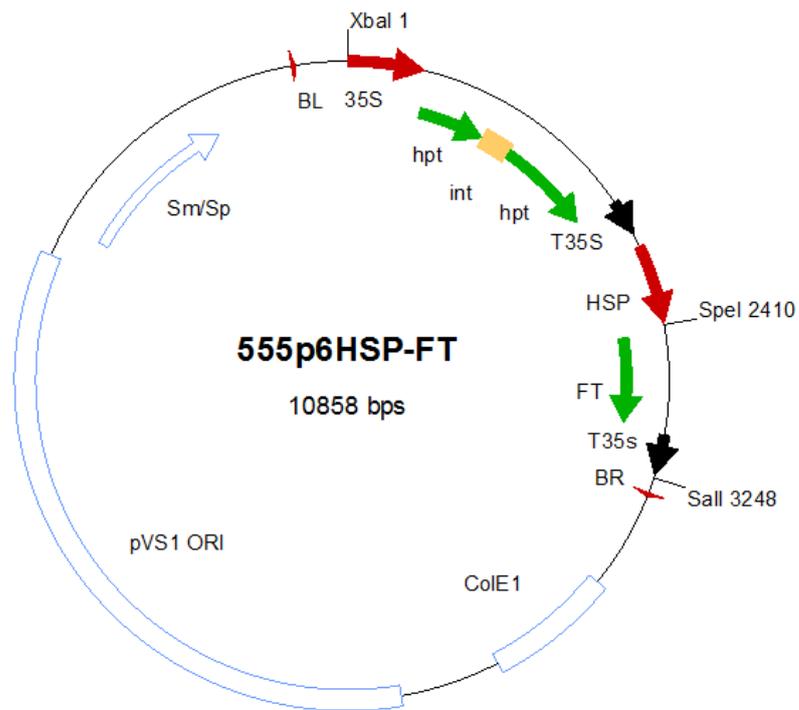
#### pBI101



# pK2GW7



**P6i**



## Anexo 3.1

### Grado de avance Beca Tipo I CONICET. Año 2013.

**Título:** Optimización del cultivo de tejidos y transformación genética de *Populus deltoides* cv. Australia 129/60, para obtener plantas tolerantes a herbicidas.

**Objetivo general:** Obtener *Populus deltoides* cv. 129/60 tolerante a herbicidas.

**Objetivos particulares:**

**A-** Generar material vegetal por cultivo *in vitro* a través de la optimización de un procedimiento de organogénesis para su posterior uso en ensayos de transformación genética.

**B-** Optimizar la eficiencia de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando una construcción plasmídica que lleve un gen reportero y un agente de selección para la transformación de distintos explantes de *Populus deltoides* cv. 129/60.

**C-** Transformar genéticamente *Populus deltoides* cv. Australia 129/60 en las condiciones optimizadas con el gen de resistencia a herbicidas.

#### Actividades realizadas

**A-** Establecimiento del protocolo de cultivo *in vitro* para clones de *Populus deltoides*.

**Material vegetal de partida:** estacas de *Populus deltoides* cv. Australiano 129/60 y *Populus x euroamericana* Ragonesse 22 INTA (incorporado al plan por su uso extendido en el Delta y sur de Santa Fe) provenientes de ensayos clonales evaluados, ubicados en el Vivero Darwin (Prov. de Buenos Aires) y en la Estación Experimental JH de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP.

**Acondicionamiento, limpieza y juvenilización del material de partida:** las estacas colectadas a campo en el mes de julio de 2011 (durante el reposo vegetativo) se trataron con fungicida y bactericida Kasumyn® y se colocaron en el invernáculo del CEPROVE-UNLP. Para obtener brotes jóvenes, se utilizó la técnica de estaquillado y la de brotación (forced flushing, Vieitez *et al*, 1994). Para el estaquillado, se cortaron segmentos de 35-40 cm., se colocaron en sustrato tierra-perlita-vermiculita (6:3,5:0,5) (Abedini *et. al.*, 2008), y se trataron con solución de de Acido naftalén acético (ANA) 25 ppm, durante 48h, para inducir su enraizamiento y posterior brotación (Fig. 1). Para la técnica de brotación inducida, las estacas de 3-5 cm de diámetro, de los 2 genotipos, se cortaron en segmentos de 50 cm. Se colocaron horizontalmente en bandejas con sustrato tierra-perlita-vermiculita (6:3,5:0,5) y en cama caliente. Las condiciones ambientales fueron: temperatura de 24 °C, luz día y humedad relativa del 80%. (Fig.2).



Fig. 1: Estaquillado de *P. deltoides*



Fig. 2: Forced flushing de *P. deltoides*

Todas las estacas formaron brotes 15-20 días después, tanto por estaquillado como por forced flushing. Estos brotes juveniles fueron utilizados para obtener explantos (hojas y secciones nodales) para cultivo *in vitro*.

**Desinfección establecimiento *in vitro* de explantos:** los explantes se desinfectaron siguiendo los protocolos de Bueno M.A *et al.*, (1992); Dagoberto Castro R. *et. al.* (2010) modificados y se colocaron en medio de aislamiento (agar 8 gr/L, sacarosa 20gr/L, agua sin PGR). Transcurridos 15 días de cultivo se evaluaron los porcentajes de mortalidad (%M) y contaminación (%C), considerando los hongos, levaduras y bacterias como agentes contaminantes. En esta investigación se consideró "explante establecido" aquel que transcurrido 15 días de cultivo estaba libre de contaminantes visibles. Uno de los inconvenientes encontrados en este período fue la dificultad para establecer material libre de contaminación. En todos los ensayos realizados, con diferentes explantos y plantas madre, se observó contaminación con hongos y bacterias. El material

contaminado fue enviado al Laboratorio de Fitopatología de la FCAYF para ser analizado e identificar los patógenos, con el objeto de determinar el mejor tratamiento para limpiar el material. Los resultados demostraron que las plantas madres utilizadas están contaminadas endógenamente con diversos hongos y bacterias. Los hongos encontrados en brotes y yemas son *Deuteromicetes* (hongos patógenos de plantas superiores): *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*, orden *Pleosporales forma Sphareopsidales*, sin poder identificar la especie. En base a esto, se diseñaron los siguientes experimentos (cinco repeticiones, se muestran los promedios):

- Método de desinfección con hipoclorito de sodio comercial (55g/l): los explantes fueron previamente sumergidos en fungicida Benomyl (800 ppm) por 2 hs y colocados en etanol 70% durante 30 segundos. Tabla 1. Ensayo con hipoclorito de sodio:

Explante	Hipoclorito (%)	Tiempo (min.)	% sin contaminación
Hojas	10	10	35
Hojas	15	10	50
Hojas	15	15	<b>60</b>
Hojas	20	15	38
Secciones nodales	20	20	50
Secciones nodales	30	20	<b>60</b>
Secciones nodales	30	25	20
Secciones nodales	40	25	50

- Método de desinfección por gasificación (Dra. Rangel Cano Rosa M. CINVESTAV Irapuato, México, 2011): ante las dificultades para limpiar el material de partida se ha empleado ácido clorhídrico e hipoclorito de sodio comercial (55g/l), en campana de extracción con diferentes tiempos de exposición. Las estacas se colocaron previamente en fungicida Benomyl (800 ppm) por 16 hs, se cortaron las hojas y secciones nodales, las cuales se lavaron con jabón blanco y agua corriente y se dejaron secar. Tabla 2. Ensayos gasificación:

Explante	Ac clorhídrico	tiempo (min.)	% sin contaminación
Hojas	12N	8	37
Hojas	6N	9	<b>50</b>
Hojas	12N	10	48
Secciones nodales	6N	15	23
Secciones nodales	6N	17	<b>25</b>
Secciones nodales	6N	23	15
Secciones nodales	6N	25	10

Hasta el momento, para el caso de las *hojas*, los mejores resultados fueron: a) método de desinfección usando hipoclorito de sodio al 15%, durante 15 min (60% sin contaminación); b) ensayo por gasificación con ácido clorhídrico 6N durante 9 minutos (50% sin contaminación). Para el caso de las *secciones nodales*, los mejores resultados fueron: a) método de desinfección usando hipoclorito de sodio al 30% durante 20 minutos (60% sin contaminación); b) método de gasificación con un tiempo de 17 min de desinfección (25% sin contaminación).

Condiciones de cultivo: los explantes fueron colocados en una cámara de incubación con tubos Biolux, con fotoperiodo de 16 h. de luz y 8 h. de oscuridad, irradiancia de 60  $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a 25°C y humedad relativa del 70% (Saturo *et. al.*, 2006; Abedini *et. al.*, 2008).

Regeneración y multiplicación: en base a los antecedentes (Abedini *et al.* 2008, Adema *et al.* 2009, Sharry *et. al.*, 2011) se utilizó el medio basal MS (Murashige & Skoog, 1962), completo y a la mitad de su concentración, obteniéndose mejores resultados, en cuanto a la calidad de los brotes obtenidos, en el medio con menor contenido de sales. Para determinar la capacidad de producción de brotes, se utilizaron los explantes de la fase de establecimiento y se evaluó la respuesta individual a la aplicación de BAP (Bencilaminopurina, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4 mg/l), solo o en combinación con GA<sub>3</sub> (0,5, 1 y 2 mg/l) frente al testigo (medios sin PGR). Transcurridos 20-30 días de cultivo, se evaluaron los porcentajes de formación de callo o brotes. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo simple de tratamientos, con 10 repeticiones (c/u con 20 frascos de 250ml. con tres secc. nodales/hojas). Las hojas formaron brotes utilizando una concentración de BAP de 2 mg/l con GA<sub>3</sub> 1 mg/l. Las hojas cultivadas en medio MS sin reguladores, formaron callos (90%) y al repicarlos a un medio MS con BAP (entre 1 y 5 mg/l) el 8% formaron brotes, mientras que el 30% de los callos formaron raíces. El 10% de estas raíces formaron brotes directos. Las secciones nodales cultivadas

en MS con BAP (1 - 5 mg/l) y sin reguladores de crecimiento, formaron brotes. El tiempo de formación de brotes se redujo 20 días, con el agregado de BAP.

Enraizamiento: se utilizó el medio de asilamiento (sacarosa 30g/l y agar 8 g/l, sin PGR) y el medio MS completo con ácido indol butírico (IBA, 4 y 10 mg/l), por un período de 48h. Luego se redujo la concentración de auxinas. Los explantes que estaban en medio MS suplementado con 4mg/l se colocaron en un medio libre de auxina, mientras que la mitad de los explantes que estaban en MS con 10 mg/l de IBA se paso a un medio con una concentración de 4 mg/l de dicho regulador, y la otra mitad al mismo medio pero libre de auxinas. La etapa más complicada de la regeneración *in vitro* fue el enraizamiento, que pudo lograrse con los brotes colocados en medio MS suplementado con 10 mg/l de IBA por 48hs repicados a un medio MS libre de reguladores. También se obtuvo un 5% de enraizamiento de secciones nodales en un medio de aislamiento.

**B-** Optimizar la transformación de distintos explantes de *Populus deltoides* cv. 129/60 mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando una construcción plasmídica que lleve un gen reportero y un agente de selección: se realizaron ensayos exploratorios para transformar hojas, pecíolos y brotes de *Populus deltoides* cv. Australia 129/60.

Cepas de *Agrobacterium* (*A.tumefaciens* y *A.rhizógenes*): en base a la bibliografía (Fladung *et al.*, 1997; Kumar y Fladung 2000; Gutiérrez *et al.*, 2003) y de acuerdo a las disponibles para realizar los ensayos, se usaron las cepas: pRi 1500 de *Agrobacterium rhizógenes* y las PGV 2260 y LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens*.

Plásmidos: se utilizaron los plásmidos wstop y pMON, los cuales llevan genes que confieren tolerancia a estrés hídrico y al herbicida glifosato, respectivamente, cedidos por CINVESTAV, unidad Irapuato, México.

Agro-infección: las colonias se suspendieron en un frasco con 30 ml de medio líquido YEB (extracto de carne 1 g l-1, extracto de levadura 2 g l-1, peptona 5 g l-1, NaCl 5 g l-1, agar 15 g l-1, pH= 7,2-7,4) suplementado con los antibióticos correspondientes a cada cepa y 50mg/l de acetosiringona. Se crecieron por 24 hs. a 28 ° C., hasta lograr una densidad de  $1 \times 10^9$ . Los explantos se cortaron bajo la campana de flujo laminar y se colocaron el MS líquido, para evitar la desecación de los mismos. Se colocaron 9 ml de MS líquido y 1 ml de la solución bacteriana por cada placa. Se incubó por 1 hora y se retiró el resto del medio líquido para evitar el exceso de bacterias en la superficie del explanto. Los explantos se colocaron, en el medio de co-cultivo: placas con MS sólido suplementado con 25 mg/l de acetosiringona y papel de filtro. Se dejaron en oscuridad, en la cámara climatizada de 25°C por 48 horas. Luego, los explantes se pasaron a medio MS con 200 mg/l de Cefotaxime (Claforán) (Confalonieri *et al*, 2000), para eliminar la bacteria. En el caso de la infección con *Agrobacterium rhizógenes* se le adicionó al medio 40 mg/l de floroglucinol (compuesto fenólico de importancia para procesos de enraizamiento). El paso siguiente fue adicionarle al medio, además del Cefotaxime, el agente de selección que posee cada plásmido. Las tres construcciones utilizadas llevan dos genes marcadores de selección; 1- el gen bar que codifica para la enzima fosfinotricina-N-acetil-transferasa, que otorga resistencia al herbicida glufosinato de amonio, (Thompson *et al*, 1987); y 2- el gen marcador de la neomicina fosfotransferasa II (NPTII) (Kumar y Fladung, 2000) la cual inactiva a los antibióticos aminoglucósidos como la kanamicina y la neomicina. La kanamicina adicionada al medio resultó eficiente para discriminar entre raíces transformadas y no transformadas en estos ensayos. No se regeneraron plantas de estos experimentos.

Los objetivos A y B han sido parcialmente alcanzados, se continúa optimizando el protocolo de desinfección de explantes y el de agroinfección. Actualmente se cuenta con material de propagación conservado *in vitro* en forma de callo organogénico, brotes y plántulas *in vitro*, que serán utilizadas para continuar con la transformación genética.

### **C- Transformación genética de *Populus deltoides***

El objetivo C se está trabajando y se plantea en el Plan de Trabajo para aplicar a una beca Tipo II. Aún se debe repetir y ajustar el protocolo de transformación. En este período de Beca se regeneraron *in vitro* clones de *Populus deltoides* y se realizaron algunos ensayos exploratorios para la introducción de genes. Los genotipos *deltoides*, aun no han podido ser modificados genéticamente a nivel mundial, se comportan como recalcitrantes al cultivo de tejidos, presentan dificultades para enraizar tanto *in vivo* como *ex vitro*. Sin embargo, son los genotipos mas plantados en el país, de allí la importancia de la continuidad de este trabajo, donde se ha avanzado en el establecimiento y multiplicación *in vitro*.



## Anexo 4.2

Línea	Agro	constructs	Selección	Ft 1980/1981	Barnase 282/283	HSP 1151/1152	PsEND1 2080/2081
N426-3	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N426-5	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N426-6	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	-	-	-	-
N427-1	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N427-2	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N427-4	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N430-1	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	-	-
N430-2	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N430-3	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	-	-
N430-4	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+
N430-5	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N430-6	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	-	-	-	-
N430-7	A249 + A112	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N430-10	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N430-11	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+
N430-12	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	-	-	-	-
N430-13	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N430-14	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N430-15	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N430-18	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N430-19	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+
N430-21	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N430-24	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N430-25	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	-
N430-26	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N430-28	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N430-29	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N430-30	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N430-31	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	-	-	-	-
N431-1	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N431-2	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	-	-	-	-
N431-3	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N431-4	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	-	-	-	-
N431-5	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N431-6	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	-	-	-	-
N431-7	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N431-8	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	-	-	-	-
N435-1	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-2	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-3	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-4	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-5	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-6	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-7	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-8	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-9	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-10	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-11	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-

Linea	Agro	constructs	Selección	Ft 1980/1981	Barnase 282/283	HSP 1151/1152	PsEND1 2080/2081
N435-12	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-13	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-14	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-15	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+
N435-17	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-19	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	-	-	+	-
N435-20	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-21	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-22	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-23	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-24	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-25	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-26	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-27	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-28	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	-	-
N435-29	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	-	-
N435-30	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	-	-
N435-31	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	-	-	-	-
N435-32	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	-	-	-	-
N435-33	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+
N435-34	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-35	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N435-36	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N441-1	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N441-2	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N441-3	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+
N441-5	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N441-7	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+
N441-8	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N441-9	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N441-10	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N441-12	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N441-13	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N441-15	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+
N441-16	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N441-17	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N441-20	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	-	-	+	-
N441-21	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	+	+	+
N441-23	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N441-24	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	-	+	-	+
N441-25	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N442-1	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N442-2	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N442-6	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N442-7	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	-	-
N442-8	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-
N442-9	A249 + A113	Ft+Barnase	K 50	+	-	+	-

Resultados de las PCRs con los primers para detectar la presencia de los genes *FT* y *barnase*, y los promotores HSP y END1, en las regenerantes de las transformaciones genéticas con *P. tremula* L.



## Anexo 4.4.

Primers para sonda PsEND1

Primer izquierdo: atcgtagcaccacaccagtc

Tamaño: 20 bp      Tm: 59.8 C      GC: 55.0 %

Primer derecho: tgacagttgaaaccgccaca (Compl. rev. GTGGCGGTTTCAACTGTCA)

Tamaño: 20 bp      Tm: 60.4 C      GC: 50.0 %

Tamaño del producto: 922 pb. Cercano al borde derecho.

atcgtagcaccacaccagtcgtctcacacaacctttccgctcattgaatcaacgattttctaaacagttcacatccacacactgatggatg  
agaacaacgcattctgctctctcctacatacactgacattcttgcgcatccgctgcattttctagaagtgaagcataaactcgtgat  
gagatcaagaacatctgtagcaccaaaatacacacacactgaaatcatccaacgattccagttgctgctgaacaatggnagcgtg  
cacagatcacaacgatataatattttgattgaaatgaagaacaaattccattattctaaaatggttacacactgatgtagactgcaa  
aaggaataaagatacaattgttcacaccactcactgctgaaatataagtgaagtaatgagaataactaaaatccctctaaaatgat  
aattaattcaacaatctctaattgtagtataatccataaacactttgatggcaggtataacaagggtaagtagtgatatacatattaggctc  
tattattttatattatctgctttctctcatgttctcactaatatgatattatctccctccctaaattattattattagaaaaagagttcattttta  
aaaatattaccgtaattttcaaaaaataaaatataatattataaaaaaattttaataattttacattaatgcataaataaataa  
atactgcttaataatttaaccttttaacaataaattatatttttaattcaactaatataagctaagttatctcatccaaccaataaaagatcat  
tgaaaataccttttatttagttggtggcggttcaactgtca

Secuencia completa:

gactcaaccttattagtgatggacaataaaggtataagctccttactgtgaaagcccaccagtaacatcaccttgcttatattcagctt  
ctttctagtaacatttgaacgtgtttataacgaaaaaacccaaaaactctgaaaagactcacactttctattctccagtcacacctctcaa  
aaggaacaatttctcagcttctggttgacacactgttgagcacatattgctgagtggaacagtttctcccacaaagtgttaggaagctt  
cttctcctcagcatttctgctatcaagcaagttcggtttcaacaagaccattatgttgaggatattatggatcagtcacttcatgctca  
attccattctttacagaactcttgaactctgtagagtatactaccctccacatcagttctgagaatctcagaagtctgaccactttttctc  
agccttgattatgaatttctaaattcagcaaacacctcgtgttgaattttataagggataccatgtcatccttggaactcatcataaatgac  
ataaagtattatccctctagtgaaaggttgaatgggcccacacacataagaatgcactactcctaaagcatgtttgctcttgagctactttt  
gatgaaaatggcagcttgggtgctcccttcatgcacacattacatgacttttggttcttaattgtaggaattccacgtaccagttcttgaatt  
caaattccctaagctcctaaagtcaaatgacaaatctttgtccacaactcactttcctcacaacactgttgctgtaaggaattcagagtc  
tgcagtttaacattcgctgaatgtttactcctcattgctgactccataatcaactctgataacagtcatacagctcacaagaatgctatt  
catgtaactggaatccctttcaattaattgacctacactcatcagattgctcttcatgccaagaacgtaccaagacgttctgaattaatgca  
gattttctattcataatcactcctaacattcccattcctttagcatttagtacttatcatcagcacatctaactctggtttctcttagagtc  
tcaaccagccatttctattccagatgatggttgaacaaccagtgccatataaccagcttctatagacgcactatcataactagaagcc  
atfaatagcacatgttcatggtgctcagatccttagaattgtcaattgctacaacgatgaatcaaaactgatgagtaagagatctaagtc  
cttcaatgatacttctcataaagagttctccatgctcctcatctcattgtgatcagaatcactctagagatgtagtcagataacttctcatt  
gttctctagcttagattctcactgctcagtagagactgaagttcaccttctacactgatgcatcactatcgtagcaccacaccagtcgtct  
cacacaacctttccgctcattgaatcaacgattttctaaacagttcacatccacacactgatggatgtagaacaacgcattctgatccttctc  
ctcatatcacactgagcatttcttgcgcatccggtgcattttctagaagtgaagcataaactcgttgatgagatcaagaactctgagcacc  
aaataacacacacatctgaatcatccaacgattccagttgtgctgctgaacaatggnagcgtggtgcacagattcacaacgatataatata  
antttgattatgaaatgaagaacaaattccattattctaaaatggttacacactgatgtagactgcaaaaggaataaagatacaattgttca  
caccactcactgctgaaatataagtgaagtaatgagaataactaaaatccctctaaaattatgaattaattcaacaatcttaattgtag  
tataatccataaacactttgatggcaggtataacaagggtaagtagtgatatacatattaggctcttatttttattatctctgctttctctc  
atgttctcactaatatgatattatctccctccctaaattattattatttagaaaaagagttcatttttaaaaatattaccgtaattttcaaaa  
aataaaatataatattttataaaaaaattttaataattttacattaatgcataaataaataaataactgcttaataatttaaccttttaa  
caataaattatttttaattcaactaatataagctaagttatctcatccaaccaataaaagatcattgaaaataccttttatttagttggtg  
cggttcaactgtcaaaaaaggaattttacgacgatataaatttaaccagcaaaaaatgaagcagtaagcgaaccaactcatggt  
atggtgatattttatcttctgctttatctggttcgaatcttataatgatgaaaaatataatcaacttttaataagaacgtattatagagc  
catttgggaacacatattctgtagcacgtagtcgaaattccaataactctatatagccctcctcagtttcatgctttgctcacaacat  
aaccttcttgaat