

TESIS

TES



ISIS

TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

TESIS

“GENERACIÓN Y CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE
CACTÁCEAS”

PRESENTA

IBQ. Adilene Dávila Galván

PARA OBTENER EL GRADO EN MAESTRIA EN CIENCIAS EN EL
ÁREA DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL

TUTOR

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch

COMITÉ TUTORAL

M. en C. Martha Cristina González Díaz

M. en C. Lucía Isabel Chávez Ortiz

Aguascalientes, Ags, Noviembre del 2012

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

I.B.Q. ADILENE DÁVILA GALVÁN,
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN EL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
P R E S E N T E ,

Estimado (a) alumno (a) Dávila:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "**Generación y Cultivo de Raíces Transformadas de Cactáceas**", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., 7 de noviembre de 2012

"SE LUMEN PROFERRE"

EL DECANO SUSTITUTO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo
JJRG,mjda



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES



M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
P R E S E N T E :

Estimado M. en C. Ruíz Gallegos:

Por este medio le comunico que la I.B.Q. Adilene Dávila Galván, egresada de la Maestría en Ciencias en el Área de Biotecnología Vegetal, ha concluido satisfactoriamente tanto su trabajo de tesis, como el escrito derivado del mismo. El título de su proyecto fue: "GENERACIÓN Y CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE CACTÁCEAS".

Asimismo, le informo que después de revisar el escrito, así como las correcciones hechas al mismo, considero que ya se tiene una versión final satisfactoria y se puede proceder ya a su impresión definitiva y al examen de grado.

A T E N T A M E N T E
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags. a 05 de Noviembre de 2012

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch
Tutor de Tesis
Departamento de Química
Centro de Ciencias Básicas



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
P R E S E N T E :

Estimado M. en C. Ruíz Gallegos:

Por este medio le comunico que la I.B.Q. Adilene Dávila Galván, egresada de la Maestría en Ciencias en el Área de Biotecnología Vegetal, ha concluido satisfactoriamente tanto su trabajo de tesis, como el escrito derivado del mismo. El título de su proyecto fue: "GENERACIÓN Y CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE CACTÁCEAS".

Asimismo, le informo que después de revisar el escrito, así como las correcciones hechas al mismo, considero que ya se tiene una versión final satisfactoria y se puede proceder ya a su impresión definitiva y al examen de grado.

A T E N T A M E N T E
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags. a 07 de Noviembre de 2012

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Martha', written over a horizontal line.

M. en C. Martha Cristina González Díaz
Comité Tutoral
Departamento de Química
Centro de Ciencias Básicas



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
P R E S E N T E :

Estimado M. en C. Ruíz Gallegos:

Por este medio le comunico que la I.B.Q. Adilene Dávila Galván, egresada de la Maestría en Ciencias en el Área de Biotecnología Vegetal, ha concluido satisfactoriamente tanto su trabajo de tesis, como el escrito derivado del mismo. El título de su proyecto fue: "GENERACIÓN Y CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE CACTÁCEAS".

Asimismo, le informo que después de revisar el escrito, así como las correcciones hechas al mismo, considero que ya se tiene una versión final satisfactoria y se puede proceder ya a su impresión definitiva y al examen de grado.

A T E N T A M E N T E
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags. a 08 de Noviembre de 2012

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Lucía Chávez'.

MC Lucía Isabel Chávez Ortiz
Comité Tutoral
Departamento de Química
Centro de Ciencias Básicas

AGRADECIMIENTOS

...He aprendido que un resultado negativo es siempre un resultado...he aprendido a ser paciente...muy paciente...a insistir, a saber trabajar y esperar...gracias "tesis".

...En estos días que estoy ultimando los últimos detalles no puedo creer que por fin haya terminado. Hoy he llegado a un punto final de mi vida, pero también a un punto y seguido (o eso quiero pensar). He cerrado una puerta que llevaba abierta unos dos años, pero abro una nueva con mucha ilusión...esperanza...y ganas de experimentar el mañana.

...Este trabajo no es el fruto del esfuerzo de una única persona sino de muchas otras que han influido de una forma más o menos directa. Justo es que a la hora de plasmar lo realizado por escrito se tenga presente a todos aquellos que me ayudaron en el camino.

...En primer lugar quiero dar las gracias al Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch, mi tutor de tesis, que ha contribuido de forma fundamental al hacer realidad lo que durante un año ha sido un trabajo inacabado. Me considero afortunada por haber tenido un tutor como él. Le agradezco por acogerme y confiar en mí desde mi llegada al Departamento de Biotecnología vegetal y por su permanente disponibilidad y cualidades personales y profesionales.

... a CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto. A la Universidad Autónoma de Aguascalientes, esta institución de enorme calidad, que me brindo todo el apoyo durante mi estancia.

...También a la M. en C. Lucía Isabel Chávez Ortiz que aun estando continuamente ocupada en mil cosas siempre encontraba tiempo para ayudarme y orientarme en todo momento de la tesis, así también su constancia y su paciencia en la lectura de los interminables borradores.

...Al Departamento de Biotecnología vegetal por haberme ayudado en una parte importante del trabajo realizado. Especialmente a la Ing. Martita Pérez Reyes quiero darle las gracias por las horas que ha dedicado y por su inestimable ayuda durante la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tesis proporcionándome todo lo que necesitaba, así como en la realización de todas la técnicas realizada., también quiero darle las gracias a Isaac y Lupita por apoyarme y escucharme en todo momento así como su ayuda en la realización de mi trabajo de tesis.

...A Maryfer Galicia, que has sido para mí más que una amiga, por escucharme siempre y compartir conmigo mis buenos y malos momentos, eres una persona maravillosa de verdad. A Shantal Suarez mi amiga y compañera de tesis que siempre nos estuvimos apoyando y escuchando en todo momento, también a Alejandra por ayudarme y escucharme incondicionalmente, y a todos en el laboratorio por haberme hecho sentir como en casa. Gracias.

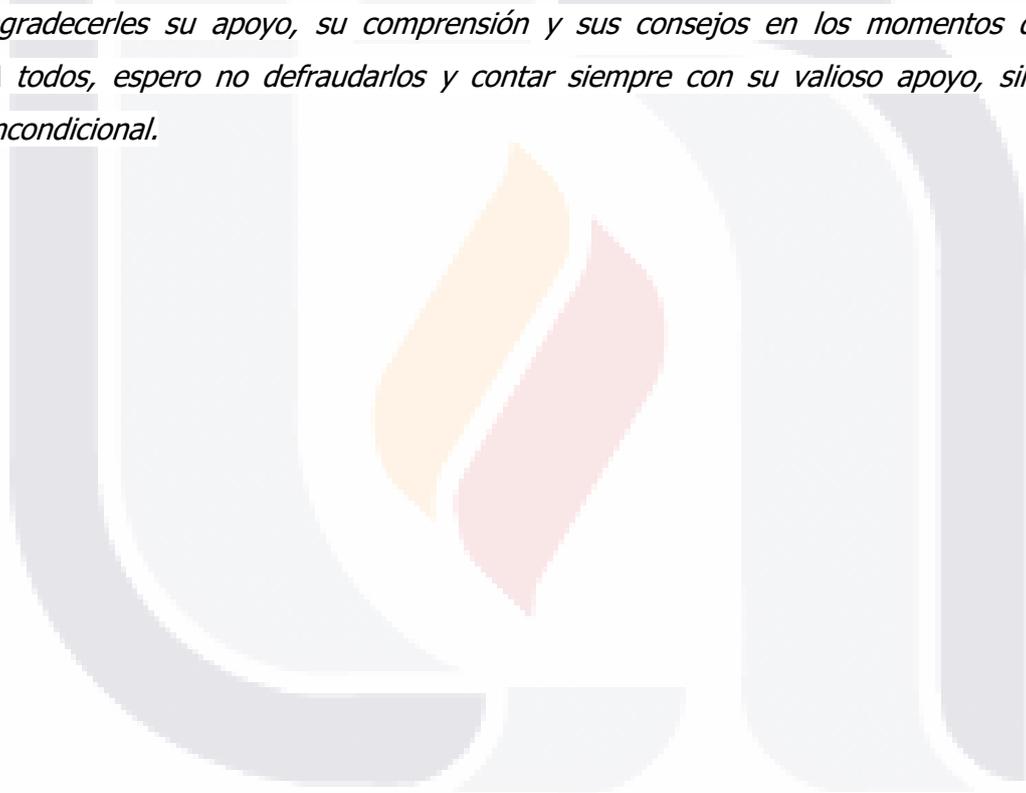
...a mis padres. Todo se lo debo a ellos. Les agradezco haberme dado la vida, por apoyarme en mis estudios, y creer en mí en todo momento. Ahora me doy cuenta de lo importante que es llegar hasta aquí. Gracias por sentirse tan orgullosos de mí. Los quiero muchísimo.

...soy inmensamente agradecida a ti...Miguel...por animarme, apoyarme y no dejarme tirar la toalla en los momentos difíciles... jamás has limitado mi formación aunque hemos tenido que estar separados durante años. Sabías que era bueno para mí y siempre he contado con tu apoyo. Gracias por iluminar mi camino, por el amor y la paciencia, por estar allí y aguantarme cuando las cosas me salían mal...este trabajo es mérito de los dos. Tengo mucha suerte al tenerte a mi lado...

DEDICATORIAS

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. Porque creyeron en mí, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y por el orgullo que sienten por mí.

A el amor de mi vida, a mis hermanos y amigos. Gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida. Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles. A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.



INDICE GENERAL

	Pagina
Resumen	22
Abstract	23
I Marco Teórico	24
I.1. Antecedentes sobre las Cactáceas	24
I.1.2 Uso de las cactáceas desde sus orígenes	26
I.1.3 Descripción Botánica	28
I.1.4 Clasificación	29
I.1.5 Situación actual	32
I.1.6 Usos actuales y potenciales	33
I.1.7 Metabolitos secundarios producidos en cactácea	35
I.2. Raíces Transformadas	36
I.2.1 Descripción de <i>A. rhizogenes</i>	36
I.2.1.1 Filogenia y Biología de <i>A. rhizogenes</i>	38
I.2.1.2 Bases moleculares y fisiológicas de la formación de raíces pilosas	40
I.2.2 Generación de raíces transformadas	44

I.2.2.1 Gen reportero construcciones transgénicas para la identificación de raíces pilosas	46
I.2.3 Uso de las Raíces Transformadas en la Producción de Metabolitos secundarios	47
I.3. Raíces transformadas en cactáceas	51
II. Justificación	54
III. Hipótesis y Objetivos del Proyecto	55
III.1 Hipótesis	55
III.2 Objetivos	55
IV. Metodología	56
IV.1 Preparación de Medio YM pH 7	56
IV.2 Cultivo de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> A4/pCSE4	56
IV.3 Extracción de ADN de <i>A. rhizogenes</i> A4/pCSE4 utilizando lisozima	56
IV.4 Electroforesis en gel de Agarosa al 0.8%	57
IV.5 Reacción de Polimerización en cadena (PCR)	57
IV.6 Transformación de cactáceas con <i>A. rhizogenes</i> A4/pCSE4	59
IV.6.1 Primera parte (cocultivo)	59

IV.6.2 Segunda parte	60
IV.7 Medición de raíces, Captura y Análisis de Datos del Método convencional	60
IV.8 Condiciones de Medio Líquido	61
IV.9 Condiciones de Incubación (Luz)	62
IV.10 Condiciones de incubación (Temperatura)	62
IV.11 Adición de Compuestos Orgánicos	63
IV.12 Ensayo histoquímico para β -glucuronidasa (<i>gus</i>)	63
IV.13 Extracción de ADN de raíces presuntamente transformadas	64
IV.14 PCR del ADN vegetal	64
IV.15 Electroforesis de los productos de la PCR del ADN vegetal	65
IV.16 Extracción y valoración de los metabolitos secundarios	65
V. Resultados	
V.1 Reacción de Polimerización en cadena (PCR) para verificar la cepa de <i>A. rhizogenes</i>	67
V.2 Respuesta de 52 especies de cactáceas mexicanas a la infección de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> A4	68
V.3 Curvas de Crecimiento de las raíces presuntamente transformadas de cactáceas mexicanas en medio MS a 20°C, en la obscuridad.	72

V.4	Curvas de Crecimiento de las raíces presuntamente transformadas de cactáceas mexicanas en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan a 26°C, en la luz por fotoperiodos de 12 hrs.	84
V.5	Curvas de Crecimiento de las raíces presuntamente transformadas de cactáceas mexicanas en medio MS liquido con 250 mg/L de Claforan a 20°C, en la obscuridad.	89
V.6	Curvas de Crecimiento de las raíces presuntamente transformadas de cactáceas mexicanas en medio MS solido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan a 26°C, en la obscuridad.	96
V.7	Curvas de Crecimiento de las raíces presuntamente transformadas de cactáceas mexicanas en medio MS solido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan a 20°C, en la obscuridad, así como la adición de diferentes compuestos orgánicos.	101
V.8	Especies de cactáceas mexicanas presuntamente transformadas por <i>Agrobacteruin rhizogenes</i> en el Método Convencional.	106
V.9	Especies de Cactáceas mexicanas presuntamente trasformadas por <i>Agrobacterium rhizogenes</i> en Condiciones de Luz	109
V.10	Especies de Cactáceas mexicanas presuntamente trasformadas por <i>Agrobacterium rhizogenes</i> en Medio Liquido	111

V.11	Especies de Cactáceas mexicanas presuntamente transformadas por <i>Agrobacterium rhizogenes</i> en condiciones de incubación (Temperatura)	113
V.12	Especies de Cactáceas mexicanas presuntamente transformadas por <i>Agrobacterium rhizogenes</i> en Medio adicionado con Compuestos Orgánicos	114
V.13	Pruebas Histoquímicas de la β -glucuronidasa GUS	115
V. 14	Reacción de polimerización en cadena (PCR) para las diferentes especies de cactáceas mexicanas	117
V. 15	Comparación del crecimiento de las raíces presuntamente transformadas en los diferentes tratamientos.	122
V. 16	Cromatografía TLC y análisis por diferentes sistemas de detección; UV-365nm, Reactivo de Dragendorff y Reactivo de Marquis	136
V. 17	Raíces Después de los Tratamientos	141
VI.	Discusión	142
VII.	Conclusiones	148
VIII.	Glosario	150
IX.	Bibliografía	151
X.	Anexos	169

INDICE DE TABLAS

	Pagina
Tabla 1 Respuesta de 52 especies de cactáceas mexicanas a la infección por <i>Agrobacterium rhizogenes A4</i> en medio MS a 20°C en la obscuridad	70
Tabla 2 Respuesta de 12 especies de cactáceas mexicanas a la infección por <i>Agrobacterium rhizogenes A4</i> en medio MS a 26°C en la luz.	84
Tabla 3 Respuesta de 12 especies de cactáceas mexicanas a la infección por <i>Agrobacterium rhizogenes A4</i> en medio MS a 26°C en la obscuridad.	96
Tabla 4 Respuesta de 12 especies de cactáceas mexicanas a la infección por <i>Agrobacterium rhizogenes A4</i> en medio MS adicionado con diferentes compuestos orgánicos.	101
Tabla 5. Amplificación de los genes (<i>rol B</i> , <i>Vir D</i> , <i>nptII</i> y <i>GUS</i>) por la técnica de PCR de varias especies de cactáceas mexicanas para confirmar la transformación genética inducida por la infección de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	117

INDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS

	Pagina
Figura. 1 Estructuras químicas de acetosiringona y algunas opinas	37
Figura 2. Capa de raíces de tomate en hidroponía infectado por <i>A. rhizogenes</i> .	37
Figura. 3 Estructura de plásmido Ri de <i>A. rhizogenes</i>	42
Figura. 4 Diagrama de flujo para la inducción de raíces pilosas en cultivo y algunas de sus aplicaciones	45
Figura. 5 Raíces transgénicas producidas en los brotes de tipo silvestre de tomate después de la infección con <i>A. rhizogenes</i>	47
Figura. 6 La inducción de raíces pilosas en varias especies y prueba GUS	52
Fig. 7 Medición de raíces con ayuda de plumón y regla métrica	61
Fig. 8 Reacción de polimerización en cadena (PCR) de ADN de <i>Agrobacterium rhizogenes A4</i> .	67
Grafica 1. Generación de raíz de 52 especies de cactáceas mexicanas que fueron sometidas a la infección por <i>Agrobacterium rhizogenes A4</i> .	71
Grafica 2. Curva de Crecimiento para <i>Acharagma aguirreana</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	73
Grafica 3. Curva de Crecimiento para <i>Ariocarpus kotshoubeyanus</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	73

Grafica 4. Curva de Crecimiento para <i>Astrophytum híbrido myriostigma x ornatum</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	73
Grafica 5. Curva de Crecimiento para <i>Echinocactus platycanthus</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	73
Grafica 6. Curva de Crecimiento para <i>Echinocactus grusonii</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	74
Grafica 7. Curva de Crecimiento para <i>Echinocactus platycanthus (Echinocactus ingens)</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	74
Grafica 8. Curva de Crecimiento para <i>Epithelantha micromeris</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	74
Grafica 9. Curva de Crecimiento para <i>Escorbaria chaffeyi</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	74
Grafica 10. Curva de Crecimiento para <i>Escontria chiotilla</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	75
Grafica 11. Curva de Crecimiento para <i>Ferocactus glaucescens</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	75
Grafica 12. Curva de Crecimiento para <i>Ferocactus peninsulae</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	75
Grafica 13. Curva de Crecimiento para <i>Ferocactus cylindraceus var cylindraceus</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	75
Grafica 14. Curva de Crecimiento para <i>Ferocactus flavovirens</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	76

Grafica 15. Curva de Crecimiento para <i>Ferocactus latispinus var latispinus</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	76
Grafica 16. Curva de Crecimiento para <i>Ferocactus pilosus</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	76
Grafica 17. Curva de Crecimiento para <i>Ferocactus rectispinus</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	76
Grafica 18. Curva de Crecimiento para <i>Leuchtenbergia principis</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	77
Grafica 19. Curva de Crecimiento para <i>Lophophora williamsii (Lophophora fricsii)</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	77
Grafica 20. Curva de Crecimiento para <i>Neobuxbaumia tetetzo</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	77
Grafica 21. Curva de Crecimiento para <i>Obregonia denegrii</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	77
Grafica 22. Curva de Crecimiento para <i>Opuntia amyaclea</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	78
Grafica 23. Curva de Crecimiento para <i>Opuntia ficus- indica</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	78
Grafica 24. Curva de Crecimiento para <i>Opuntia macrocentra</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	78
Grafica 25. Curva de Crecimiento para <i>Opuntia robusta</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	78

Grafica 26. Curva de Crecimiento para <i>Pilosocereus chrysacanthus</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	79
Grafica 27. Curva de Crecimiento para <i>Stenocereus queretaroensis</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	79
Grafica 28. Curva de Crecimiento para <i>Stenocereus stellatus</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	79
Grafica 29. Curva de Crecimiento para <i>Stenocereus thurberi var thurberi</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	79
Grafica 30. Curva de Crecimiento para <i>Turbincarpus pseudomacrolele var lausseri</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	80
Grafica 31. Curva de Crecimiento para <i>Turbincarpus shimiedickeanus var shimiedickeanus</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	80
Grafica 32. Curva de Crecimiento para <i>Turbincarpus shimiedickeanus var schwarzi</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	80
Grafica 33. Curva de Crecimiento para <i>Turbincarpus hoferi</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	80
Grafica 34. Curva de Crecimiento para <i>Turbincarpus laui</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	81
Grafica 35. Curva de Crecimiento para <i>Turbincarpus lophophoroides</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	81
Grafica 36. Curva de Crecimiento para <i>Turbincarpus pseudomacrolele var pseudomacrolele</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	81

Grafica 37. Curva de Crecimiento para <i>Turbinicarpus pseudopectinatus</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	81
Grafica 38. Curva de Crecimiento para <i>Turbinicarpus schmiedickeanus var klinkerianus</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	82
Grafica 39. Curva de Crecimiento para <i>Turbinicarpus schmiedickeanus vas schmiedickeanus</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	82
Grafica 40. Curva de Crecimiento para <i>Turbinicarpus subterraneus (Gymnocactus subterraneus)</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	82
Grafica 41. Curva de Crecimiento para <i>Turbinicarpus swoboda</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	82
Grafica 42. Curva de Crecimiento para <i>Turbinicarpus valdezianus</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	83
Grafica 43. Curva de Crecimiento para <i>Turbinicarpus valdezianus var albiflorus</i> , en Medio MS a 20°C en la obscuridad	83
Grafica 44. Curva de Crecimiento para <i>Echinocactus platycanthus</i> , en Medio MS a 26°C en luz	86
Grafica 45. Curva de Crecimiento para <i>Echinocactus grusonii</i> , en Medio MS a 26°C en luz	86
Grafica 46. Curva de Crecimiento para <i>Echinocactus platycanthus (Echinocactus ingens)</i> ,	86
Grafica 47. Curva de Crecimiento para <i>Ferocactus peninsulae</i> , en Medio MS a 26°C en luz	86

Grafica 48. Curva de Crecimiento para <i>Oputia amyaclea</i> , en Medio MS a 26°C en luz	87
Grafica 49. Curva de Crecimiento para <i>Opuntia robusta</i> , en Medio MS a 26°C en luz	87
Grafica 50. Curva de Crecimiento para <i>Stenocereus thurberi var thurberi</i> , en Medio MS a 26°C en luz	87
Grafica 51. Curva de Crecimiento para <i>Turbiniacarpus pseudomacrochele var lausseri</i> , en Medio MS a 26°C en luz	87
Grafica 52. Curva de Crecimiento para <i>Turbiniacarpus laui</i> , en Medio MS a 26°C en luz	88
Grafica 53. Curva de Crecimiento para <i>Turbiniacarpus schimiedickeanus vas klinkerianus</i> , en Medio MS a 26°C en luz	88
Grafica 54. Curva de Crecimiento para <i>Turbiniacarpus schimiedickeanus var schwarzii</i> , en Medio MS a 26°C en luz	88
Grafica 55. Curva de Crecimiento para <i>Turbiniacarpus subterraneus (Gymnocactus subterrabeus)</i> , en Medio MS a 26°C en luz	88
Grafica 56. Curva de Crecimiento para <i>Acharagma aguirreana</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	90
Grafica 57. Curva de Crecimiento para <i>Echinocatus grussoni</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	90
Grafica 58. Curva de Crecimiento para <i>Escorbaria chaffeyi (E. dasyacantha subsp. Chafferyi)</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	90

Grafica 59. Curva de Crecimiento para <i>Echinocactus platycanthus</i> (<i>Echinocactus ingens</i>), en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	90
Grafica 60. Curva de Crecimiento para <i>Escontria chiotilla</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	91
Grafica 61. Curva de Crecimiento para <i>Ferocactus cylindraceus var cylindraceus</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	91
Grafica 62. Curva de Crecimiento para <i>Lophophora williamsii</i> (<i>Lophophora fricsii</i>), en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	91
Grafica 63. Curva de Crecimiento para <i>Neobuxbaumina tetetzo</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	91
Grafica 64. Curva de Crecimiento para <i>Opuntia amyaclea</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	92
Grafica 65. Curva de Crecimiento para <i>Opuntia ficus- indica</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	92
Grafica 66. Curva de Crecimiento para <i>Stenocereus stellatus</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	92
Grafica 67. Curva de Crecimiento para <i>Stenocereus thurberi var thurberi</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	92
Grafica 68. Curva de Crecimiento para <i>Turbincarpus hoferi</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	93
Grafica 69. Curva de Crecimiento para <i>Turbincarpus schmiedickeanus var klinkerianus</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	93

Grafica 70. Curva de Crecimiento para <i>Turbinicarpus subterraneus</i> (<i>Gymnocactus subterraneus</i>), en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	93
Grafica 71. Curva de Crecimiento para <i>Turbinicarpus lophophoroides</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	93
Grafica 72. Curva de Crecimiento para <i>Turbinicarpus schmiedickeanus</i> var <i>schmiedickeanus</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	94
Grafica 73. Curva de Crecimiento para <i>Turbinicarpus swobodae</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	94
Grafica 74. Curva de Crecimiento para <i>Turbinicarpus laui</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	94
Grafica 75. Curva de Crecimiento para <i>Turbinicarpus pseudomacrochele</i> var <i>pseudomacrochele</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	94
Grafica 76. Curva de Crecimiento para <i>Turbinicarpus pseudopectinatus</i> , en Medio MS liquido a 20°C en la obscuridad	95
Grafica 77. Curva de Crecimiento para la Especie <i>Echinocactus grusonii</i> ,	98
Grafica 78. Curva de Crecimiento para <i>AEchinocactus platyacanthus</i> (<i>Echinocactus ingens</i>), en Medio MS a 26°C en la obscuridad	98
Grafica 79. Curva de Crecimiento para <i>Ferocactus peninsulae</i> , en Medio MS a 26°C en la obscuridad	98
Grafica 80. Curva de Crecimiento para <i>Ferocactus flavovirens</i> , en Medio MS a 26°C en la obscuridad	98

Grafica 81. Curva de Crecimiento para <i>Leuchtenbergia principis</i> , en Medio MS a 26°C en la oscuridad	99
Grafica 82. Curva de Crecimiento para <i>Opuntis amyctlea</i> , en Medio MS a 26°C en la oscuridad	99
Grafica 83. Curva de Crecimiento para <i>Stenocereus thurberi var thurberi</i> , en Medio MS a 26°C en la oscuridad	99
Grafica 84. Curva de Crecimiento para <i>Turbincarpus schmiedickeanus var schmiedickeanus</i> , en Medio MS a 26°C en la oscuridad	99
Grafica 85. Curva de Crecimiento para <i>Turbincarpus schmiedickeanus var schwarzii</i> , en Medio MS a 26°C en la oscuridad	100
Grafica 86. Curva de Crecimiento para <i>Turbincarpus laui</i> , en Medio MS a 26°C en la oscuridad	100
Grafica 87. Curva de Crecimiento para <i>Turbincarpus schmiedickeanus var klinkerianus</i> , en Medio MS a 26°C en la oscuridad	100
Grafica 88. Curva de Crecimiento para <i>Turbincarpus subterraneus (Gymnocactus subterreanus)</i> , en Medio MS a 26°C en la oscuridad	100
Grafica 89. Curva de Crecimiento para <i>Echinocactus grusonii</i> , en Medio MS adicionado con Extracto de Malta a 20°C en la oscuridad	103
Grafica 90. Curva de Crecimiento para <i>Ferocactus peninsulae</i> , en Medio MS adicionado con Extracto de Malta a 20°C en la oscuridad	103
Grafica 91. Curva de Crecimiento para <i>Stenocereus thurberi var thurberi</i> , en Medio MS adicionado con Extracto de Malta a 20°C en la oscuridad	103

Grafica 92. Curva de Crecimiento para *Echinocactus grusonii*, en Medio MS adicionado con Hidrolizado de Caseina a 20°C en la obscuridad 104

Grafica 93. Curva de Crecimiento para *Ferocactus peninsulae*, en Medio MS adicionado con Hidrolizado de Caseina a 20°C en la obscuridad 104

Grafica 94. Curva de Crecimiento para *Stenocereus thurberi var thurberi*, en Medio MS adicionado con Hidrolizado de Caseina a 20°C en la obscuridad 104

Grafica 95. Curva de Crecimiento para *Echinocactus grusonii*, en Medio MS adicionado con Agua de Coco a 20°C en la obscuridad 105

Grafica 96. Curva de Crecimiento para *Ferocactus peninsulae*, en Medio MS adicionado con Agua de Coco a 20°C en la obscuridad 105

Grafica 97. Curva de Crecimiento para *Stenocereus thurberi var thurberi*, en Medio MS adicionado con Agua de Coco a 20°C en la obscuridad 105

Fig. 9 Muestra el crecimiento de raíces pilosas a los 15 y 45 días después de la infección con *A. rhizogenes*. 106

Fig. 10 Muestra el crecimiento de raíces pilosas infectadas por *A. rhizogenes A4* a los 15, 45 y 60 días 106

Fig. 11 Muestra el crecimiento de raíces pilosas a los 15 y 45 días después de la generación de raíz en cada explante 107

Fig. 12 Muestra el crecimiento de raíces pilosas a los 60 días después de la generación de raíz en diferentes especies, las imágenes se tomaron con ayuda de un Estereoscopio 108

Fig. 13 Tratamiento en donde se prueban las condiciones de luz para 12 especies diferentes de cactáceas mexicanas. 109

Fig. 14 Muestra el crecimiento de raíces pilosas a los 0, 15, 30 Y 45 días después de la generación de raíz en Medio MS a 26°C en Luz. 110

Fig. 15 Muestra el crecimiento de raíces pilosas a los 90 días de que se pasaron a Medio Líquido a 20°C en la obscuridad 110

Fig. 16 Crecimiento de raíces pilosas y cambio de color por exposición a la luz. 111

Fig. 17 Muestra el material para determinar el peso del explante en el Medio MS Líquido 111

Fig. 18 Muestra el crecimiento de raíces pilosas a los 15, 30 Y 45 días después de la generación de raíz en cada explante a 26°C en la obscuridad 113

Fig. 19 Crecimiento de raíces pilosas en Medio Ms adicionado con diferentes Compuestos Orgánicos a los 15, y 60 días después de la generación de raíz a 20°C en la obscuridad 114

Fig. 20 Raíces transgénicas positivas a la reacción de la β -glucoronidasa (GUS)1. 115

Fig. 21 Raíces transgénicas positivas a la reacción de la β -glucoronidasa (GUS)2. 116

Fig. 22 Detección por la técnica de PCR de los genes *rolB*, *VirD*, *nptII* y *GUS* de raíces transformadas con *A. rhizogenes* de varias especies de cactáceas mexicanas. El gen *VirD* es negativo a la prueba 118

Fig. 23 Detección por la técnica de PCR de los genes *rolB*, *VirD*, *nptII* y *GUS* de raíces transformadas con *A. rhizogenes* de varias especies de cactáceas mexicanas. El gen *VirD* es positivo a la prueba. 119

Grafica 98. Curva de Crecimiento Relativo para *Echinocactus grusonii*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio liquido, Condiciones de incubación (luz, temperatura), y Adición de compuestos orgánicos. 122

Grafica 99. Curva de Crecimiento Relativo para *Echinocactus platycanthus* (*Echinocactus ingens*), en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio liquido y Condiciones de incubación (luz, temperatura). 123

Grafica 100. Curva de Crecimiento Relativo para *Echinocactus platycanthus*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio liquido y Condiciones de incubación (luz). 124

Grafica 101. Curva de Crecimiento Relativo para *Ferocactus flavovirens*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio liquido y Condiciones de incubación (temperatura). 125

Grafica 102. Curva de Crecimiento Relativo para *Ferocactus peninsulae*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio liquido, Condiciones de incubación (luz, temperatura), y Adición de compuestos orgánicos. 126

Grafica 103. Curva de Crecimiento Relativo para *Opuntia amyaclea*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio liquido y Condiciones de incubación (luz, temperatura). 127

Grafica 104. Curva de Crecimiento Relativo para *Opuntia robusta*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional y Condiciones de incubación (luz). 128

Grafica 105. Curva de Crecimiento Relativo para *Stenocereus thurberi* var *thurberi*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio liquido, Condiciones de incubación (luz, temperatura), y Adición de compuestos orgánicos. 129

Grafica 106. Curva de Crecimiento Relativo para *Turbincarpus laui*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio líquido y Condiciones de incubación (luz, temperatura). 130

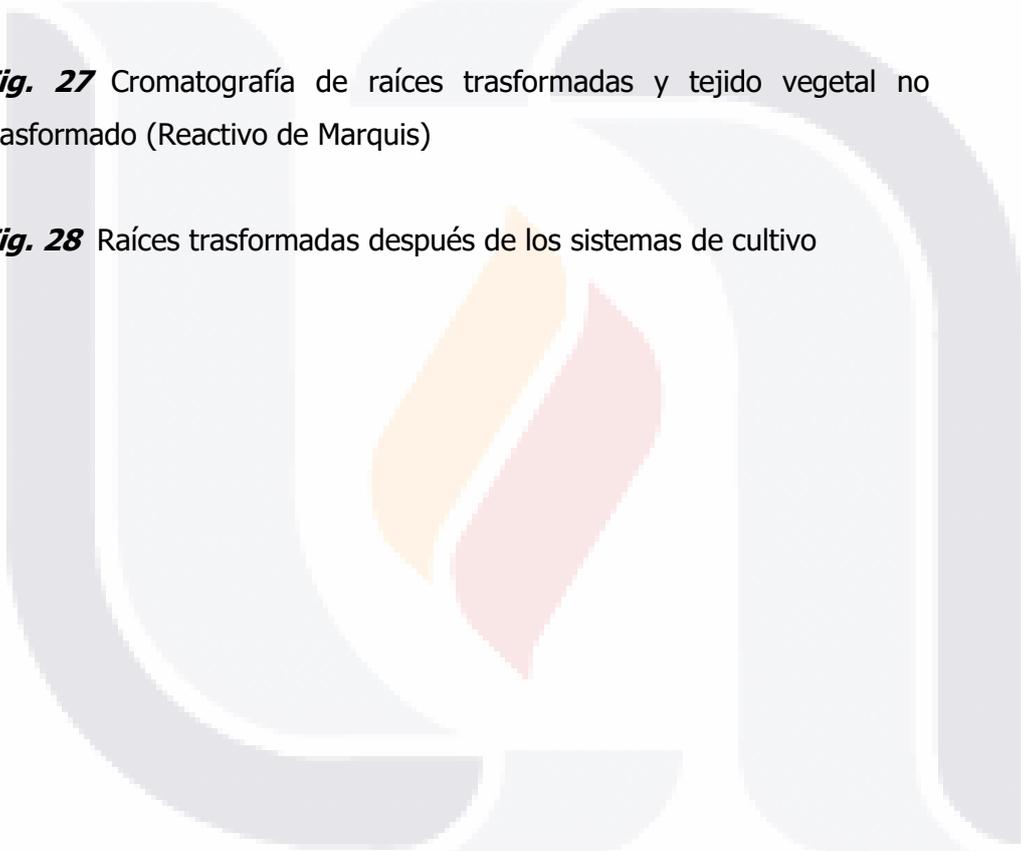
Grafica 107. Curva de Crecimiento Relativo para *Turbincarpus subterraneus* (*Gymnocactus subterraneus*), en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio liquido y Condiciones de incubación (luz, temperatura). 131

Grafica 108. Curva de Crecimiento Relativo para *Turbincarpus shimiedickeanus* var *klinkerianus*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio líquido y Condiciones de incubación (luz, temperatura). 132

Grafica 109. Curva de Crecimiento Relativo para *Turbincarpus shimiedickeanus* var *schwarzii*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional y Condiciones de incubación (luz, temperatura). 133

Grafica 110. Curva de Crecimiento Relativo para *Turbincarpus shimiedickeanus* var *shimiedickeanus*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, y Condiciones de incubación (luz, temperatura). 134

Fig. 24 Cromatografía de raíces transformadas y tejido vegetal no transformado (UV 365nm)	136
Fig. 25 Cromatografía de raíces transformadas y tejido vegetal no transformado (Reactivo de Dragendorff)	138
Fig. 26 Cromatografía de raíces transformadas y tejido vegetal no transformado (Reactivo de Marquis)	139
Fig. 27 Cromatografía de raíces transformadas y tejido vegetal no transformado (Reactivo de Marquis)	140
Fig. 28 Raíces transformadas después de los sistemas de cultivo	141



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

GENERACIÓN Y CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE CACTÁCEAS

Adilene Dávila Galván

RESUMEN

Las cactáceas producen una gran cantidad de compuestos químicos que podrían ser de interés farmacológico, un ejemplo de ello son los alcaloides, que se encuentran en grandes cantidades en los tejidos de estas plantas. Sin embargo, la poca disponibilidad de material vegetal de muchas especies de Cactáceas imposibilita el estudio y aprovechamiento de estos compuestos. Una solución a este problema puede tenerse con la generación y cultivo de raíces de Cactáceas transformadas con *A. rhizogenes*, las cuales en otros grupos de plantas se ha visto que son capaces de crecer *in vitro* con una tasa alta de generación de biomasa y compuestos químicos de interés. En este trabajo se realizó la transformación genética de 52 especies de cactáceas mexicanas con *A. rhizogenes* A4/pCSE4 de acuerdo a González et. al. (2006). La actividad GUS fue detectada histoquímicamente en las raíces presuntamente transformadas como lo describe Stropf (1992). Se realizó posteriormente una (PCR) para la amplificación de los genes de interés (*rol B*, *virD*, *nptII* y *gus*) de las raíces transformadas. Finalmente se realizó la extracción de metabolitos secundarios de raíces transformadas y tejido vegetal (*in vitro*, *in vivo*) no transformado, así como una cromatografía en capa fina (TLC) de los mismos por tres sistemas de detección; UV-254nm, reactivo de Dragendorff, y reactivo de Marquis. De las 52 especies de cactáceas Mexicanas analizadas, pertenecientes a 17 géneros diferentes, se encontró que el 81% generaron raíces presuntamente transformadas. Se observó que el máximo crecimiento de la raíz se da en los primeros 30 días. La coloración azul en la prueba de la β -glucoronidasa (GUS) indicó la presencia del gen *gus* en las raíces. De las 42 especies de cactácea que generaron raíz, solo 30 fueron positivas a la prueba GUS. De 27 especies de cactáceas que se les realizó PCR, 9 fueron positivas a los genes (*rol B*, *nptII* y *Gus*). Se comprobó que las raíces conservan su capacidad biosintética para la producción de metabolitos secundarios como los alcaloides. Se demostró la posibilidad de generar y cultivar raíces transformadas de 42 especies de cactáceas mexicanas. Estas raíces podrían ser la base de un sistema biotecnológico que permita la producción de metabolitos secundarios de cactáceas sin la necesidad de coleccionar plantas de su hábitat natural.

ABSTRACT

Cacti produce a large amount of chemicals that might be of pharmacological interest, an example of this are alkaloids, which are found in large quantities in these plants' tissues. Nevertheless, the limited availability of plant material of many species of cacti has prevented the research and use of these compounds. One solution to this problem may be the generation and cultivation of Cactáceas transformed with *A. rhizogenes*, which are able to grow *in vitro* with a high rate of biomass generation and production of chemical compounds of interest. In the present study, 52 species of Mexican cacti were transformed with *A. rhizogenes* A4/pCSE4 according to González et. al. (2006). The GUS activity was detected histochemically in putatively transformed roots as described by Strop (1992). The genes *rolB*, *virD*, *gus* and *nptII* were amplified by PCR of the transformed roots. Finally, secondary metabolites were extracted from transformed roots (*in vitro*, *in vivo*) and non transformed plant tissue. These extracts were analyzed by thin layer chromatography (TLC) using three different detection systems, UV-254nm, Dragendorff reagent and Marquis reagent. Of the 52 species of Mexican cacti belonging to 17 different genera used for this study, 81% generated allegedly transformed roots. It was observed that the maximum root growth occurs during the first 30 days. The blue coloration on the β -glucuronidase test (GUS) indicated the presence of the *gus* gene in the roots. Of the 42 species of cactus that generated roots, only 30 were positive for GUS test. Of the 27 species of cacti that underwent PCR, nine were positive for the genes *rol B*, *nptII* and *Gus*. We found that transformed roots retain their biosynthetic capacity to produce secondary metabolites such as alkaloids. We were able to demonstrate the ability to generate and cultivate transformed roots of 42 species of Mexican cacti. These roots could be the basis of a biotechnological system that allows the production of secondary metabolites of cacti without the need to collect plants from the wild.

I. MARCO TEORICO

I.1. Antecedentes sobre las Cactáceas

Las cactáceas, por su aspecto peculiar, han sido motivo de atención en nuestro país desde tiempo remotos. La historia y el folklor registran la importancia que adquirieron entre las tribus prehispánicas según se deduce de sus tradiciones, teogonías, códices, monumentos descritos antes de su destrucción y de las numerosas voces con que designaron y aún persisten en nuestros días (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

La familia Cactácea es una familia grande y diversa originaria de América. México es sin duda el más importante centro de concentración de cactáceas, con un total de 48 géneros y 563 especies reconocidas. Del total de los géneros que existen en este país, 15 (31.3 %) están estrictamente restringidos a sus límites territoriales, y 20 más son casi endémicos. En este último caso, una o varias de las especies de un género determinado extienden su distribución a áreas adyacentes al territorio mexicano, especialmente en el suroeste de los Estados Unidos (Hernandez y Godinez 1994).

I.1.2 Uso de las cactáceas desde sus orígenes

Cuando los seres humanos emigraron al continente americano desde Asia hace más de 40 mil años, se encontraron plantas y animales muy diferentes de cualquier experiencia anterior. El movimiento hacia el sur y hacia el este de estas personas durante muchos milenios finalmente los llevó a las regiones más áridas. Allí se encontraron con una variedad de cactus, sin duda a varios de ellos les encontraron alguna utilidad. Poco a poco, algunos de los cactus adquirieron más importancia que otros, como fuente segura de alimentos o porque les confirieron atributos divinos (Anderson, 2001).

Hace aproximadamente 23,000 años, los humanos emigraron a América del Sur a través del Istmo de Panamá. Una vez más se encontraron con extrañas y nuevas plantas y animales en este continente. La supervivencia de los seres humanos dependía del uso exitoso de los recursos naturales, ya sea como fuente de alimento o fibra, o como un medio de tratar con los espíritus. El registro arqueológico en muchas

de estas regiones áridas es escaso, sin embargo, algunos datos interesantes se han obtenido de restos de planta, tallas, pinturas y textiles. Los cactus están presentes muy temprano en estos registros, los más interesantes son las pinturas rupestres en la Serra da Capivara, Piauí, Brasil. Representado en estas pinturas, que datan de hace 12,000 años, lo que parecen ser plantas de *Tacinga inamoena*. Tanto en México y Perú, las semillas de la subfamilia de *Opuntioideae* aparecen en los depósitos que datan de más de 9,000 años, mucho antes de que cualquiera de los pueblos indígenas se convirtieran en agricultores. Uno de los sitios más interesantes es la cueva de Pachumachay, ubicado en los Andes centrales del Perú, a 4200 m. Allí, una gran cantidad de semillas de *opuntia* se han descubierto desde 11,800 años y solo ahora el cactus *Austocylindropuntia flusossa* crece a este tipo de altura.

La agricultura se desarrolló hace entre 3500 y 6000 años en diversas regiones de América del Sur, incluyendo el cultivo de frijol y algodón. Uno de los usos más notables de los cactus por el pueblo en este período precerámico fue la producción de anzuelos usando espinas de cactus; estas eran cuidadosamente dobladas y atadas en una curva usando fibras de *Furcraea* (Agaveceae), posteriormente se endurecen durante muchas semanas, luego se corta a partir de los cactus. Se unían puntas de algodón o *Furcraea* y se utilizaban para la pesca (Anderson, 2001).

Las cactáceas, son autóctonas del continente americano en donde se encuentran distribuidas especialmente en las regiones áridas y semiáridas. México, por sus peculiares condiciones de latitud topografía y climas es el país que alberga, posiblemente, la mayor cantidad de especies. Cuando a principios del descubrimiento de América las cactáceas fueron conocidas en Europa, causaron gran asombro y admiración por lo exótico y peculiar de su aspecto y pronto ocuparon de ellas botánicos, médicos y horticultores (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

De particular interés es el desarrollo de conocimiento de las plantas entre las personas que habitaban en el valle de México, antes llamado Anáhuac. Muchas tribus separadas vivieron en esta región desde hace milenios, no siempre de manera amistosa. Hacia el siglo XV las tribus nahuas ganaron la supremacía; la más poderosa, los aztecas, quienes construyeron la ciudad de Tenochtitlán en una isla en un lago en el centro de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Anáhuac. Uno de los jefes más importantes de los nahuas, Nezahualcoyotl de la tribu acolhua, tenía un gran afecto por las plantas (Anderson, 2001).

Por los códices que escaparon a la destrucción de los conquistadores, por la cerámica, por algunas pinturas murales, por las interesantes obras escritas a raíz de la conquista como el *Códice Cruz, Badiano o Barberini* (1552), y por las obras de Hernández (1649), se han podido conocerse las plantas de mayor interés. En la vida económica, social y religiosa de los nahuas, las cactáceas desempeñaron un papel importante; a tal grado que el jeroglífico de la Gran Tenochtitlan, ostentaba airesamente un nopal, el símbolo que conserva el escudo de nuestro México actual; intervinieron en sus prácticas religiosas y algunas fueron elevadas a categorías de dioses; se usaron con frecuencia en la magia, pues varias de ellas eran consideradas como talismanes capaces de alejar los espíritus del mal; fueron empleadas en remedios en la curación de enfermedades; influyeron determinando la fundación de poblados en regiones cactíferas, y se la tuvo en gran estima como plantas de ornato (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Dentro de la nomenclatura que usaron para designarlas había dos grupos bien definidos: el de los *Tochtli* integrado por las especies de tallos articulados, discordes y aplanados, y el de los *comitl*, que incluía los cactus provistos de tallos feroidales (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

I.1.3 Descripción Botánica

Cactácea en algún momento se confunde con otras suculentas porque la familia de los cactus es una de varias familias de plantas que tienen grandes tallos carnosos, sin hojas, de larga vida, de diferentes formas y tamaños, en los que están a cargo grupos de espinas. Una planta suculenta es la que es capaz de almacenar agua para sobrevivir en un clima árido.

Innes y Glass (1991) describe los hábitos de cactus simplemente como globulares, escalada, colgantes, columnas semejantes a hojas, o la agrupación. Hunt (1989) lista de 13 formas diferentes de cactus de crecimiento: (1) con areolas de fieltro en las axilas de las hojas persistentes, (2) tallos cilíndricos, no segmentado, hojas caducas,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cilíndricos, (3) los tallos cilíndricos, no segmentado, hojas pequeñas (caído) ; espinas ausentes, (4) tallos aplanados, segmentados; ausente de espinas, (5) se deriva de dos alas, no segmentado, areolas confinados a los márgenes, (6) tallos planos, segmentados, (7) tallos delgados, cilíndricos, (8) se deriva largo, cilíndrico, (9) se deriva esférica con tapa como cefalio, un área especializada de flores teniendo en la parte superior de un cactus madre con entrenudos muy cortos por lo general una densidad de lana o peludos, (10) tallos esféricos cilíndricos, (11) tallos aplanados esféricos, de cinco costillas, (12) tallo con tubérculos, se asemeja a una roseta de hojas, y (13) tallos con las areolas como tubérculos.

El tallo del cactus tiene formas muy diversas pero constantes para cada entidad taxonómica, la estructura histológica es semejante, en lo general, a la de las demás dicotiledóneas (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Los cactus son plantas suculentas en el que los tallos están especializados para almacenar agua. Las areolas son exclusivas de los cactus. Una areola es una yema lateral o axilar muy especializada, o un brote o rama pequeño. Un brote pequeño posee nodos, los puntos de fijación de la hoja, entrenudos, las porciones de tallo entre hojas adyacentes. Los entrenudos son muy cortos, dando lugar a una masa compacta de nodos, y la yema axilar asociada a cada hoja da lugar a las espinas y a las estructuras reproductivas. Cuando se mira tanto a la areola como al tubérculo, a menudo se puede ver que la areola, de hecho, se origina de la base de la hoja o tubérculo (Anderson, 2001).

El rasgo más distintivo de la mayoría de los cactus son las espinas, que nacen de las areolas. La mayoría coincide en que las espinas de los cactus son hojas modificadas, y no espinas, derivadas de las ramas.

La mayoría de las raíces se extienden ampliamente debajo de la superficie del suelo, lo que les permite absorber el agua que se ha filtrado a través de la parte superior del suelo tras la breve lluvia del desierto.

Las flores de los cactus surgen de las areolas. Por lo general, una sola flor se produce a partir de cada areola, aunque pueden surgir varias flores de una areola

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

única de *Myrtillocactus geometrizans*. *Pereskia* es el único género que produce una inflorescencia organizada en un tallo.

Al igual que otras partes del sistema reproductivo de los cactus, las características del grano de polen varían considerablemente dentro de la familia y proporcionar información valiosa sobre la relación. En general, el polen de cactus es de tamaño mediano a grande (35 a 125 μm), de esferoidal a subprolato (tendido), y con aberturas de 3- 12 μm .

Las semillas de las cactáceas presentan variaciones en la forma, tamaño, estructura y color de la testa y en las características del embrión y de los tejidos almacenadores de sustancias nutritivas, que se atribuyen estos caracteres gran importancia filogenética y taxonómica. En una semilla madura hay que considerar varias partes; el embrión y el perisperma, la testa, el micrópilo, el hilo, así como la carúncula, el estrofiolo y la cobertura funicular que existe en las semillas de algunos géneros. El embrión es el primordio de la planta y en él están embozados los órganos fundamentales (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Una de las características más distintivas de cactus es que contienen pigmentos como la betalaínas, que contienen nitrógeno (pigmentos solubles en agua, incluyendo betacianinas y betaxantinas), a diferencia de las antocianinas que no contienen nitrógeno (flavonoides solubles en agua) típico de la floración mayoría de los otros plantas. Esto es una fuerte evidencia de que la familia pertenece al orden *Caryophyllales* (Anderson, 2001).

Los principales compuestos nitrogenados encontrados en las cactáceas son: aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos y alcaloides. En la familia de las cactáceas no se han hecho estudios específicos de estos compuestos con excepción de los alcaloides, por lo que lo único que sabemos sobre estas sustancias es lo aplicable en general a los vegetales superiores (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

I.1.4 Clasificación

La evidencia de las interrelaciones viene de características morfológicas y anatómicas en adición a las nuevas pruebas de la química, la fisiología, y los estudios moleculares. Los fósiles pueden revelar los retazos de un linaje de organismos, pero no se han descubierto fósiles de cactáceas.

Las poblaciones de plantas se componen de individuos, y los individuos varían con frecuencia, tal como lo hacen en la población de animales, incluyendo seres humanos. El mismo tipo de pruebas utilizadas para estudiar la relación planta se utiliza para dibujar los límites que separan los taxones de la plantas, y se da nombre a los taxones.

La clasificación de la familia Cactácea desarrollado por el Grupo Internacional de sistemática de cactáceas reconoce cuatro subfamilias-*Preskioideae*, *Maihuenioideae*, *Opuntioideae*, y *Cactoideae*, a su vez la familia *Cactoideae* se divide en nueve tribus (Anderson, 2001).

Cactáceas

Preskioideae

Son plantas arbóreas, arbustivas, trepadoras, con metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) en los tallos y metabolismo C3 en las hojas. Los tallos son redondos en la sección transversal, no muestran estrías o tubérculos. Hojas presentes. Las espinas presentes. Flores solitarias o en inflorescencias, diurnas; pericarpios con escamas u hojas, a veces persistentes; areolas florales raras veces con espinas; tubos florales ausentes. Frutos indehiscentes, en forma de bayas, a menudo con la cáscara jugosa. Semillas más o menos redondas, de 1.7 - 7.5mm de diámetro, de color negro marrón, brillante, sin arrugas o quilla, no se expande alrededor de la pequeña región hilio-micropilar. Se distribuyen desde el sur de México en todo el Caribe y América Central, y en gran parte de América del Sur al este de los Andes.

La subfamilia ***Pereskioideae*** representan el grupo de los cactus con las características más primitivas o ancestrales, y varias características demuestran la relación de la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

familia a otros miembros del orden *Caryophyllales*. Leuenberger (1986) ha hecho el estudio definitivo de *Pereskioideae*.

- *Pereskia*

Maihuenioideae

Los miembros de la subfamilia ***Maihuenioideae*** son arbustos cespitosos, solo presentan metabolismo C3. Tallos cortos suculentos, cilíndricos a globosos. Hojas pequeñas, cilíndricas y persistentes. Espinas usualmente 3 por areola. Flores terminales, solitarias. Los frutos poco carnosos, con pequeñas escamas. Semillas con 3-4mm de diámetro. Distribución: restringido solo en Argentina y Chile.

- *Maihuenia*

Opuntioideae

La subfamilia ***Opuntioideae*** incluye plantas variables en hábito, arbóreo, arbustivas o cespitosas. Los tallos generalmente son segmentados en distintos conjuntos o pencas. Hojas presentes, efímeras, redondas en la sección transversal, pequeñas. Gloquidios presentes. Tiene variación de espinas. Flores generalmente laterales, sésiles, solitarias, diurnas; hojas con pericarpios, aréolas, gloquidios y espinas. El tubo floral es corto o ausente. Presenta pequeños frutos, indehiscente, a veces se secan en la madurez. Las semillas van desde redondas a ovaladas, de 3-12mm de diámetro, cubiertas por una envoltura funicular. Distribución: desde Canadá en todo Norte América, el Caribe, América Central y casi hasta el extremo sur de América del Sur.

- *Austrocylindropuntia*
- *Brasiliopuntia*
- *Consolea*
- *Cumulopuntia*
- *Cylindropuntia*
- *Grusonia*
- *Maihuniopsis*
- *Miquelipuntia*
- *Opuntia*

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- *Pereskiopsis*
 - *Pterocactus*
 - *Quiabentia*
 - *Tacinga*
 - *Tepherocatus*
 - *Tunilla*

Cactoideae

Subfamilia ***Cactoideae*** incluye plantas muy variables en hábito, arbóreo, arbustivas, cespitosas y epifitas. Raíces fibrosas y tubérculos. Tallos usualmente no segmentados, de globosos a columnares, estriados o tuberculosos; las zonas de reproducción pueden estar diferenciadas o indiferenciadas. Con hojas rudimentarias o ausentes. Gloquidios ausentes. Flores sésiles, diurnas o nocturnas; pericarpios escamosos; tubo floral corto alargado. Frutas dehiscentes, carnosas o secas, variable en el tamaño y forma. Semillas de 0.4-5mm de diámetro. Distribución: en todo el hemisferio occidental, incluso también en África, Madagascar, y en las islas de la India y en Sri Lanka (Anderson, 2001).

Esta subfamilia se divide a su vez en 9 tribus las cuales son:

- *Calymmanthium*
- *Hilocereeae*
- *Cereeae*
- *Trichocereae*
- *Notocactae*
- *Rhipssalideae*
- *Browningieae*
- *Pachycereeae*
- *Cacteae*

I.1.5 Situación actual

Las cactáceas en México desempeñan un papel muy importante desde el punto de vista biológico, social y económico. En el país existen alrededor de 715 especies de cactáceas, de las cuales cerca de 80% son endémicas, y casi todas las demás son compartidas con el sur de Estados Unidos o con Centro y Sudamérica. Muchos de sus frutos y tallos son alimentos importantes en la dieta de los mexicanos, aunque también se usan como forraje, ornamento y fuente de sustancias químicas de interés médico y farmacológico; asimismo, existen pruebas claras que apuntan al papel ecológico sobresaliente de muchas de las cactáceas en las zonas áridas y semiáridas del país. En contraste, también se sabe que este grupo ha sido el blanco de un intenso saqueo ilegal (de plantas y semillas), con el fin de satisfacer el mercado internacional, especialmente en Estados Unidos, Japón y varios países europeos. Este saqueo se ha llevado a cabo por varias decenas de años, y en la actualidad hay indicios de que se sigue practicando, aun cuando las medidas de protección de los ambientes silvestres en México son más eficientes que en el pasado (Benítez y Dávila, 2002).

De entre las muchas familias amenazadas, como las Palmáceas y flora tropical, se va haciendo patente el desastre que está ocurriendo con los parajes ecológicos de las cactáceas. Si bien en Estados Unidos ya existía un férreo control del comercio de cactus y existían parques y ecosistemas protegidos como reservas naturales, la situación era muy diferente en México y América del sur. La situación de pobreza de alguno de esos países, las mafias especializadas en comercio ilegal de especies y la baja moralidad de importadores de países ricos con el fin de abastecer las líneas de coleccionismo, están llevando a muchos cactus al borde de la extinción. La lentitud de su crecimiento y las dificultades de reproducción en sus parajes naturales, hacen que las poblaciones de cactus desciendan y entren en regresión ante las rapiñas continuadas (CITES).

I.1.6 Usos actuales y potenciales

Desde los primeros albores de la historia el hombre americano en las zonas desérticas y semidesérticas del Nuevo mundo, las cactáceas, al igual que las agaváceas, jugaron un papel muy importante en el sustento y la cultura de las primitivas tribus nómadas que recorrían estos territorios, influyendo en forma marcada en los procesos de sedimentación y civilización de las mismas. Las cactáceas fueron para los indígenas fuente de alimento, bebida medicina y materia prima para la construcción de viviendas (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada 1991).

Utilidad de la cactáceas como alimento humano

Todos los órganos de las cactáceas son comestibles y a través de los tiempos se han usado como alimento los distintos órganos de muy diversas especies, como lo señalan por Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991):

Uso de las raíces. Su gran contenido de fibra, no han sido usadas por lo general como alimento, salvo las raíces tuberosas.

Uso de los tallos. Los nopalitos se obtienen de diversas especies de nopales que crecen en el altiplano, generalmente desarrollándose en asociaciones extensas y han sido empelados como alimento humano desde hace mucho tiempo.

Uso de los frutos. En general, la pulpa, integrada por los funículos de las semillas a madurar el fruto se llena de líquidos azucarados, constituyen un alimento fresco, dulce, muy gustado en el país. Su importancia alimenticia radica en su alto contenido de azúcares y de cantidades considerables de vitamina B, C y E.

Utilidad de las cactáceas como forraje

Las pencas o cladodios de los nopales (*Opuntia*), los tallos de algunos órganos y cardones (*Cereus sensu lato*), y los tallos de algunas biznagas (*Echinocactus y Ferocactus*) son ampliamente utilizados como forraje. A pesar del escaso valor

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

nutritivo de estos tallos, se ha constatado que el ganado en el campo en ocasiones puede sobrevivir durante las grandes sequías alimentándose de nopales, aprovechando así el gran contenido acuífero de los parénquimas (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada 1991).

Usos medicinales de las cactáceas

Han sido usadas en la medicina tradicional de México desde épocas anteriores a la conquista, ya sea por sus propiedades farmacológicas o bien por las mágico- adivinatorias que les han sido atribuidas por shamanes, brujos o sacerdotes en prácticas medico-religiosas, por ejemplo el empleo de un *Cereus* para el tratamiento de huesos entre los antillanos. Algunas especies siguen siendo usadas como remedio para curar, entre otros padecimientos, inflamaciones musculares, dolores reumáticos, fracturas, constipaciones intestinales, diarrea, úlceras gástricas, diabetes, cáncer del estómago y afecciones cardio-vasculares y mentales (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada 1991).

Las propiedades antibióticas de las cactáceas han sido estudiadas, entre otros, por McCleary y colaboradores en 1960, encontraron que todas poseen, en mayor o menor grado propiedades que inhiben el crecimiento de una o varias especies de bacterias, por tanto la actividad antimicrobiana parece estar relacionada con el metabolismo ácido crasuláceo (CAM) de las plantas (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada 1991).

Otros usos de las cactáceas

Estas plantas han sido usadas y lo siguen siendo con fines muy diversos, como lo son:

- Protección de suelos
- Mejoramiento de suelos
- Combustible
- Material de construcción
- Fines artesanales
- Formar setos vivos
- Fuente de azúcar, alcohol y vinagre

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Fuente de mucílago, gomas y pectinas
 - Fuente de fibras y pulpas para la fabricación de papel y materiales aislantes
 - Fuente de sustancias diversas y como fuente de energía
 - Industria cosmetológica
 - Obtención de colorantes
 - Plantas de ornato

(Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada 1991).

I.1.7 Metabolitos secundarios producidos en cactáceas

Un gran número de drogas se obtienen a partir de plantas que contienen alcaloides. Sin embargo, el grupo es muy variado y tan sólo las propiedades químicas debidas al nitrógeno básico unifican las numerosas clases de alcaloides. Por esta razón las cuestiones relativas al papel fisiológico de los alcaloides de la planta, de su importancia en taxonomía y biogénesis, suelen ser enjuiciadas de forma más adecuada en relación a una determinada clase de alcaloide (Trease y Evans, 1987).

Es un tanto difícil dar una definición precisa del término "alcaloide" (semejante a álcali), debido a que no existe una clara distinción entre alcaloides y aminas complejas de origen natural. Los alcaloides son productos vegetales, aunque algunos se encuentran en los animales, y prácticamente todos se obtuvieron en el laboratorio por síntesis química. No obstante las dificultades que encierra una definición precisa, el término alcaloide es sumamente útil porque comúnmente se aplica a compuestos nitrogenados básicos de origen vegetal que son fisiológicamente activos (Tyler et al., 1979). Los alcaloides típicos derivan de fuentes vegetales, son básicos, contienen uno o más átomos de nitrógeno (generalmente en anillo heterocíclico) de un amino, y muchos, especialmente los usados en farmacia y en medicina, suelen poseer una marcada acción fisiológica en el ser humano y otros animales (Trease y Evans, 1987).

Los alcaloides considerados en su más amplio sentido, han de poseer un átomo de nitrógeno que puede ser primario (mezcalina), secundario (efedrina), terciario (atropina) o cuaternario (uno de los átomos de N de tubocurarina), y este aspecto afecta a los derivados alcalóidicos que pueden prepararse y a los procedimientos de su

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aislamiento. En las plantas los alcaloides no pueden existir en estado de sales como amina o como alcaloides N-óxidos (Trease y Evans, 1987).

La presencia de alcaloides en cactáceas fue reportado por primera vez por Lewin (1888) en varias especies del género *Anhalonium* (*Ariocarpus*). Estas investigaciones fueron estimuladas primordialmente por buscar el principio alucinógeno del peyote, cuyos extraordinarios efectos fueron descritos hace más de cuatro siglos por Fray Bernardino de Sahagún, y desde entonces hasta nuestros días, han sido, siguen y seguirán siendo objetivo de numerosas investigaciones. Por este motivo, la investigación de alcaloides en las cactáceas fue enfocada principalmente hacia las varias plantas conocidas con el nombre genérico del peyote.

Actualmente se sabe que otras muchas cactáceas contienen alcaloides pues han hecho pruebas de campo con reactivos especiales en diversas especies y alrededor del 40% ha sido positivo; en otras especies se presume su existencia (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada 1991).

I.2. Raíces Transformadas

I.2.1 Descripción de *A. rhizogenes*

Cuando varias plantas son susceptibles (principalmente especies de gimnospermas y dicotiledóneas) y son heridas en su ecosistema natural, estas producen sustancias fenólicas simples, tales como la acetosiringona (*Fig. 1*), que induce la localización del plásmido *vir* (virulencia) genes de *Agrobacterium* que son los responsables para la transferencia de los fragmentos de plásmido de Ti (inductor de tumor) o el plásmido Ri (inducción de raíz) de T-ADN (para el caso de de *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*, respectivamente) a las células vegetales (Nilsson y Olsson, 1997). Los genes del fragmento de ADN transferido median la formación de tumores neoplásicos de la agalla de la corona y los tejidos raíces pilosas, que producen (y secretan en el suelo) sustancias llamadas opinas (aminoácidos inusuales; (*Fig. 1*), utilizados por *Agrobacterium* como nutrientes (Weising y Kahl 1996).

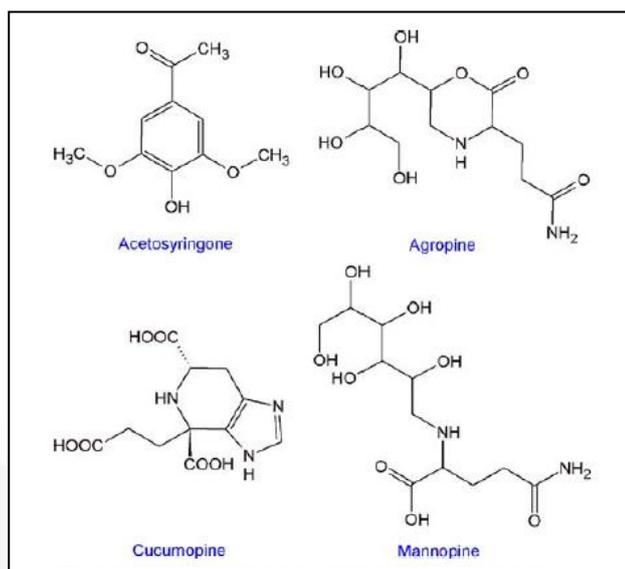


Fig. 1 Estructuras químicas de acetosiringona y algunas opinas (Georgiev et al., 2007)

Agrobacterium rhizogenes (antes *rhizogenes Phytomonas*) fue identificado por primera vez hace más de 70 años (Riker et al. 1930; Hildebrand 1934; White 1972) como el agente causal de la enfermedad conocida como síndrome de la planta raíz-pilosa o enfermedad de la raíz-de la esfera (Fig. 2)



Fig 2. Capa de raíces de tomate en hidroponía infectado por *A. rhizogenes*. (Veena et al. 2007)

A. rhizogenes es una bacteria del suelo Gram-negativa, en forma de varilla que pertenece al género *Agrobacterium* (Conn 1942). *A. rhizogenes* es un pariente cercano de la más conocida *A. tumefaciens*, que es el agente causal de la enfermedad de agalla de la corona y las especies más caracterizadas entre el género *Agrobacterium*.

Infecta a las heridas de las células de la planta debido a la producción de compuestos fenólicos que atraen *A. rhizogenes*. Las bacterias se mueven a la zona de la herida por

quimiotaxis. Tras la infección en la herida seguida por la integración del material genético de *Agrobacterium* al genoma de las plantas se desarrolla la enfermedad de la raíz pilosa. La enfermedad de la raíz pilosa se caracteriza por el crecimiento de raíces plagiotrópicas, un alto grado de ramificación lateral, profusión de pelos de la raíz, y una mayor tasa de crecimiento similar a la de los callos no diferenciados, aunque el tejido de la raíz se mantiene en un órgano altamente diferenciado y funcional (Tepfer 1984; Balandrin et al. 1985; Charlwood y Charlwood 1991; Flores et al 1999). Una característica importante de las raíces inducidas por *A. rhizogenes* es su capacidad única para crecer *in vitro* en ausencia de reguladores de crecimiento exógenos (Rao y Ravishankar 2002), son de crecimiento rápido y plagiotrópicas (Giri y Narasu 2000). Estas características de crecimiento han hecho a las raíces pilosas una herramienta ampliamente utilizada para la producción de metabolitos secundarios, la investigación de la función de genes y el estudio de la biología de la raíz en general (Veena y Taylor 2007).

I.2.1.1 Filogenia y Biología de *A. rhizogenes*

La diversidad de la cepas de A. rhizogenes y sus rangos. Los rangos naturales de *A. rhizogenes* parecen estar restringidos a un número limitado de especies de plantas: manzana, pepino, tomate o el melón (Smith y Townsend, 1907; Riker et al. 1930; Davioud et al. 1988; Isogai et al. 1990, Weller et al. 2000, 2004, 2006). Sin embargo, en condiciones de laboratorio, más de 450 especies diferentes de plantas son susceptibles a la infección por *A. rhizogenes* (Tepfer 1984, Porter 1991), incluyendo una amplia gama de familias de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas (De Cleene y De Ley, 1981; Tepfer et al. 1989) y algunas gimnospermas (Diouf et al. 1995; Yibrah et al. 1996). La mayoría de los tejidos y órganos vegetales, incluyendo el hipocótilo, hojas, tallo, tallos, pecíolos, puntas apicales, los cotiledones, protoplastos, la raíz de almacenamiento, y tubérculos, han demostrado la capacidad de ser infectados y transformados genéticamente por *A. rhizogenes*, con la consiguiente producción de raíces pilosas (Mugnier 1988; Han et al. 1993; Drewes y Staden 1995; Giri et al. 2001; Krolicka et al. 2001; Azlan et al. 2002). Sin embargo, la respuesta varía dependiendo de la cepa de *A. rhizogenes* y su interacción con la especie de la planta y el tipo de tejido (Veena y Taylor 2007).

Se ha identificado y caracterizado parcialmente numerosas cepas de *A. rhizogenes*. Sobre la base de mapeo comparativo del genoma y experimentos de hibridación ADN /ADN, todas las cepas han demostrado que poseen una región muy conservada de ADN en el "núcleo" que es esencial para la formación de raíces pilosas (Filetici et al. 1987). A pesar de la confusión actual en la clasificación de las especies, las cepas de *A. rhizogenes* pueden clasificarse en varios subgrupos en función del tipo de opina que producen. La cepa de *A. rhizogenes* más común identificadas hasta la fecha incluyen cepa del tipo agropina (representado por plásmidos Ri PRIA4, pRi1855, pRiHRI, pRi15834 y pRiLBA9402), las cepas de tipo manopina (representado por el plásmido Ri, pRi8196), las cepas del tipo cucumopina (representado por el plásmido Ri, pRi2659), y la del tipo mikimopina (representado por el plásmido Ri pRi1724). Mikimopina y cucumopina son estereoisómeros, pero no se ha encontrado homología entre los genes de biosíntesis a nivel de nucleótidos (Filetici et al. 1987; Davioud et al. 1988; Isogai et al. 1988; Petit et al. 1983; Suzuki et al. 2001).

También las cepas de *A. rhizogenes* difieren entre sí en términos de la polaridad de la infección del tejido de la planta. Por ejemplo, algunas cepas de *A. rhizogenes* son capaces de inducir el crecimiento de raíces sólo en la superficie apical de la raíz de los discos de zanahoria y no dan ninguna consecuencia perceptible en la superficie basal, mientras que otros favorecen la proliferación de raíces tanto en la inoculación de las superficies apical y basal (Cardarelli et al. 1985; Ryder et al. 1985). Basándose en estas observaciones, varias cepas de *A. rhizogenes* fueron clasificadas en tipos polares y no polares. Las cepas de agropina que son del tipo no polares, ya que provocan la formación de raíces pilosas, independientemente de la orientación del disco, mientras que todas las otras variedades son polares, ya que provocan la formación de numerosas raíces sólo cuando el disco se coloca en la orientación invertida (Veena y Taylor 2007).

El desarrollo de raíces pilosas por cepas de *A. rhizogenes* polares en explantes se ha atribuido al transporte basipetalo de la auxina en las plantas (Meyer et al. 2000)

I.2.1.2 Bases moleculares y fisiológicas de la formación de raíces pilosas

El mecanismo de formación de raíces pilosas no se entiende totalmente. La formación de raíces pilosas se divide en cuatro pasos: proceso de activación, el movimiento del ADN de la bacteria en la célula vegetal, y la inducción de la formación de raíces y el crecimiento. De los cuatro procesos, los tres primeros pasos se entienden mejor dadas las similitudes en los procesos biológicos y los modelos existentes de la patogénesis proporcionada por amplios estudios de *A. tumefaciens* C58 (Veena y Taylor 2007).

El plásmido Ri de *A. rhizogenes* y el plásmido Ti de *A. tumefaciens* son muy similares en términos de composición, así como en la estructura. Los estudios comparativos de la secuencia completa de varios plásmidos Ri y plásmidos Ti indican que muchos de los mecanismos de activación, el procesamiento, y el movimiento del T-ADN de la bacteria a la célula de la planta se conservan entre los dos tipos de plásmidos. En ambos plásmidos Ri y Ti, el T-ADN es flanqueado por repeticiones directas de 24 pb, conocido como secuencias de frontera (Yadav et al. 1982).

Tanto el Ri y plásmidos Ti contienen genes responsables de la tramitación del ADN-T, para su fijación y la transferencia a la célula de la planta, y para el catabolismo de opinas en los tejidos vegetales transformadas (Ackermann 1977; Moore et al. 1979; Tepfer y Tempe 1981; White y Nester 1980b; Chilton et al. 1982; Spano et al. 1982; Costantino et al. 1984; Tepfer 1989). La observación de homologías entre los plásmidos Ri y Ti en la región de virulencia (VIR) y similitudes en los mecanismos de procesamiento de T-ADN, la transferencia y la integración (Moriguchi et al. 2001) sugieren fuertemente la existencia de un mecanismo común de transferencia de genes.

Una diferencia notable entre *A. tumifaciens* y *A. rhizogenes* es la ausencia de los genes virE1 y virE2 del genoma de *A. rhizogenes* y el plásmido Ri (Moriguchi et al. 2001; Hodges et al. 2004). El gen VirE2 es una proteína de unión a ADN cadena sencilla y VirE1 es su acompañante secretora. La función de VirE2 es la protección del de ADN-T de cadena sencilla del ataque de nucleasas y promueve su importación nuclear en las células vegetales (Yusibov et al. 1994; Rossi et al. 1996; Rossi et al. 1996; Zupan et al. 1996; Gelvin 1998).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

El genoma de *A. rhizogenes* indica claramente que los genes *vir* no son esenciales para la inducción de raíces pilosas (Moriguchi et al. 2001). Es interesante observar que *A. rhizogenes* contiene el gen de la agalla en el plásmido Ri, que puede sustituir a la función VirE2 en *A. tumefaciens* (Hodges et al. 2004).

El mecanismo por el cual la proteína de la AGALLA puede sustituir a la función VirE2 en *A. rhizogenes* se desconoce hasta el momento. Estas diferencias sugieren claramente que los mecanismos de virulencia de Ti y Ri comparten un ancestro común, pero se han convertido en mecanismos separados para la transferencia de ADN-T y que otras variaciones en el procesamiento y la transferencia T-DNA pueda existir, pero quedan por descubrir. Todas las cepas de *A. rhizogenes* contienen una región del ADN-T que se encuentra en el plásmido Ri que lleva genes implicados en la iniciación de las raíces y el desarrollo (genes-*rol*), los genes relacionados con la biosíntesis de opinas, y los genes de función desconocida (Fig. 3; Slightom et al. 1986; Hansen et al. 1994). El segundo T-ADN puede estar presente en los genes implicados en la biosíntesis de auxina (*aux1* o *iaaM* y *aux2* o *iaaH*), junto con otros genes de función desconocida. Los plásmidos R1 con dos T-DNAs, izquierda y derecha (T_L y T_R , respectivamente), se denominan T-ADN "split". El plásmido Ri de las cepas del tipo cucumopina y manopina consiste en una sola región del ADN-T, mientras que la de las cepas del tipo agropina consiste en dos regiones del ADN-T, T_L y T_R , cada una de ~ 15 a 20 kb. Considerando que tanto la T_L -ADN y T_R -DNA son transferidos e integrados en el genoma de la planta huésped de forma independiente, la transferencia de T_L -ADN es esencial para la inducción del síndrome de la raíz pilosa (Phelep et al. 1991; Nilsson y Olsson, 1997; Sevon y Oksman-Caldentey 2002).

Los genes Rol. Varios loci en el T_L -ADN de los plásmidos Ri han demostrado ser esenciales para la inducción de raíces pilosas. El T_L -ADN del plásmido Ri del tipo agropina consiste en por lo menos cuatro loci, *rolA*, *B*, *C* y *D* (White et al. 1985; Estramareix et al. 1986; Slightom et al. 1986). En la década de 1990, se demostró que una combinación de los loci *rolA*, *rolB*, y *rolC* era suficiente para producir el fenotipo de la raíz pilosa, dependiendo de las especies de plantas y el tipo de tejido (Christey 2001). La capacidad de los genes *rolA*, *rolB*, y *rolC* para inducir raíces neoplásicas con

tasas de crecimiento más rápido que los tejidos normales es equivalente a la de la L_T de todo el ADN del plásmido R_i (Spano et al. 1988).

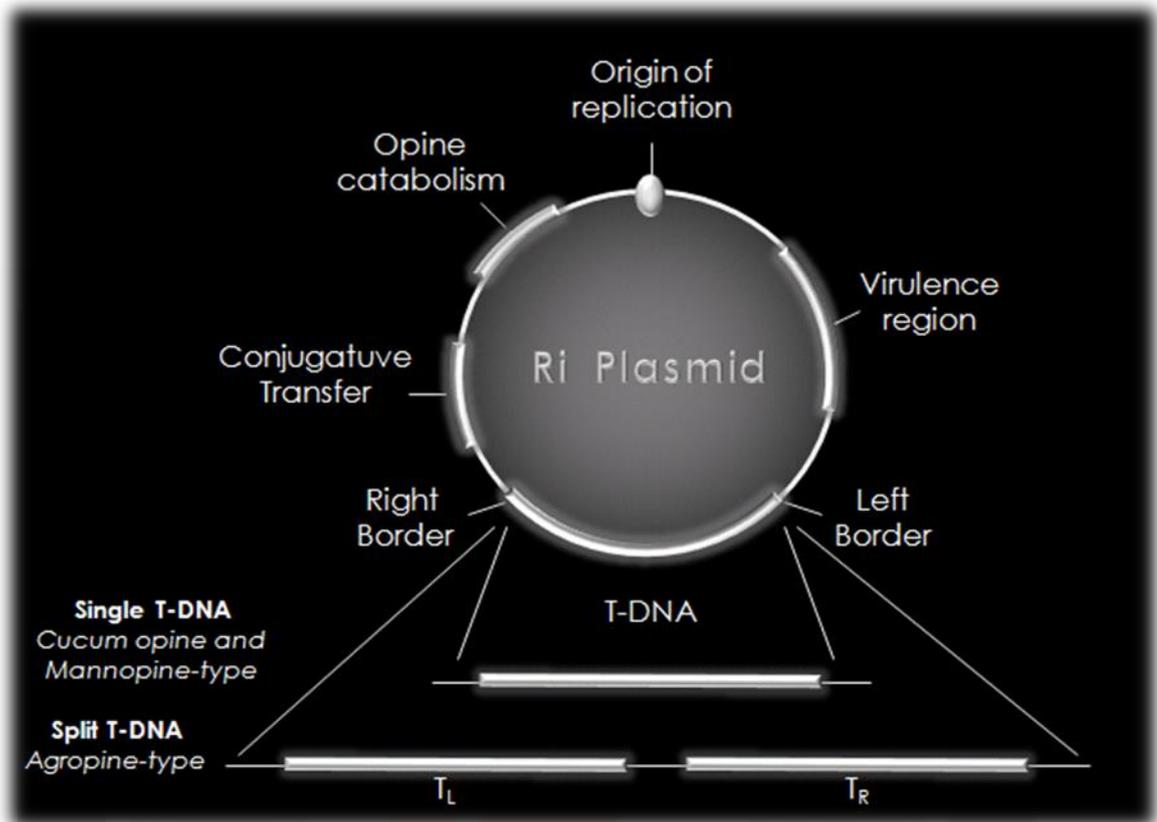


Fig. 3 Estructura de plásmido R_i de *A. rhizogenes* (Veena et al. 2007)

El T_R -ADN que se encuentran sólo en los plásmidos R_i del tipo agropina de *A. rhizogenes* se compone de los genes (*aux1*, *aux2*, *roB*, T_R , *mas1*, *mas2*, y *ags*) que intervienen el control y la biosíntesis de las auxina (Christey 2001). Los genes *aux* se considera que desempeñan un papel de hormona en la inducción de raíces pilosas (Cardarelli et al. 1987a, 1987b) y no son esenciales para la producción de raíces pilosas (Vilaine et al. 1987). Las cepas de *A. rhizogenes* que producen opinas como manopina, cucumopina o mikimopina, transfieren un solo fragmento de ADN-T que es homólogo al T_L -DNA de agropina pero sin el gen *roD* (Meyer et al. 2000; Christey 2001). El T-ADN de las cepas del tipo cucumopina y manopina no posee genes *aux*, sólo los genes *roI* y son suficientes para producir un fenotipo de la raíz pilosa. Los ORF 10, 11, 12 y 15 coincidieron con los genes *roA*, *roB*, *roC* y *roD*, respectivamente. Posteriormente, la mayoría de la investigación se ha centrado en la caracterización de los tres genes *roI* (*roA*, *roB* y *roC*), ya que parecen ser esenciales para la iniciación de raíces pilosas basados en análisis de trasposon "perdida de la función" (White et al.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1985), de tal manera que la inactivación o la sobre-expresión de varios genes *rol* en líneas transgénicas o cultivos de raíces pilosas resultan en diferentes alteraciones de los fenotipos de las plantas y la morfología de la raíz. El *roA* parece jugar un papel importante en la formación de raíces pilosas; se ha implicado en los cambios en la fisiología hormonal incluyendo la interferencia con las giberelinas (Dehio y Schell, 1993; Dehio et al. 1993; Prinsen et al. 1994) y poliaminas (Sun et al. 1991; Al Martin-Tanguy et al. 1996).

Otros efectos hormonales incluyen un aumento en la sensibilidad a auxinas (Maurel et al. 1991), que podría correlacionarse con la membrana plasmática de la ATPasa H⁺ observado en las plantas transgénicas que expresan *roA* (Vansuyt et al. 1992). La expresión transgénica del *roA* muestra un patrón específico del tejido, siendo más fuerte en el tronco y más débiles en las raíces y hojas (Schmülling et al. 1988, 1989; Carneiro y Vilaine 1993). La secuencia del gen de la *roA* de varias cepas de *A. rhizogenes* está en rangos de 279 a 423 pb de longitud (Meyer et al. 2000). El *roA* también pueden estar involucrados en la generación de un desequilibrio funcional en los niveles de fitohormonas (Dehio et al. 1993; Schmülling et al. 1993). En general, se ha propuesto que los efectos de *roA* y *roB* son antagónicos.

Las células vegetales transformadas con el gen *roB* muestran el resultado de una alteración de la hiperpolarización de auxina inducida en la membrana plasmática (Maurel et al. 1991), posiblemente explicado por la evidencia de que *roB* codifica para una β-glucosidasa, que puede liberar las auxinas activas a través de la hidrólisis de β-glucósidos inactivos (Estruch et al. 1991c). La expresión *roB* también induce cambios en la percepción y la sensibilidad de la auxina (Shen et al. 1988, 1990; Maurel et al. 1991, 1994; Meyer et al. 2000). Por otra parte, los estudios sobre la biosíntesis de la auxina han demostrado que *roB* podría desempeñar un papel importante durante los primeros pasos de la inducción de raíces pilosas (Bellincampi et al. 1996). También se ha demostrado que el *roB* posee actividad de tirosina fosfatasa, lo que sugiere un papel en el paso de quinasa/fosfatasa en la transducción de señales de la respuesta a las auxinas (Filippini et al. 1996; Kiselev et al. 2007).

Expresión *roC* también se traduce en una reducción considerable en los niveles de ácido abscísico (ABA), poliaminas y etileno (Nilsson et al. 1996a; Martin-Tanguy 2001,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1996). El promotor del *roC* resulto ser inducido por la sacarosa (Yokayama et al. 1994; Faiss et al. 1996), lo que sugiere que e *roC* puede estar influyendo en la regulación del metabolismo del azúcar y su transporte en la planta (Veena y Taylor 2007).

El gen del *roD* sólo se encuentra en plásmidos Ri T-ADN de las cepas del tipo agropina. La expresión transgénica de *roD* tiene efectos pleiotrópicos incluyendo la inducción temprana de la floración y un aumento en el número de flores, que en última instancia, puede tener implicaciones en la productividad de la planta (Veena y Taylor 2007).

El efecto de los genes codificados del T-ADN de *A. rhizogenes* en los fenotipos de las plantas y su interferencia en las vías de varias hormonas indican claramente que los genes *roA*, *roB* y *roC* podría ser esenciales para la inducción de raíces pilosas, dependiendo de la especie hospedera y / o el tipo de células (Porter, 1991).

Los efectos fenotípicos observados en respuesta a la expresión transgénica de varios genes que codifican en el T-ADN son similares taxonómicamente en diversas especies, sino que varían en función del tipo de los promotores utilizados, número de copias de T-ADN insertado, y los niveles de expresión (Veena y Taylor 2007).

I.2.2 Generación de raíces transformadas

Los explantes heridos de las plantas pueden ser infectados con cepas de *Agrobacterium*, ya sea por inoculación directa con suspensiones bacterianas y la incubación en un medio sólido o por co-cultivo en medios líquidos. En cualquier caso, los explantes infectados tienen que ser posteriormente transferidos a un medio sólido con antibióticos (penicilina o sus derivados Claforan), por lo general cerca de 72 horas más tarde, para eliminar las bacterias (Georgiev et al. 2007).

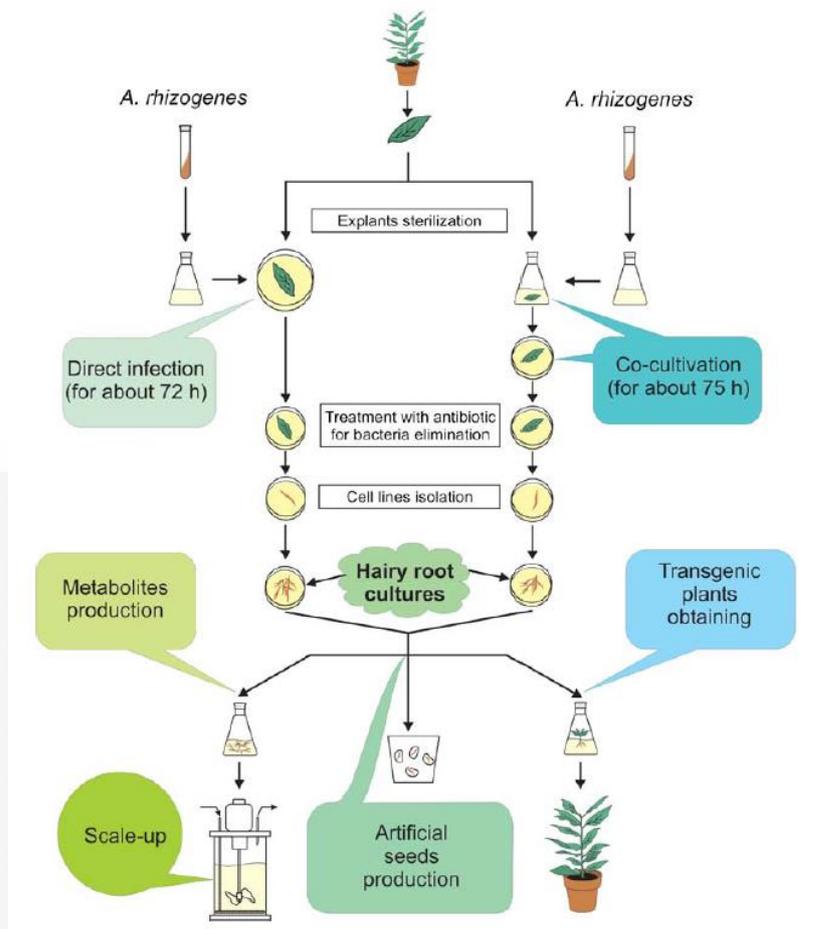


Fig. 4 Diagrama de flujo para la inducción de raíces pilosas en cultivo y algunas de sus aplicaciones. (Georgiev, 2007)

Las raíces neoplásicas transformadas, (que generalmente aparecen después de 1-4 semanas) crecen, con abundantes ramificaciones laterales, en medio Murashige y Skoog o medios de Gamborg B5 libre de hormonas (Pavlov et al. 2002; Sevón y Oksman-Caldentey 2002). El éxito de la transformación genética se puede demostrar de dos maneras: directa o indirectamente, mediante la detección de T-ADN u opinas, respectivamente (Sevon y Oksman-Caldentey 2002). Para detectar T-ADN se puede usar la reacción en cadena de polimerasa PCR (Palazon et al. 2003a; Le Flem-Bonhomme et al. 2004) o hibridaciones Southern blot (Nin et al. 1997; Xie et al. 2001); para detectar T-ADN. Después de un corto período de adaptación, los cultivos de raíces pilosas pueden ser utilizados para producir metabolitos (Wysokinska y Chmiel 1997; Shanks y Morgan 1999; Sevón y Oksman-Caldentey 2002).

La concentración de bacterias también juega un papel importante para la producción de raíces transformadas, las concentraciones subóptimas puede resultar en una menor disponibilidad de bacterias para la transformación de las células vegetales, mientras que altas concentraciones puede disminuir los eventos de transformación ya que se presenta una inhibición por la competencia entre las bacterias. (Giri y Narasu 2000).

Influyen muchos factores en la probabilidad de éxito la transformación del tejido de la planta madre y la regeneración de raíces pilosas, incluyendo la especie, edad y tipo de tejido vegetal (Sevón y Oksman-Caldentey 2002), el tipo de cepa de *Agrobacterium* y, como ya se mencionó, la densidad de la suspensión bacteriana (Park y Facchini, 2000).

La expresión de los genes que codifican enzimas extrañas que catalizan pasos claves en la biosíntesis de metabolitos principales ofrece buenas oportunidades para mejorar los rendimientos y / o la síntesis de nuevos compuestos. Dichas transferencias de genes podrían ser relativamente fácil de realizar, con *A. rhizogenes*, colocando el gen deseado (s) entre los bordes del T-ADN y la transferencia de la construcción resultante en el genoma de la planta huésped (Tzfira y Citovsky 2003).

I.2.2.1 Gen reportero construcciones transgénicas para la identificación de raíces pilosas

Los genes reporteros que codifican cualquiera β -glucuronidasa (GUS) (Jefferson et al. 1987) o proteínas fluorescentes (Haseloff et al. 1997) puede tener funciones importantes en los sistemas de raíces pilosas. Sobre todo, se pueden utilizar construcciones con el gen reportero para seleccionar visualmente a las raíces de interés que expresan el T-ADN, entre otras raíces no transgénicas en un sistema de cultivo. Tales genes reporteros también puede ser utilizados en estudios de análisis de promotor y utilizado para examinar los productos génicos se expresan y en qué compartimento subcelular están localizadas (Veena y Taylor 2007).

A través de la incorporación de genes reporteros constitutivamente expresado como la proteína verde fluorescente (GFP) en el T-ADN de los plásmidos binarios, los investigadores pueden seleccionar fácilmente las raíces pilosas transgénicas para el T-

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ADN. Se ha utilizado con éxito la GFP como marcador de raíces pilosas que expresan el T-ADN de interés (Fig. 5; Collier et al 2005).



Fig. 5 Compuesto de plantas de tomate. (a) las raíces transgénicas producidas en los brotes de tipo silvestre de tomate después de la infección con *A. rhizogenes*. (b) la expresión del marcador GFP puntuales en las raíces transgénicas. (Veena et al. 2007)

Los genes reporteros se expresan en las raíces pilosas y se han utilizado para examinar la función de promotores. Como se describe las raíces pilosas anteriores expresan el promotor GUS de varios genes de *rol* que han sido examinadas en las raíces de tipo silvestre y piloso (Veena y Taylor 2007).

1.2.3 Uso de las Raíces Transformadas en la Producción de Metabolitos secundarios

El volumen y la variedad de Fitoquímicos que utiliza hoy en día la sociedad moderna (entre otras cosas, como los medicamentos, nutrientes, aditivos cosméticos y bioplaguicidas) son cada vez más importantes (Georgiev et al. 2007).

En la actualidad, más del 25% de todos los medicamentos prescritos utilizados en los países industrializados se derivan directa o indirectamente de las plantas, y las ventas anuales de estos productos solamente en los EE.UU. ha superado 30 millones de dólares en 2002 (Raskin et al. 2002; Fowler 2006). Estas altas exigencias están

impulsando esfuerzos para desarrollar nuevas formas de producir metabolitos de origen vegetal. Las técnicas de plantas *in vitro*, en las que se cultivan las células vegetales, tejidos y órganos en condiciones de esterilidad con total independencia de factores geográficos y climáticos, ofrecen alternativas para la producción de metabolitos importantes (Kieran 2001).

Aunque el mecanismo de transformación genética mediante *Agrobacterium* se conoce desde hace más de 30 años, la enorme capacidad de los cultivos de raíces transformadas se ha descuidado mucho en todo ese tiempo. Sin embargo, a mediados de la década de 1980, a través de una serie de investigaciones se dieron indicios de la posibilidad de biosíntesis de raíces pilosas, centrándose principalmente en la producción de alcaloides (Mano et al. 1986; Payne et al. 1987).

Además, los acontecimientos recientes en los sistemas de biorreactores proporcionan formas en que puede ser posible ampliar el cultivo de raíces pilosas de los sistemas de pequeña escala a procesos industriales a gran escala (Guillon et al. 2006a). Se debe facilitar la transferencia de conocimientos de los laboratorios académicos a la farmacéutica, alimentaria y cosmética (Georgiev et al. 2007).

Las ventajas que ofrecen las raíces pilosas son: su crecimiento rápido, el tiempo de duplicación corto, la facilidad de mantenimiento, y la capacidad para sintetizar una serie de compuestos químicos y proteínas en cultivos de suspensión celular, así como una fuente continua para la producción de metabolitos secundarios y proteínas extrañas. Los cultivos de raíces pilosas suelen ser capaces de producir los mismos compuestos que se encuentran en las raíces de tipo silvestre de la planta madre, sin la pérdida de concentración observado con frecuencia en los callos o cultivos de células en suspensión (Kim et al. 2002a, b). Por otra parte, se han desarrollado diversas estrategias, incluyendo la mejora en el diseño de biorreactores, ingeniería metabólica, la transformación genética de las raíces, y la activación de T-ADN marcado para mejorar los rendimientos de los metabolitos deseados y proteínas recombinantes (Hamill y Lidgett 1997; Guillon et al. 2006a, 2006b; Georgiev et al. 2007; Srivastava y Srivastava 2007).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Las raíces pilosas, son el resultado de la transformación genética mediante *Agrobacterium rhizogenes*, tienen propiedades atractivas para la producción de metabolitos secundarios. A menudo crece tan rápido o más que los cultivos de células vegetales (Charlwood y Charlwood, 1991; Flores et al. 1999) y no requiere de hormonas en el medio. La mayor ventaja de las raíces pilosas es que los cultivos a menudo presentan la capacidad de biosíntesis de igual o mayor producción de metabolitos secundarios en comparación con las plantas madre (Banerjee et al. 1998; Kittipongpatana et al. 1998). Muchos metabolitos secundarios valiosos se sintetizan en las raíces en vivo, y muchas veces la síntesis está vinculada a la diferenciación de raíz (Robins et al. 1991; Flores et al. 1999). La estabilidad genética es otra de las características de las raíces pilosas (Kim et al. 2002).

Las plantas producen metabolitos secundarios con fines específicos, incluida la defensa frente a patógenos y depredadores, la protección contra el daño de la luz UV, la atracción de los polinizadores, y por otras razones aún por descubrir. La síntesis de metabolitos secundarios en vivo es a menudo causado por factores ambientales, y por lo tanto, no es de extrañar que la producción de metabolitos secundarios en las raíces pilosas también sea afectada por las condiciones de cultivo. La mayoría de los estudios sobre la manipulación de los niveles de metabolitos secundarios en las raíces pilosas se llevan a cabo en matraces de agitación, y rara vez en biorreactores (Kim et al. 2002).

Como siempre, la optimización debe ser determinada empíricamente para cada clon y cada condición del cultivo.

➤ *Optimización de las condiciones de inóculo.* La importancia de optimizar las condiciones de inóculo es con frecuencia subestimado. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que el tamaño del inóculo y la edad influyen fuertemente en el crecimiento de los cultivos de raíz pilosa de *Panax ginseng* (Jeong et al. 2004) y los rendimientos de betalaínas de *Beta vulgaris* en cultivos de raíces pilosas (Pavlov et al. 2003).

➤ *Selección de tensión.* La selección de buenas líneas raíces pilosas es un requisito previo, y plantas productoras de altos niveles de metabolitos secundarios suelen generar líneas de células de alta producción. Las diferentes cepas de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Agrobacterium rhizogenes también puede afectar a la transformación (Kim et al. 2002).

➤ *Relación con la fase de crecimiento.* Para la efectiva producción de metabolitos secundarios en gran escala, es importante entender en que fase de crecimiento se forma un producto específico. Esta información puede ser utilizada para desarrollar una estrategia de producción efectiva. Por ejemplo, si un producto se forma principalmente durante el crecimiento exponencial, se podría tratar de utilizar una estrategia de cultivo en lote alimentado con el objetivo de mantener el cultivo en crecimiento activo, maximizando así la producción del metabolito secundario (Kim et al. 2002).

La producción de metabolitos secundarios *in vitro* puede ocurrir en casi cualquier etapa de crecimiento del cultivo.

➤ *Composición del medio.* Los nutrientes en el medio de cultivo pueden ser fácilmente manipulados y tienen un gran impacto en la producción de metabolitos secundarios. Por lo general, la composición del medio se modifica con respecto a la concentración y relaciones de carbono, nitrógeno y fósforo como fuentes (Wilhelmson et al. 2006) y otros macronutrientes (Sivakumar et al. 2005).

➤ *Gases.* Los gases, principalmente CO₂, O₂ y C₂H₄, también afectan a la producción de metabolitos secundarios. No son muchos los estudios realizados en cultivos de raíces pilosas, en comparación con el número de estudios realizados en suspensiones celulares. La mayoría de los estudios que utilizan las raíces se han centrado en el papel que desempeña el oxígeno en el crecimiento y el metabolismo secundario (Kim et al. 2002).

El oxígeno también puede afectar la liberación de productos en el medio de cultivo. El CO₂, es un producto final de la respiración, y puede acumularse en los cultivos de raíces y, en caso de que no haya el suficiente cual conduce a la acidificación del citoplasma (Buchanan et al. 2000). Sin embargo, el CO₂ puede estimular el crecimiento de raíces, como se muestra por Dilorio et al. (1992b)

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

No todas las especies de raíces pilosas muestran un aumento en el rendimiento del crecimiento en respuesta al aumento de CO₂. La fijación de CO₂ se ha detectado a través de la fosfoenol piruvato carboxilasa, provocado principalmente a los ácidos orgánicos (Farmer, 1996).

➤ *Elicitores.* Son sustancias químicas o biofactores de diversas fuentes que pueden inducir respuestas fisiológicas y morfológicas así como la acumulación de fitoalexinas (Zhao et al. 2005).

➤ *Permeabilización y el cultivo en sistemas de dos fases* Los metabolitos secundarios de las plantas generalmente se encuentran en compartimentos intracelulares, por lo general las vacuolas (Muehlbach 1998). Por lo tanto, la producción de muchos metabolitos está limitada por la capacidad de la vacuola (s). Para mejorar los rendimientos de los metabolitos deseados y reducir los costos totales del proceso, se han aplicado varios enfoques para permeabilizar las células y por lo tanto la liberación de los productos, por ejemplo, el tratamiento con disolventes orgánicos (dimetilsulfóxido) (Sim et al. 1994) o tensoactivos (Boitel-Conti et al. 1996). Además, los autores citados observaron que la producción de alcaloides totales (intracelular más extracelular) fue de 3 a 8 veces más alta en los tratados que en las raíces sin tratamiento. La adición de una segunda fase artificial, también puede mejorar los rendimientos de los metabolitos de interés (Doernenburg y Knorr 1995).

I.3. Raíces transformadas en cactáceas

Muchos metabolitos secundarios importantes se sintetizan en las raíces, que se pueden almacenar *in situ* o transportadas a otros órganos de la planta (Waller y Nowacki 1978). Por esta razón, una de las más prometedoras técnicas *in vitro* para producir metabolitos secundarios de las plantas es la generación y el cultivo de raíces transformadas inducida como resultado de la infección con *Agrobacterium rhizogenes*. Las raíces transformadas tienen varias ventajas: 1) las raíces pueden ser retiradas del explante original y se cultivan en medios libres de hormonas en los que presentan una alta tasa de crecimiento y estabilidad genética, 2) las raíces transformadas producen metabolitos secundarios en mayores cantidades y de forma más estable que otros tipos de cultivos *in vitro*, como callos o suspensión celular (Bourgaud et al. 1997), 3) a

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

veces es posible regenerar plantas completas transformadas a partir de ellas, como en *Lotus corniculatus*, *Centaurium*, *erythraea* y *Perfoliata Blackstonia* (González, Pérez, Pérez-Molphe, 2006).

Se han realizado pocas investigaciones sobre la inducción de raíces transformadas para la producción de metabolitos secundarios, por lo que a continuación se muestra una investigación que se publicó en el 2006, que trata de este tema.

La cepa A4 de *Agrobacterium rhizogenes* del tipo agropina contiene el plásmido del tipo silvestre pRiA4, que le confiere el fenotipo de raíces pilosas, y el vector binario pESC4 que contiene en la región del T-ADN el gen *nptII* con el promotor y terminador *nos*, el gen *gus* con el promotor *cab* y el terminador *ocs* (González et al., 2006).

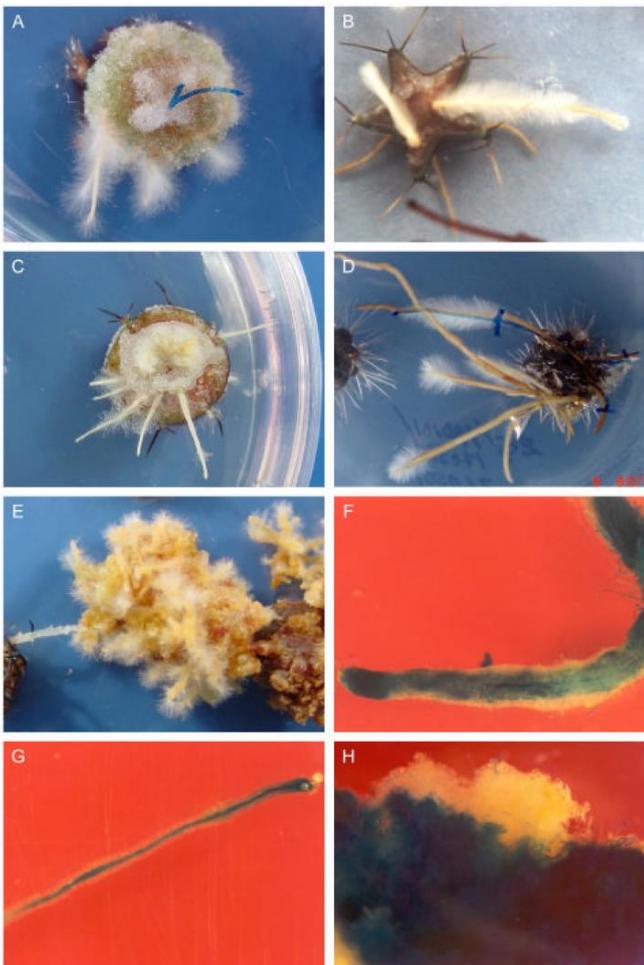
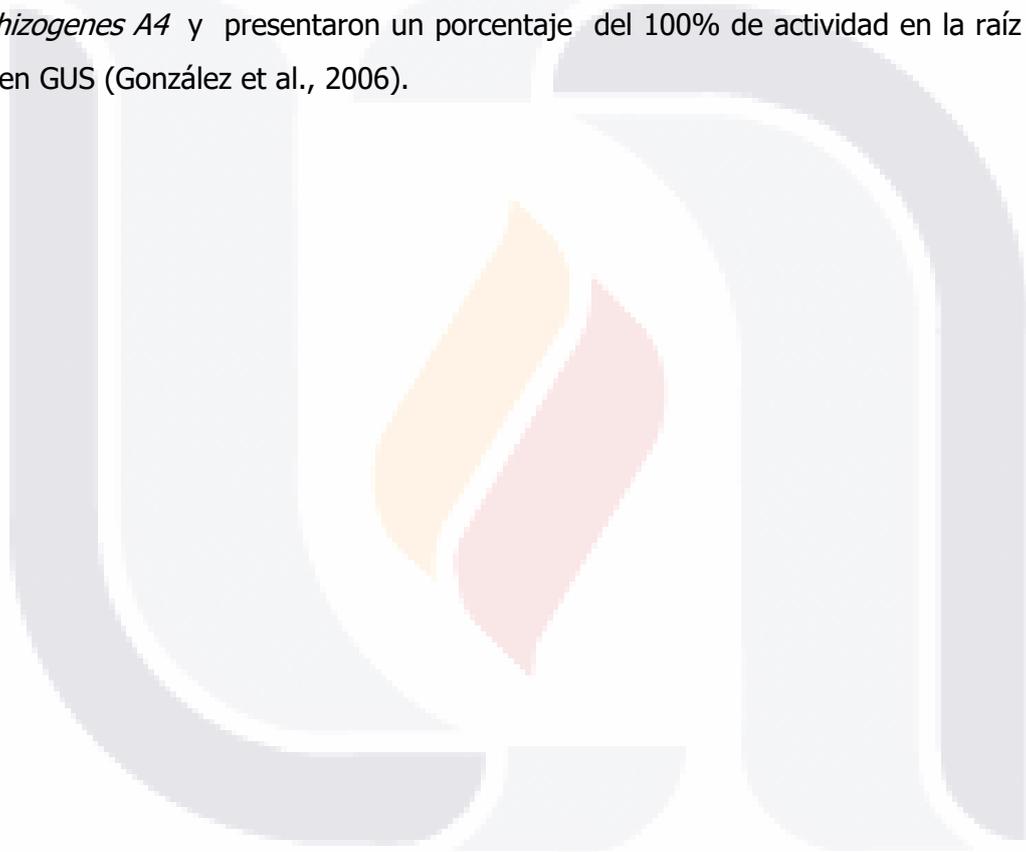


Fig. 6 La inducción de raíces pilosas en los segmentos de raíz de *Mammillaria plumosa* (A), *Pachycereus schottii* (B), *Turbinicarpus Schmidickeanus* var. *schmidickeanus* (C) y *P. pringlei* (D), infectados con *A. rhizogenes*. (E) Las raíces transformadas formadas a partir de callos en var *T. schmidickeanus*. explante *schwarzii* infectados con *A. rhizogenes*. (F, G) - Tinción histoquímica de para la expresión del gen GUS en raíces transformadas de *T. schmidickeanus* var. *schmidickeanus* (F) y *M. hutchinsoniana* var. *louisae* (G). (H) Tinción histoquímica para la expresión del gen GUS en callos producidos en un explante de *Coryphantha* infectados con *A. rhizogenes* (González, Pérez, Pérez-Molphe, 2006).

La adición de acetosiringona, un inductor de los genes *vir*, al medio de co-cultivo, aumenta la frecuencia de explantes con raíces transformadas (Henzi et al. 2000). El ácido cítrico y ascórbico impide la oxidación de compuestos fenólicos excretados por los explantes heridos, un proceso que probablemente inhibe la transformación. Los resultados nos indican que 16 de las 65 especies de cactáceas (*A. ornatum*, *C. durangensis*, *E. pectinatus* var. *Pectinatus*, *F. histrix*, *F. latispinus* var. *Latispinus*, *F. pilosus*, *Mammillaria bocasana* var. *Bocasana*, *M. crinita*, *M. formosa* var. *Formosa*, *M. herrerae*, *M. petterssonii*, *M. sonorensis*, *M. sphacelata* var. *Sphacelata*, *M. uncinata*, *T. lophophoroides* y *T. pseudopectinatus*) fueron transformadas genéticamente con *A. rhizogenes* A4 y presentaron un porcentaje del 100% de actividad en la raíz con el gen GUS (González et al., 2006).



II. JUSTIFICACION

- Las cactáceas producen una gran cantidad de compuestos químicos que podrían ser de interés farmacológico, un ejemplo de ello son los alcaloides, que se encuentran en grandes cantidades en la raíz y cuya producción podría incrementarse transformándolas con *A. rhizogenes*.
- La poca disponibilidad de material vegetal de muchas especies de Cactáceas imposibilita el estudio y aprovechamiento de estos compuestos.
- Esta poca disponibilidad se debe a: crecimiento lento *in vivo*, talla pequeña y poblaciones silvestres muy disminuidas para especies amenazadas que imposibilita el estudio y el aprovechamiento de estos compuestos.
- Una solución a la poca disponibilidad de material para estudio puede tenerse con la generación y cultivo de Cactáceas transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*, las cuales son capaces de crecer *in vitro* con una tasa alta de generación de biomasa y compuestos químicos de interés.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL PROYECTO

III.1 Hipótesis

Es posible generar, cultivar y multiplicar *in vitro* raíces transformadas de diversas especies de cactáceas mexicanas

III.2 Objetivos

- 1)** Generar y cultivar raíces transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* A4/pESC4 *in vitro* de Cactáceas de los géneros *Acharagma*, *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Echinocactus*, *Epithelantha*, *Escorbaria*, *Escontria*, *Ferocactus*, *Leuchtenbergia*, *Lophocereus*, *Lophophoro*, *Neobuxbaumina*, *Obregonia*, *Opuntia*, *Pereskia*, *Pibsocereus*, *Stenocereus*, *Stenocactus* y *Turbinicarpus*.
- 2)** Encontrar las condiciones óptimas para el desarrollo *in vitro* de las raíces transformadas en aquellas especies que hayan respondido de manera positiva a la infección con *Agrobacterium rhizogenes* A4/pESC4.
- 3)** Realizar un análisis preliminar de los metabolitos secundarios producidos en tejido normal y en raíces transformadas de algunas especies transformadas.

IV. METODOLOGIA

IV.1 Preparación de Medio YM pH 7

Se prepararon 500ml de medio YM se mezclaron todos los compuestos en agua destilada (Manitol 5gr, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1gr, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.25gr, Extracto de levadura 0.2gr, NaCl 0.05gr), se ajusto el pH a 7 y se aforo a 500ml en una probeta graduada de 500ml. Para preparar 100ml de medio YM sólido, se peso 2.62gr de medio YM (contiene todos los compuestos así como el agar) y se disolvió en 100ml de agua destilada

IV.2 Cultivo de *Agrobacterium rhizogenes* A4/pCSE4

En un matraz de 250ml se añadió en condiciones asépticas 50ml de Medio líquido YM con 50mg/L de kanamicina* y 50 mg/L de Rifampicina*, posteriormente se inoculo *Agrobacterium rhizogenes* A4/pCSE4 con una asa bacteriológica en la campana de flujo laminar, así como mechero bunsen para evitar contaminación. Ya inoculada la bacteria en medio YM, el matraz se dejó en incubación a 28°C a 100rpm por 48 horas.

IV.3 Extracción de ADN de *Agrobacterium rhizogenes* A4/pCSE4 utilizando lisozima

Se tomó 1.5ml del cultivo líquido en un tubo para microcentrífuga, se centrifugó a 12000rpm por 5 min para coleccionar la bacteria y se eliminó el sobrenadante. La pastilla bacteriana se resuspendió en 350µl de STET* + lisozima, luego se dejó en incubación por 30min a 37°C. Posteriormente se colocó en un baño de agua hirviendo por 40 segundos, se dejó enfriar a temperatura ambiente en baño de hielo. Una vez que se enfrió se centrifugó a 12000rpm por 10 min, y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Se añadió 40µl de acetato de sodio 2.5M pH 5.2 y 420µl de isopropanol, y se dejó precipitar 2 hr a -20°C, cuando ya se precipitó, se centrifugó a 12000rpm por 10min, la pastilla que se obtuvo se lavó con 250µl etanol al 70% y nuevamente se centrifugó a 12000 rpm por 10 min, la pastilla se puso a secar a 45°C de 10 a 15min y finalmente se resuspendió en 40 µl de TE*

IV.4 Electroforesis en gel de Agarosa al 0.8%

Se preparó un gel de agarosa al 0.8% para la verificación del ADN de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes A4/pCSE4*, para 100ml se pesó 0.8gr de agarosa en 10ml de TAE 1X (se preparó de una solución stock de TAE 50X 20ml para 1000ml de agua destilada). En la cámara de electroforesis se llenó con 30ml de gel de agarosa caliente, luego se dejó enfriar para que gelificara el gel. La muestra de ADN se corrió con 3µl de muestra y 2µ de colorante, así como 6µl de marcador de peso molecular (PM).

IV.5 Reacción de Polimerización en cadena (PCR)

Se realizó una amplificación del ADN de la bacteria de *Agrobacterium rhizogenes A4/pCSE4*, así como de los genes *Vir*, *rolB*, *NptII* y GUS en cuatro tubos respectivamente, se preparó la mezcla de reacción;

Agua	2 µl
2X Read Mix REDTaq Sigma*	25 µl
Primer 1	2 µl
Primer 2	2 µl
ADN	2 µl
<hr/>	
Total	50 µl.

Tubos	Oligos	Secuencia de Oligos	Tamaño del fragmento amplificado
1	<i>rolB 1</i>	5' ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA 3'	780 pb
	<i>rolB 2</i>	5' TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC 3'	
2	<i>Vir 1</i>	5' ATGTCGCAAGGACGTAAGCCCA 3'	450 pb
	<i>Vir 2</i>	5' GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA 3'	
3	<i>nptII 1</i>	5' TATTCGGCTATGACTGGGCA 3'	517 pb
	<i>nptII 2</i>	5' GCCAACGCTATGTCCTGAT 3'	
4	<i>gus 1</i>	5' GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG 3'	1200 pb
	<i>gus 2</i>	5' GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA 3'	

Los cuatro tubos se colocaron en un termociclador con un programa de AMPLI A (termociclador Techner TC 312).

Las condiciones de cada ciclo fueron las siguientes;

1 ciclo 94°C 1min
55°C 1min
72°C 3min

30 ciclos 94°C 1min
55°C 1min
72°C 3min

1 ciclo 72°C 7min

Ya finalizado la reacción de polimerización en cadena en el termociclador, se colocaron 25µl del contenido cada uno de los tubos en un gel de agarosa al 1.2% y se corrió el gel en la cámara de electroforesis.

El gel fue teñido en bromuro de etidio, una vez que se tiñó se observó en una lámpara de luz ultravioleta.

IV.6 Transformación de cactáceas con *Agrobacterium rhizogenes* A4/pCSE4

Material utilizado en la transformación;

- Cultivos axénicos de cactáceas (tomados del Banco de Germoplasma de la Unidad de Biotecnología del Dpto. de Química de la Universidad Autónoma de Aguascalientes).
- *Agrobacterium rhizogenes* A4/pESC4 Cultivada en medio YM + 50 mg/L de Rifampicina + 50 mg/L de Kanamicina.
- Campana de flujo laminar y equipo de disección

Primera parte (Cocultivo):

- a) Medio MS* (Murashige, Skoog, 1962) líquido con 3% de sacarosa y antioxidantes* (100 mg/L de ac. Cítrico y 100 mg/L de ac. Ascórbico, esterilizados por filtración). Frasco con 45 ml de medio y 45µl de antioxidante.
- b) Medio MS líquido con 3% de sacarosa. Frasco con 45 ml.
- c) Medio MS con 3% de sacarosa y 8 g/L de agar como gelificante. (5 cajas por especie)

Segunda parte:

- d) Medio MS líquido con 3% de sacarosa y 250 mg/L de Claforán. Frasco de 90 ml (90µl por frasco de Claforán)
- e) Medio de selección. MS con 3% de sacarosa, 8 g/L de agar como gelificante, 50 mg/L de kanamicina como agente selectivo (30 µl por caja) y 250 mg/L de Claforán para eliminar a la bacteria (30 µl por caja).

IV.6.1 Primera parte (cocultivo)

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Se añadieron 25 µl de acetosiringona 100mM al frasco de 45ml de medio MS líquido sin antioxidantes (b). Posteriormente se al mismo frasco se le añadieron 5ml de cultivo bacteriano. Se cortaron los 40 explantes transversales delgados (4-5mm) de la cactácea, al tiempo de cortarlos, los explantes se colocaron en el frasco con medio MS líquido con antioxidantes (a), una vez que se cortaron todos los explantes, éstos se transfirieron al frasco con la bacteria y acetosiringona, luego se dejaron en incubación por 30 min.

Una vez que transcurrió el tiempo de incubación, los explantes se sacaron de la suspensión bacteriana para ser secados sobre una gasa estéril, posteriormente son transferidos a cajas con medio sólidos con antibiótico (c) y se dejaron en incubación a 20°C en la oscuridad por 72hr.

IV.6.2 Segunda parte

Los explantes que se encontraban en incubación se sacaron del medio de cocultivo en condiciones axénicas y se incubaron por 30 min en frascos con medio MS y Claforán (d) para eliminar el exceso de bacteria. Pasado el tiempo de incubación los explantes se transfirieron a medio sólido de selección (e) y se dejaron en incubación a 20°C en la oscuridad y se tomaron resultados a los 40-60 días (cuando se observo raíces de 2 mm).

Los explantes con raíz se cambiaron a una caja con medio de selección (e) (1 explante por caja). Después de que se cambiaron los explantes de forma individual se tomaron mediciones a los 0, 15, 30, 45 y 60 días.

IV.7 Medición de raíces, Captura y Análisis de Datos del Método convencional

La medición de la raíces se realizó cada 15 días por un tiempo total de 60 días, la medición se llevó a cabo marcando con un plumón de color las raíces generadas a partir del explante, una vez marcadas con el plumón se midieron con una regla métrica y todos los datos generados fueron almacenados en un programa office (Excel) , pasados los 15 días de la medición anterior nuevamente se macaba la raíz a partir de la última marca con un nuevo color de plumón para identificar cuanto

habían crecido en el lapso de 15 días, así también se marcaban las nuevas raíces que salía (**Fig. 7**).



Fig. 7 Medición de raíces con ayuda de plumón y regla métrica, cada color de plumón representa la medición de las raíces en diferente día.

Todos los datos se analizaron en el programa Office Excel en el cual se realizaron las estadísticas correspondientes así como las gráficas que se presentan en los resultados.

IV.8 Condiciones de Medio Líquido

Se tomaron la mitad de los explantes del método convencional de aquellas especies que tuvieran más de seis explantes con raíz, posteriormente en condiciones estériles se pasaron los explantes de cada especie a un frasco con medio MS líquido con 250 mg/L de Claforan, luego se dejaron en incubación a 20°C en la obscuridad por 90 días. Para monitorear el crecimiento de raíces de cada uno de los explantes, lo primero fue pesar el frasco con el medio líquido, luego se colocó el explante dentro del frasco y se volvió a pesar el frasco con el explante dentro, por diferencia de peso se determinó el peso inicial del explante, pasados los 60 días de incubación, en condiciones de esterilidad se sacó el explante del frasco, y éste se pesó dentro de la campana sobre una gasa estéril para evitar la contaminación. Éste mismo procedimiento se realizó a los 90 días de incubación.

IV.9 Condiciones de Incubación (Luz)

Se tomaron 7 explantes con raíz de 12 especies que mostraron un buen crecimiento en el Método Convencional, éstas fueron; *Echinocactus platyacanthus*, *Echinocactus grusonii*, *Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)*, *Ferocactus peninsulae*, *Opuntia amyaclea*, *Opuntia robusta*, *Stenocereus thurberi var thurberi*, *Turbincarpus schmiedickeanus var schmiedickeanus*, *Turbincarpus schmiedickeanus var schwarzii*, *Turbincarpus laui*, *Turbincarpus schmiedickeanus var klinkerianus*, *Turbincarpus subterraneus (Gymnocactus subterraneus)*, se pasaron a medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C por fotoperiodos de 12hrs, posteriormente los explantes se midieron a los 0, 15, 30, 45, y 60 días, en cada una de las mediciones se sacó la longitud media de las raíces, esto es la suma de todas las mediciones (mm) entre el total de las raíces generadas de cada especie, así como su error estándar, que es la desviación estándar entre la raíz cuadrada de las raíces totales.

IV.10 Condiciones de incubación (Temperatura)

Se eligieron 12 especies que respondieron de manera positiva al crecimiento de raíces tomadas del método convencional, de éstas se tomaron 7 explantes de cada una de ellas; *Echinocactus grusonii*, *Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)*, *Ferocactus peninsulae*, *Ferocactus flavovirens*, *Leuchtenbergia principis*, *Opuntia amyaclea*, *Stenocereus thurberi var thurberi*, *Turbincarpus schmiedickeanus var schmiedickeanus*, *Turbincarpus schmiedickeanus var schwarzii*, *Turbincarpus laui*, *Turbincarpus schmiedickeanus var klinkerianus*, *Turbincarpus subterraneus (Gymnocactus subterraneus)*, los explantes se pasaron a medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, posteriormente se introdujeron a una caja de cartón para mantener la obscuridad pero a una temperatura de 26°C. Los explantes se midieron a los 0, 15, 30, 45, y 60 días, en cada una de las mediciones se sacó la longitud media de las raíces, esto es la suma de todas las mediciones (mm) entre el total de las raíces generadas de cada especie, así como su error estándar, que es la desviación estándar entre la raíz cuadrada de las raíces totales.

IV.11 Adición de Compuestos Orgánicos

Se eligieron 3 especies diferentes que respondieron de manera positiva a la infección por *Agrobacterium rhizogenes*, de las cuales se tomaron 7 explantes de cada una de ellas. Se realizaron 3 medios diferentes, cada uno de ellos contenía un compuesto orgánico diferente (Hidrolizado de caseína, Extracto de malta y Agua de coco) cada uno de ellos a diferentes concentraciones (0.5 gr/L, 1.5 gr/L, 5 gr/L) respectivamente, el hidrolizado de caseína así como el extracto de malta se filtraron para eliminar cualquier contaminante y se adicionaron al medio MS después de que se esterilizó, así el agua de coco se adiciono al medio MS antes de ser esterilizado en la autoclave. Posteriormente los explantes se sembraron en el medio MS con los diferentes compuestos orgánicos (Extracto de levadura, Hidrolizado de caseína y Agua de coco), y se incubaron en la obscuridad a 20°C por 60 días, las mediciones se realizaron cada 15 días.

IV.12 Ensayo histoquímico para β-glucoronidasa (*gus*)

Se realizó un análisis histoquímico para detectar la actividad del producto del gen *gus* en una muestra de las raíces obtenida de cada especie. Los explante seleccionados se sacaron a la luz durante una semana para posteriormente hacer el ensayo.

Solución de reacción:

Buffer fosfatos 1M	100 µl	100 mM
EDTA 0.25 M	40 µl	10 mM
Ferrocianuro de K 5 mM	100 µl	0.5 mM
Ferricianuro de K 5 mM	100 µl	0.5 mM
Triton 10%	10 µl	0.1 %
X-gluc 40 mM	50 µl	2.0 mM
Agua destilada		600 µl
	<hr/>	
Total		1 000 µl

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

En la campana de flujo laminar se cortaron las raíces del explante seleccionado y se cubrió el tejido con la solución de reacción dejándose en incubación a 37°C hasta que apareció el precipitado azul. Las raíces se lavaron varias veces con etanol al 70% para fijar el tejido y eliminar las clorofilas. Después se almacenaron las raíces en etanol al 70%, para conservar por tiempo indefinido las raíces ya teñidas.

IV.13 Extracción de ADN de raíces presuntamente transformadas

La extracción de ADN se efectuó con el método de CTAB (Melody, 1997), realizando ajustes a los volúmenes finales de resuspendió. Los pesos de las raíces analizadas fluctuaron entre los 50 y 300 mg. Se pesó de 50 a 300 mg de tejido vegetal y se congelaron a -20°C por 24hrs para su posterior uso. Posteriormente el tejido vegetal se paso a un mortero para macerar el tejido y se le agregó nitrógeno líquido para romper la pared celular, luego se añadió 700µl de la solución de extracción precalentada a 60°C y se homogenizo con la ayuda de vortex. Se efectuó una incubación por 20 min a 60°C, agitando ocasionalmente. Se centrifugo 10 min a 12000rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se adicionó un volumen de cloroformo: alcohol isoamilico 24:1 (saturado en TE) y se agitó manualmente por 2min. Se centrifugó 5min a 12000 rpm y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo añadiendo un volumen de isopropanol frio. Se incubó por 24h a -20°C y se volvió a centrifugar por 10 min a 12000 rpm para colectar el ADN y se eliminó el sobrenadante y se lavó 2 veces con 200µl de etanol al 80% frio, posteriormente se secó la pastilla en una parilla eléctrica a 50°C. Finalmente la pastilla se resuspendió en 50µl de agua destilada estéril. Resuspendida la pastilla de ADN, se tomaron 10µl de la muestra y se resuspendió en 490µl de aguas destilada estéril para cuantificar ADN, luego se llevó a un espectrofotómetro UV-visible donde se cuantificó la concentración de ADN en (µg/µl), la concentración de proteína (µg/µl), como las absorbancia a 260nm y 280nm, así también la relación de ADN 260/280, con el fin de determinar la concentración adecuada para llevar a cabo la PCR.

IV.14 PCR del ADN vegetal

Para la realización de la PCR se utilizaron kits de reacción que incluían todos los reactivos para indicar dicha reacción (REDTaq ReadyMix PCR REaction Mix de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

SIGMA®). Las concentraciones de los iniciadores se adecuaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las secuencias iniciadoras para las cadenas sentido y para la cadena antisentido fueron:

rolB- 1: 5' ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA 3'

rolB- 2: 5' TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC 3'

Vir- 1: 5' ATGTCGCAAGGACGTAAGCCCA 3'

Vir- 2: 5' GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA 3'

gus- 1: 5' GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG 3'

gus- 2: 5' GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA 3'

NPTII- 1: 5' TATTCGGCCTATGACTGGGCA 3'

NPTII- 2: 5' GCCAACGCTATGTCCTGAT 3'

Las condiciones de la PCR fueron:

- 1 Ciclo de 7min a 94°C, 1 min a 55°C y 3 min a 72°C
- 30 Ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 3 min a 72°C
- 1 Ciclo de 1 min a 55°C y 7 min a 72°C

IV.15 Electroforesis de los productos de la PCR del ADN vegetal

Se efectuó una electroforesis de los productos de la PCR. El gel fue preparado con agarosa al 1.2% en TAE 1X y corrido a 80 V. se utilizó un MPM de 300, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 pb, se tiñó el gel con bromuro de etidio (500 μ LL⁻¹) durante 1 min y se lavó durante 1 hr. Se observó en el transiluminador UV y se registró con una fotografía.

IV.16 Extracción y valoración de los metabolitos secundarios

Se pesaron de 500 a 1000 mg de tejido de raíces y se mezclaron vigorosamente con un 1ml de solución de amoníaco al 10%. La mezcla fue sometida a reflujo con 500 μ l de metanol por 10 min y posteriormente fue filtrada. Dicho proceso fue realizado con equipo a microescala.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Las muestras del extracto se aplicaron a una placa de TLC (silica gel 60F₂₅₄, Merck, Alemania) usando un volumen de 5µl, se secó la muestra y se volvió a aplicar la muestra en 7 ocasiones más con un volumen total de 40 µl.

La placa se desarrolló en obscuridad, utilizando un sistema de solventes de tolueno-acetato de etileno-dietilamina (70:20:10). La placa fue revelada con los reactivos de Marquis y Dragendorff (Wagner y Bladt, 1996) mediante aspersion y se valoro bajo luz ultravioleta (254 nm) y luz visible. Usando esta metodología, se analizaron 10 especies de cactáceas diferentes de las que se disponía suficiente material biológico, tanto de las raíces presuntamente transformadas así como de tejido vegetal de especies que se encontraban en el banco de germoplasma, así también en el invernadero que se encuentran en el departamento de Biotecnología vegetal de la UAA. Las especies que se analizaron son:

Ariocarpus kotschoubeyanus, *Echinocactus grusonii*, *Echinocactus platyacanthus* (*Echinocactus ingens*), *Ferocactus peninsulae*, *Ferocactus rectispinus*, *Stenocereus thurberi* var *thurberi*, *Turbincarpus schmiedickeanus* var *schwarzii*, *Turbincarpus laui*, *Turbincarpus lophophoroides*, *Turbincarpus pseudopectinatus*, *Turbincarpus schmiedickeanus* var *klinkerianus*, *Turbincarpus subterraneus* (*Gymnocactus subterraneus*).

V. RESULTADOS

V.1 Reacción de Polimerización en cadena (PCR) para verificar la cepa de *A. rhizogenes*

Se muestra un gel de agarosa al 1.2%, donde el carril 2 lo ocupa el marcador de peso molecular (PM) de 2000, 1500, 1000, 750, 500 y 300pb, así como el carril 3 (1) lo ocupa el *rolB*, el carril 4 (2) se encuentra el *VirD*, en el carril 5 (3) está ocupado por el gen *nptII*, y por último el carril 6 (4) se encuentra el gen *gus*. Las bandas presentes en cada uno de los carriles corresponden al peso molecular del fragmento amplificado, para el *rolB* con un peso molecular de 780pb, *VirD* 450pb, *nptII* 517pb y el gen *gus* 1200pb, al observar la (Figura 8) las bandas corresponden a los pesos moleculares antes mencionados, indicando que la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* contiene los genes de interés dentro de su plásmido Ri, por tanto es una bacteria apta para trabajar y realizar las transformaciones genéticas en las 51 especies de cactáceas mexicanas.

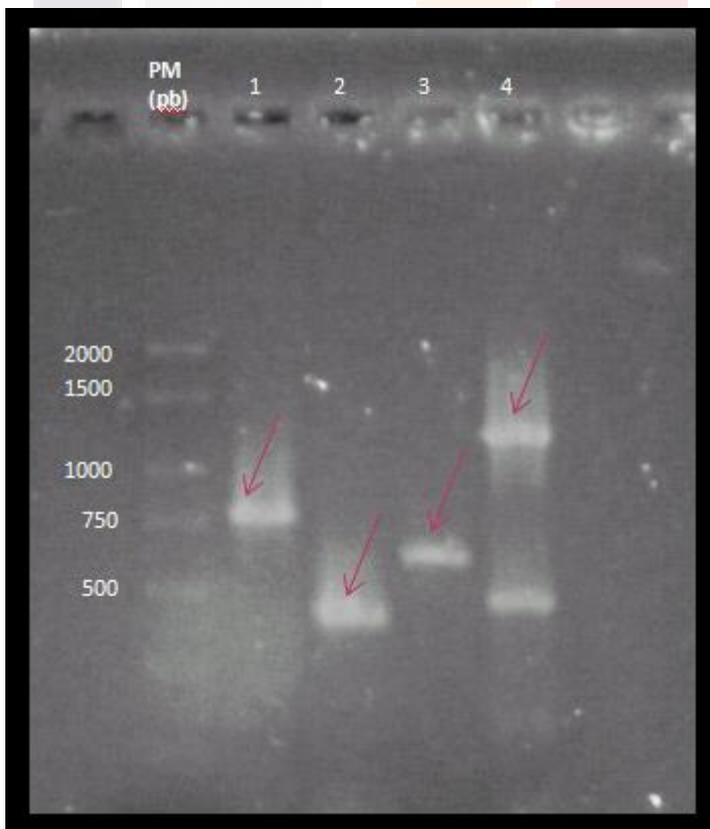


Fig. 8 Reacción de polimerización en cadena (PCR) de ADN de *Agrobacterium rhizogenes* A4. Marcador de peso molecular (PM); gen *rolB* (1); gen *VirD* (2); gen *nptII* (3); gen *gus* (4). Las flechas muestran las bandas amplificadas de cada uno de los genes mencionados.

V.2 Respuesta de 52 especies de cactáceas mexicanas a la infección de *Agrobacterium rhizogenes* A4.

Se muestran los datos de explantes totales que fueron infectados con *Agrobacterium rhizogenes* A4, el número de explantes que genero al menos una raíz, el porcentaje de explantes que generaron raíz de los 40 explantes que se tomaron como muestra, el número de raíces por explante (solo de los explantes que generaron raíz) con media y su desviación estándar, la longitud de raíz en (mm) con su media y desviación estándar, así también el porcentaje raíces que presentaron actividad GUS.

Clave	Especie	Numero de Explantes	% Explantes que Generaron Raíz	Numero de Raíces por Explante (Media ± Desviación Estándar)	Longitud de Raíz (mm) (Media ± Desviación Estándar)	Raíces con Actividad GUS (%)
53	<i>Acharagma aguirreana</i>	9	22.5%	4.89 ± 2.09	5.52 ± 3.77	71
47	<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	6	15.0%	8.50 ± 4.23	4.29 ± 2.18	100
148	<i>Astrophytum asterias</i> var <i>superkabuto</i>	0	0	-	-	-
141	<i>Astrophytum capricorne</i> var. <i>Senile</i>	0	0	-	-	-
26	<i>Astrophytum capricorne</i>	0	0	-	-	-
194	<i>Astrophytum híbrido myriostigma x ornatum</i>	1	2.5%	1.0±0	1.25 ± 0.50	75
12	<i>Astrophytum myriostigma</i>	0	0	-	-	-
38	<i>Astrophytum ornatum</i>	0	0	-	-	-
1	<i>Echinocactus platyacanthus</i>	11	27.5%	10.45 ± 5.91	5.10 ± 4.49	71
67	<i>Echinocactus grusonii</i>	33	82.5%	10.58 ± 7.12	2.99 ± 4.22	100
152	<i>Echinocactus platyacanthus</i> (<i>Echinocactus ingens</i>)	26	65.0%	4.69 ± 5.09	3.78 ± 2.74	86
190	<i>Epithelantha micromeris</i>	2	5.0%	2.0±1.41	2.50 ± 0.58	100
189	<i>Escobaria chaffeyi</i> (<i>E. dasyacantha</i> subsp. <i>chaffeyi</i>)	16	40.0%	2.81 ± 2.05	4.13 ± 4.22	86
131	<i>Escontria chiotilla</i>	13	32.5%	2.38 ± 1.56	4.90 ± 2.38	0
164	<i>Ferocactus glaucescens</i>	6	15.0%	5.17±1.72	1.65 ± 0.88	85
165	<i>Ferocactus peninsulae</i>	13	32.5%	18.92 ± 9.90	6.13 ± 4.22	100
27	<i>Ferocactus cylindraceus</i> var <i>cylindraceus</i>	3	7.5%	4.0 ± 5.20	7.0 ± 5.33	57
32	<i>Ferocactus flavovirens</i>	10	25.0%	4.80 ± 1.32	2.77 ± 1.17	42
188	<i>Ferocactus hamatacanthus</i>	0	0	-	-	-

4	<i>Ferocactus histrix</i>	0	0	-	-	-
14	<i>Ferocactus latispinus</i> var <i>latispinus</i>	5	12.5%	4.20 ± 3.42	6.67 ± 5.59	0
3	<i>Ferocactus pilosus</i>	4	10.0%	5.0 ± 2.45	4.05 ± 2.25	N M
206	<i>Ferocactus rectispinus</i>	8	20.0%	8.50 ± 12.48	11.13 ± 6.69	86
34	<i>Leuchtenbergia principis</i>	8	20.0%	1.63 ± 1.06	5.46 ± 3.86	40
134	<i>Lophophora williamsii</i> (<i>Lophophora decipiens</i>)	0	0	-	-	-
146	<i>Lophophora williamsii</i> (<i>Lophophora fricsii</i>)	9	22.5%	7.44 ± 5.27	4.18 ± 2.72	43
184	<i>Neobuxbaumia tetetzo</i>	9	22.5%	5.22 ± 5.61	16.79 ± 6.76	14
49	<i>Obregonia denegrii</i>	1	2.25%	1.0 ± 0	1.0 ± 0	0
154	<i>Opuntia amyclea</i>	34	85.0%	4.38 ± 2.09	16.11 ± 15.08	0
155	<i>Opuntia ficus-indica</i>	24	60.0%	3.29 ± 2.33	8.25 ± 6.09	0
157	<i>Opuntia macrocentra</i>	1	2.5%	1.00 ± 0	17.0 ± 0	0
156	<i>Opuntia robusta</i>	6	15.0%	3.75 ± 4.23	18.5 ± 24.9	0
35	<i>Pilosocereus chrysacanthus</i>	5	12.5%	5.00 ± 4.16	3.52 ± 2.26	86
221	<i>Stenocactus phyllacanthus</i> ssp. <i>Violaciflorus</i>	0	0	-	-	-
205	<i>Stenocereus queretaroensis</i>	5	12.5%	4.60 ± 2.30	4.47 ± 2.96	14
36	<i>Stenocereus stellatus</i>	11	27.5%	4.36 ± 3.44	5.79 ± 3.65	27
29	<i>Stenocereus thurberi</i> var <i>thurberi</i>	23	57.5%	8.87 ± 5.97	9.18 ± 5.84	43
204	<i>Stenocereus weberi</i>	0	0	-	-	-
119	<i>Turbincarpus</i> <i>pseudomacrochele</i> var <i>lausseri</i>	6	15.0%	6.17 ± 6.08	5.78 ± 2.29	0
75	<i>Turbincarpus schmiedickeanus</i> var <i>schmiedickeanus</i>	16	40.0%	7.19 ± 2.56	4.10 ± 1.61	33
123	<i>Turbincarpus schmiedickeanus</i> var <i>schwarzii</i>	13	32.5%	10.38 ± 6.49	3.30 ± 2.10	42
51	<i>Turbincarpus hoferi</i>	11	27.5%	7.09 ± 5.45	2.36 ± 1.39	100
63	<i>Turbincarpus laui</i>	25	62.5%	7.04 ± 5.53	4.06 ± 2.51	71
52	<i>Turbincarpus lophophoroides</i>	7	17.5%	6.46 ± 6.06	6.81 ± 7.30	71
118	<i>Turbincarpus pseudomacrochele</i> var <i>pseudomacrochele</i>	15	37.5%	4.07 ± 2.25	4.07 ± 2.33	0
64	<i>Turbincarpus pseudopectinatus</i>	12	30.0%	8.67 ± 5.71	3.93 ± 2.66	86
62	<i>Turbincarpus schmiedickeanus</i> var <i>klinkerianus</i>	20	50.0%	10.30 ± 7.20	3.65 ± 2.33	14
121	<i>Turbincarpus schmiedickeanus</i> var <i>schmiedickeanus</i>	6	15.0%	3.17 ± 2.04	1.47 ± 2.09	0
99	<i>Turbincarpus subterraneus</i> (<i>Gymnocactus subterraneus</i>)	15	37.5%	2.80 ± 2.08	4.62 ± 2.64	27
124	<i>Turbincarpus swoboda</i>	9	22.5%	4.25 ± 3.11	2.65 ± 1.10	27
77	<i>Turbincarpus valdezianus</i>	5	12.5%	6.60 ± 2.70	7.55 ± 5.07	71

78	<i>Turbincarpus valdezianus var albiflorus</i>	1	2.5%	1.0 ± 0	4.50 ± 2.12	0
----	--	---	------	---------	-------------	---

Tabla 1 Respuesta de 52 especies de cactáceas mexicanas a la infección por *Agrobacterium rhizogenes* A4. Todos los parámetros se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan. La media del número de raíces por Explante se calculó dividiendo el número de raíces totales entre los explantes que generaron raíz, se muestra la desviación estándar del número de raíces por explante. La longitud de raíz con su media y desviación estándar se determinó teniendo en cuenta que no todas las raíces tienen el mismo tiempo de crecimiento, puesto algunas raíces salieron al inicio y otras al final del tratamiento.

De las 51 especies que se sometieron a la infección con *Agrobacterium rhizogenes* 42 generaron raíz en al menos uno de los explantes, ya que la muestra que se tomó en cuenta para cada una de las especies fue de 40 explantes. Aquellas especies que presentaron un porcentaje mayor del 50% de explantes que generaron raíz fueron; *Echinocactus grusonii*, *Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)*, *Opuntia amyckea*, *Opuntia ficus-indica*, *Stenocereus thurberi var thurberi*, *Turbincarpus laui*, *Turbincarpus schmiedickeanus var klinkerianus*, esto es que de los 40 explantes que se infectaron con *A. rhizogenes* 20 o más explantes generaron raíz.

Aquellas especies de cactáceas que presentaron el mayor número de raíces por explante como: *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Echinocactus platyacanthus*, *Echinocactus grusonii*, *Ferocactus peninsulae*, *Ferocactus rectispinus*, *Stenocereus thurberi var thurberi*, *Turbincarpus schmiedickeanus var schwarzii*, *Turbincarpus schmiedickeanus var klinkerianus*, aunque algunas de estas especies como *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus peninsulae*, *Ferocactus rectispinus* y *Turbincarpus schmiedickeanus var schwarzii* no presentan un alto porcentaje de explantes que generaron raíz, es más importante una especie que genere un mayor número de raíces por explante.

La longitud de la raíz es otro factor importante y que se debe de considerar para decir que una especie tiene potencial para la producción masiva de raíz, de esta forma las especies que generaron una mayor longitud de raíz en un periodo de 60 días son: *Acharagma aguirreana*, *Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus peninsulae*, *Ferocactus cylindraceus var cylindraceus*, *Ferocactus latispinus var latispinus*, *Ferocactus rectispinus*, *Leuchtenbergia principis*, *Neobuxbaumia tetetzo*, *Opuntia amyckea*, *Opuntia ficus-indica*, *Opuntia macrocentra*, *Opuntia robusta*, *Stenocereus stellatus*, *Stenocereus thurberi var thurberi*, *Turbincarpus pseudomacrolele var lausseri*, *Turbincarpus lophophoroides*, *Turbincarpus valdezianus*.

Otro de los datos que se presentan en la (Tabla 1), así como uno de los más importantes es el porcentaje de la actividad GUS donde las especies: *Acharagma aguirreana*, *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Astrophytum híbrido myriostigma x ornatum*, *Echinocactus platyacanthus*, *Echinocactus grusonii*, *Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)*, *Escobaria chaffeyi (E. dasyacantha subsp. chaffeyi)*, *Ferocactus glaucescens*, *Ferocactus peninsulae*, *Ferocactus rectispinus*, *Pilosocereus chrysacanthus*, *Turbinicarpus hoferi*, *Turbinicarpus laui*, *Turbinicarpus lophophoroides*, *Turbinicarpus pseudopectinatus*, *Turbinicarpus valdezianus* presentaron mayor actividad GUS, esto es que de las 7 raíces que se tomaron como muestra para la realización de la prueba histoquímica más de 5 raíces fueron positivas a la prueba GUS. Como se puede observar muchas de especies del genero *Turbinicarpus* fueron positivas a esta prueba.

Haciendo un análisis de los resultados obtenidos en un periodo de 60 días, donde se tomaron en cuenta varios factores ya mencionados, se puede decir que la especies con mayor potencial para la generación y producción de raíces sometidas a la infección con *A. rhizogenes* son; *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Echinocactus grusonii*, *Echinocactus grusonii*, *Ferocactus peninsulae*, *Stenocereus thurberi var thurberi*, *Turbinicarpus laui*, *Turbinicarpus lophophoroides*, *Turbinicarpus pseudopectinatus*, *Turbinicarpus schmiedickeanus var klinkerianus*



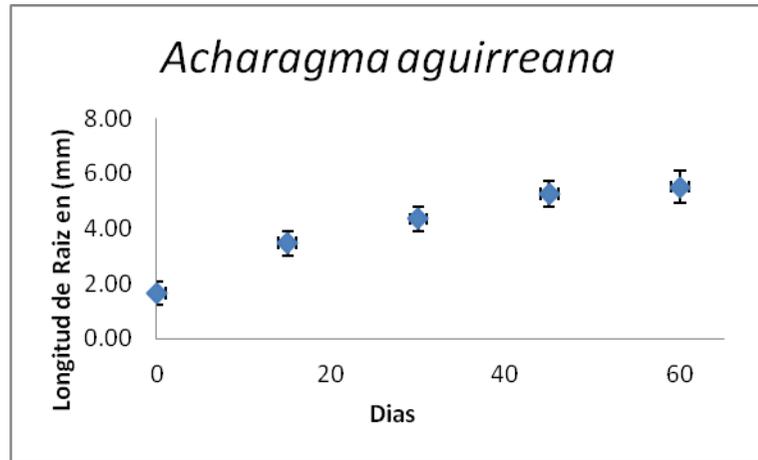
Grafica 1. Muestra la generación de raíz de al menos un explante por especies de las 42 especies de cactáceas mexicanas que fueron sometidas a la infección por *Agrobacterium rhizogenes A4*.

V.3 Curvas de Crecimiento de las raíces presuntamente transformadas de cactáceas mexicanas en medio MS a 20°C, en la obscuridad.

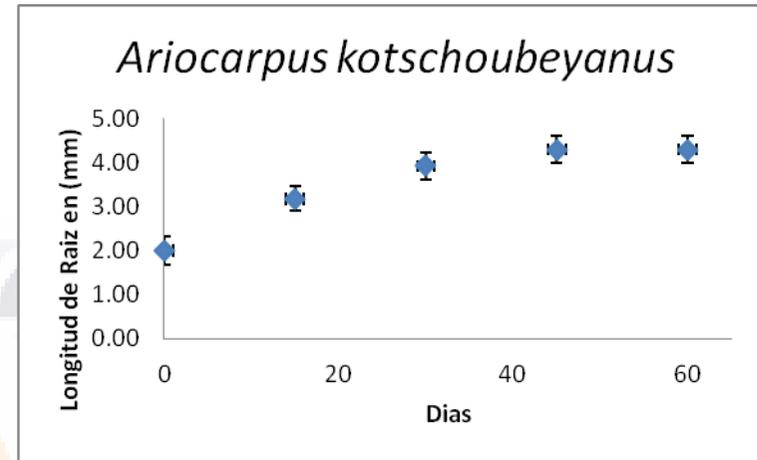
Los explantes que generaron raíz se midieron a los 0, 15, 30, 45, y 60 días, en cada una de las mediciones se sacó la longitud media de las raíces, esto es la suma de todas las mediciones (mm) entre el total de las raíces generadas de cada especie, así como su error estándar, que es la desviación estándar entre la raíz cuadrada de las raíces totales.

Las condiciones que se toman en cuenta en el Método convencional donde los explantes se encuentran en medio semisólido MS, a una temperatura de 20°C y en la obscuridad se observa que el mayor crecimiento de casi todas las especies que probaron en este sistema, fue en los primeros 30 días de incubación después de que el explante generaba la primer raíz, posteriormente se observó un estancamiento parecido a una fase estacionaria que puede deberse a la ausencia de nutrientes en el medio de cultivo ya que durante el tiempo de incubación no se les cambió el medio de cultivo para poder llevar un control de las mediciones de cada una de las raíces, por esta razón en los primeros 30 días el explante pudo tomar con facilidad los nutrientes presentes en el cultivo y conforme el paso del tiempo éstos se fueron agotando, provocando el lento crecimiento en la mayoría de las especies.

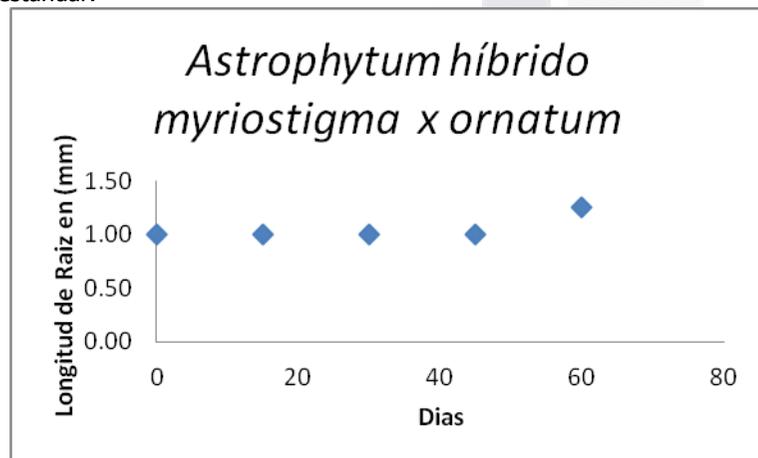
Se observa también que en algunas de las gráficas pertenecientes a las especies *Echinocactus platycanthus*, *Epithelantha micromeris*, *Ferocactus latispinus var latispinus*, *Ferocactus pilosus*, Especie *Leuchtenbergia principis*, *Opuntia robusta*, *Stenocereus queretaroensis*, *Stenocereus stellatus*, *Turbiniarpus pseudomacroechele var pseudomacroechele* y *Turbiniarpus valdegianus var albiflorus*, el error estándar es considerablemente alto, puesto que su longitud en (mm) de cada una de las especies antes mencionadas a los 0, 15, 30, 45 y 60 varía de forma considerable.



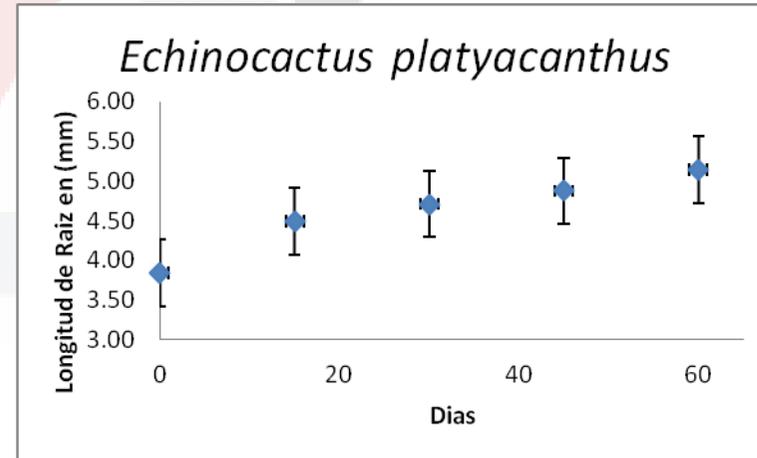
Gráfica 2. Curva de Crecimiento para la Especie *Acharagma aguirreana*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



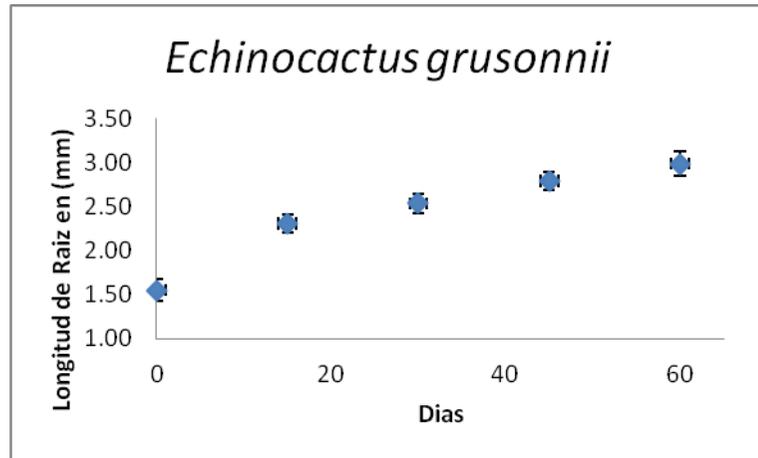
Gráfica 3. Curva de Crecimiento para la Especie *Ariocarpus kotschoubeyanus*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



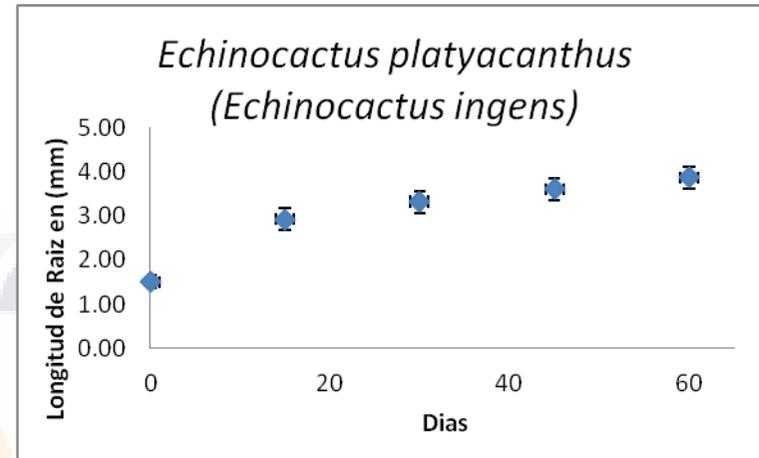
Gráfica 4. Curva de Crecimiento para la Especie *Astrophytum híbrido myriostigma x ornatum*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



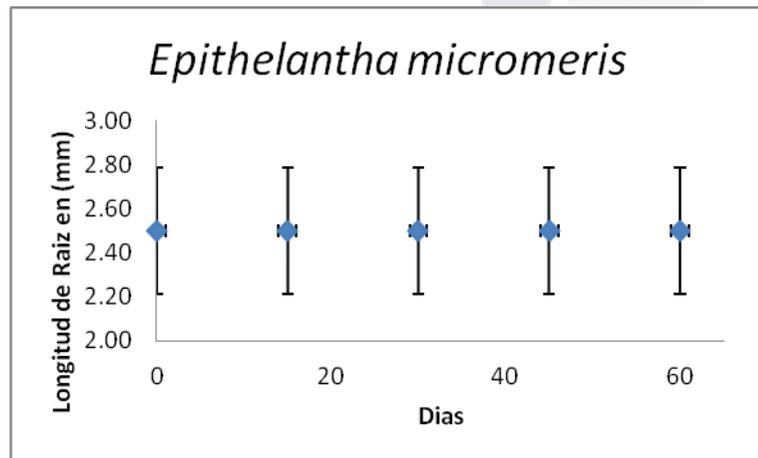
Gráfica 5. Curva de Crecimiento para la Especie *Echinocactus platyacanthus*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



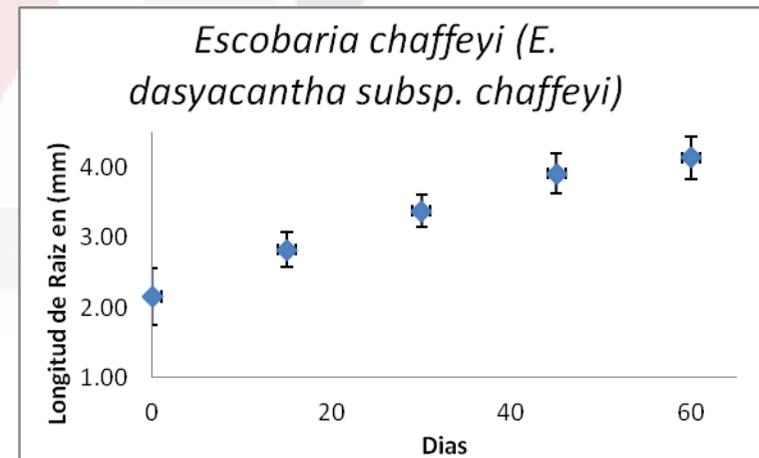
Grafica 6. Curva de Crecimiento para la Especie *Echinocactus grusonii*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



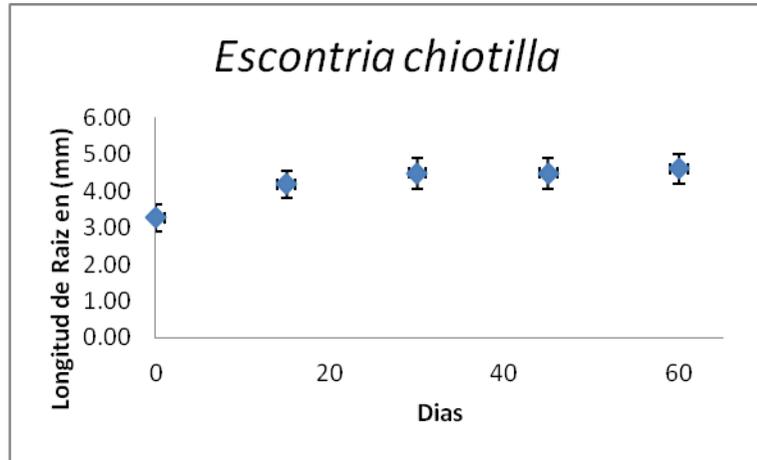
Grafica 7. Curva de Crecimiento para la Especie *Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



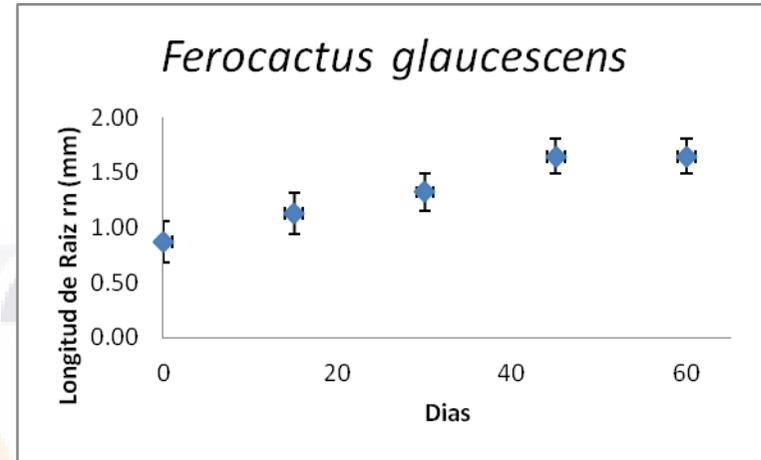
Grafica 8. Curva de Crecimiento para la Especie *Epithelantha micromeris*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



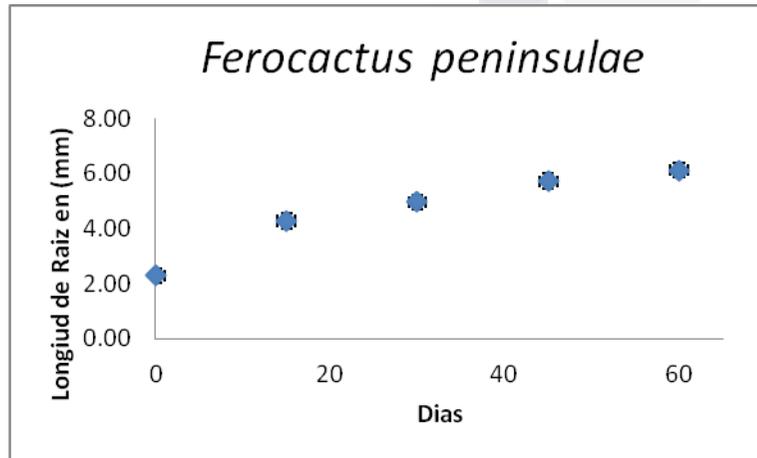
Grafica 9. Curva de Crecimiento para la Especie *Escobaria chaffeyi*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



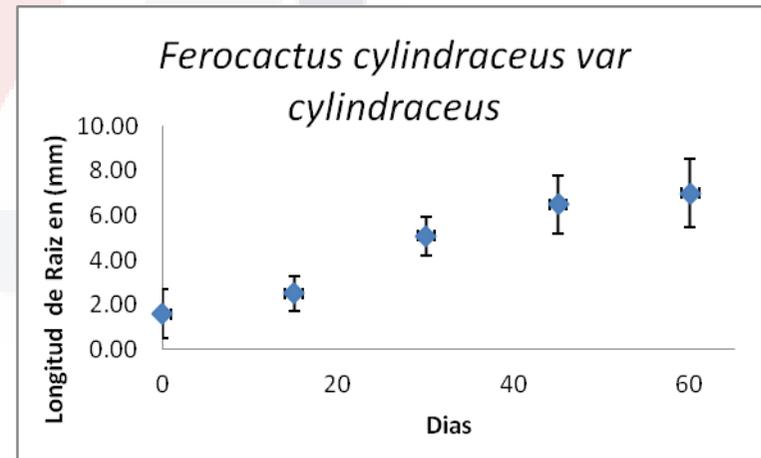
Gráfica 10. Curva de Crecimiento para la Especie *Escontria chiotilla*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



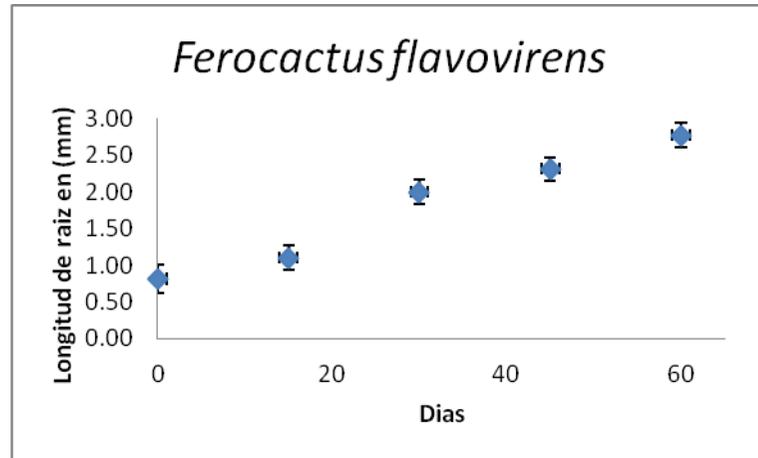
Gráfica 11. Curva de Crecimiento para la Especie *Ferocactus glaucescens*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



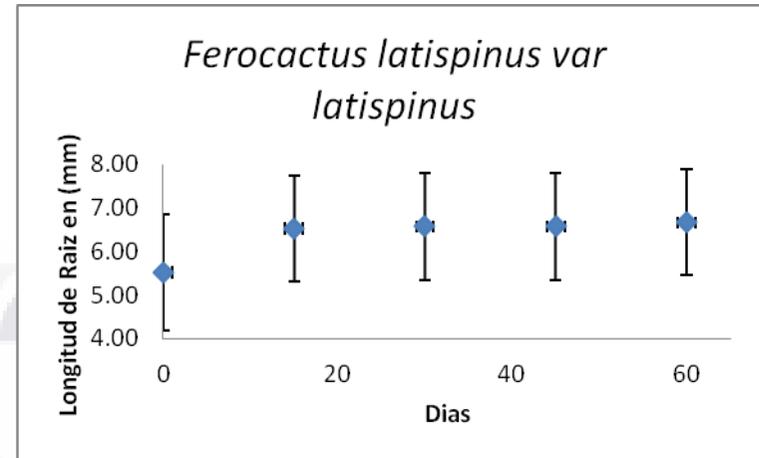
Gráfica 12. Curva de Crecimiento para la Especie *Ferocactus peninsulae*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



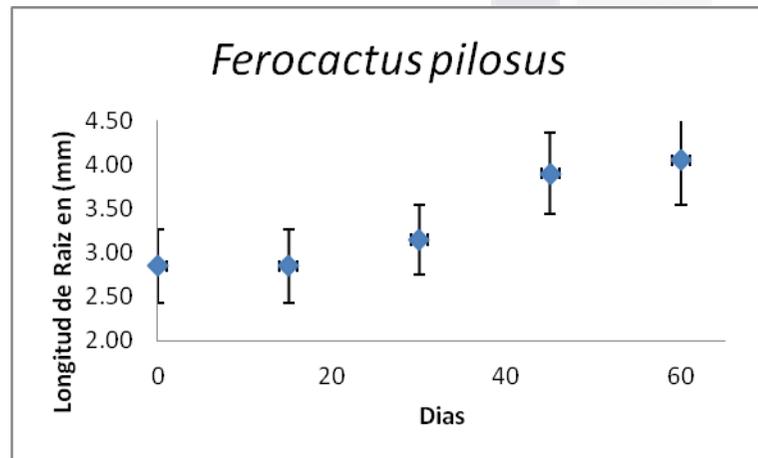
Gráfica 13. Curva de Crecimiento para la Especie *Ferocactus cylindraceus var cylindraceus*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



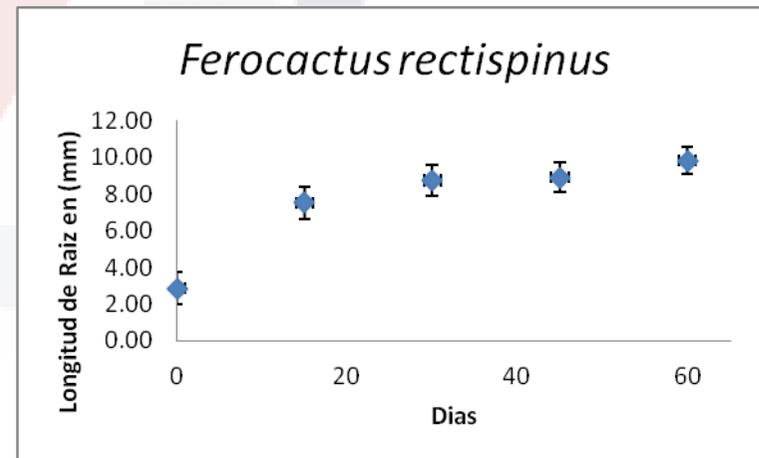
Grafica 14. Curva de Crecimiento para la Especie *Ferocactus flavovirens*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



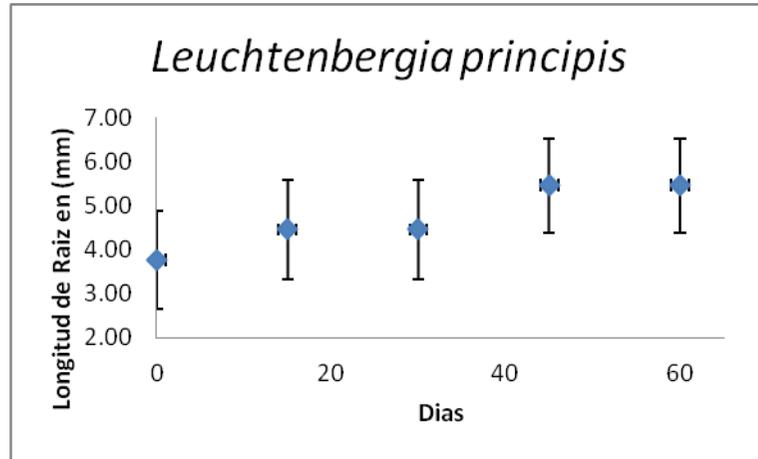
Grafica 15. Curva de Crecimiento para la Especie *Ferocactus latispinus var latispinus*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



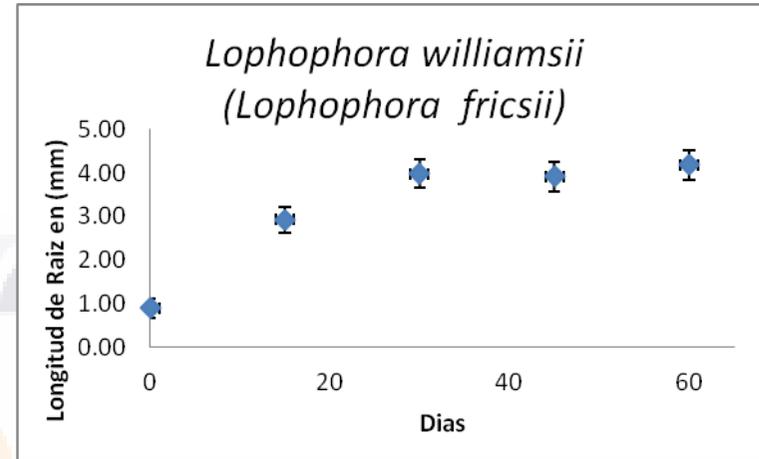
Grafica 16. Curva de Crecimiento para la Especie *Ferocactus pilosus*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



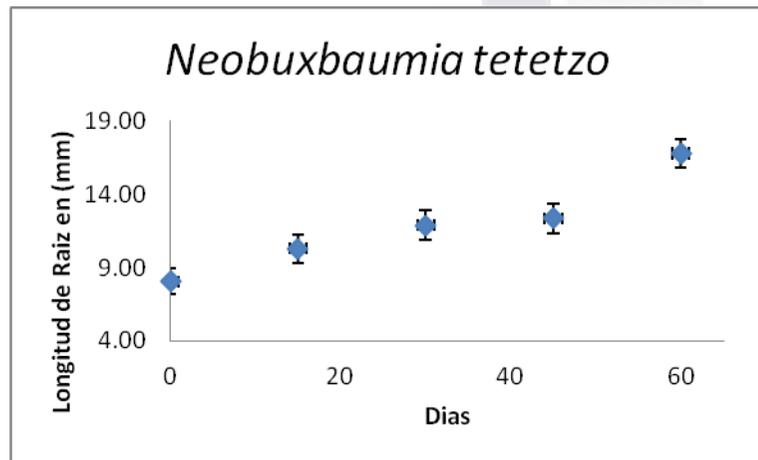
Grafica 17. Curva de Crecimiento para la Especie *Ferocactus rectispinus*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



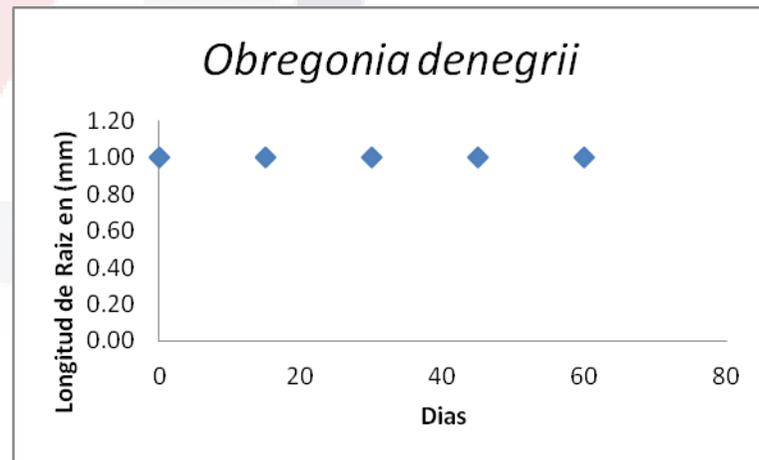
Grafica 18. Curva de Crecimiento para la Especie *Leuchtenbergia principis*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



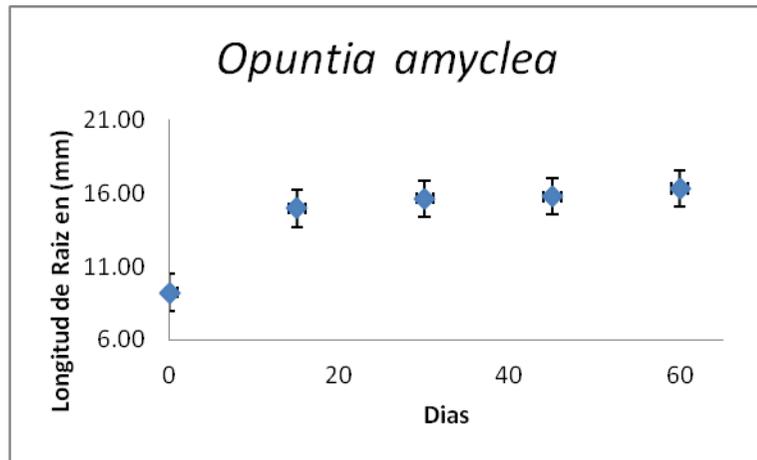
Grafica 19. Curva de Crecimiento para la Especie *Lophophora williamsii* (*Lophophora fricsii*), los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



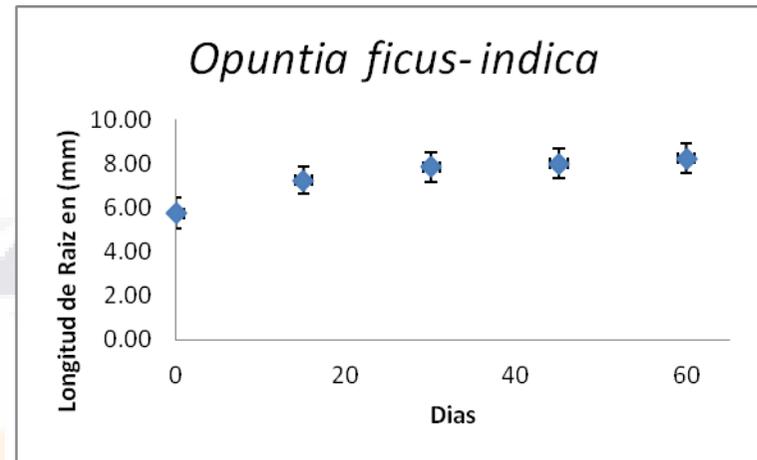
Grafica 20. Curva de Crecimiento para la Especie *Neobuxbaumia tetetzo*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



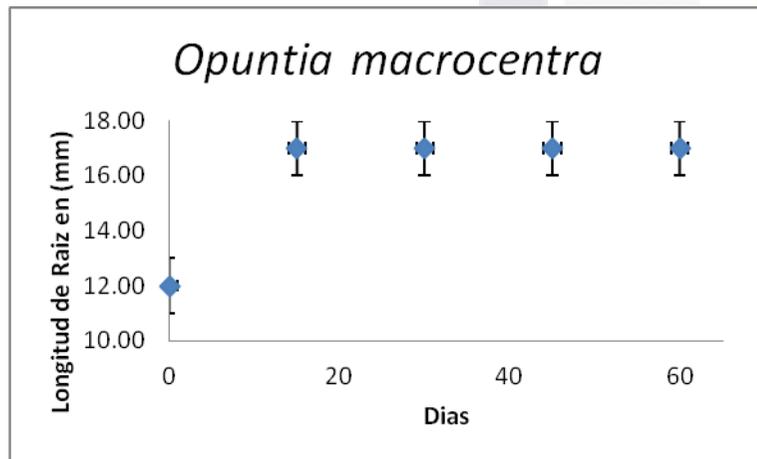
Grafica 21. Curva de Crecimiento para la Especie *Obregonia denegrii*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



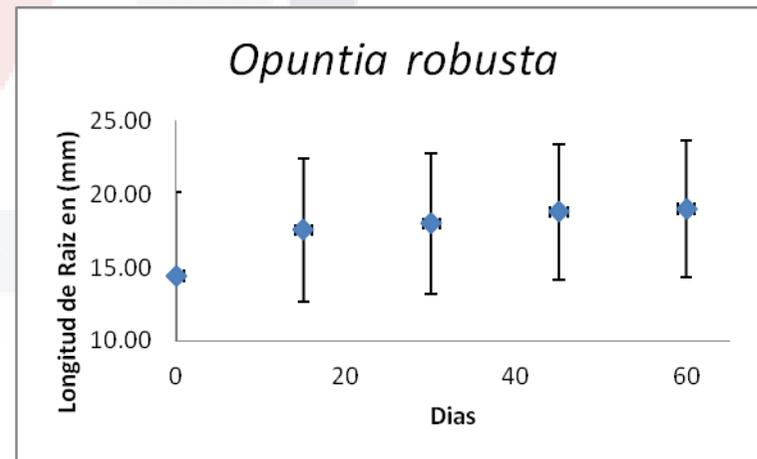
Gráfica 22. Curva de Crecimiento para la Especie *Opuntia amyaclea*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



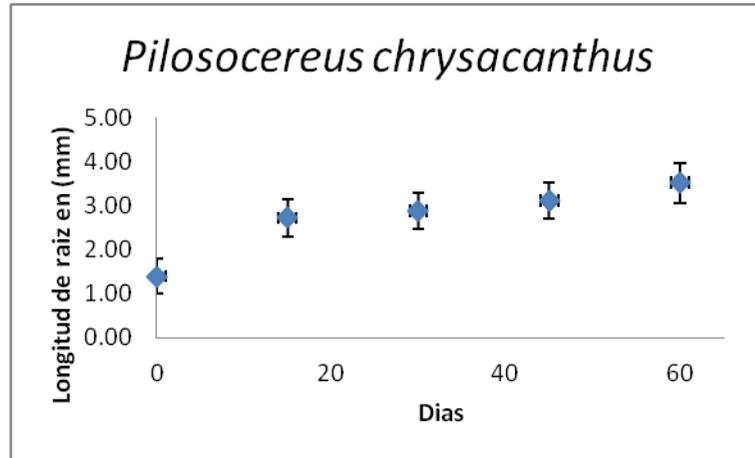
Gráfica 23. Curva de Crecimiento para la Especie *Opuntia ficus-indica*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



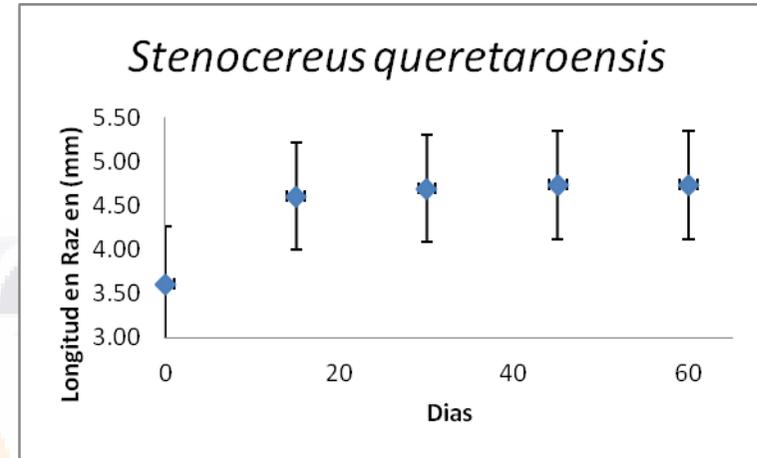
Gráfica 24. Curva de Crecimiento para la Especie *Opuntia macrocentra*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



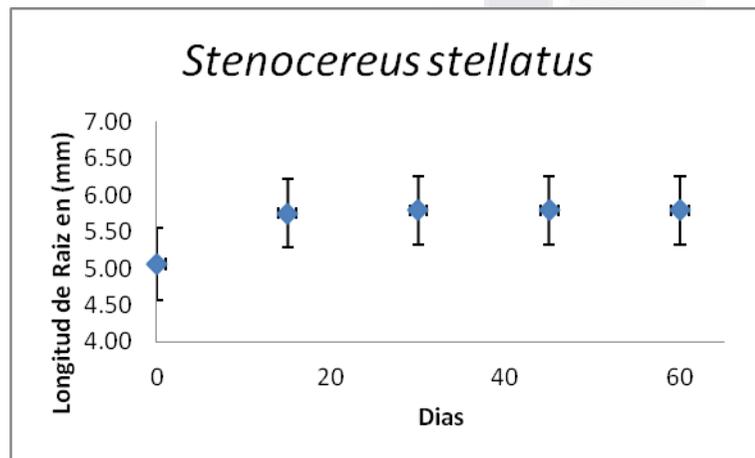
Gráfica 25. Curva de Crecimiento para la Especie *Opuntia robusta*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



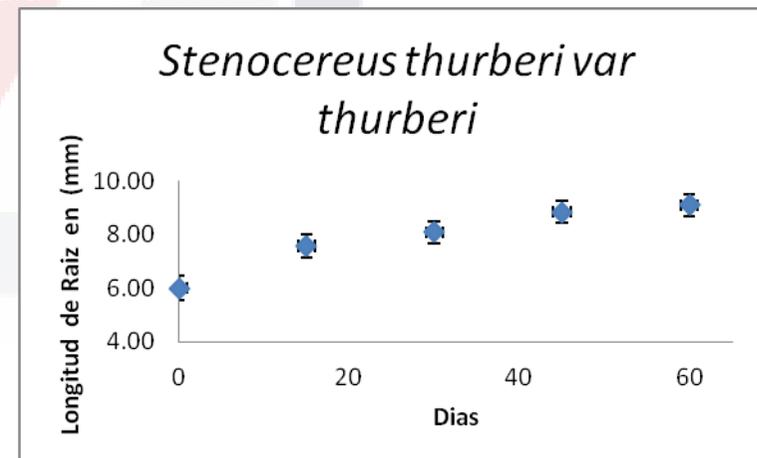
Gráfica 26. Curva de Crecimiento para la Especie *Pilosocereus chrysacanthus*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



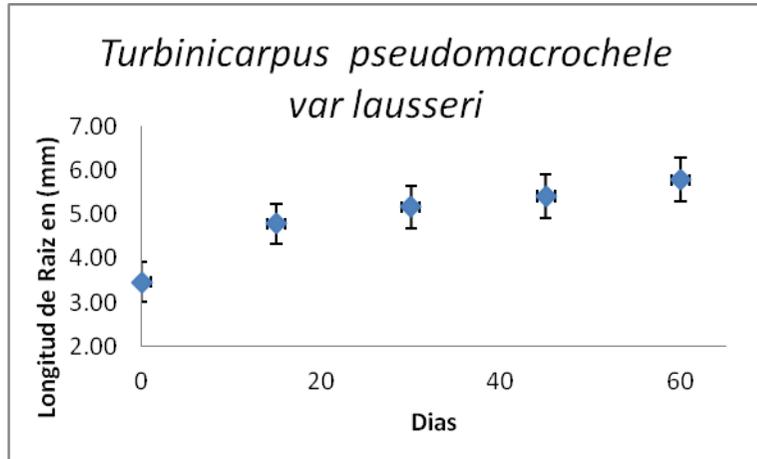
Gráfica 27. Curva de Crecimiento para la Especie *Stenocereus queretaroensis*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



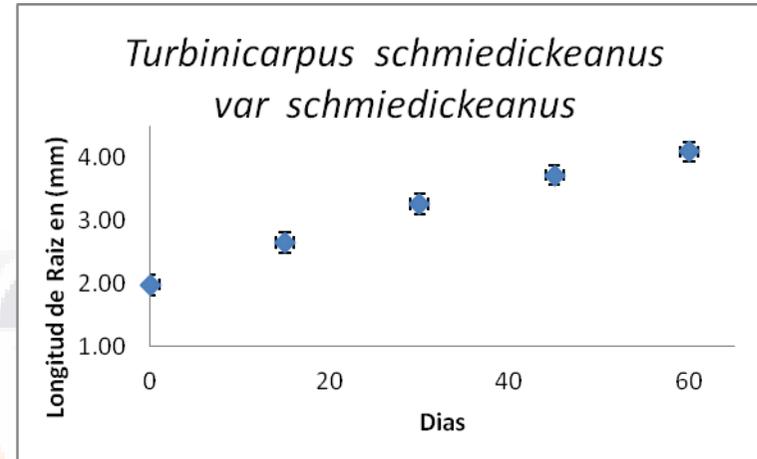
Gráfica 28. Curva de Crecimiento para la Especie *Stenocereus stellatus*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



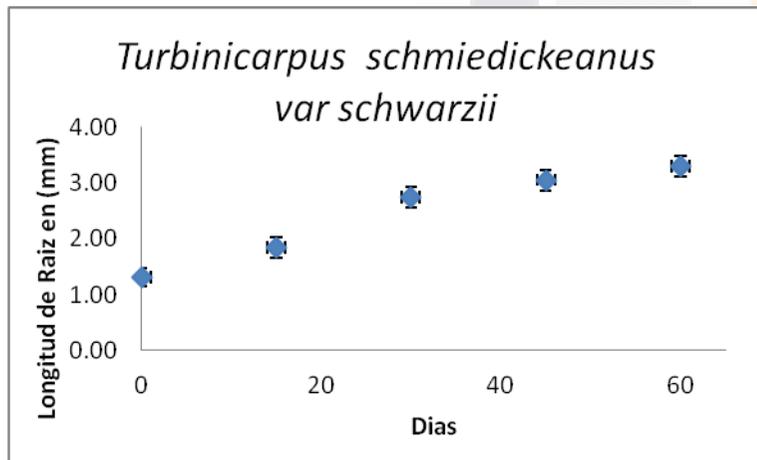
Gráfica 29. Curva de Crecimiento para la Especie *Stenocereus thurberi var thurberi*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



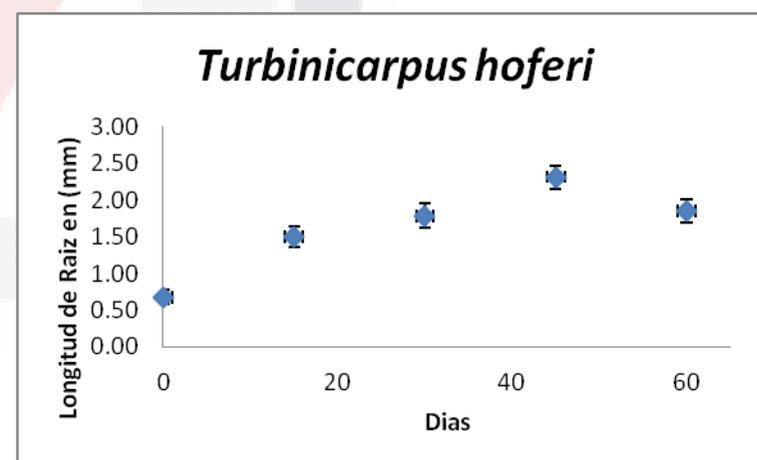
Grafica 30. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus pseudomacrochele var lausseri*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



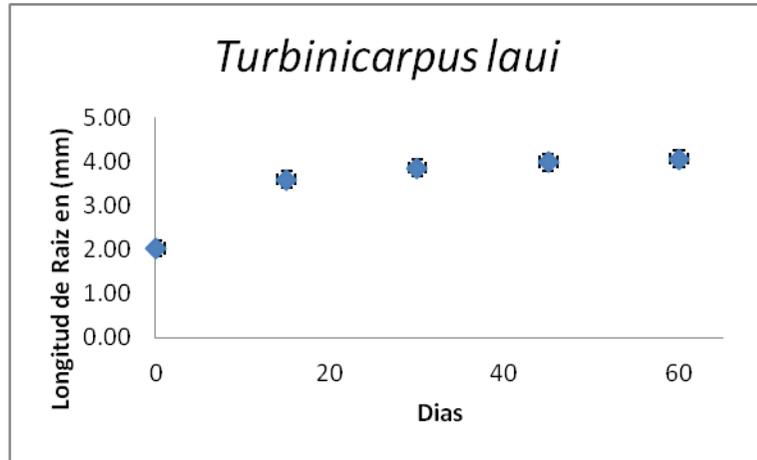
Grafica 31. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus schmidickeanus var schmidickeanus*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



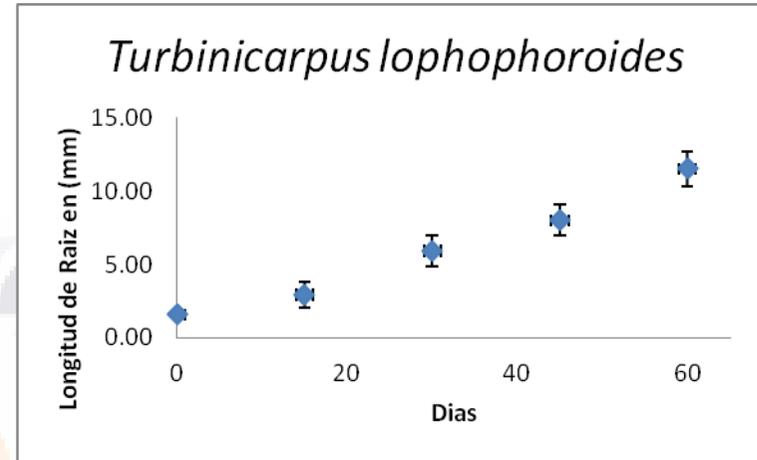
Grafica 32. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus schmidickeanus var schwarzii*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



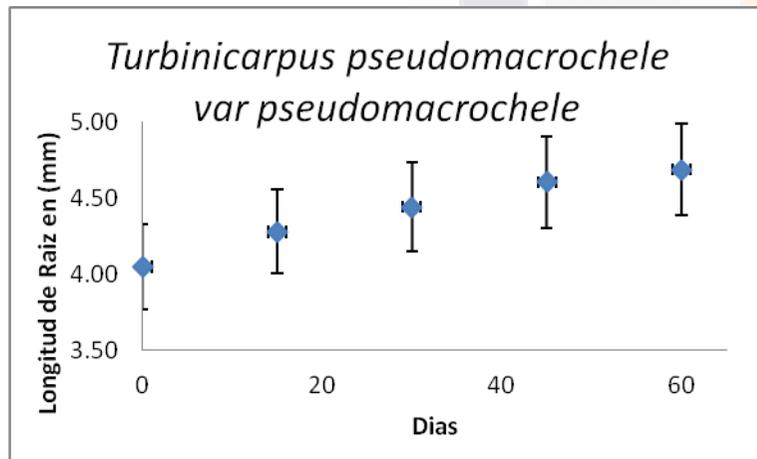
Grafica 33. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus hoferi*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



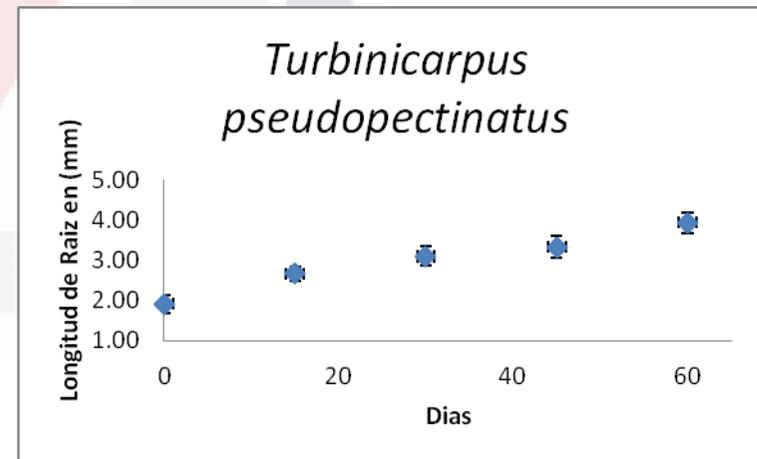
Grafica 34. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus laui*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



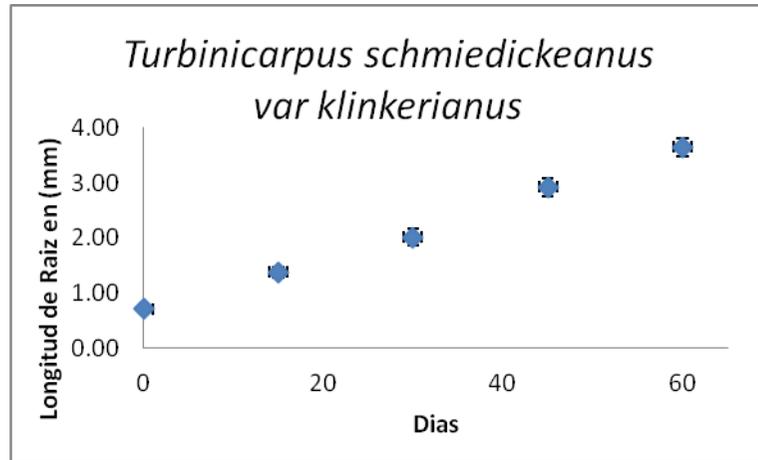
Grafica 35. Curva de Crecimiento para *Turbinicarpus lophophoroides*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



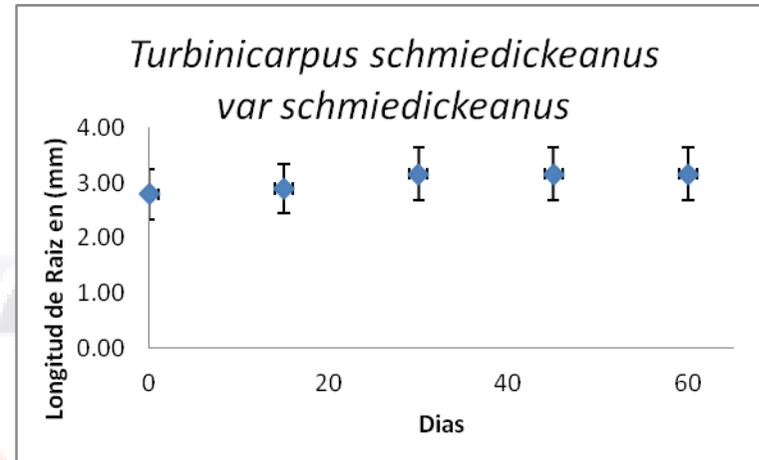
Grafica 36. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus pseudomacrochele var pseudomacrochele*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



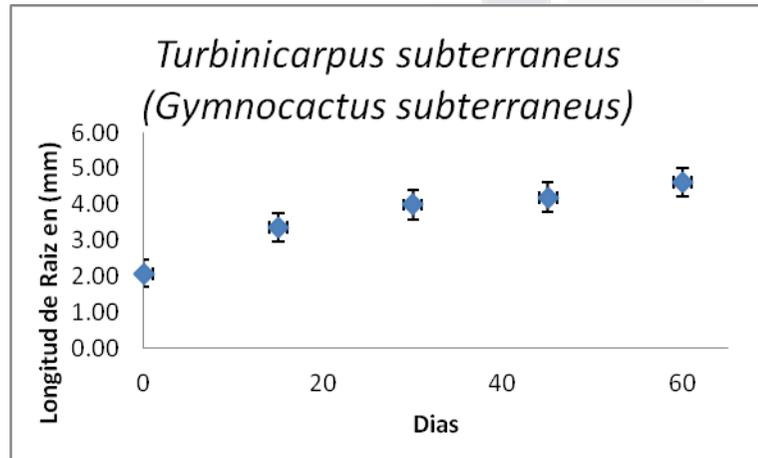
Grafica 37. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus pseudopectinatus*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



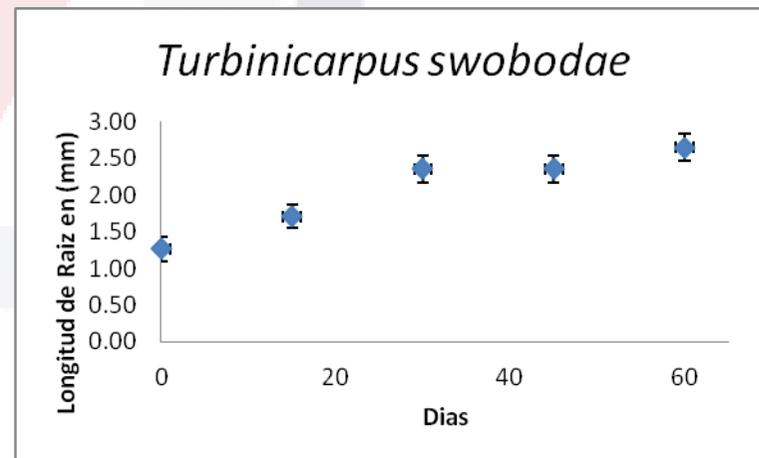
Gráfica 38. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus schmidickeanus var klinkerianus*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



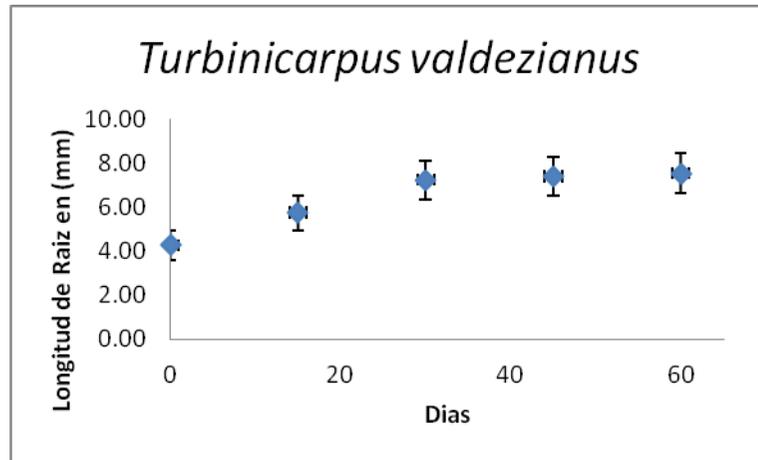
Gráfica 39. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus schmidickeanus var schmidickeanus*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



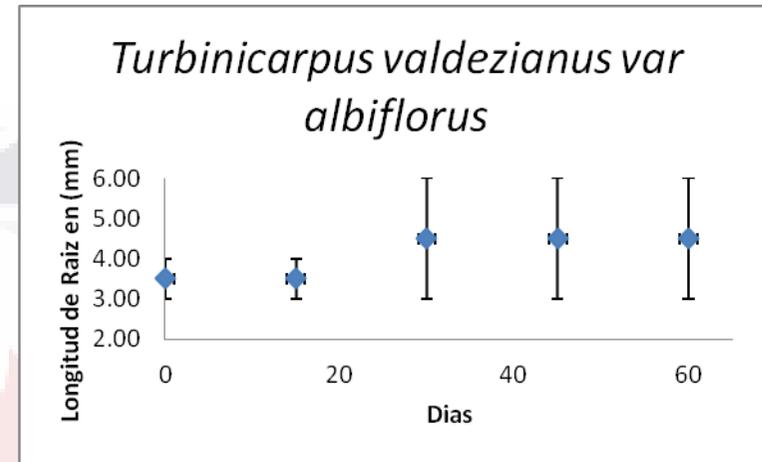
Gráfica 40. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus subterraneus (Gymnocactus subterraneus)*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



Gráfica 41. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus swobodaе*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



Grafica 42. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus valdezianus*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



Grafica 43. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus valdezianus var albiflorus*, los explantes se encontraban en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.

V.4 Curvas de Crecimiento de las raíces presuntamente transformadas de cactáceas mexicanas en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan a 26°C, en la luz por fotoperiodos de 12 hrs.

Se tomaron 7 explantes con raíz de 12 especies que mostraron un buen crecimiento en el Método Convencional, y se midieron a los 0, 15, 30, 45, y 60 días.

Clave	Especie	n	Numero de Raíces por Explante (Media ± Desviación Estándar)	Longitud de Raíz (mm) (Media ± Desviación Estándar)
1	<i>Echinocactus platyacanthus</i>	7	12.0 ± 7.83	6.5 ± 3.9
67	<i>Echinocactus grusonii</i>	7	20.29 ± 9.48	2.7 ± 2.0
152	<i>Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)</i>	7	8.57 ± 8.10	3.0 ± 1.8
165	<i>Ferocactus peninsulæ</i>	7	13.0 ± 8.87	7.3 ± 5.8
154	<i>Opuntia amyclea</i>	7	2.36 ± 1.77	14.4 ± 10.4
156	<i>Opuntia robusta</i>	7	2.57 ± 1.27	7.4 ± 2.5
29	<i>Stenocereus thurberi var thurberi</i>	7	12.36 ± 8.86	7.1 ± 5.0
75	<i>Turbinicarpus schmidickeanus var schmidickeanus</i>	7	7.43 ± 4.43	2.8 ± 1.7
123	<i>Turbinicarpus schmidickeanus var schwarzii</i>	7	20.71 ± 22.10	3.9 ± 2.2
63	<i>Turbinicarpus laui</i>	7	9.43 ± 8.54	4.1 ± 2.5
62	<i>Turbinicarpus schmidickeanus var klinkerianus</i>	7	8.29 ± 6.10	2.3 ± 0.9
99	<i>Turbinicarpus subterraneus (Gymnocactus subterraneus)</i>	7	4.86 ± 3.58	4.1 ± 2.1

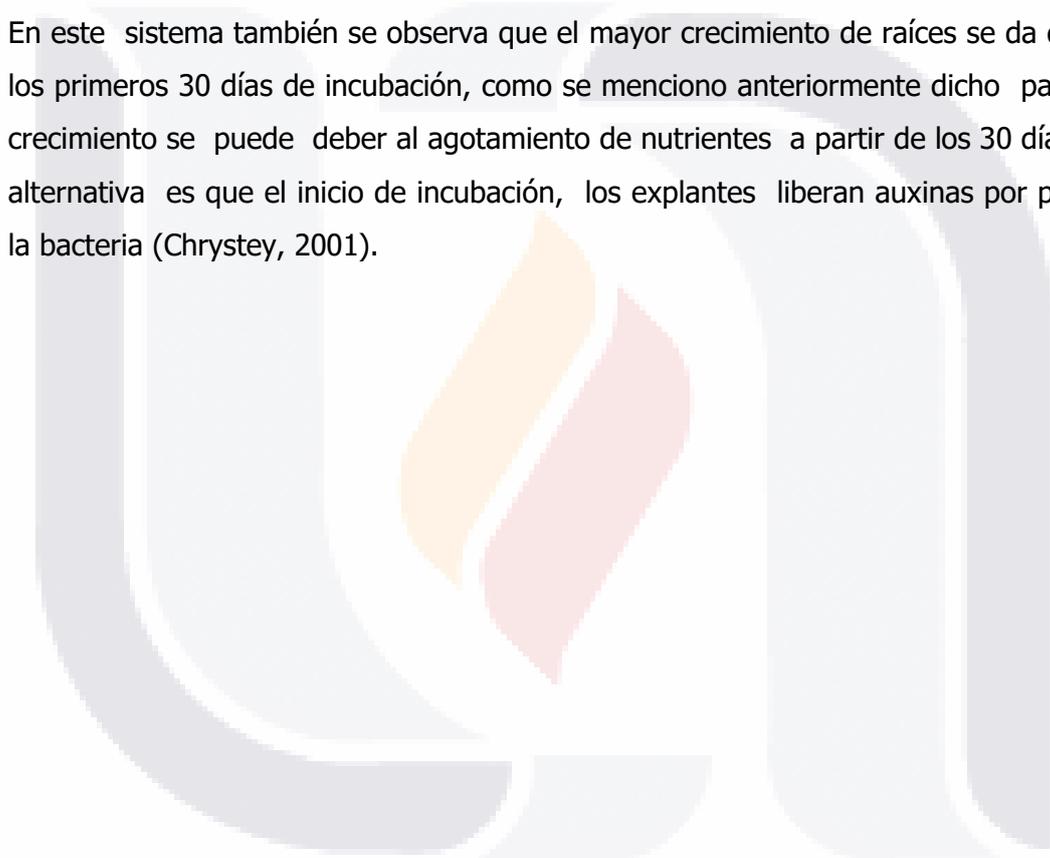
Tabla 2 Respuesta de 12 especies de cactáceas mexicanas a la infección por *Agrobacterium rhizogenes* A4. Todos los parámetros se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan. La media del número de raíces por Explante se calculó dividiendo el número de raíces totales entre los explantes que generaron raíz, se muestra la desviación estándar del número de raíces por explante. La longitud de raíz con su media y desviación estándar se determinó teniendo en cuenta que no todas las raíces tienen el mismo tiempo de crecimiento, puesto algunas raíces salieron al inicio y otras al final del tratamiento.

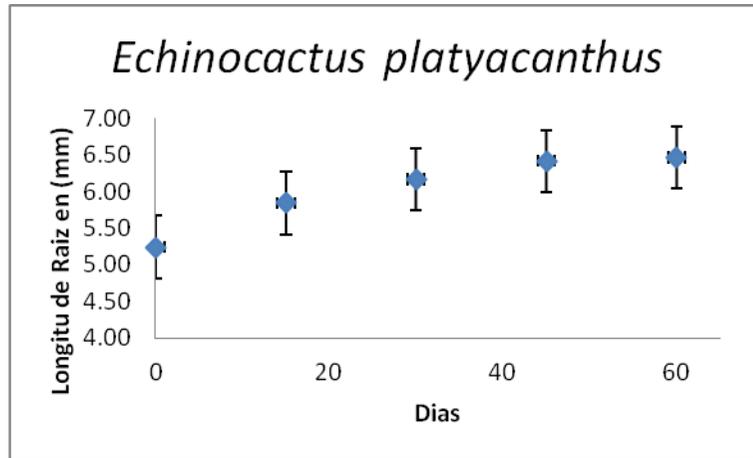
Las condiciones que presenta este sistema fueron óptimas para el crecimiento de las raíces de 12 especies de cactáceas mexicanas, donde la temperatura de 26°C y fotoperiodos de 12hrs en un medio MS semisólido contribuyeron a un mejor crecimiento que el que presentaron en el método convencional, ya que a una mayor temperatura y con exposición a la luz podría simularse el efecto que tienen las plantas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

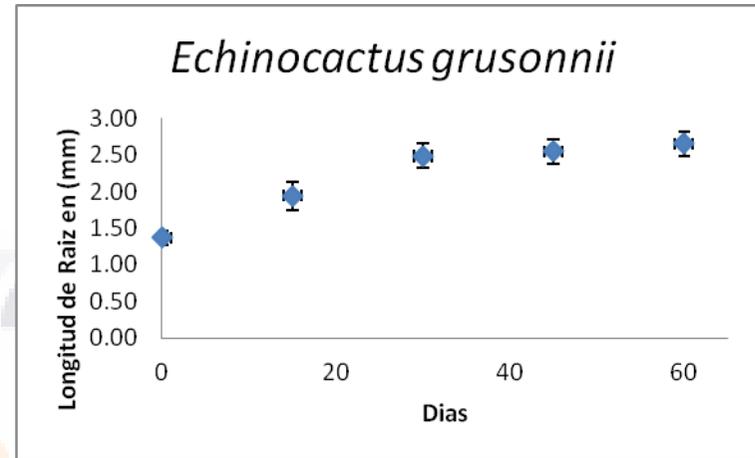
al estar expuestas al sol y obtener una mejor respuesta en comparación cuando se encuentran en la obscuridad total. Las especies que mostraron un mayor número de raíces por explante en este sistema fueron: *Echinocactus platyacanthus*, *Echinocactus grusonii*, *Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)*, *Ferocactus peninsulae*, *Stenocereus thurberi var thurberi*, *Turbiniacarpus schmiedickeanus var schwarzii*, *Turbiniacarpus laui*. Así también las especies en las que se observó una mayor longitud de raíz, tales como: *Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus peninsulae*, *Opuntia amyoclea*, *Opuntia robusta*, *Stenocereus thurberi var thurberi*.

En este sistema también se observa que el mayor crecimiento de raíces se da durante los primeros 30 días de incubación, como se mencionó anteriormente dicho patrón de crecimiento se puede deber al agotamiento de nutrientes a partir de los 30 días. Otra alternativa es que al inicio de incubación, los explantes liberan auxinas por parte de la bacteria (Chrystey, 2001).

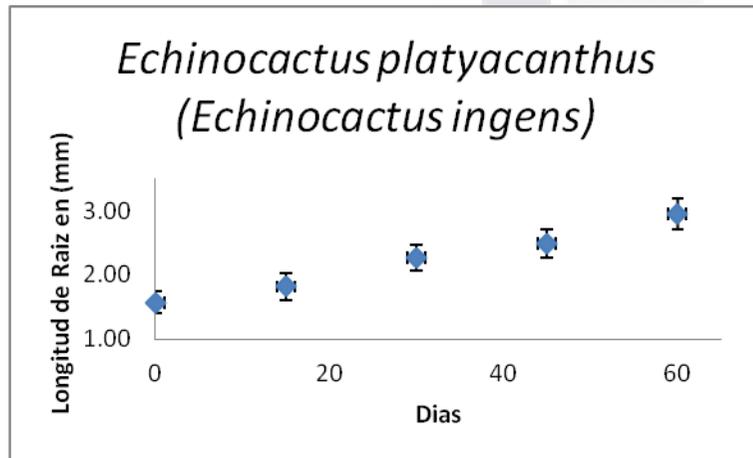




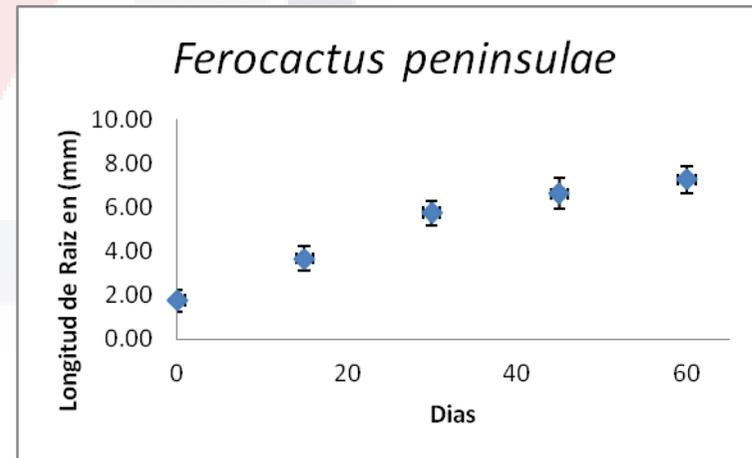
Grafica 44. Curva de Crecimiento para la Especie *Echinocactus platyacanthus*, l en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en fotoperiodos de 12 hrs, se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



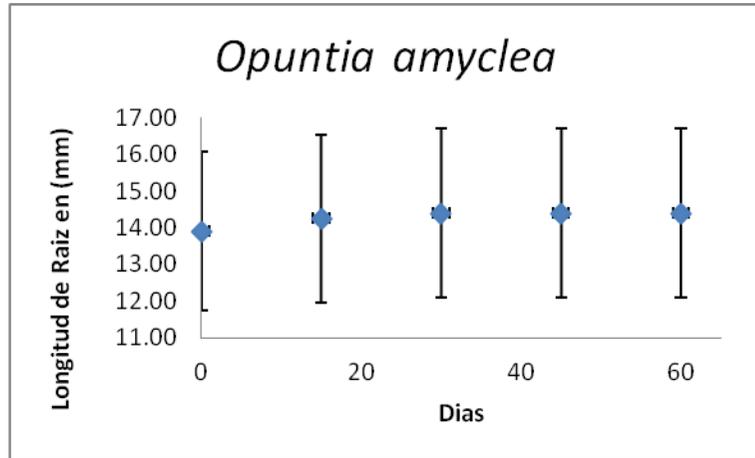
Grafica 45. Curva de Crecimiento para la Especie *Exhinocactus grusonii*, en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en fotoperiodos de 12 hrs, se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



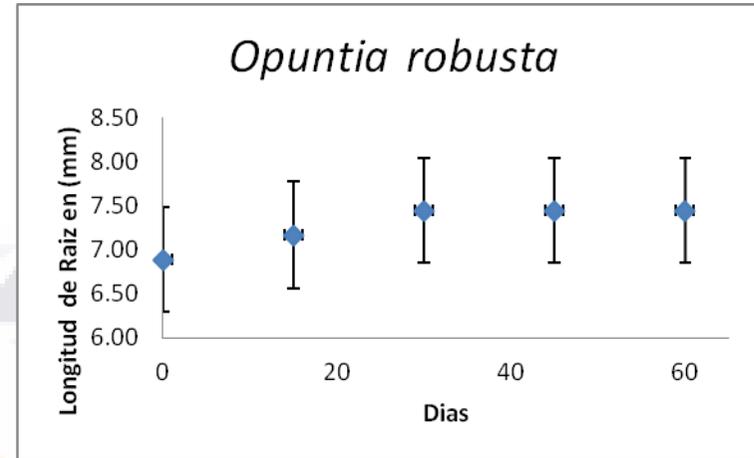
Grafica 46. Curva de Crecimiento para la Especie *Echinocactus platycanthus (Echinocactus ingens)*, en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en fotoperiodos de 12 hrs, se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



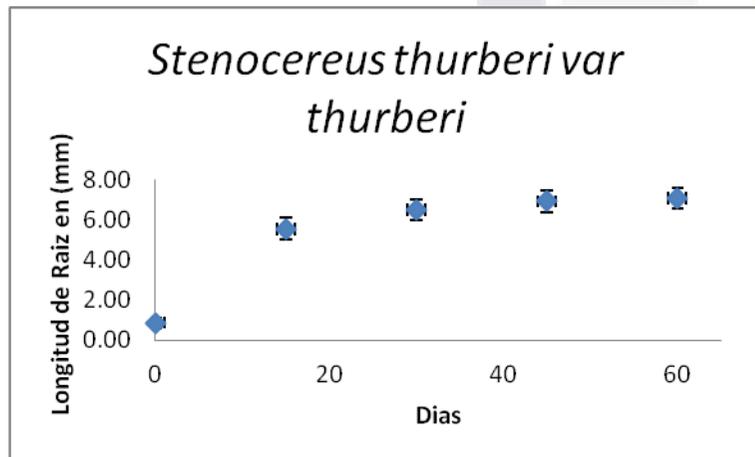
Grafica 47. Curva de Crecimiento para la Especie *Ferocactus peninsulae*, en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en fotoperiodos de 12 hrs, se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



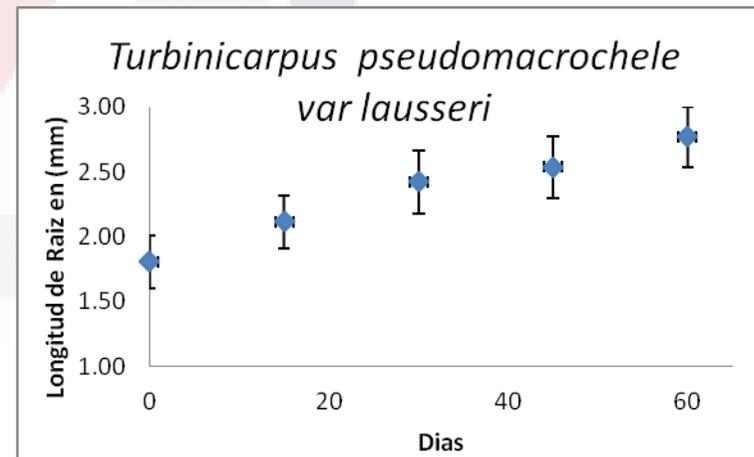
Grafica 48. Curva de Crecimiento para la Especie *Opuntia amyaclea*, en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en fotoperiodos de 12 hrs, se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



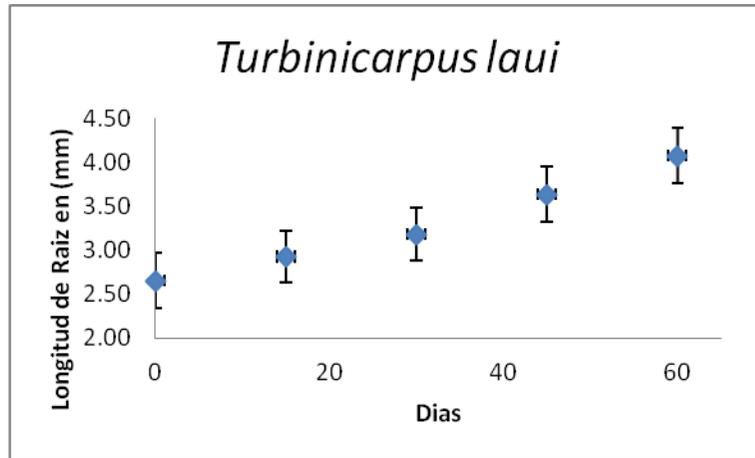
Grafica 49. Curva de Crecimiento para la Especie *Opuntia robusta*, en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en fotoperiodos de 12 hrs, se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



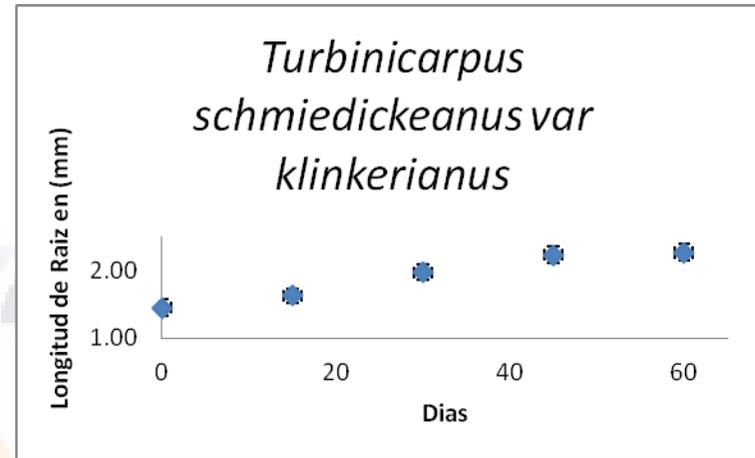
Grafica 50. Curva de Crecimiento para la Especie *Stenocereus thurberi var thurberi*, en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en fotoperiodos de 12 hrs, se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



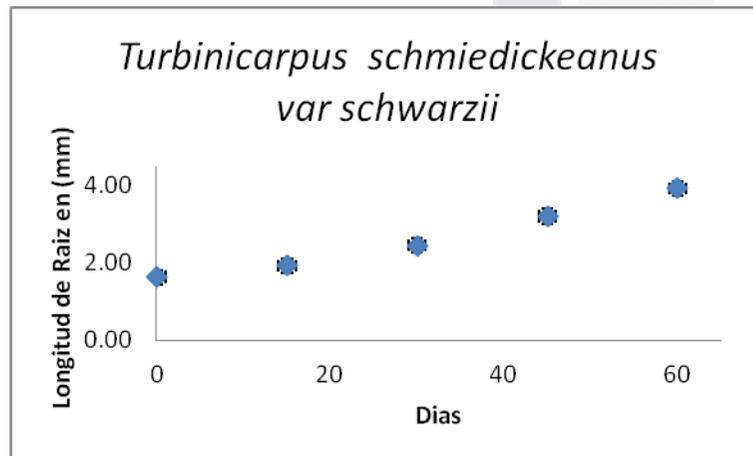
Grafica 51. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus pseudomacrochele var lausseri*, en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en fotoperiodos de 12 hrs, se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



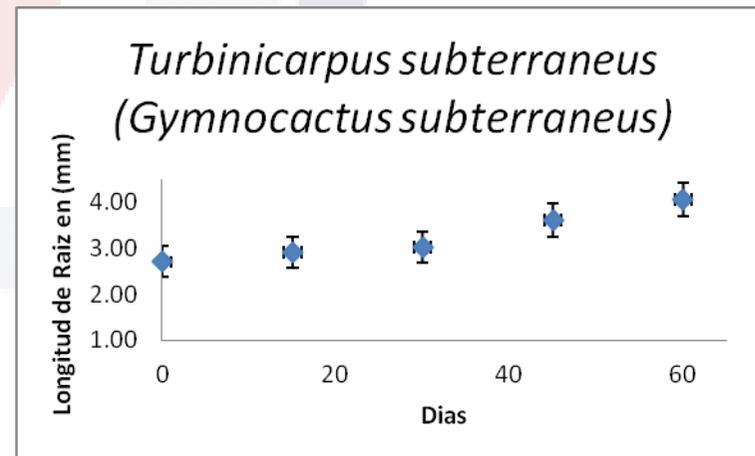
Grafica 52. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus laui*, en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en fotoperiodos de 12 hrs, se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



Grafica 53. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus schmidickeanus var klinkerianus*, en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en fotoperiodos de 12 hrs, se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



Grafica 54. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus schmidickeanus var schwarzii*, en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en fotoperiodos de 12 hrs, se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.



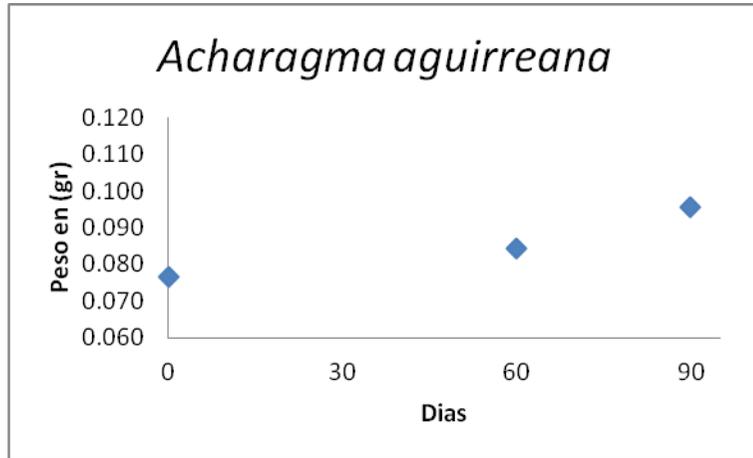
Grafica 55. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus subterraneus (Gymnocactus subterraneus)*, en medio MS con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en fotoperiodos de 12 hrs, se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, con media \pm error estándar.

V.5 Curvas de Crecimiento de las raíces presuntamente transformadas de cactáceas mexicanas en medio MS líquido con 250 mg/L de Claforan a 20°C, en la obscuridad.

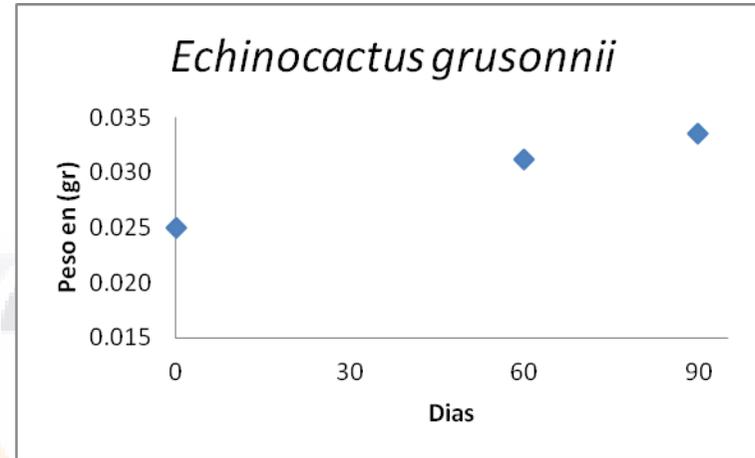
Se tomaron la mitad de los explantes con raíz que se encontraban el método convencional de aquellas especies que tuvieran más de 6 explantes por especie, una vez que se pasaron a los frascos con medio líquido se pesaron a los 0, 60, y 90 días.

La variable que se manejó en este sistema de cultivo el medio MS líquido y en este sistema de cultivo se observaron varios cambios en los explantes, el más destacable fue la vitrificación de los explantes, este fenómeno puede deberse a que el explante se encuentra en mayor contacto con el medio líquido y a mayor área de superficie en contacto con el medio, será mayor la absorción de nutrientes pero también mayor absorción de agua por tanto se da la vitrificación de los explantes. También se observó la formación de tejido calloso en algunos de los explantes así también en la especie *Opuntia amyoclea* todos los explantes generaron brotes que se separaron del explante para posteriormente resembrarlos en medio semisólido MS.

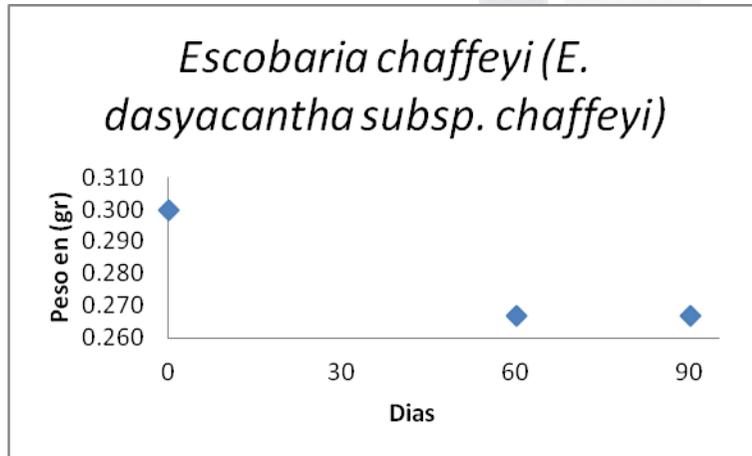
Al pesar los explantes a los 0, 60 y 90 días algunos de los explantes presentaban vitrificación y por tanto dificultaba el peso del mismo ya que al momento de sacar el explante del frasco las raíces se desprendían y por tanto en lugar de tener un aumento de peso en el explante, el peso disminuía por lo que no se considera un buen sistema para determinar el crecimiento del explante. Éste sistema resulto muy difícil de manipular ya que muy fácilmente los frascos se contaminaban al destaparlos por tal motivo fue que se pesaron a los 0, 60 y 90 días, así mismo el sacar los explantes, colocarlos en gasa estéril para eliminar el exceso de agua y posteriormente pesarlos fue un proceso difícil puesto que también se contaminaban fácilmente aun cuando se trabajo bajo condiciones estériles.



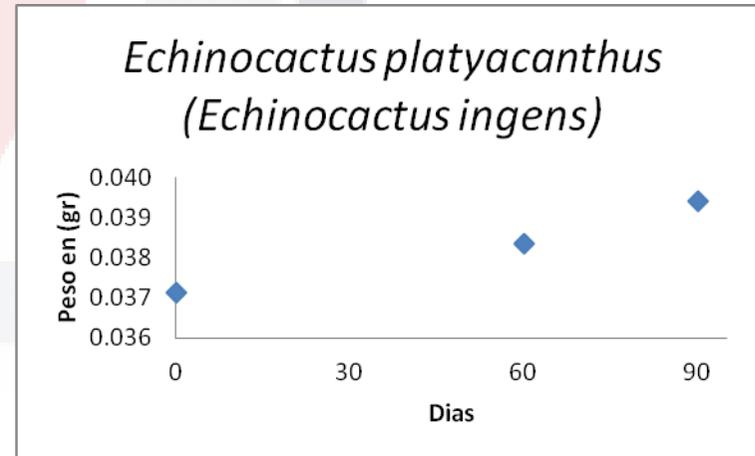
Grafica 56. Curva de Crecimiento para la Especie *Acharagma aguirreana*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



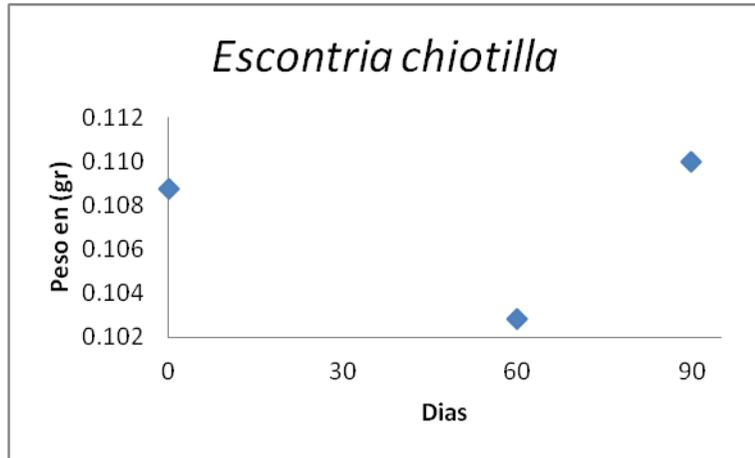
Grafica 57. Curva de Crecimiento para la Especie *Echinocactus grusonii*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



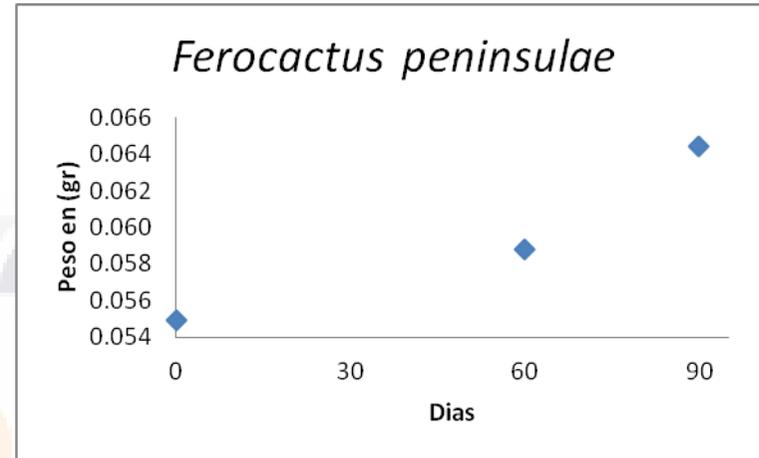
Grafica 58. Curva de Crecimiento para la Especie *Escobaria chaffeyi* (*E. dasyacantha subsp. Chaffeyi*), los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



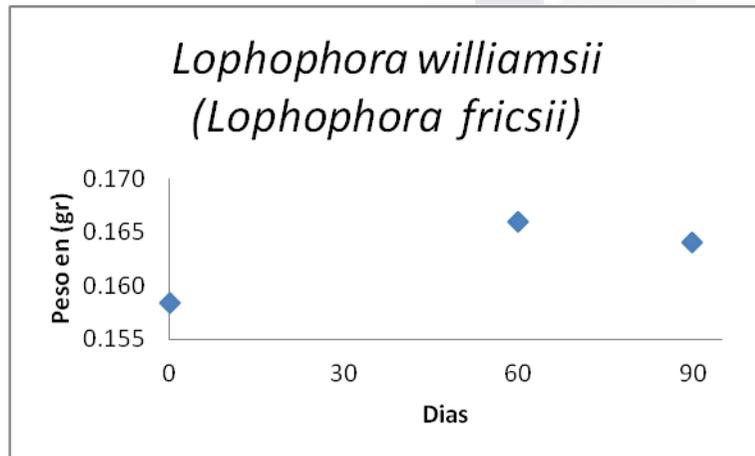
Grafica 59. Curva de Crecimiento para la Especie *Echinocactus platyacanthus* (*Echinocactus ingens*), los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



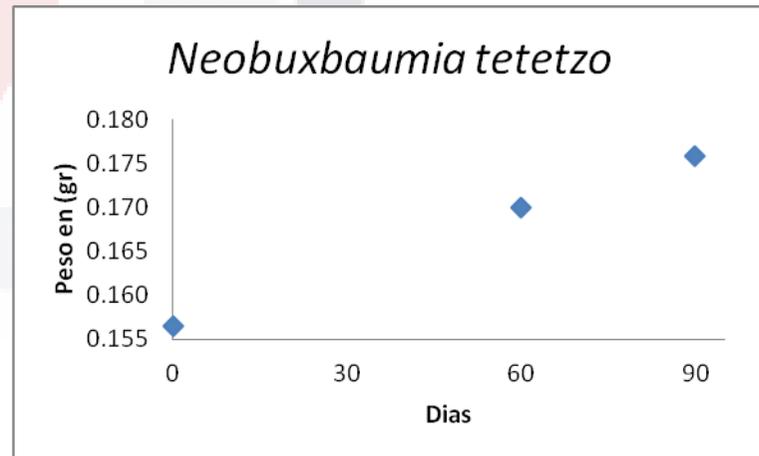
Grafica 60. Curva de Crecimiento para la Especie *Escontria chiotilla*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



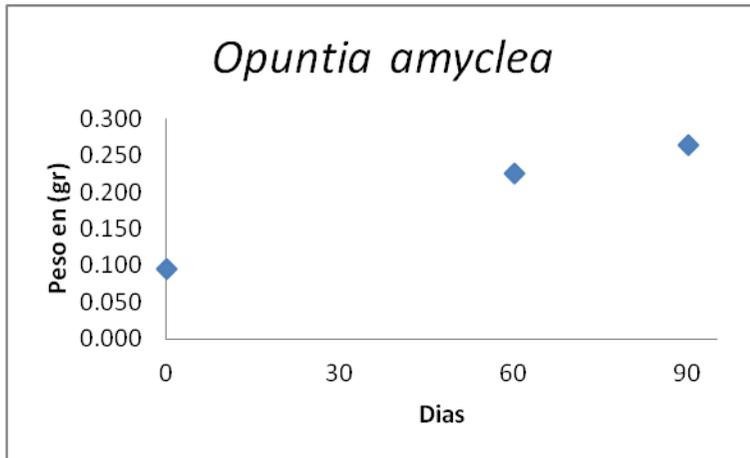
Grafica 61. Curva de Crecimiento para la Especie *Ferocactus cylindraceus var cylindraceus*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



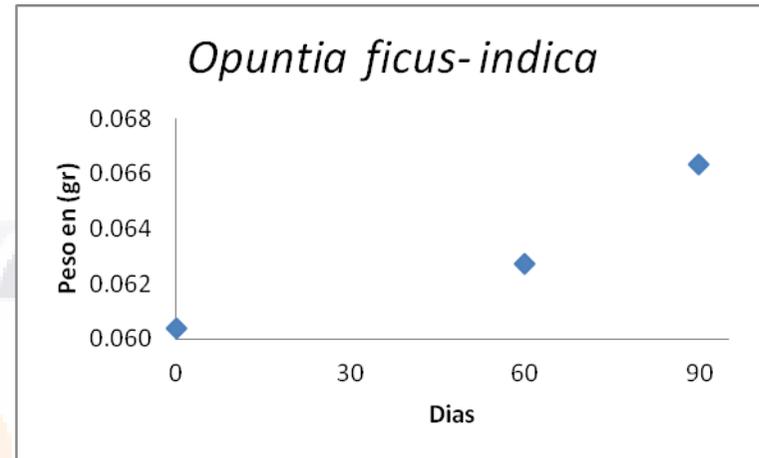
Grafica 62. Curva de Crecimiento para la Especie *Lophophora williamsii (Lophophora fricsii)*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



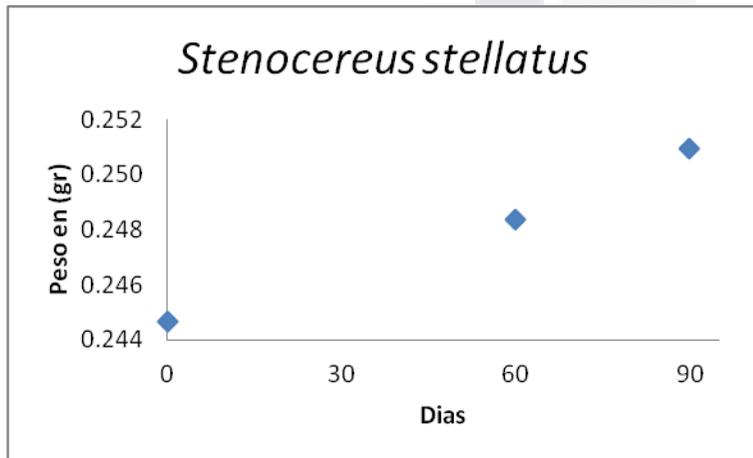
Grafica 63. Curva de Crecimiento para la Especie *Neobuxbaumia tetetzo*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



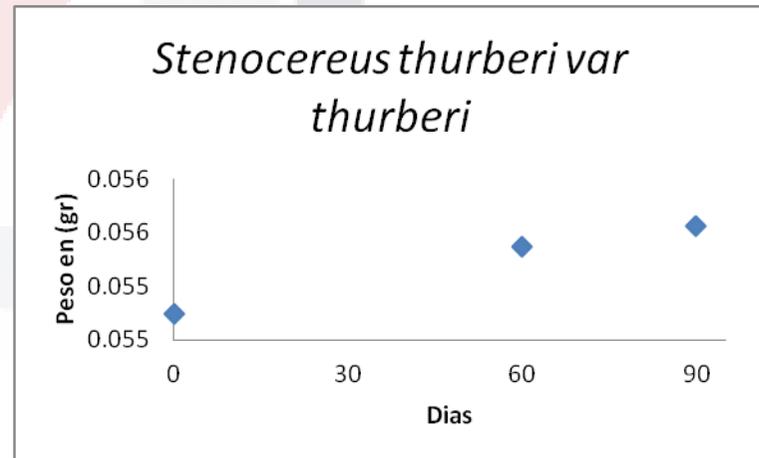
Grafica 64. Curva de Crecimiento para la Especie *Opuntia amyaclea*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



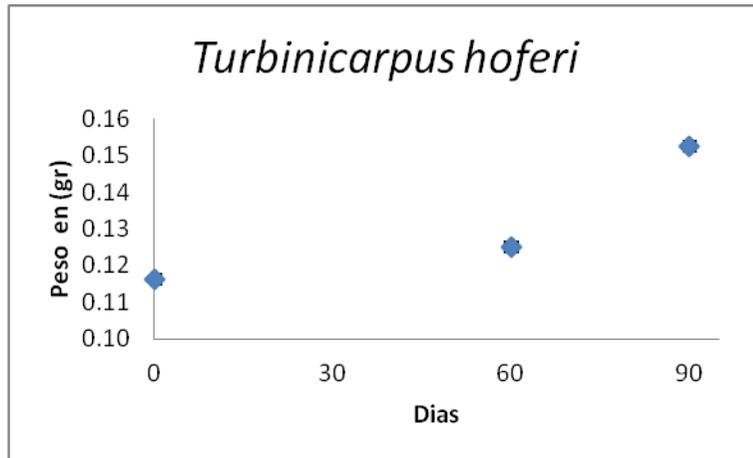
Grafica 65. Curva de Crecimiento para la Especie *Opuntia ficus-indica*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



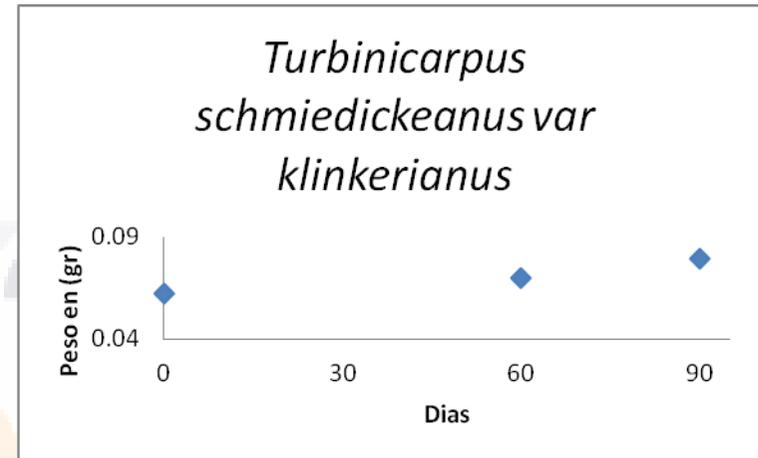
Grafica 66. Curva de Crecimiento para la Especie *Stenocereus stellatus*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



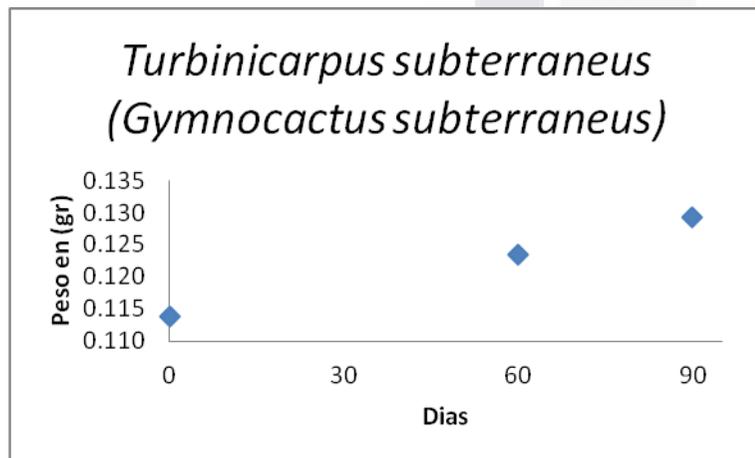
Grafica 67. Curva de Crecimiento para la Especie *Stenocereus thurberi var thurberi*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



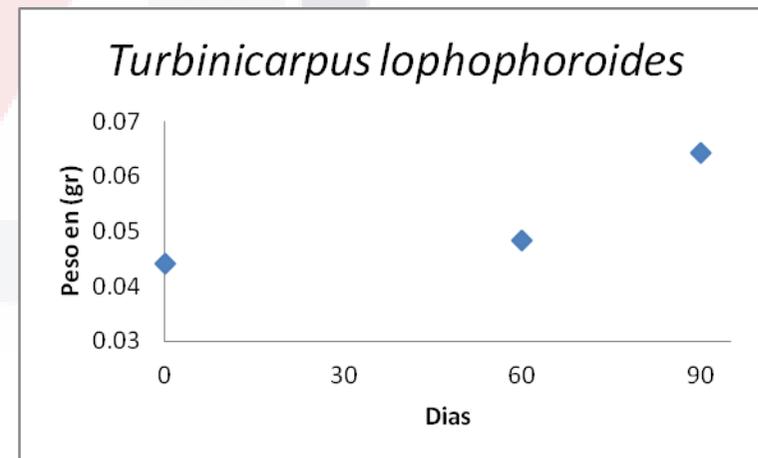
Grafica 68. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus hoferi*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



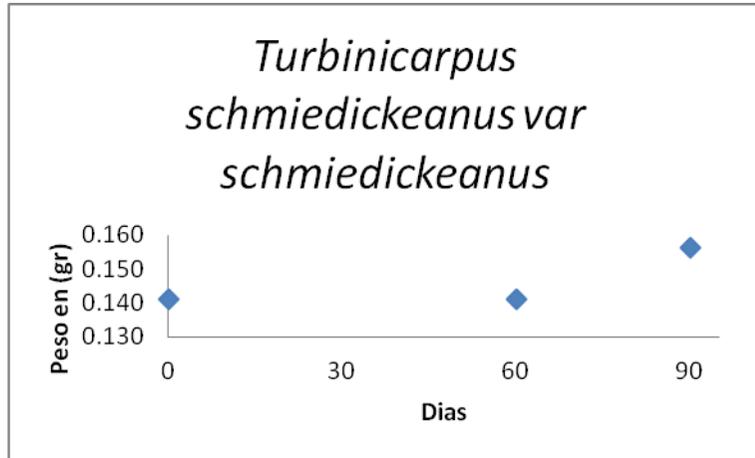
Grafica 69. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus schmiedickeanus var klinkerianus*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días,



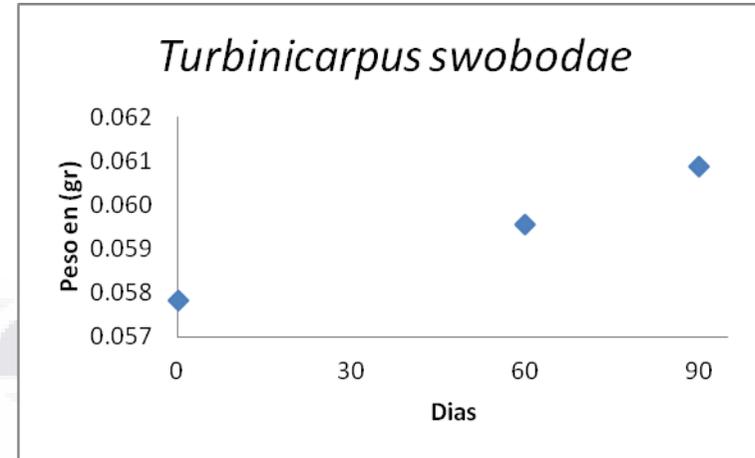
Grafica 70. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus subterraneus (Gymnocactus subterraneus)*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



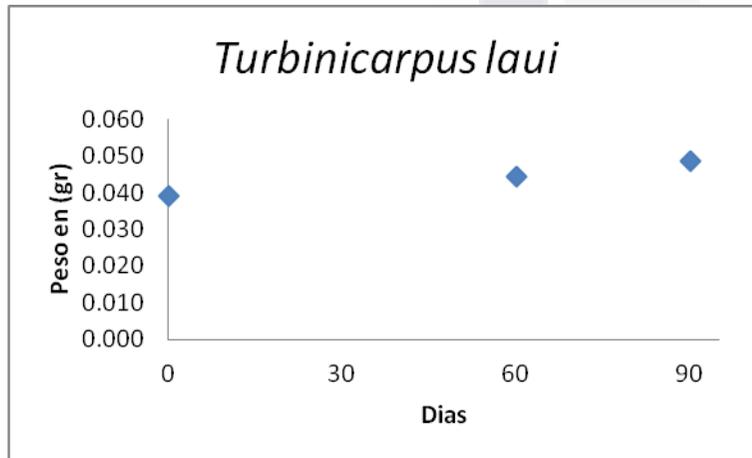
Grafica 71. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus lophophoroides*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



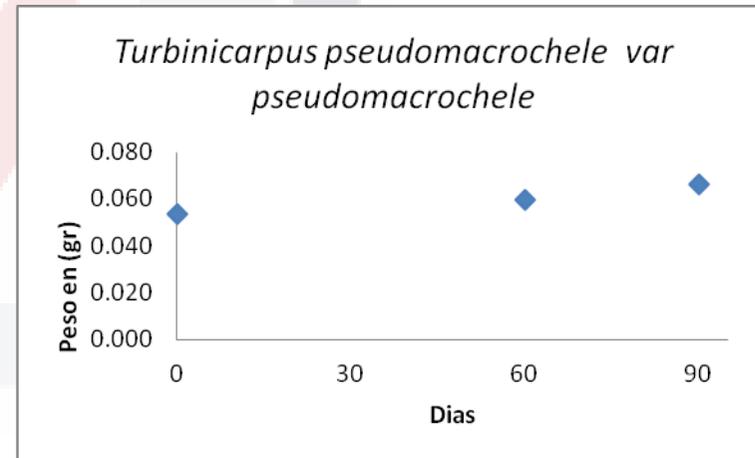
Grafica 72. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus schmiedickeanus var schmiedickeanus*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y



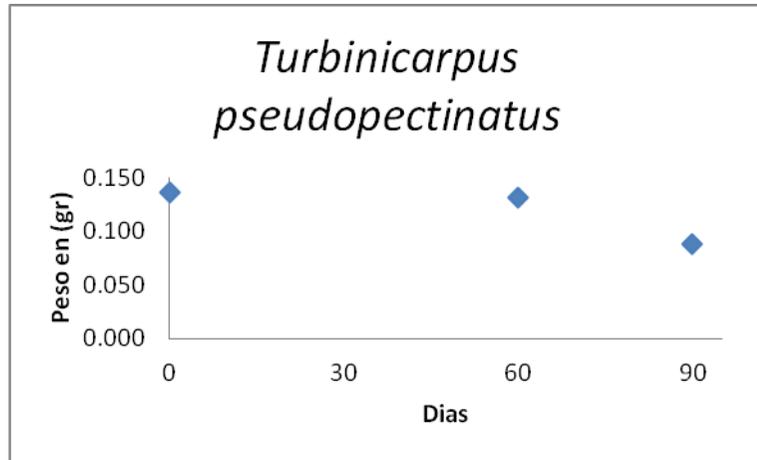
Grafica 73. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus swobodaе*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



Grafica 74. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus laui*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



Grafica 75. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus pseudomacroechele var pseudomacroechele*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.



Grafica 76. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus pseudopectinatus*, los explantes se encontraban en medio MS Liquido con 250 mg/L de Claforan, y se pesaron a los 0, 60 y 90 días, con media.

V.6 Curvas de Crecimiento de raíces presuntamente transformadas de cactáceas mexicanas en medio MS solido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan a 26°C, en la obscuridad.

Se eligieron 12 especies, de las cuales se tomaron 7 explantes de cada una de ellas, y se incubaron a 26°C en la obscuridad.

Clave	Especie	n	Numero de Raíces por Explante (Media ± Desviación Estándar)	Longitud de Raíz (mm) (Media ± Desviación Estándar)
67	<i>Echinocactus grusonii</i>	7	19.29 ± 11.97	3.6 ± 3.9
152	<i>Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)</i>	7	13.57 ± 14.37	5.0 ± 5.5
165	<i>Ferocactus peninsulae</i>	7	15.86 ± 20.47	9.1 ± 7.9
32	<i>Ferocactus flavovirens</i>	7	7.14 ± 5.08	2.3 ± 1.6
34	<i>Leuchtenbergia principis</i>	7	4.86 ± 2.91	4.3 ± 2.1
154	<i>Opuntia amyoclea</i>	7	2.14 ± 2.19	7.8 ± 3.5
29	<i>Stenocereus thurberi var thurberi</i>	7	6.43 ± 4.61	3.7 ± 2.8
75	<i>Turbincarpus schmidickeanus var schmidickeanus</i>	7	8.71 ± 5.96	2.8 ± 1.6
123	<i>Turbincarpus schmidickeanus var schwarzii</i>	7	7.29 ± 8.10	3.6 ± 3.0
63	<i>Turbincarpus laui</i>	7	3.71 ± 2.06	2.9 ± 1.9
62	<i>Turbincarpus schmidickeanus var klinkerianus</i>	7	4.0 ± 1.73	2.4 ± 1.6
99	<i>Turbincarpus subterraneus (Gymnocactus subterraneus)</i>	7	5.14 ± 4.56	4.4 ± 3.1

Tabla 3 Respuesta de 12 especies de cactáceas mexicanas a la infección por *Agrobacterium rhizogenes* A4. Todos los parámetros se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días en medio MS solido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan. La media del número de raíces por Explante se calculo dividiendo el número de raíces totales entre los explantes que generaron raíz, se muestra la desviación estándar del número de raíces por explante. La longitud de raíz con su media y desviación estándar se determino teniendo en cuenta que no todas las raíces tienen el mismo tiempo de crecimiento, puesto algunas raíces salieron al inicio y otras al final del tratamiento.

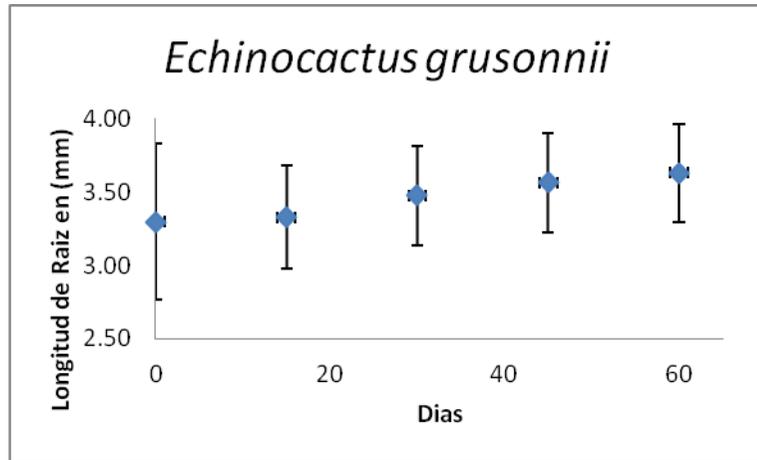
A partir de los datos que se muestra en la (Tabla 3), las especies que mostraron una mejor respuesta en un mayor número de raíces por explante son: *Echinocactus grusonii*, *Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)*, *Ferocactus peninsulae* y *Turbincarpus schmidickeanus var schmidickeanus*, como también mostraron una mayor longitud de la raíz en (mm) a excepción de *Turbincarpus schmidickeanus var*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

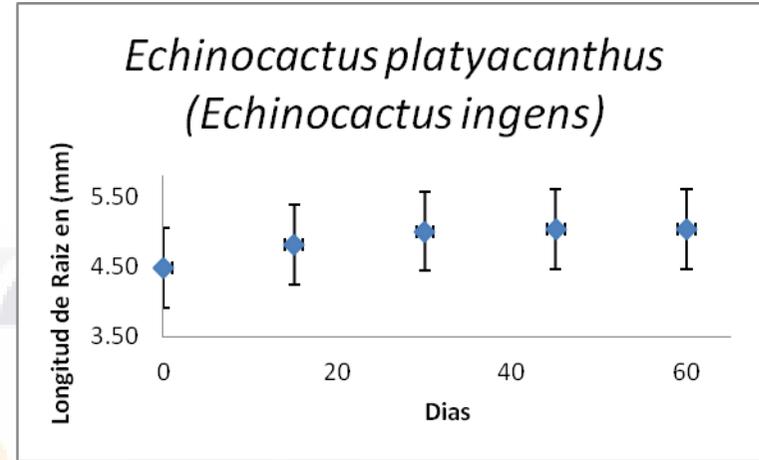
schmiedickeanus. A pesar que mostraron buenos resultados, el final del tratamiento en este sistema donde la variable fue la temperatura (26°C) se observó que la mayoría de los explantes mostraban un ligero color café, indicando la iniciación de necrosis en el tejido vegetal del explante.

Observando las Gráficas de la 77 a la 88, el mayor crecimiento se da en los primeros 30 días de incubación, tal como se muestra en los dos sistemas de cultivo anteriores, mientras que el crecimiento del día 30 al día 60 fue mucho más lento hasta cesar por completo. Es importante destacar que el error estándar que presenta la mayoría de las gráficas (de la 77 a la 88) es muy grande, éste nos permite medir la variabilidad de dispersión de los valores los cuales encontramos en la muestra, como es el número de raíces por explante y la longitud de la raíz, es común que el error estándar sea muy grande puesto que estamos hablando de organismo vivos y por tanto cada uno de los explantes se comporta de manera diferente ya que cada uno es un evento diferente a pesar de encontrarse en las mismas condiciones.

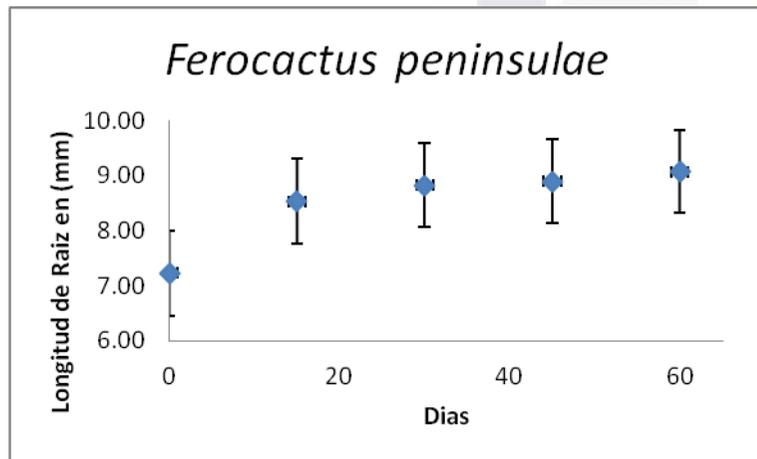




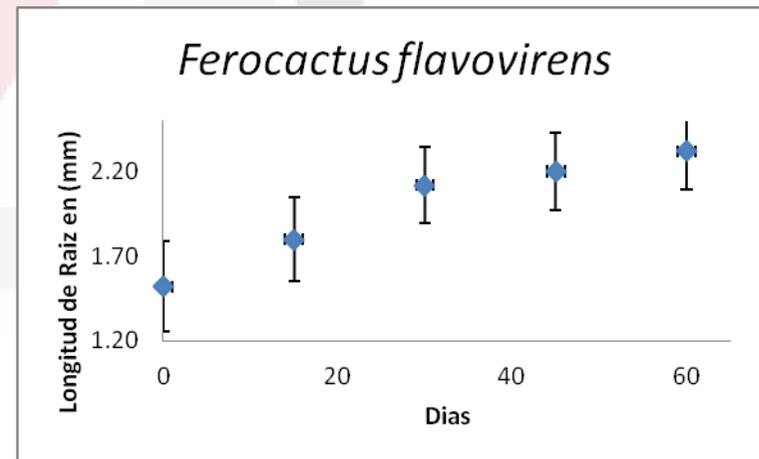
Grafica 77. Curva de Crecimiento para la Especie *Echinocactus grusonii*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en la obscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



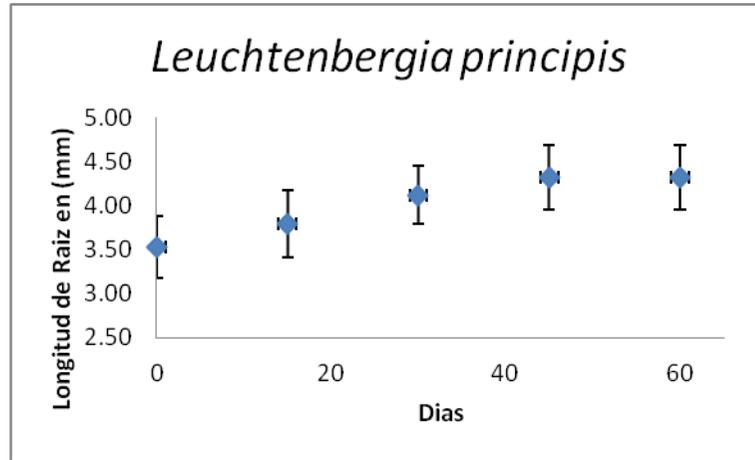
Grafica 78. Curva de Crecimiento para la Especie *Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en la obscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



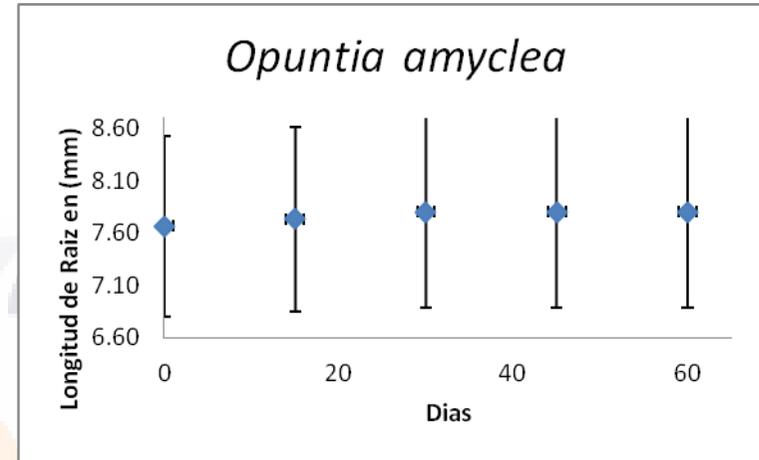
Grafica 79. Curva de Crecimiento para la Especie *Ferocactus peninsulae*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en la obscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



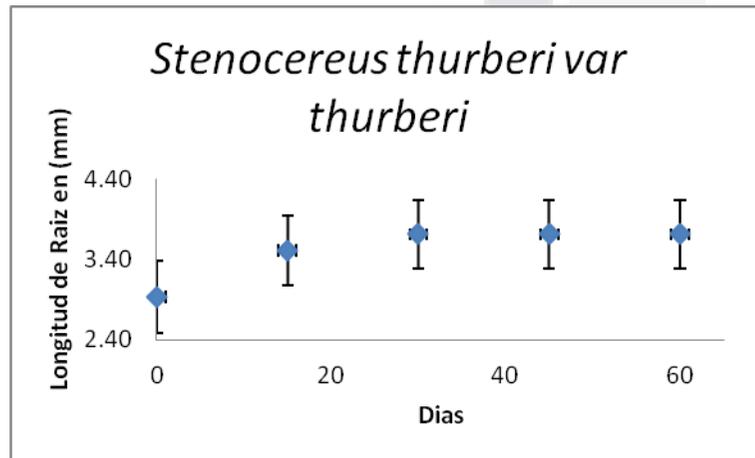
Grafica 80. Curva de Crecimiento para la Especie *Ferocactus flavovirens*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en la obscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



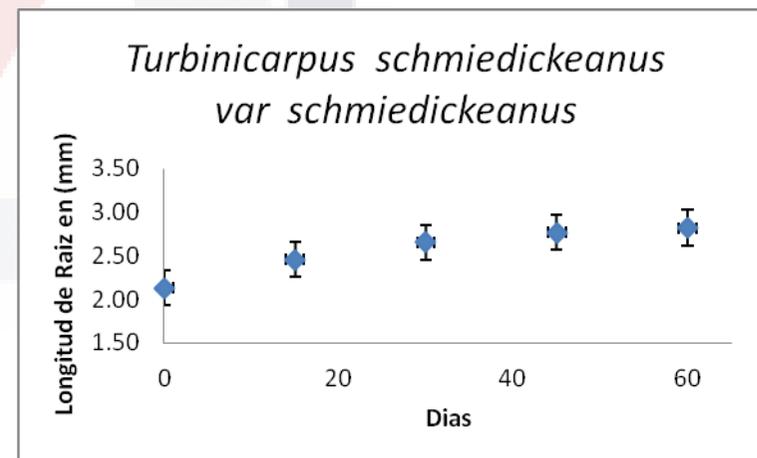
Grafica 81. Curva de Crecimiento para la Especie *Leuchtenbergia principis*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en la obscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



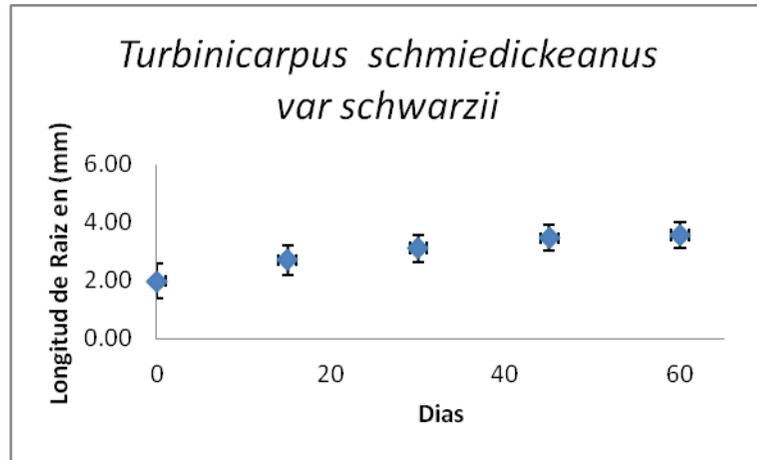
Grafica 82. Curva de Crecimiento para la Especie *Opuntis amyclea*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en la obscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



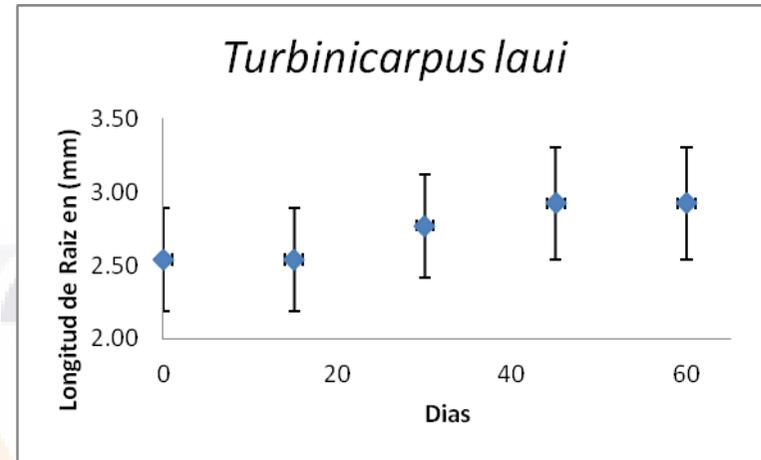
Grafica 83. Curva de Crecimiento para la Especie *Stenocereus thurberi var thurberi*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en la obscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



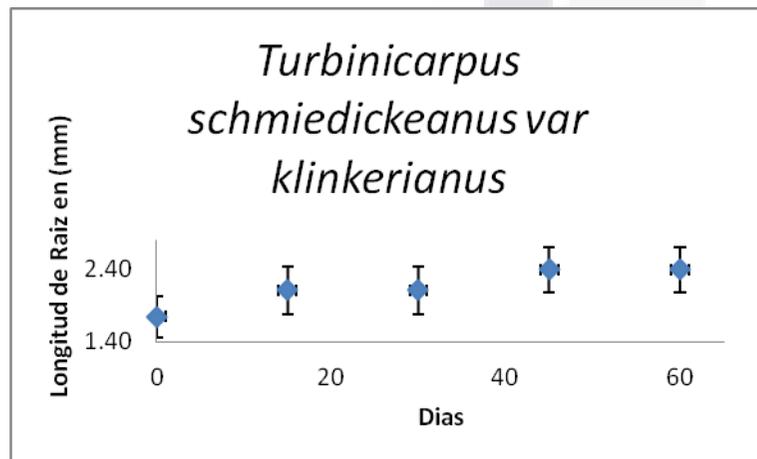
Grafica 84. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus schmiedickeanus var schmiedickeanus*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en la obscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



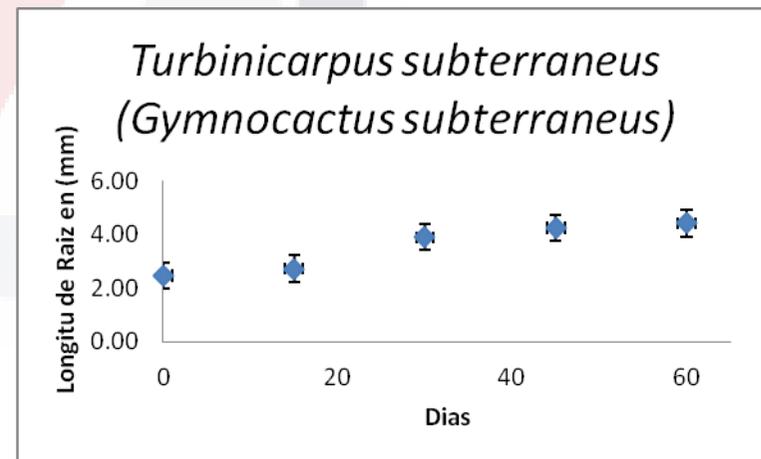
Grafica 85. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus schmidickeanus var schwarzii*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en la obscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



Grafica 86. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus laui*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en la obscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



Grafica 87. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus schmidickeanus var klinkerianus*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en la obscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



Grafica 88. Curva de Crecimiento para la Especie *Turbinicarpus subterraneus (Gymnocactus subterraneus)*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan, a 26°C en la obscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.

V.7 Curvas de Crecimiento de raíces presuntamente transformadas de cactáceas mexicanas en medio MS solido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan a 20°C, en la obscuridad, así como la adición de diferentes compuestos orgánicos.

Se eligieron 3 especies que respondieron de manera positiva a la infección por *Agrobacterium rhizogenes*, de las cuales se tomaron 7 explantes de cada una de ellas, éstas se sembraron en medio MS con diferentes compuestos orgánicos (Extracto de levadura, Hidrolizado de caseína y Agua de coco), en la obscuridad a 20°C.

Clave	Especie	N	Numero de Raíces por Explante (Media ± Desviación Estándar)	Longitud de Raíz (mm) (Media ± Desviación Estándar)
Extracto de Malta				
67	<i>Echinocactus grusonii</i>	7	4.71 ± 3.77	2.3 ± 1.0
165	<i>Ferocactus peninsulæ</i>	7	13.57 ± 9.71	4.9 ± 4.8
29	<i>Stenocereus thurberi var thurberi</i>	7	8.14 ± 3.34	4.1 ± 3.5
Hidrolizado de Caseína				
67	<i>Echinocactus grusonii</i>	7	14.14 ± 14.16	2.6 ± 1.5
165	<i>Ferocactus peninsulæ</i>	7	14.29 ± 11.91	4.6 ± 5.2
29	<i>Stenocereus thurberi var thurberi</i>	7	12.57 ± 7.93	8.7 ± 7.6
Agua de Coco				
67	<i>Echinocactus grusonii</i>	7	11.71 ± 6.58	2.5 ± 1.4
165	<i>Ferocactus peninsulæ</i>	7	11.71 ± 13.23	7.1 ± 5.3
29	<i>Stenocereus thurberi var thurberi</i>	7	6.57 ± 3.41	7.0 ± 5.7

Tabla 4 Respuesta de 12 especies de cactáceas mexicanas a la infección por *Agrobacterium rhizogenes* A4. Todos los parámetros se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días en medio MS solido con 50 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de Claforan. La media del número de raíces por Explante se calculo dividiendo el número de raíces totales entre los explantes que generaron raíz, se muestra la desviación estándar del número de raíces por explante. La longitud de raíz con su media y desviación estándar se determino teniendo en cuenta que no todas las raíces tienen el mismo tiempo de crecimiento, puesto algunas raíces salieron al inicio y otras al final del tratamiento.

En ocasiones se utilizan mezclas orgánicas complejas en los medios de cultivo, ya que se ha visto que éstas en algunos casos estimulan el crecimiento de los tejidos.

El efecto de los complejos orgánicos se debe a la presencia en ellos de micronutrientes, fitohormonas y quizá sustancias no identificadas, pero requeridas por los tejidos.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

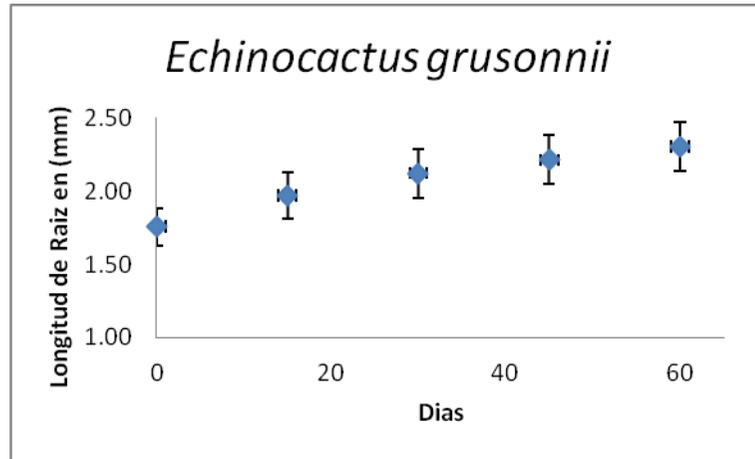
Se utilizan el agua de coco, el extracto de levadura y de malta, el endospermo de maíz, el jugo de tomate, de naranja y piña, y el extracto de plátano, entre otros.

En este sistema de cultivo se adiciono tres compuestos orgánicos para ver si estos compuestos ayudaban al crecimiento de las raíces. Se eligió el agua de coco así como el extracto de levadura ya que se ha visto que estimulan el crecimiento de los tejidos, así como el hidrolizado de caseína que sirve como fuente de nitrógeno orgánico además del nitrógeno inorgánico que se adiciona en el medio MS.

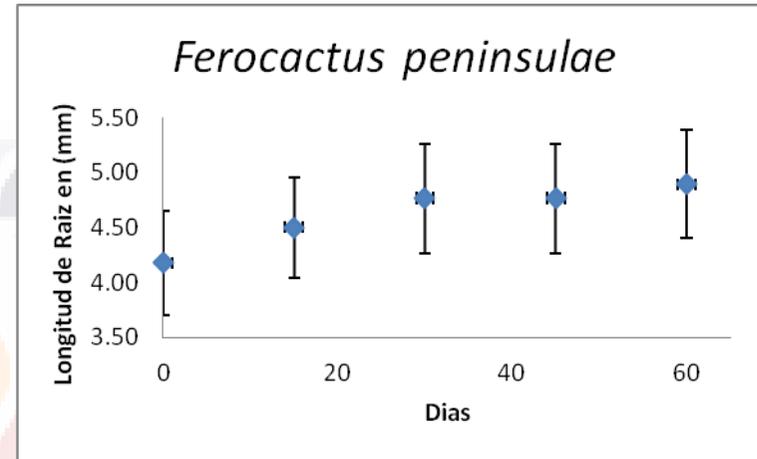
En el caso de los explantes este sistema no ayudo a incrementar el crecimiento de las raíces, a pesar de esto al hacer un comparativo de los tres compuestos orgánicos el mejor para el crecimiento de las raíces es el hidrolizado de caseína ya que tanto el número de raíces por explante fue mayor así como la longitud de raíz fue la mejor para las tres especies seleccionadas (*Echinocactus grusonii*, *Ferocactus peninsulæ*, *Stenocereus thurberi var thurberi*).

Al igual que los otros sistemas de cultivos ya mencionados, el crecimiento se da durante los primeros 30 días, posteriormente el crecimiento fue mucho más lento hasta cesar por completo a los 60 días de incubación.

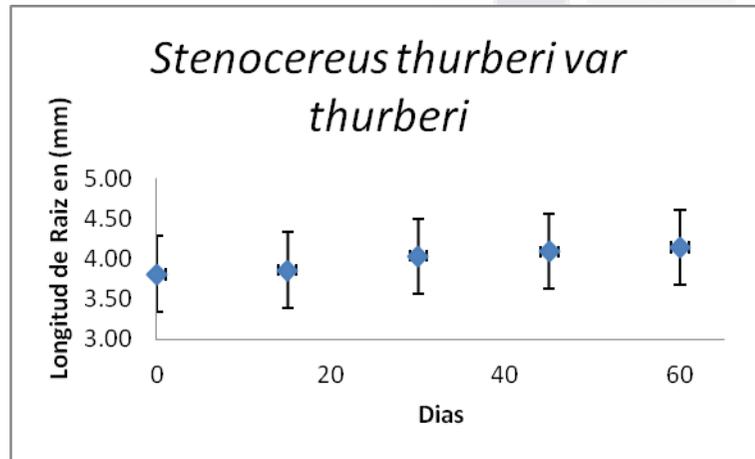
Extracto de Malta



Grafica 89. Curva de Crecimiento para la Especie *Echinocactus grusonii*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina, 250 mg/L de Claforan y Extracto de malta, a 26°C en la oscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.

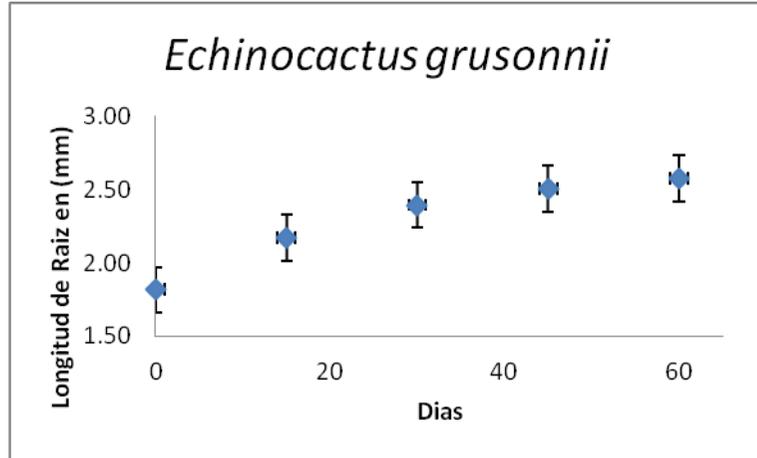


Grafica 90. Curva de Crecimiento para la Especie *Ferocactus peninsulae*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina, 250 mg/L de Claforan y Extracto de malta, a 26°C en la oscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.

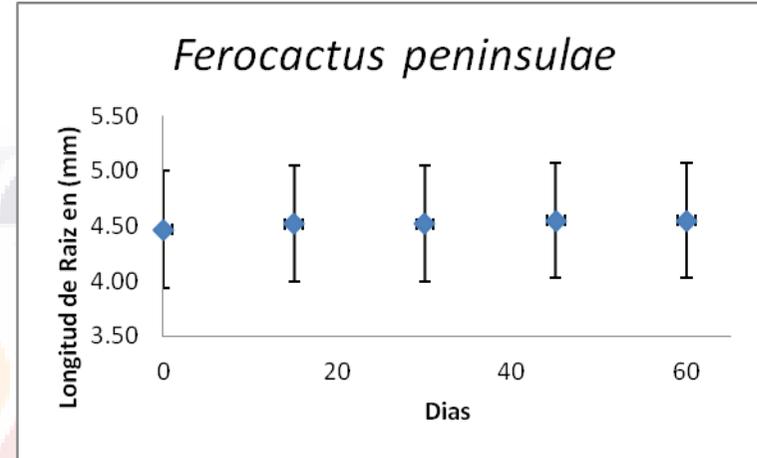


Grafica 91. Curva de Crecimiento para la Especie *Stenocereus thurberi var thurberi*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina, 250 mg/L de Claforan y Extracto de malta, a 26°C en la oscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.

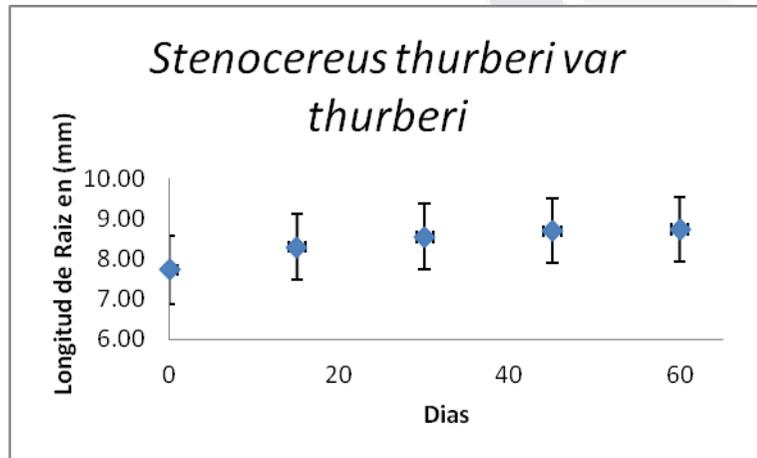
Hidrolizado de caseína



Grafica 92. Curva de Crecimiento para la Especie *Echinocactus grusonii*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina, 250 mg/L de Claforan e hidrolizado de caseína, a 26°C en la obscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.

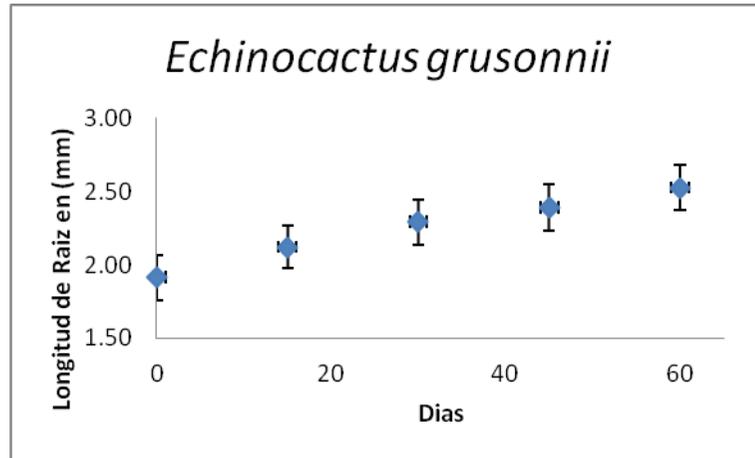


Grafica 93. Curva de Crecimiento para la Especie *Ferocactus peninsulae*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina, 250 mg/L de Claforan e hidrolizado de caseína, a 26°C en la obscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.

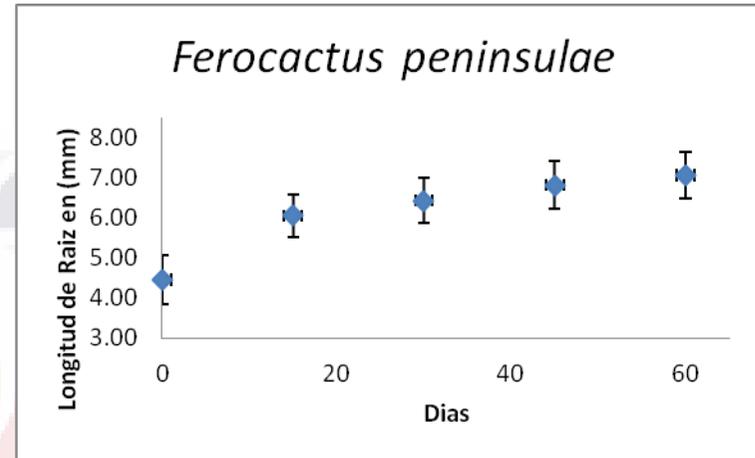


Grafica 94. Curva de Crecimiento para la Especie *Stenocereus thurberi var thurberi*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina, 250 mg/L de Claforan e hidrolizado de caseína, a 26°C en la obscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.

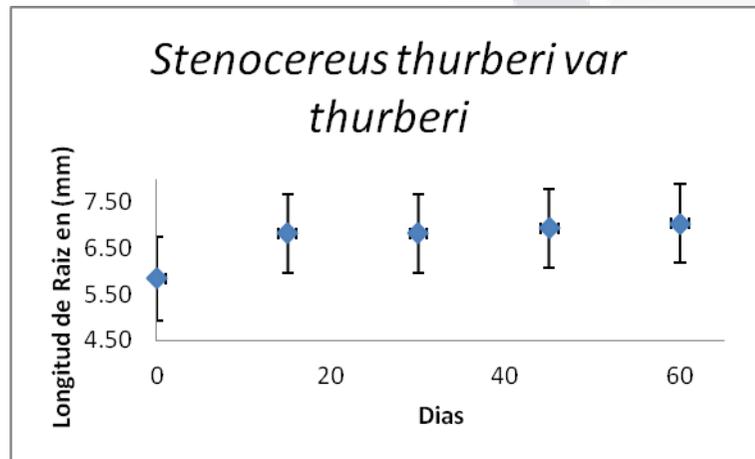
Agua de Coco



Grafica 95. Curva de Crecimiento para la Especie *Echinocactus grusonii*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina, 250 mg/L de Claforan y Agua de Coco, a 26°C en la oscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



Grafica 96. Curva de Crecimiento para la Especie *Ferocactus peninsulae*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina, 250 mg/L de Claforan y Agua de Coco, a 26°C en la oscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.



Grafica 97. Curva de Crecimiento para la Especie *Stenocereus thurberi var thurberi*, los explantes se encontraban en medio MS sólido con 50 mg/L de kanamicina, 250 mg/L de Claforan y Agua de Coco, a 26°C en la oscuridad y se midieron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días posterior a la infección con *Agrobacterium rhizogenes A4*, media \pm error estándar.

V.8 Especies de cactáceas mexicanas presuntamente transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* en el Método Convencional.

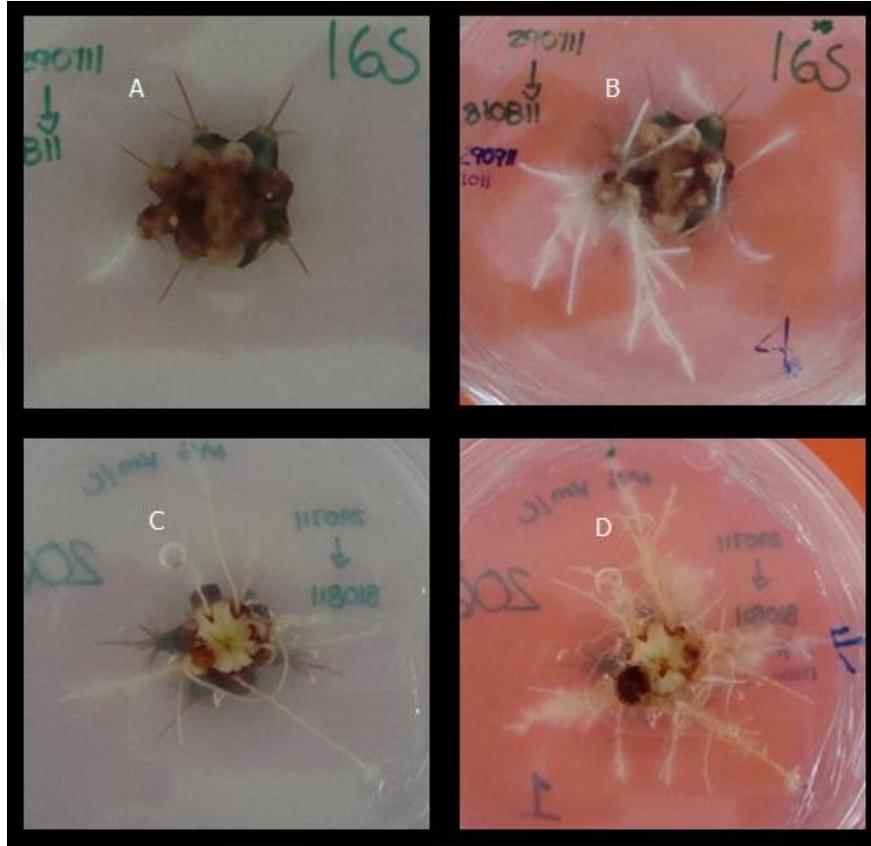


Fig. 9 Muestra el crecimiento de raíces pilosas a los 15 días después de la generación de raíz en cada explante; *Ferocactus peninsulaea* (A), *Ferocactus rectispinus* (C) y a los 45 días; *Ferocactus peninsulaea* (B), *Ferocactus rectispinus* (D), infectados con *A. rhizogenes*.

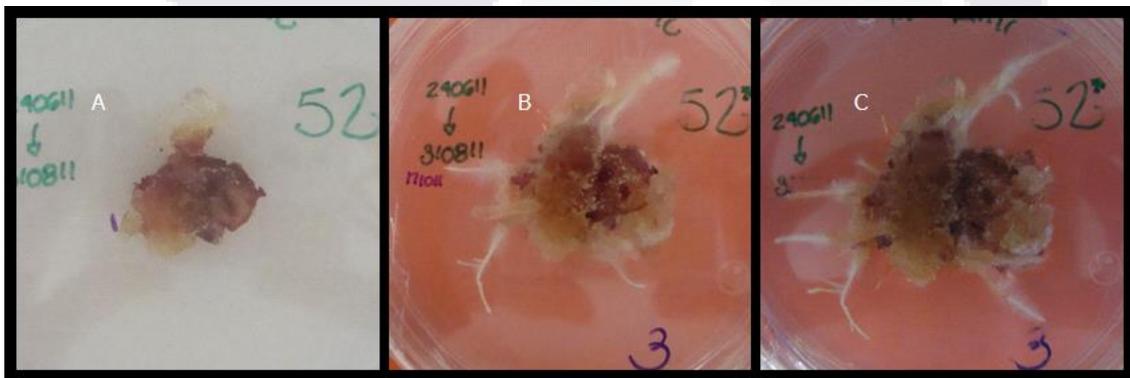


Fig. 10 Muestra el crecimiento de raíces pilosas infectadas por *A. rhizogenes* A4 ; *Turbinicarpus lophophoroides* a los 15 días de la generación de raíces(A); *Turbinicarpus lophophoroides* a los 45 días de generación de raíces (B); *Turbinicarpus lophophoroides* a los 60 días de la generación de raíces (C)



Fig. 11 Muestra el crecimiento de raíces pilosas a los 15 días después de la generación de raíz en cada explante; *Stenocereus thurberi var thurberi* (A), *Neobuxbaumia tetetzo* (C), *Echinocactus platyacanthus* (*Echinocactus ingens*) (E) y a los 45 días; *Stenocereus thurberi var thurberi* (B), *Neobuxbaumia tetetzo* (D), *Echinocactus platyacanthus* (*Echinocactus ingens*) (F).



Fig. 12 Muestra el crecimiento de raíces pilosas a los 60 días después de la generación de raíz en diferentes especies, las imágenes se tomaron con ayuda de un Estereoscopio; *Ferocactus peninsulae* (A, B y C); *Turbinicarpus lophophoroides* (D, E y F); *Ferocactus rectispinus* (G, H, e I); *Stenocereus thurberi var thurberi* (J, K y L); *Neobuxbaumia tetetzo* (M, N y O); *Echinocactus grusonii* (P y Q); *Opuntia amyaclea* (R).

En las Figuras 9, 10 y 11 se muestra el crecimiento de raíces presuntamente transformadas de diferentes especies al inicio y en la fase final del tratamiento, donde se puede apreciar el crecimiento de dichas raíces con profusión de pelos radicales en las raíces, característico de la enfermedad de la raíz pilosa que es propia de la infección con *Agrobacterium rhizogenes*. En la Figura 12 se muestra con más claridad (imágenes tomadas con un estereoscopio) el cómo se desarrollan los pelos radicales en la raíz que le sirven para una mejor absorción de los nutrientes presentes en el medio.

Las raíces formadas tienen un origen clónico; cada raíz se desarrolla generalmente a partir de una única célula vegetal transformada (Tempé y Casse-Delbart, 1989). Esto hace que los clones de raíces transformadas iniciados usando el mismo material y tecnología, en distintos sitios de infección presenten diferencias en su morfología, en la tasa de crecimiento y hasta en los perfiles y concentraciones de metabolitos secundarios (Mano *et al.*, 1989; Bourgaud *et al.*, 1997). Por ello cada una de las especies de cactáceas que se sometieron a infección con *A. rhizogenes*, la generación de raíces fue muy variable ya que no todas las raíces presentaban la misma morfología.

V.9 Especies de Cactáceas mexicanas presuntamente transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* en Condiciones de Luz

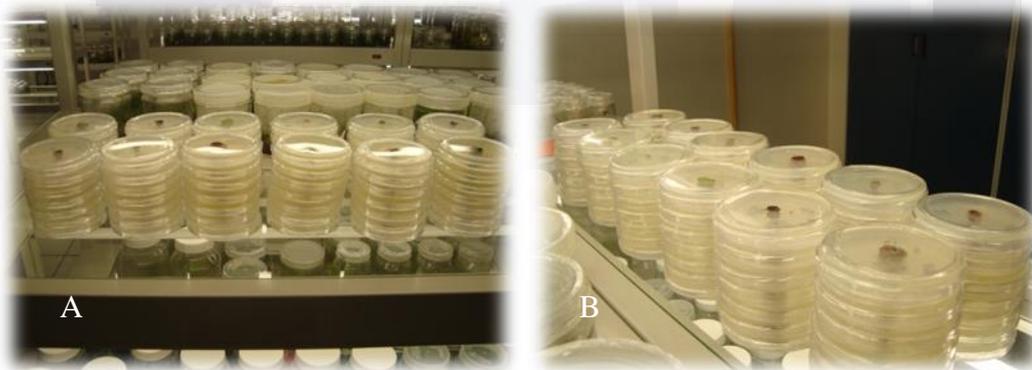


Fig. 13 Tratamiento en donde se prueban las condiciones de luz para 12 especies diferentes de cactáceas mexicanas, para ver el crecimiento de las raíces pilosas a 26°C con fotoperiodos de 12hrs.

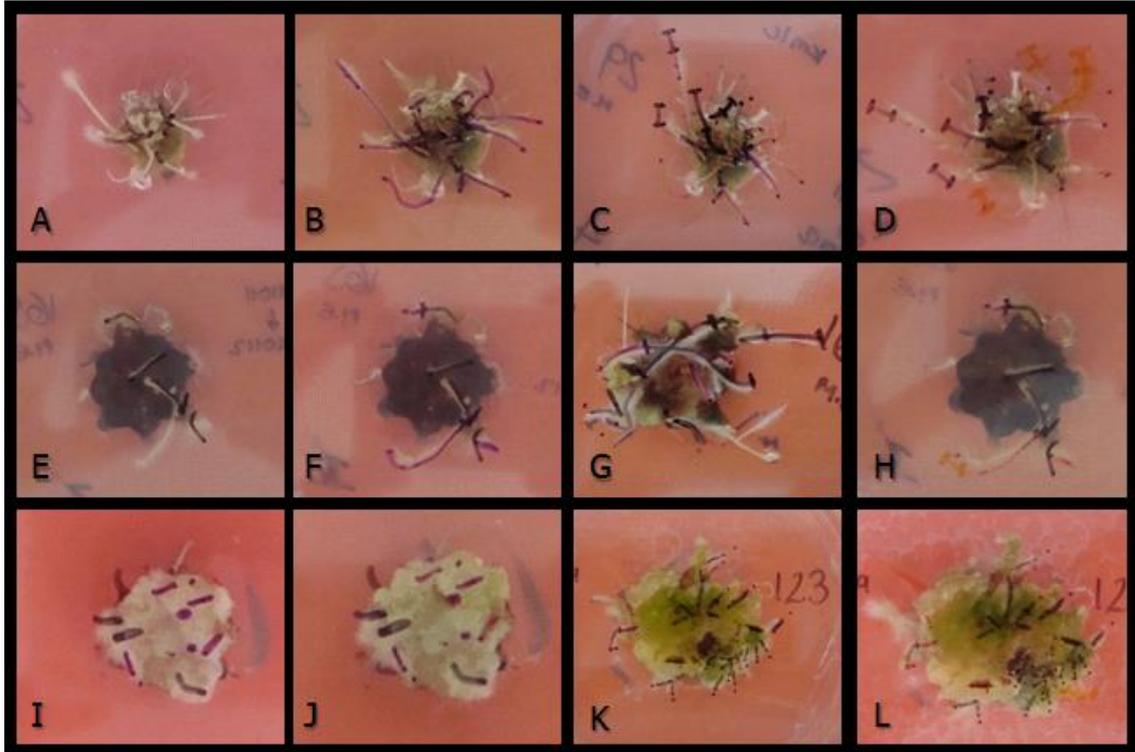


Fig. 14 Muestra el crecimiento de raíces pilosas a los 0, 15, 30 Y 45 días después de la generación de raíz en cada explante; *Stenocereus thurberi* var *thurberi* (A, B, C, D), *Ferocactus peninsulae* (E, F G, H), *Turbinicarpus schmidickeanus* var *schwarzii* (I, J, K, L)



Fig. 15 Crecimiento de raíces pilosas y cambio de color en las mismas por exposición a la luz; *Turbinicarpus schmidickeanus* var *klinkerianus* (A), *Turbinicarpus laui* (B), *Echinocactus platyacanthus* (C).

En este sistema de cultivo, se pueden hacer varias observaciones, ya que el crecimiento fue favorable para casi todas las especies que se eligieron para este tratamiento donde las variables como la temperatura (26°C) y luz (fotoperiodos de 12). Al comienzo del tratamiento las raíces comenzaron a crecer muy rápidamente, así como hubo un cambio de coloración de las raíces donde de ser blancas pasaron a tomar un color verde y el algunas de ellas color rojizo como se muestra en la Figura 15, y la formación de tejido calloso con la producción de betalainas.

V.10 Especies de Cactáceas mexicanas presuntamente transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* en Medio Líquido

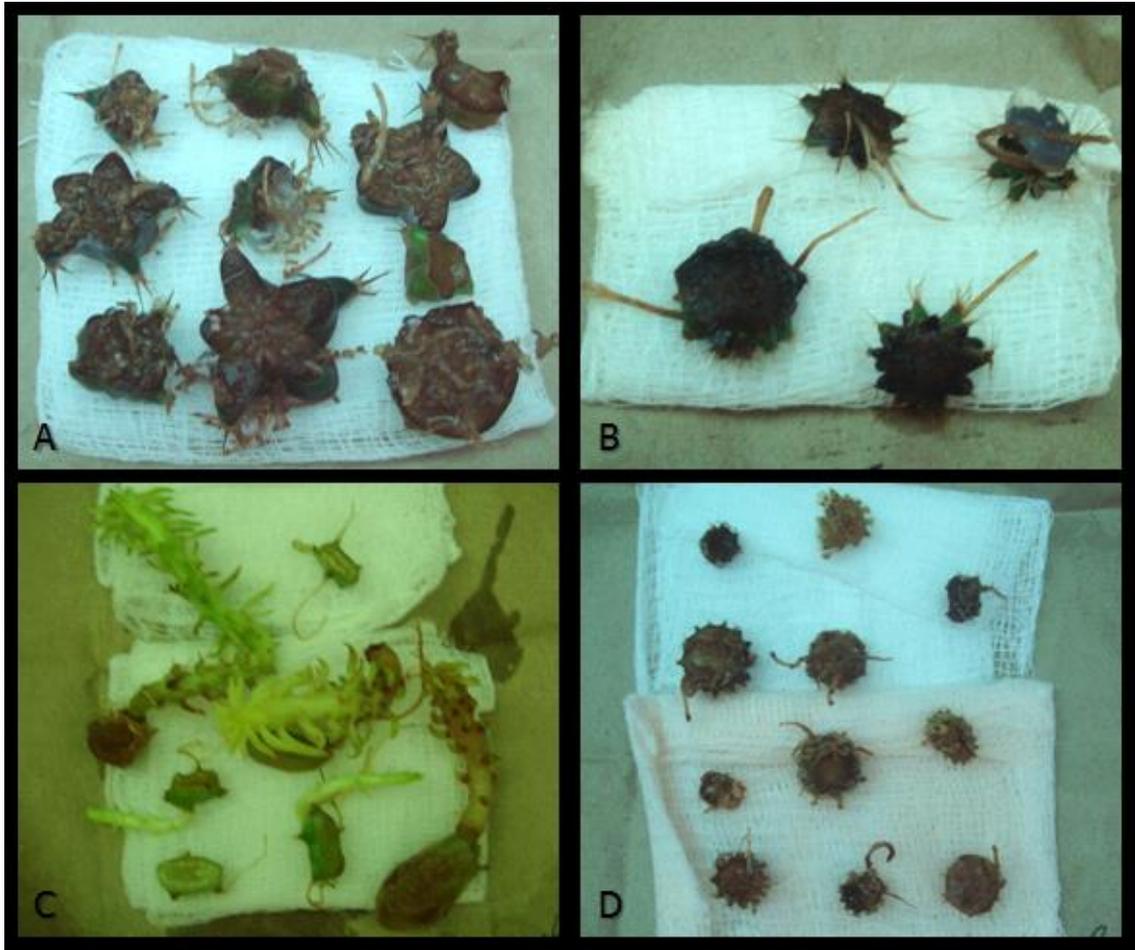
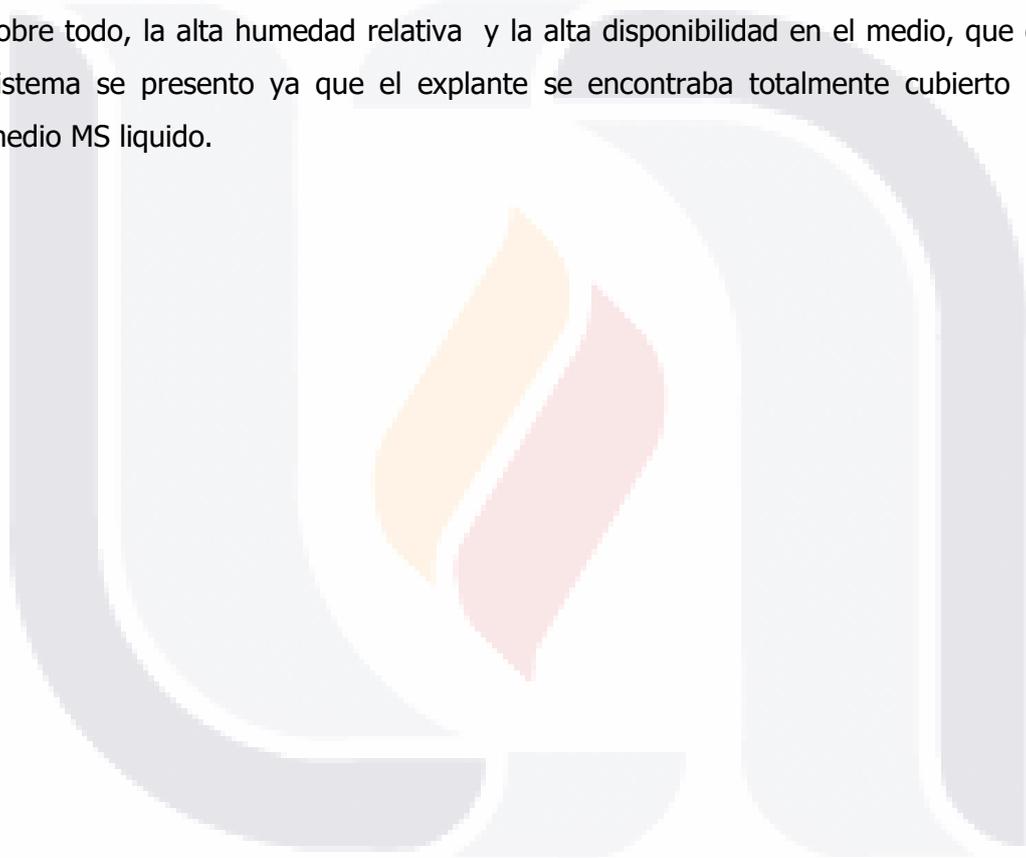


Fig. 16 Muestra el crecimiento de raíces pilosas a los 90 días de que se pasaron a Medio Líquido con 250 gr/L de Claforan a 20°C en la obscuridad; *Echinocactus platyacanthus* (*Echinocactus ingens*) (A), *Neobuxbaumia tetetzo* (B), *Opuntia amyoclea* (C), *Turbinicarpus laui* (D).



Fig. 17 Muestra el material para determinar el peso de cada explante en condiciones estériles (A), y los frascos con medio MS líquido con los explantes en el interior de cada uno de los frascos (B).

En el sistema de cultivo líquido se observa en la Figura 16, la vitrificación de algunos de los explantes (D), la producción de brotes (C), así como el ennegrecimiento tisular causado por la oxidación de polifenoles presentes en los explantes. Este ennegrecimiento causa la muerte de los mismos, por tal motivo al terminar el tratamiento se desecharon varios explantes que presentaron necrosis. Considerando un tratamiento no eficiente para la generación y producción de raíces transformadas. La vitrificación del tejido se debe a una serie de desórdenes anatómicos, morfológicos y fisiológicos originados por las condiciones del cultivo que normalmente las causas son: el exceso de nutrientes, el exceso de carbohidratos, la baja intensidad luminosa, y sobre todo, la alta humedad relativa y la alta disponibilidad en el medio, que en este sistema se presentó ya que el explante se encontraba totalmente cubierto por el medio MS líquido.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

V.11 Especies de Cactáceas mexicanas presuntamente transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* en condiciones de incubación (Temperatura)

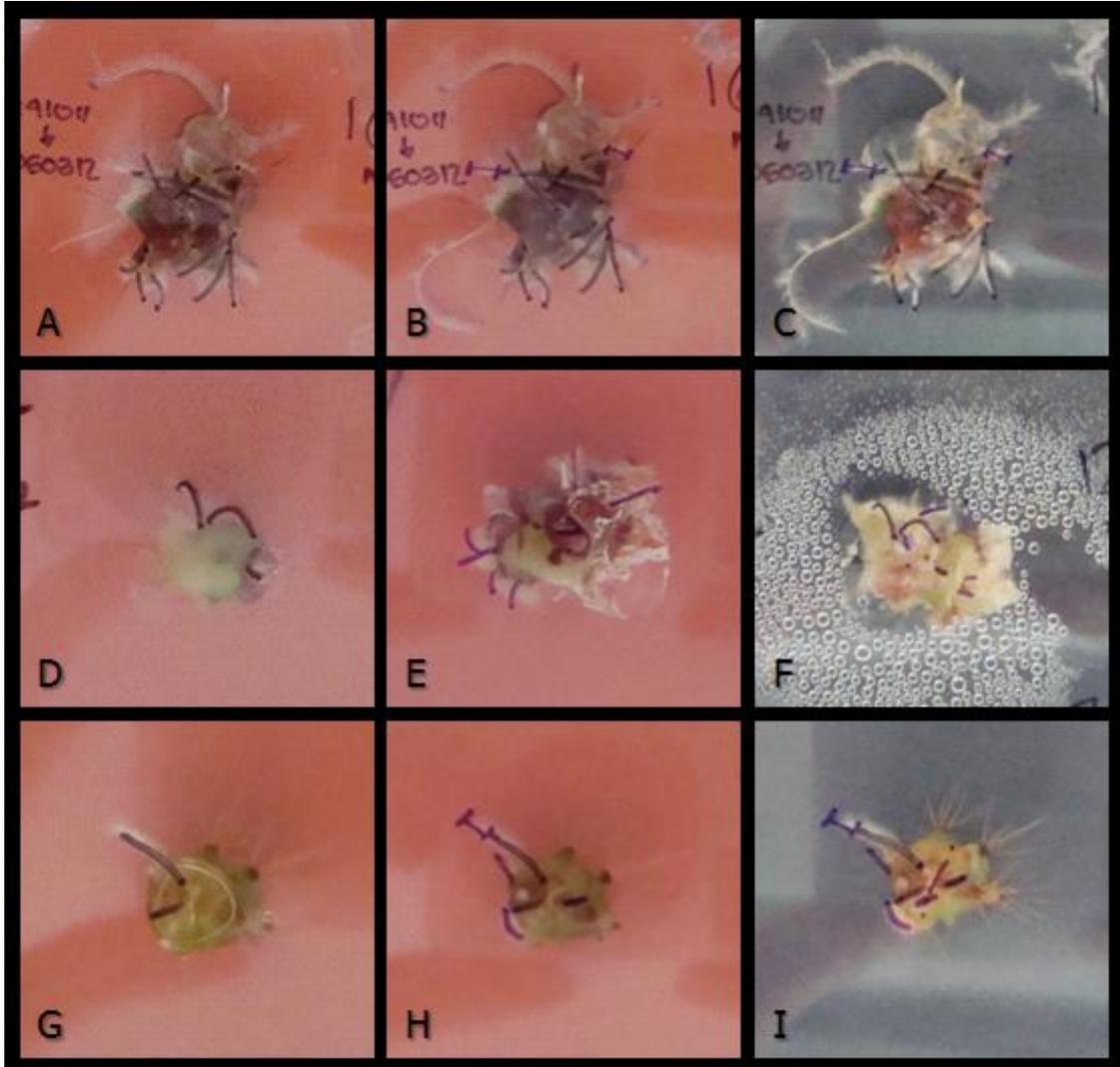


Fig. 18 Muestra el crecimiento de raíces pilosas a los 15, 30 Y 45 días después de la generación de raíz en cada explante a 26°C en la oscuridad; *Ferocactus peninsulae* (A, B, C), *Turbinicarpus schmidickeanus var schwarzii* (D, E, F), *Stenocereus thurberi var thurberi* (G, H, I)

El tratamiento donde la variable fue la temperatura, los resultados no fueron los esperados puesto que en sistema de cultivo donde la variable fue la luz a 26°C se observo un buen crecimiento, así como en el método convencional a 20°C en la oscuridad, donde también se observaron resultados positivos, en este caso no paso lo mismo ya que el crecimiento fue demasiado lento y se presento ennegrecimiento tisular a causa de la oxidacion por polifenoles al igual que en el sistema líquido.

V.12 Especies de Cactáceas mexicanas presuntamente transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* en Medio adicionado con Compuestos Orgánicos

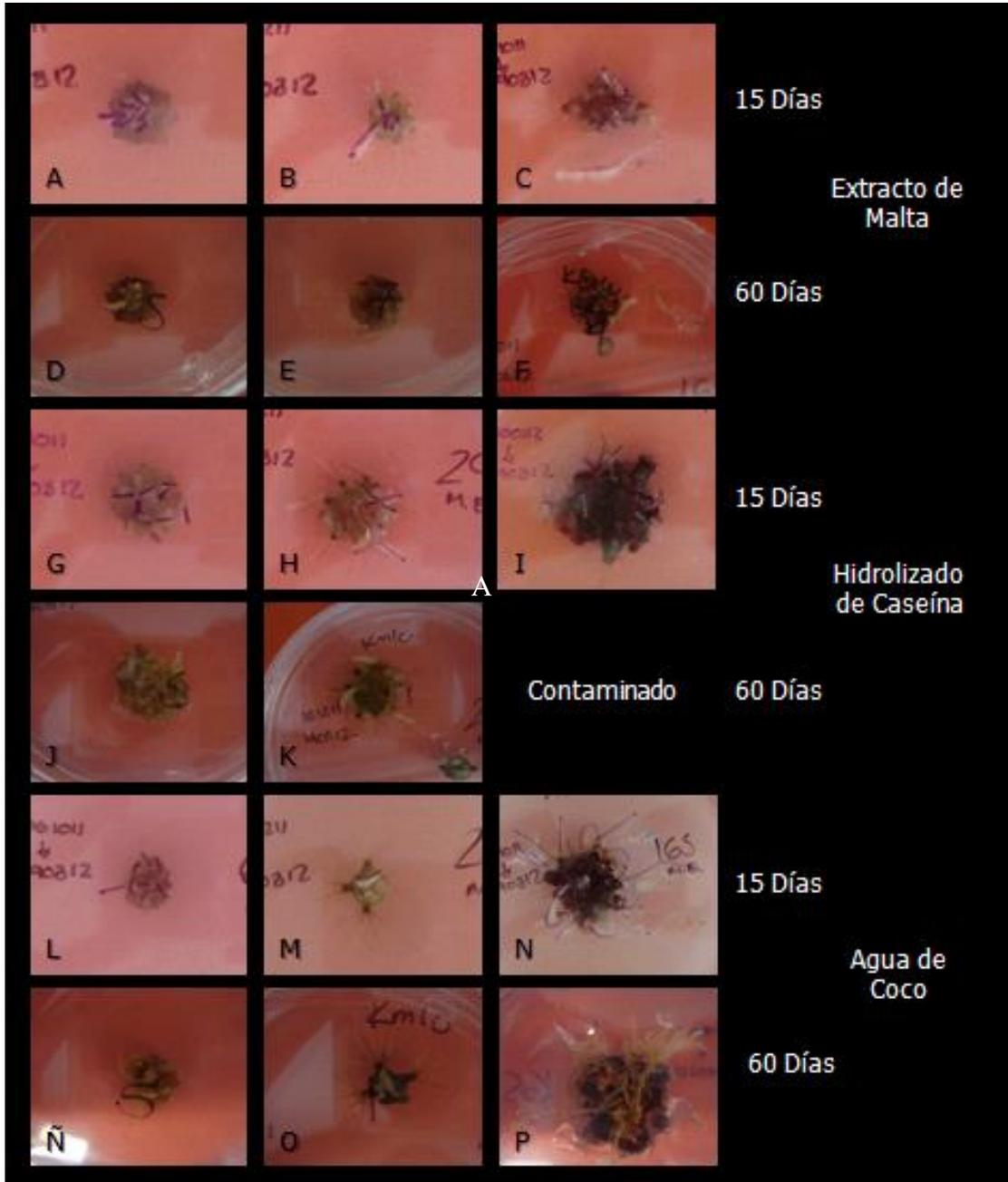


Fig. 19 Muestra el crecimiento de raíces pilosas a los 15, y 60 días después de la generación de raíz a 20°C en la obscuridad; Medio MS con Extracto de Malta a los 15 Días *Echinocactus grusonii*, *Ferocactus peninsulæ*, *Stenocereus thurberi* var *thurberi* (A, B, C); Medio MS con Extracto de Malta a los 60 Días *Echinocactus grusonii*, *Ferocactus peninsulæ*, *Stenocereus thurberi* var *thurberi* (D, E, F); Medio MS con Hidrolizado de Caseína a los 15 Días *Echinocactus grusonii*, *Ferocactus peninsulæ*, *Stenocereus thurberi* var *thurberi* (G, H, I); Medio MS con Hidrolizado de Caseína a los 60 Días *Echinocactus grusonii*, *Ferocactus peninsulæ* (J, K); Medio MS con Agua de Coco a los 15 Días *Echinocactus grusonii*, *Ferocactus peninsulæ*, *Stenocereus thurberi* var *thurberi* (L, M, N); Medio MS con Agua de Coco a los 60 Días *Echinocactus grusonii*, *Ferocactus peninsulæ*, *Stenocereus thurberi* var *thurberi* (Ñ, O, P);

V.13 Pruebas Histoquímicas de la β -glucuronidasa GUS

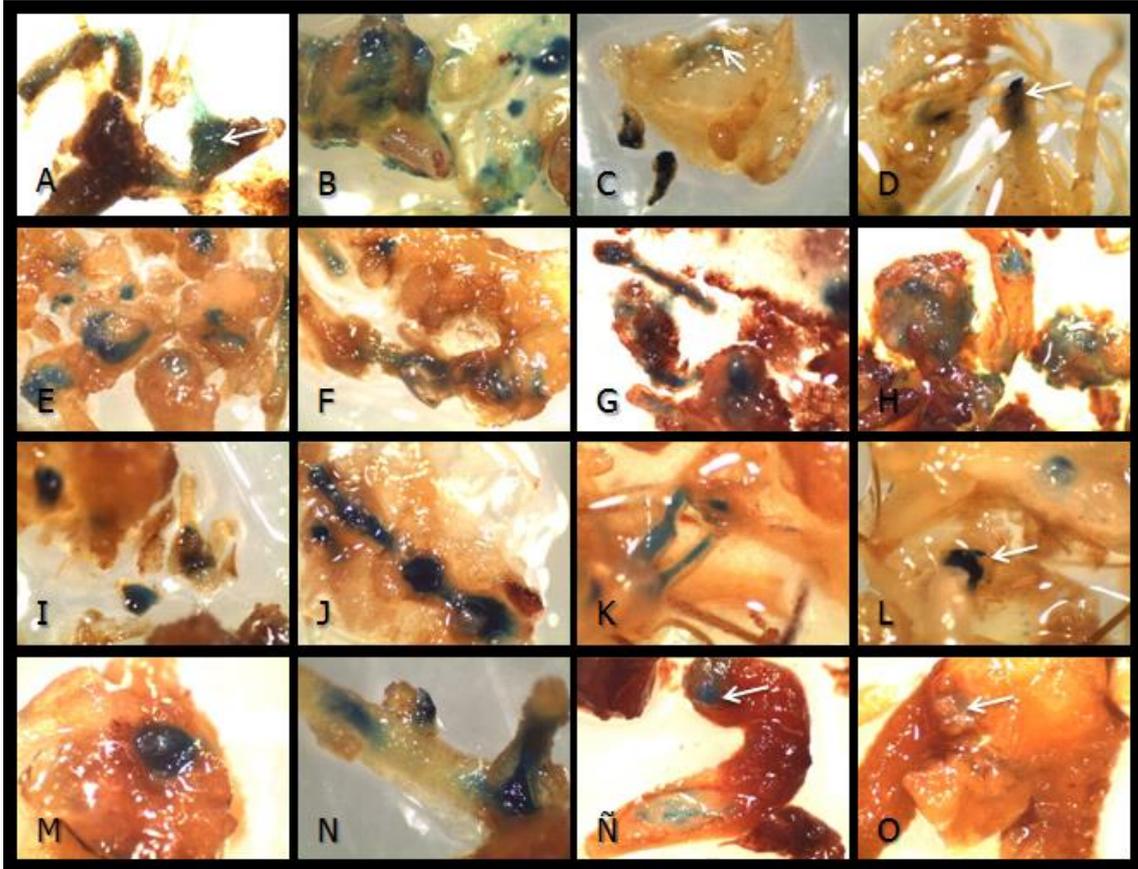


Fig. 20 Raíces transgénicas positivas a la reacción de la β -glucuronidasa (GUS). Se transformaron cactáceas de varias especies mediante *Agrobacterium rhizogenes* cepa A4/pESC4, con dos meses en oscuridad, y después se colocaron los explantes con raíz en luz por una semana, posteriormente se realizó la prueba de GUS en todas las raíces. Se observa evidentemente, la transformación por la coloración azul; *Acharagma aguirreana* (A), *Ariocarpus kotschoubeyanus* (B), *Astrophytum híbrido myriostigma x ornatum* (C), *Echinocactus platyacanthus* (D), *Echinocactus grusonii* (E), *Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)* (F), *Epithelantha micromeris* (G), *Escobaria chaffeyi (E. dasyacantha subsp. chaffeyi)* (H), *Ferocactus glaucescens* (I), *Ferocactus peninsulae* (J), *Ferocactus cylindraceus var cylindraceus* (K), *Ferocactus flavovirens* (L), *Ferocactus rectispinus* (M), *Leuchtenbergia principis* (N), *Lophophora williamsii (Lophophora fricsii)* (Ñ), *Neobuxbaumia tetetzo* (O)

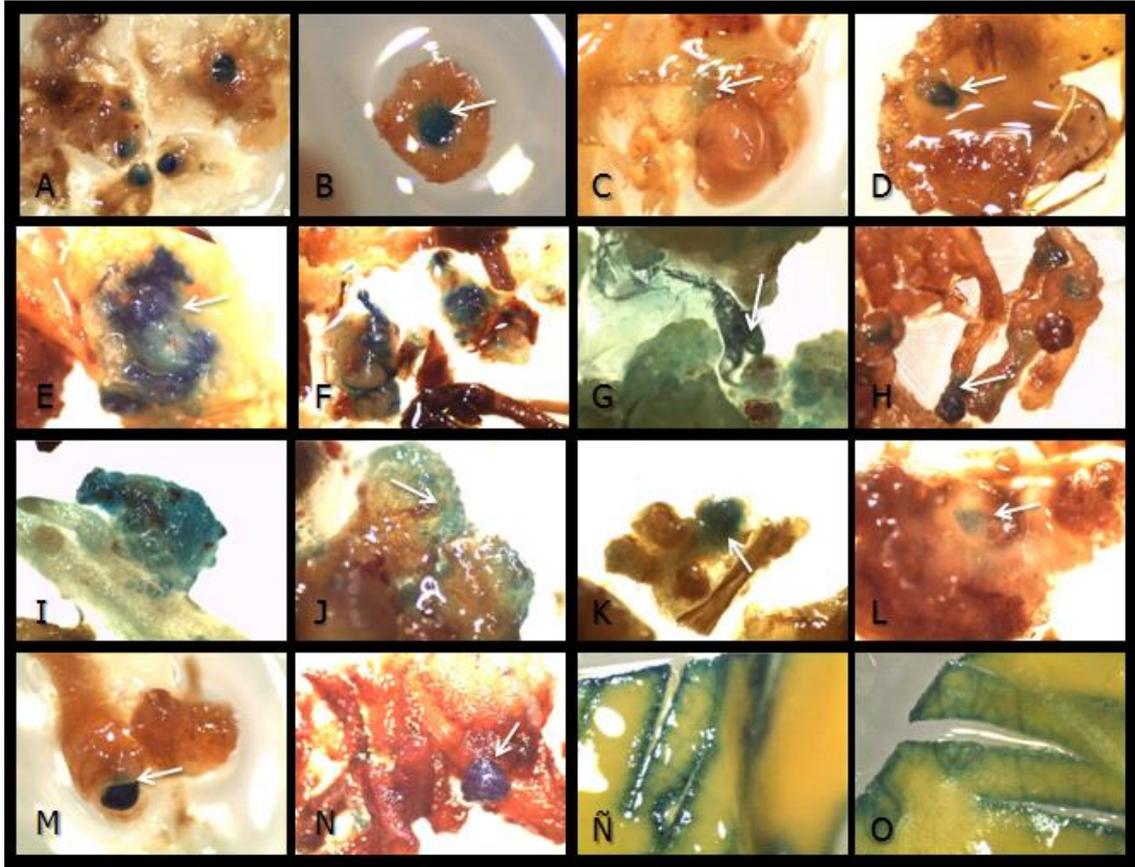


Fig. 21 Raíces transgénicas positivas a la reacción de la β -glucuronidasa (GUS)2. Se transformaron cactáceas de varias especies mediante *Agrobacterium rhizogenes* cepa A4/pESC4, con dos meses en oscuridad, y después se colocaron los explantes con raíz en luz por una semana, posteriormente se realizó la prueba de GUS en todas las raíces. Se observa evidentemente, la transformación por la coloración azul; *Pilosocereus chrysacanthus* (A), *Stenocereus queretaroensis* (B), *Stenocereus stellatus* (C), *Stenocereus thurberi* var *thurberi* (D), *Turbincarpus schmiedickeanus* var *schmiedickeanus* (E), *Turbincarpus schmiedickeanus* var *schwarzii* (F), *Turbincarpus hoferi* (G), *Turbincarpus laui* (H), *Turbincarpus lophophoroides* (I), *Turbincarpus pseudopectinatus* (J), *Turbincarpus schmiedickeanus* var *klinkerianus* (K), *Turbincarpus subterraneus* (*Gymnocactus subterraneus*) (L), *Turbincarpus swoboda* (M), *Turbincarpus valdezianus* (N), Control de limón transgénico (Ñ), Control de limón transgénico (O).

De las 42 especies de cactáceas mexicanas que generaron raíz, 30 especies fueron positivas a la prueba histoquímica GUS. En las Figura 21 y 22 se observa la coloración azul, ya que en presencia de un sustrato específico la β -glucuronidasa cataliza la producción de un precipitado azul-índigo indicando la presencia del gen *gus* en la raíz; en algunas especies la coloración azul-índigo también se presentó en tejido normal o tejido calloso.

V. 14 Reacción de polimerización en cadena (PCR) para las diferentes especies de cactáceas mexicanas

Especies	<i>rol B</i>	<i>vir D</i>	<i>nptII</i>	<i>GUS</i>
<i>Acharagma aguirreana</i>	X	X	O	O
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	X	X	X	X
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	X	X	X	X
<i>Echinocactus grusonii</i>	X	X	X	X
<i>Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)</i>	X	X	X	X
<i>Escobaria chaffeyi (E. dasyacantha subsp. chaffeyi)</i>	X	X	X	X
<i>Ferocactus peninsulae</i>	X	O	X	X
<i>Ferocactus cylindraceus var cylindraceus</i>	X	O	X	X
<i>Ferocactus flavovirens</i>	X	O	X	X
<i>Ferocactus latispinus var latispinus</i>	O	O	O	O
<i>Ferocactus rectispinus</i>	X	O	X	X
<i>Leuchtenbergia principis</i>	X	X	X	X
<i>Neobuxbaumia tetetzo</i>	X	X	X	X
<i>Opuntia amyclea</i>	O	X	O	O
<i>Stenocereus queretaroensis</i>	O	O	O	O
<i>Stenocereus stellatus</i>	X	O	X	X
<i>Stenocereus thurberi var thurberi</i>	O	O	O	O
<i>Turbincarpus pseudomacroechele var lausseri</i>	O	O	O	O
<i>Turbincarpus schmiedickeanus var schmiedickeanus</i>	O	X	X	X
<i>Turbincarpus schmiedickeanus var schwarzii</i>	X	X	X	X
<i>Turbincarpus hoferi</i>	X	X	X	X
<i>Turbincarpus laui</i>	X	O	X	X
<i>Turbincarpus lophophoroides</i>	X	O	X	X
<i>Turbincarpus pseudopectinatus</i>	X	O	X	X
<i>Turbincarpus schmiedickeanus var klinkerianus</i>	X	X	X	X
<i>Turbincarpus schmiedickeanus var schmiedickeanus</i>	O	O	O	O
<i>Turbincarpus subterraneus (Gymnocactus subterraneus)</i>	X	O	X	O

Tabla 5. Muestra varias especies de cactáceas mexicanas a las cuales se amplificaron cuatro genes (*rol B*, *Vir D*, *nptII* y *GUS*) para confirmar la transformación genética inducida por la infección de *Agrobacterium rhizogenes* mediante la técnica de PCR (reacción de polimerización en cadena)

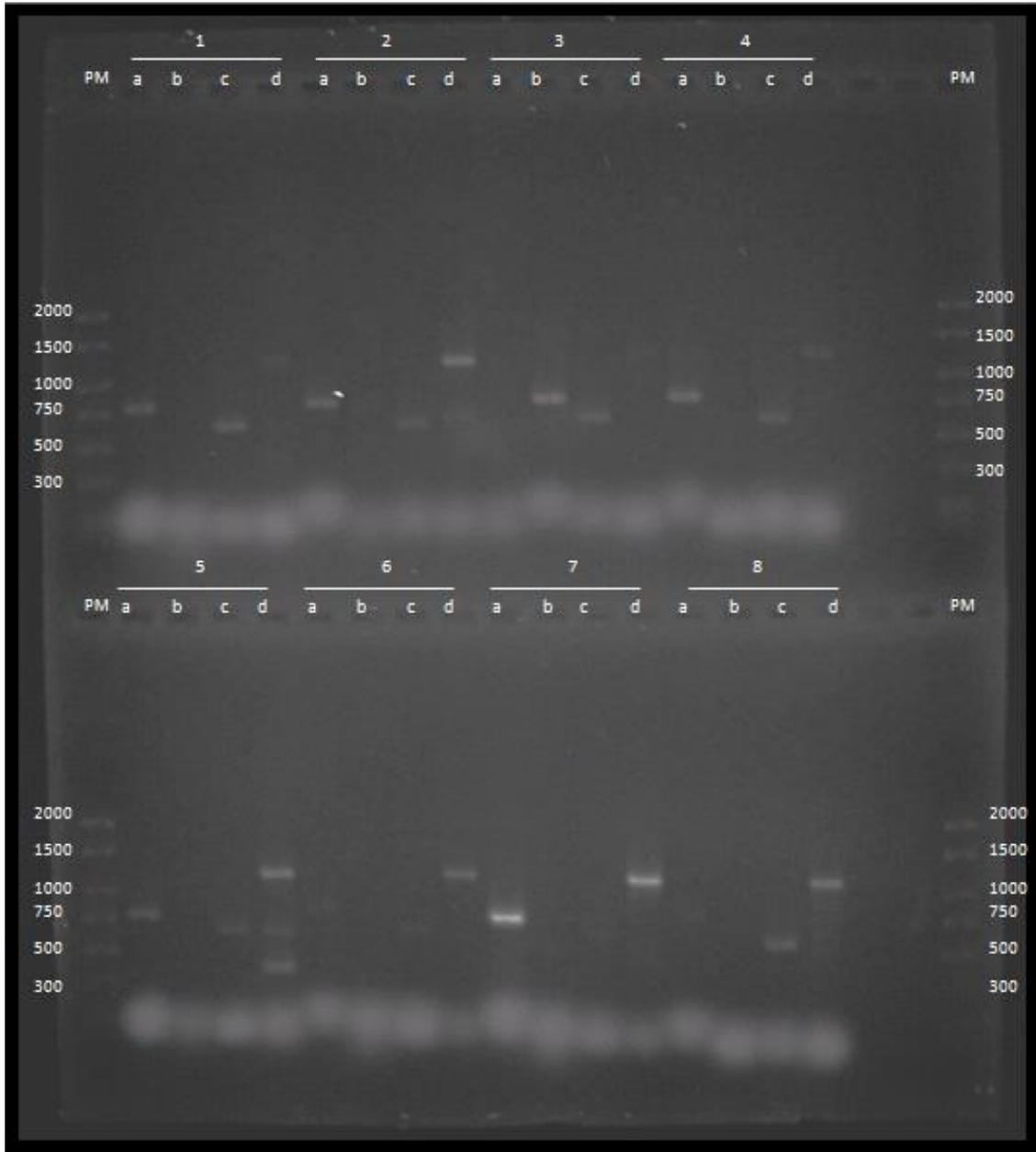


Fig. 22 Detección por la técnica de PCR de los genes *rolB*, *virD*, *nptII* y *GUS* de raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* de varias especies de cactáceas mexicanas; *Turbincarpus lophophoroides* (1), *Ferocactus peninsulæ* (2), *Turbincarpus subterraneus* (*Gymnocactus subterraneus*) (3), *Ferocactus rectispinus* (4), *Turbincarpus laui* (5), *Stenocereus stellatus* (6), *Turbincarpus pseudopectinatus* (7), *Ferocactus cylindraceus* var *cylindraceus* (8). Carril a: primers para la detección del *rolB*; carril b: primers para la detección de *virD*; carril c: primers para la detección de *nptII*; carril d: primers para la detección del gen *GUS*.

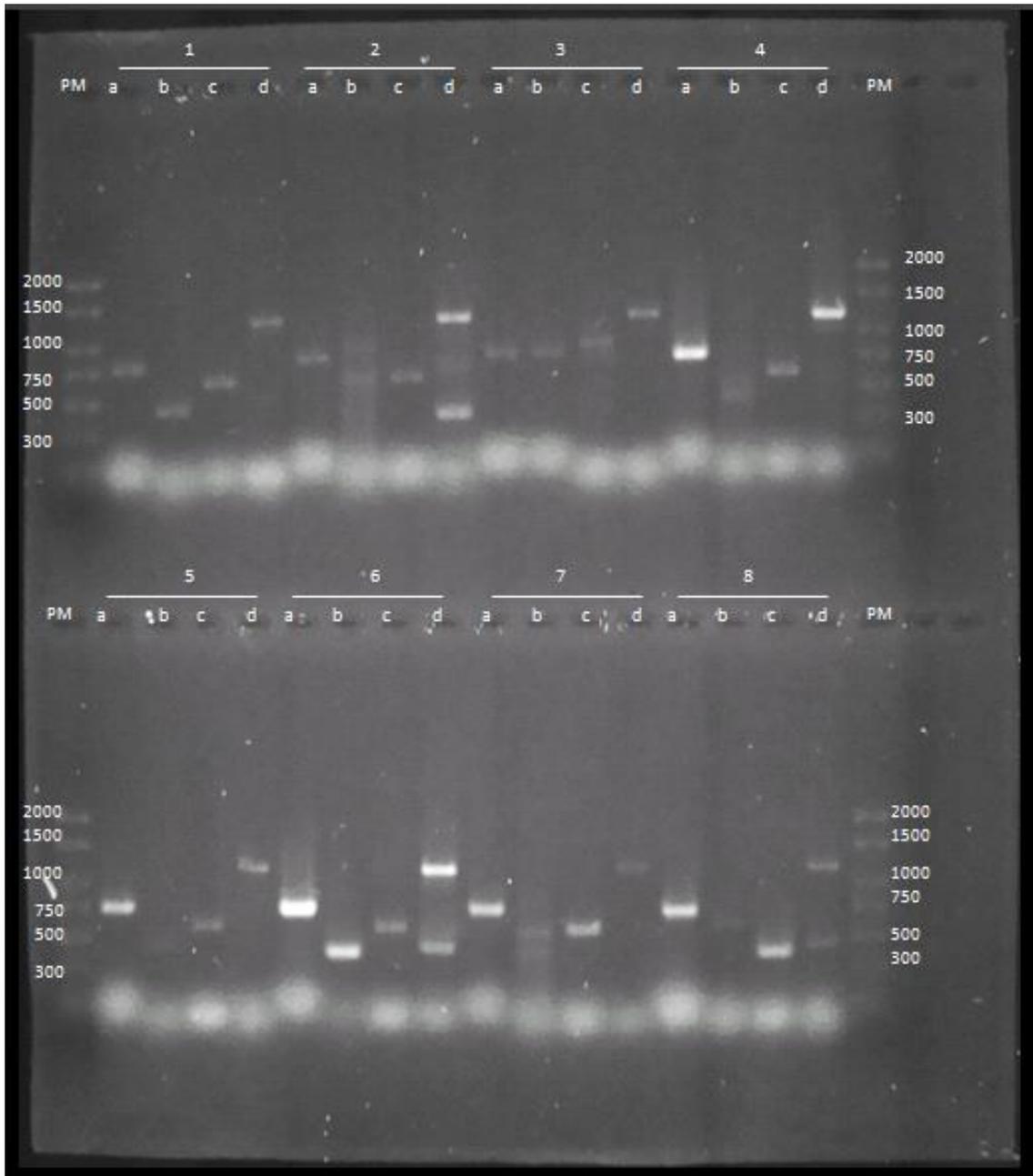


Fig. 23 Detección por la técnica de PCR de los genes *rolB*, *virD*, *nptII* y *GUS* de raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* de varias especies de cactáceas mexicanas; *Turbiniacarpus hoferi* (1), *Turbiniacarpus schmidickeanus* var *klinkerianus* (2), *Neobuxbaumia tetetzo* (3), *Echinocactus platyacanthus* (*Echinocactus ingens*) (4), *Echinocactus grusonii* (5), *Ariocarpus kotschoubeyanus* (6), *Escobaria chaffeyi* (*E. dasyacantha* subsp. *chaffeyi*) (7), *Leuchtenbergia principis* (8). Carril a: primers para la detección del *rolB*; carril b: primers para la detección de *virD*; carril c: primers para la detección de *nptII*; carril d: primers para la detección del gen *GUS*.

La PCR constituye una tecnología poderosa que involucra la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN. La reacción se basa en la hibridación de un par de oligonucleótidos, diseñados en base a la secuencia de interés y sintetizados artificialmente, a la secuencia de ADN.

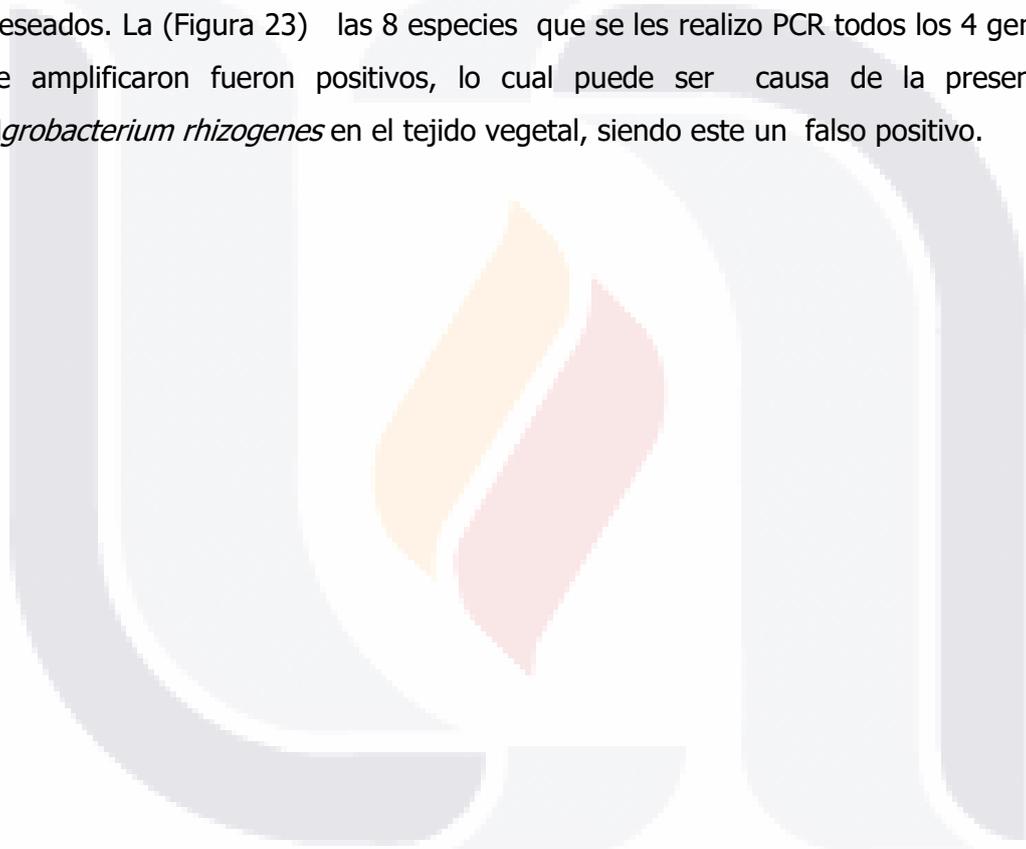
Estos oligonucleótidos funcionan como iniciadores o cebadores ("primers") que delimitan la secuencia a ser amplificada. La primera etapa de la reacción involucra la desnaturalización del ADN de doble cadena, por elevación de la temperatura a 92-95°C. Posteriormente comienzan los ciclos de PCR, que comprenden: desnaturalización de la doble cadena, unión por complementariedad del cebador al ADN de simple hebra y replicación del ADN a partir del cebador, catalizada por la enzima *Taq* polimerasa. La temperatura de unión de los cebadores al ADN de cadena simple depende de la secuencia y tamaño del oligonucleótido, así como de la estrategia específica de trabajo, comprendiéndose en términos generales entre los 35-60°C. La fase de síntesis de ADN complementario se lleva a cabo a la temperatura óptima para que la *Taq* polimerasa realice la replicación a partir de cada extremo 3' de los cebadores. Se trata de una ADN polimerasa termo-resistente aislada de *Thermus aquaticus*, bacteria que vive en fuentes termales. Este ciclo es repetido por algunas decenas de veces y, como el producto de cada polimerización sirve como molde para el siguiente, en cada ciclo se duplica la cantidad de producto sintetizado. Es necesario tener en cuenta que, además de la enzima, los cebadores y el ADN de interés, para que se produzca la amplificación es necesaria la presencia de un medio tamponado y desoxinucleótidos (dNTPs) y cloruro de magnesio que actúa como cofactor de la enzima. El resultado de la reacción es un fragmento de ADN de doble cadena cuyos extremos corresponden a los extremos 5' de los *cebadores* y su tamaño a la distancia entre los mismos. A pesar de que se forman moléculas más largas a partir del molde original en cada ciclo, se acumulan solo a una tasa lineal y no contribuyen significativamente a la masa final de secuencia blanco. Después de apenas 20 ciclos se logra más de un millón de veces la cantidad inicial de la secuencia de interés. Esta escala de amplificación permite, por lo tanto, iniciar el proceso con cantidades mínimas de ADN (del orden de pico o nanogramos) y terminar la reacción con grandes cantidades de una secuencia de interés (Levitus et al., 2010).

Se realizó la PCR a 27 especies de cactáceas mexicanas que dieron positivo a la prueba histoquímica GUS así como algunas de las cuales dieron negativo, con el objetivo de ver la presencia de los genes *rolB*, *VirD*, *nptII* y *gus* en la Tabla 5 se muestran los resultados de las 27 especies. Se eligieron esos 4 genes ya que es importante saber si el gen *rolB* que es el inductor de la raíz pilosa se encuentra presente en el tejido vegetal, por otro lado el gen *VirD* que es el gen de virulencia, al

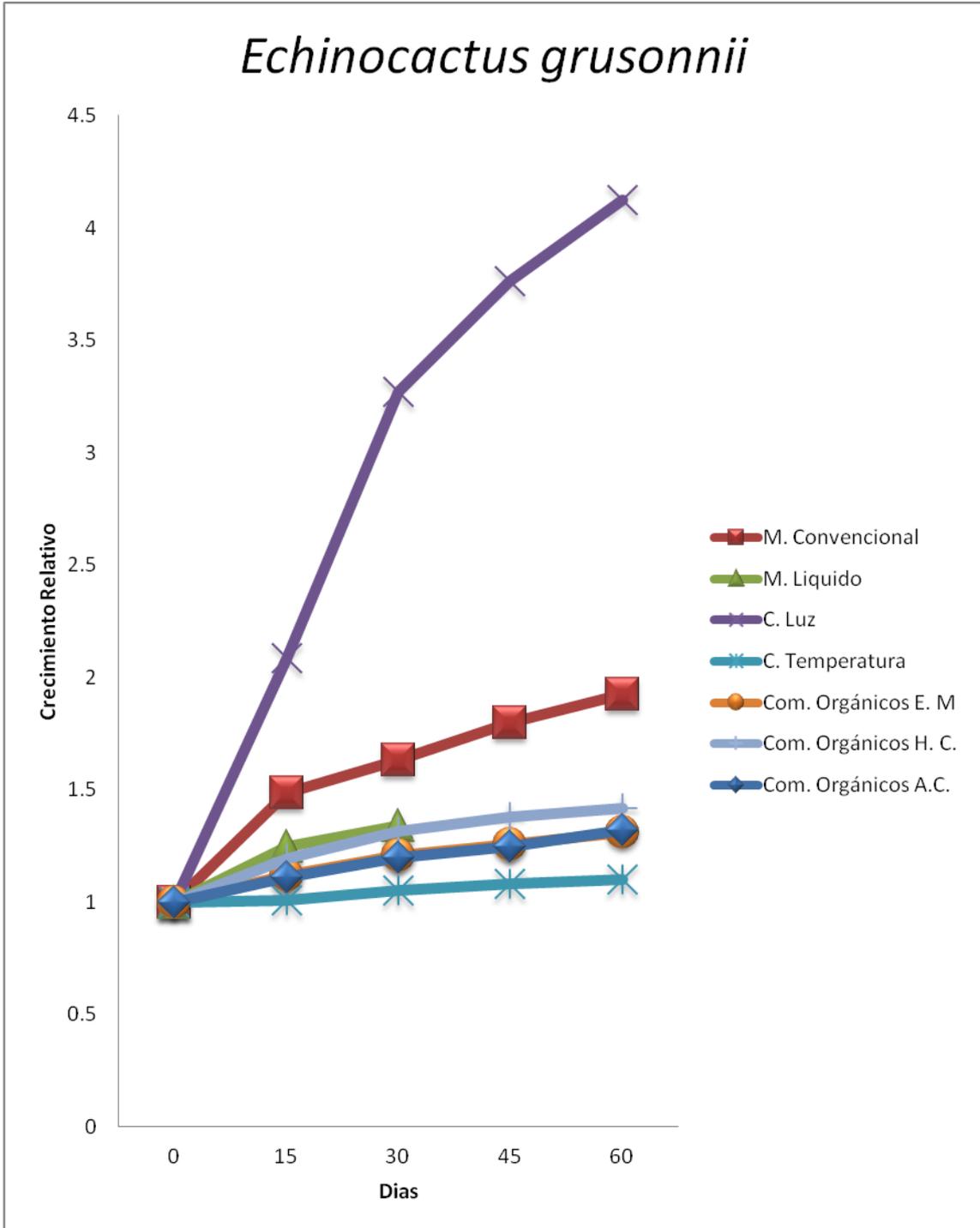
TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

momento de realizarse la infección este fragmento no es transferido al genoma vegetal, por lo que el estar presente indica la presencia de la bacteria en el tejido y puede ser un falso positivo. El *nptII* es un gen de selección que permite a las células transgénicas crecer en un medio de cultivo que contiene el agente selectivo correspondiente, y por último el gen *gus* marcador visualizable que posibilita la observación directa de las células que lo expresan.

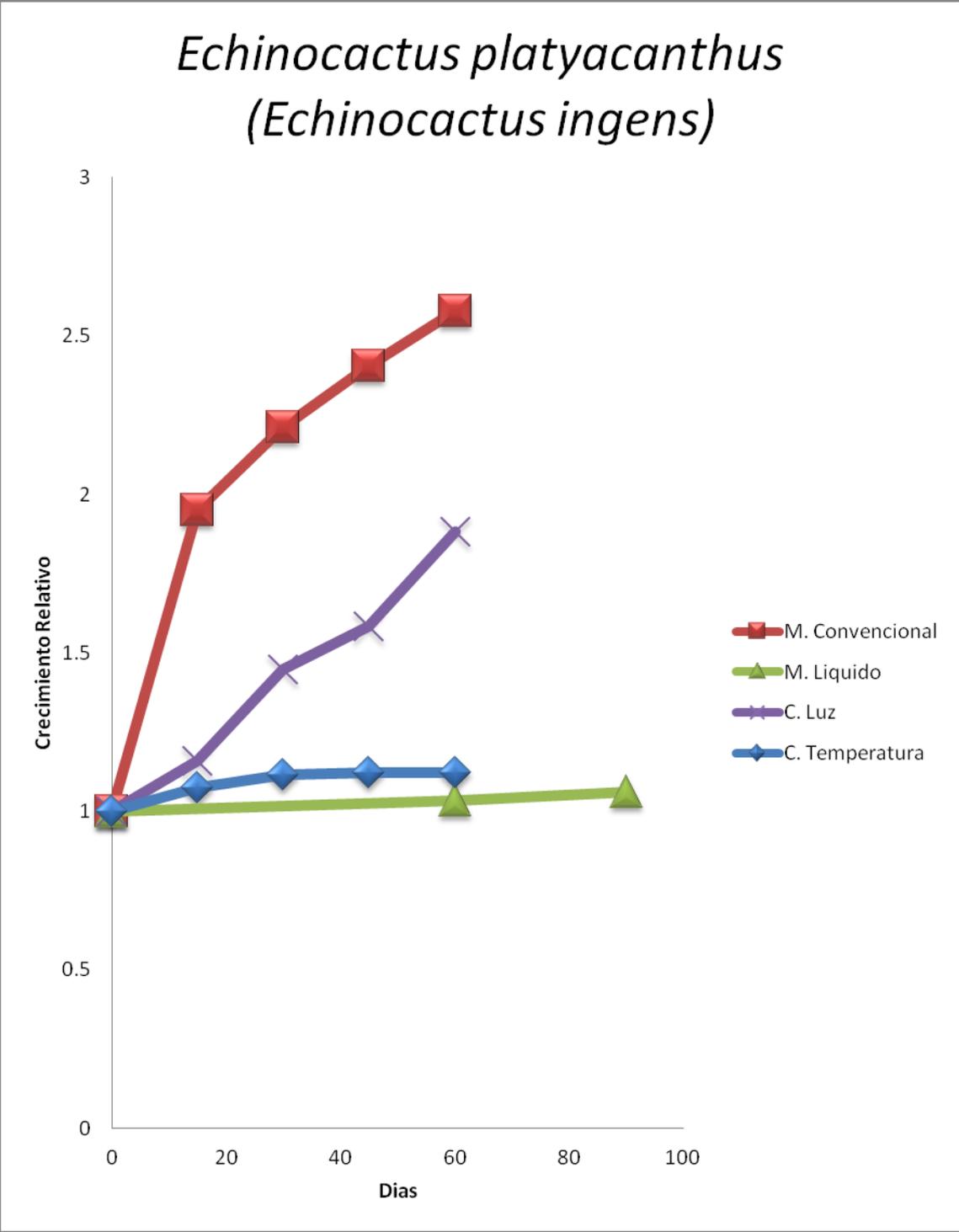
En la (Figura 22) se tiene la amplificación de los cuatro genes antes mencionados de 8 diferentes especies, donde el gen *VirD* es negativo, ya que no se amplificó en la PCR, indicativo que el tejido vegetal está transformando expresando los genes deseados. La (Figura 23) las 8 especies que se les realizó PCR todos los 4 genes que se amplificaron fueron positivos, lo cual puede ser causa de la presencia de *Agrobacterium rhizogenes* en el tejido vegetal, siendo este un falso positivo.



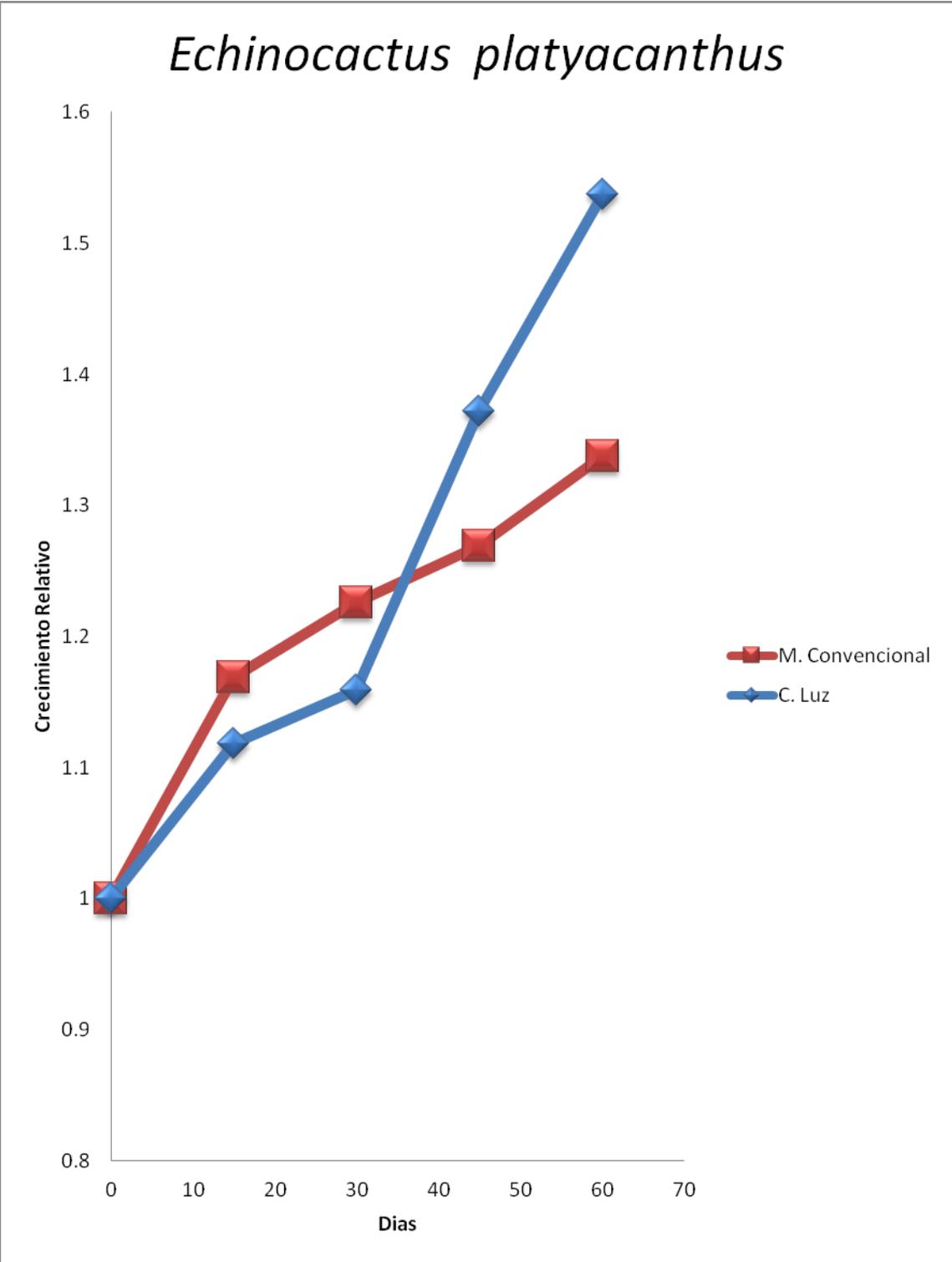
V. 15 Comparación del crecimiento de las raíces presuntamente transformadas de Cactáceas en los Diferentes Tratamientos (Método Convencional Medio Liquido, Condiciones de incubación (Luz, Temperatura), y Adición de compuestos Orgánico.



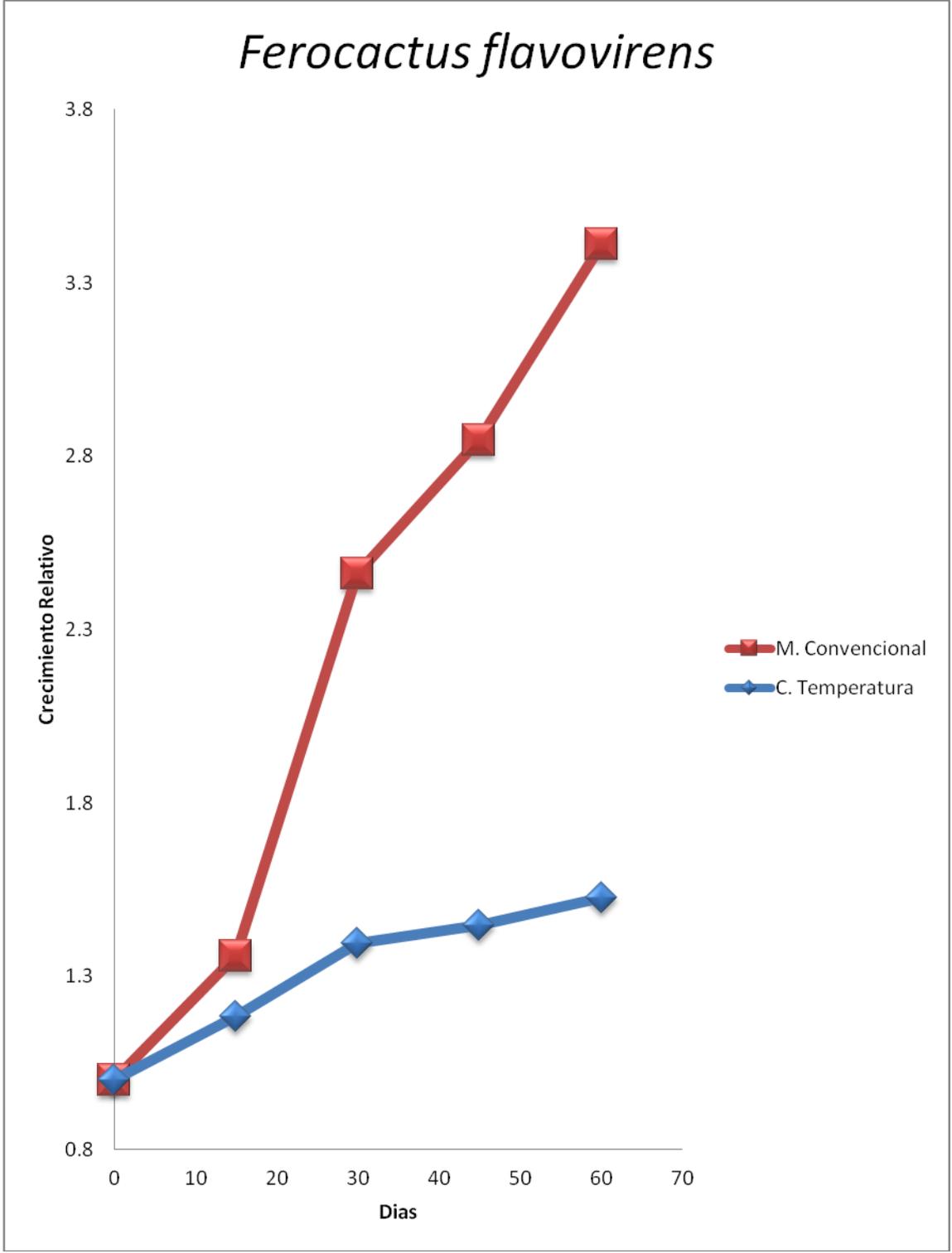
Grafica 98. Curvas de Crecimiento Relativo de Especie *Echinocactus grusonii*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio liquido, Condiciones de incubación (Luz, Temperartura), Adicion de compuestos orgánicos al medio (Extracto de malta, Hidrolizado de caseina, Agua de Coco). El Crecimiento Relativo se obtuvo dividiendo el tamaño o peso de las raíces obtenido en cada medición entre el tamaño o peso inicial.



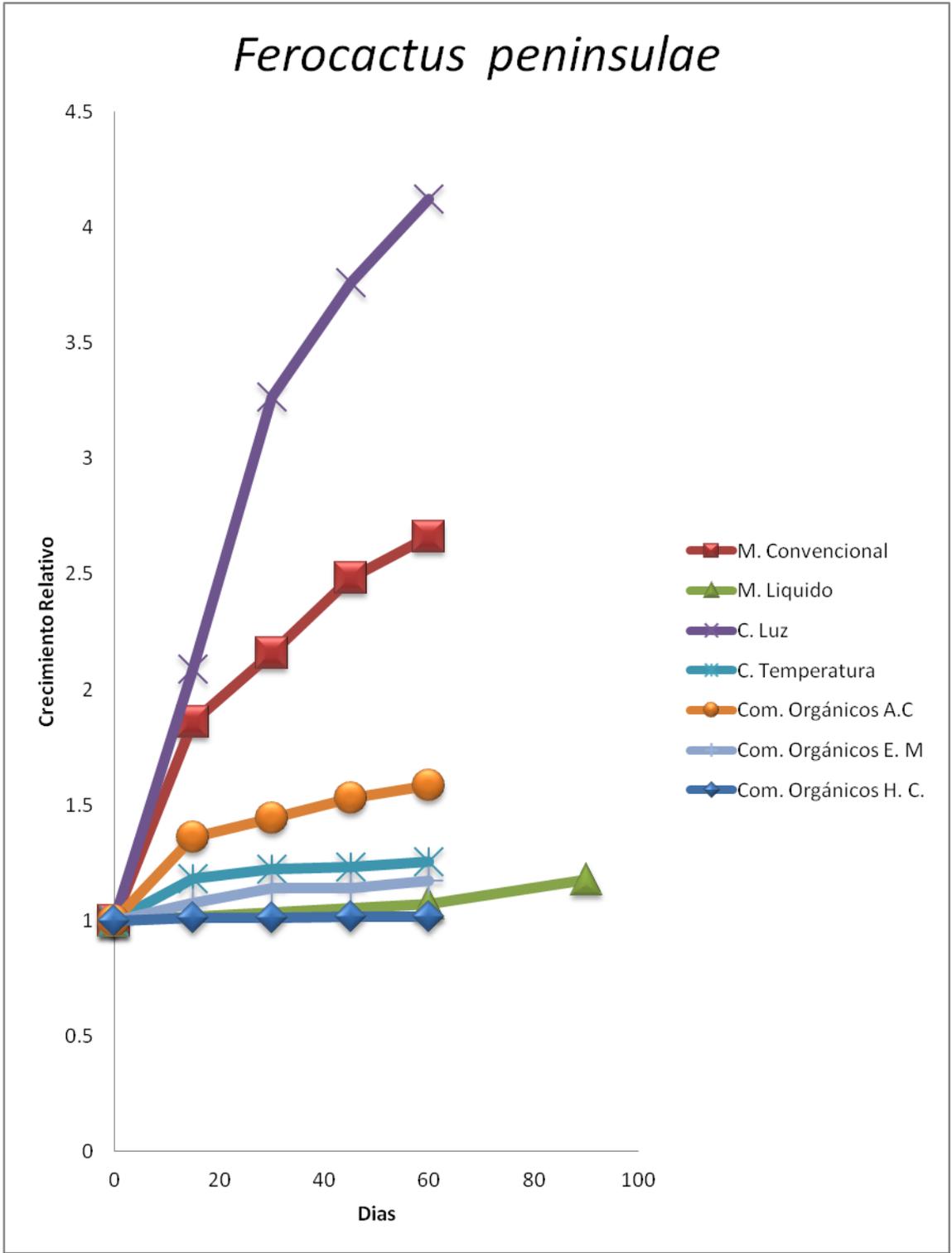
Grafica 99. Curvas de Crecimiento Relativo de Especie *Echinocactus platyacanthus* (*Echinocactus ingens*), en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio liquido y Condiciones de incubación (Luz, Temperatura). El Crecimiento Relativo se obtuvo dividiendo el tamaño o peso de las raíces obtenido en cada medición entre el tamaño o peso inicial.



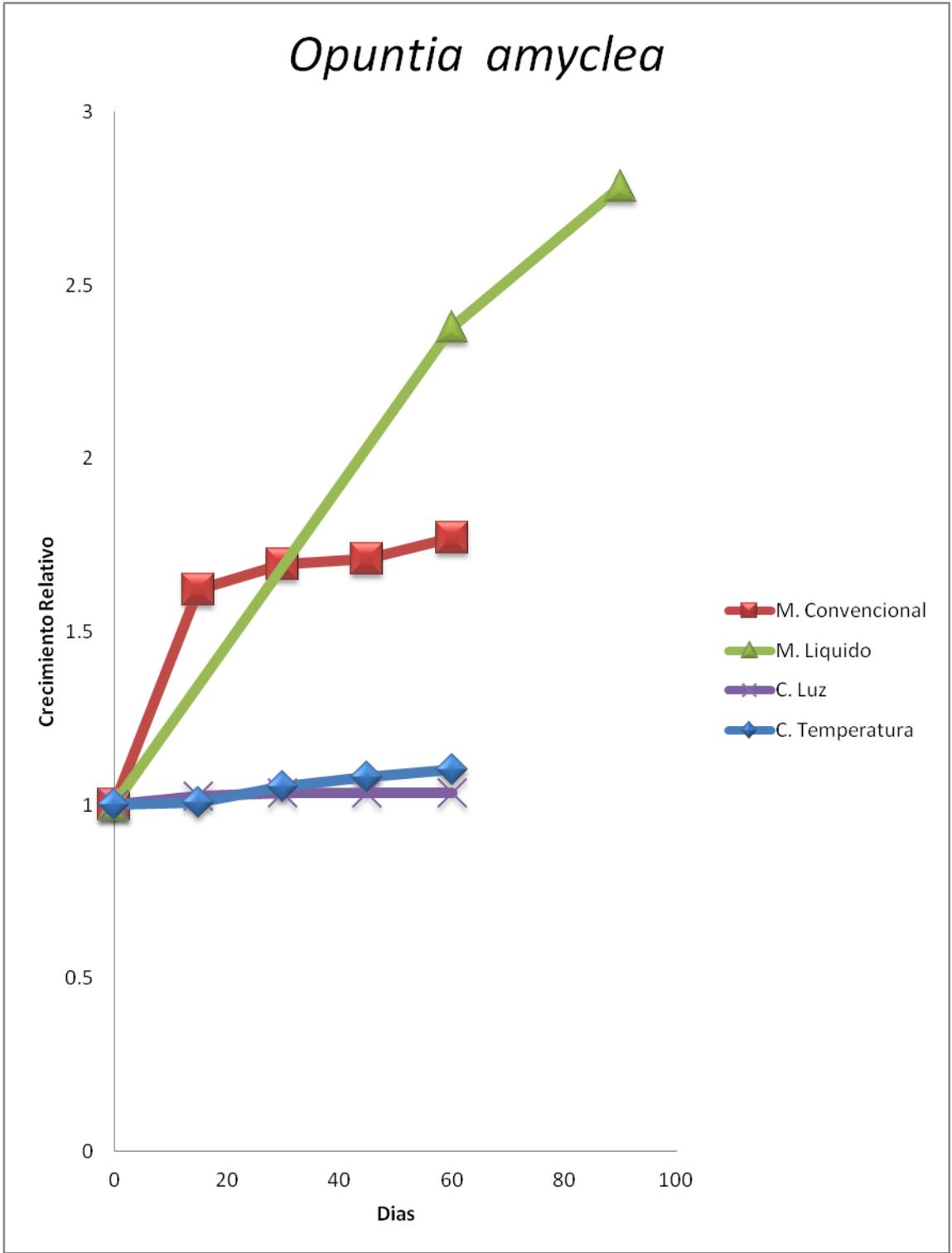
Grafica 100. Curvas de Crecimiento Relativo de Especie *Echinocactus platyacanthus*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Condiciones de incubación (Luz). El Crecimiento Relativo se obtuvo dividiendo el tamaño o peso de las raíces obtenido en cada medición entre el tamaño o peso inicial.



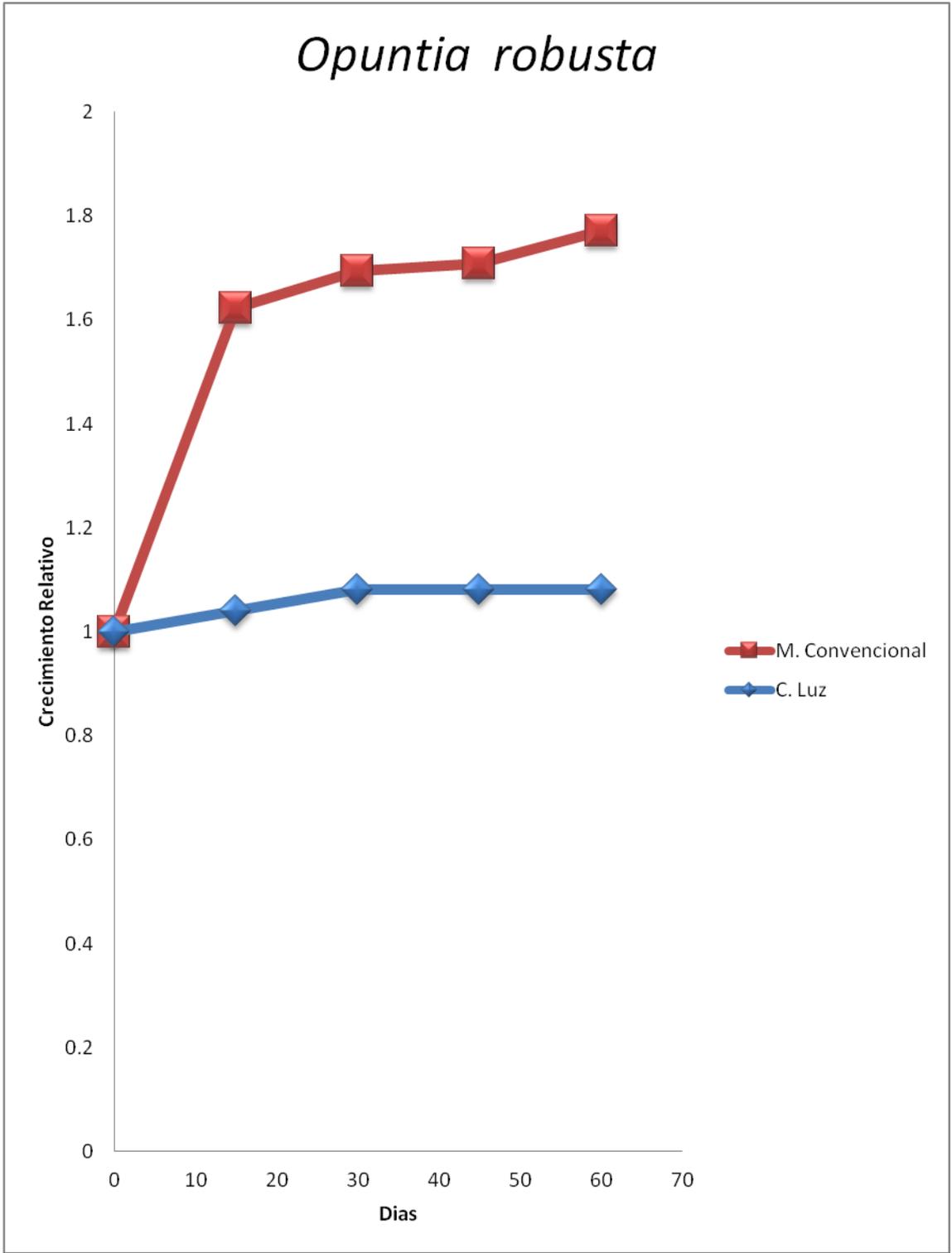
Grafica 101. Curvas de Crecimiento Relativo de Especie *Ferocactus flavovirens*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Condiciones de incubación (Temperatura). El Crecimiento Relativo se obtuvo dividiendo el tamaño o peso de las raíces obtenido en cada medición entre el tamaño o peso inicial.



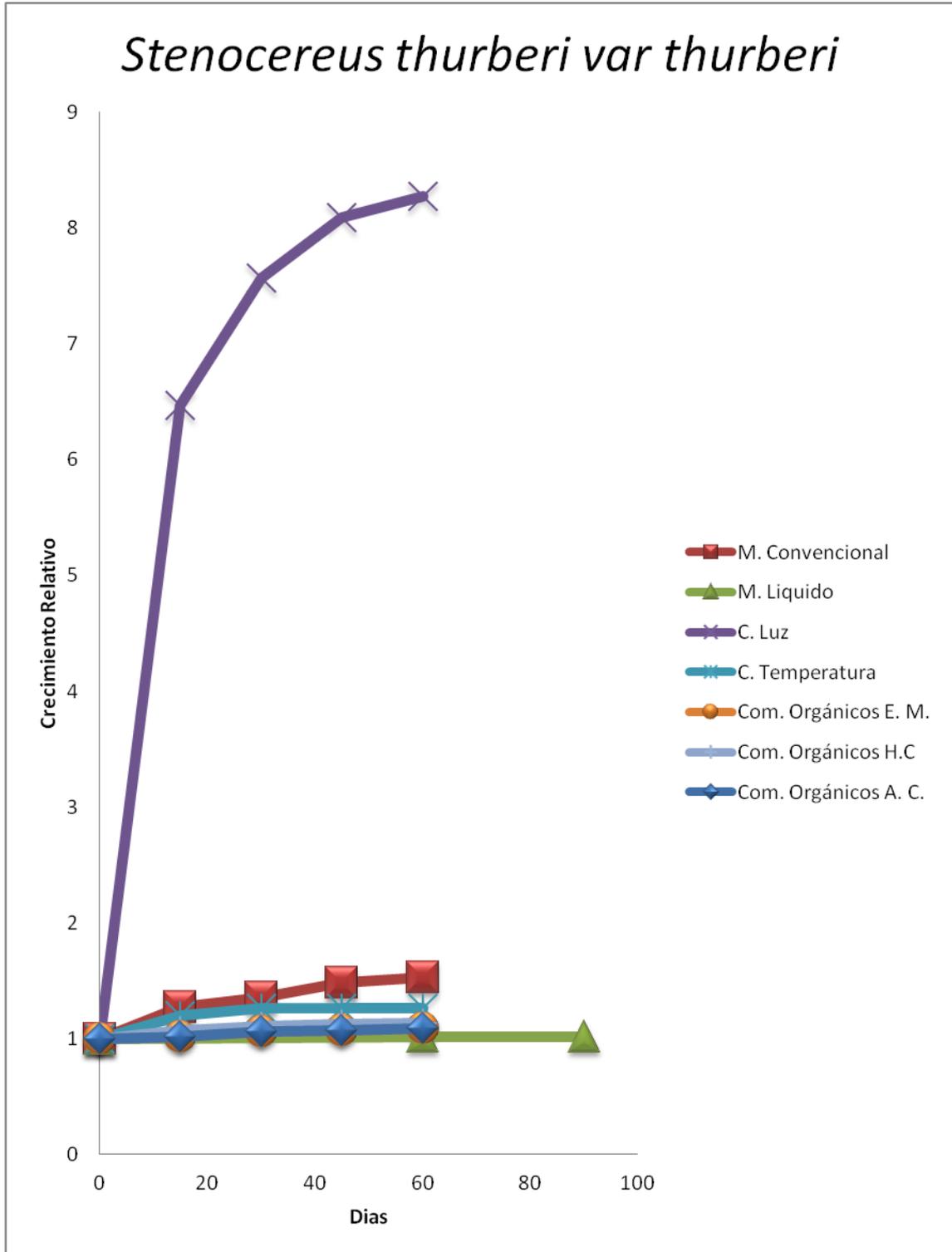
Grafica 102. Curvas de Crecimiento Relativo de Especie *Ferocactus peninsulae*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio liquido, Condiciones de incubación (Luz, Temperartura) y Adicion de compuestos orgánicos al medio (Agua de Coco, Extracto de malta, Hidrolizado de caseina). El Crecimiento Relativo se obtuvo dividiendo el tamaño o peso de las raíces obtenido en cada medición entre el tamaño o peso inicial.



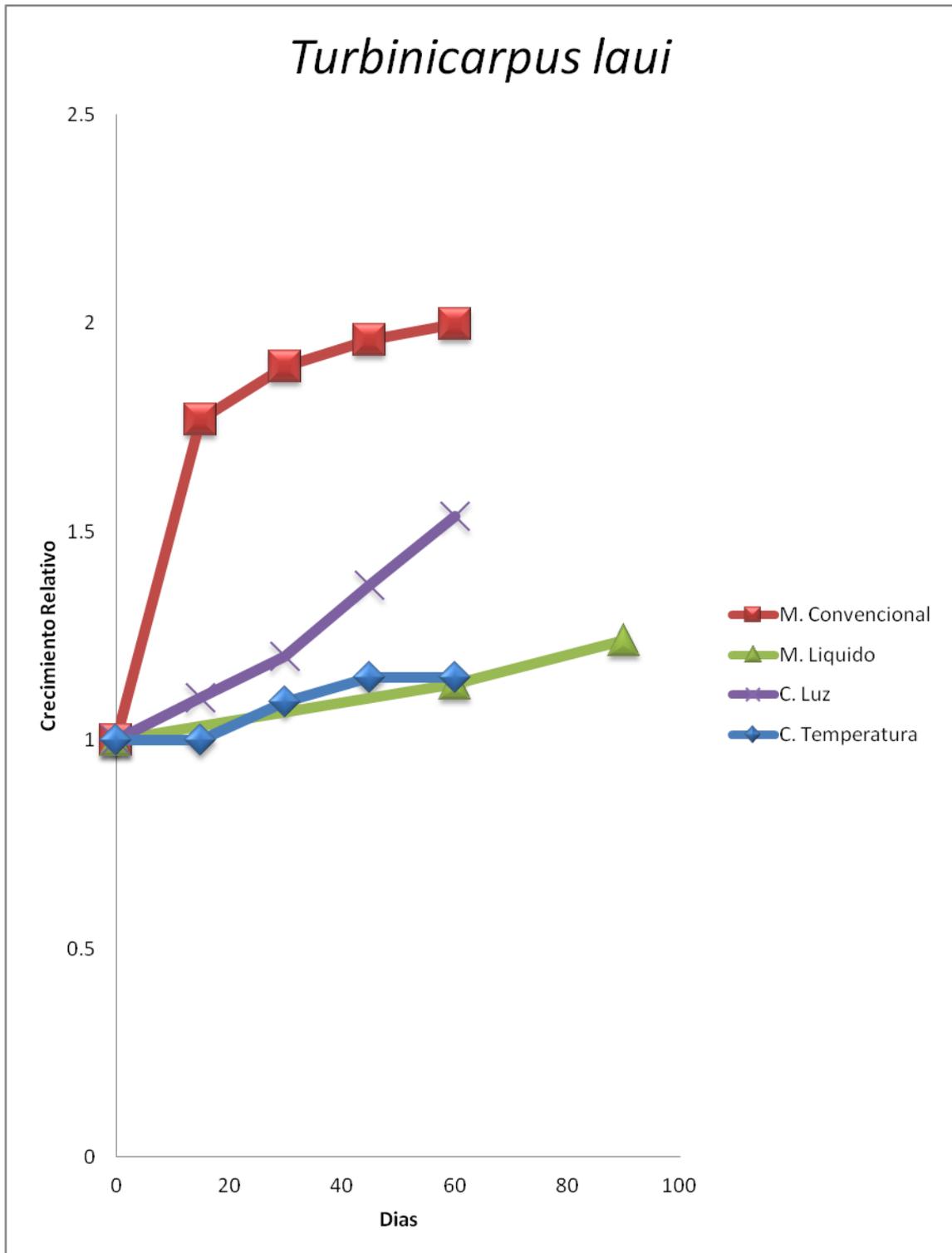
Grafica 103. Curvas de Crecimiento Relativo de Especie *Opuntia amyctea*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio liquido, Condiciones de incubación (Luz, Temperatura). El Crecimiento Relativo se obtuvo dividiendo el tamaño o peso de las raíces obtenido en cada medición entre el tamaño o peso inicial.



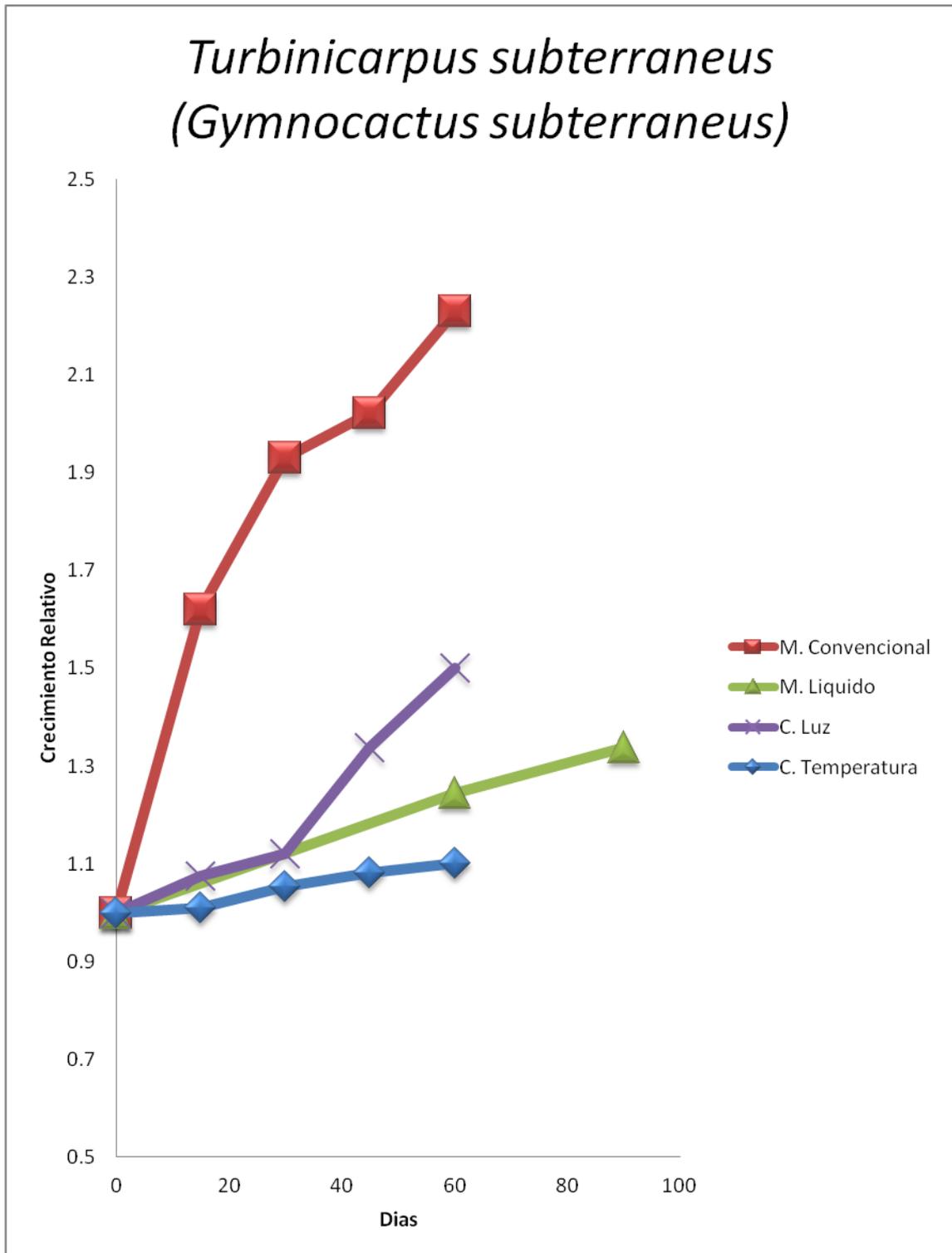
Grafica 104. Curvas de Crecimiento Relativo de Especie *Opuntia robusta*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Condiciones de incubación (Luz). El Crecimiento Relativo se obtuvo dividiendo el tamaño o peso de las raíces obtenido en cada medición entre el tamaño o peso inicial.



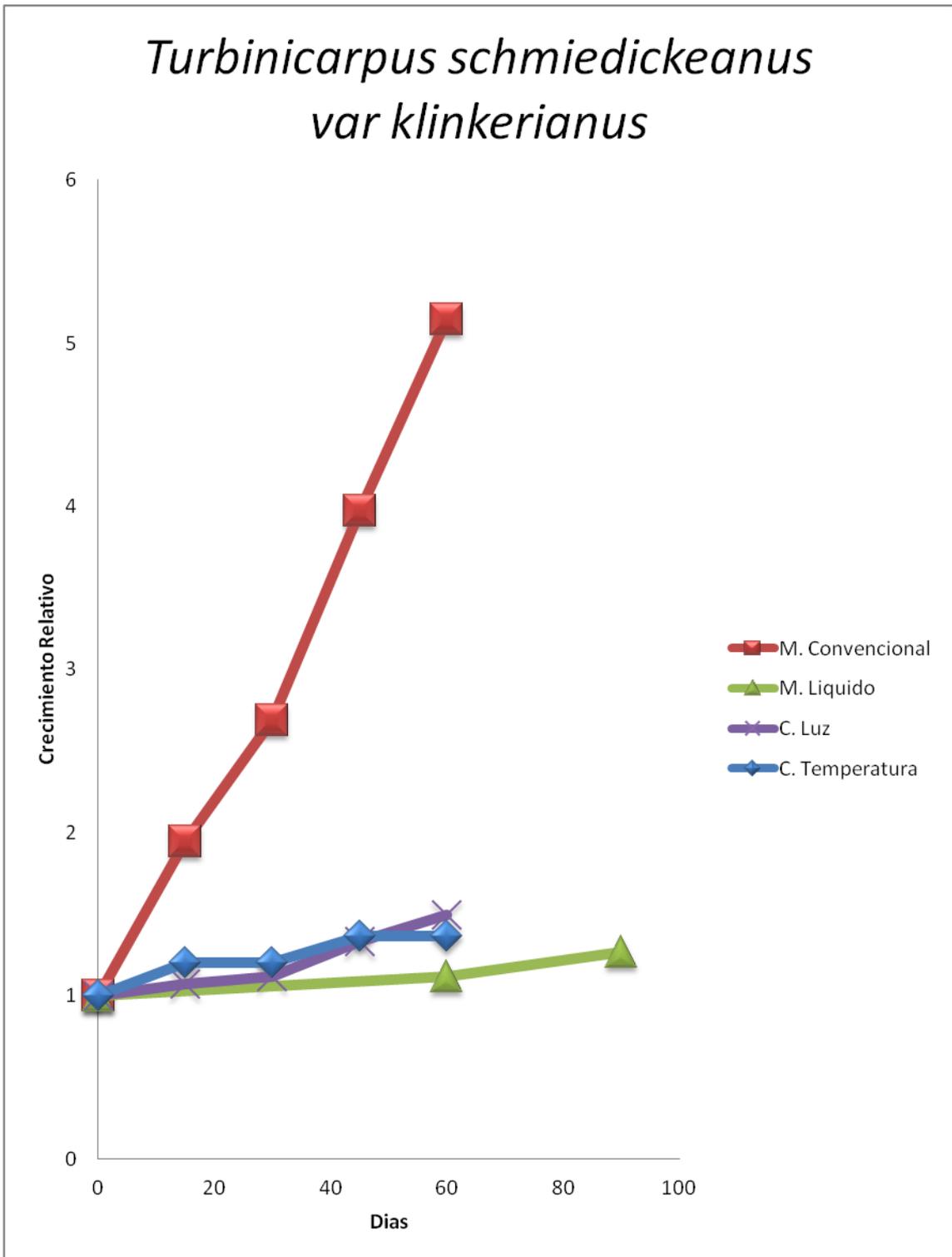
Grafica 105. Curvas de Crecimiento Relativo de Especie *Stenocereus thurberi var thurberi*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio liquido, Condiciones de incubación (Luz, Temperartura), Adición de compuestos orgánicos al medio(Extracto de malta, Hidrolizado de caseina y Agua de coco). El Crecimiento Relativo se obtuvo dividiendo el tamaño o peso de las raíces obtenido en cada medición entre el tamaño o peso inicial.



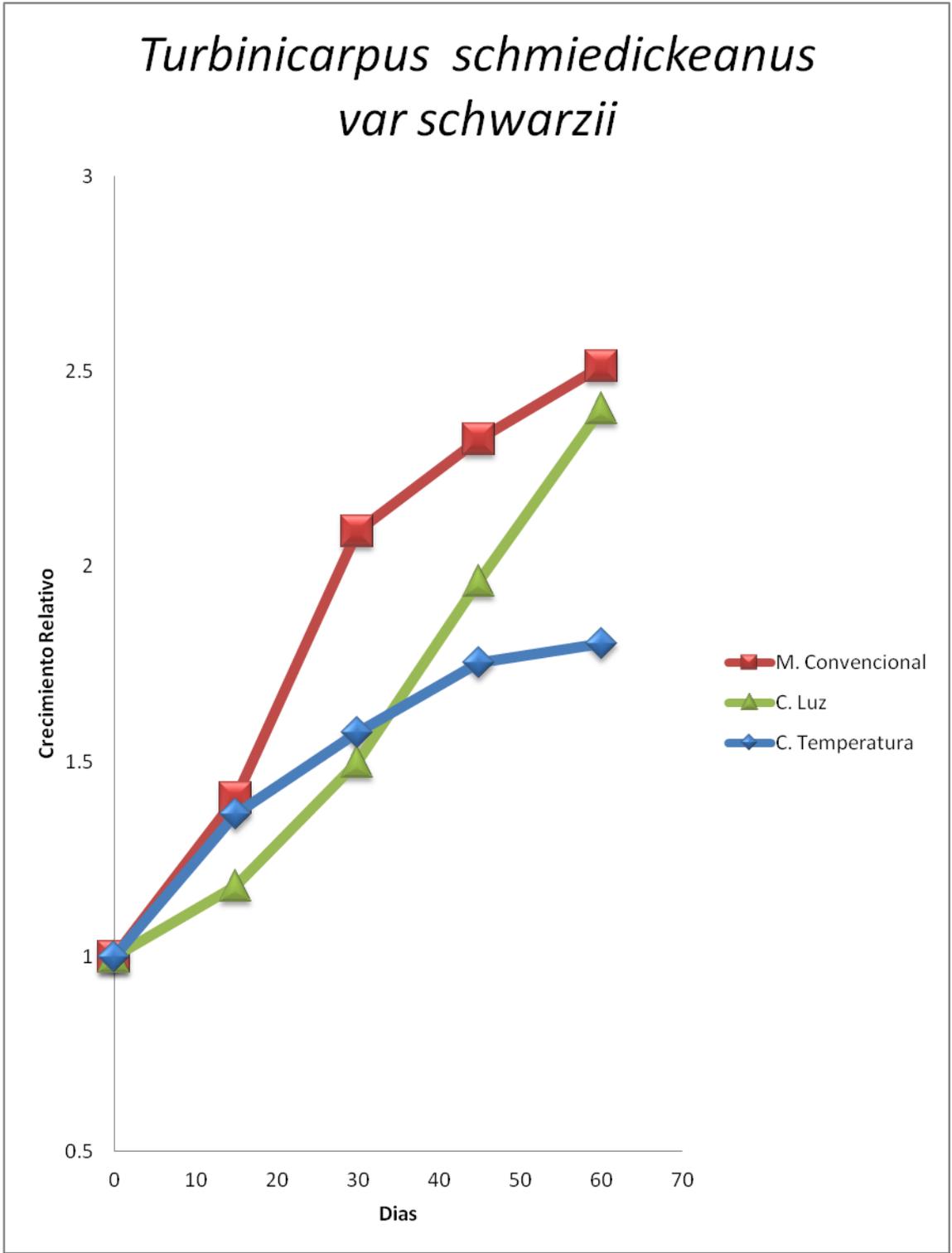
Grafica 106. Curvas de Crecimiento Relativo de Especie *Turbinicarpus laui*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio liquido, Condiciones de incubación (Luz, Temperartura). El Crecimiento Relativo se obtuvo dividiendo el tamaño o peso de las raíces obtenido en cada medición entre el tamaño o peso inicial.



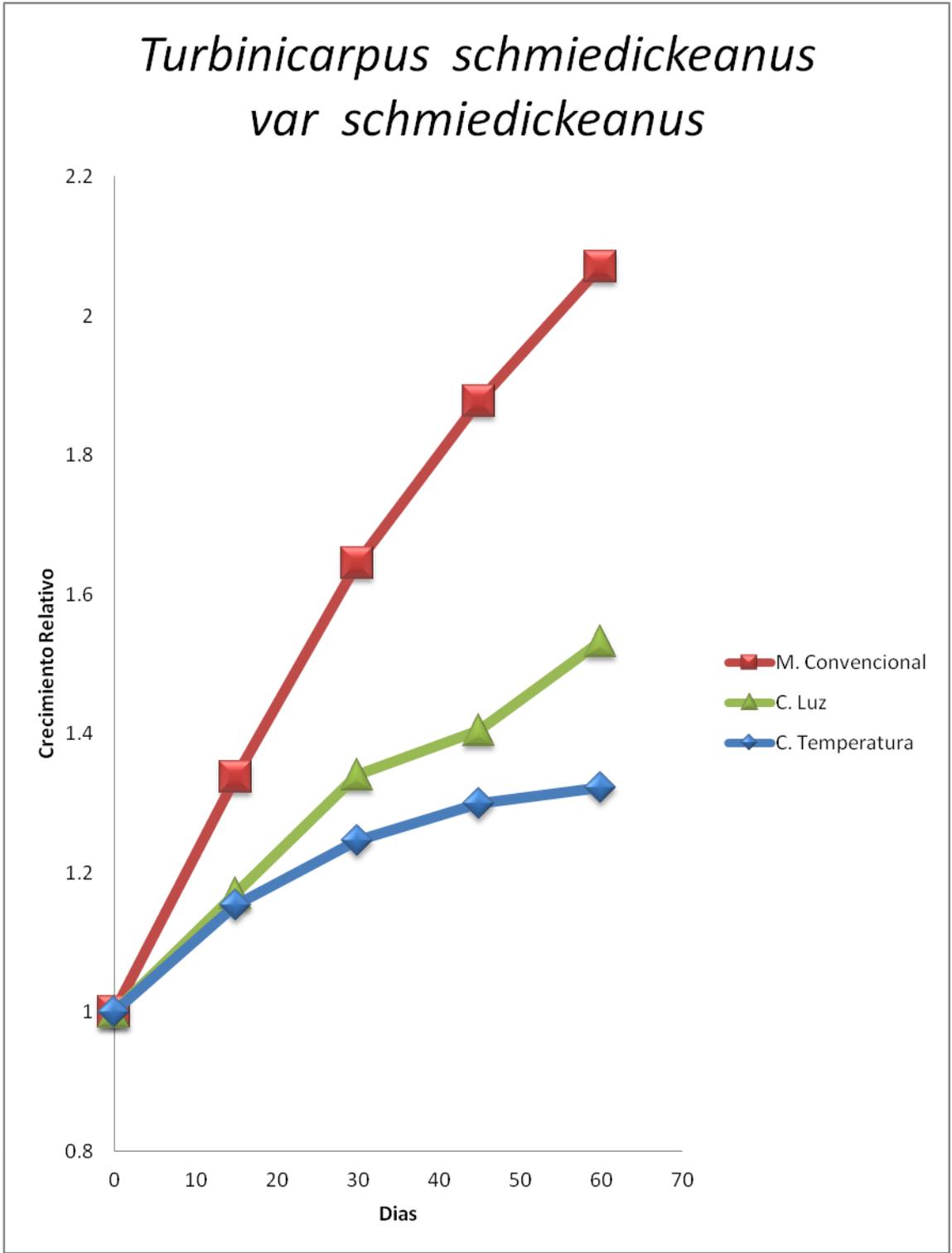
Grafica 107. Curvas de Crecimiento Relativo de Especie *Turbinicarpus subterraneus* (*Gymnocactus subterraneus*), en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio liquido, Condiciones de incubación (Luz, Temperartura). El Crecimiento Relativo se obtuvo dividiendo el tamaño o peso de las raíces obtenido en cada medición entre el tamaño o peso inicial.



Grafica 108. Curvas de Crecimiento Relativo de Especie *Turbinicarpus schmiedickeanus var klinkerianus*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Medio líquido, Condiciones de incubación (Luz, Temperatura). El Crecimiento Relativo se obtuvo dividiendo el tamaño o peso de las raíces obtenido en cada medición entre el tamaño o peso inicial.



Grafica 109. Curvas de Crecimiento Relativo de Especie *Turbinicarpus schmiedickeanus var schwarzii*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Condiciones de incubación (Luz, Temperatura). El Crecimiento Relativo se obtuvo dividiendo el tamaño o peso de las raíces obtenido en cada medición entre el tamaño o peso inicial.



Grafica 110. Curvas de Crecimiento Relativo de Especie *Turbinicarpus schmiedickeanus var schmiedickeanus*, en diferentes sistemas de cultivo; Método convencional, Condiciones de incubación (Luz, Temperatura). El Crecimiento Relativo se obtuvo dividiendo el tamaño o peso de las raíces obtenido en cada medición entre el tamaño o peso inicial.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los resultados se muestran en unidades de crecimiento relativo para poder hacer un comparativo de todos los sistemas de cultivo y poder determinar cuál es el sistema más eficiente para el crecimiento de las raíces transgénicas de las diferentes especies de cactáceas mexicanas. Éste valor se obtiene dividiendo el tamaño (o peso) de las raíces obtenido en cada medición entre el tamaño o peso inicial. Por tanto el valor inicial siempre será 1 y conforme las raíces crecen se obtienen valores por encima de 1, por lo cual todos los tratamientos se encuentran en la misma escala.

Este estudio que compara los diferentes sistemas de cultivo para diferentes especies de cactáceas mexicanas, se observa que en la mayoría de las especies el mejor sistema de cultivo es el Método Convencional, seguido sistema de incubación (Luz). En las graficas (99, 101, 104, 106, 107, 108 y 110) es evidente que el método convencional (20°C en la obscuridad) es en el que se da el mejor crecimiento a comparación de los otros sistemas de cultivo [medio líquido, condiciones de incubación (luz, temperatura) y adición de compuestos orgánicos]. Por otro lado las graficas (98, 100, 102, 105 y 109) muestran que el mejor crecimiento se da en el sistema de incubación (luz).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

V. 16 Cromatografía TLC y Análisis por Diferentes Sistemas de Detección; UV-365nm, Reactivo de Dragendorff y Reactivo de Marquis

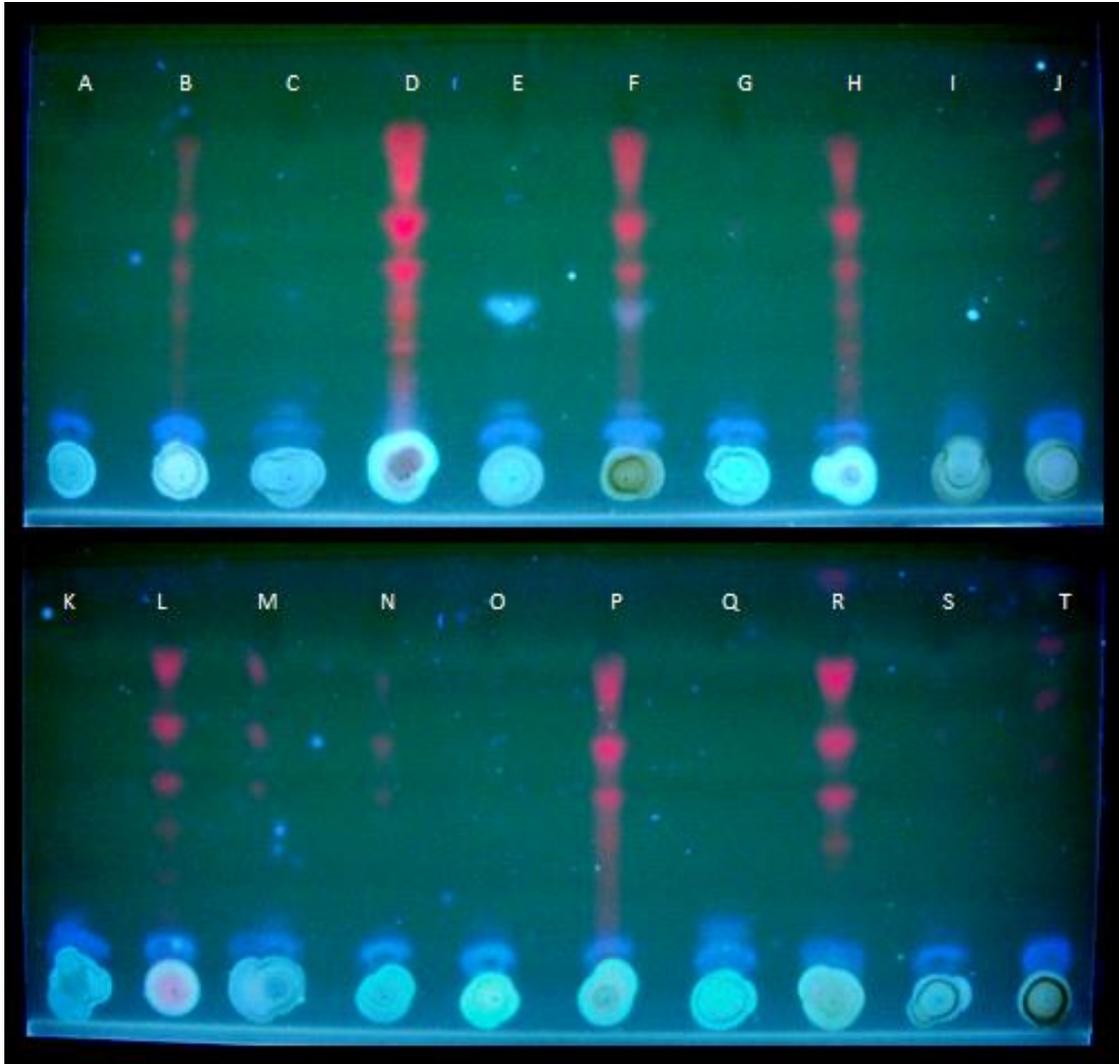


Fig. 24 Cromatografías de las raíces transformadas y tejido vegetal no transformado (*in vitro* y *in vivo*), la placa se expuso a UV 356nm, *Ariocarpus kotschoubeyanus* (A,B), *Echinocactus grusonii* (C, D), *Echinocactus platyacanthus* (*Echinocactus ingens*) (E, F), *Ferocactus peninsulae* (G, H), *Stenocereus thurberi* var *thurberi* (I, J), *Turbincarpus schmiedickeanus* var *schwarzii* (K, L), *Turbincarpus laui* (M, N), *Turbincarpus lophophoroides* (O, P), *Turbincarpus pseudopectinatus* (Q, R), *Turbincarpus schmiedickeanus* var *klinkerianus* (S, T). Nota, el primer carril corresponde a la especie transformada y el segundo al tejido vegetal no transformado.

Los extractos obtenidos de raíces transformadas, y de tejido vegetal no transformado (*in vitro*, *in vivo*, Figuras 24, 25, 26 y 27) fueron sometidos a ensayos de cromatografías en capa fina y revelados por exposición de la placa a luz ultravioleta (365 nm), a los reactivos de Dragendorff y Marquis. Las especies a las cuales se le

realizo el ensayo fueron positivas a GUS y amplificaron positiva por PCR de los genes (*rol B*, *vir D*, *nptII*, *gus*) a excepción de *Stenocereus thurberi var thurberi*, que no amplifico para ninguno de los genes antes mencionados.

Se observa en la Figura 24 que los metabolitos secundarios son muy semejantes los extractos de las raíces transformadas y tejido vegetal no transformadas, a excepción de los metabolitos que se manifiestan en color rojo intenso que corresponden al tejido vegetal no transformado. También se observa que en el carril (E) que es extracto de raíz transformada correspondiente a la especie *Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)*, donde se muestra una mancha mucho más intensa que en el carril (F) correspondiente a la misma especie de tejido vegetal no transformada.

En la Figura 25 muestra el revelado con el reactivo Dragendorff, reactivo que detecta metabolitos secundarios del tipo alcaloide (purinas y efedrina) (Wagner y Bladt, 1996), las manchas observan patrones semejantes de las raíces transformadas y tejido vegetal no transformado, en el carril E y F correspondiente a la especie *Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)* se sigue observando una mancha en el carril del extracto de la raíz transformada.

Se muestra en las Figura 26 y 27 el revelado con el reactivo de Marquis, reactivo que detecta metabolitos secundarios derivados del opio (Wagner y Bladt, 1996), las manchas observan patrones semejantes de las raíces transformadas y tejido vegetal no transformado en todas las especies, las placas se observaron a luz visible (placa 1) y en luz ultravioleta (356nm) (placa 2).

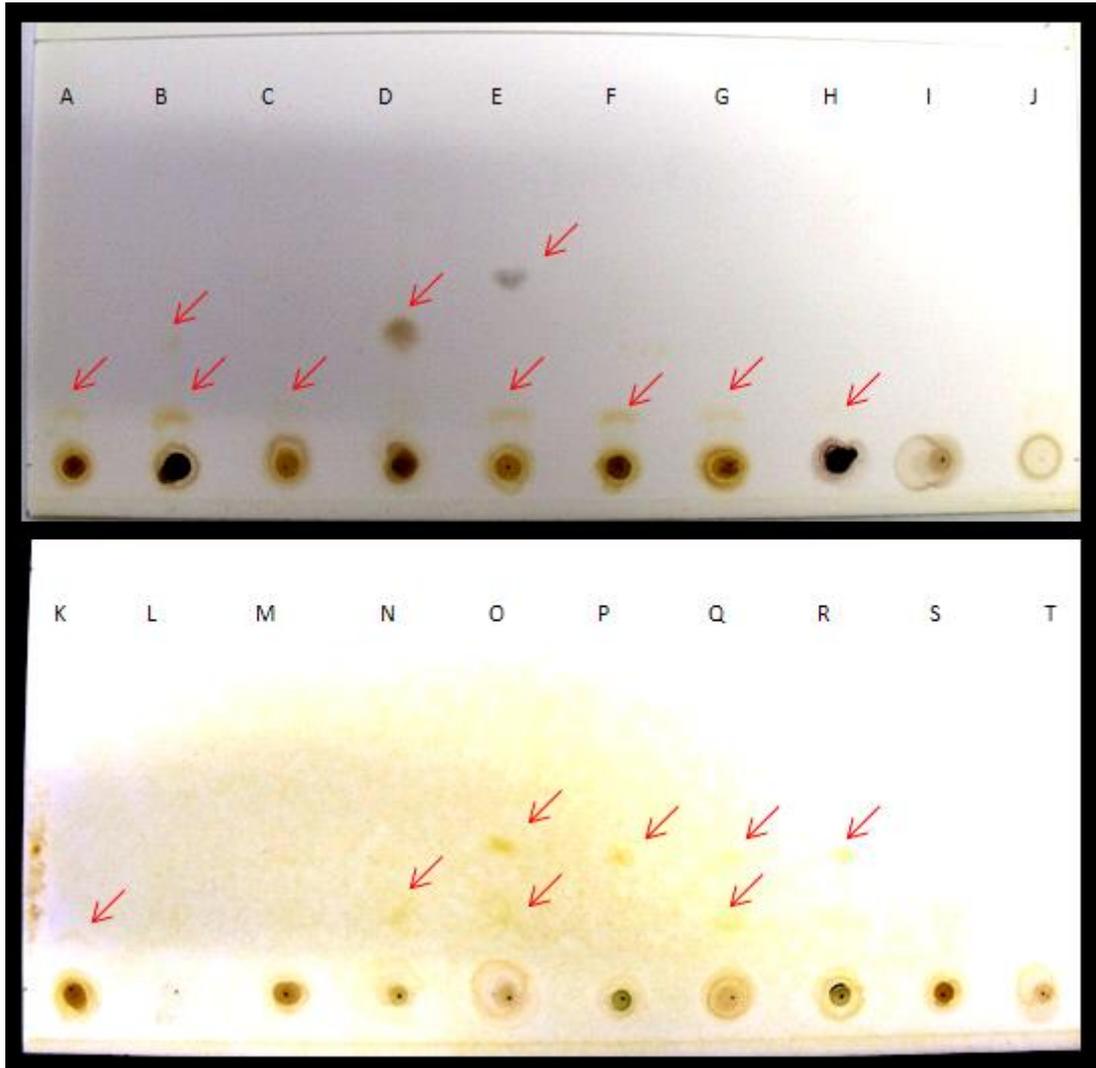


Fig. 25 Cromatografías de las raíces transformadas y tejido vegetal no transformado (*in vitro* y *in vivo*), la placa se reveló con el reactivo de Drgendorff; *Ariocarpus kotschoubeyanus* (A,B), *Echinocactus grusonii* (C, D), *Echinocactus platyacanthus* (*Echinocactus ingens*) (E, F), *Ferocactus peninsulæ* (G, H), *Stenocereus thurberi* var *thurberi* (I, J), *Turbinicarpus schmidickeanus* var *schwarzii* (K, L), *Turbinicarpus laui* (M, N), *Turbinicarpus lophophoroides* (O, P), *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Q, R), *Turbinicarpus schmidickeanus* var *klinkerianus* (S, T). Nota, el primer carril corresponde a la especie transformada y el segundo al tejido vegetal no transformado.

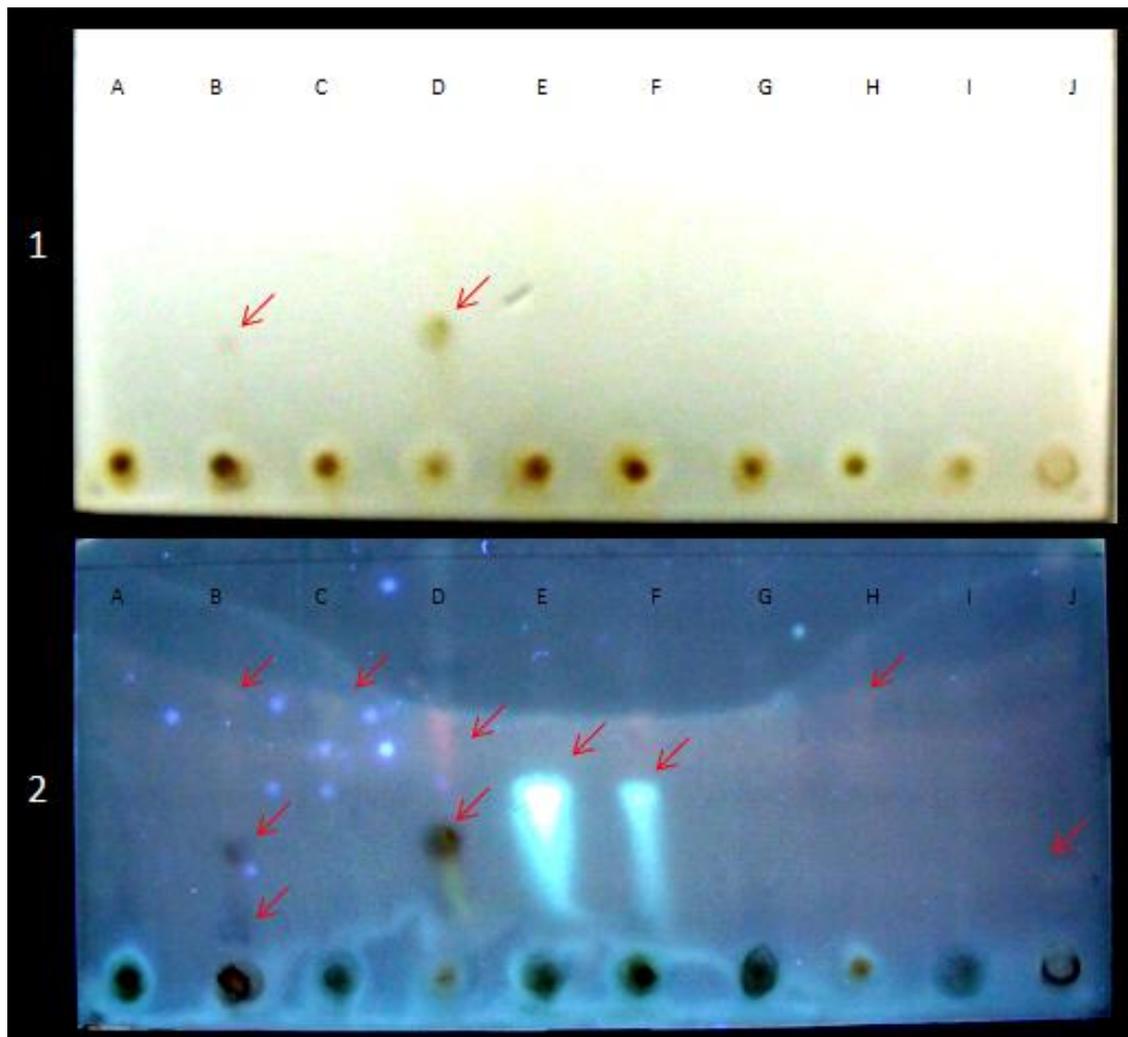


Fig. 26 Cromatografías de las raíces trasformadas y tejido vegetal no transformado (*in vitro* y *in vivo*), la placa se reveló con reactivo de Marquis, la placa 1 vista en luz visible y placa 2 vista en UV 356nm; *Ariocarpus kotschoubeyanus* (A,B), *Echinocactus grusonii* (C, D), *Echinocactus platyacanthus* (*Echinocactus ingens*) (E, F), *Ferocactus peninsulae* (G, H), *Stenocereus thurberi var thurberi* (I, J). Nota, el primer carril corresponde a la especie trasformada y el segundo al tejido vegetal no transformado.

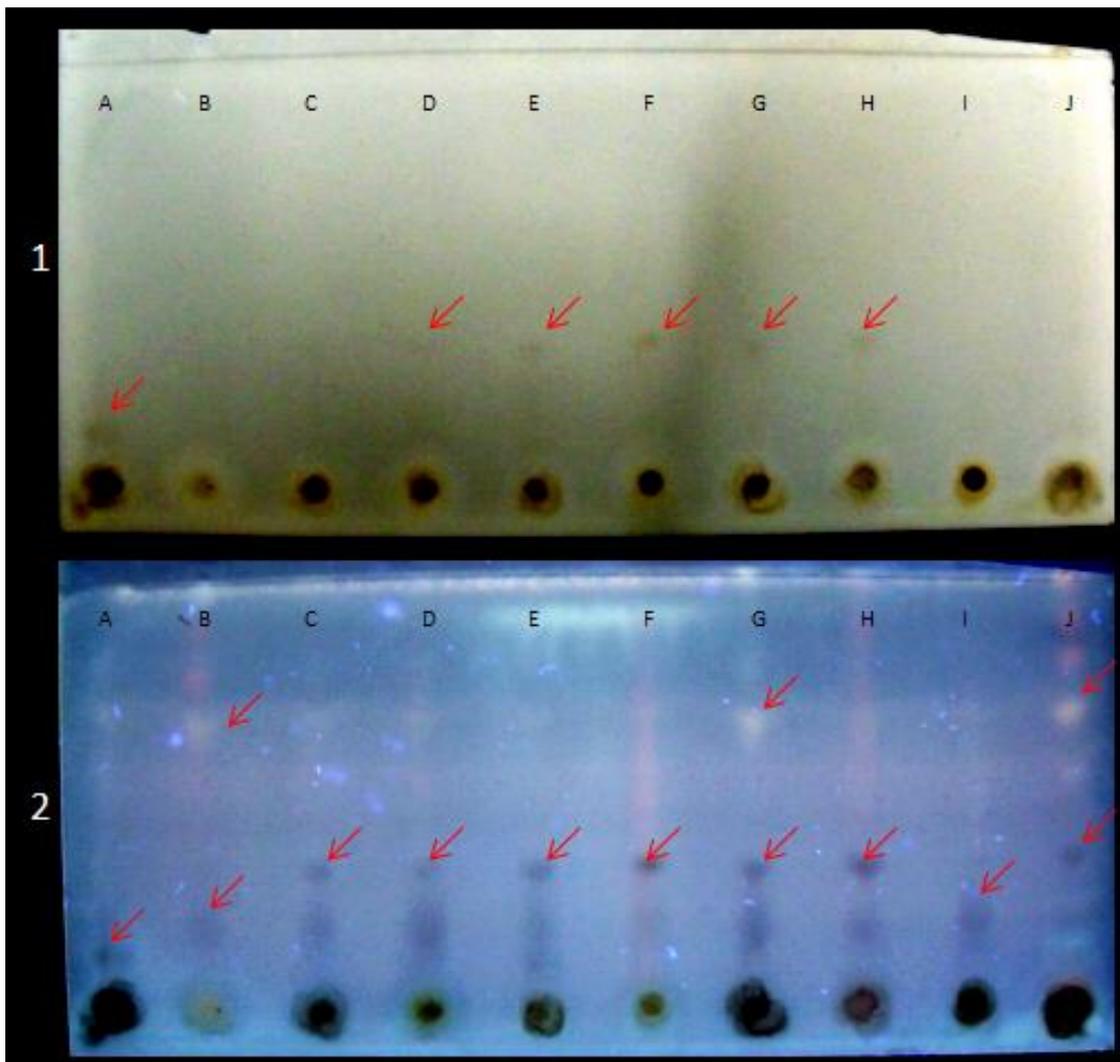


Fig. 27 Cromatografías de las raíces transformadas y tejido vegetal no transformado (*in vitro* y *in vivo*), la placa se reveló con reactivo de Marquis, la placa 1 vista en luz visible y placa 2 vista en UV 356nm; *Turbinicarpus schmiedickeanus* var *schwarzii* (A, B), *Turbinicarpus laui* (C, D), *Turbinicarpus lophophoroides* (E, F), *Turbinicarpus pseudopectinatus* (G, H), *Turbinicarpus schmiedickeanus* var *klinkerianus* (I, J). Nota, el primer carril corresponde a la especie transformada y el segundo al tejido vegetal no transformado.

V. 17 Raíces Después de los Tratamientos

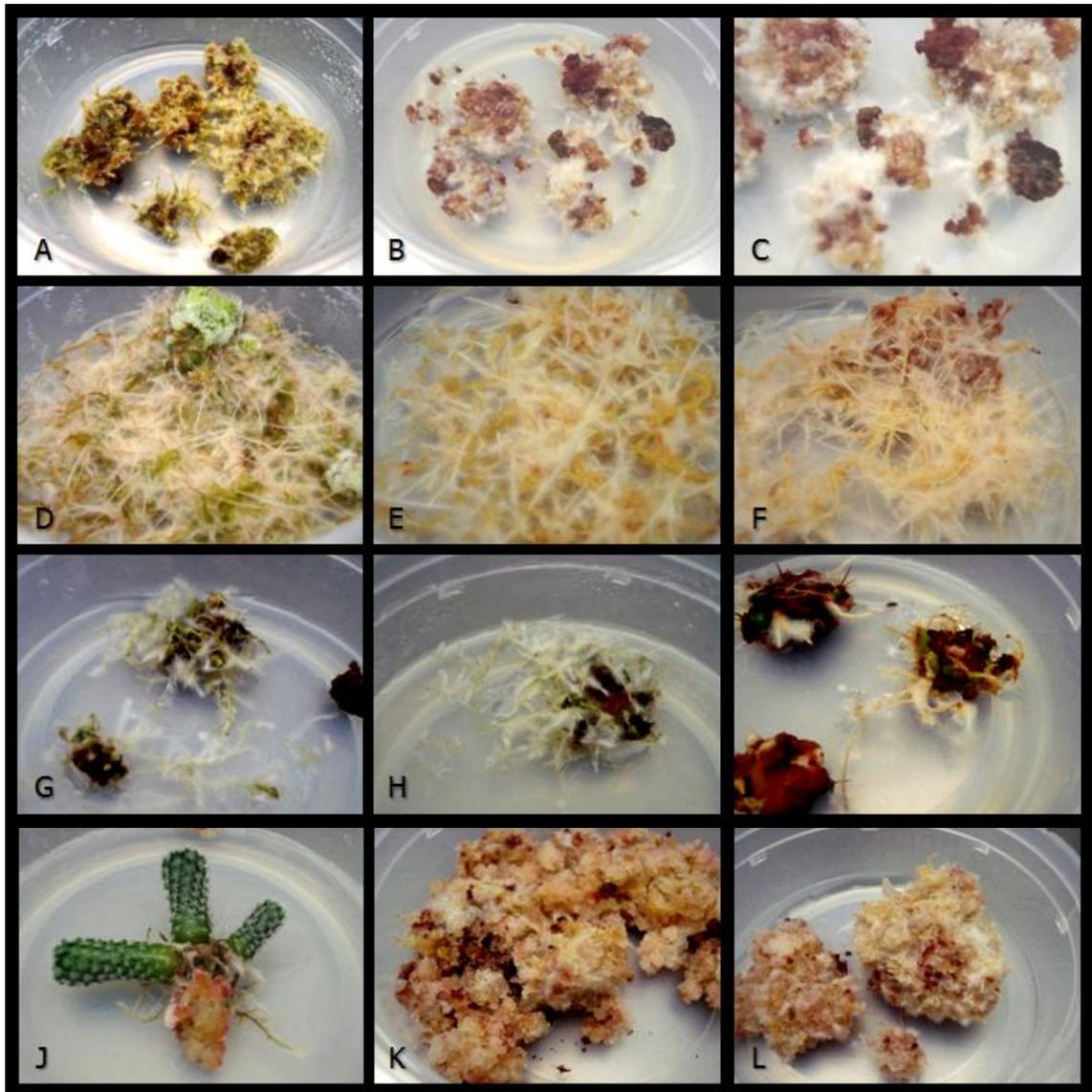


Fig. 28 Raíces transformadas después de los sistemas de cultivo. *Turbinicarpus schmedickeanus* var *schwarzii* (A, B, C), *Turbinicarpus lophophoroides* (D, E, F), *Ferocactus peninsulæ* (G, H, I), *Turbinicarpus laui* (J), *Turbinicarpus pseudopectinatus* (K, L).

Después de los tratamientos varias de las especies presentaron crecimiento, por lo cual se pasaron a recipientes más amplios para ver como se comportaban, por lo que en la figura 28 se observa que varias de las especies tuvieron una respuesta positiva al cambio de recipiente, donde se generó raíz, tejido calloso, y brotes.

VI. DICUSION

Los eventos efectuados en el trabajo de tesis, fue la transformación con *Agrobacterium rhizogenes* en 52 especies de cactáceas mexicanas para la generación y cultivos de raíces transformadas con el objeto que por medio de métodos cualitativos determinar si las raíces transformadas contienen los mismos metabolitos secundarios y en la misma cantidad que el tejido normal. Así también ver cuáles son las mejores condiciones para el cultivo de dichas raíces. Al efectuar la transformación genética en las 52 especies de cactáceas mexicanas se dan varias etapas para que la infección sea exitosa.

Para la confirmación de dicho éxito se pueden realizar varias pruebas que con ayuda de genes marcadores se puede saber si el tejido vegetal contiene en su genoma genes procedentes de la bacteria. Por tal razón la bacteria que se utilizó en este proyecto es la cepa de *Agrobacterium rhizogenes A4* con el vector binario pESC4 que contiene en la región de ADN-T el gen *nptII* con el promotor y terminador *nos*, y el gen *gus* con el promotor *cab* y el terminador *ocs* (Gonzalez Diaz, 2006). Los genes marcadores que contiene la bacteria son el gen *nptII* y el gen *gus*, son genes que otorgan a la células transgénicas que lo expresan una importante ventaja, con respecto a las células no transgénicas, al permitirles crecer en un medio de cultivo que contiene un agente selectivo correspondiente como es el caso del gen *nptII*, que codifica para una proteína que confiere resistencia a agentes fitotóxicos como antibióticos o herbicidas, las células que lo expresen podrán crecer y desarrollarse en medio de cultivo que contenga dichos agentes selectivos mientras que las células no transgénicas no lo harán (selección negativa). El gen *gus* es un marcador visualizable que posibilita la observación directa de las células que lo expresan.

Teniendo en cuenta lo antes dicho, para confirmar la naturaleza transgénica en cada una de las especies de cactáceas que fueron infectadas con *Agrobacterium rhizogenes*, fue mediante la adición de Kanamicina al medio de selección, puesto que el gen *nptII* es un gen que codifica para la 3-fosfotrasferasa e inactiva por fosforilación una amplia gama de antibióticos aminoglúcidos como lo es la kanamicina, por tal razón la kanamicina inhibe el crecimiento de células no transformadas donde se da un proceso de necrosis del tejido hasta la muerte de aquellos explantes que no están

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

presuntamente transformados, al contrario de los explantes que mostraron un crecimiento normal en el medio de selección.

Otra prueba que se realizó fue un ensayo histoquímico para la β -glucuronidasa, ya que es una prueba contundente de que ocurrió un evento de transformación, por lo que el ensayo es específico para la actividad de la β -glucuronidasa. El promotor *cab* que contiene el gen *gus* es inducible por luz, dado que este promotor fue tomado del gen que codifica para las proteínas que unen clorofilas "a" y "b" que participan en la fotosíntesis, fue necesario sacar las raíces a la luz por más de una semana con el fin de encender este promotor. Ahora el gen *gus* fue tomado de la bacteria *E. coli*, éste codifica para la producción de la β -glucuronidasa, ya que esta proteína no es propia de las plantas, el gen se utiliza como marcador para detectar el éxito de una transformación con la presencia de una coloración azul en el sitio de actividad de la enzima, indicando la presencia del gen en las células vegetales.

De las 52 especies sometidas a transformación, 42 de ellas generaron raíz, donde el género *Turbinicarpus sp.* fue susceptible a la transformación ya que de las 14 especies que de éste género, las 14 generaron raíz, teniendo en cuenta que este género está en peligro de extinción además que son cactáceas de talla pequeña por lo que se imposibilita el estudio y aprovechamiento de este género, también el género *Ferocactus sp.*, de las 9 especies que se transformaron de éste género, 7 generaron raíz; no fue el caso para el género *Astrophytum sp.*, ya que de las 6 especies que se transformaron solo una generó raíz y en un solo explante. Esto sugiere que hay géneros más susceptibles a la transformación con *Agrobacterium rhizogenes* A4.

Al realizar la transformación se observó la oxidación de los explantes en el cocultivo en medio sólido, este fenómeno se presentó al elevado contenido de compuestos fenólicos y nitrogenados (Trease y Evans, 1987). Por lo que esta condición se erradicó en medida utilizando en el cocultivo líquido antioxidantes como el ácido ascórbico y ácido cítrico, evitando así la necrosis de los explantes (González et al, 2006).

Se observó que el mejor crecimiento de las raíces se da durante los primeros 30 días, esto se puede deber a que el medio MS en el que se encuentra contiene los nutrientes necesarios para un buen crecimiento, pero a medida que pasa el tiempo el medio se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

va agotando, evitando así que la raíz pueda absorber los nutrientes y evitar un el desarrollo de crecimiento de las raíces.

Para la cuantificación y la medición de cada una de las raíces en los diferentes explantes de las 52 especies transformadas, se observó que el número de raíces por explante es muy variable en todas las especies por lo que tenemos errores estándar casi iguales a los de la media, indicando que a pesar de ser explantes de la misma especie todos se comportan diferente. Una probable explicación es que cada célula que compone al explante puede ser mayormente susceptible a la infección y a la probable transformación que otras células, lo que da como resultado que un solo explante presente un gran número de raíces y otro explante de la misma especie presente solo una raíz (González et al., 2006).

Al realizar los diferentes sistemas de cultivo; convencional, líquido, incubación (luz y temperatura), y la adición de diferentes compuestos orgánicos (extracto de malta, hidrolizado de caseína, y agua de coco), se observó que los mejores sistemas de cultivo para que las raíces se desarrollen mejor, fueron el sistema convencional y el sistema de incubación en luz, ya que el crecimiento fue considerablemente mayor que los otros sistemas de cultivo. Las raíces que crecieron en el sistema de incubación en luz presentaron en la raíz gran pilosidad que es característico de la enfermedad de la raíz pilosa, ya que este fenotipo es producto de los genes rol, también presentaron un engrosamiento de raíz, una coloración verde y un geotropismo positivo indicativo de actividad fotosintética. Esto se explica como efectos debidos a la introducción y expresión de los genes involucrados en la transformación, alteran vías morfogénicas (Tepfer, 1991). Por otro lado también se observó el desarrollo de tejido calloso en el explante (Figura 15) que puede deberse a la exposición del explante al medio MS ó bien a la producción intrínseca de citocininas por el explante. De las raíces generadas también se presentó el crecimiento de raíces nuevas en el explante que se explica con el hecho de que las cactáceas tienen ciclos internos de desarrollo de raíces secundarias cuya función es la absorción de agua y presentan su crecimiento antes del periodo de lluvias, preparándose para tener una mayor superficie de absorción (Anderson 2001) en otras palabras, sus células podrían reconocer ciclos fisiológicos internos.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Cuando se resembró los explantes en un medio MS nuevo, esto es que los explantes eran sometidos a estrés, ya que sufrían incisiones (heridas en el tejido vegetal), la raíz era retirada de explante para ser cultivada de forma individual, así también el pasar los explantes de una caja petri a un recipiente más amplio, donde las raíces tenían un mayor contacto con el oxígeno, se observó un desmesurado crecimiento de raíces (Figura 28), tal fue el caso para *Turbincarpus lophophoroides* que se ha logrado la micropropagación de la raíz de forma individual.

Otra de las pruebas para la confirmación de los genes en el genoma vegetal fue la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se efectuó con ADN de 27 diferentes especies de cactáceas mexicanas, de las 30 especies que fueron positivas a GUS no se contaba con suficiente material, por lo que se trabajó con 23 especies que fueron positivas a GUS y 4 especies que fueron negativas a la prueba GUS. De las cuales 9 fueron positivas a los genes; *rol B*, *nptII* y *gus*, siendo negativas para el gen *vir D*, este gen debe de dar negativo ya que al realizar la transformación el gen de virulencia no se trasfiere al genoma vegetal, solo ayuda al T-ADN a entrar en el genoma vegetal, por tanto este gen nos sirve como control para no tener un falso positivo, ya que puede darse el caso de que al extraer el ADN vegetal, la bacteria todavía esté presente en el explante y sea el ADN de la bacteria lo que estemos analizando en vez de ADN vegetal. También de las 27 especies analizadas 9 de ellas fueron positivas a todos los genes ya antes mencionados, lo que indica que la bacteria todavía se encontraba presente en el explante al momento de realizar la extracción del ADN vegetal. Se muestran una serie de evidencias que permite asegurar que el proceso de transformación fue exitoso, como la generación de raíces, el crecimiento en kanamicina, el resultado positivo al ensayo GUS y la observación de los insertos (*rol B*, *nptII* y *gus*) en los productos de amplificación (tabla 5).

En la obtención de los extractos de metabolitos secundarios del tipo alcaloide de raíces transformadas y tejido vegetal no transformado, se observó que tanto las raíces transformadas así como el tejido vegetal no transformado sintetizan metabolitos secundarios tipo alcaloide (figura 24, 25, 26 y 27), sin embargo en la mayoría de los extractos del tejido vegetal no transformado se observó mayor concentración de metabolitos secundarios y en ocasiones presento mayor número de metabolitos secundarios en comparación de las raíces transformadas. Tal no fue el caso para la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

especie de *Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)* que presentó una mayor concentración de metabolitos secundarios tipo alcaloide en el extracto de las raíces transformadas y que se observa en los tres sistemas de detección; UV visible (356nm), reactivo de Dragendorff y Marquis. La especie *Turbincarpus laui* muestra un patrón similar al extracto de raíces transformadas y el tejido vegetal no transformado (Figura 24). En Revelado con Reactivo de Dragendorff, que es un reactivo para determinar metabolitos secundarios tipo purinas y efedrinas (Wagner y Bladt, 1996), como se muestra en la Figura 25 las especies *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Echinocactus grusonii*, *Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)*, *Ferocactus peninsulæ* presentan este tipo de alcaloides. Para el revelado con reactivo de Marquis que detecta metabolitos secundarios derivados del opio (Wagner y Bladt, 1996).

La extracción de metabolitos secundarios se puede ver afectada por la cantidad de raíz transformada, así como de tejido vegetal no transformado que se utiliza para cada especie, puesto que no fue la misma cantidad de tejido debido a que no de todas las especies contábamos con material suficiente para esta prueba. Ya que las pruebas realizadas son cualitativas y no cuantitativas, la cantidad de tejido utilizado para cada especie no tiene que ser un peso determinado.

En la placa vista a Luz visible y a UV 356nm, muestra que las especies; *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Echinocactus grusonii*, *Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)*, *Ferocactus peninsulæ*, *Turbincarpus schmiedickeanus var schwarzii*, *Turbincarpus lophophoroides*, *Turbincarpus pseudopectinatus*, mostraron mayor concentración de metabolitos secundarios en tejido vegetal no transformado en comparación de las raíces transformadas. Por otro lado *Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)* presento mayor concentración de un metabolito secundario en la raíz transformada en comparación del tejido vegetal no transformado. *Turbincarpus laui* presenta un patrón similar de metabolitos secundarios tanto en la raíz transformada como en el tejido vegetal no transformado.

Las placas que se revelaron con el reactivo de Dragendorff, *Ariocarpus kotschoubeyanus*, presento un patrón similar de los metabolitos secundarios en raíz transformada como en el tejido vegetal no transformado. *Echinocactus platyacanthus (Echinocactus ingens)*, *Turbincarpus schmiedickeanus var schwarzii*, *Turbincarpus*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

lophophoroides y *Turbincarpus pseudopectinatus*, tienen una mayor concentración de metabolitos secundarios en raíces transformadas que en tejido vegetal no transformado, por otro lado *Echinocactus grusonii* y *Turbincarpus laui* presentaron menor concentración de metabolitos secundarios en raíz transformada que en tejido vegetal no transformado.

El revelado de las placas de sílice gel con el reactivo de Marquis se observa que, *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Echinocactus grusonii*, presentan mayor concentración de metabolitos secundarios en tejido vegetal no transformado que en raíces transformadas. Por otro lado *Echinocactus platyacanthus* (*Echinocactus ingens*) tiene mayor concentración de metabolitos secundarios en raíz transformada que en tejido vegetal no transformado. Mientras que *Turbincarpus schmiedickeanus var schwarzii*, *Turbincarpus laui*, *Turbincarpus lophophoroides*, *Turbincarpus pseudopectinatus*, *Turbincarpus schmiedickeanus var klinkerianus*, tiene un patrón similar de metabolitos secundarios en raíz transformada, que en tejido vegetal no transformado, lo que sugiere que no hay alteración en las rutas de biosíntesis implicadas para dichos metabolitos en las especies antes mencionadas.

Los resultados obtenidos de éste trabajo de tesis indican que será necesario continuar con la investigación donde se logre una producción abundante de raíces como es el caso de los biorreactores, así como la identificación de los metabolitos secundarios encontrados en los extractos, implementando un análisis mediante la cromatografía de gases acoplado a masas, y ver su utilidad en las áreas médico, industrial y farmacéutica.

VII. CONCLUSIONES

- Se probó que la cepa *Agrobacterium rhizogenes* A4 pESC4, es altamente efectiva en la transformación de cactáceas mexicanas para la generación de raíces transgénicas.
- Se probaron 52 especies de cactáceas Mexicanas, encontrándose que el 81% generaron raíces presuntamente transformadas. Las especies *Echinocactus grusonii*, *Echinocactus platyacanthus* (*Echinocactus ingens*), *Opuntia amyoclea*, *Opuntia ficus-indica*, *Stenocereus thurberi* var *thurberi*, *Turbincarpus schmedickeanus* var *klinkerianus* y *Turbincarpus laui* presentaron un mayor porcentaje de explantes que generaron raíz.
- Las especies *Echinocactus platyacanthus*, *Echinocactus grusonii*, *Ferocactus peninsulae*, *Ferocactus rectispinus*, *Stenocereus thurberi* var *thurberi*, *Turbincarpus schmedickeanus* var *schwarzii*, *Turbincarpus pseudopectinatus* y *Turbincarpus schmedickeanus* var *klinkerianus* presentaron un mayor número de raíces por explante
- De las 42 especies de cactáceas mexicanas que generaron raíz, solo 30 de ellas fueron positivas a la prueba GUS, siendo éstas; *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Astrophytum híbrido myriostigma x ornatum*, *Echinocactus grusonii*, *Echinocactus platyacanthus* (*Echinocactus ingens*), *Epithelantha micromeris*, *Escobaria chaffeyi* (*E. dasyacantha* subsp. *chaffeyi*), *Ferocactus glaucescens*, *Ferocactus peninsulae*, *Ferocactus rectispinus*, *Pilosocereus chrysacanthus*, *Turbincarpus hoferi*, *Turbincarpus pseudopectinatus*, que presentaron más del 75% de actividad GUS.
- Se observó que el mayor crecimiento de la raíz se da en los primeros 30 días después de cada subcultivo.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- El sistema de incubación en luz presentó mejores resultados en el crecimiento de raíces transformadas a comparación de los otros sistemas de cultivos probados durante este trabajo.
 - Las raíces transformadas presentaron pilosidad en la raíz, indicativo del gen *rolB*, así como variantes morfológicas como; geotropismo positivo, pigmentación verde a la exposición a la luz, desarrollo de tejido calloso con pigmentación, indicativo de actividad fotosintética.
 - De las 27 especies que se amplificaron los genes (*rolB*, *virD*, *nptII* y *gus*) por la técnica de PCR, 9 de ellas fueron positivas para *rolB*, *nptII* y *gus*, Esto indica que la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* inserto su T-ADN en el genoma vegetal.
 - Los extractos obtenidos de raíces generadas *in vitro* y tejido vegetal (*in vitro*, *in vivo*), demostraron la síntesis de metabolitos secundarios tipo alcaloide (opinas, purinas y efedrina) por medio de cromatografía en capa fina.
 - Se demostró la posibilidad de generar y cultivar raíces transformadas de 42 especies de cactáceas mexicanas. Estas raíces podrían ser la base de un sistema biotecnológico que permita la producción de metabolitos secundarios de cactáceas sin la necesidad de coleccionar plantas de su hábitat natural.

VIII. GLOSARIO

- Aux: Gen para la formación de auxinas
- DNA: Ácido desoxyrribonucleico
- dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato
- EDTA: Ácido etilendiaminotetracético
- *gus*: Gen de la β -glucuronidasa
- PM: Marcador de peso molecular
- MS: Medio de cultivo Murashige y Skoog
- *nptII*: Gen de la neomicina fisfotransferasa
- ORF: Regiones codificadoras, marcos de lectura abierta (open reading frames)
- pb: Pares de bases
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- pRi: Plásmido inductor de raíces
- pTi: Plásmido inductor de tumores
- rol: Genes inductores de raíces
- rpm: Revoluciones por minuto
- TAE: Tampón Tris-ácido acético-EDTA
- T-DNA: ADN transferido
- TLC: Cromatografía de capa fina
- vir: Genes de virulencia
- x-Glu: Sustrato cromogénico (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -Dglucorónido)

IX. BIBLIOGRAFIA

- Ackermann C., *Pflanzen aus Agrobacterium rhizogenes*–Tumoren an *Nicotiana tabacum*. *Plant Sci Lett* 8:23–30; 1977
- Aird, E.L.H.; Hamill, J.D. y Rhodes, M.J.C. (1988) Cytogenetic analysis of hairy root cultures from a number of plant species transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 15: 47-57.
- Anderson E. F., *The Cactus Family*. - Timber Press, Portland 2001.
- Azlan G. J., Marziah M., Radzali M., Johari R., Establishment of *Physalis minima* hairy roots culture for the production of physalins. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 69:271–278; 2002
- Balandrin M.F., Klocke J.A., Wurtele E.S., Bollinger W.H., Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228:1154–1160; 1985
- Banerjee S., Rahman L., Uniyal G. C., Ahuja P. S., Enhanced production of valepotriates by *Agrobacterium rhizogenes* induced hairy root cultures of *Valeriana wallichii* DC. *Plant Sci.* 131:203–208; 1998.
- Barz, W.H. y Oksman-Caldentey, K.M. (2002) Plant Biotechnology- An emerging field. En: *Plant Biotechnology and Transgenic Plants*. K.M. Oksman-Caldentey and W.H. Barz (eds.), Marcel Dekker, New York. pp. 1-21.
- Bellincampi D., Cardarelli M., Zaghi D., Serino G., Salvi G., Gatz C., Cervone F., Altamura M. M., Constantino P., De-Lorenzo G., Oligogalacturonides prevent rhizogenesis in *rolB* transformed tobacco explants by inhibiting auxin-induced expression of the *rolB* gene. *Plant Cell* 84:77–487; 1996
- Benítez H., Dávila P., 2002. Las cactáceas mexicanas en el contexto de las CITES. *CONABIO. Biodiversidad* 40:8-11

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Bensaddek, L.; Gillet, F.; Saucedo, J.E.N. y Fliniaux, M.A. (2001) The effect of nitrate and ammonium concentration on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. J. Biotechnol. 85: 35-40.
 - Boitel-Conti M., Gontier E., Laberche J. C., Ducrocq C., Sangwan- Noreel B. S., (1996) Inducer effect of Tween 20 permeabilization treatment used for release of stored tropane alkaloids in *Datura innoxia* Mill. hairy root cultures. Plant Cell Rep 16:241–24
 - Bourgaud F., Bouque V., Gontier E., Guckert A., Hairy root cultures for the production of secondary metabolites. AgBiotech News Inform. 9: 205-208, 1997.
 - Bravo-Hollis H., Sánchez-Mejorada H., Las Cactáceas de México. Vol. I y III. - Universidad Nacional Autónoma de México, México 1991.
 - Buchanan R. B., Gruissem W., Jones R. L., Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists; 2000:1177–1189
 - Cardarelli M., Mariotti D., Pomponi M., Spanò L., Capone I., Costantino P., *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. Mol Gen Genet 209:475–480; (1987a)
 - Cardarelli M., Spanò L., De Paolis A., Mauro M.L., Vitali G., Costantino P., Identification of the genetic locus responsible for non-polar root induction by *Agrobacterium rhizogenes* 1855. Plant Mol Biol 5:385–391; 1985
 - Cardarelli M., Spanò L., Mariotti D., Mauro L., van Sluys M. A., Costantino P., The role of auxin in hairy root induction. Mol Gen Genet 208:457–463; (1987b)
 - Carneiro M., Vilaine F., Differential expression of the *rolA* plant oncogene and its effect on tobacco development. Plant J 3:785– 792; 1993
 - Charlwood B. V., Charlwood K. A., Terpenoid production in plant cell culture. In: Harborne, J. B., Tomas-Barberan, F. A., eds. Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids. Oxford: Clarendon Press; 1991:95–132.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Chilton M. D., Tepfer D. A., Petit A., David C., Casse-Delbart F., Tempe J., *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295:432–434; 1982
 - Christey M. C., Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37:687–700; 2001
 - CITES "www.cactuscenterclub.com/Articulos/Proteccion/01sosocactus.htm"
 - Collier R., Fuchs B., Walter N., Kevin L. W., Taylor C. G., Ex Vitro composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. *Plant J* 43:449–457; 2005
 - Conn H.J., Validity of the genus *Alcaligenes*. *J Bacteriol* 44:353–360; 1942
 - Costantino P., Spano L., Pomponi M., Benvenuto E., Ancora G., The T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* is transmitted through meiosis to the progeny of hairy root plants. *J Mol Appl Genet* 2:465–470; 1984
 - Davioud E., Petit A., Tate M.E., Ryder M.H., Tempe J., Cucumopine—a new T-DNA-encoded opine in hairy root and crown gall. *Phytochemistry* 27:2429–2433; 1988
 - De Cleene M., De Ley J., The host range of infectious hairy roots [*Agrobacterium rhizogenes*]. *Bot Rev* 47:147–194; 1981
 - Dehio C., Grossmann K., Schell J., Schmulling T., Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants overexpressing the *rolA* gene of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant Mol Biol* 23:1199–1210; 1993
 - Dehio C., Schell J., Stable expression of a single-copy *rolA* gene in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants allows an exhaustive mutagenic analysis of the transgene-associated phenotype. *Mol Gen Genet* 241:359–366; 1993

- Dilorio A. A., Cheetham R. D., Weathers P. J., Carbon dioxide improves the growth of hairy roots cultured on solid medium and in nutrient mists. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:463–467; 1992b.
- Diouf D., Gherbi H., Prin Y., Franche C., Duhoux E., Bogusz D., Hairy root nodulation of *Casuarina glauca*: a system for the study of symbiotic gene expression in an actinorhizal tree. *Mol Plant Microbe Interact* 8:532–537; 1995
- Doernenburg H., Knorr D., (1995) Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme Microb Technol* 17:674–684
- Drewes F. E., Staden J. V., Initiation of and solasodine production in hairy root cultures of *Solanum mauritianum* Scop. *Plant Growth Regul* 17:27–31; 1995
- Ermayanti, T.M.; McComb, J.A. y O'Brien, P.A. (1993) Cytological analysis of seedling roots, transformed root cultures and roots regenerated from callus of *Swainsona galegifolia* (Andr.) R. Br. *J. Exp. Bot.* 44: 375-380.
- Estramareix C., Ratet P., Boulanger F., Richaud F., Multiple mutations in the transferred regions of the *Agrobacterium rhizogenes* root-inducing plasmids. *Plasmid* 15:245; 1986
- Estruch J. J., Parets-Soler A., Schmülling T., Spena A., Cytosolic localization in transgenic plants of the rolC peptide from *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Mol Biol* 17:547–550; 1991b
- Faiss M., Strnad M., Redig P., Dolzak K., Hanus J., Van Onckelen H., Schmuelling T., Chemically induced expression of the rolC encoded β -glucuronidase in transgenic tobacco plants and analysis of cytokinin metabolism: RolC does not hydrolyze endogenous cytokinin glucosides in planta. *Plant J* 10:33–46; 1996
- Farmer A. M., Carbon uptake by root systems. In: Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U., eds. *Plant roots the hidden half*. 2nd edn. New York: Marcel Dekker; 1996:679–687.

- Filetici P., Spanò L., Costantino P., Conserved regions in the T-DNA of different *Agrobacterium rhizogenes* root inducing plasmid. *Plant Mol Biol* 9:19–26; 1987
- Filippini F., Rossi V., Marin O., Trovato M., Costantino P., Downey P. M., Lo Schiavo F., Terzi M., A plant oncogene as a phosphatase. *Nature* 379:499–500; 1996
- Flores H.E., Vivanco J.M., Loyola-Vargas V.M., Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends Plant Sci* 4:220–226; 1999
- Flores, H.E. (1987) Use of plant cells and organ culture in the production of biological chemicals. En: *Biotechnology in Agricultural Chemistry*. HM LeBaron, RO Mumma, RC Honeycutt, JH Duesing, (eds.) ACS Symp. Ser. 334. Washington, DC: American Chemical Society, pp 66-86.
- Flores, H.E. y Filner, P. (1985) Metabolic relationships of putrescine, GABA and alkaloids in cell and root cultures of *Solanaceae*. En: *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures*. Neumann, K.H.; Barz, W. y Reihard, E. (eds.) Berlin, Germany: Springer-Verlag, pp. 568-578.
- Fowler M. W., (2006) Plants, medicines and man. *J Sci Food Agric* 86 (12):1797–1804
- Gelvin S. B. *Agrobacterium VirE2* proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm. *J Bacteriol* 180:4300–4302; 1998
- Georgiev M. I., Pavlov A. I. Bley T., Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:1175–1185; 2007
- Gheysen, G.; Angenon, G. y Van Montagu, M. (1998) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: a scientifically intriguing story with significant applications. En: Lindsey K (ed.) *Transgenic plant research*. Harwood, Amsterdam, pp. 1-33.
- Giri A. M., Narasu L., Transgenic hairy roots: recent trends and applications, *Biotechnology Advances*. 18, 1-22, 2000.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Giri A., Giri C. C., Dhingra V., Narasu M. L., Enhanced podophyllotoxin production from *Agrobacterium rhizogenes* transformed cultures of *Podophyllum hexandrum*. Nat Prod Lett 15:229–235; 2001
 - Giri, A. y Narasu, M.L. (2000) Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnol. Adv. 18: 1-22.
 - Giri, A.; Baberjee, S.; Ahuja, P.S. y Giri, C.C. (1997) Production of hairy roots in *Aconitum heterophyllum* Wall. Using *Agrobacterium rhizogenes*. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 33: 280-284.
 - González-Díaz M. C., Pérez-Reyes M. E., Pérez-Molphe-Balch E., *In vitro* analysis of susceptibility to *Agrobacterium rhizogenes* in 65 species of Mexican cacti, *Biología Plantarum* (3): 331-337, 2006.
 - Guillon S., Tremouillaux-Guiller J., Pati P. K., Rideau M., Gantet P., Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. Trends Biotechnol 24:403–409; 2006a
 - Guillon S., Tremouillaux-Guiller J., Pati P. K., Rideau M., Gantet P., Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. Curr Opin Plant Biol 9:341–346; 2006b
 - Hamill J. D., Lidgett A. J., Hairy root cultures—opportunities and key protocols for studies in metabolic engineering. In: Doran P (ed) Hairy roots: Culture and Applications. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1997: pp1–30
 - Han K. H., Keathley D. E., Davis J. M., Gordon M. P., Regeneration of a transgenic woody legume (*Robinia pseudoacacia* L. black locust) and morphological alterations induced by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. Plant Sci 88: 149–157; 1993
 - Hansen G., Vaubert D., Clerot D., Tempe J., Brevet J., A new open reading frame, encoding a putative regulatory protein, in *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. C R Acad Sci III 317:49–53; 1994

- Haseloff J., Siemering K. R., Prasher D. C., Hodge S., Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. Proc Natl Acad Sci U S A 94:2122–2127; 1997
- Henzi M. X., Christey M. C., McNeil D. L., Factors that influence *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). Plant Cell Rep. **19**: 994-999, 2000.
- Hernandez H. M., y Godínez H. A., Contribución al Conocimiento de las Cactáceas Mexicanas Amenazadas, Acta Botánica Mexicana, 26:36-52, 1994.
- Hildebrand E., Life history of the hairy-root organism in relation to its pathogenesis on nursery apple trees. J Agric Res 48:857–885; 1934
- Hodges L. D., Cuperus J., Ream W., *Agrobacterium rhizogenes* GALLS protein substitutes for *Agrobacterium tumefaciens* single-stranded DNA-binding protein VirE2. J Bacteriol 186:3065–3307; 2004
- Innes, C. and C. Glass 1991 Cacti. Portland House, New York, NY. 320 pp.
- Isogai A., Fukuchi N., Hayashi M., Kamada H., Harada H., Suzuki A., Mikimopine, an opine in hairy roots of tobacco induced by *Agrobacterium rhizogenes*. Phytochemistry 29:3131–3134; 1990
- Isogai A., Fukuchi N., Hayashi M., Kamada H., Harada H., Suzuki A., Structure of a new opine, mikimopine, in hairy root induced by *Agrobacterium rhizogenes*. Agric Biol Chem 52:3235–3237; 1998
- Jaziri, M.; Shimomura, K.; Yoshimatsu, K.; Fauconnier, M.L.; Marlier, M. y Homès, J. (1995) Establishment of normal and transformed root cultures of *Artemisia annua* L. for artemisinin production. J. Plant Physiol. 145: 175-177.
- Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W., GUS fusions: β - Glucuronidase as sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6:3901–3907; 1987

- Jeong G. T., Park D. H., Ryu H. W., Hwang B., Woo J. C., (2004) Effects of inoculum conditions on growth of hairy roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Appl Biochem Biotechnol* 113–116:1193–1203

- Jofre-Garfias A. E., Villegas-Sepúlveda N., Cabrera-Ponce J. L., Adame-Alvarez R. M., Herrera-Estrella L., Simpson J., *Agrobacterium*-mediated transformation of *Amaranthus hypochondriacus*: light- and tissue-specific expression of pea chlorophyll *a/b*-binding protein promoter. - *Plant Cell Rep.* 16: 847-852, 1997.

- Kieran P., (2001), Bioreactor design for plant cell suspension cultures. In: Cabral JMS (ed) *Principles of multiphase reactor design*. Harwood Academic Publishers, pp 391–426

- Kim Y., Wyslozil B. E., Weathers P. J., Secondary Metabolism of Hairy root Cultures in Biorreactor, *In Vitro Cell.* 38:1-10, 2002.

- Kiselev K. V., Dubrovina A. S., Veselova M. V., Bulgakov V. P., Fedoreyev S. A., Zhuravlev Y. N., The rolB gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *J Biotechnol* 128:681–692; 2007

- Krolicka A., Staniszewska I. I., Bielawski K., Malinski E., Szafranek J., Lojkowska E., Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. *Plant Sci* 160:259–264; 2001

- Le Flem-Bonhomme V., Laurain-Mattar D., Fliniaux M. A., (2004) Hairy root induction of *Papaver somniferum* var. *album*, a difficult-to-transform plant by *A. rhizogenes* LBA 9402. *Planta* 218:890–893

- Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E., Mroginski L., *Biotechnology y Mejoramiento Vegetal II*, Argen Bio, Segunda Edicion, Intituto Nacional de Trecnologia Agropecuaria (INTA), 2010.

- Lourenço, P.M.L.; De Castro, S.; Martins, T.M.; Clemente, A. and Domingos, A. (2002) Growth and proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: effect of nitrogen and sucrose. *Enz. Microb. Technol.* 31: 242-249.

- Maldonado-Mendoza, I.E.; Ayora-Talavera, T. y Loyola-Vargas, V.M. (1993) Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33: 321-329.
- Mano Y., Nabeshima S., Matsui C., Ohkawa H., (1986) Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agric Biol Chem* 50:2715–2722
- Mano, Y.; Ohkawa, H. y Yamada, Y. (1989) Production of tropane alkaloid by hairy root cultures of *Duboisia leichhardtii* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Sci.* 59: 191-201.
- Martin-Tanguy J., Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regul* 34:135–148; 2001
- Martin-Tanguy J., Sun Y., Burtin D., Vernoy R., Rossin N., Tepfer D., Attenuation of the Phenotype caused by the root-inducing, lefthand, transferred DNA and its rolA gene (correlations with changes in polyamine metabolism and DNA methylation). *Plant Physiol* 111:259–267; 1996
- Maurel C., Barbier-Brygoo H., Spena A., Tempe J., Guern J., Single rol genes from the *Agrobacterium rhizogenes* T(L)-DNA alter some of the cellular responses to auxin in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol* 97:212–216; 1991
- Maurel C., Leblanc N., Barbier-Brygoo H., Perrot-Rechenmann C., Bouvier-Durand M., Guern J., Alterations of auxin perception in rolB-transformed tobacco protoplasts. Time course of rolB mRNA expression and increase in auxin sensitivity reveal multiple control by auxin. *Plant Physiol* 105:1209–1215; 1994
- Melody, S. C. 1997. *Plant Molecular Biology. A laboratory manual.* Springer-Verlag. New York. Pp 1-74
- Meyer A., Tempe J., Costantino P., Hairy root: a molecular overview functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. In: Stacey G, Keen N (eds) *Plant-microbe interactions*, vol. 5. APS Press, St. Paul, Minnesota, 2000: pp 93 139

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Moore L., Warren G., Strobel G., Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid* 2:617–626; 1979
 - Moriguchi K., Maeda Y., Satou M., Hardayani N. S., Kataoka M., Tanaka N., Yoshida K., The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in *Rhizobiaceae*. *J Mol Biol* 307:771– 784; 2001
 - Muehlbach H. P., (1998) Use of plant cultures in biotechnology. In: El- Gewely MR (ed) *Biotechnology annual review*, vol 4. Elsevier Science BV, pp 113–176
 - Mugnier J., Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep* 7:9–12; 1988
 - Murashige, Skoog, 1962, Medio de Murashige y Skoog *Physiol. Plant.* 15: 473 - 97.
 - Nilsson O., Little C. H., Sandberg G., Olsson O., Expression of two heterologous promoters, *Agrobacterium rhizogenes rolC* and cauliflower mosaic virus 35S, in the stem of transgenic hybrid aspen plants during the annual cycle of growth and dormancy. *Plant Mol Biol* 31:887–895; 1996^a
 - Nilsson O., Olsson O., (1997) Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes rol*-genes in the formation of hairy roots. *Physiol Plantarum* 100:463–473
 - Nin S., Bennici A., Roselli G., Mariotti D., Schiff S., Magherini R., (1997) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Artemisia absinthium* L. (wormwood) and production of secondary metabolites. *Plant Cell Rep* 16:725–730
 - Nussbbaumer, P.; Kapetanidis, I. y Christen, P. (1998) Hairy roots of *Datura candida* X *D. aurea*: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Rep.* 17: 405-409.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Palazon J., Moyano E., Cusido R. M., Bonfill M., Oksman-Caldentey K. M., Pinol M. T., (2003a) Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy roots and plants overexpressing the h6h gene. *Plant Sci* 165:1289–1295
 - Park S. U., Facchini P.J., (2000) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham. root cultures. *J Exp Bot* 347:1005–1016
 - Parr, A.D. Hamill, J.D. (1987) Relationship between *Agrobacterium rhizogenes* transformed hairy root and intact, uninfected *Nicotiana* plants. *Phytochemistry* 26: 3241-3245.
 - Pavlov A., Georgiev V., Kovatcheva P., (2003) Relationship between type and age of inoculum and betalains biosynthesis by *B. vulgaris* hairy root culture. *Biotechnol Lett* 25:307–309
 - Pavlov A., Kovatcheva P., Georgiev V., Koleva I., Ilieva M., (2002) Biosynthesis and radical scavenging activity of betalains during the cultivation of Red beet (*Beta vulgaris*) hairy root cultures. *Z Naturforsch C* 57:640–644
 - Payne J., Hamill J. D., Robins R. J., Rhodes M. J. C., (1987) Production of hyoscyamine by hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Planta Med* 53:474–478
 - Payne, M.A.; Hamill, J.D.; Robins, R.J. y Rhodes, M.J.C. (1987) Production of hyoscyamine by hairy root culture of *Datura stramonium*. *Planta Med.* 53: 474-478.
 - Petit A., David C., Dahl G., Ellis J., Guyon P., Casse-Delbart F., Tempé J., Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* co-operate for opine degradation. *Mol Gen Genet* 190:204–214; 1983
 - Phelep M., Petit A., Martin L., Duhoux E., Tempe J., Transformation and regeneration of a nitrogen-fixing tree, *Allocasuarina verticillata* Lam. *Bio/Technology* 9:461–466; 1991

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Porter J. R., Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. Crit Rev Plant Sci 10:387–421; 1991
 - Prinsen E., Chriqui D., Vilaine F., Tepfer M., Van Onckelen H., Endogenous phytohormones in tobacco plants transformed with *Agrobacterium rhizogenes* pRi TL-DNA genes. Plant Physiol 144:80–85; 1994
 - Ramsay, G. y Kumar, A. (1990). Transformation of *Vicia faba* cotyledon and stem tissues by *Agrobacterium rhizogenes*: infectivity and cytological studies. J. Exp. Bot. 41: 841–847.
 - Rao S.R., Ravishankar G., Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol Adv 20:101–153; 2002
 - Raskin I., Ribnicky D.M., Komarnytsky S., Ilic N., Poulev A., Borisjuk N., Brinker A., Morena D. A., Ripoll C., Yakoby N., O'Neal J., Cornwell T., Pastor I., Fridlender B., (2002) Plants and human health in the twenty-first century. Trends Biotechnol 20:522 531
 - Riker A.J., Banfield W.M., Wright W.H., Keitt G.W., Sagen H.E., Studies on infectious hairy root of nursery-apple tree. J Agric Res 41:507–540; 1930
 - Riker A.J., Banfield W.M., Wright. W.H., Keitt G.W., Sagen H.E., Studies on infectious hairy root of nursery-apple tree. J Agric Res 41:507–540; 1930
 - Robins R. J., Bent E. G., Rhodes M. J. C., Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids by *Datura stramonium* L. transformed root cultures. 3. The relationship between morphological integrity and alkaloid biosynthesis. Planta 185:385–390; 1991.
 - Rossi L., Hohn B., Tinland B., Integration of complete transferred DNA units is dependent on the activity of virulence E2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*. Proc Natl Acad Sci U S A 93:126– 130; 1996
 - Ryder M. H., Tate M. E., Kerr A., Virulence properties of strains of *Agrobacterium* on the apical and basal surfaces of carrot root discs. Plant Physiol 77:215–221; 1985

- Schmülling T., Fladung M., Grossmann K., Schell J., Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single rol genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant J* 3:371–382; 1993
- Schmulling T., Schell J., Spena A., Promoters of the rolA, B, and C genes of *Agrobacterium rhizogenes* are differentially regulated in transgenic plants. *Plant Cell* 1:665–670; 1989
- Schmulling T., Schell J., Spena A., Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *EMBO J* 7:2621–2629; 1988
- Schumacher, H.M.; Malik, K.A. y Iren, F.V. (1995) Technical information sheet No. 13: simple storage of plant cell cultures in liquid media, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 703-705.
- Sevon N., Oksman-Caldentey K. M., *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Med* 68:859–868; 2002
- Shanks J.V., Morgan J., (1999) Plant "hairy root" culture. *Curr Opin Biotechnol* 10:151–155
- Shanks, J.V. y Morgan, J. (1999) Plant 'hairy root' culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 151-155.
- Shen W. H., Davioud E., David C., Barbier-Brygoo H., Tempe J., Guern J., High sensitivity to auxin is a common feature of hairy root. *Plant Physiol* 94:554–560; 1990
- Shen W. H., Petit A., Guern J., Tempe J., Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3417–3421; 1988
- Shimomura, K.; Sudo, H.; Saga, H. y Komada, H. (1991) Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Rep.* 10: 282-285.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Sim S. J., Chang H. N., Liu J. R., Jung K. H., (1994) Production and secretion of indole alkaloids in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: effect of in situ adsorption, fungal elicitation and permeabilization. *J Ferment Bioeng* 78:229–234
 - Sivakumar G., Yu K. W., Hahn E. J., Paek K. Y., (2005) Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors. *Curr Sci* 89:641–649
 - Slightom J. L., Durand-Tardif M., Jouanin L., Tepfer D., Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. Identification of open reading frames. *J Biol Chem* 261:108–121; 1986
 - Smith E.F., Townsend C.O., A plant-tumor of bacterial origin. *Science* 25:671–673; 1907
 - Spanò L., Costantino P., Regeneration of plants from callus cultures of roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* on tobacco. *Z Pflanzenphysiol* 106:87–92; 1982
 - Spanò L., Mariotti D., Cardarelli M., Branca C., Costantino P., Morphogenesis and auxin sensitivity of transgenic tobacco with Different complements of Ri T-DNA. *Plant Physiol* 87:479–483;1988
 - Srivastava S., Srivastava A. K., Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Crit Rev Biotechnol* 27:29– 43; 2007
 - Sun L. Y., Monneuse M. O., Martin-Tanguy J., Tepfer, D., Changes in flowering and accumulation of polyamines and hydroxycinnamic acid-polyamine conjugates in tobacco plants transformed by the rolA locus from the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Sci* 80:145–146; 1991
 - Suzuki K., Tanaka N., Kamada H., Yamashita I., Mikimopine synthase (mis) gene on pRi1724. *Gene* 263:49–58; 2001

- Tempé, J y Casse-Delbart, F. (1989) Plant vectors and plant transformation: *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmids. En: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Schell, J.; Vasil, K. (eds.), San Diego, USA: Academic Press, pp. 26-49.
- Tepfer D., Metzger L., Prost R., Use of roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* in rhizosphere research: applications in studies of cadmium assimilation from sewage sludges. Plant Mol Biol 13:295–302; 1989
- Tepfer D., Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes*: a source of genes having applications in rhizosphere biology and plant development, ecology and evolution. In: Kosuge T, Nester E (eds) Plant–microbe interactions. McGraw-Hill, New York, 1989: pp 294–342
- Tepfer D., Tempé J., Production d’agropine par des racines formées sous l’action d’*Agrobacterium rhizogenes*, souche A4. C R Acad Sci 292:153–156; 1991
- Tepfer D., Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. Cell 37:959–967; 1984
- Trease G. E., and W. C. Evans. 1987. Tratado de Farmacognosia. 12ª Edición. Ed. Interamericana, S.A. México. pp. 3,4, 79 - 82, 85, 86, 121, 253, 254, 281, 558, 561, 562, 683-685.
- Tyler V. E., I. R. Brady, J. E. Robbers, 1979 Farmacognosia. 2ª Edición. Ed. "El ateneo" Pedro Garcia S.A. Argentina. pp. 3, 7 - 11, 31, 32, 36, 65, 89, 95, 114, 116, 117, 150, 170, 197 - 199, 274, 275.
- Tzfira T., Citovsky V., (2003) The *Agrobacterium*–plant cell interaction. Taking biology lessons from a bug. Plant Physiol 133:943– 947
- Vansuyt G., Vilaine F., Tepfer M., Rossingnol M., rolA modulates the sensitivity to auxin of the proton translocation catalyzed by the plasma membrane H⁺-ATPase in transformed tobacco. FEBS Lett 298:111–115; 1992

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Venna V., Taylor C. G., *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *Plant* 43:383-403; 2007
 - Vilaine F., Casse-Delbart F., A new vector derived from *Agrobacterium rhizogenes* plasmids: a micro-Ri plasmid and its use to construct a mini-Ri plasmid. *Gene* 55:105–114; 1987
 - Wagner, H., Blatt, S.: *Plant Drug Analysis*. 2nd Ed. - Springer-Verlag, Berlin 1996.
 - Waller G. R., Nowacki E. K., *Alkaloid biology and metabolism in plants*. - Plenum Press, New York 1978.
 - Weising K., Kahl G., (1996) Natural genetic engineering of plant cells: the molecular biology of crown gall and hairy root disease. *World J Microbiol Biotechnol* 2:327–351
 - Weller S. A., Stead D. E., O'Neill T. M., Hargreaves D., McPherson G. M., *Rhizogenic Agrobacterium* biovar 1 strains and cucumber root mat in the UK. *Plant Pathol* 49:43–50; 2000
 - Weller S. A., Stead D. E., Young J. P., Acquisition of an *Agrobacterium Ri* plasmid and pathogenicity by other alpha-Proteobacteria in cucumber and tomato crops affected by root mat. *Appl Environ Microbiol* 70:2779–2785; 2004
 - Weller S. A., Stead D. E., Young J. P., Recurrent outbreaks of root mat in cucumber and tomato are associated with a monomorphic, cucumopine, Ri-plasmid harboured by various Alphaproteobacteria. *EMS Microbiol Lett* 258:136–43; 2006
 - White F. F., Nester E. W., Hairy root: plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol* 141:1134–1141; 1980b
 - White F. F., Taylor B. H., Huffman G. A., Gordon M. P., Nester E. W., Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol* 164:33–44; 1985

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- White L.O., The taxonomy of the crown gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to Rhizobia and to other *Agrobacterium*. J Gen Microbiol 77:565–574; 1972
 - Wilhelmson A., Hakkinen S. T., Kallio P.T., Oksman-Caldentey K. M., Nuutila A. M., (2006) Heterologous expression of Vitreoscilla hemoglobin (VHb) and cultivation conditions affect the alkaloid profile of Hyoscyamus muticus hairy roots. Biotechnol Prog 22:350–358
 - Wysokinska H., Chmiel A., (1997) Transformed root cultures for biotechnology. Acta Biotechnol 17:131–159
 - Xie D., Zou Z., Ye H., Li H., Guo Z., (2001) Selection of hairy root clones of Artemisia annua L. for artemisinin production. Isr J Plant Sci 49:129–134
 - Yadav N. S., Van der Leyden J., Bennett D. R., Barnes W. M., Chilton M. D., Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. Proc Natl Acad Sci U S A 79:6322–6326; 1982
 - Yibrah H. S., Gronroos R., Lindroth A., Franzen H., Clapham D., Arnold S. V., *Agrobacterium rhizogenes*-mediated induction of adventitious rooting from Pinus contorta hypocotyls and the effect of 5-azacytidine on transgene activity. Transgen Res 5:75–85; 1996
 - Yokoyama R., Hirose T., Fujii N., Aspuria E. T., Kato A., Uchimiya H., The rolC promoter of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants. Mol Gen Genet 244:15–22; 1994
 - Yusibov V. M., Steck T. R., Gupta V., Gelvin S. B., Association of single-stranded transferred DNA from *Agrobacterium tumefaciens* with tobacco cells. Proc Natl Acad Sci U S A 91:2994–2998; 1994
 - Zhao J., Davis L. C., Verpoorte R., (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol Adv 23:283–333

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Zupan J. R., Citovsky V., Zambryski P., *Agrobacterium VirE2* protein mediates nuclear uptake of single-stranded DNA in plant cells. Proc Natl Acad Sci U S A 93:2392–2397; 1996



5 % p/v	Triton X-100
----------------	--------------

*STET + lisozima: 7.5mg de lisozima / 10ml de STET

Las soluciones de tomaron de laboratorio previamente preparadas (soluciones stock)

- Dilucion 1:100 para Tris HCl pH8 1M
Para 10ml se tomaron 100µl de Tris HCl 1M
- Dilución 1:50 de NaCl 5M
Para 100ml se tomaron 200µl de NaCl 5M
- Dilución 1:500 de EDTA 0.5M (500mM)
Para 10ml se tomaron 20 µl de EDTA 0.5M
- Triton X-100 5% p/v

1000ml ----- 5gr
10ml ----- 0.05gr

Para 10ml de solución STET se pesaron 0.05gr de Triton, luego se agregan todos los compuestos ya mencionados y se afora a un volumen final de 10ml con agua desionizada estéril.

2X Read Mix REDTaq Sigma

- MgCl2 numero de catalogo R2648
- Tris- HCl 20mM
- pH 8.3
- KCl 100mM
- MgCl2 3mM
- Gelatina 0.002%
- Mezcla dNTP 0.4mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Estabilizadores

0.06 U/ μ l de Taq ADN Polimeraza

PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO MS

Preparación de las soluciones concentradas para el medio MS.

SOLUCION A.

Concentración: 1 000 X. Volumen: 50 mL

Cloruro de calcio	CaCl ₂ - 2H ₂ O	22.000 g
-------------------	---------------------------------------	----------

SOLUCION B.

Concentración: 1 000 X. Volumen: 50 mL

Yoduro de potasio	KI	41.50 mg
-------------------	----	----------

Cloruro de cobalto	CoCl ₂ - 6H ₂ O	1.25 mg
--------------------	---------------------------------------	---------

SOLUCION C.

Concentración: 400 X. Volumen: 50 mL

Fosfato monobasico de K	KH ₂ PO ₄	3.400 g
-------------------------	---------------------------------	---------

Ac. borico	H ₃ BO ₃	0.124 g
------------	--------------------------------	---------

Molibdato de sodio	NaMoO ₄	0.005 g
--------------------	--------------------	---------

SOLUCION D.

Concentración: 400 X. Volumen: 50 mL

Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 - 7 \text{H}_2\text{O}$	7.400 g
Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 - \text{H}_2\text{O}$	0.340 g
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$	0.172 g
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 - 5\text{H}_2\text{O}$	0.50 mg

SOLUCION E.

Concentración: 200 X. Volumen: 100 mL

Sulfato ferroso	$\text{Fe SO}_4 - 7 \text{H}_2\text{O}$	0.557 g
EDTA disódico	$\text{Na}_2 \text{EDTA}$	0.745 g

Se disolvió ambos componentes por separado, para se requirió calentar. Luego se agregó poco a poco la solución de Fe a la de EDTA y se aforo. La mezcla debe de quedar de color amarillo sin precipitados.

SOLUCION F.

Concentración 100 X. Volumen: 100 mL

Glicina	20.00 mg
Piridoxina HCl	5.00 mg
Ac. nicotínico	5.00 mg
Tiamina HCl	1.00 mg
Mio inositol	1.00 g

Las soluciones se almacenan en frascos limpios (lavados y enjuagados con agua destilada) y en refrigeración.

Cuando ya se tienen las soluciones stock preparadas, se utilizan para la preparación de medio MS

Solución	Volumen (ml)
A	1
B	1
C	2.5
D	2.5
E	5
F	10

Posteriormente se pesan, añaden y se agitan hasta disolver los siguientes compuestos:

Sacarosa	30.00 g
Nitrato de potasio	1.90 g
Nitrato de amonio	1.65 g

Luego que los compuestos se han disuelto, se ajusto el pH del medio a 5.7 con NaOH 1N o HCl 1N, y luego se aforo con agua destilada.

- Para medio de cultivo liquido

El medio líquido se vacía en los recipientes que se utilizan para la transformación (recipientes con 45 y 90 ml de medio líquido), se esterilizan a 121°C por 20min, se sellan y se almacenan para su posterior uso.

- Para medio de cultivo sólido

Se pesan 8 g/L de agar como gelificante y se añade al medio en un matraz de 1L (con una mosca para agitación dentro del matraz), posteriormente se esteriliza a 121°C por 20 min y una vez esterilizado se pone en agitación para disolver el gelificante. Una vez que el medio se encuentra a una temperatura de 35°C se vacía en cajas petri (30ml por caja petri), todo en condiciones asépticas (campana de flujo laminar así como material estéril), cuando el medio se enfría se sellan las cajas y se refrigeran para luego ser usadas.

Para medio de selección se sigue el mismo procedimiento, solo que antes de vaciar a cajas petri se añade la 50 mg/L de kanamicina como agente selectivo y 250 ml/L de Claforan* para eliminar la bacteria.

*Esterilizado por filtración

SOLUCIÓN DE EXTRACCIÓN DE ADN POR EL MÉTODO DE BROMURO DE CETLDIMETILETILAMONIO (CTAB)

CTAB	4%
NaCl	1.4M
Tris HCl pH8	100mM
B-mercaptoetanol	2% Anadir inmediatamente antes de usar

REACTIVO DE DRAGENDORFF (Warner y Bladt, 1996)

Utilidad: Detección de alcaloides y compuestos nitrogenados heterocíclicos.

Solución A: Disolver 0.85 g de nitrato básico de bismuto en 10ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua bajo calor. Si es necesario, filtrar.

Solución B: Disolver 8 gr de Yoduro de potasio en 30 ml de agua

Solución madre: Mezclar 1:1 las soluciones A y B.

Reactivo en aerosol: 1 ml de la solución madre es mezclado con 2 ml de ácido acético glacial y 10 ml de agua.

Intensificación de manchas: Después del tratamiento con el reactivo de DRG, a la placa se le puede aplicar un segundo aerosol de nitrito de sodio acuoso al 10% o de ácido sulfúrico etanólico al 10%. Esto intensifica las zonas coloreadas; el nitrito las vuelve café oscuras y el H₂SO₄, naranja brillante.

REACTIVO DE MARQUIS (Warner y Bladt, 1996)

Utilidad: Detección de alcaloides derivados de la morfina.

Diluir de 3 ml de formaldehido en 100 ml de ácido sulfúrico concentrado. Las placas son evaluadas en luz visible inmediatamente después de aplicar el aerosol.