



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

EFICIENCIA DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO*
EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE CACTÁCEAS

PRESENTA

Biol. Rocío Shantal Suárez Mercado

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

TUTOR

Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch

COMITÉ TUTORAL

M. en C. Lucía Isabel Chávez Ortiz
M. en C. Martha Cristina González Díaz

Aguascalientes, Ags., Diciembre de 2012



Centro de Ciencias Básicas

BIOL. ROCÍO SHANTAL SUÁREZ MERCADO
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) Suárez:

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: "**Eficiencia de Diferentes Sistemas de Cultivo *in vitro* en 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., 20 de noviembre de 2012
"SE LUMEN PROFERRE"
EL DECANO SUSTITUTO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo
MCGD,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 **Biol. Rocío Shantal Suárez Mercado**, 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: "EFICIENCIA DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO* EN 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 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

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
PRESENTE:

Estimado M. en C. Ruíz Gallegos:

Por este medio le comunico que la **Biol. Rocío Shantal Suárez Mercado**, 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: "EFICIENCIA DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO* EN 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 a su impresión definitiva y al examen de grado.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags. a 13 de Noviembre de 2012

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

MC Lucía Isabel Chávez Ortiz
Comité Tutorial
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 **Biol. Rocío Shantal Suárez Mercado**, 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: "EFICIENCIA DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO* EN 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

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



Agradecimientos

Quiero agradecer

A Dios por permitirme cumplir siempre mis planes en esta vida.

Especialmente a mis papás Efraín y Rocío

Por siempre estar a mi lado apoyándome, por alentarme a superarme, su amor incondicional y siempre creer en mí, los amo papás.

A mi hermano Efraín de Jesús

Por su cariño de toda la vida y por su amistad, te amo.

A mis tías Ernestina e Italia

Por su ejemplo de superación y por sus palabras de apoyo durante mi desarrollo profesional, las quiero.

A mis abuelitos

Por sus lecciones de vida y amor, los quiero.

A mis tíos y primos

Por su cariño y palabras de aliento en cada paso que he dado, los quiero mucho.

Al M. en C. Jesús Alvarado

Por su amistad, apoyo y amor, por compartirme su experiencia y consejos para llevar a cabo este proyecto, te amo.

A Martha Pérez, Adilene Dávila y a mis compañeros de laboratorio

Por su apoyo y consejos para la elaboración de este trabajo y recorrer junto a mí éste camino.

Al Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch

Por confiar en mí para realizar este estudio, por compartir sus conocimientos y experiencias, pero sobre todo por contribuir en mi formación profesional

A la M. en C. Lucía Chávez y a la M. en C. Martha Cristina González

Por su ayuda y consejos para la elaboración de esta tesis

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 376953 y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por darme la oportunidad de ser orgullosamente Universitaria

A todos los profesores que contribuyeron en mi formación y a mis compañeros de maestría.

Índice General

Acrónimos	20
Resumen	22
Abstract	23
1. Introducción	24
1.1 Marco Teórico	25
1.1.1 Generalidades de las Cactáceas	25
1.1.1.1 Descripción botánica	27
1.1.1.2 Clasificación	30
1.1.1.3 Usos de las Cactáceas	31
1.1.1.4 Metabolitos de las Cactáceas	36
1.1.2 Raíces transformadas	38
1.1.3 Clasificación de <i>Agrobacterium</i>	40
1.1.3.1 <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	41
1.1.4 Transformación genética con <i>Agrobacterium</i>	42
1.1.4.1 Inducción de raíces transformadas en la naturaleza	42
1.1.4.2 Inducción de raíces transformadas <i>in vitro</i>	45
1.1.4.3 Diferencias entre <i>A. rhizogenes</i> y <i>A. tumefaciens</i>	49

1.1.4.4	Modo de infección por <i>A. rhizogenes</i>	51
1.1.4.5	Rangos de hospedantes	54
1.1.5	Cultivo de raíces pilosas de plantas con <i>A. rhizogenes</i>	55
1.1.5.1	Cultivo de raíces transformadas de cactáceas	56
1.2	Justificación	58
2.	Hipótesis de trabajo	60
3.	Objetivo general	61
3.1	Objetivos particulares	61
4.	Metodología	62
4.1	Cultivo y análisis de la cepa <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	62
4.1.1	Cepa seleccionada para la transformación	62
4.1.2	Preparación de YM y cultivo bacteriano	63
4.1.3	Confirmación de que la bacteria contiene los genes de interés	65
4.1.3.1	Extracción de ADN de <i>Agrobacterium</i> utilizando lisozima	65
4.1.3.2	Análisis por PCR de la bacteria A4/ESC4	65
4.2	Inducción de raíces transformadas	67

4.2.1 Cactáceas seleccionadas	67
4.2.2 Preparación de medio MS (Murashige y Skoog)	70
4.2.3 Primera parte: Cocultivo	70
4.2.4 Preparación de medio de selección	71
4.3.5 Segunda parte: Medio de selección	71
4.2.6 Cultivo de raíces en medio semisólido	72
4.2.7 Análisis de raíces generadas	72
4.3 Sistema de cultivo en medio líquido (CML)	73
4.4 Sistema de cultivo en medio líquido con agitación (CMLA)	74
4.5 Sistema de inmersión temporal automático (RITA®)	74
4.6 Comparación de los diferentes sistemas de cultivo	75
4.7 Pruebas de comprobación de las raíces transformadas	75
4.7.1 Prueba GUS en raíces generadas	75
4.7.2 Análisis por PCR de los genes de interés de raíces presuntamente transformadas	76

4.7.2.1 Extracción de ADN de raíces generadas	76
4.7.2.2 PCR del ADN de raíces generadas	77
4.8 Análisis cualitativo de metabolitos secundarios mediante cromatografía en capa fina (TLC)	78
4.8.1 Extracción y análisis de metabolitos	78
5. Resultados	79
5.1 PCR del cultivo <i>Agrobacterium rhizogenes</i> A4	79
5.2 Análisis de cactáceas infectadas por <i>A. rhizogenes</i>	80
5.3 Crecimiento de las raíces generadas en medio MS semisólido	84
5.3.1 Curvas de crecimiento de las raíces generadas en medio semisólido	91
5.4 Sistemas de cultivo diferentes al medio semisólido convencional	105
5.4.1 Sistema de cultivo en medio líquido	105
5.4.2 Sistema de cultivo en medio líquido con agitación	115
5.4.3 Sistema de inmersión temporal (RITA®)	125
5.5 Comparación del crecimiento de raíces en diferentes sistemas de cultivo	132

5.5.1 Curvas de crecimiento relativo de los diferentes sistemas de cultivo	132
5.5.2 Comparación de la generación de raíces en los diferentes sistemas de cultivo	141
5.6 Pruebas de comprobación de raíces transformadas	143
5.6.1 Prueba histoquímica para el gen β -Glucoronidasa (GUS) de raíces generadas.	143
5.6.1.1 Observación de explantes y raíces en luz (previo a la prueba gus)	147
5.6.2 Análisis por PCR de raíces generadas	150
5.7 Análisis cualitativo de metabolitos secundarios mediante cromatografía en capa fina (TLC)	152
5.8 Cultivo masivo de raíces transformadas	155
6. Discusión	156
7. Conclusión	169
8. Glosario	171
9. Bibliografía	177
10. Anexos	186

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Metabolitos secundarios analizados en diferentes cactáceas	37
Cuadro 2. Orden de oligos para PCR de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> A4	66
Cuadro 3. Especies de cactáceas seleccionadas	67
Cuadro 4. Respuesta de 60 especies de cactus a la infección con <i>A. rhizogenes</i> A4 con el método convencional (MSS)	81
Cuadro 5. Promedio de número de raíces durante los diferentes tratamientos	141
Cuadro 6. Resultados de la amplificación por PCR	150

Índice de Gráfica y Figuras

Figura 1. Cultivo de raíces pilosas después de 2 meses de ser transferidas a medio libre de hormonas	42
Figura 2. Estructura química de la acetosiringona y algunas opinas	43
Figura 3. Diagrama de flujo para la inducción de cultivos de raíces pilosas y algunas de sus aplicaciones	46
Figura 4. Estructura del plásmido Ri de <i>A. rhizogenes</i>	52
Figura 5. Inducción de raíces pilosas en segmentos de brote de <i>Mammillaria plumosa</i> y <i>Pachycereus schottii</i> infectadas con <i>A. rhizogenes</i>	57
Figura 6. Mapa del plásmido pRiA4	62
Figura 7. Mapa del plásmido pESC4	63
Figura 8. Electroforesis del análisis por PCR	79
Gráfica 1. Porcentaje de generación de raíces	80
Figura 9. Generación de raíces adventicias (i)	84
Figura 10. Generación de raíces adventicias (ii)	85
Figura 11. Pelos radicales de raíces inducidas con <i>A. rhizogenes</i>	86

Figura 12. Análisis de raíces generadas	87
Figura 13. Crecimiento de raíces (15 días) en medio semisólido	87
Figura 14. Crecimiento de raíces (60 días) en medio semisólido	88
Figura 15. Ramificaciones en raíces inducidas con <i>A. rhizogenes</i>	89
Figura 16. Crecimiento y ramificaciones de raíces generadas	90
Figura 17. Proceso de resiembra de raíces generadas	91
Gráfica 2. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Browningia candelaris</i>	92
Gráfica 3. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Carnegiea gigantea</i>	92
Gráfica 4. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Cephalocereus senilis</i>	92
Gráfica 5. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Coryphantha clavata</i>	92
Gráfica 6. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Coryphantha durangensis</i>	93
Gráfica 7. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Coryphantha macromeris</i>	93

Gráfica 8. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Coryphantha radians</i>	93
Gráfica 9. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Echinocereus (Morangaya) pensilis</i>	93
Gráfica 10. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Echinocereus adustus</i> var <i>adustus</i>	94
Gráfica 11. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Echinocereus enneacanthus</i> var <i>enneacanthus</i>	94
Gráfica 12. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Echinocereus ferreirianus</i> var <i>lindsayi</i> (<i>E. lindsayi</i>)	94
Gráfica 13. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Echinocereus knippelianus</i>	94
Gráfica 14. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Echinocereus knippelianus</i> (<i>E. knippelianus</i> var <i>kruegeri</i>)	95
Gráfica 15. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Echinocereus longisetus</i> (<i>Echinocereus freudenbergeri</i>)	95
Gráfica 16. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Echinocereus longisetus</i> var <i>delaetii</i> (<i>E. delaetii</i>)	95
Gráfica 17. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Echinocereus pulchellus</i> subsp. <i>weinbergii</i>	95

Gráfica 18. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Echinocereus schmollii</i>	96
Gráfica 19. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Echinofossulocactus sp.</i>	96
Gráfica 20. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Echinomastus erectocentrus</i>	96
Gráfica 21. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Frailea asterioides</i>	96
Gráfica 22. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Hylocereus undatus</i>	97
Gráfica 23. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Isolatocereus dumortieri (Stenocereus dumortieri)</i>	97
Gráfica 24. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammillaria senilis (Mamillopsis senilis)</i>	97
Gráfica 25. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammillaria carmenae</i>	97
Gráfica 26. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammillaria rettigiana (M. gilensis)</i>	98
Gráfica 27. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammillaria albiflora (M. herrerae var albiflora)</i>	98

Gráfica 28. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammillaria bocasana</i> var <i>bocasana</i>	98
Gráfica 29. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammillaria crinita</i> (<i>Mammillaria zeilmanniana</i>)	98
Gráfica 30. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammillaria herrerae</i>	99
Gráfica 31. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammillaria hutchisoniana</i> subsp. <i>louisae</i>	99
Gráfica 32. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammillaria jaliscana</i>	99
Gráfica 33. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammillaria oteroi</i>	99
Gráfica 34. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammillaria perbella</i> (<i>M. pseudoperbella</i>)	100
Gráfica 35. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammillaria perezdelarosae</i>	100
Gráfica 36. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammillaria petterssonii</i> (<i>M. obscura</i>)	100
Gráfica 37. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammillaria solisioides</i>	100

Gráfica 38. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammillaria sphacelata</i> var <i>sphacelata</i>	101
Gráfica 39. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammillaria standleyi</i> (<i>M. sonorensis</i> , <i>M. craigii</i>)	101
Gráfica 40. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammillaria theresae</i>	101
Gráfica 41. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Mammilloidia candida</i> (<i>Mammillaria candida</i>)	101
Gráfica 42. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Matucana</i> <i>madisoniorum</i>	102
Gráfica 43. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Melocactus</i> <i>curvispinus</i> var <i>curvispinus</i> (<i>M. oaxacensis</i>)	102
Gráfica 44. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Myrtillocactus geometrizans</i>	102
Gráfica 45. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Myrtillocactus schenckii</i>	102
Gráfica 46. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Pachycereus pringlei</i>	103
Gráfica 47. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Pelecyphora strobiliformis</i>	103

Gráfica 48. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Peniocereus serpentinus</i> (<i>Nyctocereus serpentinus</i>)	103
Gráfica 49. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Polaskia chichipe</i>	103
Gráfica 50. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Selenicereus validus</i>	104
Gráfica 51. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Thelocactus hexaedrophorus</i> var <i>hexaedrophorus</i>	104
Gráfica 52. Curva de crecimiento de las raíces generadas por <i>Thelocactus rinconensis</i> subsp. <i>rinconensis</i>	104
Gráfica 53. Curva de crecimiento en medio líquido de <i>Browningia candelaris</i>	105
Gráfica 54. Curva de crecimiento en medio líquido de <i>Cephalocereus senilis</i>	106
Gráfica 55. Curva de crecimiento en medio líquido de <i>Coryphantha clavata</i>	106
Gráfica 56. Curva de crecimiento en medio líquido de <i>Coryphantha macromeris</i>	107
Gráfica 57. Curva de crecimiento en medio líquido de <i>Echinocereus schmollii</i>	107

Gráfica 58. Curva de crecimiento en medio líquido de <i>Hylocereus undatus</i>	108
Gráfica 59. Curva de crecimiento en medio líquido de <i>Isolatocereus dumortieri</i> (<i>Stenocereus dumortieri</i>)	108
Gráfica 60. Curva de crecimiento en medio líquido de <i>Mammillaria carmenae</i>	109
Gráfica 61. Curva de crecimiento en medio líquido de <i>Mammillaria hutchisoniana</i> subsp. <i>louisae</i>	109
Gráfica 62. Curva de crecimiento en medio líquido de <i>Mammillaria jaliscana</i>	110
Gráfica 63. Curva de crecimiento en medio líquido de <i>Mammillaria sphacelata</i> var <i>sphacelata</i>	110
Gráfica 64. Curva de crecimiento en medio líquido de <i>Mammillaria theresae</i>	111
Gráfica 65. Curva de crecimiento en medio líquido de <i>Melocactus curvispinus</i> var <i>curvispinus</i> (<i>M. oaxacensis</i>)	111
Gráfica 66. Curva de crecimiento en medio líquido de <i>Myrtillocactus schenckii</i>	112
Gráfica 67. Curva de crecimiento en medio líquido de <i>Polaskia chichipe</i>	112

Gráfica 68. Curva de crecimiento en medio líquido de <i>Myrtillocactus schenckii</i>	113
Figura 18. Raíces en medio líquido	114
Gráfica 69. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación <i>Browningia candelaris.</i>	115
Gráfica 70. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación <i>Cephalocereus senilis</i>	116
Gráfica 71. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación <i>Coryphantha clavata</i>	116
Gráfica 72. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación <i>Coryphantha macromeris</i>	117
Gráfica 73. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación <i>Echinocereus schmollii</i>	117
Gráfica 74. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación <i>Hylocereus undatus</i>	118
Gráfica 75. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación <i>Isolatocereus dumortieri (Stenocereus dumortieri)</i>	118
Gráfica 76. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación <i>Mammillaria carmenae</i>	119

Gráfica 77. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación <i>Mammillaria hutchisoniana</i> subsp. <i>louisae</i>	119
Gráfica 78. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación <i>Mammillaria jaliscana</i>	120
Gráfica 79. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación <i>Mammillaria sphacelata</i> var <i>sphacelata</i>	120
Gráfica 80. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación <i>Mammillaria theresae</i>	121
Gráfica 81. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación <i>Melocactus curvispinus</i> var <i>curvispinus</i> (<i>M. oaxacensis</i>)	121
Gráfica 82. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación <i>Myrtillocactus schenckii</i>	122
Gráfica 83. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación <i>Polaskia chichipe</i>	122
Gráfica 84. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación <i>Thelocactus hexaedrophorus</i> var <i>hexaedrophorus</i>	123
Figura 19. Raíces en medio líquido con agitación	124
Gráfica 85. Curva de crecimiento de raíces de <i>Browningia candelaris</i> en el sistema de inmersión temporal (RITA®)	125

Figura 20. Explante en otros tratamientos para comparación con el biorreactor	126
Figura 21. Raíces de <i>Browningia candelaris</i> en el sistema de inmersión temporal (RITA®)	127
Figura 22. Desventajas del sistema de inmersión temporal (RITA®) con raíces	128
Gráfica 86. Curva de crecimiento de raíces de <i>Myrtillocactus schenckii</i> en el sistema de inmersión temporal (RITA®)	129
Figura 23. Raíces de <i>Myrtillocactus schenckii</i> en el sistema de inmersión temporal (RITA®)	130
Gráfica 87. Curva de crecimiento de la longitud de raíces de <i>Myrtillocactus schenckii</i> en el sistema de inmersión temporal	131
Gráfica 88. Curva de crecimiento relativo de <i>Browningia candelaris</i> en diferentes sistemas de cultivo	132
Gráfica 89. Curva de crecimiento relativo de <i>Cephalocereus senilis</i> en diferentes sistemas de cultivo	133
Gráfica 90. Curva de crecimiento relativo de <i>Coryphantha clavata</i> en diferentes sistemas de cultivo	133
Gráfica 91. Curva de crecimiento relativo de <i>Coryphantha macromeris</i> en diferentes sistemas de cultivo	134

Gráfica 92. Curva de crecimiento relativo de <i>Echinocereus schmollii</i> en diferentes sistemas de cultivo	134
Gráfica 93. Curva de crecimiento relativo de <i>Hylocereus undatus</i> en diferentes sistemas de cultivo	135
Gráfica 94. Curva de crecimiento relativo de <i>Isolatocereus dumortieri</i> (<i>Stenocereus dumortieri</i>) en diferentes sistemas de cultivo	135
Gráfica 95. Curva de crecimiento relativo de <i>Mammillaria carmenae</i> en diferentes sistemas de cultivo	136
Gráfica 96. Curva de crecimiento relativo de <i>Mammillaria hutchisoniana</i> subsp. <i>louisae</i> en diferentes sistemas de cultivo	136
Gráfica 97. Curva de crecimiento relativo de <i>Mammillaria jaliscana</i> en diferentes sistemas de cultivo	137
Gráfica 98. Curva de crecimiento relativo de <i>Mammillaria sphaelata</i> var <i>sphaelata</i> en diferentes sistemas de cultivo	137
Gráfica 99. Curva de crecimiento relativo de <i>Mammillaria theresae</i> en diferentes sistemas de cultivo	138
Gráfica 100. Curva de crecimiento relativo de <i>Melocactus curvispinus</i> var <i>curvispinus</i> (<i>M. oaxacensis</i>) en diferentes sistemas de cultivo	138
Gráfica 101. Curva de crecimiento relativo de <i>Myrtillocactus schenckii</i> en diferentes sistemas de cultivo	139

Gráfica 102. Curva de crecimiento relativo de <i>Polaskia chichipe</i> en diferentes sistemas de cultivo	139
Gráfica 103. Curva de crecimiento relativo de <i>Thelocactus hexaedrophorus</i> var <i>hexaedrophorus</i> en diferentes sistemas de cultivo	140
Figura 24. Raíces con actividad GUS (i)	143
Figura 25. Raíces con actividad GUS (ii)	144
Figura 26. Raíces con actividad GUS (iii)	145
Figura 27. Tejido calloso con actividad GUS	146
Figura 28. Raíces en luz	149
Figura 29. Electroforesis de la amplificación por PCR de raíces generadas	151
Figura 30. Cromatogramas de raíces transformadas y tejido normal expuestas en UV a 365 nm	153
Figura 31. Cromatogramas de raíces transformadas y tejido normal reveladas con reactivo de Dragendorff	154
Figura 32. Cromatogramas de raíces transformadas y tejido normal reveladas con reactivo de Marquis expuestas en UV	154
Figura 33. Crecimiento masivo de raíces inducidas con <i>A. rhizogenes</i>	155

Acrónimos

Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN-T	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
ADN-T _L	Ácido desoxirribonucleico de transferencia izquierdo (left)
ADN-T _R	Ácido desoxirribonucleico de transferencia derecho (right)
agr	agropina
aux	auxina
CITES	Convención Internacional sobre el Tráfico de Especies Silvestres de Flora y Fauna Amenazadas
cm	Centímetro
CML	Cultivo en medio líquido
CMLA	Cultivo en medio líquido con agitación
CTAB	Cetiltrimethyammonium bromide. Bromuro de Cetiltrimetilamonio
DE	Desviación estándar
DRG	Dragendorff
EDTA	Sal disódica de ácidoetilendiaminotetraacético
EE	Error estándar
g	gramos
GUS	β -glucoronidasa
h	Hora u horas
kb	Kilobases
L	litros
M	Molar
mg	Miligramos
mL	Militro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MPM	Marcador de peso molecular
MS	Murashige y Skoog
MSS	Medio semisólido convencional

N	Normal
<i>nptII</i>	Neomycin phosphotransferase II. Neomicina fosfotransferasa II
nm	nanómetros
ORF	Open Reading frame. Marcos de lectura abierta
p	Plásmido
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction .Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PPM	Plant Preservative Mixture
psi	Pounds per square inch. Libras por pulgada cuadrada
Ri	Root inducing. Inductor de la raíz
RITA®	Récepteur à Immersion Temporaire Automatique. Reactor de inmersión temporal automático.
rpm	Revoluciones por minuto
S	Unidad de Svedberg
	Sonication Assisted Agrobacterium-mediated Transformation.
SAAT	Transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> y asistida por sonicación
TAE	Buffer Tris - Acetato - EDTA
TE	Solución Tris - EDTA
Ti	Tumor inducing. Inductor de tumor
TLC	Thin layer chromatography. Cromatografía en capa fina
TSS	Transcription start site
UV	Luz ultravioleta
vir	virulencia
vis	Luz visible
YM	Yeast mannitol medium. Extracto de levadura manitol
YMB	Yesat mannitol broth medium. Caldo levadura manitol
µL	Microlitros
°C	Grados centígrados

Eficiencia de Diferentes Sistemas de Cultivo *In Vitro* en Raíces
Transformadas de Cactáceas

Rocío Shantal Suárez Mercado

Resumen

El 85% de las 60 especies de cactáceas inoculadas con *Agrobacterium rhizogenes* A4, generaron raíces, de éstas el 31.4% presentaron 10 o más raíces por explante. *Mammillaria hutchisoniana* subsp. *louisae* mostró el mayor porcentaje de explantes con raíces, con 52.5%, por otro lado el mayor número de raíces por explante lo presentó *Coryphantha clavata*, y la especie *Browningia candelaris* exhibió la mayor longitud de raíces. El 49% de las especies presentaron ramificaciones. De las 45 especies a las que se les hizo la prueba GUS, el 93.33% presentaron actividad β -glucoronidasa. En el sistema en medio líquido con y sin agitación hubo crecimiento de raíces, ramificaciones e incluso generación de raíces, estas respuestas no se representan en las curvas de crecimiento, por ejemplo *M. hutchisoniana* subsp. *louisae* aumentó su número de raíces pero disminuyó su biomasa. La especie *B. candelaris*, al colocarla en el biorreactor RITA® presentó generación de raíces, raíces de mayor longitud, una gran ramificación y engrosamiento de las raíces en pocos días. En cuanto a la especie *Myrtillocactus schenckii* sólo presentó generación de raíces y engrosamiento. La presencia de los genes *rol B*, *nptII* y *gus* en el ADN de raíces transformadas se verificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa, siete especies resultaron positivas. Se evaluó la producción de metabolitos secundarios en 10 especies mediante TLC por tres sistemas de detección: reactivo de Dragendorff, UV-365 nm y reactivo de Marquis, en raíces transformadas y en tejido normal, mostrando la presencia de metabolitos secundarios, donde algunas raíces transformadas exhibieron capacidad biosintética cualitativamente similar y otras diferente en relación con el tejido normal.

Efficiency of Different Systems of Culture *In Vitro* of Transformed
Roots of Cactaceae

Rocío Shantal Suárez Mercado

Abstract

The 85% of the 60 Cacti species inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* A4, generated roots, 31.4% of these presented 10 or more roots per explant. *Mammillaria hutchisoniana* subsp. *louisae* showed the highest percentage of explants with roots, with 52.5%, in other hand the highest number of roots per explant was presented in *Coryphantha clavata* species, and the species *Browningia candelaris* exhibited the maximum length of roots. The 49% of the species showed ramifications. Of the 45 species that were probed the GUS test, the 93.33% presented β -glucuronidase activity. In the liquid medium system with and without agitation were roots and branches growth and even roots generation, these responses are not shown in the growth curves, for example *M. hutchisoniana* subsp. *louisae* increased its roots number but decreased its biomass. The species *B. candelaris*, when placed in the RITA ® bioreactor showed generation of roots, roots with bigger length, a great branch and thickening of the roots in a few days. Regarding the species *Myrtillocactus schenckii* only presented generation of roots and thickening. The presence of *rol B*, *nptII* and *gus* genes in DNA of the transformed roots was verified by analyzing the polymerase chain reaction, seven species were positive. The production of secondary metabolites was evaluated by TLC in 10 species by three detection systems: Dragendorff reagent, UV-365 nm and Marquis reagent, in roots transformed and normal tissue, showing the presence of secondary metabolites, some transformed roots exhibited biosynthetic capacity qualitatively similar and others showed different capacity in relation to normal tissue.

1. Introducción

Desde hace miles de años, y hasta nuestros días, la humanidad ha sido altamente dependiente de las plantas como fuente de energía, materiales diversos y nutrientes. Además, la cantidad y los diferentes tipos de metabolitos secundarios o fitoquímicos que es usada por la sociedad actual es muy alta. Éstos son empleados no solo en la alimentación, sino que también se utiliza en la cosmetología, farmacología, como fungicidas, bactericidas, plaguicidas, aditivos, etc. Debido a esta alta demanda se necesita desarrollar nuevas estrategias que sean sostenibles para la producción de metabolitos procedentes de plantas. Una técnica relativamente reciente es el cultivo *in vitro*, donde las células, tejidos u órganos vegetales se cultivan de forma aséptica y controlada e independiente del exterior, lo cual permitiría obtener metabolitos de interés bajo estos sistemas. Además, otras tecnologías se han desarrollado para optimizar el crecimiento del tejido vegetal y la producción de fitoquímicos. Una de estas tecnologías es la generación y el cultivo *in vitro* de raíces transformadas, el cual es un enfoque relativamente nuevo para la biotecnología vegetal. Estas raíces sirven para la biorremediación, permiten producir semillas artificiales, proteínas bioactivas, plantas transgénicas, y metabolitos de interés. Se han reportado una gran cantidad de compuestos secundarios en las cactáceas, como triterpenos, cumarinas, saponinas, flavonoides, alcaloides, esteroides, flavonas, entre otros. Sin embargo, estas plantas son de muy lento crecimiento, tienen una distribución geográfica limitada, y además una gran cantidad de sus especies se encuentran en peligro de extinción. Por tales motivos es de gran importancia la generación de sistemas alternos, como las raíces transformadas, para la obtención y estudio de sus metabolitos. En consecuencia, en este trabajo se pretendió generar y cultivar *in vitro* raíces transformadas de varias especies de cactáceas mexicanas, y algunas sudamericanas, y evaluar el efecto de diferentes sistemas de cultivo en su tasa

de crecimiento. Se probaron medios semisólidos, medio líquido con y sin agitación y el reactor de inmersión temporal RITA®. La mayor parte de las especies analizadas lograron generar al menos una raíz y en algunas una cantidad de biomasa considerable. En cuanto a los sistemas de cultivo, el más efectivo de estos fue el cultivo en medio semisólido debido a que en este sistema se observó un mayor crecimiento en la mayoría de las especies, que se probaron en los diferentes sistemas de cultivo, según las curvas de crecimiento relativo.

1.1 Marco teórico

1.1.1 Generalidades de las Cactáceas

Las cactáceas son una familia vegetal extensa y diversa, nativa de América. México es el más importante centro de concentración de cactáceas, con un alto índice de endemismo a nivel genérico, con un 73%, y específico, con un 78%. La mayor parte de las especies habitan regiones áridas y semiáridas del país, particularmente en la porción sureste del Desierto Chihuahuense, incluyendo la Zona Árida Queretano-Hidalguense (Hernández y Godínez, 1994), pero también se pueden encontrar en bosques, pastizales y selvas (Nobel, 1998). Muchas de estas especies se encuentran sujetas a presiones de colecta y a la destrucción de su hábitat, asimismo, por lo regular sus poblaciones no se restablecen fácilmente después de la presencia de un disturbio. Por lo cual, un número significativo de cactáceas mexicanas se han incluido en listados de plantas amenazadas. Las especies de cactáceas que se encuentran amenazadas son un grupo cuya conservación requiere de atención inmediata y de esfuerzos especiales (Hernández y Godínez, 1994).

La mayoría de las cactáceas presentan una combinación de características biológicas y ecológicas inherentes que las hacen más vulnerables a los factores de perturbación. Por lo que, en condiciones naturales, las cactáceas por lo general tienen tasas de crecimiento muy bajas y ciclos de vida usualmente muy largos (Gibson y Nobel, 1986). Estas además tienen un metabolismo tipo ácido de las crasuláceas (MAC) (Nobel, 1998).

Las cactáceas son uno de los grupos más amenazados del reino vegetal. Las poblaciones naturales de muchas de las especies han sido afectadas por las presiones del desarrollo humano, principalmente debido a la conversión de terreno para usos agrícolas y/o pecuarios y a las actividades de extracción de las plantas de su hábitat, para su venta como plantas de ornato en mercados nacionales e internacionales (Jarvis, 1979; Sánchez-Mejorada, 1982; Fuller y Fitzgerald, 1987). En consecuencia, la familia completa está incluida en el Apéndice II de la Convención Internacional sobre el Tráfico de Especies Silvestres de Flora y Fauna Amenazadas (CITES) y muchos de sus representantes están comprendidos en el Apéndice I, y en el listado de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (Hernández y Godínez, 1994).

Según lo señalado por Hunt (1992), México sería el centro de concentración de cactáceas más importante, por tener un total de 48 géneros y 563 especies reconocidas. Por otro lado, Arias (1993) indica que podrían haber 54 géneros aproximadamente y a nivel específico 850 aproximadamente. Del total de los géneros que existen en México, 15 (31.3%) están estrictamente restringidos a sus límites territoriales, y 20 más son casi endémicos; por otro lado, existen en América algunas otras regiones relativamente ricas en especies de cactáceas, como por ejemplo el suroeste de los Estados Unidos de América, el noreste de Brasil (Andrade-Lima, 1981), y la porción norte de Argentina junto

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con algunas regiones de Bolivia y Perú. Asimismo, además de México y los países antes mencionados, Chile, Ecuador y Costa Rica tienen altas proporciones de cactáceas endémicas. A pesar de la riqueza que existe en México en términos absolutos es el país con más especies amenazadas (197 especies y 37 variedades) que representan el 35% del total de las especies mexicanas. Por otra parte, el reclutamiento de nuevos individuos en las poblaciones es por lo general muy bajo. Además, otro atributo de muchas cactáceas es que sus áreas de distribución son demasiado restringidas y en ocasiones viven en condiciones edáficas muy especializadas. Por lo anterior el restablecimiento demográfico es muy lento después de una perturbación. A menudo éstas son plantas conspicuas y relativamente fáciles de localizar, pero, debido a factores antropogénicos, las densidades de individuos se han visto seriamente reducidas en la mayoría de sus poblaciones, a menudo a niveles críticos (Hernández y Godínez, 1994).

1.1.1.1 Descripción botánica

Las cactáceas presentan hábitos y estructuras anatómicas de adaptación altamente especializados que les imparten una fisonomía particular. De estas estructuras especializadas se consideran responsables: el medio árido y desértico en que la mayoría crece, la adaptación posterior de otras a la vida epífita o trepadora en las selvas tropicales húmedas, y posiblemente también los diversos tipos de polinización que experimentan, principalmente por medio de los insectos, aves y quirópteros (Bravo y Sánchez, 1978).

Las cactáceas presentan areolas las cuales 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 y el tubérculo, a menudo se puede ver que la areola, de hecho, se origina de la base de la hoja o tubérculo. 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 (Anderson, 2001).

Se considera que las cactáceas son un grupo natural que evolucionó en los últimos 80 millones de años a partir de plantas no suculentas, con hojas bien desarrolladas y fotosíntesis tipo C_3 . En esas épocas, en regiones cambiantes donde la aridez se volvía más severa, se desarrollaron gran cantidad de especies y formas de vida a partir de las cactáceas primitivas, las que ante estos cambios adquirieron adaptaciones morfológicas y fisiológicas particulares (Nobel, 1998). Entre las adaptaciones más notables que el tallo adquiere, y que les permiten almacenar y conservar el agua en sus tejidos, son: el gran desarrollo de los parénquimas, responsables de la suculencia; la reducción de la superficie transpiratoria, al adquirir formas globosas; la atrofia hasta estados vestigiales del limbo de las hojas o su transformación en escamas, espinas y glóquidas; el engrosamiento de la cutícula y de las membranas celulósicas de los tegumentos; la pruinosidad o las excrecencias cerosas de las células epidérmicas; la distribución hundida de los estomas, etcétera. En la evolución de sus estructuras han actuado algunos tipos de tendencias morfológicas determinadas en parte por la aridez, como son: la reducción, la fusión y el cambio de simetría, tendencias que han ejercido su acción en conjunto o separadamente. Por ejemplo, la reducción del tallo, que le permite disminuir la superficie de transpiración, no sólo afecta la altura de un gran número de especies, dando por resultado que los tallos adquieran forma

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

globosa, sino que ha actuado también sobre las hojas modificándolas, determinando que el pecíolo desaparezca, que el limbo se reduzca transformándose en una escama muy pequeña que a veces desaparece o persiste solamente como vestigios microscópicos, y que la base de la hoja se hipertrofie dando origen a un tubérculo. Las flores han sido modificadas igualmente por la reducción; en algunos géneros considerados como primitivos, las flores son muy complejas, como en *Pachycereus* en tanto que en los más avanzados, como *Mammillaria*, se han simplificado (Bravo y Sánchez, 1978).

Enfocándonos a la raíz de las cactáceas, esta es semejante, por lo general, a la de otras dicotiledóneas, procede de la radícula del embrión y, en algunos casos, es adventicia; fija la planta en el suelo, absorbe el agua con las sustancias nutritivas en ella disueltas y puede en algunos géneros almacenarla en sus tejidos (Bravo y Sánchez, 1978). Cannon en 1913, en su estudio acerca de las raíces de plantas desérticas, observó la existencia de tres tipos de raíces:

- 1) Cuando la raíz principal adquiere mayor desarrollo que las secundarias;
- 2) Cuando las raíces secundarias crecen más que la principal y
- 3) Cuando la raíz principal y las secundarias alcanzan aproximadamente el mismo desarrollo. Las cactáceas tienen representantes de estos tres tipos (Bravo y Sánchez, 1978).

Como regla general, la raíz principal constituye el sistema de fijación, pues se introduce verticalmente en el suelo y su desarrollo es proporcional al tamaño y a la fuerza de tracción del vegetal, y las raíces secundarias intervienen particularmente en la absorción, pues la longitud que alcanzan, la profundidad a que llegan y el grado de ramificación que adquieren, están en relación con el factor humedad y con las demás características del suelo. En la época de lluvias se forma en la extremidad de sus raíces secundarias, el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

verdadero sistema de absorción, el cual consiste en numerosas raicillas blancas provistas de pelos absorbentes, que son caducas, pues su vida se limita a la temporada lluviosa, marchitándose después (Bravo y Sánchez, 1978).

Como la raíz de las cactáceas es un órgano que en algunas especies almacena agua y reservas nutritivas, adquiere diversas formas: napiforme, tuberosa, tuberosa fasciculada, tuberosa claviforme y nodular. En las cactáceas son frecuentes las raíces adventicias que se desarrollan tanto en las aréolas de los tallos como en las del pericarpio. Son también comunes en las cactáceas las raíces aéreas (para fijación): se presentan en trepadoras y epífitas de los géneros *Selenicereus*, *Hylocereus*, *Epiphyllum*, etcétera (Bravo y Sánchez, 1978).

1.1.1.2 Clasificación

La evidencia de las interrelaciones entre especies y grupos vegetales 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 (Anderson, 2001).

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).

1.1.1.3 Usos de las Cactáceas

Hace aproximadamente 23,000 años, los humanos emigraron a América del Sur a través del Istmo de Panamá. Donde se encontraron con nuevas plantas y animales en este continente. La supervivencia humana depende del uso exitoso de los recursos naturales, ya sea como fuente de alimento o fibra, o como un medio de tratar con los espíritus. Muchas culturas aisladas evolucionaron tanto en América del Norte y del Sur, donde cada una desarrolló sus propios usos de las plantas. Sin embargo, los habitantes de zonas semidesérticas fueron desafiados constantemente para encontrar comida, refugio y satisfacer otras necesidades. Los Cactus en estas regiones claramente se convirtieron en un elemento importante para la subsistencia humana (Anderson, 2001).

La agricultura se desarrolló aproximadamente entre 3500 y 6000 años atrás en diversas regiones de América del Sur, incluyendo el cultivo de frijol (*Phaseolus lunatus*) y algodón (*Gossypium barbadense*). Uno de los usos más notables de los cactus por las personas en este período precerámico fue la producción de anzuelos para pesca de las espinas de *Neoraumondia arequipensis*. Dos cactus que tomaron funciones particularmente significativas en las vidas de los nativos americanos fueron el peyote, *Lophophora williamsii*, en América del Norte y el cactus de San Pedro, *Echinopsis pachanoi*, en América del Sur. Ambos tienen una historia antigua y se siguen utilizando hoy en día. Curiosamente, ambos contienen el mismo alcaloide mescalina que afecta la mente. Ambos cactus juegan un papel importante en las prácticas religiosas y medicinales realizadas por Nativos Americanos tanto modernos como antiguos (Anderson, 2001).

Los cactus como alimentos

Casi todos los frutos carnosos de cactus son comestibles y muchos son consumidos por las personas que viven en las regiones más secas del Nuevo Mundo, especialmente los nativos americanos. Un gran número de cactus forman parte al menos de la dieta diaria de muchos mexicanos también, debido a que los tejidos de los Cactus contienen proteínas crudas, grasas, hidratos de carbono, ceniza, fibra, y una fuente rica de calcio y fósforo; donde los frutos son comestibles, pero lo más importante, los tallos proporcionan un importante alimento básico (Anderson, 2001). Algunos ejemplos se presentan a continuación:

Los frutos de dos especies de *Pachycereus* a menudo se comen frescos. *Myrtillocactus geometrizans* es otro cactus grande cuyos frutos son ampliamente consumidos, llamados garambullos. Por lo general, los frutos se consumen frescos, pero pueden ser secados como pasas y como una fuente de edulcorantes. De la misma forma, el tallo del cactus *Ferocactus histrix* del centro de México tiene un largo historial de uso alimentario. Los botones florales maduros, llamados cabuches, son ampliamente consumidos en los estados mexicanos de Zacatecas y San Luis Potosí, los cuales se añaden a sopas, ensaladas y otros platos. Cuando sus frutos fermentan ofrecen así una bebida alcohólica. Una bebida no alcohólica llamada agua de biznaga también se hace de este cactus. *Ferocactus histrix* es también la fuente de acitrón o dulce de biznaga. Este brebaje dulce se puede comer tal cual, o utilizarlo en pasteles y tamales. Asimismo, *Hylocereus undatus* es ampliamente cultivado por su fruto en varias regiones del Nuevo Mundo, Europa y Asia. Sus frutos son de color brillante, dulce y rico en vitaminas. Igualmente frutas llamadas chilitos, de varias especies de *Mammillaria* se han recogido y consumido. *Peniocereus greggii* desarrolla una gran raíz subterránea que se come o se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

puede masticar para aliviar la sed. Por otro lado, muchas opuntias producen frutos carnosos, y los pueblos indígenas desde hace mucho tiempo comenzaron a consumirlas como parte de su dieta. Las tunas y nopalitos se recogen de las plantas silvestres y se venden en todo México, así como en el suroeste de los Estados Unidos (Anderson, 2001)

Los cactus como alimento animal

Tanto los animales silvestres como los domésticos carecen de agua y comida sabrosa en muchas regiones áridas. Por tal motivo, los pastores pueden cosechar cactus tipo barril para sus animales. Los tallos de muchas de las cactáceas columnares se cosechan de una manera similar. Se observan evidencias de daño y destrucción por el ganado en los años de sequía y en las regiones donde al ganado y a las cabras se les ha permitido ramonear en la limitada oferta de material vegetal. En el sur de Texas han utilizado durante mucho tiempo tunas como fuente de alimentos para el ganado. Los animales salvajes como el ciervo, jabalí, roedores y las aves también utilizan cactus como fuente de nutrición (Anderson, 2001).

Las Cactáceas como medicina

Un número notable de cactus son utilizados por los indígenas del Nuevo Mundo para la curación. Enfermedad, lesión, muerte, y el mundo espiritual están íntimamente relacionados entre sí para muchas de estas personas, como se ve en su creencia de que el peyote y el cactus de San Pedro son la medicina divina. El peyote, por ejemplo, no es sólo un medio de comunicación con el mundo espiritual, también se utiliza como “un analgésico, antirreumático y tónico general”. Otros cactus, sin embargo, sólo parecen ofrecer algún tipo de capacidad de curar, ya sea real o imaginaria (Anderson, 2001).

Usos ceremonial y religioso de los cactus

Teocomitl fue un cactus tipo barril usado por los aztecas como una mesa para los sacrificios religiosos cuando se arrancaba el corazón de sus víctimas. Las espinas del cactus también fueron utilizados en estas ceremonias. Los dos cactus religioso-medicinales más importantes son el peyote y el cactus San Pedro, pero hay varios otros cactus que tienen funciones similares entre los indígenas del Nuevo Mundo. Algunos de estos pueden tener propiedades psicoactivas por la presencia de ciertos alcaloides que inducen inusuales experiencias mentales cuando se ingiere. Los investigadores han asumido que otros cactus, “peyote” en México, deben tener alcaloides u otros compuestos químicos con propiedades psicoactivas (Anderson, 2001).

Los cactus como fuentes de colorantes

El tinte más conocidas asociados con cactus es el tinte de cochinilla. En rigor, el tinte no es producido por el cactus. Por el contrario, el tinte es producida por el insecto domesticado cochinilla, *Dactylopius coccus*, y varias especies silvestres del mismo género, que son parásitos de especies de *Opuntia*. El tinte es un carmín, ácido carmínico, aparentemente producido por el insecto como elemento disuasorio para las hormigas depredadoras. El tinte de cochinilla fue utilizada en la fabricación de tejidos por el pueblo de Paracas de Perú hace 2,400-1,800 años atrás. Estos colorantes se siguen utilizando para la tinción de los alimentos y bebidas, cosméticos, como manchas de carmín utilizado en microtécnica de laboratorio, como un indicador de pH, y como el pigmento llamado Crimson Lago utilizados en la pintura. Otro ejemplo es el uso de un pigmento amarillo de las flores de *Ferocactus wislizeni* (Anderson, 2001).

Los cactus en la horticultura

Para muchas personas en Estados Unidos y México, los cactus suelen ser desagradables al tacto y de poca importancia, en cambio las personas de Europa, Asia y de otras partes del mundo tienen una perspectiva diferente de estas notables suculentas, para ellos han sido apreciadas en horticultura como raras, inusuales, y hermosas. Más de 300 especies de cactus son cultivadas como ornamentales, muchos están disponibles en el comercio de viveros como objetos de colección (Anderson, 2001).

Otros usos de los cactus

Se usan para hacer velas (*Opuntia megacantha*); como suministro de agua fresca bebible, obtenida del parénquima de las células de la corteza del tallo; como utensilios y recipientes, por ejemplo botones de *Pachycereus pringlei* y *Carnegiea gigantea* o cactus tipo barril; como cercas o vallas, por ejemplo *Pachycereus marginatus*; también como fibras o rellenos, en la fabricación de cuerdas, o en artículos como mantas y chalecos, decoraciones navideñas, o para hacer almohadas. Igualmente los cactus son usados como leña, artículos de pesca, para muebles o material de construcción (como partes leñosas de *Cereus repandus*), el uso de gomas o mucilago de algunos cactus como pegamento, o para masticarlos; como cepillos para el cabello (frutos de *Pachycereus pactenaboriginum*); asimismo se pueden usar para el control de mosquitos, como agujas, para hacer perfumes de las flores de especies de *Opuntia*; también se usan para hacer palos de lluvia (de los tallos secos como de *Eulychnia acida*) y artículos de recuerdo (bastones, servilleteros, posavasos, lámparas y bastones); para hacer jabones o champú; como marcos de casas si son de barro o adobe; se usan además como herramientas (peines, canastas); y para clarificar agua con fango (*Opuntia polyacantha*) (Anderson, 2001).

1.1.1.4 Metabolitos de las Cactáceas

Las cactáceas, al igual que otras plantas superiores, son capaces de almacenar o contener diferentes componentes químicos en tallo, hoja y raíz. Entre los compuestos identificados en ellas se encuentran los ácidos orgánicos, carbohidratos, aceites, látex, mucílago, terpenos, resinas, pigmentos, alcaloides, triterpenos, betalainas y esteroides (Bravo y Sánchez, 1991; Anderson, 2001). En cuanto a los alcaloides, los cuales son compuestos que contienen nitrógeno, la familia Cactaceae se caracteriza por poseer una gran cantidad de ellos (Anderson, 2001). Se han reportado la mescalina, la anhalonidina, la pilocereína, la lophocereína, la carnegina, la 3-4-dimetoxifeniletamina, la candicina, la hordenina, la pelotina, la peyonina, la lophotina y la peyoforina (Bravo y Sánchez, 1978) por ejemplo, se sabe que *Lophophora williamsii* tiene más de 50 alcaloides diferentes con fenetilaminas y tetrahidroisoquinolinas (Anderson, 2001). Otros ejemplos se muestran en el Cuadro 1.

Por otro lado, las betalainas son pigmentos responsables de los colores brillantes de las flores y de los frutos de las cactáceas, estos pigmentos se encuentran en las vacuolas de las células del perianto. Los mucílagos están presentes en géneros como *Opuntia*; el látex en géneros como *Mammillaria* y sales como el oxalato de calcio y cristales de sílice en los géneros de *Opuntia* y *Stenocereus spp* (Bravo y Sánchez, 1995).

Cuadro 1. Metabolitos secundarios analizados en diferentes cactáceas.

Especie	Metabolitos Secundarios	Actividad o usos	Referencia
<i>Trichoceseus bridgesii</i>	Triterpenos	Antitumoral y antinociceptivo	Kinoshita <i>et al.</i> , 1992
<i>Trichoceseus pachanoi</i>			Takizawa <i>et al.</i> , 1993
<i>Rathbunia alamosensis</i>			Takizawa <i>et al.</i> , 1995
<i>Machaerocereus eruca</i>			Yang <i>et al.</i> , 1998
<i>Isolatocereus dumortieri</i>			Kinoshita <i>et al.</i> , 2000
<i>Stenocereus stellatus</i>			Imai <i>et al.</i> , 2006
<i>Stenocereus eruca</i>			Okazaki <i>et al.</i> , 2007
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i> y <i>Ariocarpus retusus</i>	Extractos metanólicos*	Antifúngica	Rodríguez-Garza <i>et al.</i> , 2011
<i>Stenocereus gummosus</i> (tallo y fruto)	Extractos metanólicos‡	Alimenticio, Cosmetológica y Farmacéutico	Morales-Rubio <i>et al.</i> , 2004
<i>Lophocereus schottii</i>	Extractos metanólicos†	Antibacteriana y citotóxica	Morales-Rubio <i>et al.</i> , 2007
<i>Carnegiea gigantea</i>	Compuestos enteógenos	Medicina	Berger, 2003
<i>Cephalocereus senilis</i>			
<i>Coryphantha durangensis</i>			
<i>Coryphantha elephantidens</i>			
<i>Coryphantha macromeris</i>			
<i>Coryphantha radians</i>			
<i>Echinocereus enneacanthus</i>			
<i>Mammillaria senilis</i>			
<i>Matucana madisoniorum</i>			
<i>Melocactus curvispinus</i>			
<i>Myrtillocactus geometrizans</i>			
<i>Pachycereus pringlei</i>			
<i>Peniocereus greggii</i>			

Extractos metanólicos*: grupos carbonilo, oxidrilos fenólicos, esteroides y metilesteroides, cumarinas, sesquiterpenlactonas, saponinas, flavonoides y alcaloides.

Extractos metanólicos‡: tallos – esteroides, carbohidratos, sesquiterpenlactonas, flavonas y alcaloides. Fruto – flavonas y leucoantocianinas (antioxidantes naturales), saponinas y alcaloides inespecíficos.

Extractos metanólicos†: lupeol y lofenol (triterpenos).

Compuestos enteógenos: arizonina, gigantina, norcernegina, heliamina, isochinolina, fenetilamina, macromerina, hordenina, normacromerina, metiltiramina, isoquinolina, dimetilhistamina, mescalina, tiramina, pilocereina, y otros.

1.1.2 Raíces transformadas

Existen dos tipos de métodos de transformación de plantas. Unos se basan en el uso de la bacteria *Agrobacterium* (sistemas ADN-T) como vehículo que transporta el ADN foráneo y lo integra al genoma de las células. Otros se basan en la integración del ADN foráneo mediante métodos físicos, como la biobalística, el uso de compuestos como el polietilenglicol y, en la electroporación; mediante estas tecnologías sólo algunas de las células muestran la característica deseable produciendo quimeras (Herrera *et al.*, 1997). A partir de estas metodologías se pueden regenerar y propagar plantas completas que muestren una característica deseable, para el caso de este estudio lo que se desea es la obtención de raíces transformadas. El cultivo de raíces transformadas se ha usado para el estudio de la nodulación de raíces pilosas llevadas a cabo en *Lotus corniculatus*, una leguminosa (Hansen *et al.*, 1989); en la fotosíntesis y la fotoautotrofia en raíces (Flores *et al.*, 1993); en la nodulación en *Casuarina glauca*, una no leguminosa, con el actinomiceto *Frankia* en la planta intacta (Diouf *et al.*, 1995); en interacciones planta-insecto (Wu *et al.*, 1999). Aunque el mecanismo de transformación genética mediante *Agrobacterium* se ha conocido por más de 30 años, la enorme capacidad de transformar cultivos de raíces se ha descuidado mucho en la mayoría de este tiempo. Sin embargo, a mediados de la década de 1980, algunos indicios del potencial de biosíntesis de las raíces pilosas fueron obtenidos a través de una serie de investigaciones, enfocándose mayormente en la producción de alcaloides (Mano *et al.*, 1986; Payne *et al.*, 1987).

En las dos décadas pasadas el cultivo de raíces transformadas se han usado para el estudio de metabolitos secundarios vegetales como es el caso de alcaloides del tropano, poliacetilenos, tiofenos, naftoquinonas, y sesquiterpernos, así como para la producción de proteínas bioactivas.

Recientemente, se estableció un sistema *in vitro* para la inducción de la nodulación de las raíces transformadas de jícama a través de un cocultivo con *Rhizobium*, la cual es una herramienta útil para el estudio de la nodulación y la señalización en las interacciones de las raíces transformadas con *Rhizobium* (Cadiz *et al.*, 2000).

La explotación del cultivo de raíces transformadas, también llamadas “raíces pilosas”, por la analogía con las plantas enfermas naturalmente con el mismo nombre, que causa la producción masiva de raíces adventicias con numerosas raíces pilosas, presenta un enfoque relativamente nuevo para la biotecnología vegetal *in vitro* que ha recibido una atención creciente en los últimos años. Hasta la fecha, el cultivo de raíces pilosas se ha logrado en más de 100 especies de plantas, incluyendo varias plantas medicinales en peligro de extinción, que ofrecen oportunidades para producir importantes fitoquímicos y proteínas en condiciones eco-amigables. Para esto, se pueden aplicar diversas estrategias que pueden mejorar los rendimientos de metabolitos deseados y para producir proteínas recombinantes. Del mismo modo, se reportan recientes avances en el diseño y construcción de biorreactores que permiten tecnologías basadas en raíces pilosas para llevarlos a gran escala mientras se mantiene su potencial biosintético (Georgiev *et al.*, 2007). Varios tipos de biorreactores han sido usados exitosamente para el cultivo de raíces transformadas, como: tanques agitados convencionales, tanques agitados con un impulsor por separado, columnas de burbujeo, reactores de lecho de niebla y reactores de tipo globo (Curtis, 2000). Esta tecnología desarrollada en sistemas de biorreactores proveen maneras en que puede ser posible ampliar el cultivo de raíces pilosas a partir de sistemas a pequeña escala a procesos industriales a gran escala (Guillon *et al.*, 2006).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Durante la década de 1990, las investigaciones en este campo entraron en una “fase exponencial”, y más de 400 documentos en raíces pilosas fueron publicados durante esta década (Georgiev *et al.*, 2007). Los estudios publicados pusieron en relieve varios avances del cultivo de raíces transformadas, incluyendo sus tasas de crecimiento relativamente rápidas, en medios libres de hormonas, estabilidad genética y bioquímica y la capacidad de organogénesis asociada a la síntesis de metabolitos (Shanks y Morgan, 1999; Sevon y Oksman-Caldentey, 2002).

Por otro lado, el creciente interés en sistemas de raíces pilosas ha facilitado la transferencia de conocimiento de laboratorios académicos a industrias farmacéuticas, de productos alimenticios y de cosméticos. Por otra parte, las raíces pilosas han demostrado ser igual de potentes que las raíces de tipo silvestre en términos de los mecanismos básicos para la absorción, acumulación, distribución tolerante, y la desintoxicación de sustancias tóxicas, sin la interferencia de otros órganos de la planta. Las raíces pilosas de plantas hiper-acumuladoras son capaces de absorber cadmio, níquel, uranio que son contaminantes del suelo o del agua. Las raíces pilosas de especies de plantas diferentes pueden desintoxicar de manera significativa plaguicidas, antibióticos y demás efluentes industriales tóxicos (Veena y Taylor, 2007)

1.1.3 Clasificación de *Agrobacterium*

Una primera clasificación del género *Agrobacterium* se basó principalmente en la sintomatología de enfermedades y rango de hospederos: a) *A. tumefaciens* causa la enfermedad de la agalla de la corona, b) *A. rhizogenes* causa la enfermedad de la raíz pilosa, c) *A. rubi* causa la enfermedad de la vesícula de caña, y d) *A. radiobacter* es una especie “virulenta”. Más

frecuentemente, una nueva especie ha sido propuesta *A. vitis*, que causa agallas en uvas y algunas otras especies de plantas. Las cepas de *Agrobacterium* se dividieron luego en biotipos en función de sus diferencias metabólicas y fisiológicas (bacteriológica) tales como su homología ADN-ADN, secuencias de 16S ribosomal, la utilización de ketolactosa, y los tipos de opinas producidos. Desde el punto de vista fitopatológico, la clasificación de las cepas de *Agrobacterium* para biotipos cromosómicamente determinados es de poca utilidad, ya que determinada enfermedad es llevada por los plásmidos Ti o Ri que, bajo condiciones de laboratorio, se pueden intercambiar entre las cepas pertenecientes a diferentes biotipos (Gelvin, 2003).

1.1.3.1 *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes (antes llamada *Phytomonas rhizogenes*) un miembro de la familia Rhizobiaceae, ha sido incluido en la subclase alfa 2 de proteobacterias. Fue identificado por primera vez hace 70 años como el agente causal de la enfermedad de la planta conocida como síndrome de la raíz pilosa o enfermedad de la estera de la raíz. Además *A. rhizogenes* (Gram-negativa) es una bacteria del suelo en forma de vara. Esta bacteria es un pariente cercano de *A. tumefaciens* el cual es más conocido, este es el agente causal de la enfermedad de la agalla de la corona y la especie más caracterizada entre el género *Agrobacterium* (Veena y Taylor, 2007).

A. rhizogenes es la responsable del desarrollo de la enfermedad de la raíz pilosa en una serie de plantas dicotiledóneas (Tepfer, 1990). En cuanto a condiciones *in vitro*, las raíces pilosas se distinguen fácilmente por su rápido crecimiento, su gran ramificación en medios libres de hormonas y un desarrollo plagiotrópico (Tepfer, 1989; Figura 1). Estos fenotipos son causados por

transformación genética en manera similar al desarrollo de la enfermedad de la agalla de la corona por *A. tumefaciens* (Christey, 2001).

Una importante característica de *A. rhizogenes* en las raíces es inducir la única habilidad para crecer *in vitro* en ausencia de reguladores de crecimiento exógenos. Estas características de crecimiento han hecho de las raíces pilosas una herramienta ampliamente utilizada para la producción de metabolitos secundarios, en la investigación de la función de genes y en el estudio de la biología de la raíz en general (Veena y Taylor, 2007).



Figura 1. Cultivo de raíces pilosas después de 2 meses de ser transferidas a medio libre de hormonas. Foto obtenida por: Rocío Suárez Mercado, 2012.

1.1.4 Transformación genética con *Agrobacterium*

1.1.4.1 Inducción de raíces transformadas en la naturaleza

El mecanismo de formación de la raíz pilosa aún no se entiende totalmente. La formación de raíces pilosa en general puede ser dividida en cuatro pasos:

1. Proceso de activación,
2. El movimiento del ADN de la bacteria en la célula vegetal,
3. La inducción posterior de la formación de raíces
4. 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 la cepa *A. tumefaciens* C58. Cómo ocurre la infección y la transformación genética con *A. rhizogenes*, y cómo conduce al fenotipo de la formación de raíces pilosas, y su proliferación sigue siendo menos conocido (Veena y Taylor, 2007).

Cuando varias plantas susceptibles, principalmente especies dicotiledóneas y gimnospermas, son heridas en ecosistemas o campos naturales, estas producen unas sustancias fenólicas simples, tal como la acetosiringona (Figura 2), que inducen la localización de los genes *vir* (virulencia) del plásmido de *Agrobacterium*, los cuales son los responsables del reconocimiento, procesamiento y transferencia de fragmentos de ADN-T del plásmido Ti (inductor de tumor) o del plásmido Ri (inductor de la raíz), (dependiendo en este caso de *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*, respectivamente) a las células vegetales (Nilsson y Olsson, 1997).

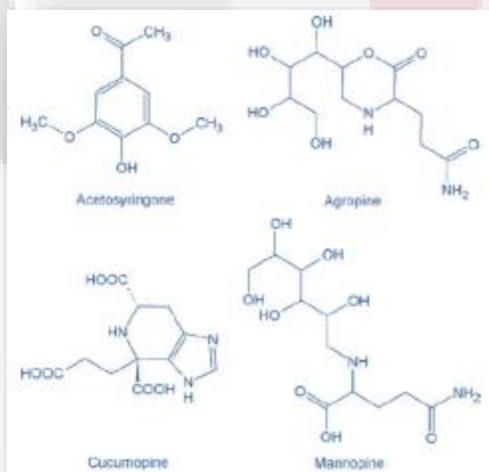


Figura 2. Estructura química de la acetosiringona y algunas opinas (Georgiev *et al.*, 2007).

Los genes del fragmento de ADN transferido mediante la formación de tumores neoplásicos de la agalla de la corona, vesículas tumorales y tejidos de raíces pilosas, producen (y secretan en el suelo) sustancias llamadas opinas (derivados de aminoácidos, Figura 2), más utilizados por *Agrobacterium* como nutrientes (Weising y Kahl, 1996), principalmente como fuente de carbono y nitrógeno (Hong *et al.*, 1997). Las cepas de *A. rhizogenes* se clasifican de acuerdo al tipo de opina que producen, por lo que existen cepas denominadas manopina, cucumopina y agropina (agr) (Pérez *et al.*, 1999).

La mayoría de las cepas de *Agrobacterium* contienen sólo un ADN-T, pero algunos (como los que llevan el plásmido Ri tipo agropina) transfieren dos ADNs-T independientes ADN-T_L y ADN-T_R. El ADN-T_R tiene alta homogeneidad con el ADN-T del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, mientras el ADN-T_L es sorprendentemente diferente y es homólogo al ADN-T llevado por el plásmido Ri de manopina de la cepa *A. rhizogenes* (Nilsson y Olsson, 1997). Tanto el ADN-T_L como el ADN-T_R son transferidos e integrados independientemente en el genoma de la planta hospedera, pero la transferencia del ADN-T_L es esencial para la inducción del síndrome de la raíz pilosa, en cambio la transferencia de ADN-T_R no provoca la formación de cultivos de raíces transformadas (Nilsson y Olsson, 1997; Sevón y Oksman, 2002). El ADN-T_R contiene dos genes, el *iaaM* y el *iaaH*, responsables de la biosíntesis de auxinas y de los genes responsables de la síntesis de opinas como la manopina (*mas1* y *mas2*) y la agropina (*aux1* y *aux2*) que controlan la biosíntesis de opinas y auxinas. El ADN-T_L lleva 18 marcos de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés), cuatro de los cuales son esenciales para la formación de las raíces pilosas; ORF10, ORF11, ORF12 y ORF15 correspondientes a los genes *rol A*, *rol B*, *rol C* y *rol D*, respectivamente (Pérez *et al.*, 1999; Christey, 2001; Georgiev *et al.*, 2007). Estos presentes por la mutagénesis de inserción en el ADN-T_L donde se han identificado estos cuatro loci (*rol A*, *B*, *C*, *D*) los cuales

están involucrados en la formación de raíz pilosa (White *et al.*, 1985). El gen *rol B* es absolutamente esencial para la inducción de la raíz pilosa (Nilsson y Olsson, 1997). Las cepas de *A. rhizogenes* que producen opinas como manopina, cucumopina o mikimopina transfieren un solo fragmento de ADN-T que es homóloga a la ADN-T_L agr pero sin el gen *rol D* (Meyer *et al.*, 2000; Christey, 2001).

En el tabaco, la expresión combinada de los loci *rol A*, *B* y *C* confieren el fenotipo de raíces pilosas completas, dependiendo de las especies de plantas y el tipo de tejido (Schmülling *et al.*, 1988; Mariotti *et al.*, 1989; Christey, 2001). Por lo que, este fenómeno natural es explotado en biotecnología para generar cultivos de raíces transformadas (Georgiev *et al.*, 2007).

Además del fenotipo completo de raíces pilosas inducidas por *A. rhizogenes*, es posible obtener alteraciones más específicas en la morfología y/o el desarrollo por introducción de genes *rol* específicos. Estos pueden producir variabilidad genética útil para incorporarlo en programas de reproducción. Los genes *rol* han sido inducidos en una serie de plantas individuales o en combinación para evaluar su expresión en plantas y para estudiar el efecto del crecimiento y desarrollo en plantas. El fenotipo completo de raíces pilosas está presente en transformantes que expresan todos los genes *rol*, mientras que un solo gen *rol* causa anormalidades específicas (Christey, 2001).

1.1.4.2 Inducción de raíces transformadas *in vitro*

El procedimiento usado para la inducción de las raíces pilosas (Figura 3) incluye el cultivo de partes de plantas heridas (llamadas explantes) en suspensiones de *A. rhizogenes* en condiciones asépticas (Sevon y Oksman,

2002). Los explantes vegetales heridos pueden ser infectados con cepas de *Agrobacterium* incluso con la inoculación directa, con la suspensión bacteriana y la incubación en medio sólido o con un cocultivo en medio líquido. En cualquier caso, los explantes infectados tienen que ser subsecuentemente transferidos a medio sólido con antibióticos (derivados de penicilina y claforán), usualmente cerca de 72 horas después, para eliminar a la bacteria (Pavlov *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2004). La neoplasia, donde las raíces transformadas (que comúnmente aparecen después de 1 a 4 semanas) crecen de una manera muy ramificada, con abundantes ramificaciones laterales, en medio Murashige y Skoog o Gamborg's B5 libre de hormonas (Pavlov *et al.*, 2002; Sevon y Oksman, 2002).

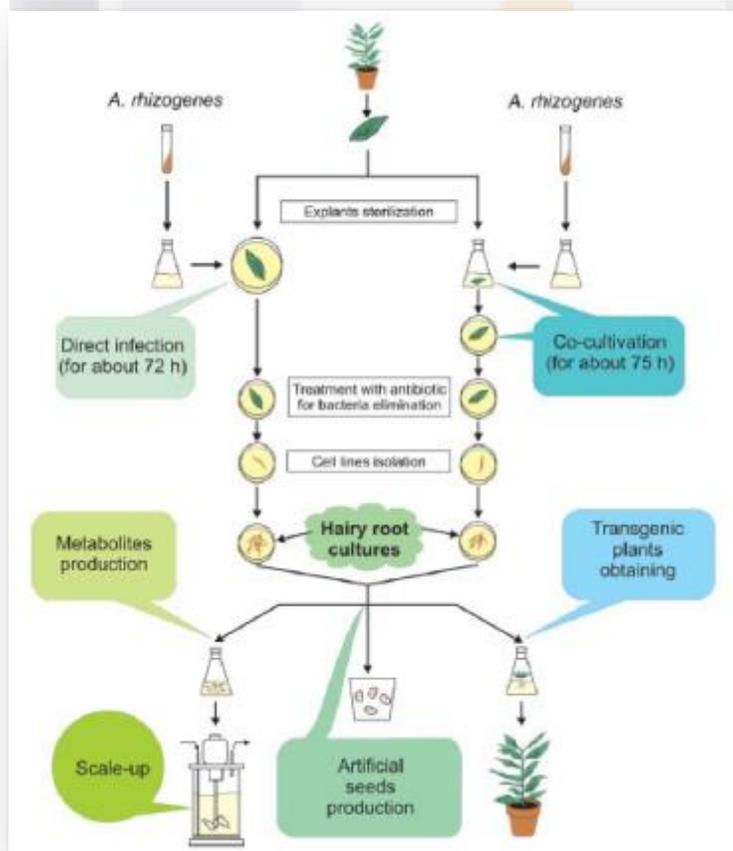


Figura 3. Diagrama de flujo para la inducción de cultivos de raíces pilosas y algunas de sus aplicaciones (Georgiev *et al.*, 2007).

La transformación genética exitosa puede ser demostrada en cualquiera de dos formas: directamente o indirectamente, por la detección del ADN-T o de las opinas, respectivamente. La forma directa es preferida, ya que en algunos casos, la producción de opinas no es estable e incluso puede cesar (Sevon y Oksman, 2002).

Para detectar el ADN-T pueden ser usados tanto la reacción de la cadena polimerasa o hibridaciones Southern blot (Georgiev *et al.*, 2007).

Por otro lado, se usan genes reporteros y genes marcadores para detectar los fragmentos de ADN que se insertaron al genoma de la planta, y de esta manera detectar las células o tejidos que se han transformado. Por tal motivo se han desarrollado metodologías que permitan identificar los productos sintetizados por la expresión de estos genes. Un ejemplo de gen reportero es el gen que sintetiza la enzima β -D-glucoronidasa (sistema del gen GUS). Este gen no está en la planta de forma natural y su enzima cataliza el rompimiento de enlaces glucosídicos. La actividad de esta enzima en tejidos de plantas transformadas se localiza por el un color azul que aparece cuando se hidroliza un sustrato incoloro, como es el caso del 5-bromo-4 cloro-3-indol- β -D-ácido glucorónico (Glick y Pasternak, 1998).

Para el caso de los genes marcadores un ejemplo es el gen *nptII* que otorga una ventaja selectiva a aquellas células que han sido transformadas sobre las que no lo han sido, la cual codifica proteínas que participan en la reacción de transposición que inactiva por fosforilación una gama de antibióticos aminoglucósidos tales como la kanamicina, neomicina, geneticina y paromomicina (Berg *et al.*, 1975).

Después de un periodo corto de adaptación, el cultivo de raíces pilosas puede ser usado para producir metabolitos (Sevon y Oksman, 2002), semillas artificiales (segmentos de raíz encapsulados), plantas transgénicas o brotes primordiales (Giri y Narasu, 2000; Georgiev *et al.*, 2007). Hay muchos factores que influyen en la posibilidad de una transformación exitosa del tejido de la planta madre y la inducción de la raíz pilosa, incluyendo las especies, edad y tipo de tejido vegetal (Sevon y Oksman, 2002), el tipo de cepa de *Agrobacterium* y la densidad de la suspensión bacteriana (Park y Facchini, 2000). Un número de productos químicos también pueden promover este proceso, por ejemplo, la acetosiringona (Figura 2; Joubert *et al.*, 2002). Recientemente se ha desarrollado una nueva técnica, llamada transformación mediada por *Agrobacterium* y asistida por sonicación (SAAT), para inducir la formación de la raíz pilosa en especies vegetales que son difíciles de transformar. Trick y Finer (1997) observaron que el tratamiento SAAT produce fisuras pequeñas, uniformes y canales en los tejidos de varias plantas, que facilitan el acceso de *A. rhizogenes* a los tejidos internos de la planta (Curtis, 2000).

Sin embargo, la historia del uso de raíces pilosas creciendo en cultivo *in vitro* en un sistema experimental es relativamente corto. Esto se debe principalmente a causa del aislamiento obligado de los cultivos de raíces pilosas en condiciones *in vitro*, lo que impedía que las raíces pilosas fueran usadas como un vehículo viable para muchas áreas de investigación, en particular los que no son fácilmente susceptibles a la vida en condiciones *in vitro*, así como las interacciones de las plantas con los animales, las bacterias o los hongos y la absorción de la toxina y nutrientes, o compuestos a partir de remediación del suelo. Otra limitación igualmente importante del cultivo de raíces pilosas es la falta de órganos aéreos. Los intentos para dilucidar los patrones de expresión génica en la ausencia de patrones de señalización sistémica fueron prácticamente imposibles en el cultivo de raíces pilosas porque

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

en tejidos de tallo y hoja son conspicuamente ausentes. Un ejemplo bien descrito es el control de las vías de la planta que responden al nitrato (Forde, 2002).

Una nueva herramienta llamada “sistema de plantas compuestas” que fue desarrollado primeramente por Hansen *et al.* (1989), aborda muchos de los problemas descritos anteriormente en relación con el cultivo de raíces pilosas. Las plantas compuestas consisten en un retoño de tipo silvestre desarrollada por las raíces transgénicas. En este proceso, las plantas compuestas se generan mediante las interacciones de las plantas con los animales, bacterias u hongos, y la absorción de toxinas y nutrientes, o la remediación de la composición del suelo (Veena y Taylor, 2007).

1.1.4.3 Diferencias entre *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens*

El plásmido Ri de *A. rhizogenes* y el plásmido Ti de *A. tumefaciens* son muy similares en términos de composición, así como la estructura. Los estudios comparativos de la secuencia completa de varios plásmidos Ri y Ti indican que muchos de los mecanismos de activación, el procesamiento, y el movimiento del ADN-T de la bacteria a la célula de la planta se conservan entre los dos tipos de plásmidos. En ambos plásmidos Ri y Ti, el ADN-T es flanqueado por repeticiones directas de 24pb, conocido como secuencias borde (Yadav *et al.*, 1982). Tanto el plásmido Ri y Ti contienen genes responsables de la transportación 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 transformados. La observación de homologías considerables entre los plásmidos Ri y Ti en la región virulenta (*vir*) y similitudes en los mecanismos de procesamiento del ADN-T, la transferencia y la integración (Moriguchi *et al.*, 2001) sugieren la

existencia de un mecanismo común de transferencia de genes (Veena y Taylor, 2007).

A pesar de las similitudes en la composición básica y la organización de los plásmidos de virulencia de *A. rhizogenes* (Ri) y *A. tumefaciens* (Ti), existen diferencias menores entre Ri y la estructura del plásmido Ti y sus mecanismos de virulencia (Moriguchi *et al.*, 2001). Por ejemplo, los plásmidos Ri de *A. rhizogenes* no contienen las secuencias de saturación que se encuentran en los plásmidos Ti de *A. tumefaciens*. Las secuencias Overdrive son de tamaño de 24pb con una secuencia central totalmente conservada de 8pb situada junto al borde derecho en el plásmido Ti y son conocidos por aumentar la eficiencia de la formación de tumores mediante la mejora de procesamiento del borde de ADN-T. Por el contrario, los plásmidos Ri de *A. rhizogenes* poseen secuencias repetidas de 8pb, llamado secuencias estimuladoras de la transferencia de ADN-T (TSS), que mejoran la eficiencia de la transferencia del ADN-T en el genoma de la planta. El TSS consiste en 12 repeticiones de la secuencia 5'-TGCCTTCG-3' en las cepas mikimopina, seis repeticiones de la secuencia 5'-ATTAGTTC-3' en las cepas manopina, cinco repeticiones de la secuencia de 5'-TTGTTCAA-3' en las cepas agropina, o 16 de la secuencia de 5'-GTTCGTCA-3' en las cepas tipo cucumopina de *A. rhizogenes* (Veena y Taylor, 2007).

Otra diferencia notable entre *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* es la ausencia de genes *virE1* y *virE2* del genoma de *A. rhizogenes* y el plásmido Ri (Moriguchi *et al.*, 2001; Hodges *et al.*, 2004). *VirE2* es una proteína de unión al ADN de cadena simple y *VirE1* es una chaperona secretora. La función de *VirE2* es la protección del ADN-T de cadena sencilla (hebras T) del ataque de la nucleasa y promover su importación en el núcleo de las células vegetales (Veena y Taylor, 2007). Los genes *Vir E* son conocidos por ser críticos para la patogénesis de *A. tumefaciens*. Sin embargo, la falta de genes *VirE* u

homólogos en el genoma de *A. rhizogenes* indica claramente que los genes *VirE* no son esenciales para inducción de raíces pilosas (Moriguchi *et al.*, 2001). Es interesante observar que *A. rhizogenes* contiene el gen *GALLS* (agallas) en el plásmido Ri, que puede sustituir a la función *VirE2* en *A. tumefaciens* (Hodges *et al.*, 2004). Un estudio más reciente muestra que, a diferencia de *VirE2*, tanto el gen *GALLS* como *VirE2* contienen secuencias de localización nuclear y un C-terminal tipo IV de señal de secreción. Las mutaciones en cualquiera de estos dominios eliminan la capacidad de *GALLS* para sustituir *VirE2*. El mecanismo por el cual la proteína GALLS puede sustituir a la función *VirE2* en *A. rhizogenes* se desconoce por el momento. Estas diferencias sugieren claramente que los mecanismos de virulencia de Ti y Ri comparten un ancestro común, pero ha evolucionado en mecanismos separados para la transferencia de ADN-T y que otras variaciones en el procesamiento y la transferencia ADN-T pueden existir, pero quedan por ser descubiertas (Veena y Taylor, 2007).

1.1.4.4 Modo de infección por *A. rhizogenes*

A. rhizogenes infecta las heridas de las células de las plantas debido a la producción de compuestos fenólicos que atraen a *A. rhizogenes*. Las bacterias se mueven a la zona de la herida por la quimiotaxis. Tras la infección en la herida seguida por la integración del material genético derivado de *Agrobacterium* en el genoma de la planta resulta en el desarrollo de la enfermedad raíz pilosa. La enfermedad de la raíz pilosa se caracteriza por el crecimiento de raíces plagiotrópicas, un alto grado de ramificaciones laterales, profusión de los pelos de la raíz, y las tasas de mayor crecimiento similar a la de los callos no diferenciados, a pesar de que el tejido mantiene un órgano altamente diferenciado y funcional. Los sistemas de “raíz pilosa”, obtenidos mediante la transformación de tejidos vegetales con “ingeniería natural”, como

es el caso del uso de *Agrobacterium rhizogenes*, el cual ha sido conocido por más de tres décadas (Georgiev *et al.*, 2007).

Todas las cepas de *A. rhizogenes* contienen una región del ADN-T localizado en el plásmido Ri que lleva genes implicados en la iniciación de las raíces y el desarrollo (genes *rol*), genes relacionados con la biosíntesis de opina, y genes de función desconocida (Figura 4; Hansen *et al.*, 1994). Un segundo ADN-T puede estar presente, que contenga los genes implicados en la biosíntesis de auxina (*aux1* o *iaaM* y *aux2* o *iaaH*), junto con otros genes de función desconocida. Los genes *aux* se consideran que desempeñan un papel auxiliar en la inducción de raíces pilosas y no son esenciales para su producción. El ADN-T de las cepas tipo cucumopina y manopina no poseen genes *aux*, sólo los genes *rol* que son suficientes para producir un fenotipo de raíz pilosa (Veena y Taylor, 2007).

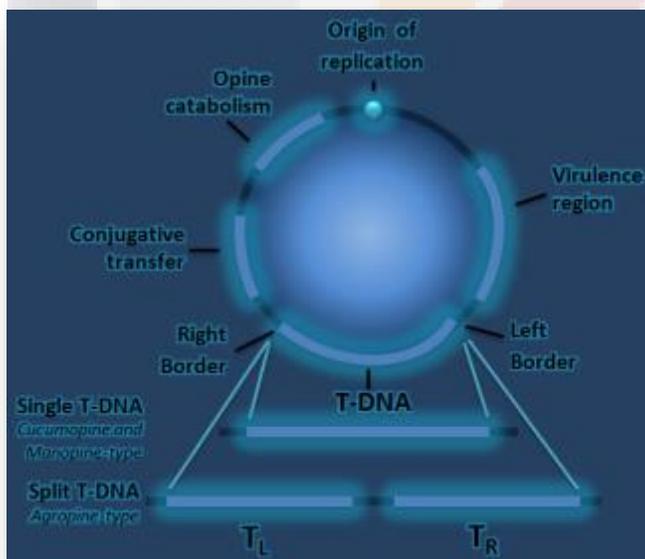


Figura 4. Estructura del plásmido Ri de *A. rhizogenes* (modificado de Veena y Taylor, 2007).

La infección en sitios heridos por *A. rhizogenes* es seguida por la transferencia, integración y expresión del ADN-T (el ADN-T_R y ADN-T_L en cepas agr) desde el plásmido Ri y el desarrollo subsecuente del fenotipo raíz pilosa (Grant *et al.*, 1991). Esto es debido a que en el sistema Ri ADN-T se encuentran los genes que, una vez integrados y expresados en la planta huésped, dan lugar a la proliferación de raíces; este proceso es aparentemente regulado, entre otras cosas, por el balance endógeno de hormonas producidas por las células transformadas en vías de proliferación (Azcón y Talón, 2000). Las raíces pilosas pueden ser seleccionadas de una amplia gama de especies vegetales, muchos de ellas pueden ser regenerados en plantas, a menudo espontáneamente (Figura 1). Se ha observado que una variedad de plantas dicotiledóneas son susceptibles a *A. rhizogenes* (Christey, 2001). Tepfer (1990) enlista 116 especies de dicotiledóneas, además el cultivo de raíces pilosas transformadas se han reportado con plantas regeneradas de 37 especies.

Las raíces pilosas y plantas derivadas de *A. rhizogenes* tienen aplicaciones en muchos ámbitos de la investigación. Por ejemplo, los cultivos de raíces pilosas se han utilizado ampliamente en la investigación de nódulos de la raíz, para la producción de semillas artificiales, para la producción de metabolitos secundarios vegetales, como un sistema experimental para estudiar las respuestas a productos químicos, y para estudiar las interacciones con otros organismos como los nematodos, los hongos micorrícicos y patógenos de la raíz (Christey, 2001).

Los cultivos de raíz establecidas por transformación mediada por *A. rhizogenes* son ampliamente utilizados como fuente de compuestos útiles, debido a su rápido crecimiento en medio libre de hormonas y por la producción relativamente alta de metabolitos secundarios. En adición, en los últimos años ha habido un interés creciente en el uso de *A. rhizogenes*, debido al efecto de los

genes *rol* en la morfología de la planta y el desarrollo y la capacidad de introducir genes extraños a través de la transformación mediante *A. rhizogenes*. En los plásmidos tipo manopina y cucumopina el ADN-T consta de una sola región, mientras que en los tipos agropina, tales como las cepas A4, dos regiones de ADN-T están presentes en el plásmido Ri para la transferencia en las células vegetales (Christey, 2001), la T_L y T_R, cada uno va desde ~15-20 kb (Veena y Taylor, 2007). Estas dos regiones de ADN-T pueden ser integradas separadamente en el genoma de la planta (Christey, 2001).

1.1.4.5 Rangos de hospedantes

El rango de hospederos naturales de *A. rhizogenes* parece estar restringida 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.*, 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 y algunas gimnospermas. La mayoría de los tejidos y órganos vegetales, incluyendo el hipocótilo, hojas, tallo, estacas, pecíolos, meristemo apical, 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. Sin embargo la respuesta varía dependiendo de la cepa de *A. rhizogenes* y la interacción con las especies de plantas y tipo de tejido (Veena y Taylor, 2007).

1.1.5 Cultivo de raíces pilosas de plantas con *A. rhizogenes*

La enfermedad de las “raíces pilosas o peludas” afecta una amplia gama de plantas entre las que se pueden mencionar 187 variedades, 463 especies, 109 familias, 49 órdenes, 5 clases y 2 divisiones (Porter, 1991), sin contar a la familia Cactaceae. La transformación de numerosas especies dicotiledóneas con *Agrobacterium rhizogenes* para producir cultivos de raíces pilosas ha proporcionado un sistema modelo para estudios en la bioquímica y fisiología de la raíz (Flores *et al.*, 1999). Además según Kim *et al.* (2002) el cultivo 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 con callos o cultivos de células en suspensión.

Las raíces transformadas que son inducidas mediante *A. rhizogenes* han sido abundantemente empleadas para el estudio y producción de metabolitos secundarios de muchas especies vegetales. Un reporte realizado por Porter (1991) de una prueba de infección mediante *A. rhizogenes* en 463 especies, las cuales derivaban de 109 familias. De estas, 264 especies, que representan el 57%, fueron sensibles y produjeron raíces transformadas. Con respecto a Cactaceae, Porter indica resultados negativos en todas las especies que analizó (*Echinocactus sp.*, *Lophophora williamsii*, *Opuntia hemifusa*, *Pereskia aculeata*, *Pereskiaopsis velutina* y *Rebutia sp.*). Por esta razón, Porter (1991) reporta que la familia Cactaceae es resistente a la infección con *A. rhizogenes* por lo cual no sería posible producir raíces transformadas de este tipo de plantas.

Por otra parte, se ha demostrado en otras especies de plantas que la adición de acetosiringona, un inductor del gen *vir*, en el medio del co-cultivo

incrementa la frecuencia de explantes con raíces transformadas (Henzi *et al.*, 2000). El ácido cítrico y ascórbico impiden la oxidación de compuestos fenólicos excretados por explantes heridos, un proceso que probablemente inhibe la transformación (González *et al.*, 2006).

1.1.5.1 Cultivo de raíces transformadas de cactáceas

Como ya se mencionó las cactáceas son una gran fuente de metabolitos secundarios, muchos de los metabolitos son sintetizados en las raíces, los cuales se pueden almacenar *in situ* o pueden ser transportados a otros órganos de la planta (Waller y Nowacki, 1978). Por tal razón, una de las técnicas *in vitro* más prometedoras para producir metabolitos secundarios, sin que se afecte la ecología de estas plantas, es la generación y el cultivo de raíces transformadas, inducidas gracias a la infección con *Agrobacterium rhizogenes*. Donde este tipo de raíces tienen grandes ventajas:

- 1) estas raíces se pueden remover del explante original y cultivar en un medio libre de hormonas donde exhiben una alta tasa de crecimiento y estabilidad genética;
- 2) las raíces transformadas producen metabolitos secundarios en altas cantidades y de una manera más estable que otros tipos de cultivos *in vitro* como en es el caso de los callos o células en suspensión.
- 3) Algunas veces es posible regenerar completamente plantas transformadas a partir de ellas (González *et al.*, 2006).

Un estudio realizado por González *et al.* (2006) donde se uso la cepa A4 de *A. rhizogenes* del tipo agropina, demostró que 34 especies de cactus, provenientes de 15 géneros, fueron susceptibles a la infección con *A. rhizogenes*

y capaces de generar raíces transformadas (Figura 5). Adicionó acetosiringona, como un inductor de los genes *vir*, al medio de co-cultivo, el cual aumentó la frecuencia de explantes con raíces transformadas. Asimismo agregó el ácido cítrico y ascórbico, el cual impide la oxidación de compuestos fenólicos excretados por los explantes heridos, proceso que posiblemente inhibe la transformación. Sin embargo, en el trabajo citado no se llegó al cultivo por tiempo prolongado ni a la multiplicación de las raíces transformadas de Cactáceas.



Figura 5. Inducción de raíces pilosas en segmentos de brote de *Mammillaria plumosa* (A) y *Pachycereus schottii* (B) infectadas con *A. rhizogenes* (González *et al.*, 2006).

1.2 Justificación

Actualmente se utilizan una gran cantidad de fitoquímicos como: fármacos, nutrientes, cosméticos, aditivos, y bioplaguicidas, por tal motivo se han desarrollado nuevas alternativas para producir metabolitos de plantas, como la implementación de técnicas *in vitro*, en donde las células vegetales, tejidos u órganos se cultivan en condiciones artificiales y axénicas, gracias a esto los cultivos son independientes de factores climáticos y geográficos, lo cual permite la producción de metabolitos importantes para la sociedad. Una fuente importante de fitoquímicos son las raíces, las cuales sintetizan una gran cantidad de metabolitos, que se almacenan o se transportan a otros órganos, por lo cual, una reciente técnica *in vitro* es la generación y el cultivo de raíces transformadas, inducidas gracias a la infección con *Agrobacterium rhizogenes* (González *et al.*, 2006), la cual causa la producción masiva de raíces adventicias con numerosas raíces pilosas (Georgiev *et al.*, 2007).

Las cactáceas son una fuente potencial de metabolitos secundarios como los alcaloides, triterpenos, betalainas y esteroides (Anderson, 2001; Bravo y Sánchez, 1991). Por lo que la generación y el cultivo *in vitro* de sus raíces transformadas podría permitir obtener estos metabolitos importantes sin alterar su biodiversidad, debido a que estas plantas se encuentran amenazadas. Porter (1991) reporta que en la familia Cactaceae obtuvo resultados negativos respecto a la susceptibilidad de infección con *A. rhizogenes* en todas las especies que analizó; sin embargo, un estudio relativamente reciente realizado en la Universidad Autónoma de Aguascalientes por González *et al.* (2006), demostró que 34 especies de cactus, provenientes de 15 géneros, fueron susceptibles a la infección con *A. rhizogenes* y fueron capaces de generar raíces transformadas. Sin embargo, en este trabajo no se llegó al cultivo y mantenimiento a largo plazo de estas raíces. Por lo

anterior el establecimiento del medio y las condiciones de cultivo adecuadas para las raíces pilosas de las cactáceas permitiría el crecimiento y proliferación de estas, para así poder usarlas para la producción de metabolitos. Este proyecto pretende definir las condiciones más adecuadas para el mantenimiento y propagación de cultivos de raíces transformadas de diversas especies de cactáceas mexicanas y algunas sudamericanas.



2. Hipótesis de trabajo

Es posible obtener, mantener y propagar *in vitro* raíces transformadas de diversas especies de cactáceas mexicanas y algunas sudamericanas. Sistemas de cultivo diferentes al medio semisólido convencional, por ejemplo medios líquidos o sistemas de inmersión temporal, podrían resultar más eficientes para el desarrollo de las raíces transformadas de Cactáceas.



3. Objetivo general

Evaluar la eficiencia de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* en raíces transformadas de varias especies de cactáceas.

3.1 Objetivos particulares

- I. Generar raíces transformadas en especies de cactáceas de los géneros: *Browningia*, *Carnegiea*, *Cephalocereus*, *Coryphantha*, *Echinocereus*, *Echinofossulocactus*, *Echinomastus*, *Epicatus*, *Frailea*, *Hylocereus*, *Isolatocereus*, *Mammillaria*, *Mammilloidia*, *Matucana*, *Melocactus*, *Myrtillocactus*, *Pachycereus*, *Pelecyphora*, *Peniocereus*, *Polaskia*, *Selenicereus* y *Thelocactus*.
- II. En aquellas especies en las que haya sido posible generar raíces transformadas, analizar el crecimiento de las mismas en diferentes sistemas de cultivo.
- III. Analizar de manera preliminar la producción de metabolitos secundarios en tejidos normales y en las raíces transformadas creciendo en los diferentes sistemas de cultivo.

4. Metodología

4.1 Cultivo y análisis de la cepa *Agrobacterium rhizogenes*

4.1.1 Cepa seleccionada para la transformación

La cepa utilizada para la inducción de la transformación fue *A. rhizogenes* A4 tipo agropina con el plásmido silvestre pRiA4 (Figura 6), el cual confiere el fenotipo de raíz pilosa y el vector binario pESC4 (Figura 7), que tiene en la región ADN-T el gen *nptII* que inactiva la kanamicina, con el promotor y terminador *nos*, y al gen *gus* con el promotor *cab* y el terminador *ocs* (Pérez y Ochoa, 1988; González *et al*, 2006).

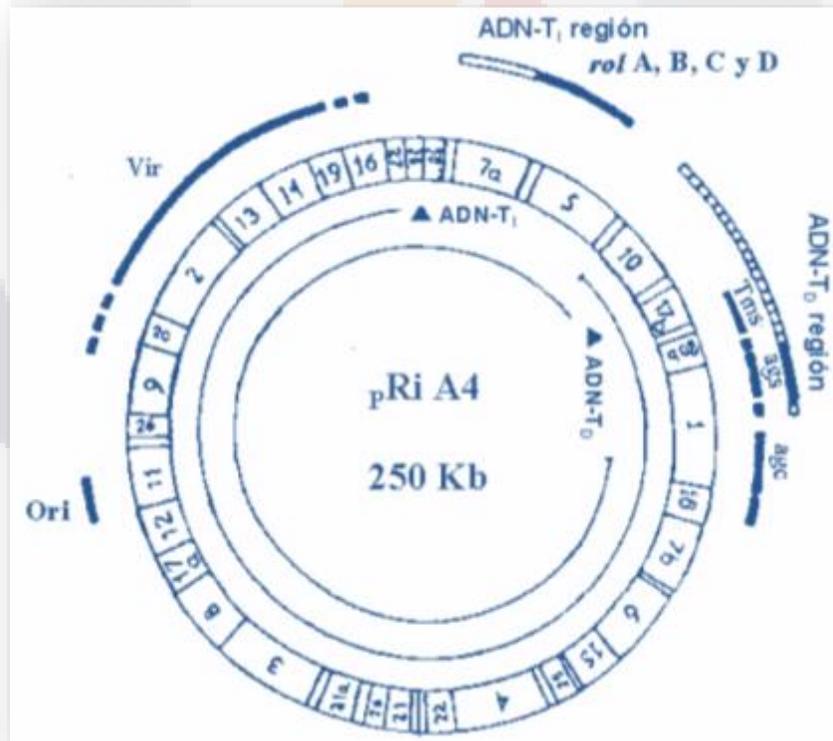


Figura 6. Mapa del plásmido pRiA4 (Biro *et al*, 1987). En la región ADN-T₁ se localizan los genes *rol A, B, C* y *D*. Ori, origen de replicación. *Vir*, genes de virulencia. *Tms*, genes para la biosíntesis de auxinas (*aux1* y *aux2*). *ags*, genes para la biosíntesis de agropinas. *agc*, genes para el catabolismo de agropinas.

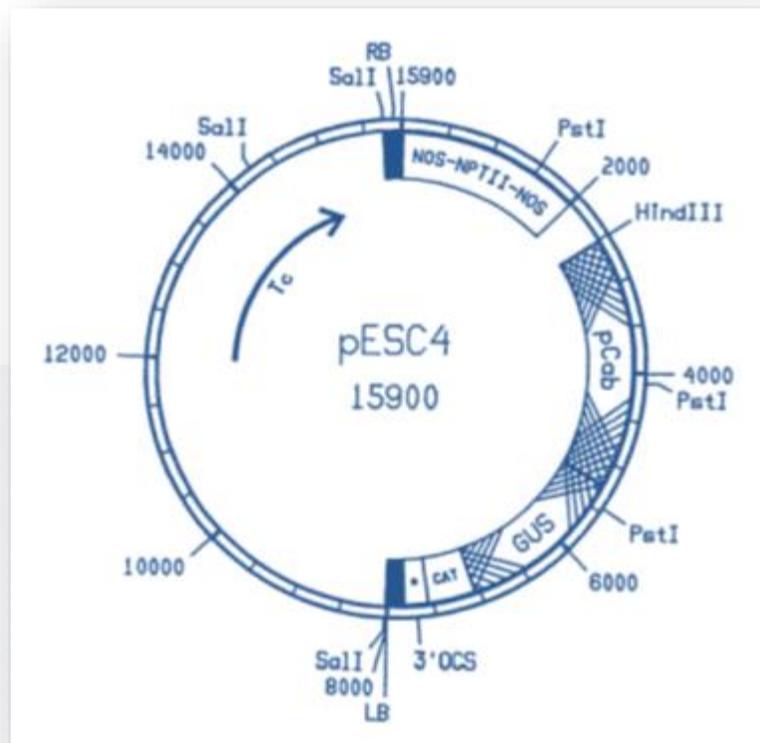


Figura 7. Mapa del plásmido pESC4 (Pérez y Ochoa, 1998). LB, borde izquierdo. pCab, promotor de la apoproteína que une las clorofilas a/b de chícharo. GUS, gen estructural de la β glucorpmodasa. CAT, fragmento del gen de la cloranfenicol acetil-transferasa. 3'OCS, terminador de la octopina sintetasa. NOS-NPTII-NOS, promotor NOS (gen de la neomicina fosfotransferasa tipo II – terminador de la nopalina sintetasa). RB, borde derecho.

4.1.2 Preparación de YM y cultivo bacteriano

Primeramente para el cultivo de la bacteria, se preparó el medio YM líquido, para esto por cada litro que se preparó se hizo una mezcla de 10 g de manitol, 0.2 g de $MgSO_4 - 7H_2O$, 0.5 g de $K_2HPO_4 - 3 H_2O$, 0.4 g de extracto de levadura y 0.1 g de NaCl a un pH de 7. Posteriormente se esterilizó en autoclave, una vez estéril se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura entre 50 y 60°C, se le agregó 50 mg/L de kanamicina y 50 mg/L de Rifampicina en una campana de flujo laminar con una micropipeta y puntas de micropipeta estériles.

Para el cultivo bacteriano se inoculó la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* A4 que contiene el plásmido pRiA4 y el vector binario pESC4 con ayuda de un asa y mechero, ya sellado el recipiente se dejó incubando a 28°C a 100 rpm durante 48 h, se realizó el cultivo bacteriano continuamente aproximadamente cada 15 días, para después ser usado en el análisis por PCR y para la inducción de las raíces.

Por otro lado, para obtener el medio YM semisólido, se utilizó 2.62 g de YMB (caldo levadura manitol) por cada 100 ml. A continuación se esterilizó en autoclave a 12 psi, cuando estuvo a temperatura entre 50 y 60°C se le añadió 5 mg/100mL de Kanamicina (50 mg/L) y 5 mg/100mL de Rifampicina (50 mg/L) y se vació en cuatro cajas de Petri estériles. Cuando el medio solidificó se realizó el cultivo bacteriano sembrando la bacteria *A. rhizogenes* A4/pESC4 en forma de estría con ayuda de un asa y mechero, por último se almacenó a 4°C, para posteriores cultivos. Se resembró aproximadamente cada tres meses.

4.1.3 Confirmación de que la bacteria contiene los genes de interés

4.1.3.1 Extracción de ADN de *Agrobacterium* utilizando lisozima

Para el análisis por PCR del cultivo bacteriano, primero se realizó una extracción de ADN de *Agrobacterium rhizogenes* utilizando lisozima, donde se tomó 1.5 ml del cultivo líquido (medio YM con inóculo de *A. rhizogenes*) en un tubo para microcentrífuga, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos para coleccionar la bacteria y se eliminó el sobrenadante. Hecho esto, se resuspendió la pastilla bacteriana en 350 μ l de STET con lisozima. A continuación se incubó por 30 minutos a 37°C e inmediatamente después se colocó en un baño de agua hirviendo por 40 segundos, terminado esto, se enfrió a temperatura ambiente en baño de hielo. Nuevamente se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos, y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio, a este se le añadió 40 μ L de acetato de sodio 2.5 M a un pH de 5.2; igualmente se le añadió 420 μ L de isopropanol y se precipitó durante 2 horas a -20°C. Se volvió a centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos y se lavó la pastilla con 250 μ L de etanol al 70%, para esto se centrifugó entre cada lavado a 12,000 rpm por 10 minutos, al acabar los lavados se secó la pastilla a 45°C por 15 minutos, finalmente se resuspendió en 40 μ L de TE.

4.1.3.2 Análisis por PCR de la bacteria A4/ESC4

Finalmente se realizó el análisis por PCR para comprobar que los genes *rol B*, *Vir D*, *nptII* y *gus* estaban presentes, se realizó un coctel de 2 μ L de una muestra, que se obtuvo del método de extracción de ADN con lisozima, con 2 μ L de cada uno de los oligos (Cuadro 2), más 25 μ L de mezcla de reacción y 19 μ L de agua ultrapura.

Cuadro 2. Orden de oligos para PCR de *Agrobacterium rhizogenes* A4. Presenta el orden en que se colocaron los oligos para comprobar la presencia de los genes *rol B*, *Vir D*, *nptII* y *gus* con el análisis de PCR. Además se presenta el tamaño de bandas esperado y la secuencia de cada oligo.

Tubo	Oligos	Tamaño de bandas	Secuencia
1	<i>rol B₁</i>	780 pb	5' ATGGATCCCAAATTG CTATTCCTTCCACGA 3'
	<i>rol B₂</i>		5' TTAGGCTTCTTTCTT CAGGTTTACTGCAGC 3'
2	<i>Vir D₁</i>	450 pb	5' ATGTCGCAAGGACGT AAGCCCA 3'
	<i>Vir D₂</i>		5' GGAGTCTTTCAGCAT GGAGCAA 3'
3	<i>nptII₁</i>	517 pb	5' TATTCGGCTATGACT GGGCA 3'
	<i>nptII₂</i>		5' GCCAACGCTATGTCC TGAT 3'
4	<i>gus₁</i>	1200 pb	5' GGTGGGAAAGCGCGT TACAAG 3'
	<i>gus₂</i>		5' GTTTACGCGTTGCTT CCGCCA 3'

En seguida, se realizó una electroforesis con agarosa al 1.2% para comprobar que la bacteria contenía los genes antes mencionados. Para esto, se agregó 1.2 g de agarosa en 100 ml de TAE 1X, se metió al microondas durante 1.25 minuto. Se añadió 30 mL de agarosa en la cámara. Se colocó el marcador de peso molecular de 2000 pb (Low DNA Mass Ladder, Gibco BRL®), 2 µL de colorante con 3 µL de muestra de bacteria A4/ESC4 en medio YM líquido, 6 muestras en total, y se corrió durante 50 minutos. Se obtuvo el gel el cual se tiñó con bromuro de etidio y posteriormente se lavó. Finalmente se observó en luz UV para identificar las bandas.

4.2 Inducción de raíces transformadas

4.2.1 Cactáceas seleccionadas

Se hizo una selección de 60 especies representativas de 22 géneros diferentes de cactáceas (Cuadro 3). El material vegetal se tomó del banco de germoplasma perteneciente al laboratorio de Biotecnología Vegetal del Departamento de Química, del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. No se colectó material alguno de campo.

Cuadro 3. Especies de cactáceas seleccionadas. Se muestran las especies que se usaran en el presente estudio donde se describen sus países de origen, la categoría a la que pertenecen en el CITES, así como la familia, subfamilia y tribu (Anderson, 2001; CITES, 2011; Zuloaga, 2008)

Género y Especie	País	Apéndice en CITES	Familia	Subfamilia	Tribu
<i>Browningia candelaris</i>	CL, PE	II	Cactaceae	Cactoideae	Browningieae
<i>Carnegiea gigantea</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Cephalocereus senilis</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Coryphantha clavata</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Coryphantha durangensis</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Coryphantha echinoidea</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Coryphantha elephantidens</i> (<i>C. bumamma</i>)	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Coryphantha macromeris</i>	MX, EU	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Coryphantha pseudochinosis</i>	MX	-	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Coryphantha radians</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Echinocereus (Morangaya) pensilis</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Echinocereus adustus</i> var <i>adustus</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Echinocereus enneacanthus</i> var <i>enneacanthus</i>	MX, EU	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Echinocereus ferreirianus</i> var <i>lindsayi</i> (<i>E. lindsayi</i>)	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae

<i>Echinocereus knippelianus</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Echinocereus knippelianus</i> (<i>E. knippelianus</i> var <i>kruegeri</i>)	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Echinocereus longisetus</i> (<i>Echinocereus</i> <i>freudenbergeri</i>)	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Echinocereus longisetus</i> var <i>delaetii</i> (<i>E. delaetii</i>)	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Echinocereus pulchellus</i> subsp. <i>weinbergii</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Echinocereus schmollii</i>	MX	I	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Echinofossulocactus</i> sp.	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Echinomastus erectocentrus</i>	MX, EU	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Epicatus híbridos</i> §	Hortícola	-			
<i>Frailea asterioides</i>	BR	-	Cactaceae	Cactoideae	Notocactaeae
<i>Hylocereus undatus</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Hylocereeae
<i>Isolatocereus dumortieri</i> (<i>Stenocereus dumortieri</i>)	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Mammillaria bombycina</i>	MX	-	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria senilis</i> (<i>Mamillopsis senilis</i>)	MX	-	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria carmenae</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria rettigiana</i> (<i>M.</i> <i>gilensis</i>)	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria albiflora</i> (<i>M.</i> <i>herrerae</i> var <i>albiflora</i>)	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria bocasana</i> var <i>bocasana</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria crinita</i> (<i>Mammillaria zeilmanniana</i>)	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria herrerae</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria hutchisoniana</i> subsp. <i>louisae</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria jaliscana</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria longiflora</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria oteroi</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria pennispinosa</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria perbella</i> (<i>M.</i> <i>pseudoperbella</i>)	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria perezdelarosae</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae

<i>Mammillaria petterssonii</i> (<i>M. obscura</i>)	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria solisioides</i>	MX	I	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria sphaclata</i> var <i>sphaclata</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria standleyi</i> (<i>M.</i> <i>sonorensis</i> , <i>M. craigii</i>)	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria theresae</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammillaria uncinata</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Mammilloidia candida</i> (<i>Mammillaria candida</i>)	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Matucana madisoniorum</i>	PE	II	Cactaceae	Cactoideae	Trichocereae
<i>Melocactus curvispinus</i> var <i>curvispinus</i> (<i>M. oaxacensis</i>)	MX, CR PA, VE CO, GT HN	II	Cactaceae	Cactoideae	Cereeae
<i>Myrtillocactus geometrizzans</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Myrtillocactus schenckii</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Pachycereus pringlei</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Pelecyphora strobiliformis</i>	MX	I	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Peniocereus greggii</i>	MX, EU	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Peniocereus serpentinus</i> (<i>Nyctocereus serpentinus</i>)	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Polaskia chichipe</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Pachycereeae
<i>Selenicereus validus</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Hylocereeae
<i>Thelocactus hexaedrophorus</i> var <i>hexaedrophorus</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<i>Thelocactus rinconensis</i> subsp. <i>rinconensis</i>	MX	II	Cactaceae	Cactoideae	Cacteae
<p>Nota: BR = Brasil; CL = Chile; CO = Colombia; CR = Costa Rica; EU = Estados Unidos de América; GT = Guatemala; HN = Honduras; MX = México; PA = Paraguay; PE = Perú; VE = Venezuela.</p> <p>§ Epicatus son híbridos de uso ornamental obtenidos a partir de cruas entre <i>Epiphyllum</i>, <i>Echinopsis</i>, <i>Nopalxochia</i>, <i>Hylocereus</i> y <i>Heliocereus</i>.</p>					

4.2.2 Preparación de medio MS (Murashige y Skoog)

Primeramente se preparó medio MS para el cocultivo, por cada litro que se preparó se añadieron las soluciones concentradas, primeramente en 850 mL de agua destilada en agitación, con ayuda de un magneto, se le colocó 1 mL de la solución A, 1 ml de la solución B, 2.5 mL de la solución C, 2.5 mL de la solución D, 5 ml de la solución E y 10 mL de la solución F. Después se le agregó 30 g de sacarosa, 1.90 g de nitrato de potasio y 1.65 g de nitrato de amonio. A continuación se ajustó el pH a 5.7 con NaOH 1N (para subirlo) y/o HCl 1N (para bajarlo), y se aforó a 1 L. Finalmente se esterilizó en autoclave a 12 psi.

Para la preparación de medio MS semisólido sólo se le agregó 8 g/L de agar como gelificante antes de esterilizar, finalmente se vació 30 ml aproximadamente en cada caja de Petri, en campana de flujo laminar, se sellaron las cajas y se mantuvieron a 4°C.

4.2.3 Primera parte: Cocultivo

Se indujo la transformación a 60 especies de cactáceas las cuales se muestran en el Cuadro 3.

La primera parte de la inducción de raíces es el cocultivo, el cual se realizó de la siguiente manera:

Por cada especie se añadieron 25 μ L de acetosiringona 200 mM en un frasco con 45 mL de medio MS líquido a este frasco se le añadieron 5 mL del cultivo bacteriano líquido. Posteriormente se cortaron 40 explantes transversales delgados de 4 a 5 mm aproximadamente por cada especie de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cactácea. Al tiempo de ser cortados se fueron colocando en un frasco con 45 mL de medio líquido adicionado con 45 μ L de antioxidantes (100 mg/L de ácido cítrico y 100 mg/L de ácido ascórbico, esterilizados por filtración).

Los explantes se transfirieron al frasco con bacteria y acetosiringona, y se incubaron durante 30 minutos. Después se sacaron los explantes de la suspensión bacteriana, se secó el exceso de líquido colocándolos suavemente sobre una gasa estéril y se transfirieron a cajas de Petri con medio MS semisólido sin antibióticos, todo esto en campana de flujo laminar. Por último, se incubaron a 20°C en la oscuridad por 72 h.

4.2.4 Preparación de medio de selección

El medio de selección, que es medio MS semisólido con antibióticos, se preparó de la misma manera que el medio MS semisólido sin antibióticos por cada especie, pero ya estéril y a una temperatura entre 50 y 60°C se le agregaron 50 mg/L de Kanamicina, como agente selectivo, y 250mg/L de Claforán, para eliminar a la bacteria, y se vació aproximadamente 30 mL en cajas Petri en campana de flujo laminar, se sellaron las cajas y se mantuvieron a 4°C.

4.2.5 Segunda parte: Medio de selección

Se sacaron los explantes del medio de cocultivo y se incubaron por 30 minutos en dos frascos con 45 mL de medio MS líquido al cual se le agregó 500 mg/L de Claforán. Se transfirieron los explantes a 5 cajas de Petri con medio de selección, lo anterior en campana de flujo laminar. Finalmente se incubaron los explantes a 20°C en la oscuridad.

4.2.6 Cultivo de raíces en medio semisólido

Se incubaron los explantes hasta obtener raíces, en el cuarto de incubación del laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, manteniéndose en oscuridad a 20°C.

4.2.7 Análisis de raíces generadas

Cuando presentaron raíces claramente visibles cada explante se sembró en cajas de Petri con medio de selección, se comenzaron a medir y contar las raíces marcándolas con plumones de colores cada 15 días durante dos meses desde que apareció la primer raíz, y así observar fácilmente su crecimiento, todo esto para obtener que especies generaron raíces, el número de explantes con raíz, el total de raíces por explante, el porcentaje de explantes que generaron raíces, el número de raíces por explante obteniendo la media, la desviación estándar y el error estándar, y llevar a cabo una curva de crecimiento tomando en cuenta la longitud de las raíces que se generaron cada 15 días durante dos meses de cada explante por especie, estas siguieron estando incubadas a 20°C en la oscuridad.

Las especies en las que sólo tres explantes o menos generaron raíces después de cuatro meses fueron sometidas nuevamente a la transformación, pero sólo a diez explantes por especie, para comprobar los resultados obtenidos. En caso de que generaran raíces, 30 explantes fueron sometidos a transformación para analizar los resultados.

En cuanto a las especies que presentaron 6 o más explantes con raíces que fueron dieciséis especies, se les volvió a inducir la transformación para

obtener más material para trabajar con el en los diferentes sistemas de cultivo y pruebas.

Todos los explantes que generaron raíces se resembraron cada dos meses aproximadamente en cajas Petri con medio de selección semisólido o en caso de que ya no tuvieran espacio se resembraron en recipientes de plástico de un mayor tamaño, y se continuó observando su crecimiento. En aquellos explantes que se produjo una gran cantidad de raíces, estas se separaban por si solas del explante o se separaban con pinzas estériles, posteriormente cuando se encontraban muy compactas se fueron separando en cúmulos de raíces pequeños para que estos continuaran creciendo.

4.3 Sistema de cultivo en medio líquido (CML)

Se preparó medio MS en forma líquida y se colocó 30 mL de este en frascos pequeños, se esterilizó a 12 psi, y a este se le agregó 250 mg/L de Claforán, después se colocaron los explantes, previamente pesados de forma estéril, con que se contaba, esto de forma aleatoria ya que se juntaron los explantes de donde se sacaron los resultado del método convencional y de los que se obtuvieron como material extra. Para probar este sistema de cultivo, se usaron dieciséis especies y se incubaron a 20°C en la oscuridad, para seleccionar las especies que se usaron se tomó en cuenta que hayan generado más de seis explantes en el medio de selección semisólido incubado en oscuridad a 20°C.

Posteriormente cada explante se pesó, después se llevó a cabo una curva de crecimiento tomando en cuenta la biomasa del explante con raíces, cada 15 días durante dos meses.

4.4 Sistema de cultivo en medio líquido con agitación (CMLA)

En este sistema de cultivo se preparó el medio, se seleccionaron las especies y los explantes, se incubó y tomaron los resultados de manera similar al sistema CML, sin embargo para la incubación estuvieron en una agitación de 90 rpm a 25°C en oscuridad.

4.5 Sistema de inmersión temporal automático (RITA®)

Se utilizaron biorreactores comerciales RITA® (por sus siglas en francés Récipient à Immersion Temporaire Automatique, fabricado por la empresa francesa Vitropic S.A.). Esto para observar la respuesta de los explantes de dos especies a este tipo de sistema de cultivo, para esto se preparó 200mL de medio MS líquido al cual se añadieron 250mg/L de Claforán y 50 mg/L de Kanamicina, este se puso en el biorreactor estéril y finalmente se colocó el explante, previamente pesado, todo esto en campana de flujo laminar, se conectó a una bomba de aire y a un temporizador digital (programador de tiempos y frecuencias de inmersión), el cual se programó con una frecuencia de inmersión de 3 h y con un tiempo de inmersión de 15 minutos. Asimismo se incubó a 25°C en luz con un fotoperiodo 12/12. Por último, se realizó una curva de crecimiento, donde se tomó en cuenta el peso en gramos del peso inicial y final contra el tiempo en días, en caso de poder medir las raíces también se tomó una medida inicial y una final y se realizaron observaciones como la generación de ramificaciones o el grosor de las raíces.

4.6 Comparación de los diferentes sistemas de cultivo

Para comparar los diferentes sistemas de cultivo (método convencional, sistema CML, CMLA, y RITA®) se realizaron curvas de crecimiento relativo, para que todos los sistemas tuvieran la misma escala ya que unas se midieron con la biomasa y otras con la longitud de raíces y así poder representar lo mejor posible el crecimiento, se tomó en cuenta el crecimiento relativo contra el tiempo, donde todos los pesos o medidas se divide entre el primer peso o longitud.

Asimismo se realizó una comparación del número de raíces generadas durante el periodo en que se llevó a cabo el tratamiento y se sacó la desviación estándar.

4.7 Pruebas de comprobación de las raíces transformadas

4.7.1 Prueba GUS en raíces generadas

Se realizó una prueba histoquímica para el gen β -glucoronidasa (GUS), a 45 especies que generaron raíces. Primeramente se seleccionaron los explantes, estos se pasaron a luz con un fotoperiodo 12/12 a 25°C entre dos y tres semanas, posteriormente se inició con la prueba, para esto se cortaron las raíces, siete por especie, con un pedazo de explante o callo, se cubrió el tejido con la solución de reacción (100 μ L) en tubos Eppendorf y se incubó a 37°C hasta que apareció un precipitado azul. Se lavó varias veces con etanol al 70% para fijar el tejido y eliminar las clorofilas. Esto mismo se realizó en tres brotes de diferentes especies y en el callo de cuatro especies que se generaron después de inducida la transformación.

4.7.2 Análisis por PCR de los genes de interés de raíces presuntamente transformadas

Para esta prueba se analizaron 25 especies para comprobar que contenían los genes *rol B*, *nptII* y *gus*, se seleccionaron las especies con las que se contaba con el material suficiente para llevar a cabo la PCR. Para esto se hizo una extracción de ADN de las raíces, se corrieron dos geles, después se amplificaron los genes de interés y se corrieron varias electroforesis de los productos amplificados, por último se hizo una electroforesis final de ocho especies de manera representativa.

4.7.2.1 Extracción de ADN de raíces generadas

Se utilizó el método CTAB (Melody, 1997) para la extracción de ADN de las raíces generadas de 25 especies donde se ajustaron los volúmenes finales de resuspensión (aproximadamente 0.30 µg/µL). Primeramente se pesaron de forma estéril entre 30 mg y 1.40 g de tejido vegetal, se pulverizó el tejido con ayuda de nitrógeno líquido y un mortero, lo obtenido se pasó a tubos Eppendorf para microcentrífuga donde se añadió 700 µL de solución de extracción precalentada a 60°C y se homogenizó en vortex. Se dejó en incubación a 60°C durante 20 minutos, agitando cada 5 minutos. Después se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Posteriormente se adicionó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (saturado en TE) y se agitó manualmente por dos minutos. Se centrifugó durante 5 minutos a 12,000 rpm y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo agregando un volumen de isopropanol frío. Se incubó por 24 h a -70°C y se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 12,000 rpm para coleccionar el ADN y se eliminó el sobrenadante después se hicieron dos lavados de la pastilla con 200

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

μL de etanol frío al 80%, después de cada lavado se centrifuga a 12,000 rpm por 10 minutos aproximadamente en cada lavado. Se secó en un thermoblock a 50°C . Por último la pastilla se resuspendió en $50 \mu\text{L}$ de agua destilada estéril. De los $50 \mu\text{L}$ de muestra de ADN se tomaron $10 \mu\text{L}$ para resuspenderlo en $490 \mu\text{L}$ de agua destilada para cuantificar el ADN por medio del espectro a una longitud de onda de 260/280 para ácidos nucleicos. Este volumen fue utilizado para realizar un aislamiento de ADN genómico de la planta. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en TAE 1X, el gel se cargó y corrió a 80V. Se tiñó con bromuro de etidio ($500 \mu\text{L}^{-1}$) durante medio minuto y se lavó por 20 minutos. Se observó en el transiluminador con luz UV.

4.7.2.2 PCR del ADN de raíces generadas

La realización de la PCR se llevó a cabo a través de kits de reacción que incluían todos los reactivos para la reacción (ReadyMix REDTaq de SIGMA® y Platinum® PCR SuperMIX de GIBCOBRL®). Se adecuaron las concentraciones de los iniciadores de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En cuanto a las secuencias iniciadoras para la cadena sentido y para la cadena antisentido de los genes *rol B*, *nptII*, *gus* y *Vir D* fueron los mismos que para el PCR de *Agrobacterium rhizogenes* A4 que se muestra en el Cuadro 2.

Se llevó a cabo una electroforesis de los productos de la PCR con agarosa al 1.2% en TAE 1 X y fue corrido a 80V. Se usó un MPM de 2000pb (Low DNA Mass Ladder, Gibco BRL®), se tiñó el gel con bromuro de etidio ($500 \mu\text{L}^{-1}$) durante medio minuto y se lavó por 20 minutos. Se observó en el transiluminador UV.

4.8 Análisis cualitativo de metabolitos secundarios mediante cromatografía en capa fina (TLC)

4.8.1 Extracción y análisis de metabolitos

Para realizar la extracción se pesaron entre 400 mg y 1 g dependiendo de la disponibilidad de material vegetal de raíces transformadas y tejido normal (planta completa sin transformar, 5 cultivadas *in vitro* y 5 de invernadero de la UAA), esto en 10 especies con las que se contaba con raíces, sólo una especie fue solamente de tejido calloso. Después se prosiguió a realizar la extracción de acuerdo a Wagner y Bladt, 1996 con algunas modificaciones, para esto se utilizó equipo de microescala, primeramente se agregó 2 mL de solución de amoníaco al 10% y se mezcló vigorosamente. La mezcla se sometió a reflujo con 1 mL de metanol por 10 minutos, después se filtró con papel filtro y lo obtenido se colocó en tubos Eppendorf.

Las muestras obtenidas se colocaron en cuatro placas TLC de Silica gel (60F254, Merck, Alemania) usando un volumen final de 50 μ L, para esto se fue colocando 5 μ L de muestra y se dejaba secar hasta completar los 50 μ L. Posteriormente se desarrolló la placa en la oscuridad, utilizando el sistema de solventes de tolueno-acetato de etileno-dietilamina (70:20:10). Las placas se observaron en UV a 365 nm. Posteriormente dos placas con raíces transformadas y tejido normal de 10 especies fueron reveladas, con el reactivo de Marquis y las otras dos placas de las mismas especies con el reactivo de Dragendorff, mediante aspersion y se analizó en luz ultravioleta (365 nm) y luz visible, respectivamente, se realizaron 6 cromatografías que se revelaron con el reactivo de Dragendorff y tres con el de Marquis.

5. Resultados

5.1 PCR del cultivo *Agrobacterium rhizogenes* A4

Se obtuvo un gel de electroforesis del análisis por PCR de una muestra de cultivo líquido de *Agrobacterium rhizogenes* A4/pESC4. Este se muestra en la Figura 8, donde se observan que efectivamente la bacteria contenía los genes *rol B*, *nptII*, *Vir D* y *gus*.

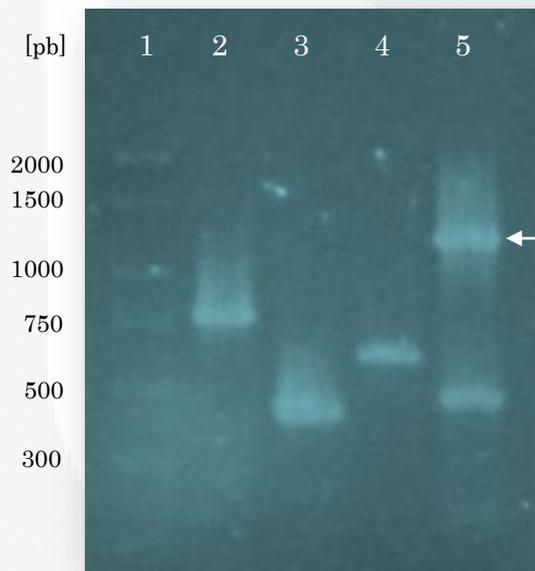
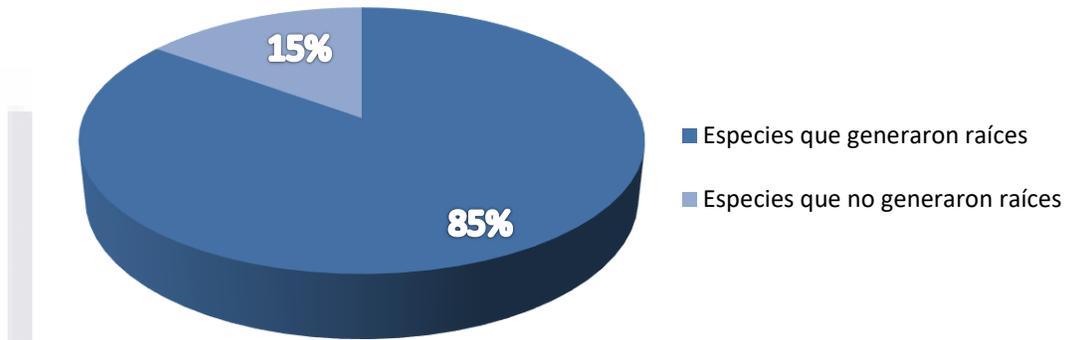


Figura 8. Electroforesis del análisis por PCR. Se observa las bandas de los genes *rol B*, *Vir D*, *nptII* y *gus* que se amplificaron de una muestra del cultivo con *A. rhizogenes* A4/pESC4. Carriles: 1) MPM de 2000 pb; 2) gen *rol B*; 3) gen *Vir D*; 4) gen *nptII*; 5) gen *gus* indicado con la flecha blanca.

5.2 Análisis de cactáceas infectadas por *A. rhizogenes*

De las 60 especies que se les indujo la transformación, el 85% generaron raíces como se representa en la Gráfica 1.



Gráfica 1. Porcentaje de generación de raíces. La presente gráfica indica que especies si generaron raíces y cuáles no, donde se observa que el 85% de las especies lograron generar al menos una raíz.

A continuación, en la Cuadro 4, se presentan los resultados que se obtuvieron en cada especie que se le indujo la transformación con *A. rhizogenes* A4. Sin embargo, como se puede observar en el Cuadro 4 no se obtuvieron resultados de la especie *Mammillaria pennispinosa*, esto debido a contaminación, no se repitió la inducción porque la planta madre también se encontraba contaminada.

Cuadro 4. Respuesta de 60 especies de cactus a la infección con *A. rhizogenes* A4 con el método convencional (MSS). Todos los parámetros se midieron durante 60 días cada 15 días en medio de selección con 50 mg/L de Kanamicina y 250 mg/L de Claforán. El número de raíces por explante presenta la media ± la desviación estándar (DE). Se toman en cuenta sólo las raíces que se presentaron después de dos meses que se generó la primera raíz.

Especies	N	No. explantes con raíz	Total de raíces	Explantes que generaron raíces (%)	No. de raíces por explante (media ± DE)	Longitud de raíces en cm (media ± DE)	Raíces con actividad GUS (%)
<i>Browningia candelaris</i> ☼	40	14	107	35	7.64 ± 4.83	1.08 ± 1.03	100
<i>Carnegiea gigantea</i>	40	1	1	2.5	1.00 ± 0.00	0.60 ± 0.00	-
<i>Cephalocereus senilis</i> ☐	40	8	59	20	7.38 ± 5.48	0.49 ± 0.40	29
<i>Coryphantha clavata</i> ☼	40	10	162	25	16.20 ± 12.49	0.78 ± 0.67	57
<i>Coryphantha durangensis</i> ☐	40	8	42	20	5.25 ± 5.80	0.52 ± 0.43	71
<i>Coryphantha echinoidea</i>	40	0	0	-	0	-	-
<i>Coryphantha elephantidens</i> (<i>C. bumamma</i>)	40	0	0	-	0	-	-
<i>Coryphantha macromeris</i> ☐	40	16	235	40	14.69 ± 11.49	0.49 ± 0.52	71
<i>Coryphantha pseudochinis</i>	40	0	0	-	0	-	-
<i>Coryphantha radians</i>	40	5	25	12.5	5.00 ± 3.74	0.57 ± 0.62	14
<i>Echinocereus</i> (<i>Morangaya</i>) <i>pensilis</i> ☐	40	6	14	15	2.33 ± 1.37	0.45 ± 0.33	0
<i>Echinocereus adustus</i> var <i>adustus</i>	40	4	10	10	2.5 ± 2.24	0.72 ± 0.37	71
<i>Echinocereus enneacanthus</i> var <i>enneacanthus</i>	40	1	1	2.5	1.00 ± 0.00	0.35 ± 0.00	-
<i>Echinocereus ferreirianus</i> var <i>lindsayi</i> (<i>E. lindsayi</i>) ☐	40	7	32	17.5	4.57 ± 1.99	0.72 ± 0.74	14
<i>Echinocereus knippelianus</i>	40	5	23	12.5	4.60 ± 3.36	0.42 ± 0.30	57
<i>Echinocereus knippelianus</i> (<i>E. knippelianus</i> var <i>kruegeri</i>)	40	13	111	32.5	8.54 ± 5.87	0.27 ± 0.25	71
<i>Echinocereus longisetus</i> (<i>Echinocereus freudenbergeri</i>)	40	1	1	2.5	1.00 ± 0.00	0.30 ± 0.00	-
<i>Echinocereus longisetus</i> var <i>delaetii</i> (<i>E. delaetii</i>)	40	3	11	7.5	3.67 ± 3.06	0.30 ± 0.26	0
<i>Echinocereus pulchellus</i> subsp. <i>weinbergii</i>	40	12	34	30	2.83 ± 2.29	0.21 ± 0.11	86

<i>Echinocereus schmollii</i> ☼	40	20	111	50	5.55 ± 4.44	0.56 ± 0.42	71
<i>Echinofossulocactus sp.</i>	40	1	2	2.5	2.00 ± 0.00	0.45 ± 0.07	-
<i>Echinomastus erectocentrus</i>	40	9	26	22.5	2.88 ± 1.76	0.39 ± 0.35	57
<i>Epicatus híbridos</i>	40	0	0	-	0	-	-
<i>Frailea asterioides</i>	40	7	37	17.5	5.29 ± 5.47	0.16 ± 0.08	100
<i>Hylocereus undatus</i> ☐	40	18	108	45	6.00 ± 3.69	0.33 ± 0.31	14
<i>Isolatocereus dumortieri</i> (<i>Stenocereus dumortieri</i>)	40	19	61	47.5	3.21 ± 1.75	0.23 ± 0.19	29
<i>Mammillaria bombycina</i>	40	0	0	-	0	-	-
<i>Mammillaria senilis</i> (<i>Mamilloopsis senilis</i>)	40	5	5	12.5	1.00 ± 0.00	0.72 ± 0.67	43
<i>Mammillaria carmenae</i> ☐	40	6	56	15	9.33 ± 8.69	0.23 ± 0.19	100
<i>Mammillaria rettigiana</i> (<i>M. gilensis</i>)	40	7	13	17.5	1.86 ± 3.58	0.35 ± 0.30	57
<i>Mammillaria albiflora</i> (<i>M. herrerae</i> var <i>albiflora</i>)	40	1	3	2.5	3.00 ± 0.00	0.23 ± 0.10	14
<i>Mammillaria bocasana</i> var <i>bocasana</i> * ☼	40	5	34	12.5	6.80 ± 8.56	0.56 ± 0.35	100
<i>Mammillaria crinita</i> (<i>Mammillaria zeilmanniana</i>) ☐	40	6	12	15	2.00 ± 1.26	0.35 ± 0.31	71
<i>Mammillaria herrerae</i>	40	8	44	20	5.5 ± 4.04	0.21 ± 0.12	43
<i>Mammillaria hutchisoniana</i> subsp. <i>louisae</i> ☐	40	21	143	52.5	6.81 ± 4.87	0.39 ± 0.37	71
<i>Mammillaria jaliscana</i> *	40	15	100	37.5	6.67 ± 4.55	0.37 ± 0.25	71
<i>Mammillaria longiflora</i>	40	0	0	-	0	-	-
<i>Mammillaria oteroi</i> ☐	40	8	34	20	4.25 ± 3.07	0.69 ± 0.71	57
<i>Mammillaria pennispinosa</i>	40	-	-	-	-	-	-
<i>Mammillaria perbella</i> (<i>M. pseudoperbella</i>) ☐	40	9	25	22.5	2.78 ± 1.86	0.51 ± 0.32	71
<i>Mammillaria perezdelarosae</i> ☐	40	6	79	15	13.17 ± 20.33	0.32 ± 0.20	100
<i>Mammillaria petterssonii</i> (<i>M. obscura</i>) ☐	40	3	9	7.5	4.50 ± 4.04	0.34 ± 0.17	57
<i>Mammillaria solisioides</i> ☐	40	8	52	20	6.50 ± 5.35	0.19 ± 0.11	57
<i>Mammillaria sphacelata</i> var <i>sphacelata</i> ☼	40	16	177	40	11.06 ± 7.11	0.15 ± 0.11	100
<i>Mammillaria standleyi</i> (<i>M. sonorensis</i> , <i>M. craigi</i>)	40	5	14	12.5	2.80 ± 1.30	0.20 ± 0.14	-

<i>Mammillaria theresae</i> ☼	40	13	93	32.5	7.15 ± 4.37	0.41 ± 0.27	57
<i>Mammillaria uncinata</i>	40	0	0	-	0	-	-
<i>Mammilloidia candida</i> (<i>Mammillaria candida</i>) ☼	40	6	32	15	5.33 ± 4.23	0.47 ± 0.24	86
<i>Matucana madisoniorum</i>	40	6	43	15	1.17 ± 7.44	0.17 ± 0.14	71
<i>Melocactus curvispinus</i> var <i>curvispinus</i> (<i>M. oaxacensis</i>) * Ω ☼	40	11	119	27.5	10.82 ± 14.62	0.57 ± 0.47	57
<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	40	6	9	15	1.50 ± 0.84	0.47 ± 0.40	43
<i>Myrtillocactus schenckii</i> ☼	40	12	57	30	4.75 ± 4.63	0.29 ± 0.25	57
<i>Pachycereus pringlei</i> Ω ☼	40	5	7	12.5	1.40 ± 0.89	0.98 ± 0.41	-
<i>Pelecyphora strobiliformis</i>	40	7	30	17.5	4.29 ± 1.80	0.20 ± 0.09	71
<i>Peniocereus greggii</i>	40	0	0	-	0	-	-
<i>Peniocereus serpentinus</i> (<i>Nyctocereus serpentinus</i>)	40	5	14	12.5	2.80 ± 2.49	0.28 ± 0.32	0
<i>Polaskia chichipe</i> □	40	17	53	42.5	3.12 ± 2.69	0.53 ± 0.40	100
<i>Selenicereus validus</i> □	40	4	11	10	2.75 ± 0.96	0.37 ± 0.40	43
<i>Thelocactus hexaedrophorus</i> var <i>hexaedrophorus</i> Ω □	40	17	172	42.5	10.12 ± 11.17	0.32 ± 0.27	0
<i>Thelocactus rinconensis</i> subsp. <i>rinconensis</i>	40	5	12	12.5	2.40 ± 1.67	0.25 ± 0.12	100

* Especie que presentó un explante (dos en *Mammillaria bocasana*) con raíces que no se pudieron medir por tener una gran cantidad o estar sobrepuestas, el cual no se toma en cuenta en longitud de raíces.

Ω Especie que presentó un explante (dos en *Thelocactus hexaedrophorus*) con raíces que no se pudieron contar ni medir por tener una gran cantidad o estar sobrepuestas, el cual no se toma en cuenta en el cuadro.

□ Especies que presentaron algunos explantes con algunas ramificaciones.

☼ Especies que presentaron algunos explantes con una gran cantidad de ramificaciones.

- No se obtuvieron resultados.

5.3 Crecimiento de las raíces generadas en medio MS semisólido

En las Figuras 9 y 10, se presentan las imágenes de los explantes de cactáceas a los que se les indujo la transformación, estas son de la primera resiembra en forma individual de cada especie que generó raíces con el método convencional.

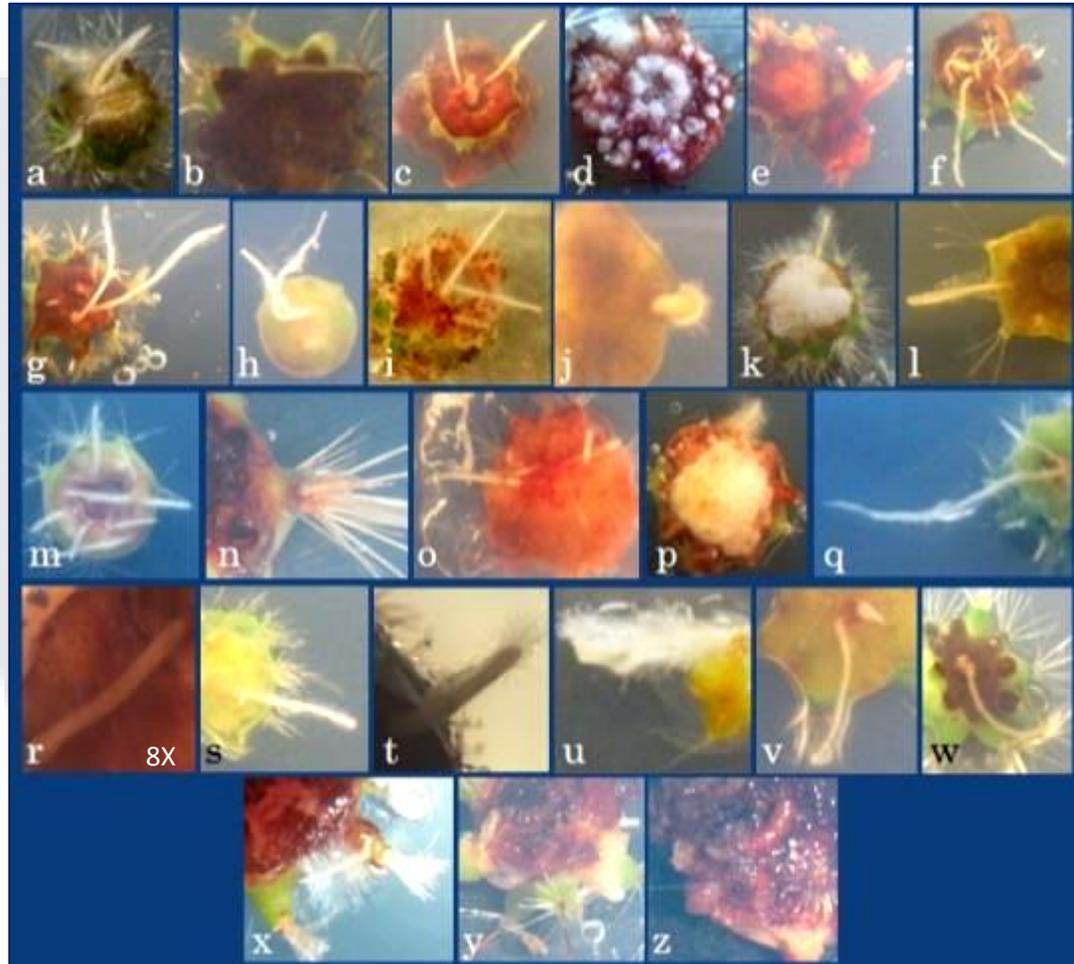


Figura 9. Generación de raíces adventicias (i). Se muestran las diferentes especies que presentaron raíces, mediante la inducción de raíces transformadas con *A. rhizogenes*, las cuales se encuentran en medio de selección semisólido en la oscuridad a 20°C. Imágenes: a) *Browningia candelaris*; b) *Carnegiea gigantea*; c) *Cephalocereus senilis*; d) *Coryphantha clavata*; e) *C. durangensis*; f) *C. macromeris*; g) *C. radians*; h) *Echinocereus* (*Morangaya*) *pensilis*; i) *E. adustus* var *adustus*; j) *E. enneacanthus* var *enneacanthus*; k) *E. ferreirianus* var *lindsayi* (*E. lindsayi*); l) *E. knippelianus*; m) *E. knippelianus* (*E. knippelianus* var *kruegeri*); n) *E. longisetus* (*E. freudenbergeri*); o) *E. longisetus* var *delaetii* (*E. delaetii*); p) *E. pulchellus* subsp. *weinbergii*; q) *E. schmollii*; r) *Echinofossulocactus* sp.; s) *Echinomastus erectocentrus*; t) *Frailea asterioides*; u) *Hylocereus undatus*; v) *Isolatocereus dumortieri* (*Stenocereus dumortieri*); w) *Mammillaria senilis* (*Mamillopsis senilis*); x) *Mammillaria carmenae*; y) *M. rettigiana* (*M. gilensis*); z) *M. albiflora* (*M. herrerae* var *albiflora*).

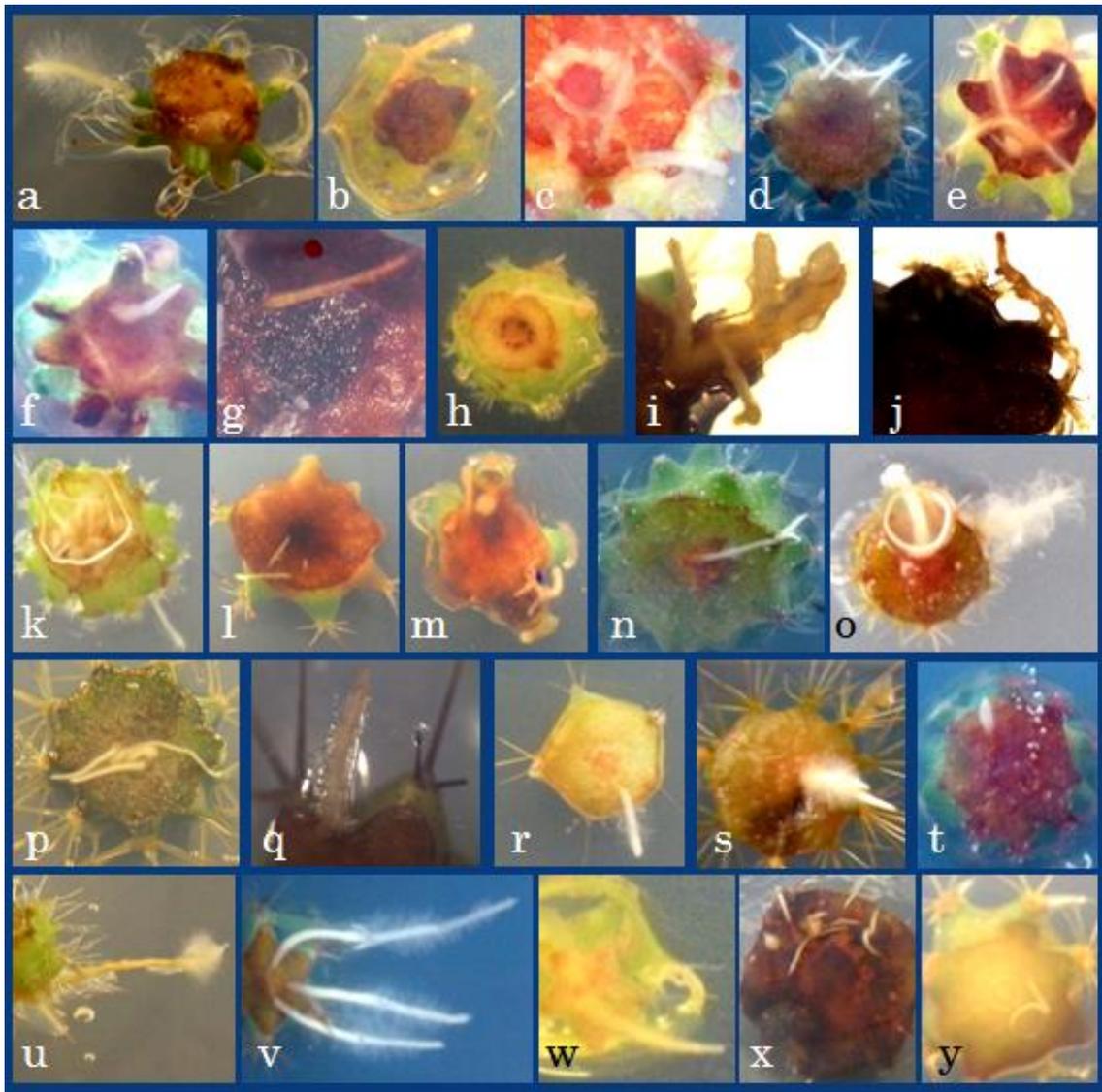


Figura 10. Generación de raíces adventicias (ii). Se muestran las diferentes especies que presentaron raíces, mediante la inducción de raíces transformadas con *A. rhizogenes*, las cuales se encuentran en medio de selección semisólido en la oscuridad a 20°C. Imágenes: a) *Mammillaria bocasana* var *bocasana*; b) *M. crinita* (*M. zeilmanniana*); c) *M. herrerae*; d) *M. hutchisoniana* subsp. *louisae*; e) *M. jaliscana*; f) *M. oteroï*; g) *M. perbella* (*M. pseudoperbella*); h) *M. perezdelarosae*; i) *M. petterssonii* (*M. obscura*); j) *M. solisioides*; k) *M. sphacelata* var *sphacelata*; l) *M. standleyi* (*M. sonorensis*, *M. craigi*); m) *M. theresae*; n) *Mammilloidia candida* (*Mammillaria candida*); o) *Matucana madisoniorum*; p) *Melocactus curvispinus* var *curvispinus* (*M. oaxacensis*); q) *Myrtillocactus geometrizans*; r) *M. schenckii*; s) *Pachycereus pringlei*; t) *Pelecyphora strobiliformis*; u) *Peniocereus serpentinus* (*Nyctocereus serpentinus*); v) *Polaskia chichipe*; w) *Selenicereus validus*; x) *Thelocactus hexaedrophorus* var *hexaedrophorus*; y) *T. rinconensis* subsp. *rinconensis*.

Se observó que las raíces adventicias que se generaron en algunos explantes presentaban numerosos pelos radicales los cuales se pueden (Figura 11).

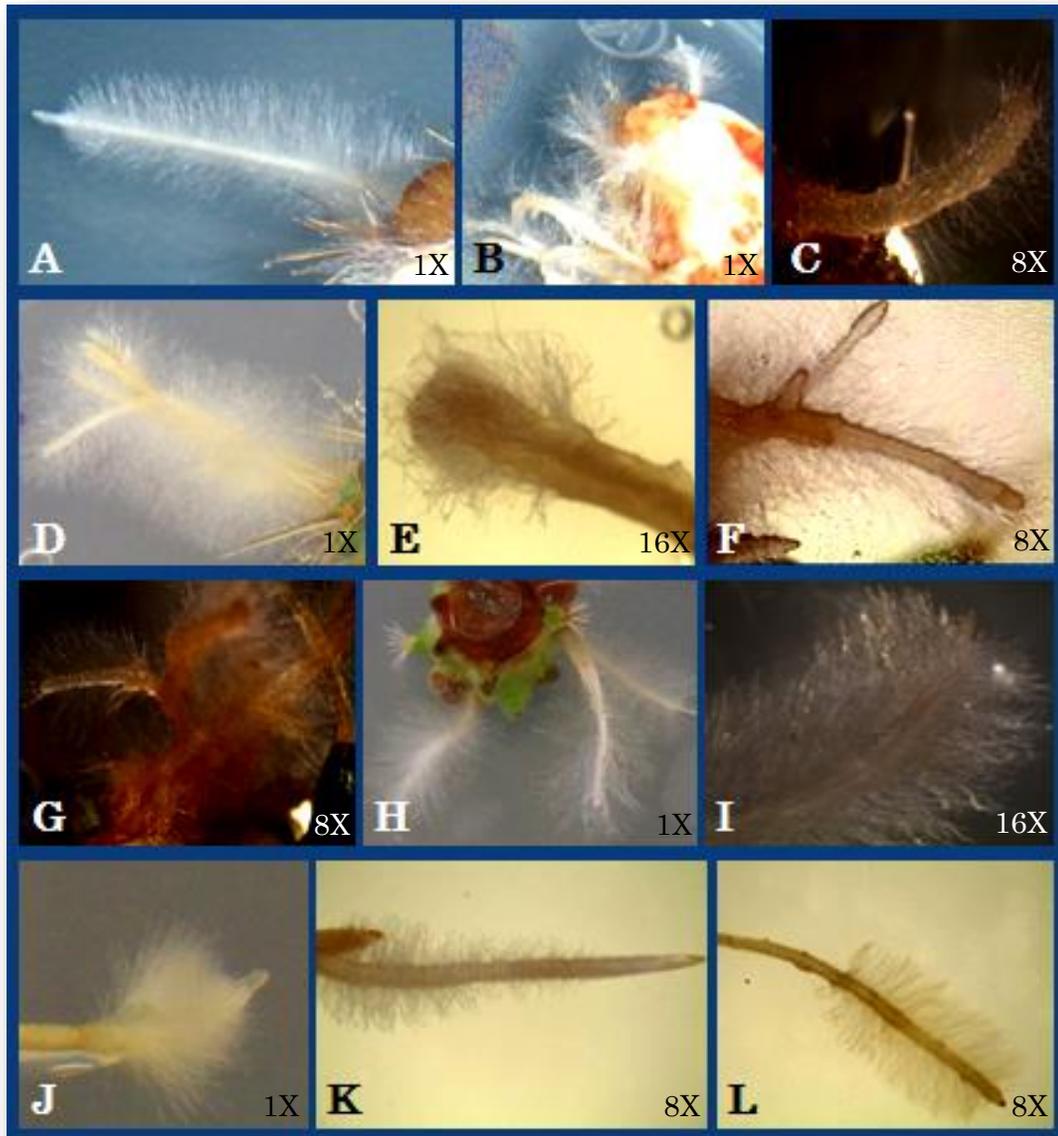


Figura 11. Pelos radicales de raíces inducidas con *A. rhizogenes*. Se muestran raíces adventicias con numerosos pelos radicales durante su cultivo en medio de selección semisólido en la oscuridad a 20°C. Imágenes: A) *Browningia candelaris*; B) *Coryphantha clavata*; C) *Coryphantha macromeris*; D) *Echinocereus schmollii*; E) *Hylocereus undatus*; F y G) *Mammillaria bocasana* var *bocasana*; H y I) *M. hutchisoniana* subsp. *louisae*; J) *Peniocereus serpentinus* (*Nyctocereus serpentinus*); K) *Polaskia chichipe*; L) *Selenicereus validus*.

Las raíces generadas por los explantes de todas las especies se midieron durante dos meses cada quince días como se muestra en la Figura 12.

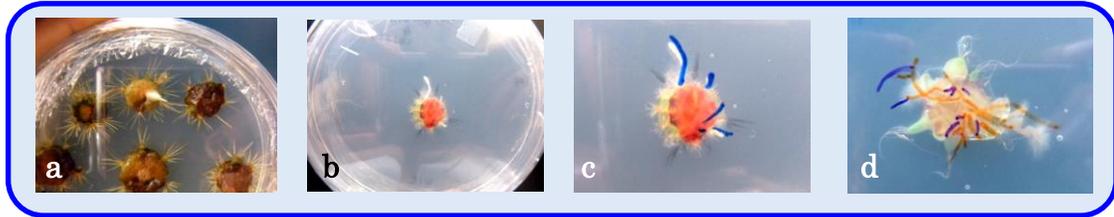


Figura 12. Análisis de raíces generadas. Se muestra cómo se realizó el análisis de las raíces por explante, resemebrando de forma individual cada explante y marcando las raíces cada 15 días con diferentes plumones de colores. Imágenes: a) generación de raíces después de inducirse la transformación en medio de selección; b) explante resemebrado en forma individual en medio de selección; c) raíces marcadas con plumón para observar el crecimiento; d) raíces marcadas con plumones de diferentes colores.

A continuación se muestran imágenes de cinco explantes de cactus que generaron raíces donde se visualiza su crecimiento después de 15 días de haber sido resemebradas de forma individual en medio de selección (Figura 13).



Figura 13. Crecimiento de raíces (15 días) en medio semisólido. Se observan explantes de diferentes especies con un crecimiento después de 15 días que generaron raíces, en la oscuridad a 20°C en medio de selección semisólido. Imágenes: A y B) *Mammillaria perezdelarosae*; C y D) *M. hutchisoniana* subsp. *louisae*; E y F) *Echinocereus knippelianus* (*E. knippelianus* var *kruegeri*); G y H) *M. oteroi*; I, J, K, L) *E. schmollii* por ambos lados.

Por otro lado, algunos explantes a los que se les indujo la transformación, exhibieron en los dos meses que se tomaron resultados, en medio de selección semisólido, un gran número de raíces de diversos tamaños o un gran crecimiento (comparado con raíces de explantes de la misma especie), como se puede apreciar en la Figura 14.

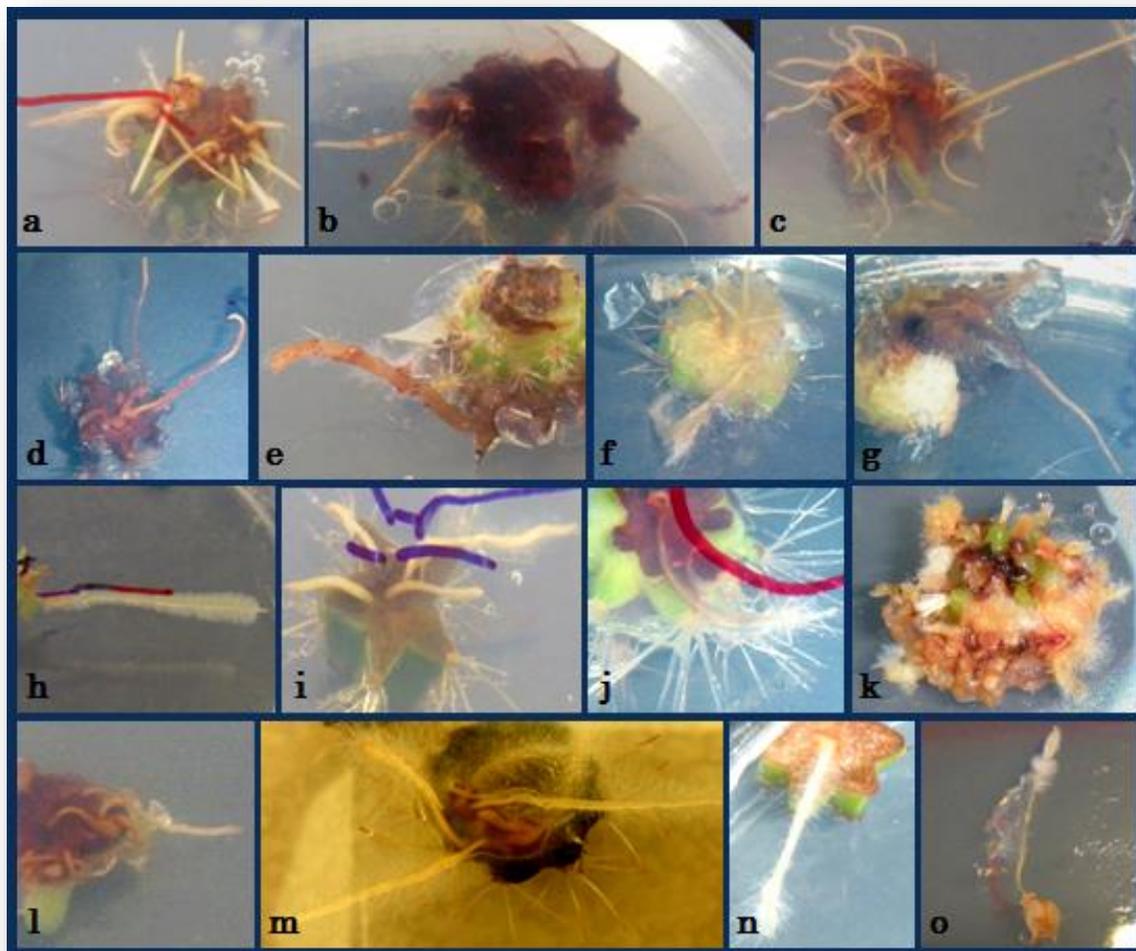


Figura 14. Crecimiento de raíces (60 días) en medio semisólido. Se muestran explantes de diferentes especies con un gran número de raíces o un buen crecimiento (comparado con otras raíces de la misma especie) en la oscuridad a 20°C en medio de selección semisólido durante 60 días que se tomaron resultados. Imágenes: a) *Cephalocereus senilis*; b) *Coryphantha durangensis*; c) *C. macromeris*; d) *C. radians*; e) *Echinocereus ferreirianus* var *lindsayi* (*E. lindsayi*); f) *E. schmollii*; g) *Echinomastus erectocentrus*; h) *Hylocereus undatus*; i) *Isolatocereus dumortieri* (*Stenocereus dumortieri*); j) *Mammillaria senilis* (*Mamillopsis senilis*); k) *M. carmenae*; l) *M. theresae*; m) *Melocactus curvispinus* var *curvispinus* (*M. oaxacensis*); n) *Myrtillocactus geometrizans*; o) *Selenicereus validus*.

Explantos de ciertas especies de cactáceas, que se encontraban en medio de selección semisólido, presentaron un gran número de raíces ramificadas en los dos meses que se estuvieron tomando resultados (Figura 15), como se indica en el Cuadro 4.

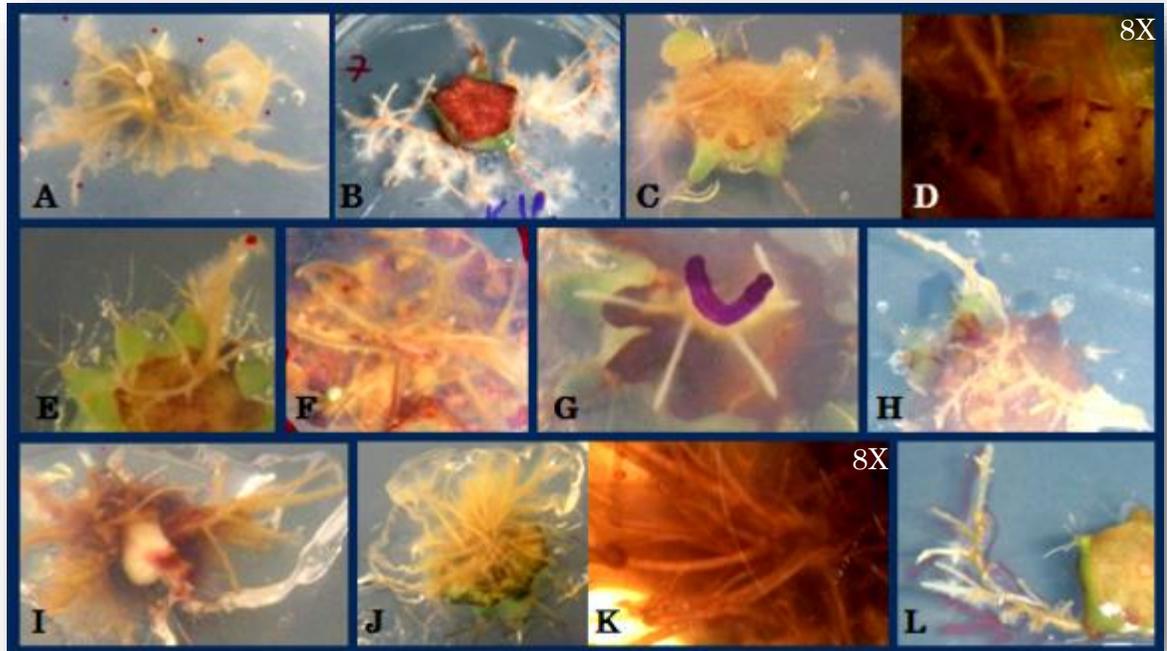


Figura 15. Ramificaciones en raíces inducidas con *A. rhizogenes*. Se observan tres explantes de diferentes especies con un gran número de ramificaciones en la oscuridad a 20°C en medio de selección semisólido durante 60 días que se tomaron resultados. Imágenes: A) *Browningia candelaris*; B) *Coryphantha clavata*; C y D) *Mammillaria bocasana* var *bocasana*; E) *M. crinita* (*M. zeilmanniana*); F) *M. jaliscana*; G) *M. perezdelarosa*; H) *M. sphacelata* var *sphacelata*; I) *Mammilloidia candida* (*Mammillaria candida*); J y K) *Melocactus curvispinus* var *curvispinus* (*M. oaxacensis*); L) *Myrtillocactus schenckii*.

Además se hizo seguimiento de los explantes después de haber tomado los resultados, resemebrando los explantes cada dos meses, donde se observó que continuaban crecimiento las raíces de algunas especies (Figura 16).

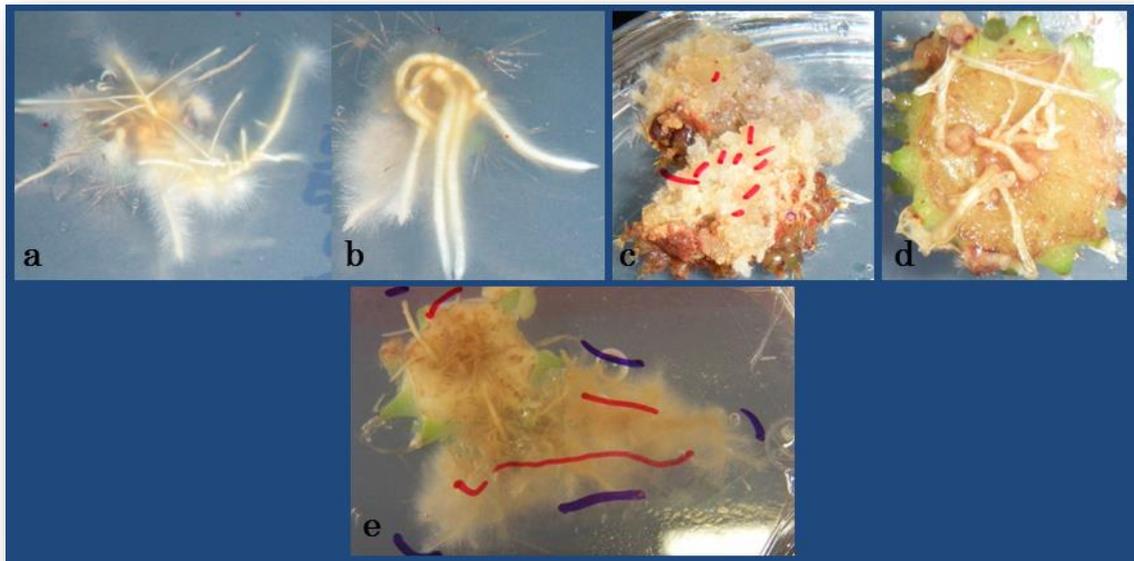


Figura 16. Crecimiento y ramificaciones de raíces generadas. Se observan cinco explantes, los cuales crecieron después de los dos meses en que se tomaron resultados, estos continuaban en medio de selección y en oscuridad a 20°C. Imágenes: a y b) *Browningia candelaris*; c) *Mammillaria sphaelata* var *sphaelata* con una gran cantidad de raíces pequeñas, d) la misma especie pero con raíces más largas; e) *M. bocasana* var *bocasana*, fue tomada a los tres meses y medio de que se terminó de tomar resultados, y f) pertenece al mismo explante pero a los seis meses con más raíces y con una gran cantidad de ramificaciones.

De algunas especies se obtuvo una gran cantidad de raíces y ramificaciones, por lo que se pasaron a un recipiente más grande donde se observó que comenzaron a crecer más rápidamente por tener un mayor espacio, sin embargo las raíces se encontraban muy compactas por los que al resemebrarse se separaban en cúmulos pequeños, donde los cúmulos de raíces continuaron creciendo. Todo esto se realizó como se muestra en la Figura 17.

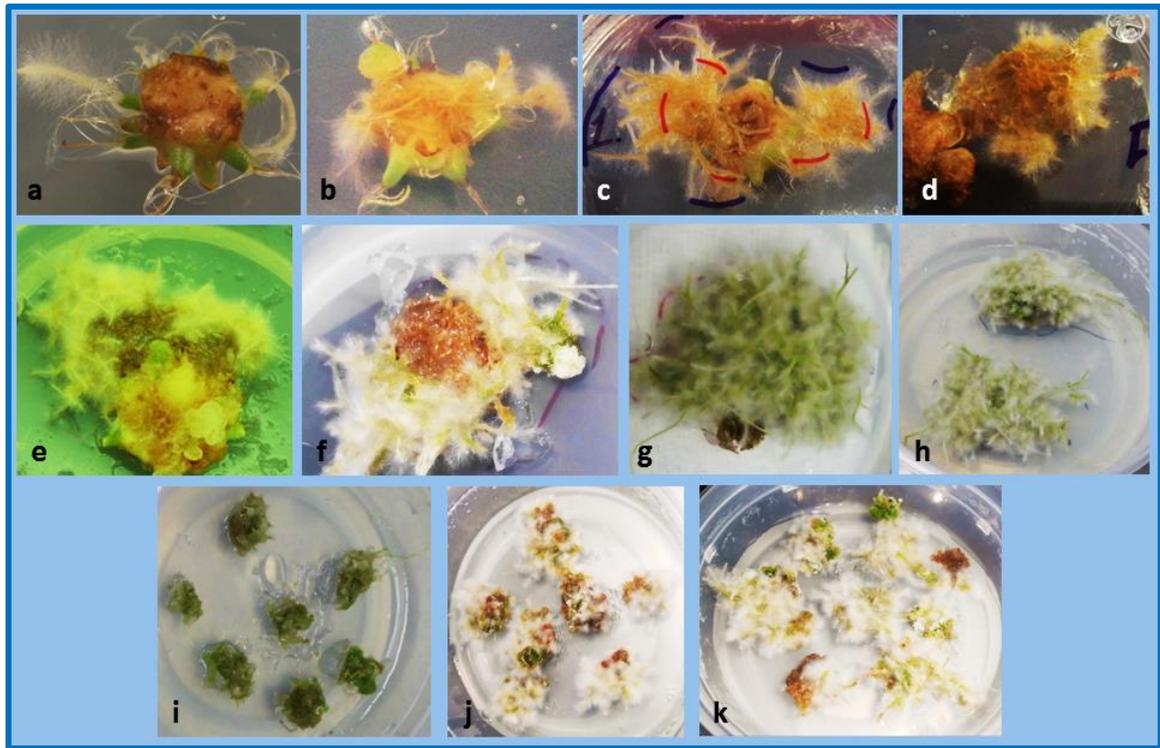
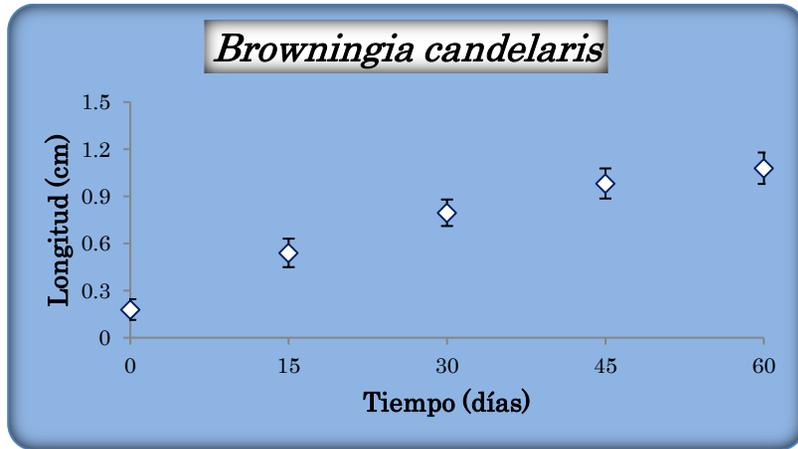


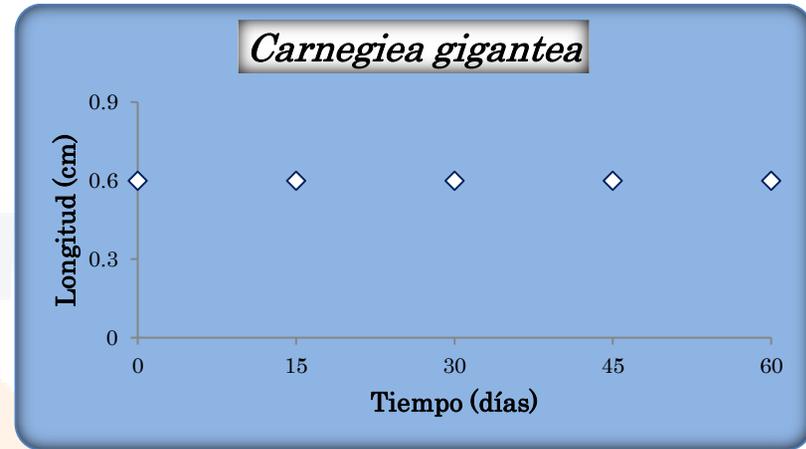
Figura 17. Proceso de la resiembra de raíces generadas. Imágenes: a) generación de las primeras raíces después de inducirse la transformación, 1° resiembra; b) crecimiento de raíces a los dos meses; c) crecimiento a los cinco meses, 3° resiembra; d) un de los cúmulos de raíces se separó por si sola y el cúmulo que se observa continuó creciendo en luz; e) resiembra del explante en un recipiente más grande; f) separación de las raíces del explante con pinzas estériles, 6° resiembra; g) crecimiento de raíces y ramificaciones a los 9 meses; h) separación en dos partes por estar muy compactas las raíces; i) división en varios pedazos pequeños y en varios recipientes al igual que la otra mitad que se separo sola; j) crecimiento de raíces pilosas de los cúmulos de raíces a los 12 meses; y k) otro recipiente con pedazos de raíces que viene del mismo explante donde se observa un mayor crecimiento.

5.3.1 Curvas de crecimiento de las raíces generadas en medio semisólido

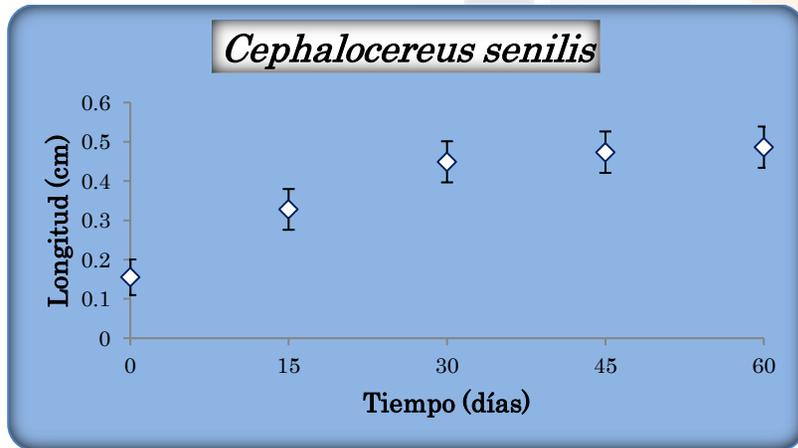
Se realizaron curvas de crecimiento de las especies que generaron raíces, esto para representar su crecimiento con el método convencional es decir en medio semisólido (Gráfica 2 a 52) donde se tomó en cuenta su longitud en centímetros; a los 0 días, cuando se pasó el explante que presentó raíz al medio de selección en forma individual, y luego a los 15, 30, 45 y 60 días.



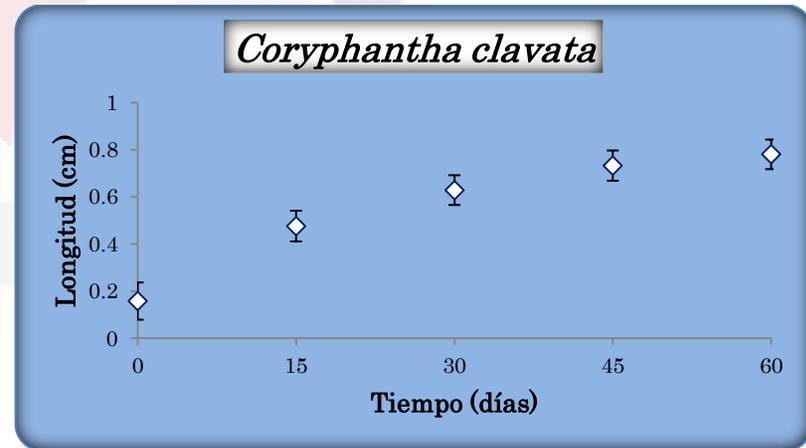
Gráfica 2. Curva de crecimiento de las raíces generadas por *Browningia candelaris*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 107.



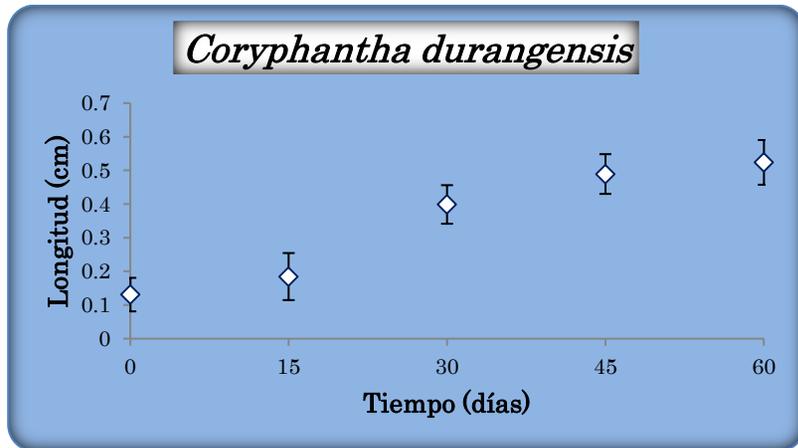
Gráfica 3. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Carnegiea gigantea*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 1.



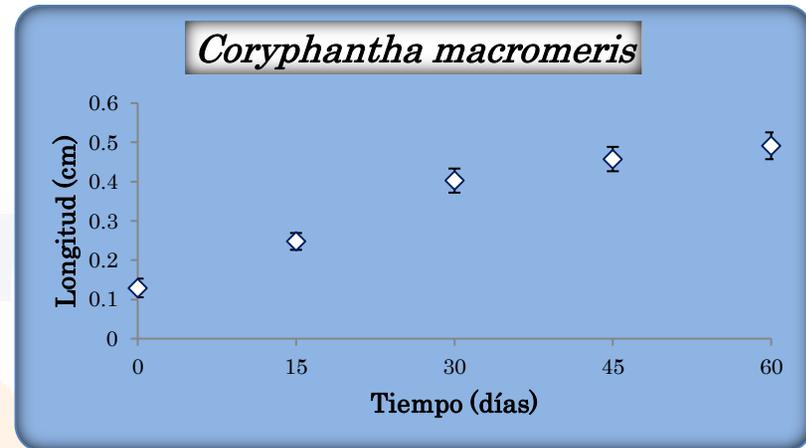
Gráfica 4. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Cephalocereus senilis*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 59.



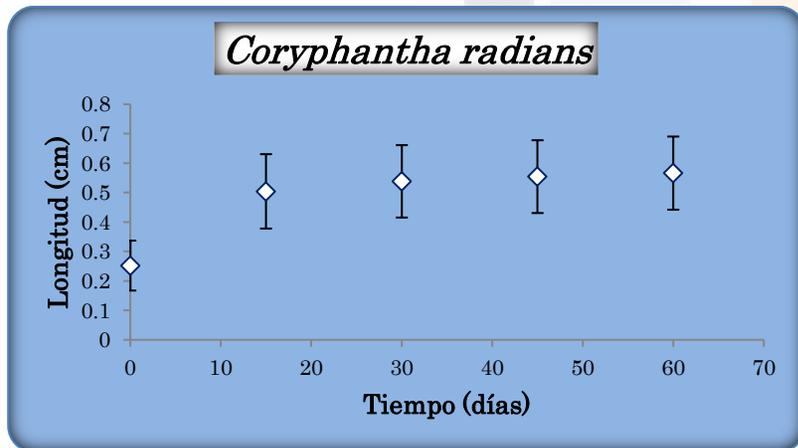
Gráfica 5. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Coryphantha clavata*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 114.



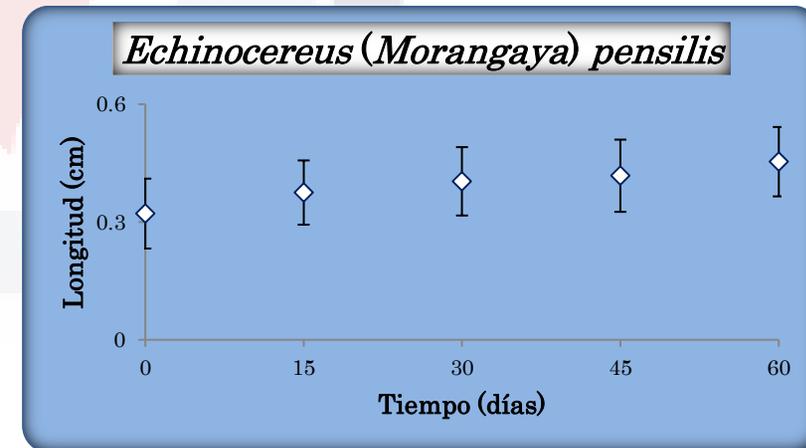
Gráfica 6. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Coryphantha durangensis*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 42.



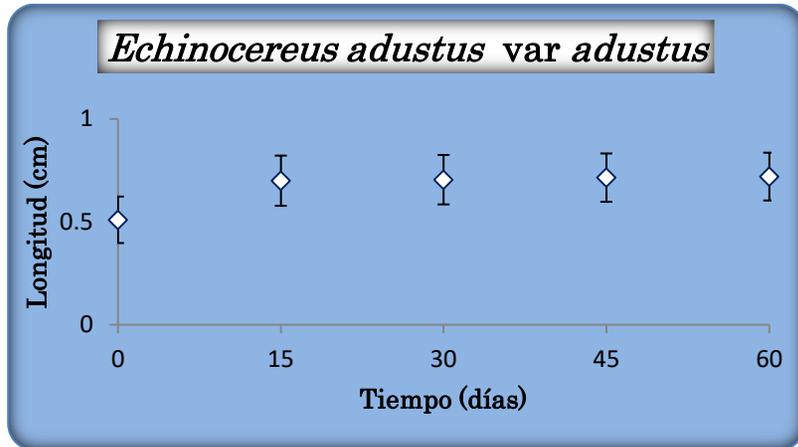
Gráfica 7. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Coryphantha macromeris*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 235.



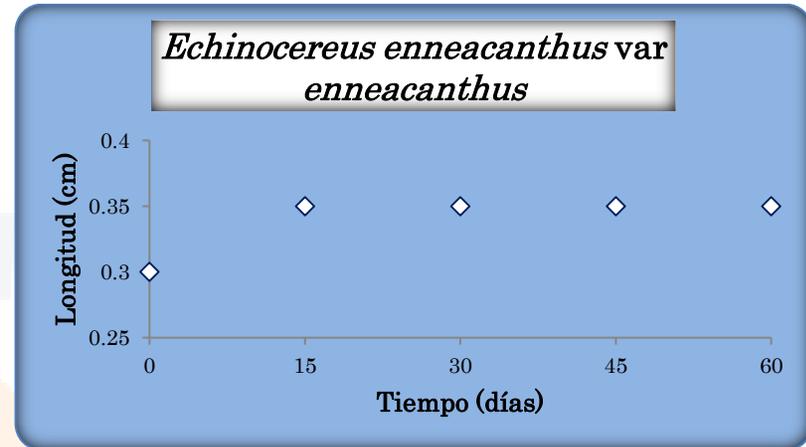
Gráfica 8. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Coryphantha radians*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 25.



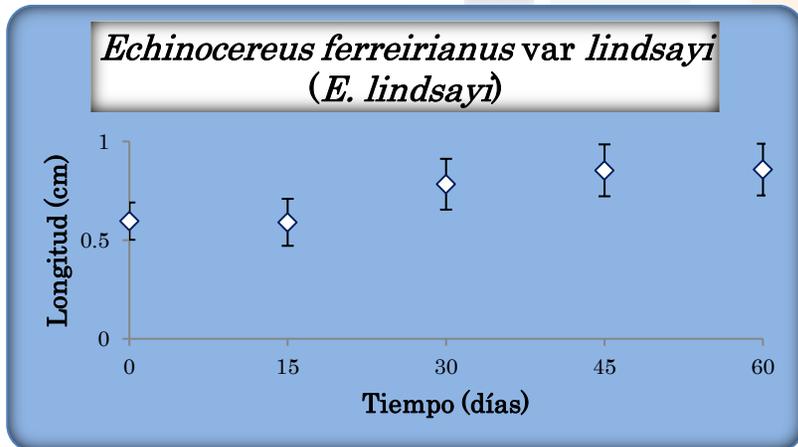
Gráfica 9. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Echinocereus (Morangaya) pensilis*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 14.



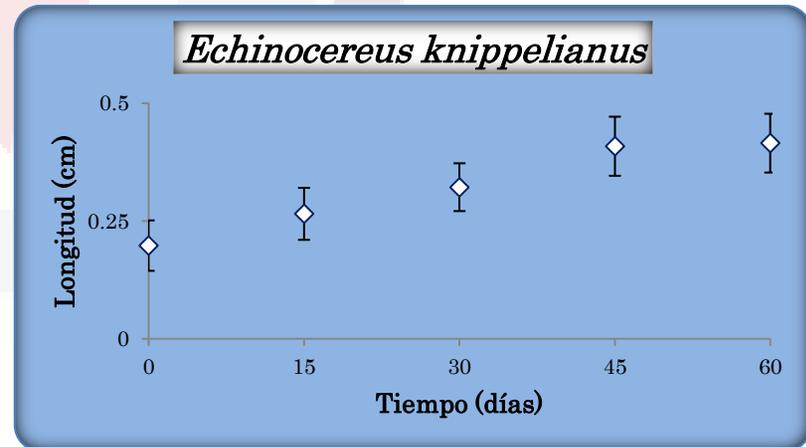
Gráfica 10. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Echinocereus adustus* var *adustus*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 10.



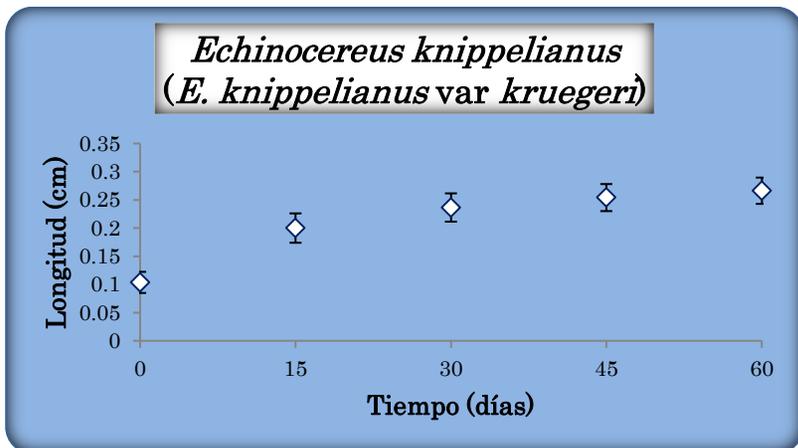
Gráfica 11. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Echinocereus enneacanthus* var *enneacanthus*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 1.



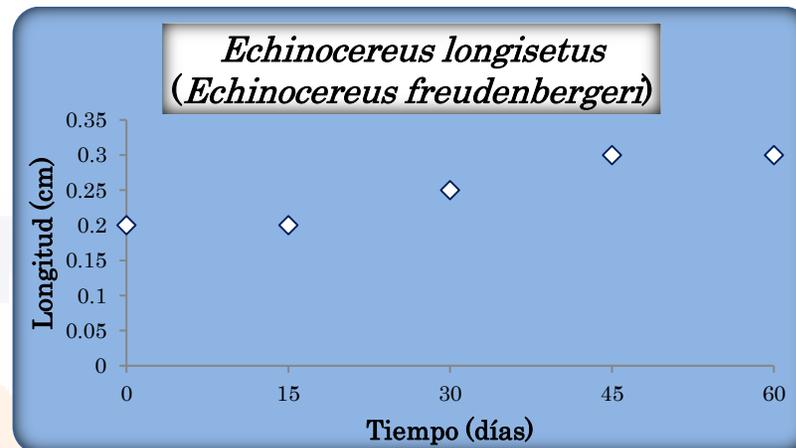
Gráfica 12. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Echinocereus ferreirianus* var *lindsayi* (*E. lindsayi*). Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 32.



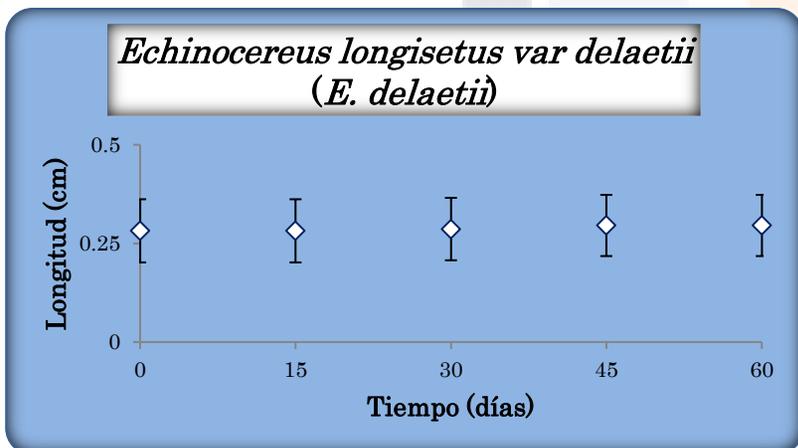
Gráfica 13. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Echinocereus knippelianus*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 23.



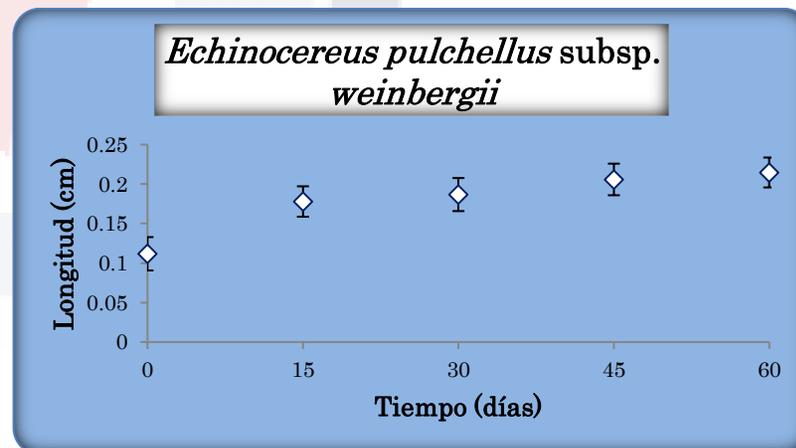
Gráfica 14. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Echinocereus knippelianus* (*E. knippelianus* var *kruegeri*). Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 111.



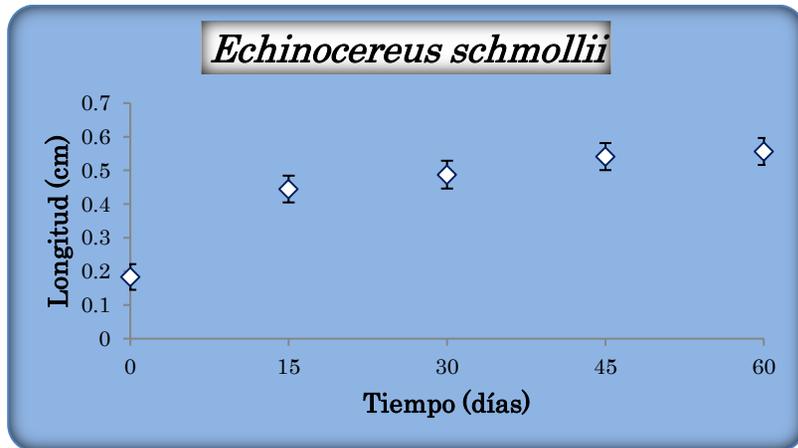
Gráfica 15. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Echinocereus longisetus* (*Echinocereus freudenbergeri*). Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 1.



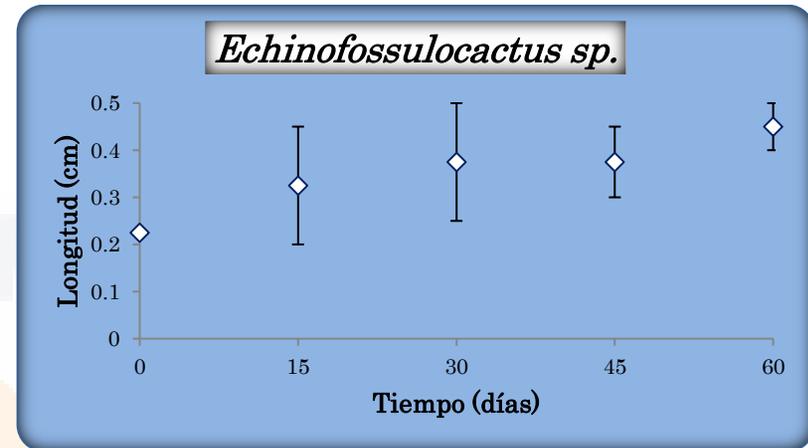
Gráfica 16. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Echinocereus longisetus* var *delaetii* (*E. delaetii*). Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 11.



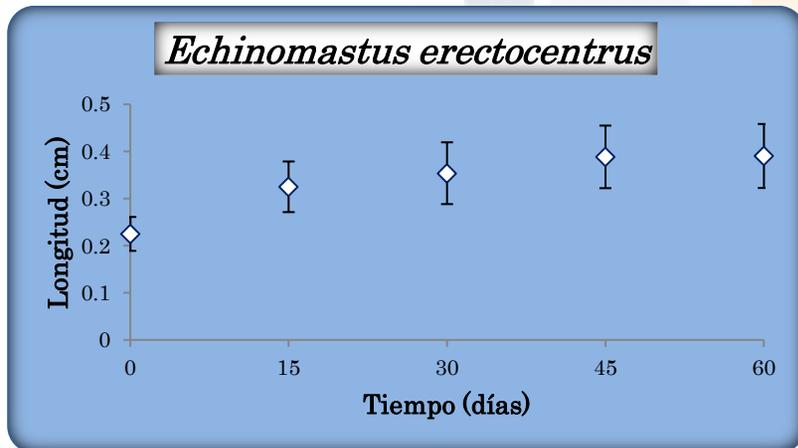
Gráfica 17. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Echinocereus pulchellus* subsp. *weinbergii*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 34.



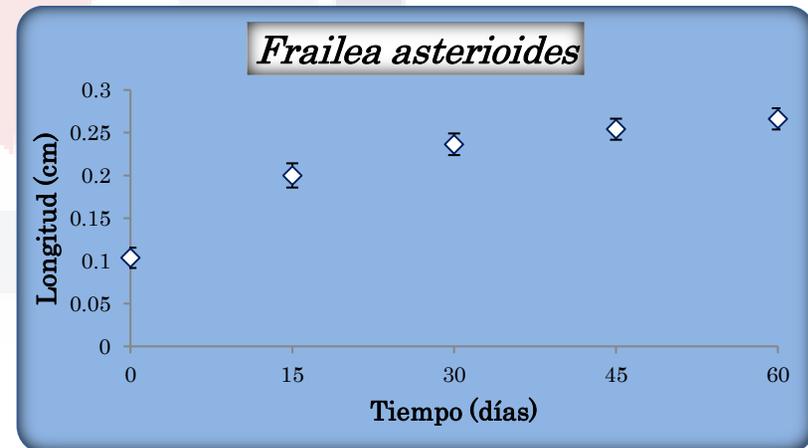
Gráfica 18. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Echinocereus schmollii*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 111.



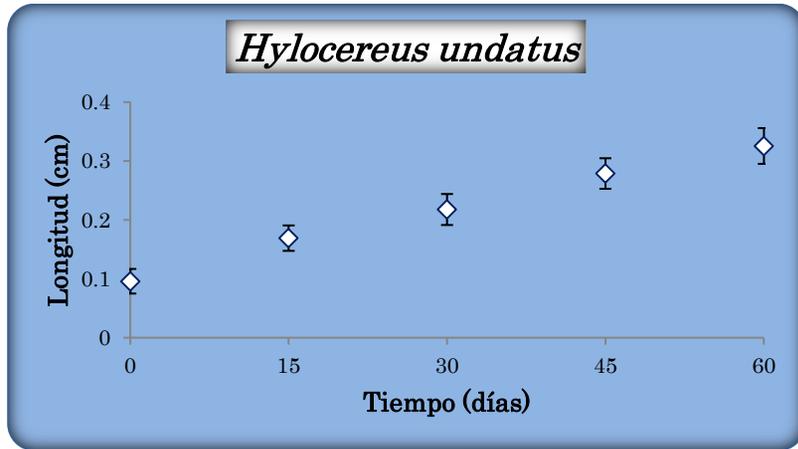
Gráfica 19. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Echinofossulocactus sp.* Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 2.



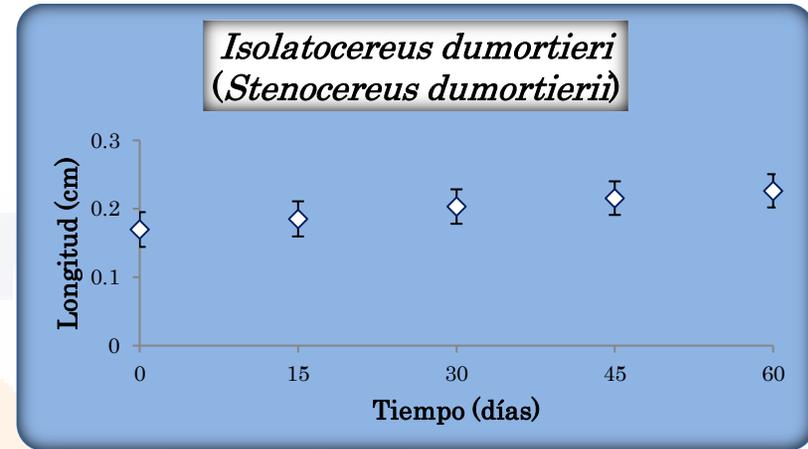
Gráfica 20. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Echinomastus erectocentrus*. Crecimiento en durante 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 26.



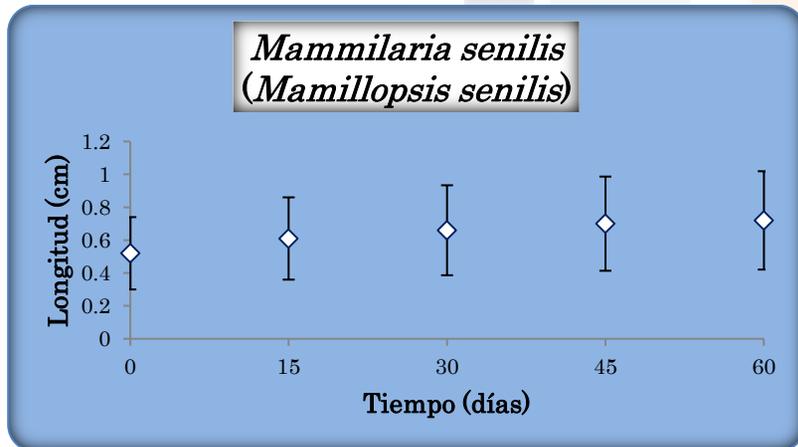
Gráfica 21. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Frailea asterioides*. Crecimiento en durante 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 37.



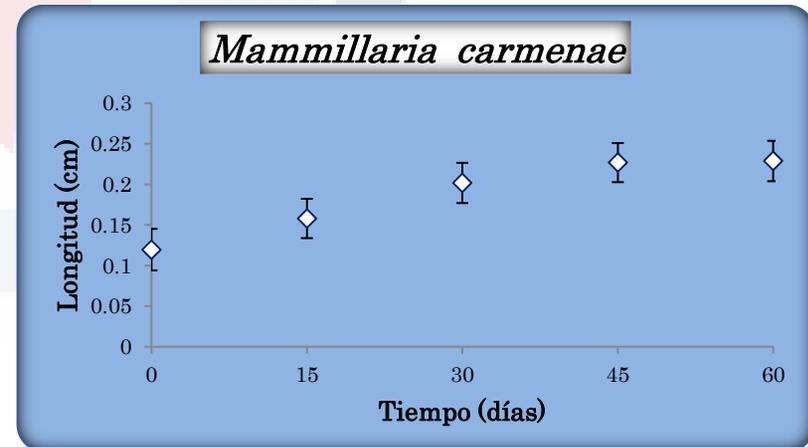
Gráfica 22. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Hylocereus undatus*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 108.



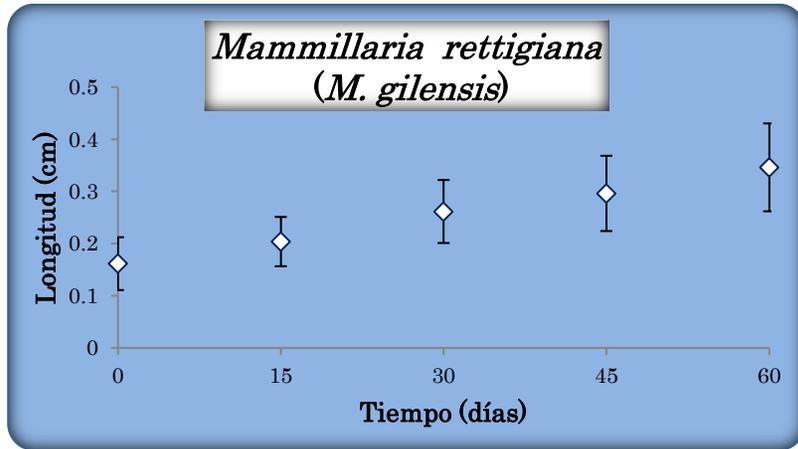
Gráfica 23. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Isolatocereus dumortieri* (*Stenocereus dumortieri*). Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 61.



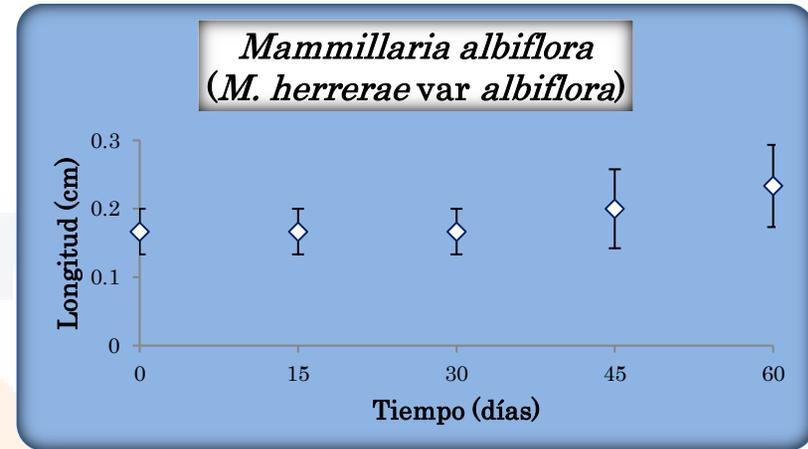
Gráfica 24. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammillaria senilis* (*Mamillopsis senilis*). Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 5.



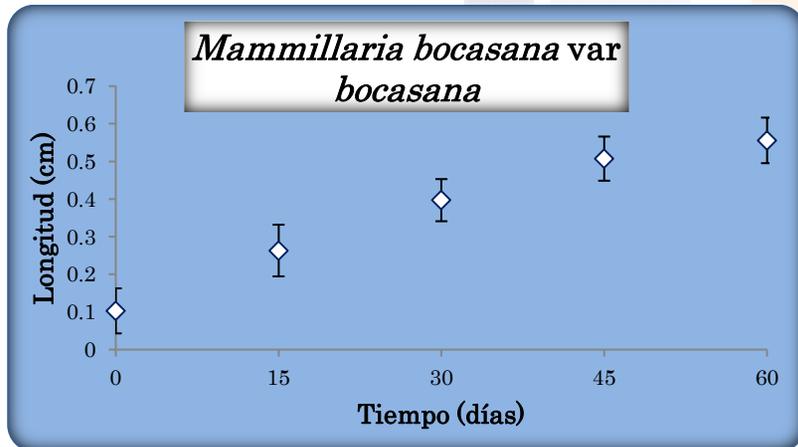
Gráfica 25. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammillaria carmenae*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 56.



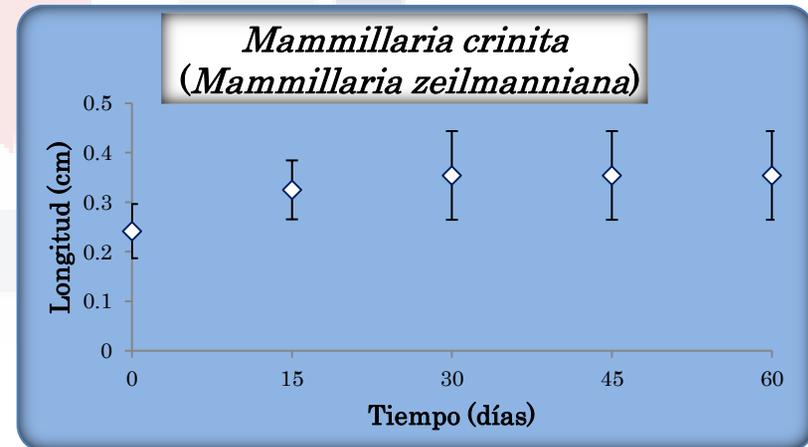
Gráfica 26. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammillaria rettigiana* (*M. gilensis*). Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 13.



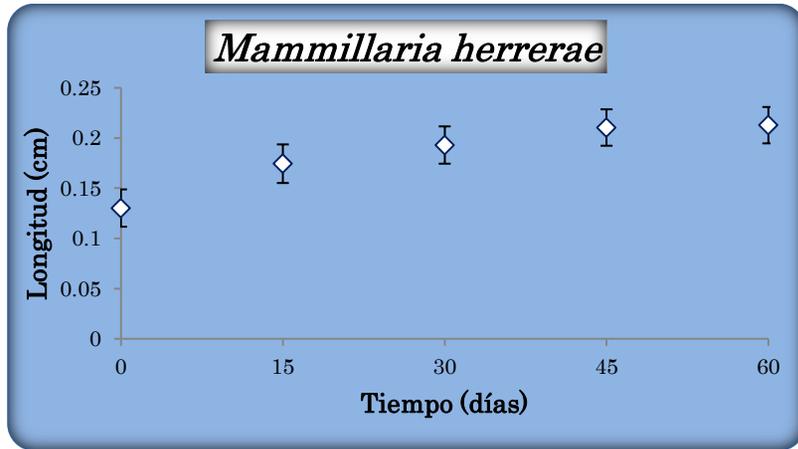
Gráfica 27. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammillaria albiflora* (*M. herrerae* var *albiflora*). Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 3.



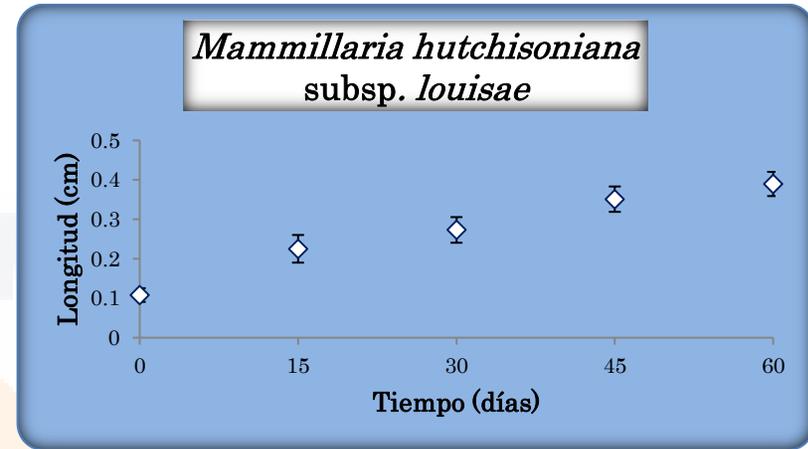
Gráfica 28. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammillaria bocasana* var *bocasana*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 34.



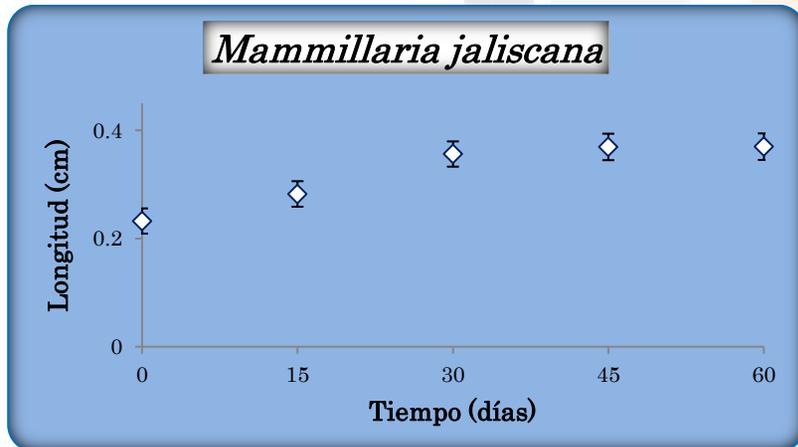
Gráfica 29. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammillaria crinita* (*Mammillaria zeilmanniana*). Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 12.



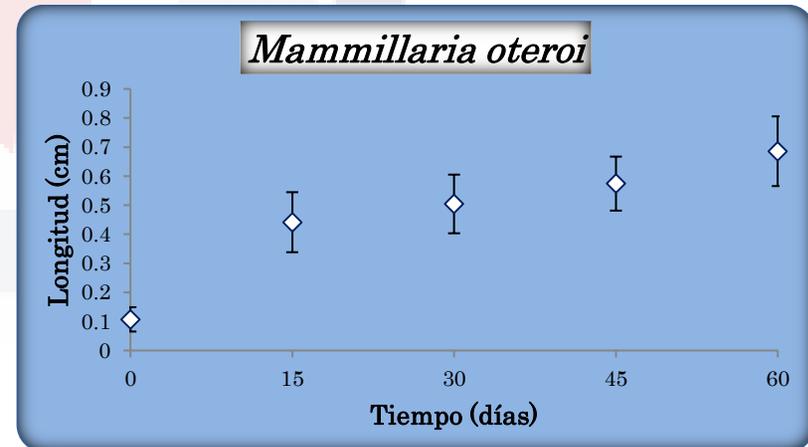
Gráfica 30. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammillaria herrerae*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 44.



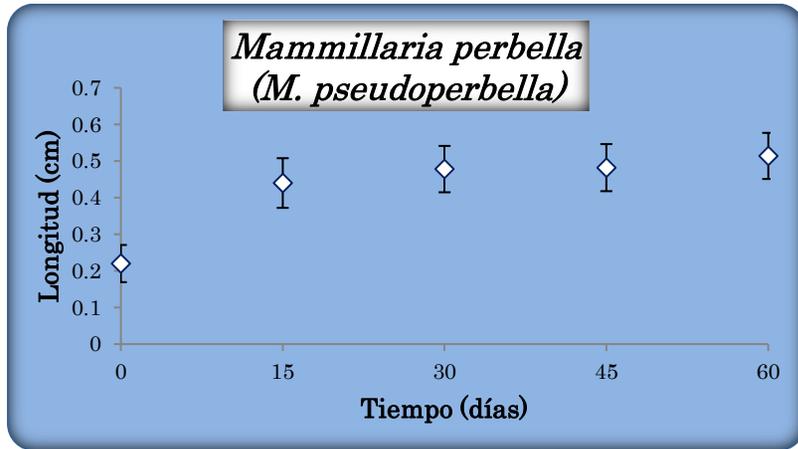
Gráfica 31. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammillaria hutchisoniana* subsp. *louisae*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 143.



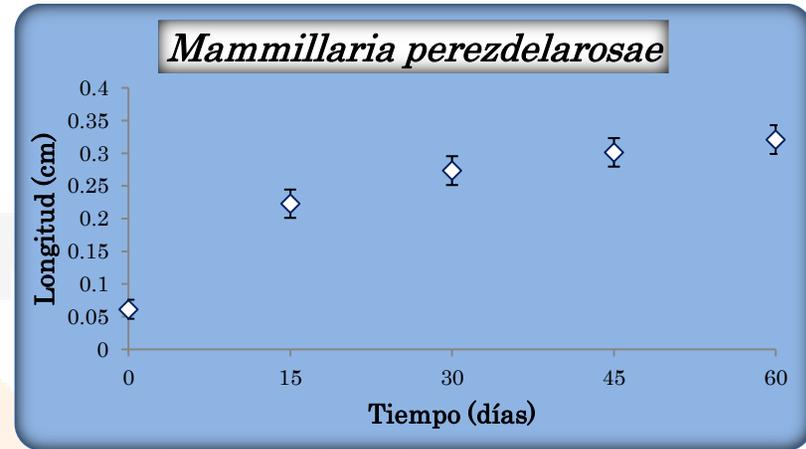
Gráfica 32. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammillaria jaliscana*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 100.



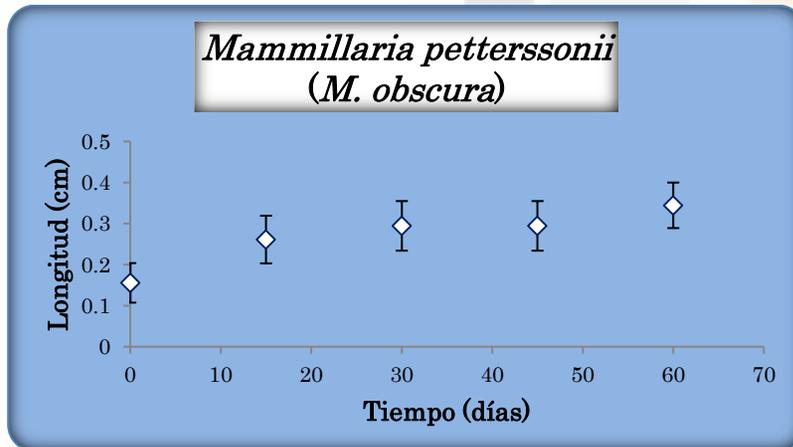
Gráfica 33. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammillaria oteroii*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 34.



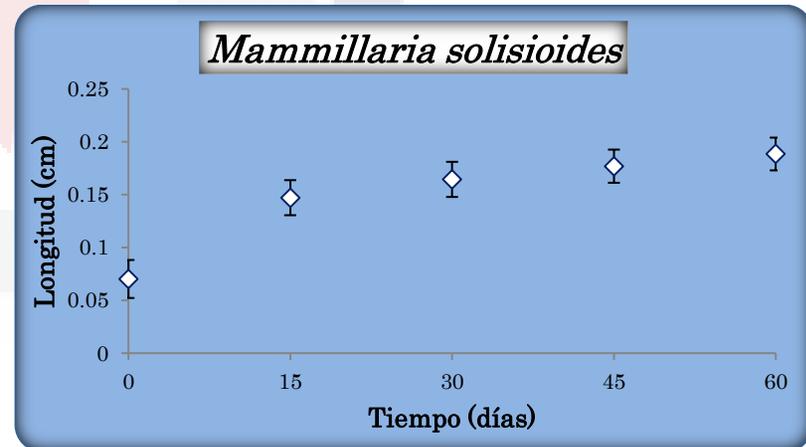
Gráfica 34. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammillaria perbella* (*M. pseudoperbella*). Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 25.



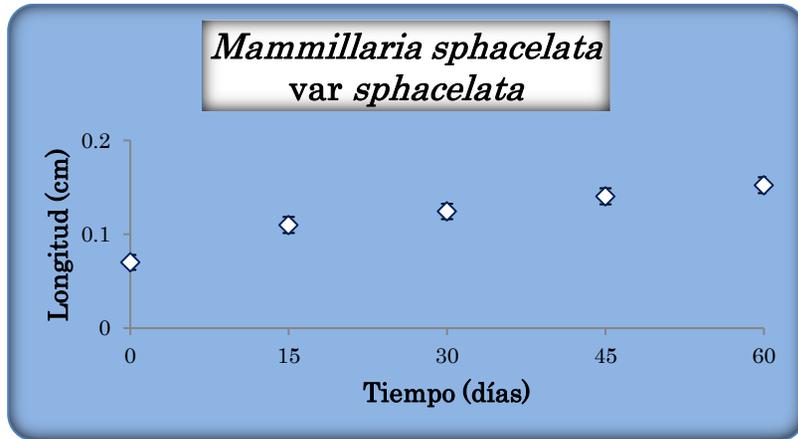
Gráfica 35. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammillaria perezdelarosae*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 79.



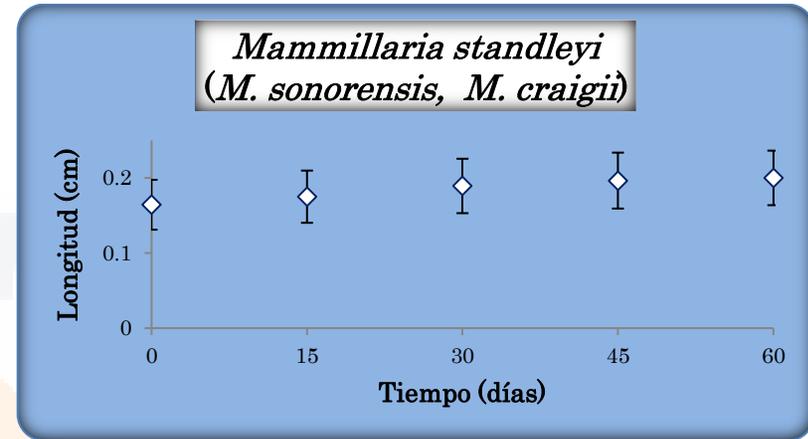
Gráfica 36. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammillaria petterssonii* (*M. obscura*). Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 9.



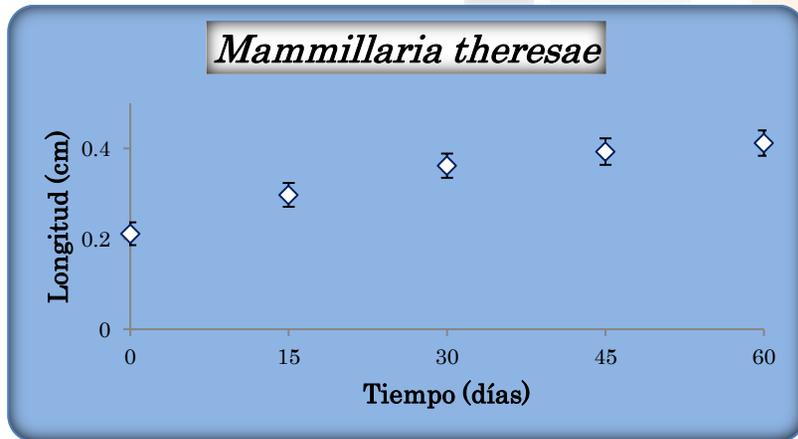
Gráfica 37. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammillaria solisioides*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 52.



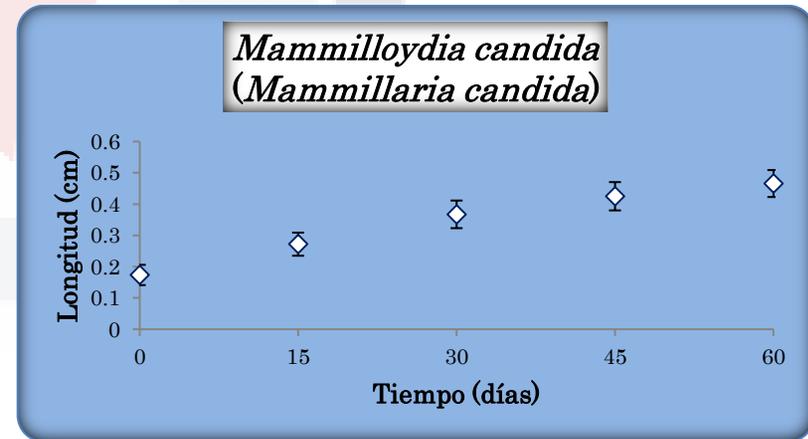
Gráfica 38. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammillaria sphaelata* var *sphaelata*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 177.



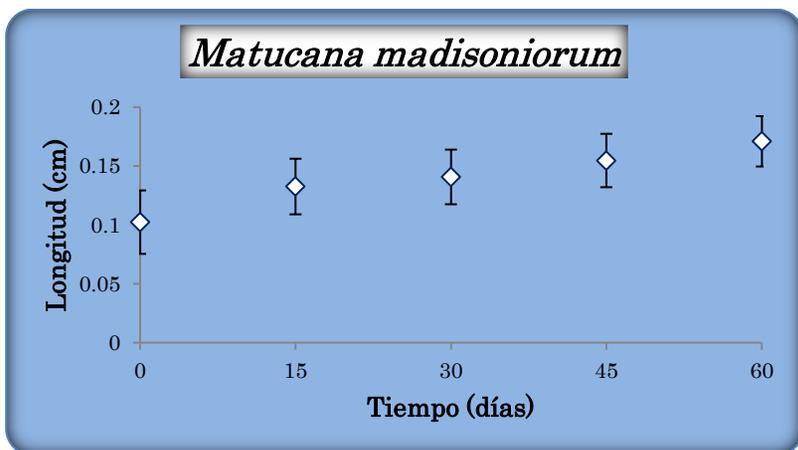
Gráfica 39. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammillaria standleyi* (*M. sonorensis*, *M. craigi*). Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 14.



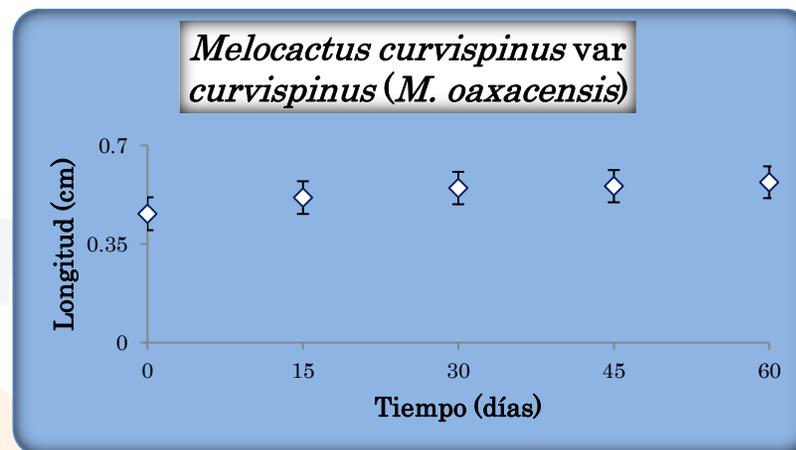
Gráfica 40. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammillaria theresae*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 93.



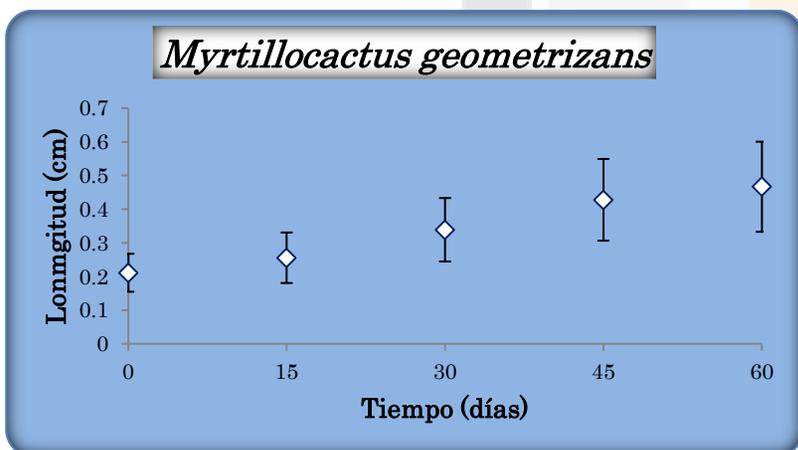
Gráfica 41. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Mammilloidia candida* (*Mammillaria candida*). Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 32.



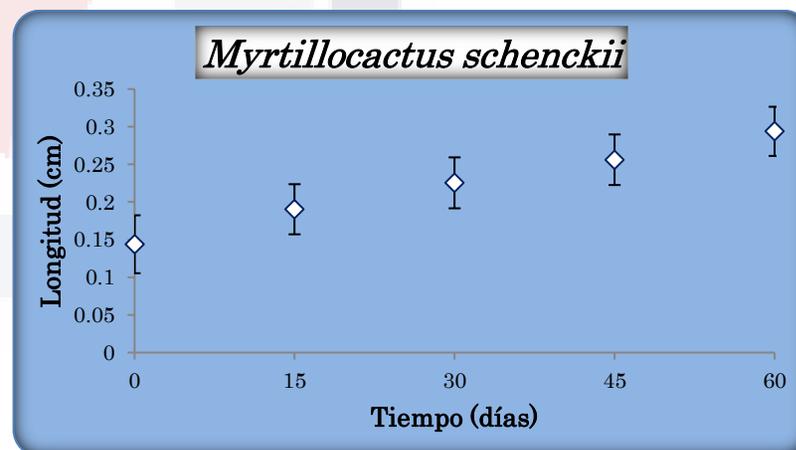
Gráfica 42. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Matucana madisoniorum*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 43.



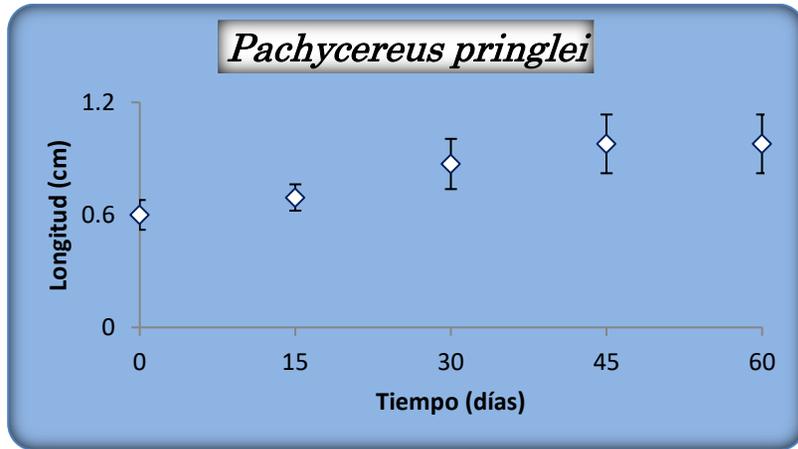
Gráfica 43. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Melocactus curvispinus* var *curvispinus* (*M. oaxacensis*). Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 68.



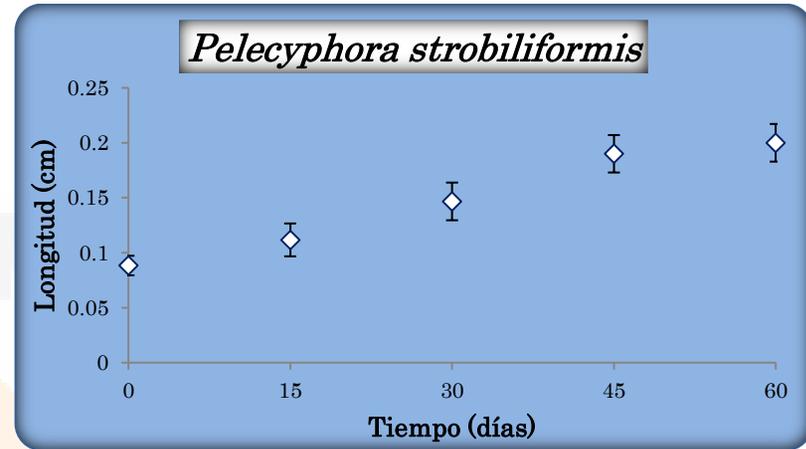
Gráfica 44. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Myrtillocactus geometrizans*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 9.



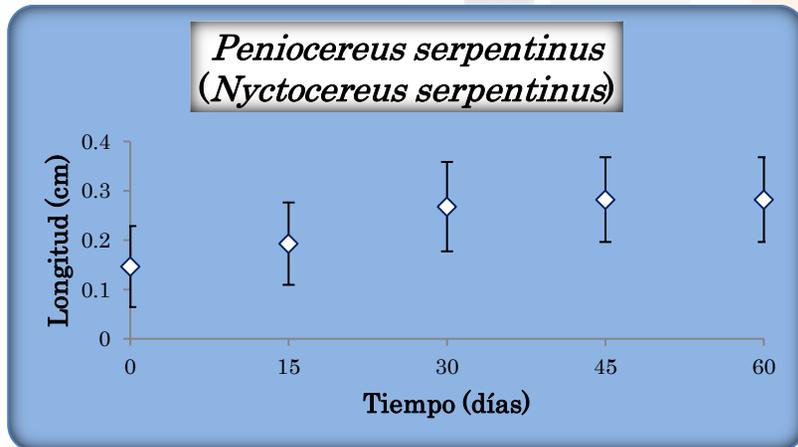
Gráfica 45. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Myrtillocactus schenckii*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 57.



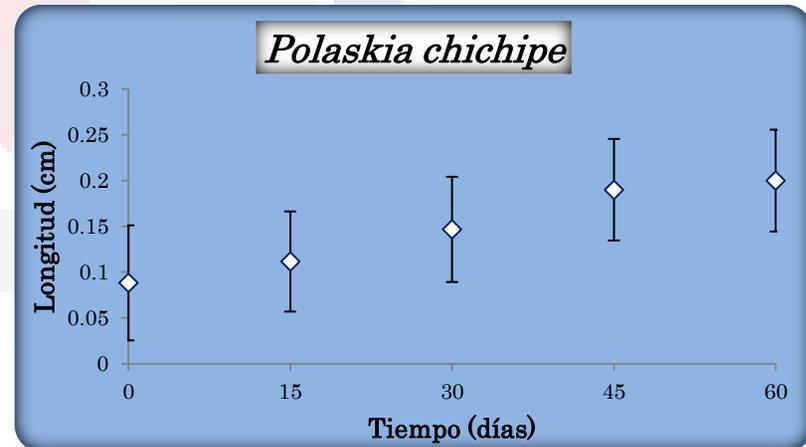
Gráfica 46. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Pachycereus pringlei*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 7.



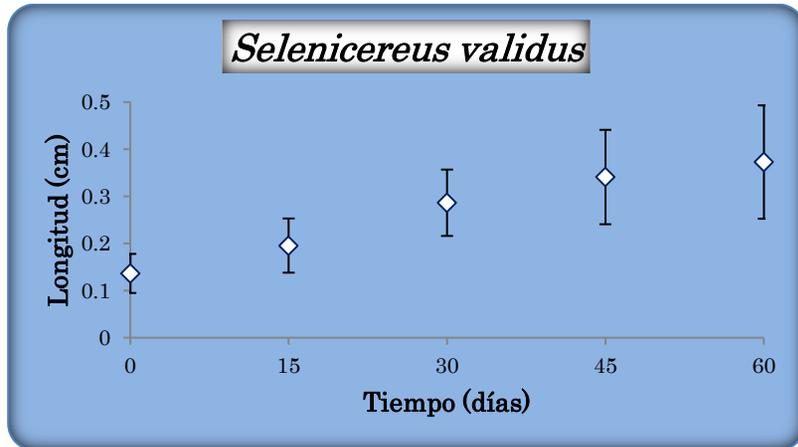
Gráfica 47. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Pelecyphora strobiliformis*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 30.



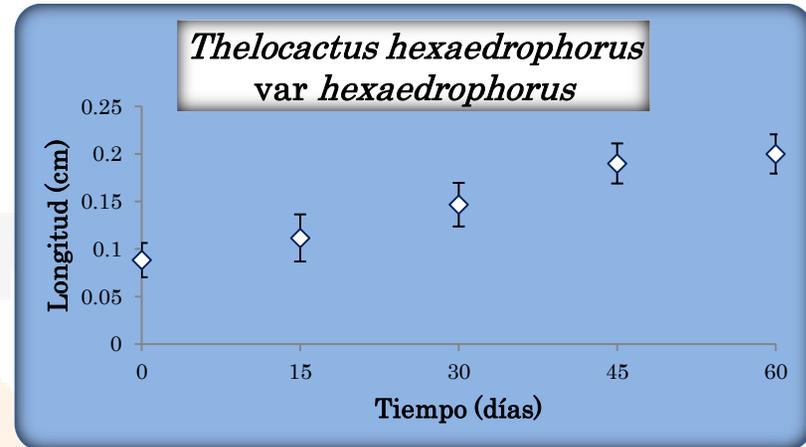
Gráfica 48. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Peniocereus serpentinus* (*Nyctocereus serpentinus*). Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 14.



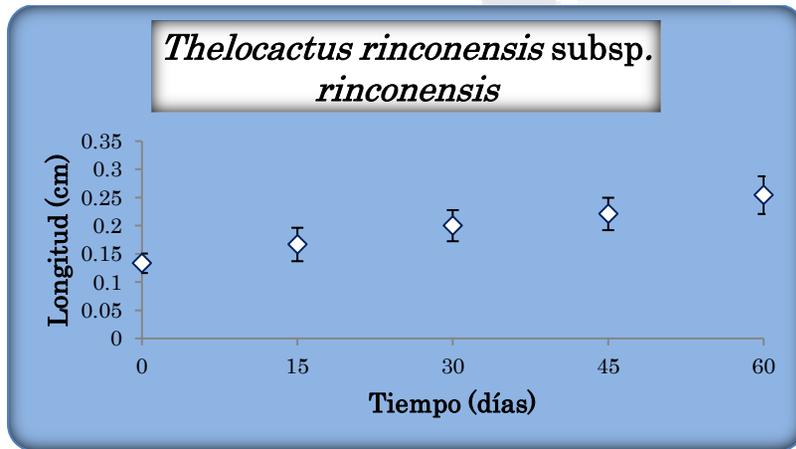
Gráfica 49. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Polaskia chichipe*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 53.



Gráfica 50. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Selenicereus validus*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 11.



Gráfica 51. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Thelocactus hexaedrophorus* var *hexaedrophorus*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 172.

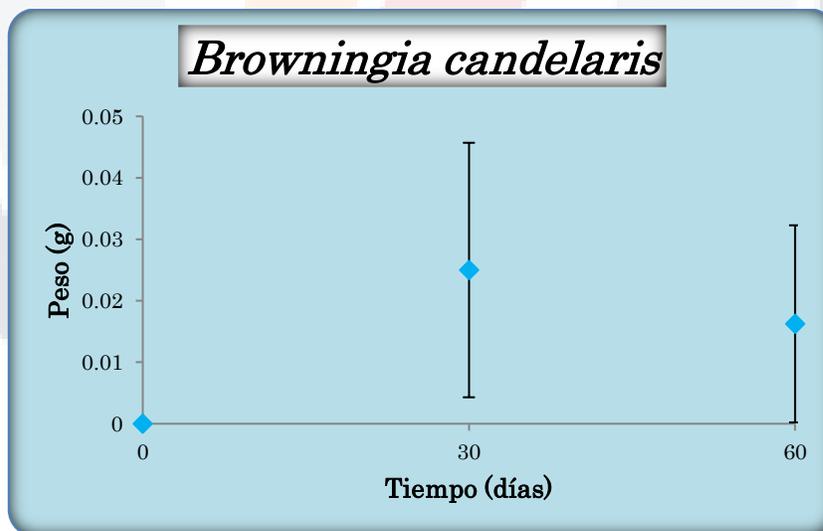


Gráfica 52. Curva de crecimiento de las raíces generadas por la especie *Thelocactus rinconensis* subsp. *rinconensis*. Crecimiento en 60 días de cultivo en medio de selección convencional (semisólido). Media \pm EE. N = 12.

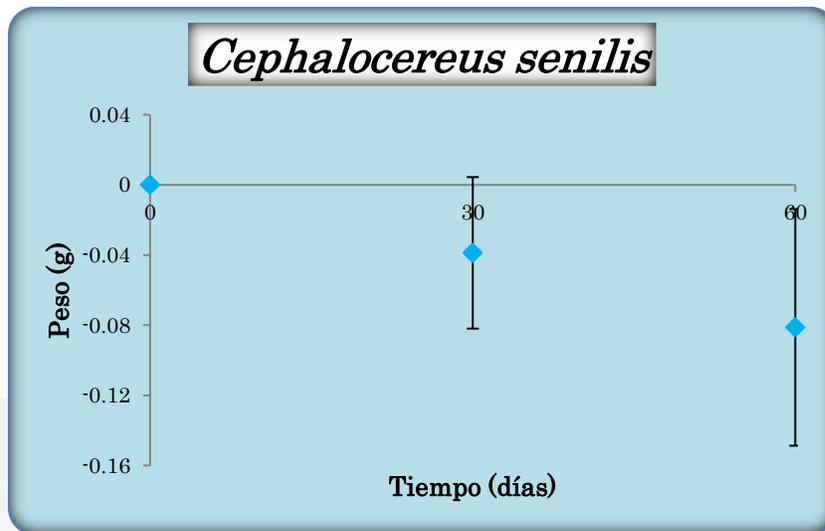
5.4. Sistemas de cultivo diferentes al medio semisólido convencional

5.4.1 Sistema de cultivo en medio líquido

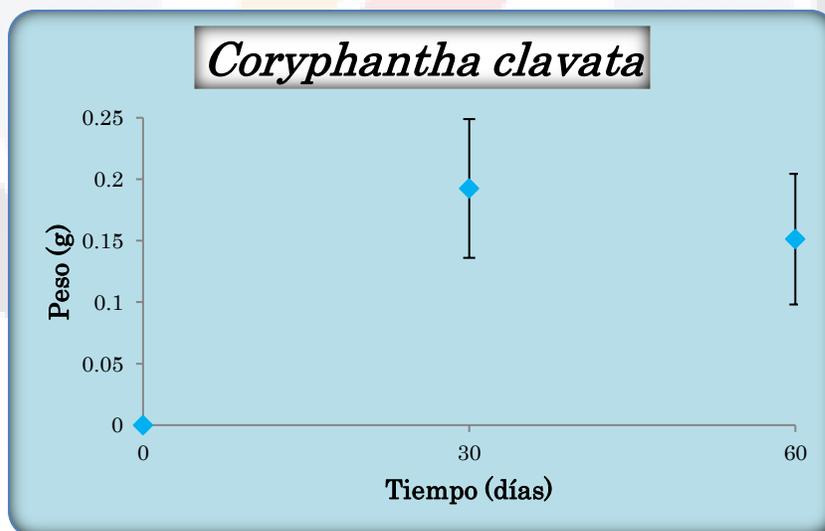
Para analizar el sistema de CML se obtuvieron las siguientes curvas de crecimiento para representar el crecimiento de dieciséis especies que contaran con más de seis explantes con raíces en el método convencional. En las curvas de crecimiento (Gráficas 53 a 68) se tomó en cuenta el tiempo en días; a los 0 días, de que se paso el explante a medio líquido, con 250 mg/L de claforán, en forma individual, a los 30 y 60 días, contra el peso que alcanzaron en gramos más su error estándar, a la suma de todos los pesos de cada día que se toma en cuenta se le resto el peso inicial debido a que los tamaños del explante son muy diferentes y de esta manera poder representar el incremento de biomasa real.



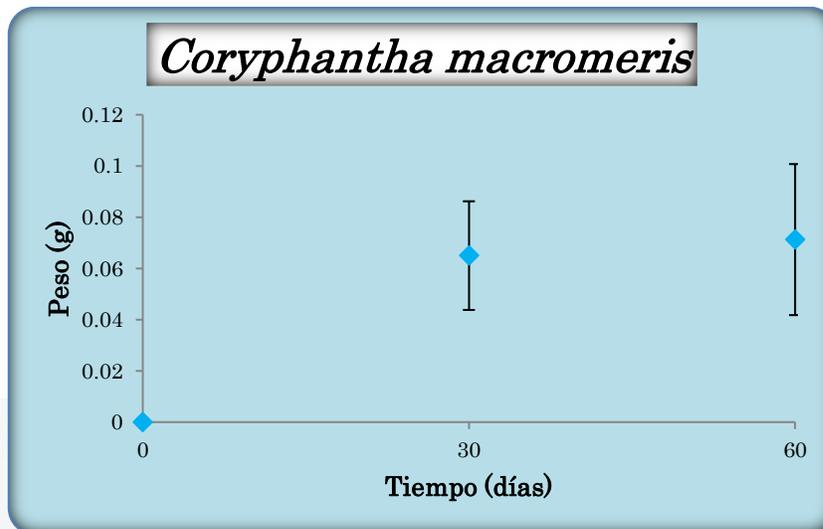
Gráfica 53. Curva de crecimiento en medio líquido *Browningia candularis*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



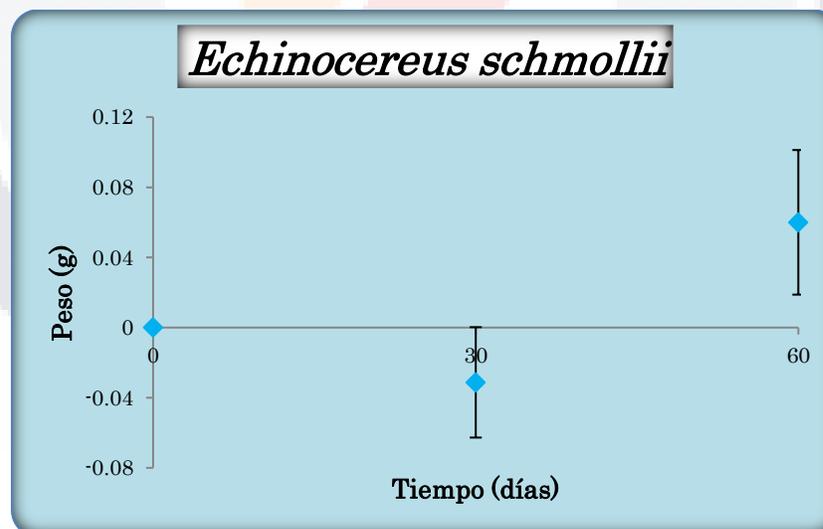
Gráfica 54. Curva de crecimiento en medio líquido *Cephalocereus senilis*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



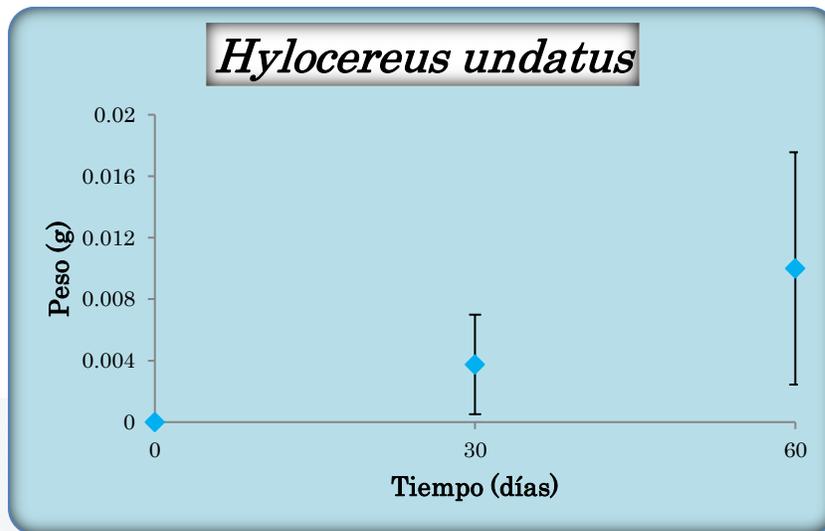
Gráfica 55. Curva de crecimiento en medio líquido *Coryphantha clavata*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



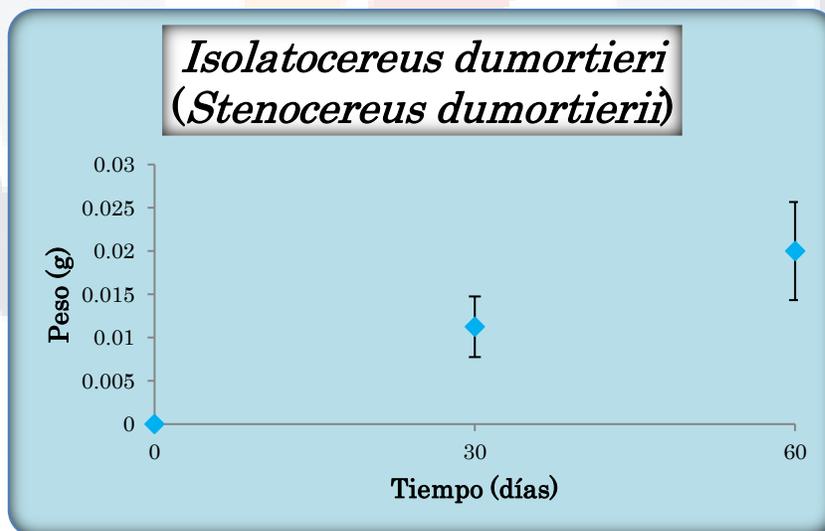
Gráfica 56. Curva de crecimiento en medio líquido *Coryphantha macromeris*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



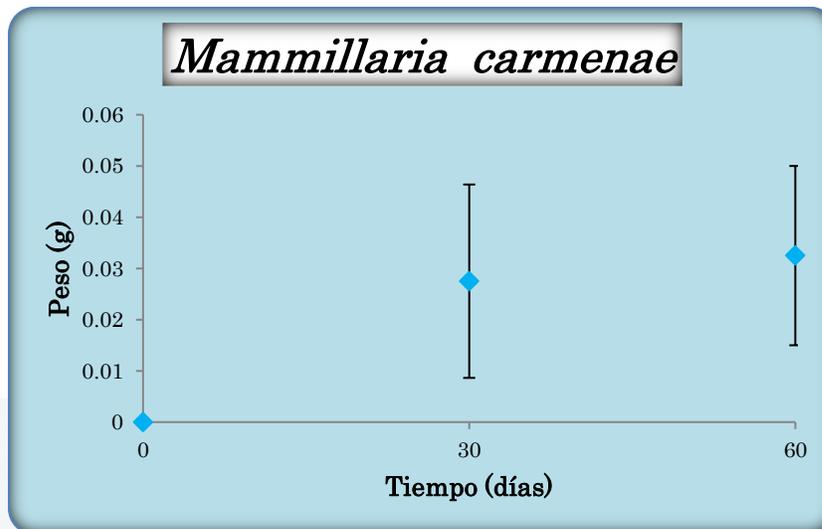
Gráfica 57. Curva de crecimiento en medio líquido *Echinocereus schmollii*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



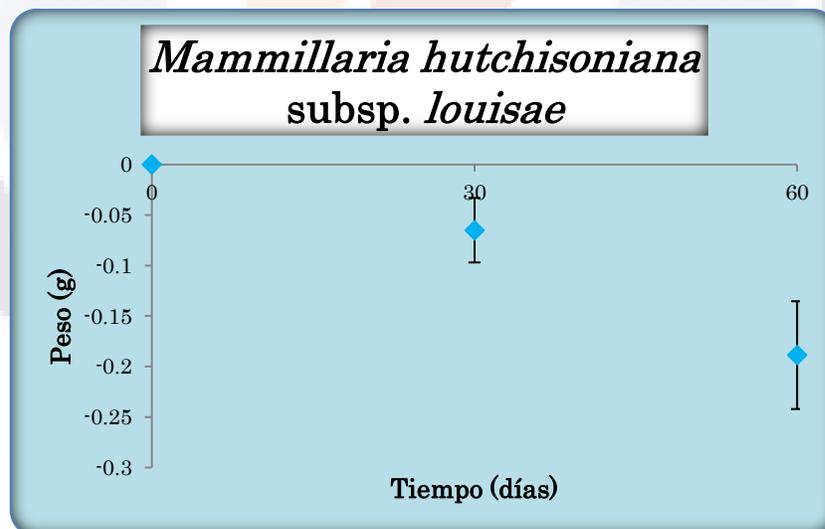
Gráfica 58. Curva de crecimiento en medio líquido *Hylocereus undatus*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



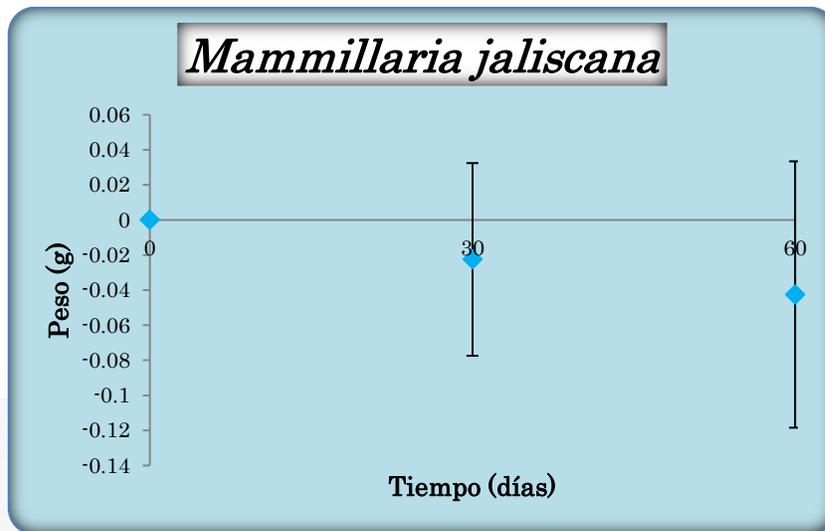
Gráfica 59. Curva de crecimiento en medio líquido *Isolatocereus dumortieri* (*Stenocereus dumortieri*). Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



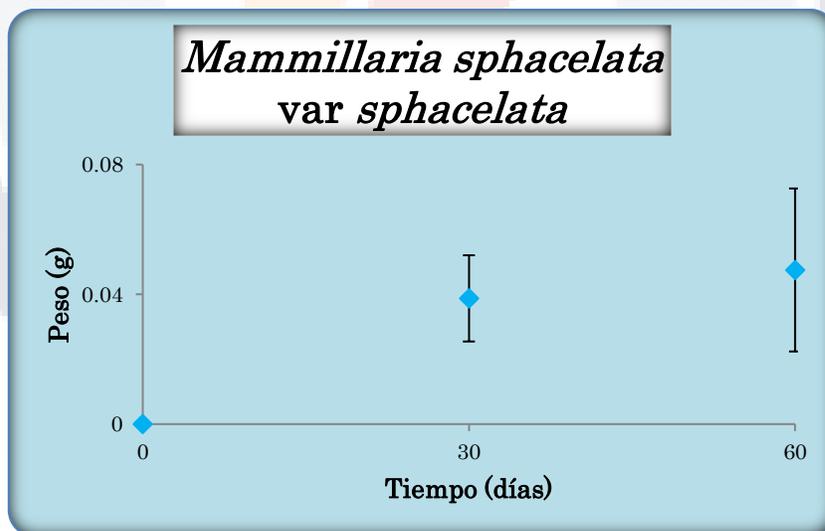
Gráfica 60. Curva de crecimiento en medio líquido *Mammillaria carmenae*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



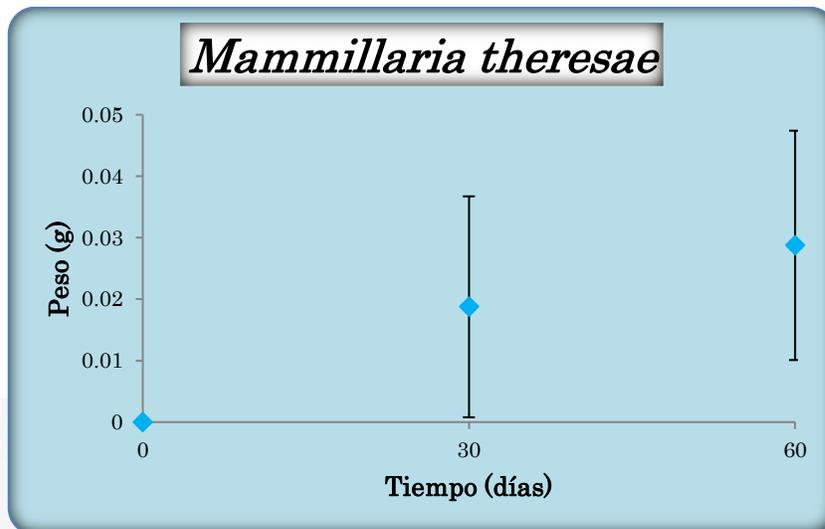
Gráfica 61. Curva de crecimiento en medio líquido *Mammillaria hutchisoniana* subsp. *louisae*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



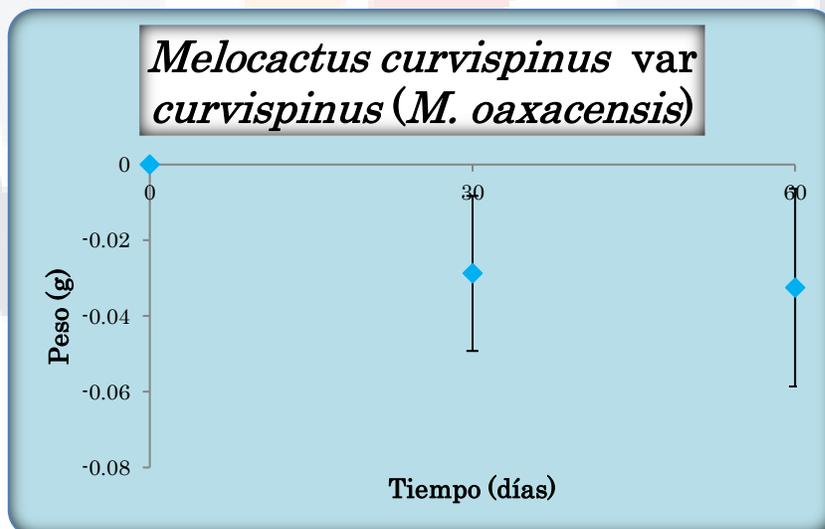
Gráfica 62. Curva de crecimiento en medio líquido *Mammillaria jaliscana*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



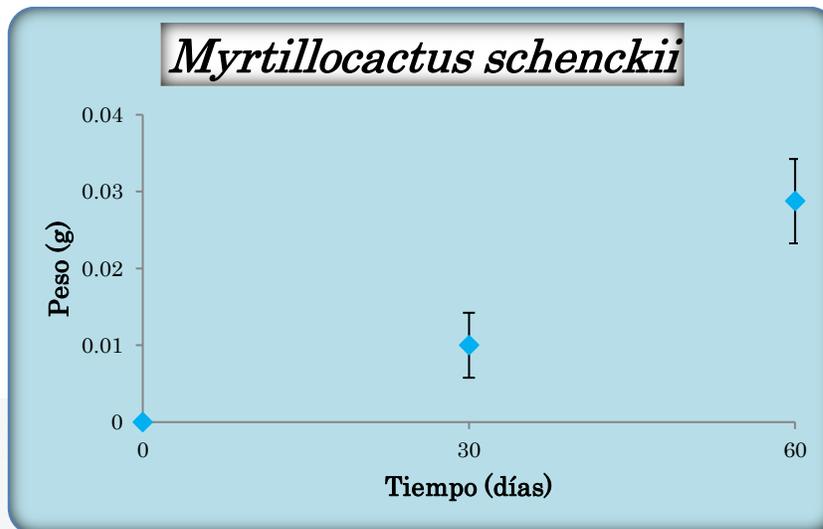
Gráfica 63. Curva de crecimiento en medio líquido *Mammillaria sphacelata* var *sphacelata*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



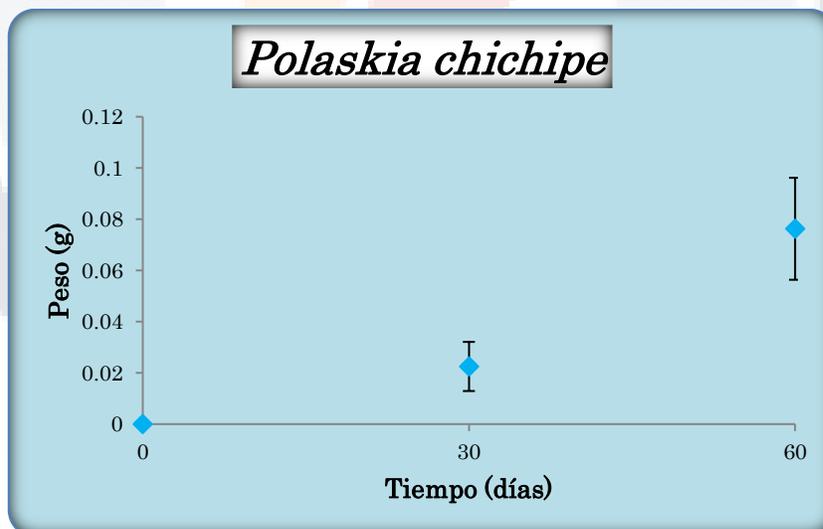
Gráfica 64. Curva de crecimiento en medio líquido *Mammillaria theresae*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



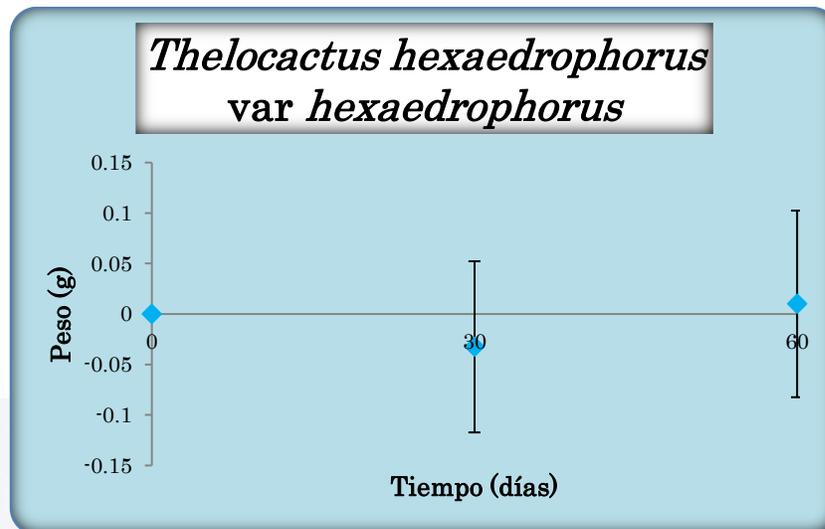
Gráfica 65. Curva de crecimiento en medio líquido *Melocactus curvispinus* var *curvispinus* (*M. oaxacensis*). Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



Gráfica 66. Curva de crecimiento en medio líquido *Myrtillocactus schenckii*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



Gráfica 67. Curva de crecimiento en medio líquido *Polaskia chichipe*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



Gráfica 68. Curva de crecimiento en medio líquido *Myrtillocactus schenckii*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.

Como se observa en las gráficas anteriores algunas especies en vez de aumentar de peso lo redujeron, a pesar de que todas desarrollaron nuevas raíces excepto *Isolatocereus dumortieri* (*Stenocereus dumortieri*). Se observó que algunos explantes absorben agua, esto en diferentes cantidades, por lo que los explantes tendían a deshacerse, o ablandarse, provocando que las espinas, areolas y las raíces se desprendían del explante, asimismo las raíces se hacían quebradizas por el mismo ablandamiento. Los explantes con callo se deshacían al ponerlos en el medio líquido. A continuación, en la Figura 18 se muestran algunos explantes en los que se observan el crecimiento de sus raíces durante el tratamiento en medio líquido, así como las respuestas antes mencionadas. También se presentan unos frascos contaminados (Figura 18a, b y c), lo cual es un inconveniente del medio líquido, ya que tiende a contaminarse con levaduras y hongos. Se muestran en la Figura 18m y 18n explantes que generaron raíces y raíces que crecieron, respectivamente, al ser sembradas en medio de selección semisólido, los cuales ya no crecían antes de colocarse en medio líquido.

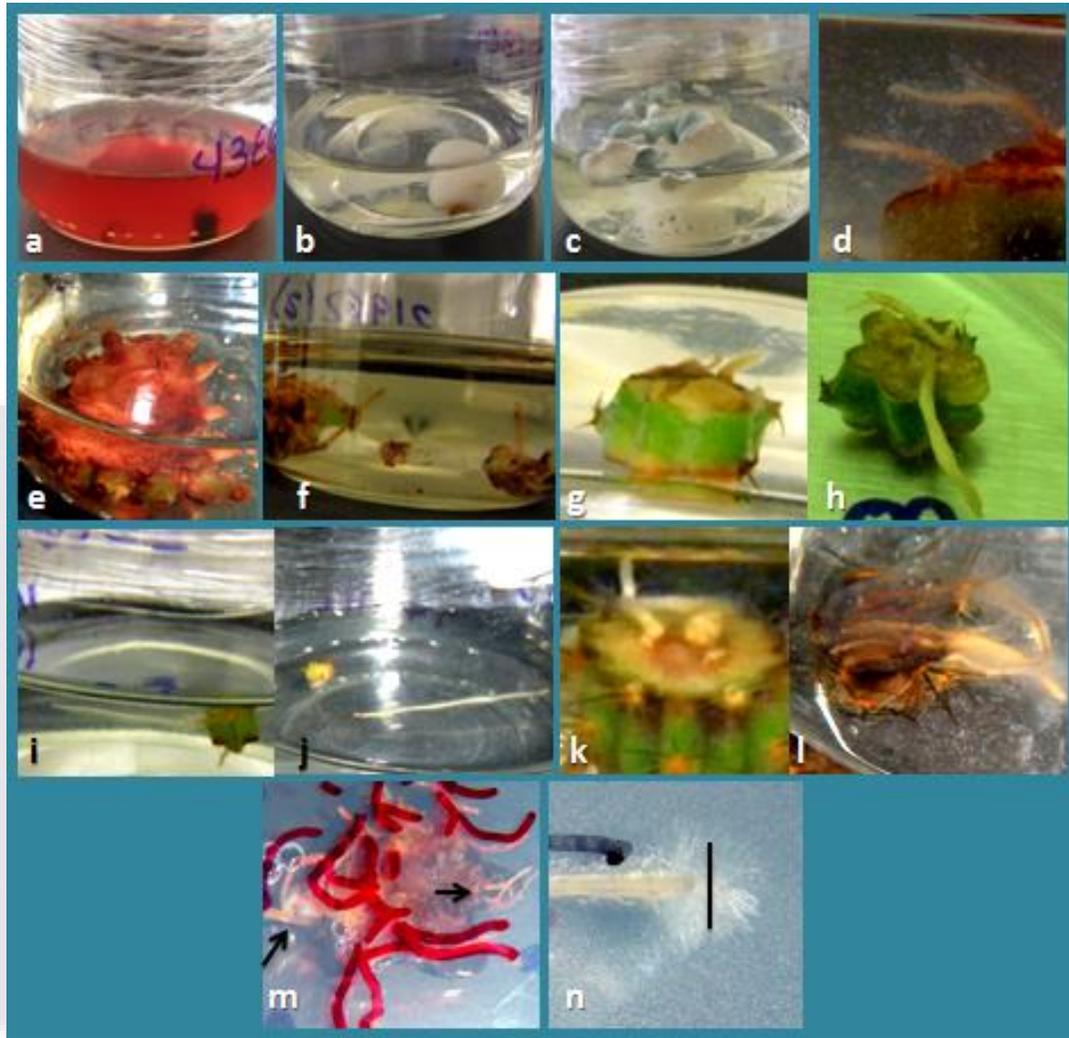
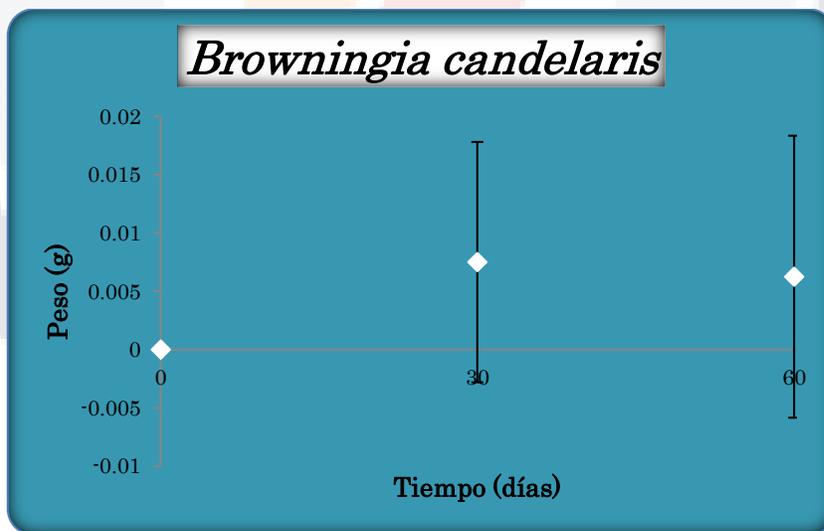


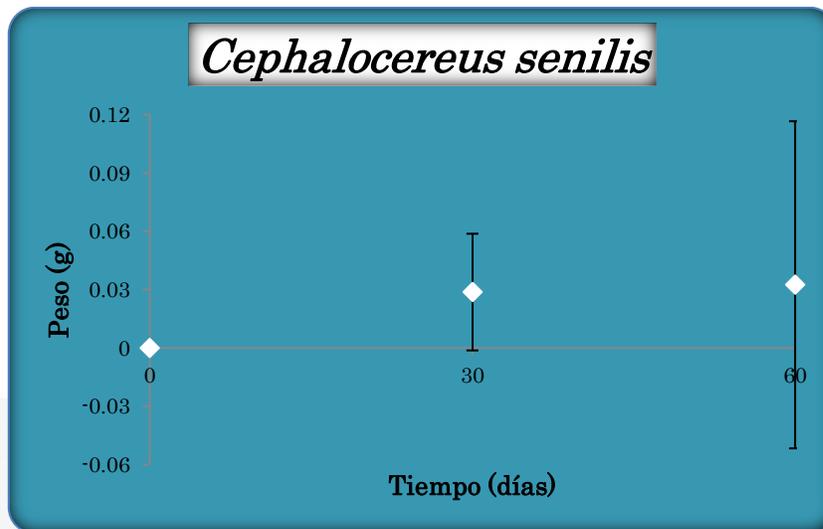
Figura 18. Raíces en medio líquido. Se presentan las raíces que fueron incubadas en medio líquido por 60 días a 25°C en oscuridad. Imágenes: a) contaminación por levadura en *Mammillaria carmenae*; b) contaminación por hongos en *Isolatocereus dumortieri* (*Stenocereus dumortierii*) y c) *M. sphacelata* var *sphacelata*; d) *Coryphantha clavata* con raíces débiles; e) *M. jaliscana* con explante ablandado y deshaciéndose; f) *C. macromeris* con areolas desprendidas; g) *Myrtillocactus schenckii* al primer día de ser puesto en medio líquido y h) *M. schenckii* a los 60 días, i) *Hylocereus undatus* a los 30 días de ser puesto en medio líquido y j) *H. undatus* a los 60 días con raíz desprendida; k) *Browningia candelaris* al primer día de ser puesto en medio líquido y l) *B. candelaris* a los 60 días; m) *C. macromeris* con raíces nuevas después de resembrarlo en medio semisólido; y n) *H. undatus* con crecimiento de raíz después de estar en medio líquido. Nota: Flechas negras indican crecimiento.

5.4.2 Sistema de cultivo en medio líquido con agitación

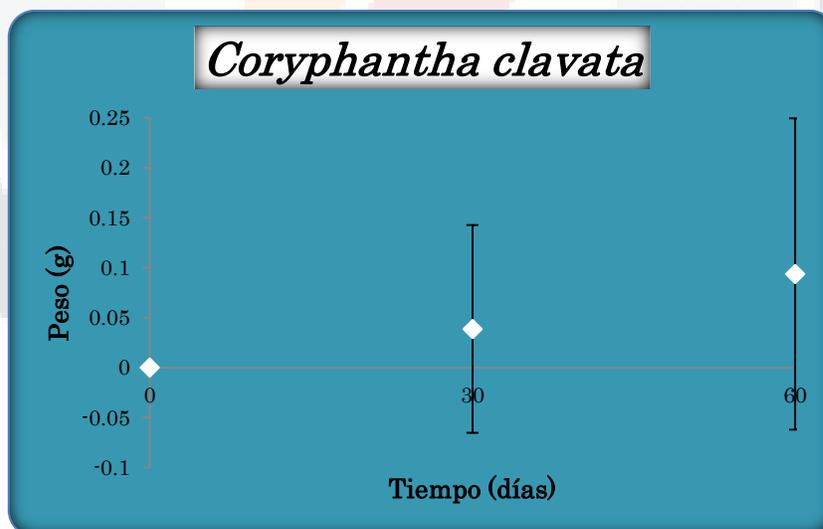
Para analizar el sistema CMLA se obtuvieron las siguientes curvas de crecimiento para mostrar su crecimiento, de dieciséis especies que contaran con más de seis explantes con raíces, esto en el método convencional. En las curvas de crecimiento (Gráficas 69 a 84) se tomó en cuenta el tiempo en días; a los 0 días, de que se paso el explante a medio líquido de forma individual, a los 30 y 60 días, contra el peso que alcanzaron en gramos más su error estándar, a la suma de todos los pesos de cada día que se toma en cuenta se le resto el peso inicial debido a que los tamaños de el explante son muy diferentes y de esta manera poder representar el incremento en el peso en forma real.



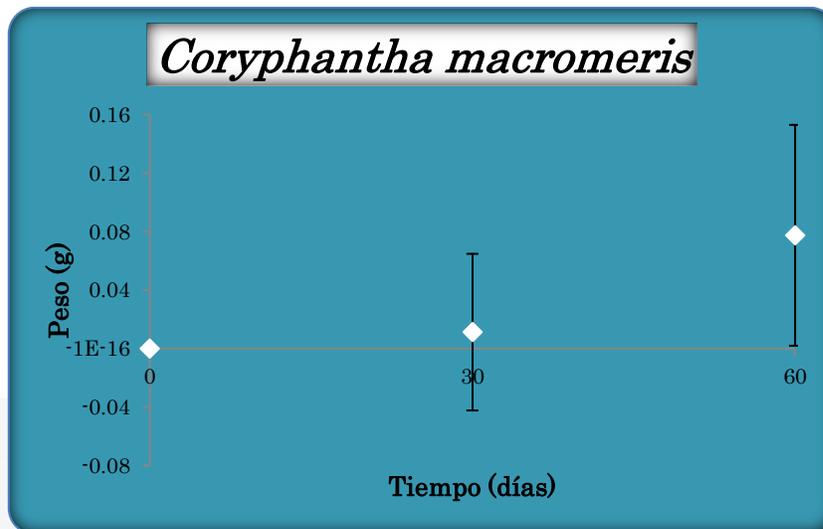
Gráfica 69. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación *Browningia candelaris*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en agitación con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



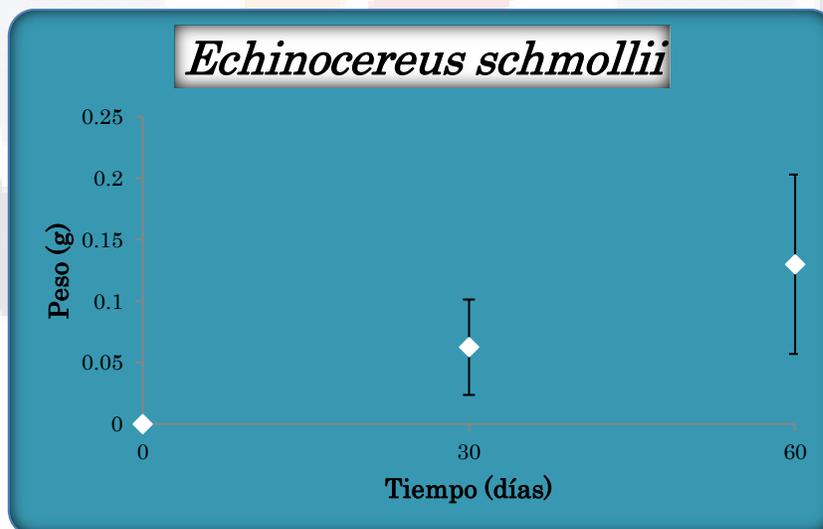
Gráfica 70. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación *Cephalocereus senilis*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en agitación con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



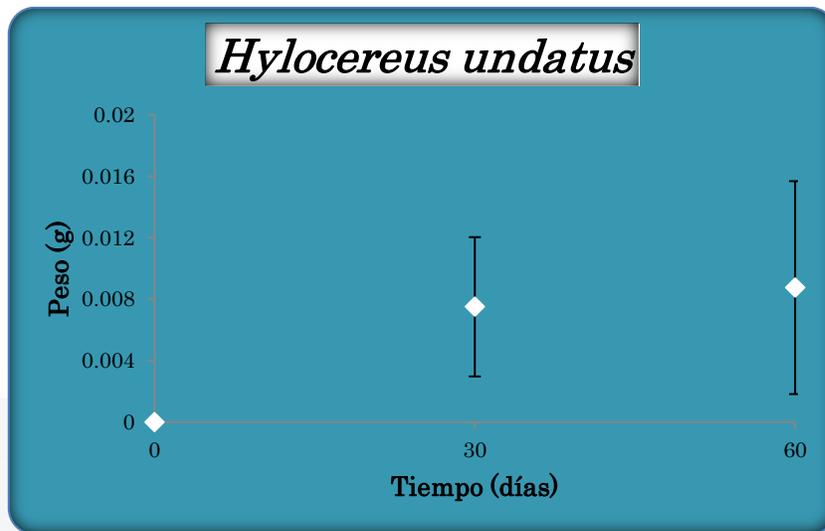
Gráfica 71. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación *Coryphantha clavata*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en agitación con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



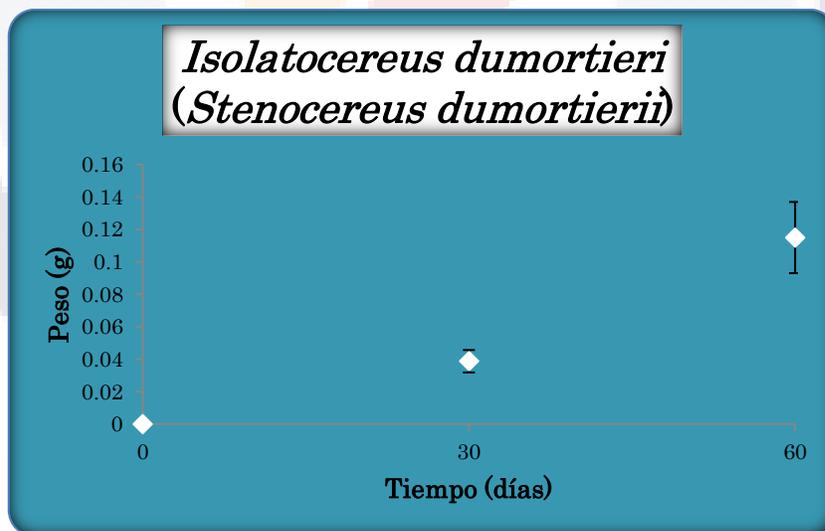
Gráfica 72. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación *Coryphantha macromeris*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en agitación con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



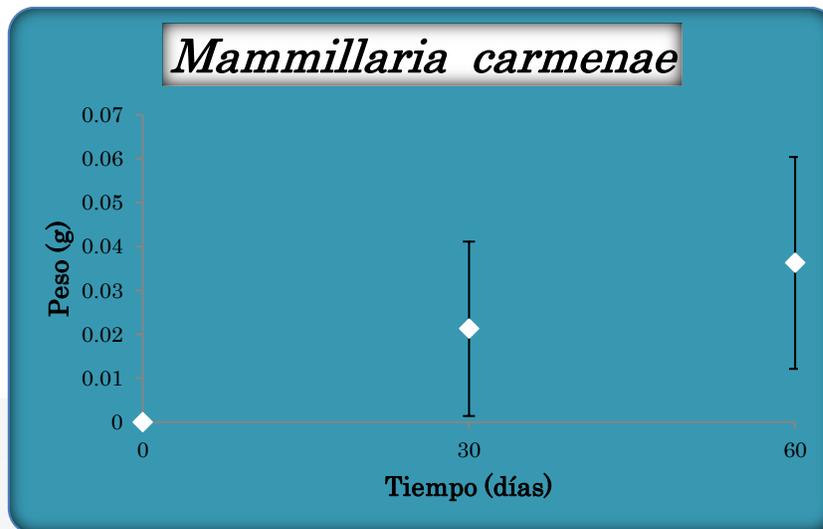
Gráfica 73. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación *Echinocereus schmollii*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en agitación con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



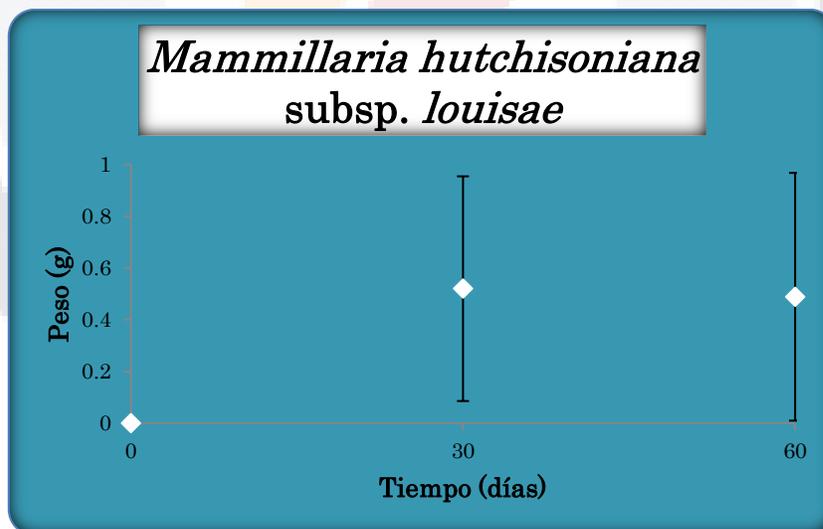
Gráfica 74. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación *Hylocereus undatus*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en agitación con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



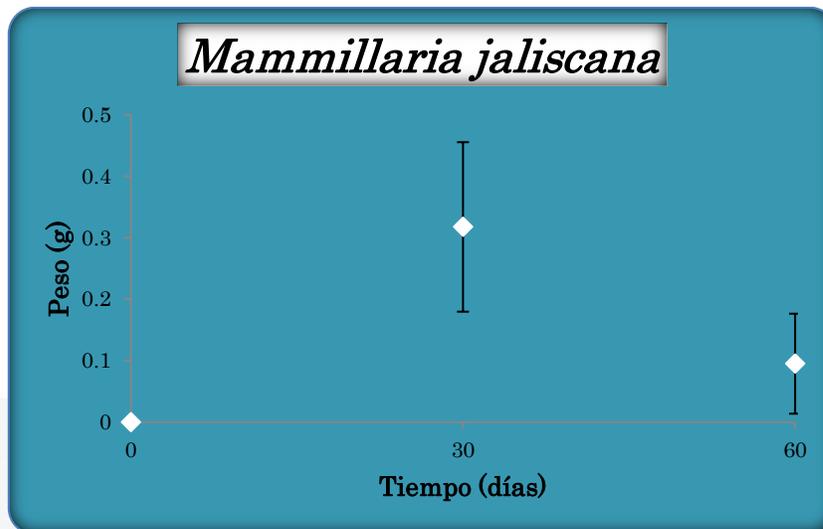
Gráfica 75. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación *Isolatocereus dumortieri* (*Stenocereus dumortieri*). Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo agitación con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



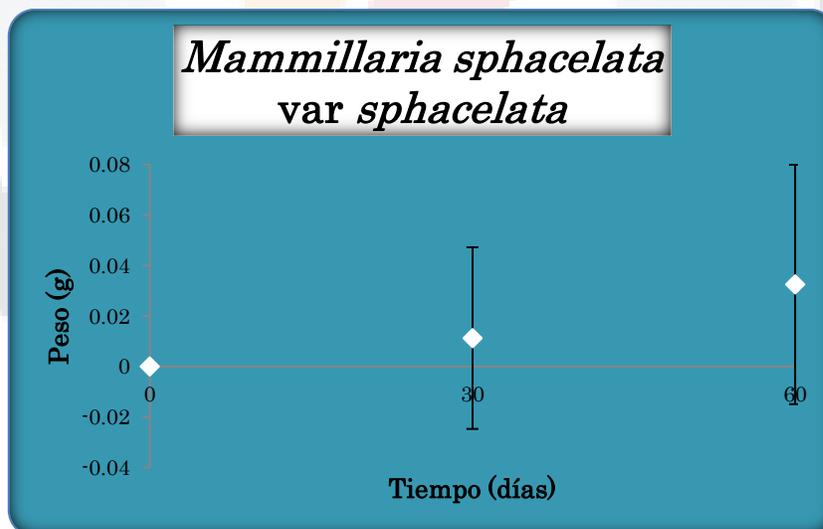
Gráfica 76. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación *Mammillaria carmenae*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en agitación con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



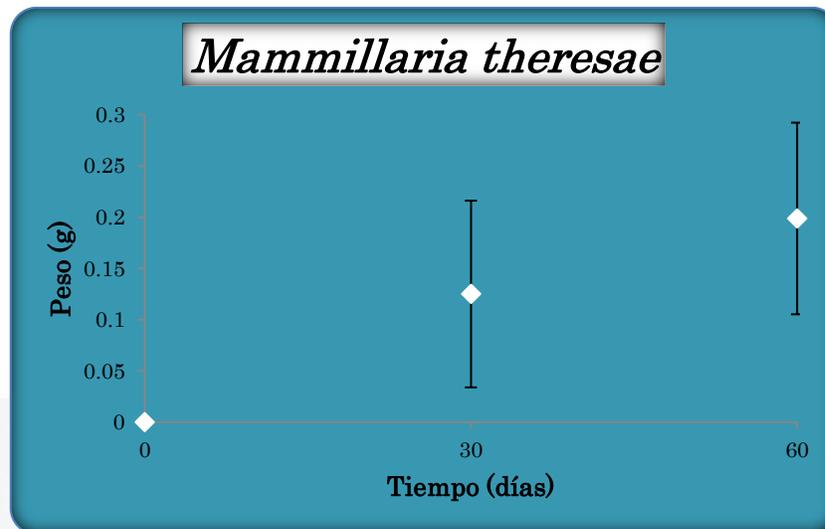
Gráfica 77. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación *Mammillaria hutchisoniana* subsp. *louisae*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en agitación con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



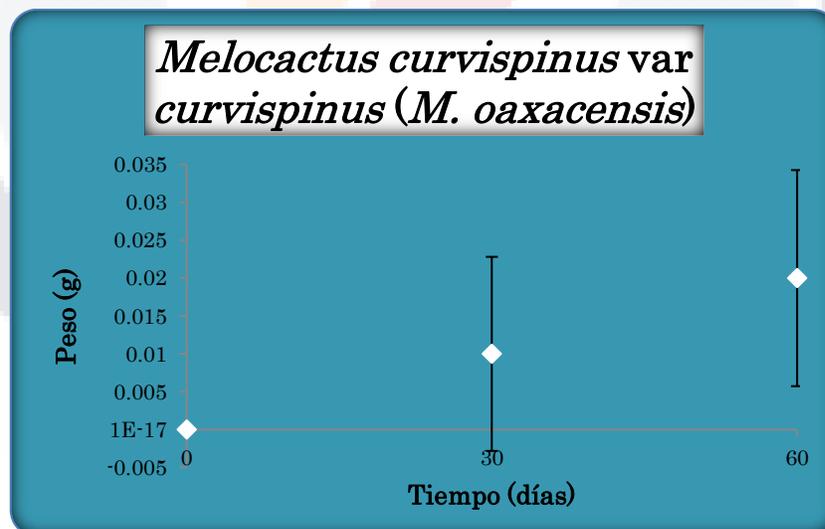
Gráfica 78. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie *Mammillaria jaliscana* durante 60 días de cultivo en agitación con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



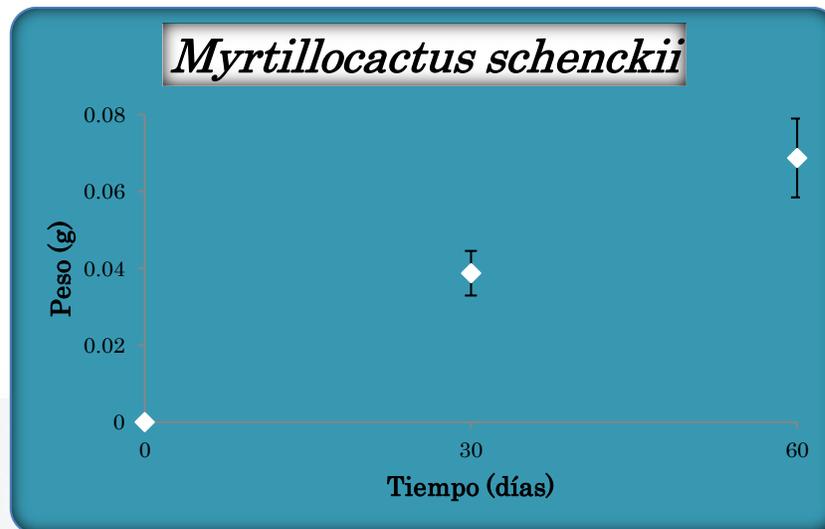
Gráfica 79. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación *Mammillaria sphaelata* var *sphaelata*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en agitación con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



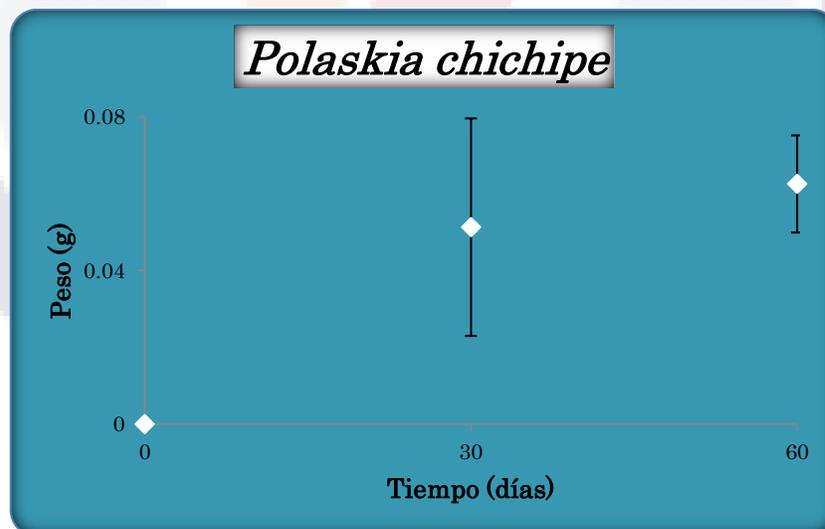
Gráfica 80. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación *Mammillaria theresae*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



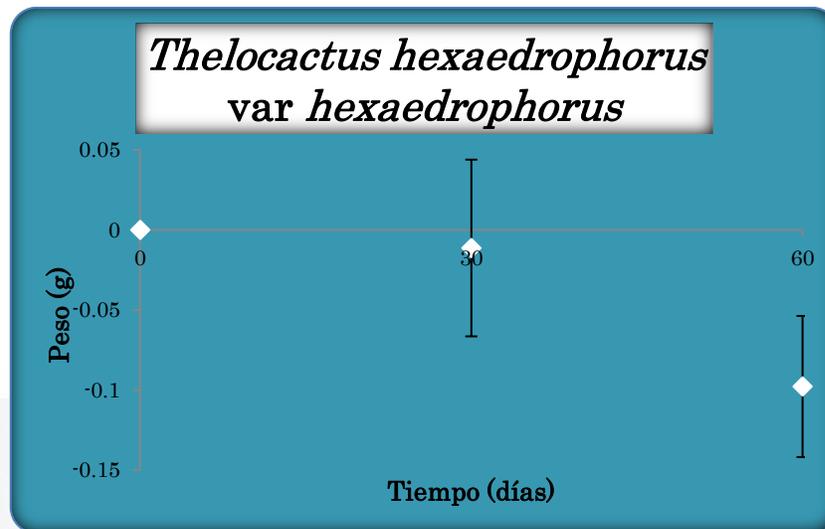
Gráfica 81. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación *Melocactus curvispinus var curvispinus (M. oaxacensis)*. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



Gráfica 82. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie *Myrtillocactus schenckii* durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



Gráfica 83. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie *Polaskia chichipe* durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.



Gráfica 84. Curva de crecimiento en medio líquido con agitación. Representa el incremento de biomasa de los explantes con raíces generadas por la especie *Thelocactus hexaedrophorus* var *hexaedrophorus* durante 60 días de cultivo en medio líquido con 250 mg/L de Clafotán. N = 8.

Se obtuvieron varias respuestas en este sistema de cultivo, como lo son: que algunos explantes absorbe agua, en distinta medida, afectando el peso, haciéndolos más blandos y desprendiéndose sus raíces, espinas, areolas y, en aquellas que presentan callo este se deshace; igualmente las raíces se hacen débiles y quebradizas, como se puede observar las respuestas fueron similares a CML. En seguida, en la Figura 15 se exponen algunos explantes en los que se observan el crecimiento de sus raíces y ramificaciones, observándose mayor ramificación que en CML, durante el tratamiento en CMLA, así como las respuestas antes mencionados. Además se muestran frascos contaminados (Figura 19a y b), el cual es un inconveniente del CMLA pero en menor medida que en el CML, pero aun así tiende a contaminarse con levaduras y hongos. Asimismo, se muestran en las Figuras 19n a 19r explantes que generaron raíces y raíces que crecieron, respectivamente, al ser sembradas en medio de selección semisólido los cuales ya no crecían antes de colocarse en medio líquido, esto en mayor cantidad que en CML.



Figura 19. Raíces en medio líquido con agitación. Se presentan las raíces que fueron cultivadas en medio líquido con agitación (90 rpm) por 60 días a 23°C en oscuridad. Imágenes: a) contaminación por levadura en *Echinocereus schmollii*; b) contaminación por hongos en *Hylocereus undatus*; c) *Mammillaria theresae* con areola desprendida; d) *Coryphantha macromeris* con explante ablandado que se deshacía y raíces cayéndose; e) *C. clavata* al primer día de ser puesto en agitación y f) *C. clavata* a los 60 días, g) *E. schmollii* en el primer día en agitación y h) *E. schmollii* a los 60 días; i) *C. macromeris* al primer día en agitación y j) *C. macromeris* a los 60 días; k) *M. carmenae* a los 30 días en agitación y l) *M. carmenae* a los 60 días; m) *E. schmollii* con sus raíces ramificadas; n) *C. macromeris* con crecimiento de raíz después de estar en medio líquido, al igual que o y p) *Isolatocereus dumortieri* (*Stenocereus dumortieri*); q) *E. schmollii*; y r) *M. carmenae*.

5.4.3 Sistema de inmersión temporal (RITA®)

En cuanto al análisis del sistema de inmersión se obtuvo una curva de crecimiento de la especie *Browningia candularis*, que fue la especie que presentó un mayor crecimiento en el método convencional. Para la curva de crecimiento (Gráfica 85) se tomó en cuenta el tiempo en días; 0 días, de que se colocó el explante en el biorreactor con 250 mg/L de clafotán y 50 mg/L de kanamicina, y a los 69 días, contra el peso que alcanzó en gramos.



Gráfica 85. Curva de crecimiento de raíces de *Browningia candularis* en el sistema de inmersión temporal (RITA®). Representa el incremento de peso del explante con raíces generadas por la especie durante 69 días de cultivo en medio de inmersión temporal con 250 mg/L de Clafotán y 50 mg/L de Kanamicina. N = 1.

Al mismo tiempo se colocó un explante en medio de selección convencional en oscuridad y otro en luz, para poder realizar una comparación de forma cualitativa (Figura 20) donde no se observó crecimiento en luz y en el método convencional si hubo crecimiento pero en menor medida, con un inicial de 2 raíces y un final de 6, y con un menor número de ramificaciones.

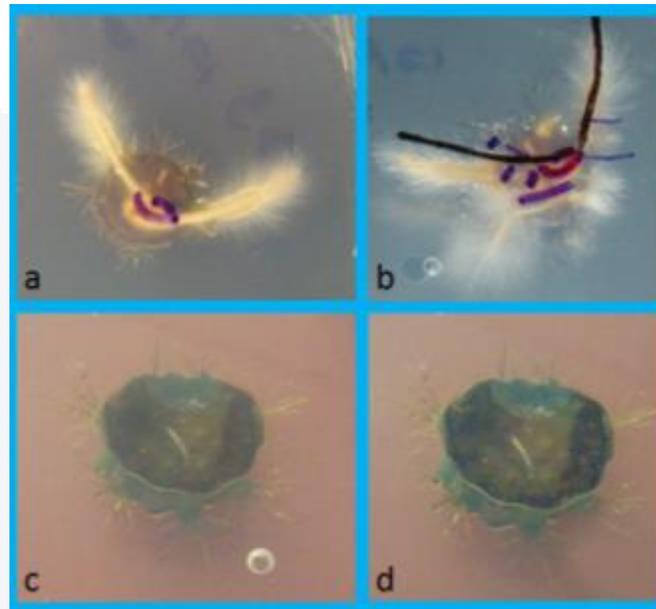


Figura 20. Explantes en otros tratamientos para comparación con el del biorreactor. Explantes de la especie *Browningia candellaris* como control para compararlo con el explante de la misma especie colocado en el sistema de inmersión temporal. Imágenes: explantes puestos al mismo tiempo que el del biorreactor RITA® a) explante en la oscuridad en medio semisólido a 21°C a los 15 días; b) mismo explante a los 69 días con 6 raíces; c) explante en la luz a 25°C al primer día; d) mismo explante a los 69 días.

En el sistema de inmersión temporal en la especie *Browningia candellaris* se observó crecimiento y generación de raíces (Figura 21) hasta los 41 días, se presentaron en total 15 raíces largas y muy ramificadas, desde el segundo día empezó a haber crecimiento y al octavo día se generó una raíz nueva, en cuanto a las ramificaciones estas comenzaron a exhibirse a los quince días (Figura 21h). A los dieciocho días ya se observaban las 15 raíces pero estas seguían creciendo y ramificándose.

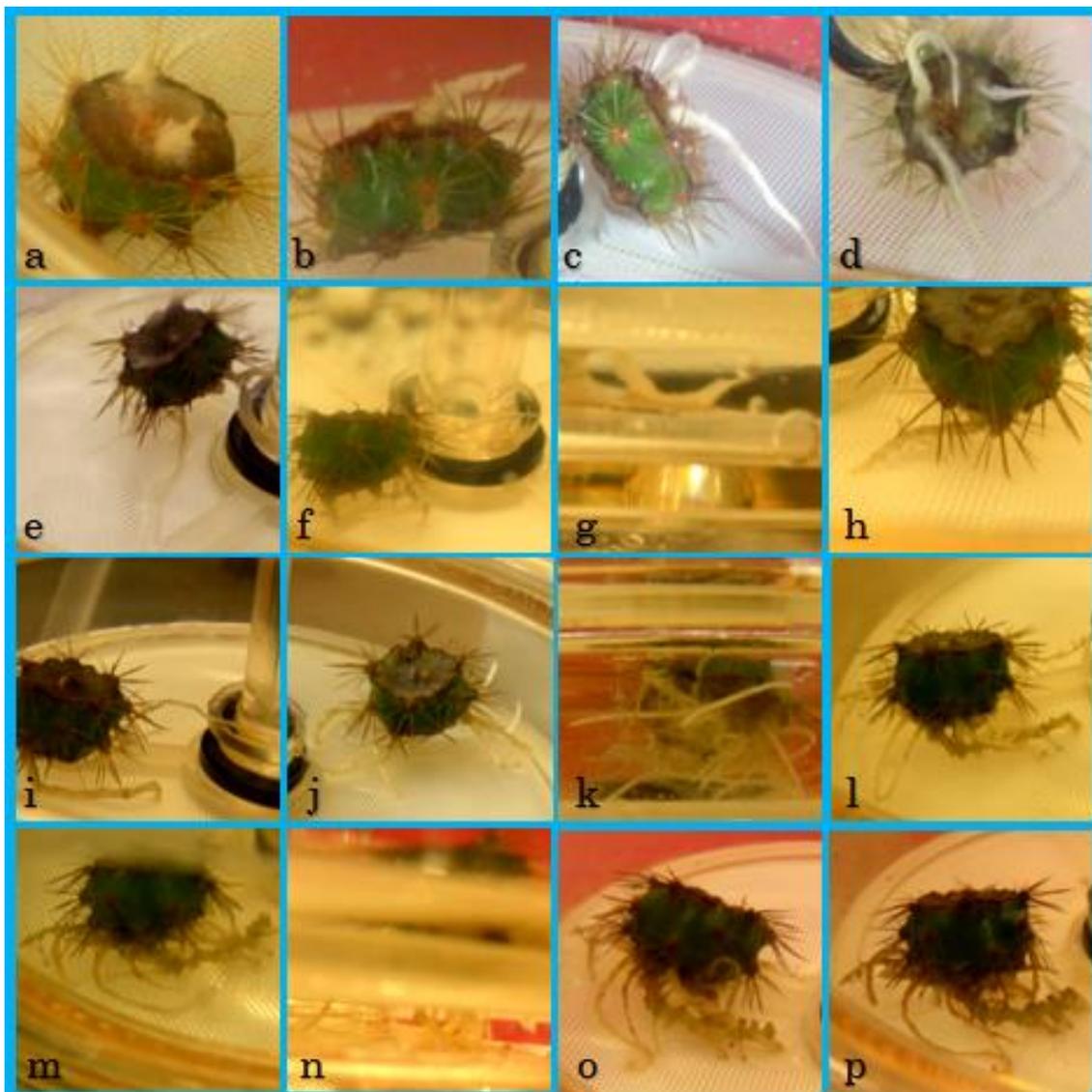


Figura 21. Raíces de *Browningia candelaris* en el sistema de inmersión temporal (RITA®). Se presenta el explante con raíces que fueron cultivadas en un biorreactor por 69 días a 25°C en luz. Imágenes: a) explante con 2 raíces en el primer día de cultivo; b) a los 3 días; c) a los 6 días; d) a los 8 días con 3 raíces; e) a los 13 días; f) a los 14 días con 4 raíces; g) una de las raíces atravesó la membrana del biorreactor a los 14 días; h) una de las raíces se comenzó a ramificar a los 15 días; i) explante a los 17 días con 5 raíces, las primeras dos raíces se empezaron a engrosar; j) a los 19 días con 15 raíces, estas se empezaron a poner verdes; k) a los 20 días primeras raíces engrosadas y muy ramificadas; l) a los 23 días; m) a los 27 días, las raíces se comenzaron a hacer rojas; n) varias raíces que atravesaron la membrana, día 31; o) día 35 con raíces más rojas y p) explante a los 56 días ya sin ninguna diferencia.

A pesar de que dejaron de haber cambios desde el día 41, se dejó unos días más para ver si realmente habían dejado de crecer, como ya no se veían cambios, se cambió el medio para saber si había sido por agotamiento de medio o por entrar en latencia. Ya colocado el nuevo medio durante 19 días no hubo ningún cambio en las raíces. Por otro lado, las raíces se pusieron de color verde y rojo (Figura 21j y 21m, respectivamente), esto puede ser debido a que estaban incubas con incidencia de luz.

Se observaron tres desventajas en este sistema de cultivo que se presentan en la Figura 22.

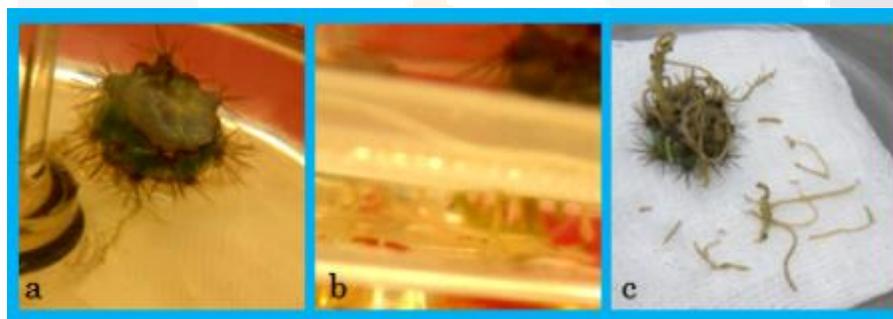
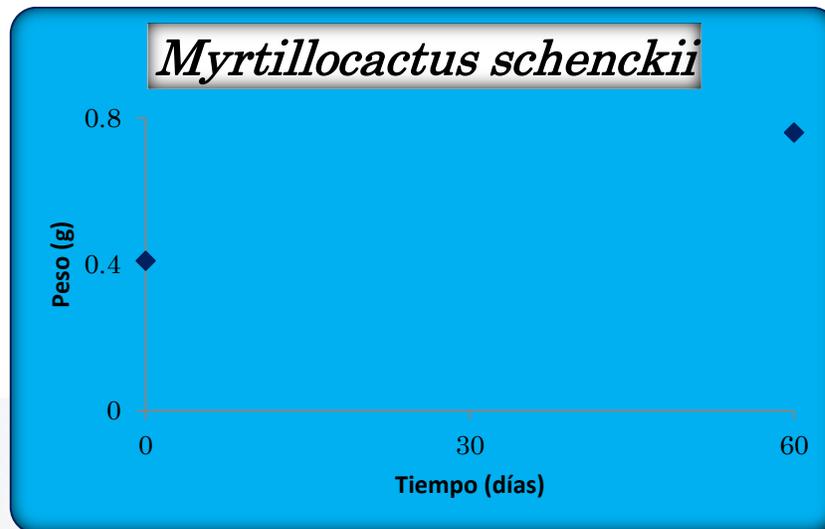


Figura 22. Desventajas del sistema de inmersión temporal (RITA®) con raíces. Se presentan el explante con raíces, que fueron cultivadas en un biorreactor por 69 días a 25°C en luz, donde se observan tres dificultades de este sistema de cultivo. Imágenes: a) medio líquido que no bajó en el tiempo programado; b) las raíces atraviesan la placa porosa del biorreactor; c) explante con raíces rotas después de haberse sacado del biorreactor.

Por otra parte, se obtuvo una curva de crecimiento de la especie *Myrtillocactus schenckii*, en esta especie se observó un buen crecimiento en luz. Para la curva de crecimiento (Gráfica 86) se tomó en cuenta el tiempo en días; 0 días, de que se colocó el explante en el biorreactor con 250 mg/L de clauforán y 50 mg/L de kanamicina, y a los 60 días, contra el peso que alcanzó en gramos.



Gráfica 86. Curva de crecimiento de raíces de *Myrtillocactus schenckii* en el sistema de inmersión temporal (RITA®). Representa el incremento de peso del explante con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio de inmersión temporal con 250 mg/L de Clafotán y 50 mg/L de Kanamicina. N = 1.

Cuando se colocó el explante en el biorreactor también se colocó uno en medio de selección semisólido en luz y otro en oscuridad para poder realizar una comparación de forma cualitativa (Figura 23a y b, respectivamente) donde no se observó un gran crecimiento en luz y en el método convencional si hubo crecimiento pero en menor medida.

En la especie *Myrtillocactus schenckii* se observó crecimiento y generación de raíces (Figura 23) hasta los 57 días, se generaron en total 16 raíces, al treceavo día se generó dos raíces nuevas. A los 50 días ya se observaban las 16 raíces.

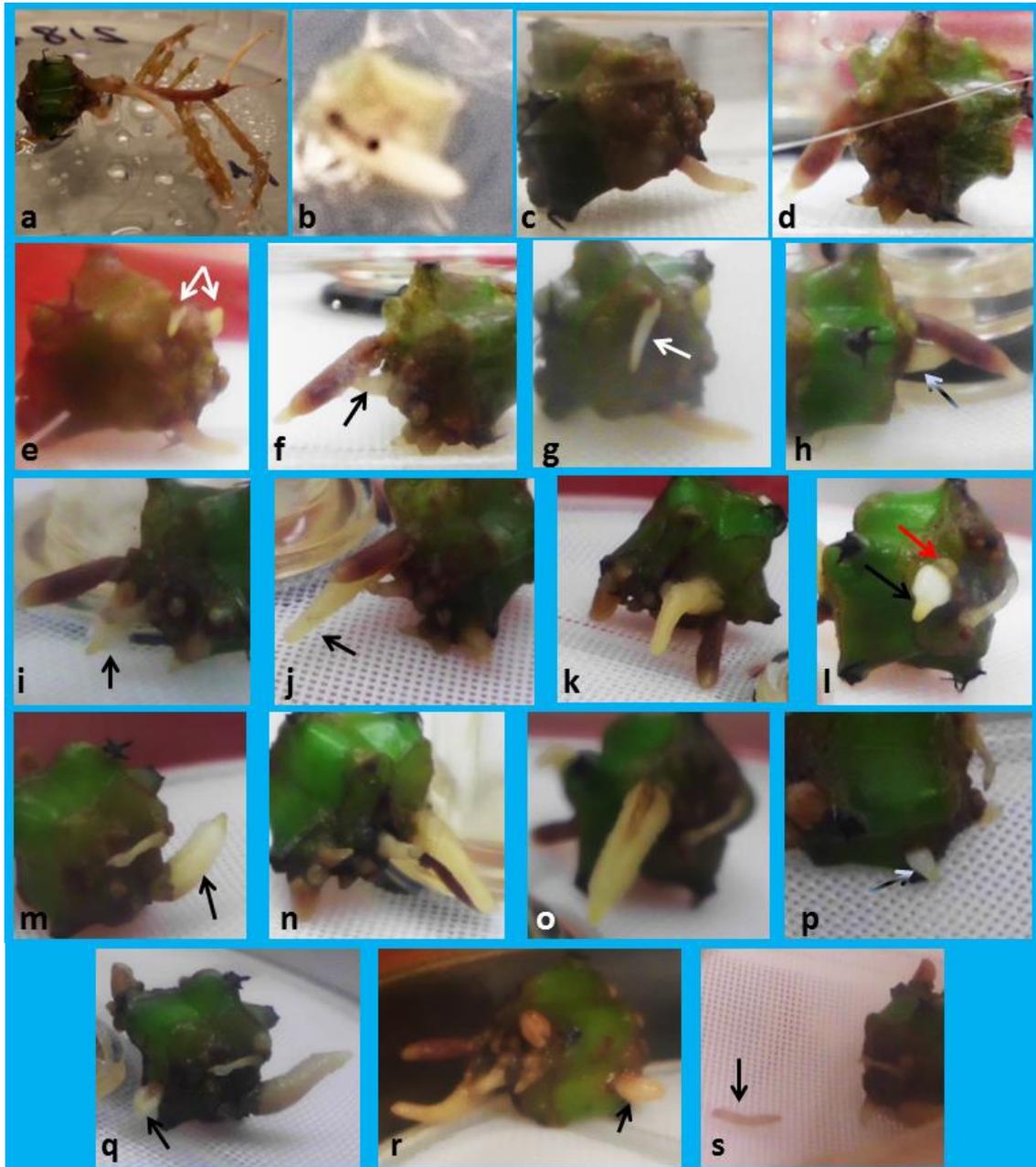
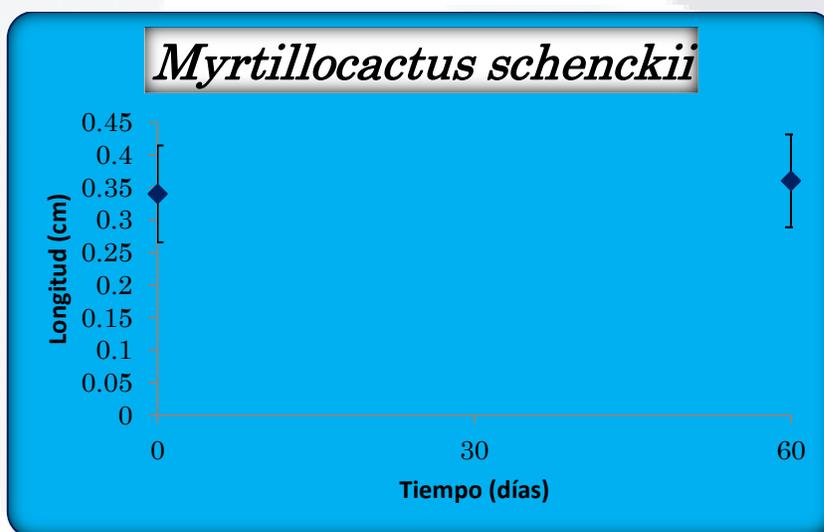


Figura 23. Raíces de *Myrtillocactus schenckii* en el sistema de inmersión temporal (RITA®). Se presentan los explantes con raíces que fueron cultivadas en biorreactor por 60 días a 25°C en luz. Imágenes: a) dos raíces y una gran cantidad de ramificaciones a los 2 meses de ser cultivada en luz en medio semisólido; b) eplante cultivado en oscuridad en medio semisólido con poco crecimiento; c) explante en biorreactor a los 3 días con 1 raíz en el lado superior; d) base del explante con 4 raíces; e) dos raíces nuevas en la parte superior a los 13 días; f) una raíz nueva en la base a los 13 días; g) crecimiento de raíz a los 14 días; h) nueva raíz en la base a los 14 días; i) crecimiento de raíz a los 20 días; j) a los 26 días, una mayor longitud de la raíz; k) base a los 29 días; l) en la parte superior se observa una raíz nueva pero dos se caieron, la flecha roja indica dónde se encontraba una de ellas; m) crecimiento de raíz a los 33 días; n) día 33 de la base; o) crecimiento de raíz a los 37 días p) nueva raíz a los 44 días; q) día 48; r) a los 57 días ya no se observaban cambios; s) raíz desprendida. Nota: las flechas indican raíces nuevas o crecimiento de ellas.

A los 44 días se cambio de medio pero sólo crecieron doce días más. Además, las raíces se pusieron en unas partes de color rojo, esto puede ser debido a que estaban incubadas con incidencia de luz.

En este caso si se lograron medir todas las raíces a pesar de que dos se cayeron por lo que se presenta una curva de crecimiento donde se tomó en cuenta el tiempo en días; 0 días, de que se colocó el explante en el biorreactor y a los 60 días, contra la longitud que alcanzó en centímetros.



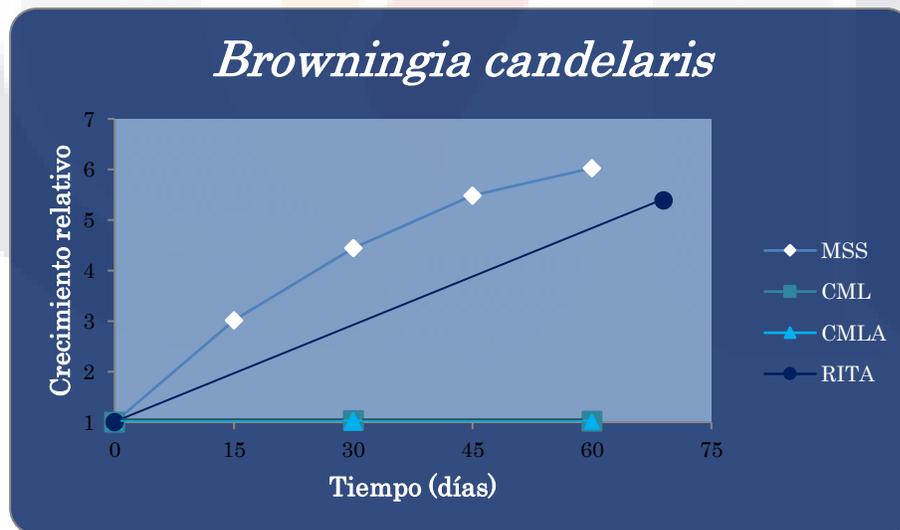
Gráfica 87. Curva de crecimiento de la longitud de raíces de *Myrtillocactus schenckii* en el sistema de inmersión temporal (RITA®). Representa el incremento en longitud del explante con raíces generadas por la especie durante 60 días de cultivo en medio de inmersión temporal. N = 1.

De acuerdo a las gráficas anteriores y al número de raíces generadas durante el tratamiento se observa que se generaron once raíces, pero el aumento en longitud fue muy poco, en lo referente al aumento de peso este fue relativamente alto esto debido a la generación de raíces pero también a que estas eran gruesas.

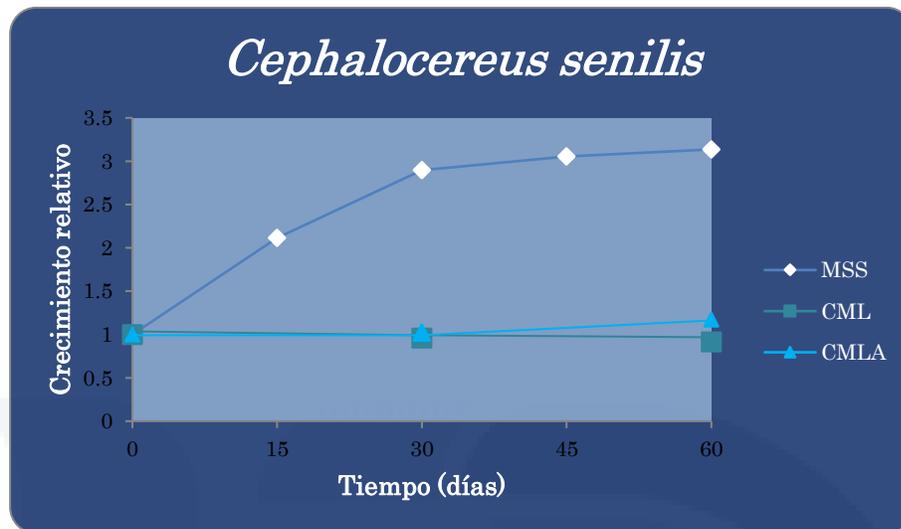
5.5 Comparación del crecimiento de raíces en diferentes sistemas de cultivo

5.5.1 Curvas de crecimiento relativo de los diferentes sistemas de cultivo

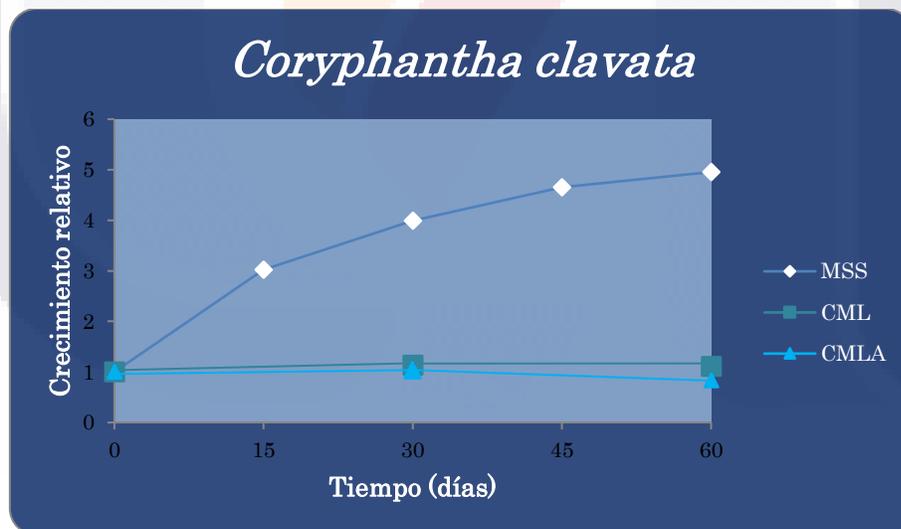
Comparación del crecimiento relativo mediante curvas de crecimiento (Gráficas 88 a 103) en los diferentes sistemas: medio semisólido, medio líquido, medio líquido con agitación en las especies *Browningia candelaris*, *Cephalocereus senilis*, *Coryphantha clavata*, *C. macromeris*, *Echinocereus schmollii*, *Hylocereus undatus*, *Isolatocereus dumertieri* (*Stenocereus dumertieri*), *Mammillaria carmenae*, *M. hutchisoniana* subsp. *louisae*, *M. jaliscana*, *M. sphacelata* var *sphacelata*, *M. theresae*, *Melocactus curvispinus* var *curvispinus* (*M. oaxacensis*), *Myrtillocactus schenkii*, *Polaskia chichipe*, y *Thelocactus hexaedrophorus* var *hexaedrophorus*. Asimismo para *B. candelaris* y *M. schenkii* además de comparar los sistemas de cultivo antes mencionados también se tomó en cuenta el sistema de inmersión temporal.



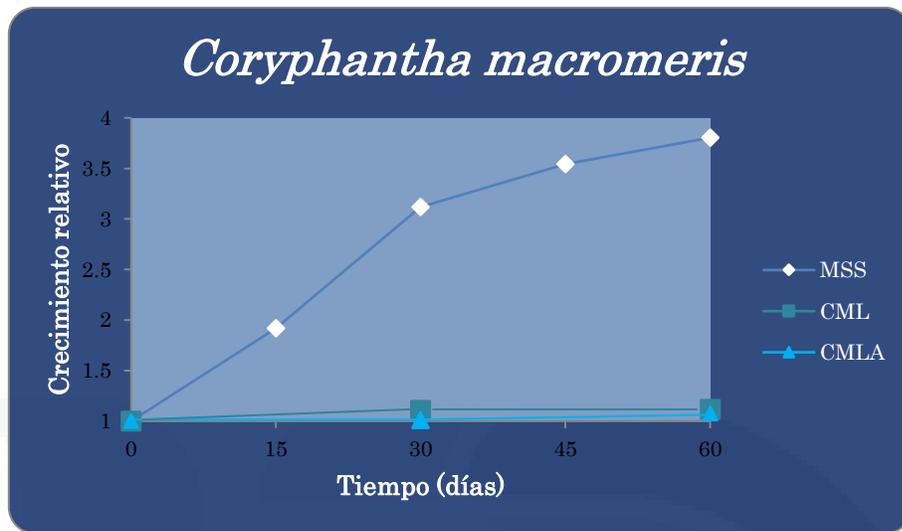
Gráfica 88. Curva de crecimiento relativo de *Browningia candelaris* en diferentes sistemas de cultivo. Representa el crecimiento relativo en medio semisólido, medio líquido, medio líquido con agitación y en el biorreactor RITA® de explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días. Nota: MSS = medio semisólido (N=14); CML = cultivo en medio líquido (N=8); CMLA = cultivo en medio líquido con agitación (N=8); RITA = Sistema de inmersión temporal por 69 días (N=1).



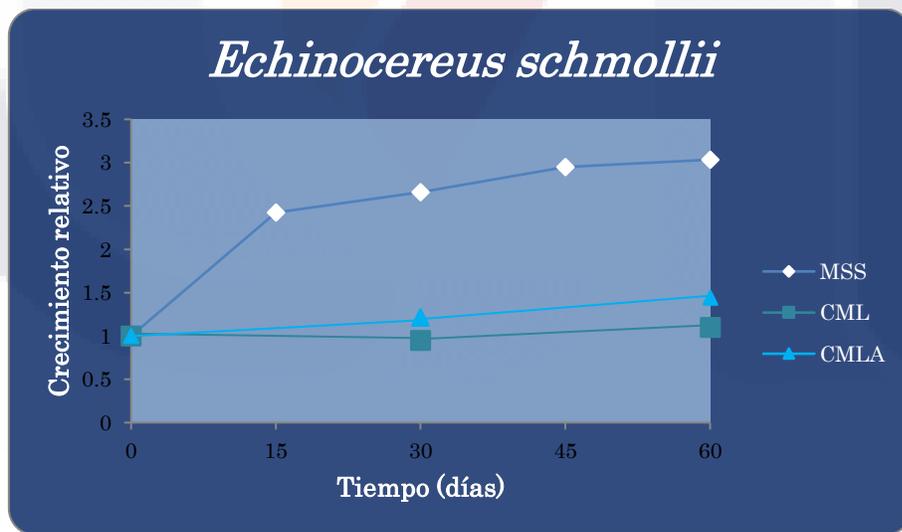
Gráfica 89. Curva de crecimiento relativo de *Cephalocereus senilis* en diferentes sistemas de cultivo. Representa el crecimiento relativo en medio semisólido, medio líquido y medio líquido con agitación de explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días. Nota: MSS = medio semisólido (N=8); CML = medio líquido (N=8); CMLA = medio líquido con agitación (N=8).



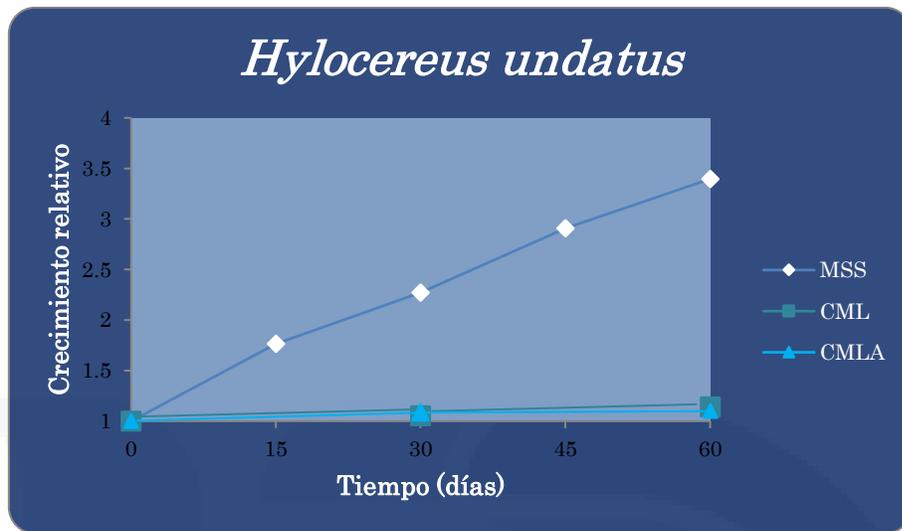
Gráfica 90. Curva de crecimiento relativo de *Coryphantha clavata* en diferentes sistemas de cultivo. Representa el crecimiento relativo en medio semisólido, medio líquido y medio líquido con agitación de explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días. Nota: MSS = medio semisólido (N=10); CML = medio líquido (N=8); CMLA = medio líquido con agitación (N=8).



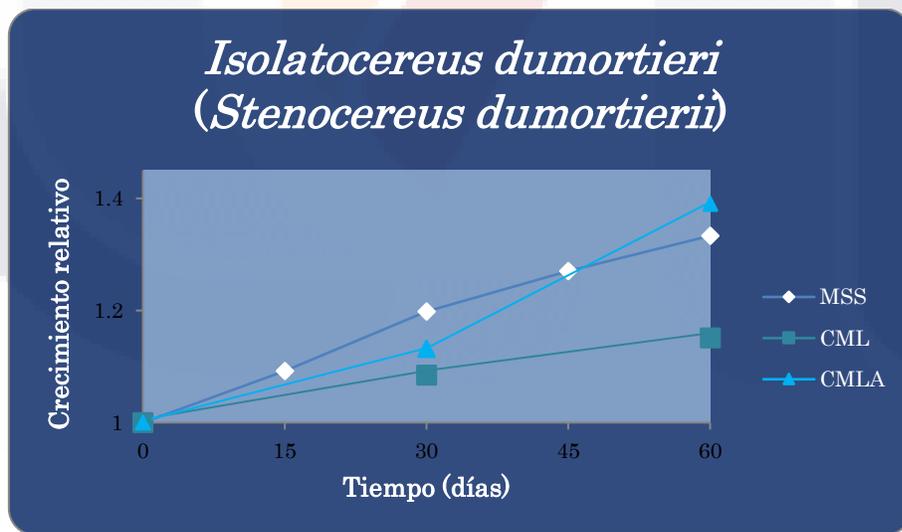
Gráfica 91. Curva de crecimiento relativo de *Coryphantha macromeris* en diferentes sistemas de cultivo. Representa el crecimiento relativo en medio semisólido, medio líquido y medio líquido con agitación de explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días. Nota: MSS = medio semisólido (N=16); CML = medio líquido (N=8); CMLA = medio líquido con agitación (N=8).



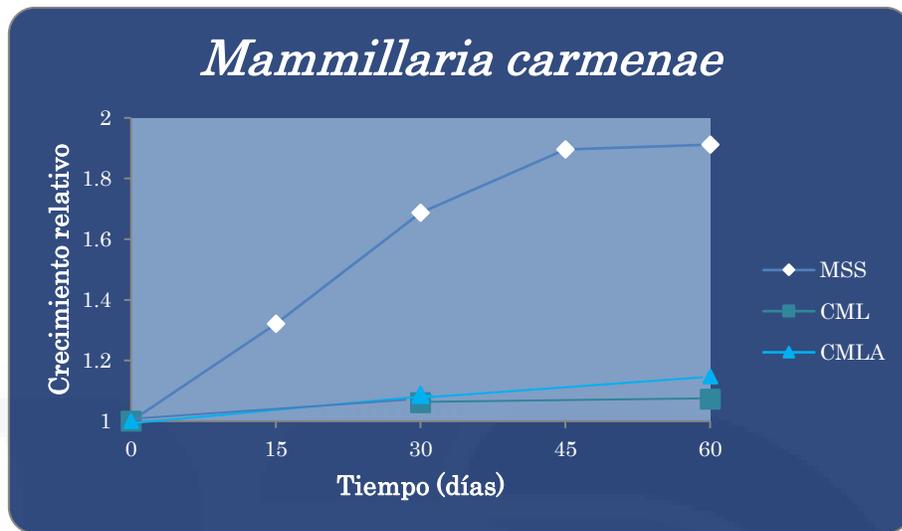
Gráfica 92. Curva de crecimiento relativo de *Echinocereus schmollii* en diferentes sistemas de cultivo. Representa el crecimiento relativo en medio semisólido, medio líquido y medio líquido con agitación de explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días. Nota: MSS = medio semisólido (N=20); CML = medio líquido (N=8); CMLA = medio líquido con agitación (N=8).



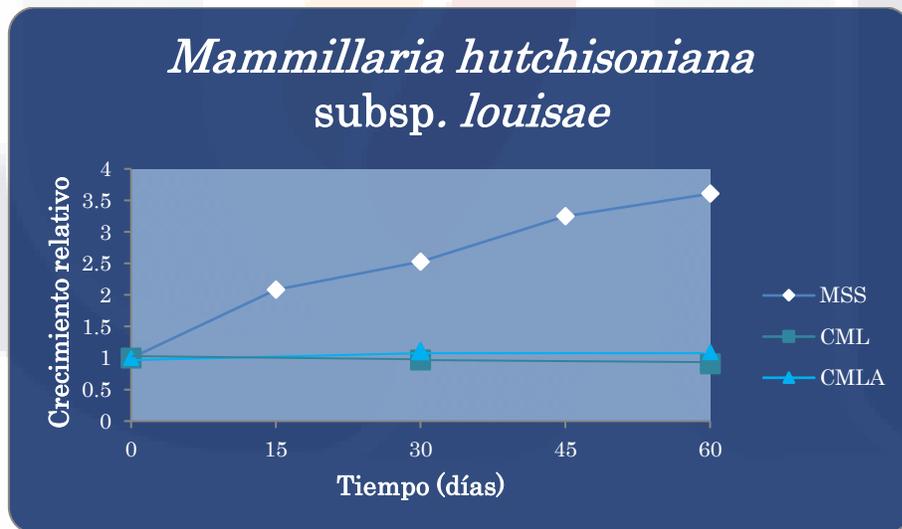
Gráfica 93. Curva de crecimiento relativo de *Hylocereus undatus* en diferentes sistemas de cultivo. Representa el crecimiento relativo en medio semisólido, medio líquido y medio líquido con agitación de explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días. Nota: MSS = medio semisólido (N=18); CML = medio líquido (N=8); CMLA = medio líquido con agitación (N=8).



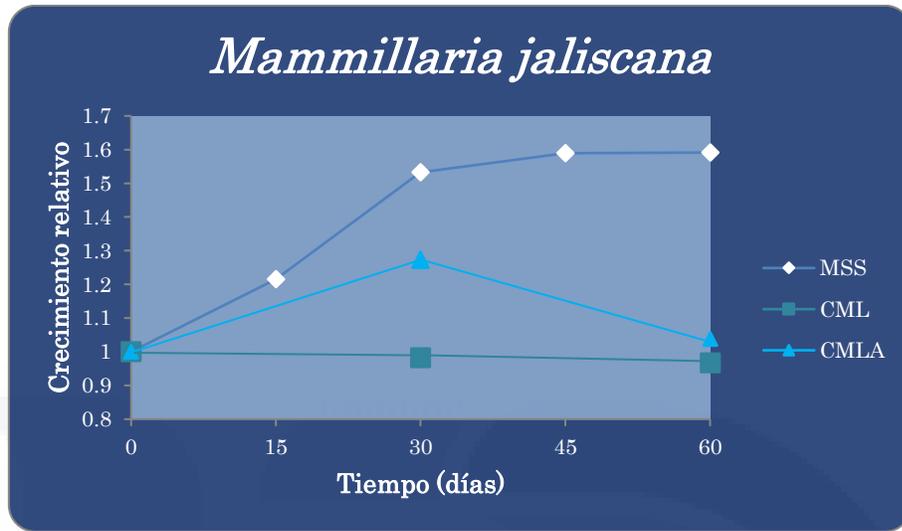
Gráfica 94. Curva de crecimiento relativo de *Isolatocereus dumortieri* (*Stenocereus dumortieri*) en diferentes sistemas de cultivo. Representa el crecimiento relativo en medio semisólido, medio líquido y medio líquido con agitación de explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días. Nota: MSS = medio semisólido (N=19); CML = medio líquido (N=8); CMLA = medio líquido con agitación (N=8).



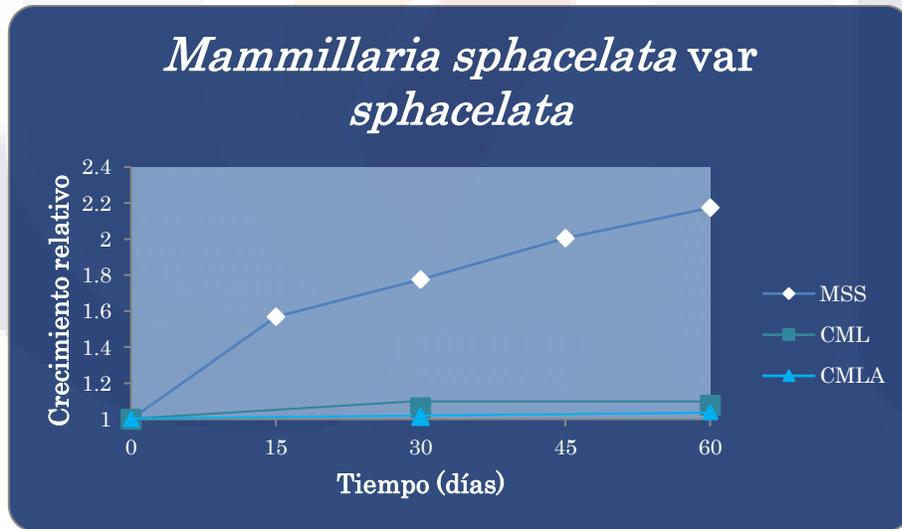
Gráfica 95. Curva de crecimiento relativo de *Mammillaria carmenae* en diferentes sistemas de cultivo. Representa el crecimiento relativo en medio semisólido, medio líquido y medio líquido con agitación de explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días. Nota: MSS = medio semisólido (N=6); CML = medio líquido (N=8); CMLA = medio líquido con agitación (N=8).



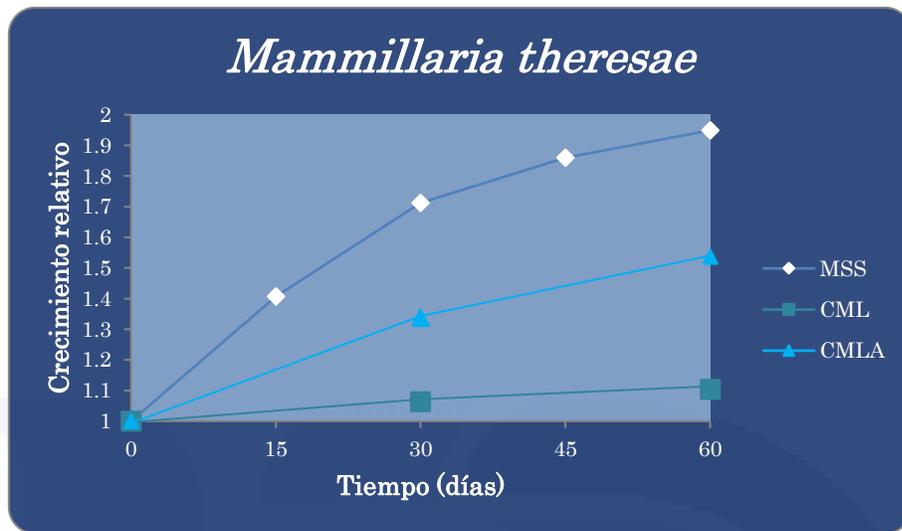
Gráfica 96. Curva de crecimiento relativo de *Mammillaria hutchisoniana* subsp. *louisae* en diferentes sistemas de cultivo. Representa el crecimiento relativo en medio semisólido, medio líquido y medio líquido con agitación de explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días. Nota: MSS = medio semisólido (N=21); CML = medio líquido (N=8); CMLA = medio líquido con agitación (N=8).



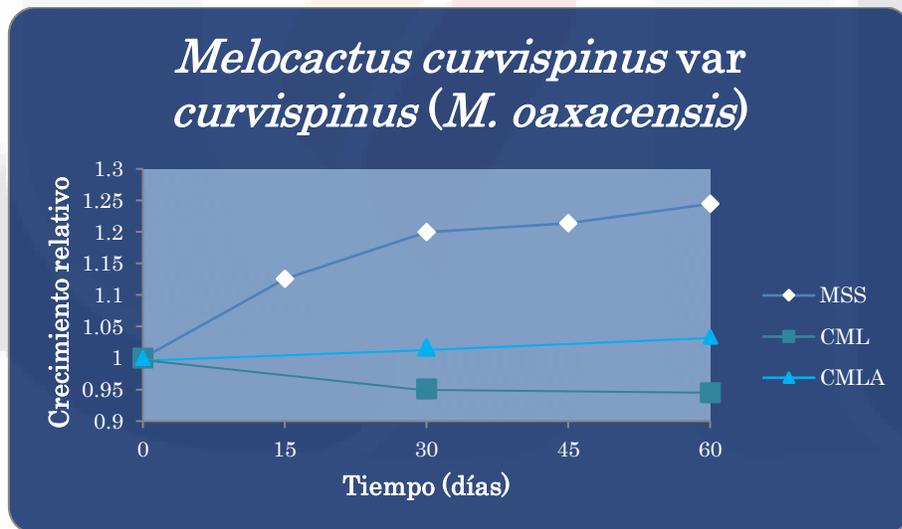
Gráfica 97. Curva de crecimiento relativo de *Mammillaria jaliscana* en diferentes sistemas de cultivo. Representa el crecimiento relativo en medio semisólido, medio líquido y medio líquido con agitación de explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días. Nota: MSS = medio semisólido (N=15); CML = medio líquido (N=8); CMLA = medio líquido con agitación (N=8).



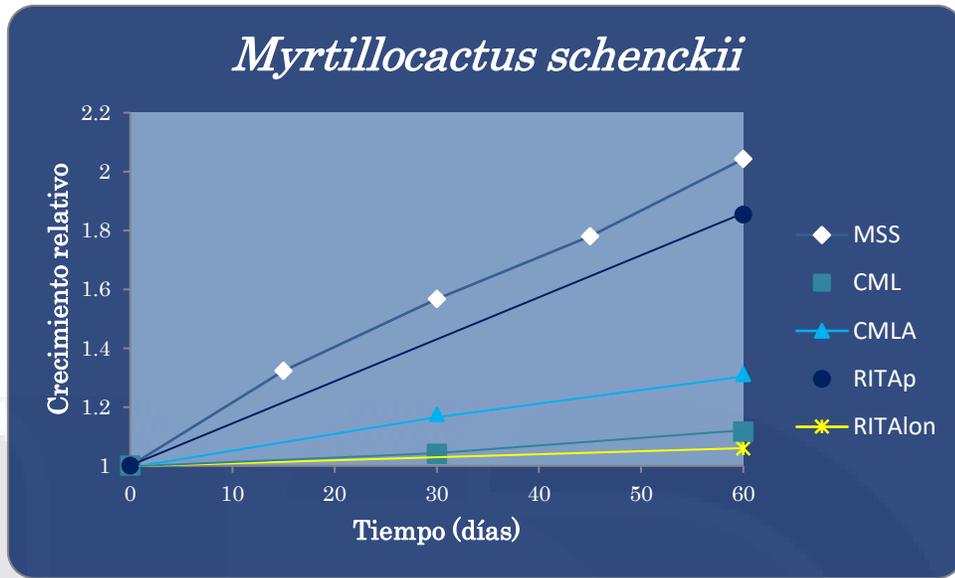
Gráfica 98. Curva de crecimiento relativo de *Mammillaria sphaclata var sphaclata* en diferentes sistemas de cultivo. Representa el crecimiento relativo en medio semisólido, medio líquido y medio líquido con agitación de explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días. Nota: MSS = medio semisólido (N=16); CML = medio líquido (N=8); CMLA = medio líquido con agitación (N=8).



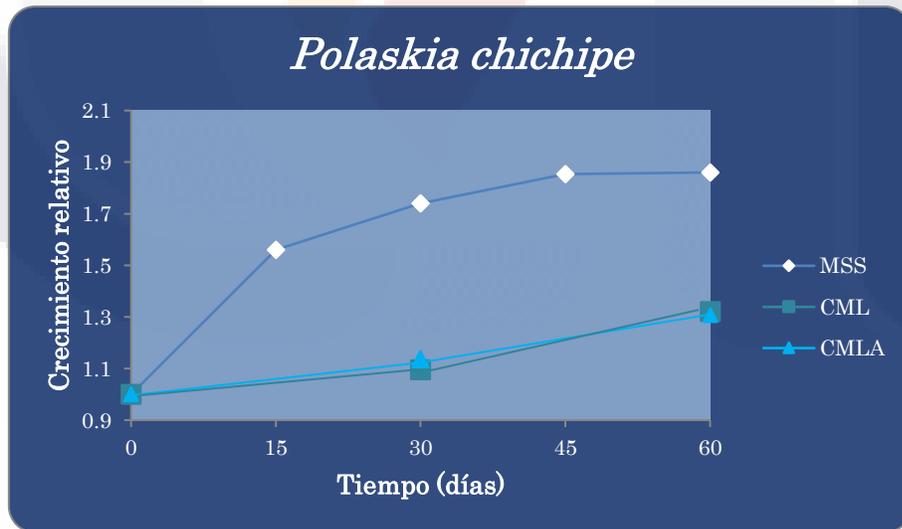
Gráfica 99. Curva de crecimiento relativo de *Mammillaria theresae* en diferentes sistemas de cultivo. Representa el crecimiento relativo en medio semisólido, medio líquido y medio líquido con agitación de explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días. Nota: MSS = medio semisólido (N=13); CML = medio líquido (N=8); CMLA = medio líquido con agitación (N=8).



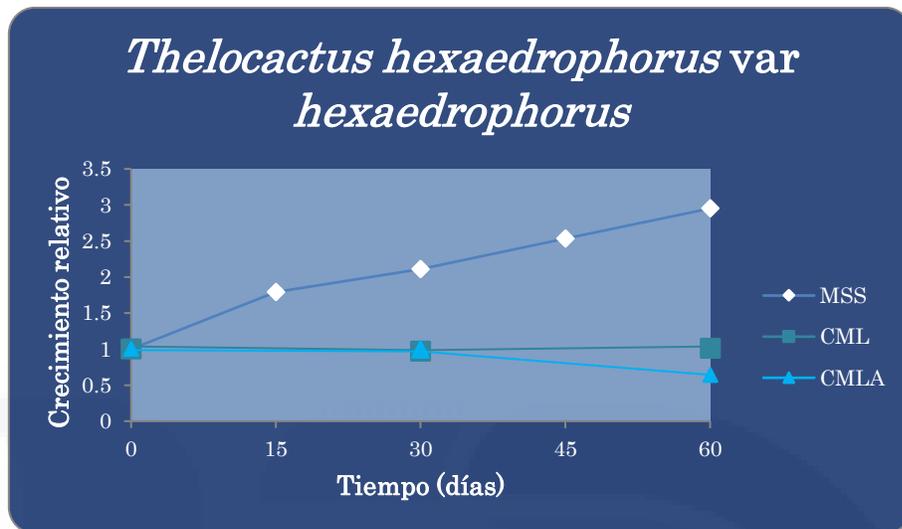
Gráfica 100. Curva de crecimiento relativo de *Melocactus curvispinus var curvispinus (M. oaxacensis)* en diferentes sistemas de cultivo. Representa el crecimiento relativo en medio semisólido, medio líquido y medio líquido con agitación de explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días. Nota: MSS = medio semisólido (N=11); CML = medio líquido (N=8); CMLA = medio líquido con agitación (N=8).



Gráfica 101. Curva de crecimiento relativo de *Myrtillocactus schenckii* en diferentes sistemas de cultivo. Representa el crecimiento relativo en medio semisólido, medio líquido, medio líquido con agitación y en el biorreactor RITA® tanto en peso como en longitud de explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días. Nota: MSS = medio semisólido (N=12); CML = medio líquido (N=8); CMLA = medio líquido con agitación (N=8); RITAp = Sistema de inmersión temporal en peso; RITALon = Sistema de inmersión temporal en longitud.



Gráfica 102. Curva de crecimiento relativo de *Polaskia chichipe* en diferentes sistemas de cultivo. Representa el crecimiento relativo en medio semisólido, medio líquido y medio líquido con agitación de explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días. Nota: MSS = medio semisólido (N=17); CML = medio líquido (N=8); CMLA = medio líquido con agitación (N=8).



Gráfica 103. Curva de crecimiento relativo de *Thelocactus hexaedrophorus* var *hexaedrophorus* en diferentes sistemas de cultivo. Representa el crecimiento relativo en medio semisólido, medio líquido y medio líquido con agitación de explantes con raíces generadas por la especie durante 60 días. Nota: MSS = medio semisólido (N=17); CML = medio líquido (N=8); CMLA = medio líquido con agitación (N=8).

En las gráficas anteriores se puede resaltar que el mayor crecimiento se dio en el medio semisólido convencional en todas las especies excepto en *Isolatocereus dumortieri* (*Stenocereus dumortieri*) donde el mayor crecimiento fue en el medio de cultivo líquido con agitación. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el crecimiento de las raíces no se representa adecuadamente debido a las desventajas antes mencionadas en el sistema de CML y en el CMLA y en cuanto al biorreactor RITA por ser sólo un explante por especie no representa la respuesta que tendrían más explantes, pero aun así es muy cercano al sistema de cultivo en MSS.

5.5.2 Comparación de la generación de raíces en los diferentes sistemas de cultivo

Se llevó a cabo un cuadro para comparar el número de raíces generadas durante el tiempo que se tomaron resultados de los diferentes sistemas de cultivo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Promedio de número de raíces durante los diferentes tratamientos. Se presentan los diferentes resultados del número de raíces generadas durante cada uno de los tratamientos más su desviación estándar.

Especies	Promedio del Número de Raíces Generadas Durante los Tratamientos			
	MSS	CML	CMLA	RITA®
<i>Browningia candelaris</i>	5.93 ± 4.46	2.5 ± 2.73	0.5 ± 0.76	13
<i>Cephalocereus senilis</i>	4.75 ± 4.71	1.38 ± 2.72	1.38 ± 1.41	
<i>Coryphantha clavata</i>	13.4 ± 12.03	3.5 ± 3.89	5.67 ± 11.39	
<i>Coryphantha macromeris</i>	10 ± 8.59	3.25 ± 3.62	1.88 ± 1.73	
<i>Echinocereus schmollii</i>	3.55 ± 3.49	2 ± 2.07	3 ± 2.62	
<i>Hylocereus undatus</i>	3.56 ± 3.33	0.88 ± 0.64	0.63 ± 1.06	
<i>Isolatocereus dumortieri</i> (<i>Stenocereus dumortieri</i>)	1.11 ± 1.49	0	1.63 ± 2.62	
<i>Mammillaria carmenae</i>	5.67 ± 6.59	2.38 ± 2.26	6.38 ± 7.17	
<i>Mammillaria hutchisoniana</i> subsp. <i>louisae</i>	4.29 ± 3.73	0.63 ± 0.74	2 ± 4.11	
<i>Mammillaria jaliscana</i>	2.71 ± 2.81	2.25 ± 2.87	0.63 ± 1.06	
<i>Mammillaria sphaelata</i> var <i>sphaelata</i>	5.5 ± 5.61	0.75 ± 1.39	20.88 ± 49.85	
<i>Mammillaria theresae</i>	2.85 ± 2.19	0.5 ± 0.76	0.93 ± 0.93	
<i>Melocactus curvispinus</i> var <i>curvispinus</i> (<i>M. oaxacensis</i>)	7.9 ± 17.32	0.25 ± 0.46	2.75 ± 4.74	
<i>Myrtillocactus schenckii</i>	2.5 ± 3.03	2.63 ± 2.39	2 ± 1.2	11
<i>Polaskia chichipe</i>	1.47 ± 2.48	0.13 ± 0.35	1.13 ± 1.13	
<i>Thelocactus hexaedrophorus</i> var <i>hexaedrophorus</i>	7.53 ± 7.94	8.13 ± 9.55	0.88 ± 1.46	

En el Cuadro 5 se observa que la mayoría de las especies generó un mayor número de raíces en el medio semisólido convencional, se debe resaltar que para este sistema de cultivo sólo se usaron explantes que acababan de generar raíces y para los otros sistemas de cultivo se usaron tanto explantes con poco tiempo de generar raíces como explantes que ya se habían usado en el método convencional, lo cual también pudo afectar en que se generaran menos raíces. Por otro lado, *Myrtillocactus schenckii* presentó un mayor número de raíces en el sistema de CML que en el MSS al igual que *Theolocactus hexaedrophorus* var *hexaedrophorus*. *Browningia candelaris* y *Myrtillocactus schenckii* presentan el mayor número de raíces en el sistema RITA®, sin embargo en este caso solamente se probó un explante. Por otro lado, *Isolatocereus dumortieri*, *Mammillaria carmenae* y *Mammillaria sphaelata* var *sphaelata* tienen un promedio mayor de raíces generadas en el sistema de CMLA. Esto indica que el uso de un sistema de cultivo para generar raíces es específico para cada especie.

5.6. Pruebas de comprobación de raíces transformadas

5.6.1 Prueba histoquímica para el gen β -glucoronidasa (GUS) de raíces generadas

El análisis de la presencia del gen β -glucoronidasa en las raíces generadas de los explantes de cactáceas. Se realizó a las especies con las que se contaba con material (cuarenta y siete especies) para poder obtener un porcentaje de la actividad del gen GUS de cada especie (Cuadro 4), además se obtuvo un porcentaje general del 93.33% que fue positiva al ensayo GUS, donde algunas raíces y explantes mostraron una coloración azul, principalmente la base y ápice de la raíz principal, en ramificaciones, y en el sistema vascular (Figura 24, 25 y 26), esto en 42 especies de los géneros: *Browningia*, *Cephalocereus*, *Coryphantha*, *Echinocereus*, *Echinomastus*, *Frailea*, *Hylocereus*, *Isolatocereus*, *Mammillaria*, *Mammilloidia*, *Matucana*, *Melocactus*, *Myrtillocactus*, *Pelecyphora*, *Polaskia*, *Selenicereus* y *Thelocactus*; lo que indica que son positivos a la prueba histoquímica del gen *gus*.

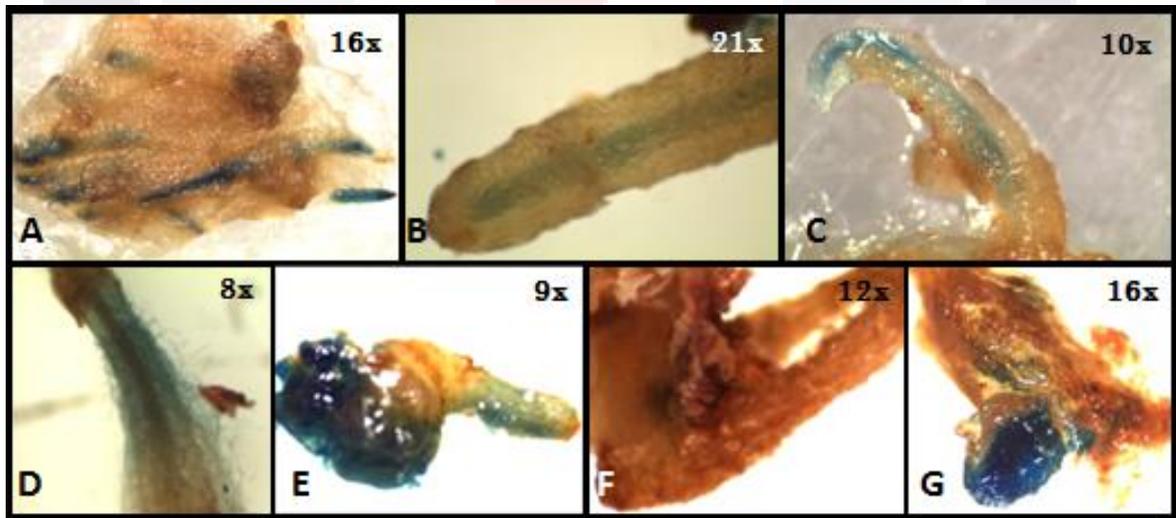


Figura 24. Raíces con actividad GUS (i). Se presentan las raíces que fueron positivas al gen *gus*. Imágenes: A) *Browningia candelaris*; B) *Cephalocereus senilis*; C) *Coryphantha clavata*; D) *C. durangensis*; E) *C. macromeris*; F) *C. radians*; G) *Echinocereus adustus* var *adustus*.

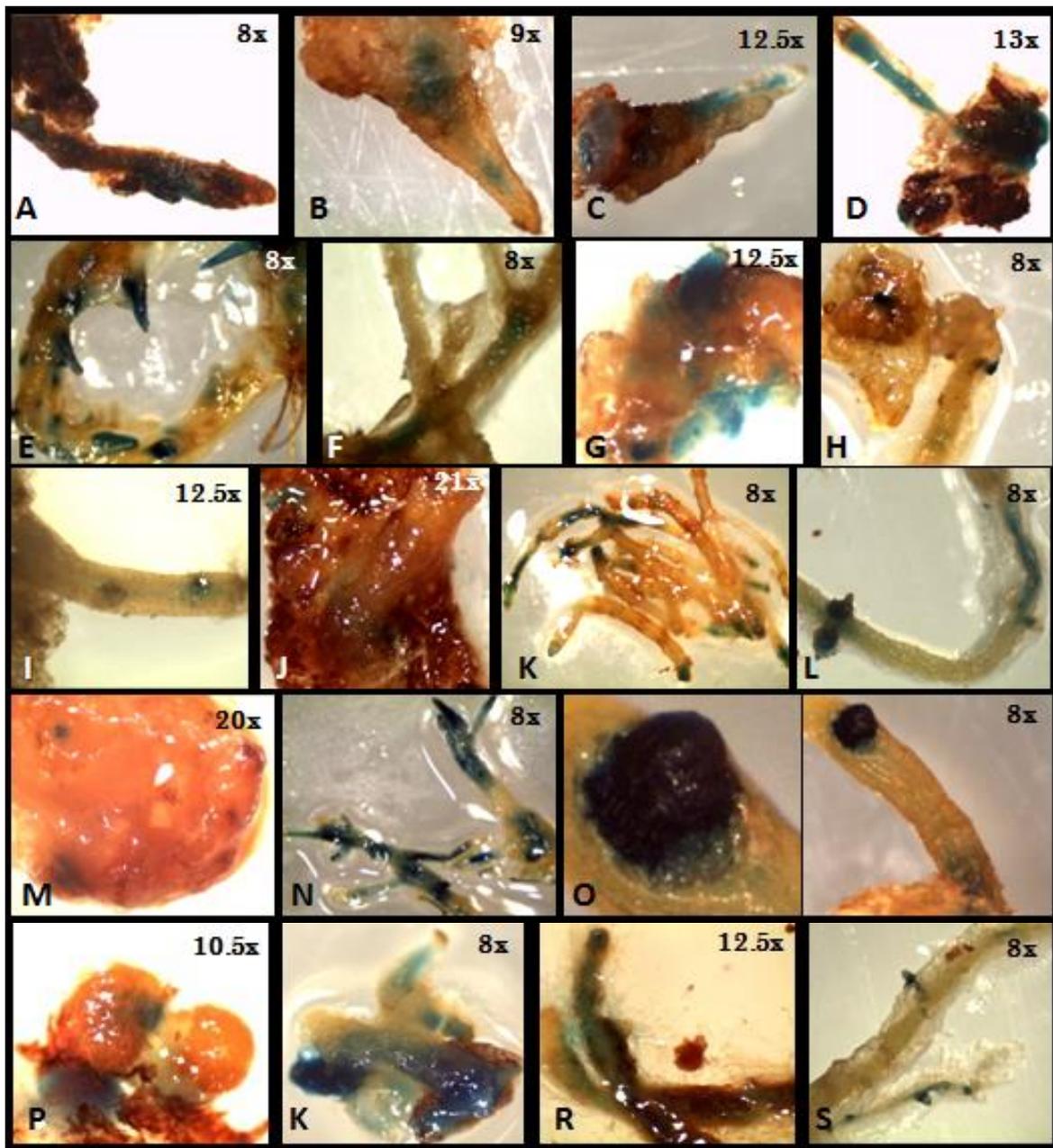


Figura 25. Raíces con actividad GUS (ii). Se presentan las raíces que fueron positivos al gen *gus*. Imágenes: A) *Echinocereus ferreirianus* var *lindsayi* (*E. lindsayi*); B) *E. knippelianus*; C) *E. knippelianus* (*E. knippelianus* var *kruegeri*); D) *E. pulchellus* subsp. *weinbergii*; E) *E. schmollii*; F) *Echinomastus erectocentrus*; G) *Frailea asterioides*; H) *Hylocereus undatus*; I) *Isolatocereus dumortieri* (*Stenocereus dumortieri*); J) *Mammillaria senilis* (*Mamillopsis senilis*); K) *Mammillaria carmenae*; L) *M. rettigiana* (*M. gilensis*); M) *M. albiflora* (*M. herrerae* var *albiflora*); N) *M. bocasana* var *bocasana*; O) *M. crinita* (*M. zeilmanniana*) P) *M. herrerae*; Q) *M. hutchisoniana* subsp. *louisae*; R) *M. jaliscana*; S) *M. oteroi*.



Figura 26. Raíces con actividad GUS (iii). Se presentan las raíces que fueron positivas al gen *gus*. Imágenes: A) *Mammillaria perbella* (*M. pseudoperbella*); B) *M. perezdelarosae*; C) *M. petterssonii* (*M. obscura*); D) *M. solisioides*; E) *M. sphacelata* var *sphacelata*; F) *M. theresae*; G) *Mammilloidia candida* (*Mammillaria candida*); H) *Matucana madisoniorum*; I) *Melocactus curvispinus* var *curvispinus* (*M. oaxacensis*); J) *Myrtillocactus geometrizans*; K) *M. schenckii*; L) *Pelecypora strobiliformis*; M) *Polaskia chichipe*; N) *Selenicereus validus*; O) *Thelocactus hexaedrophorus* var *hexaedrophorus*; P) *T. rinconensis* subsp. *rinconensis*.

Por otra parte, debido a que los explantes producían brotes y tejido calloso, se les realizó la prueba GUS a algunos de estos para saber si estaban transformados, siendo tres brotes de diferentes especies (*Mammillaria carmenae*, *M. bocasana* var *bocasana* y *M. perbella* (*M. pseudoperbella*) donde no se observó actividad GUS y cuatro especies con tejido calloso donde se observa que todo o la mayor parte del tejido presentan actividad GUS (Figura 27).

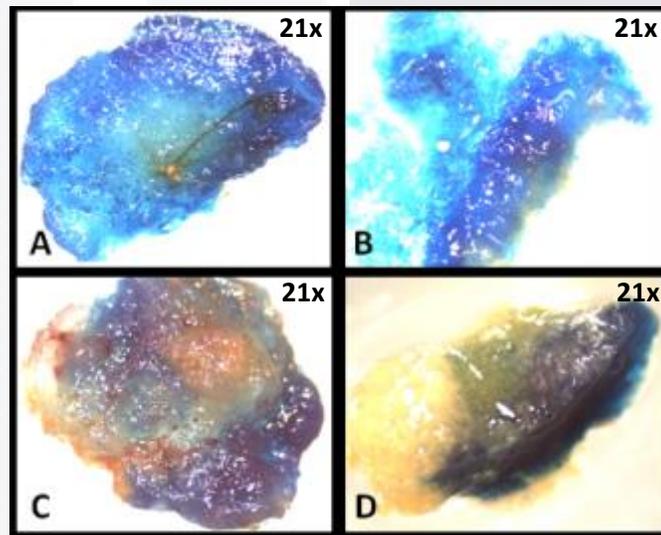


Figura 27. Tejido calloso con actividad GUS. Se presentan cuatro especies que presentaban callo el cual fue positivo al gen *gus*. Imágenes: A) *Echinocereus ferreirianus* var *lindsayi* (*E. lindsayi*); B) *E. knippelianus* (*E. knippelianus* var *kruegeri*); C) *E. pulchellus* subsp. *weinbergii*; D) *Mammillaria bocasana* var *bocasana. rinconensis*.

5.6.1.1 Observación de explantes y raíces en luz (previo a la prueba *gus*)

Como se mencionó en la metodología a los explantes a los que se les hizo la prueba histoquímica del gen *gus* se colocaron previamente en luz a una temperatura de 25°C, entre dos y tres semanas, y se realizaron observaciones sobre su respuesta a la luz, entre los análisis que se hicieron se observó que:

- * Algunas raíces se adelgazaron como en las especies *Echinocereus* (*Morangaya*) *pensilis*, *E. pulchellus* subsp. *weinbergii*, *Mammillaria crinita* (*M. zeilmanniana*), *M. oteroi*, *Myrtillocactus schenckii* (Figura 28a y b).
- * Se deshidrataron ciertos explantes como las especies *Mammillaria theresae* y *Myrtillocactus schenckii*; representado en la Figura 28b;
- * Unas raíces se pusieron de un color verde claro como en las especies *Browningia candelaris*, *Coryphantha durangensis*, *Mammillaria rettigiana* (*M. gilensis*), *M. crinita* (*M. zeilmanniana*), *M. hutchisoniana* subsp. *louisae*, *M. oteroi*, *M. perezdelarosae*, *Selenicereus validus* (Figura 28c, d).
- * Otras se pusieron muy verdes como en las especies *Echinocereus schmollii*, *Mammillaria carmenae*, *M. perezdelarosae*, *M. sphacelata* var *sphacelata*, *Myrtillocactus schenckii*, *Polaskia chichipe*, representado en la Figura 28e, f y g;
- * *Mammillaria bocasana* var *bocasana*, *Selenicereus validus* generaron brotes (Figura 28h). El color verde nos indica que se hicieron fotosintéticas.
- * Los callos también pasaron a ser verdes en las especies *Echinocereus adustus* var *adustus*, *Echinocereus ferreirianus* var *lindsayi* (*E. lindsayi*), *E. knippelianus* (*E. knippelianus* var *kruegeri*), *Pelecypora strobiliformis*, además de que crecieron (representado en la Figura 28i y j) lo que indica que el tejido pasó a ser fotosintético.
- * Ciertas raíces se pusieron de color café oscuro como en las especies *Coryphantha durangensis*, *Mammillaria senilis* (*Mamillopsis senilis*), representado en la Figura 28k.

* Unas raíces presentaron un crecimiento como en las especies *Coryphantha durangensis*, *Echinocereus schmollii*, *Frailea asterioides*, *Mammillaria bocasana* var *bocasana*, *M. hutchisoniana* subsp. *louisae*, *Myrtillocactus schenckii*, *Polaskia chichipe*, *Thelocactus rinconensis* subsp. *rinconensis*, representado en la Figura 28k, l, m, n, q.

* Algunos explantes generan nuevas raíces como en las especies *Echinocereus schmollii*, *Isolatocereus dumortieri* (*Stenocereus dumortieri*), *Mammillaria rettigiana* (*M. gilensis*), *Matucana madisoniorum*, *Myrtillocactus schenckii*, *Thelocactus rinconensis* subsp. *rinconensis* (Figura 28o, p y q).

En el caso de las especies que crecían más en luz que en la oscuridad se dejaron por tiempo indefinido en este tipo de incubación como las especies *Coryphantha durangensis*, *Echinocereus schmollii*, *Mammillaria bocasana* var *bocasana*, *Mammillaria sphaelata* var *sphaelata*, *Myrtillocactus schenckii*, *Polaskia chichipe*, esto fue determinado solo por observación ya que no se hicieron mediciones de sus raíces.

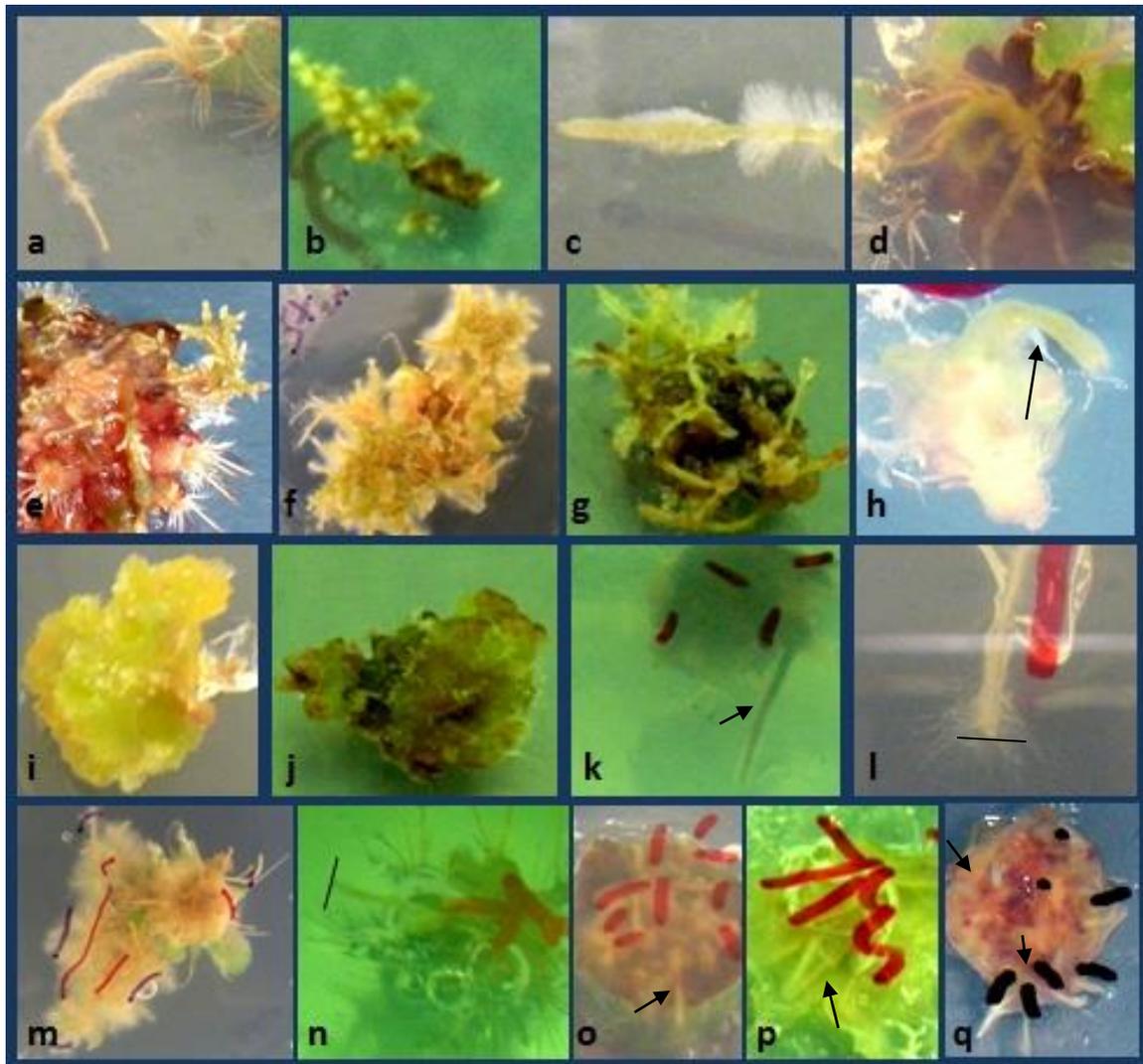


Figura 28. Raíces en luz. Se presentan las raíces que fueron incubadas en luz entre dos y tres semanas a 25°C. Imágenes: a) *Mammillaria oteroi* donde sus raíces se deshidrataron y adelgazaron; b) *Myrtillocactus schenckii* que exhibe una deshidratación de explante y raíces; c y d) donde *Selenicereus validus* y *Mammillaria perezdelarosae*, respectivamente presentaron una coloración verde claro; e,f,g) *M. sphacelata* var *sphacelata*, *Mammillaria bocasana* var *bocasana* y *M. carmenae* con una coloración muy verde, respectivamente; h) *S. validus* generó un brote verde; i,j) *Echinocereus adustus* var *adustus* y *Pelecyphora strobiliformis*, respectivamente, con callo que aumento de tamaño y además se hizo verde; k) *Coryphantha durangensis* donde se observa una coloración café de su raíz y una ramificación lo mismo que un crecimiento de su raíz,; l) *Hylocereus undatus* también aumento su tamaño al igual que m) *Mammillaria bocasana* var *bocasana* y n) *Polaskia chichipe*; o) *Frailea asterioides* generó nuevas raíces, lo mismo que p) *E. schmollii*, q) *Thelocactus rinconensis* subsp. *rinconensis*, este además mostró un crecimiento en sus raíces. Nota: las flechas y líneas negras indican crecimiento o generación tanto de raíces como de brote.

5.6.2 Análisis por PCR de raíces generadas

Se obtuvo un gel de electroforesis de la amplificación por PCR de raíces generadas posiblemente transformadas de 25 especies de cactáceas (Cuadro 6), donde todas fueron positivas a la prueba GUS excepto *Cephalocereus senilis*.

Cuadro 6. Resultados de la amplificación por PCR. Especies a las que se les realizó la extracción de ADN y la amplificaron por PCR de las secuencias de los genes *rol B*, *Vir D*, *nptII* y *gus*.

Especies	Amplificación de genes			
	<i>rol B</i>	<i>Vir D</i>	<i>nptII</i>	<i>gus</i>
<i>Browningia candelaris</i>	+	+		
<i>Cephalocereus senilis</i>				
<i>Coryphantha clavata</i>		+		+
<i>Coryphantha durangensis</i>	+			+
<i>Coryphantha macromeris</i>	+	+	+	+
<i>Coryphantha radians</i>				
<i>Echinocereus knippelianus</i> (<i>E. knippelianus</i> var <i>kruegeri</i>)		+		+
<i>Echinocereus pulchellus</i> subsp. <i>weinbergii</i>		+		+
<i>Echinocereus schmollii</i>	+	+	+	+
<i>Echinomastus erectocentrus</i>				
<i>Hylocereus undatus</i>	+	+		
<i>Isolatocereus dumortieri</i> (<i>Stenocereus dumortieri</i>)		+		
<i>Mammillaria bocasana</i> var <i>bocasana</i>	+		+	+
<i>Mammillaria carmenae</i>	+		+	+
<i>Mammillaria hutchisoniana</i> subsp. <i>louisae</i>	+	+	+	+
<i>Mammillaria jaliscana</i>	+			+
<i>Mammillaria oteroi</i>	+		+	+
<i>Mammillaria perbella</i> (<i>M. pseudoperbella</i>)				+
<i>Mammillaria solisioides</i>		+		+
<i>Mammillaria sphaelata</i> var <i>sphaelata</i>	+	+	+	+
<i>Mammillaria theresae</i>		+	+	+
<i>Mammilloidia candida</i> (<i>Mammillaria candida</i>)		+		+
<i>Melocactus curvispinus</i> var <i>curvispinus</i> (<i>M. oaxacensis</i>)	+	+		+
<i>Myrtillocactus schenckii</i>		+	+	+
<i>Polaskia chichipe</i>				+

+ Genes que amplificaron de las especies probadas

De las especies probadas, siete fueron positivas a la amplificación, es decir que se amplificó al menos uno de los genes de interés (*rol B*, *nptII*, ó *gus*), una de las especies solamente dio positivo a *Vir D* y 14 especies amplificaron algunos de los genes de interés o todos más el gen *Vir D*. En las tres especies restantes no amplificó ningún gen, donde una de ellas fue la especie negativa a la prueba GUS.

Los resultados anteriores (Cuadro 6) se obtuvieron al realizar seis electroforesis de los productos de PCR de los cuales se seleccionaron algunas especies y se hicieron dos electroforesis de los genes amplificados tanto *rol B*, *nptII*, *gus* y *Vir D* (Figura 29), el tamaño del bandeo de cada gen es similar al esperado del Cuadro 2.

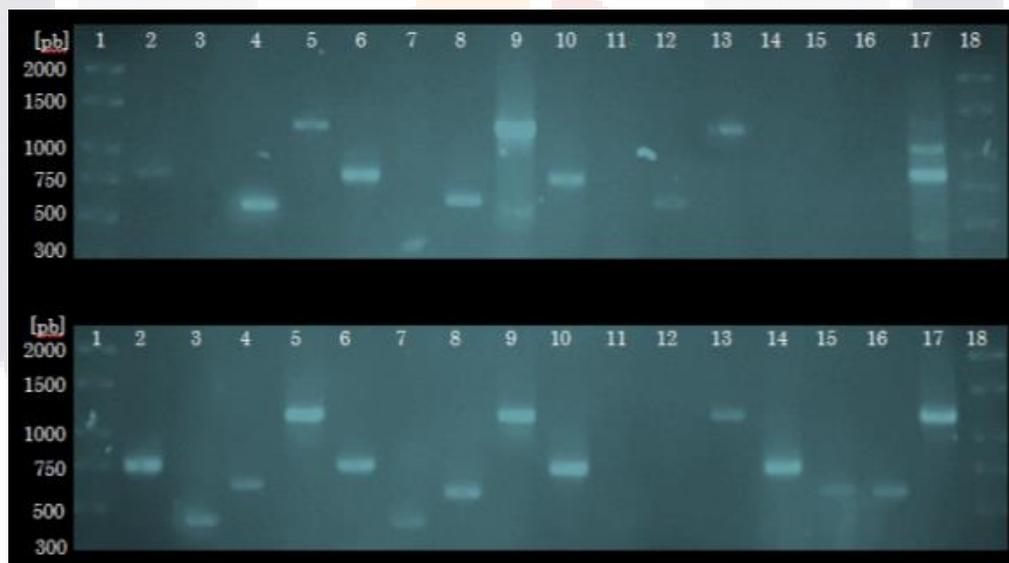


Figura 29. Electroforesis de la amplificación por PCR de raíces generadas. Se observan las bandas de los genes *rol B*, *Vir D*, *nptII* y *gus* que se amplificaron de 8 especies que presentaron raíces mediante la inducción de raíces transformadas con *A. rhizogenes*. Carriles de la imagen superior: 1 y 18) MPM de 2000 pb; *Mammillaria carmenae* 2) gen *rol B*, 4) gen *nptII* y 5) gen *gus*; *M. bocasana* var *bocasana* 6) gen *rol B*, 8) gen *nptII*, 9) gen *gus*; *M. oteroi* 10) gen *rol B*, 12) gen *nptII*, 13) gen *gus*; *M. perbella* (*M. pseudoperbella*) 17) gen *gus*. Carriles de la imagen inferior: 1 y 18) MPM de 2000 pb; *Mammillaria hutchisoniana* subsp. *louisae* 2) gen *rol B*, 3) gen *Vir D*, 4) gen *nptII* y 5) gen *gus*; *Coryphantha macromeris* 6) gen *rol B*, 7) gen *Vir D*, 8) gen *nptII* y 9) gen *gus*; *Mammillaria jaliscana* 10) gen *rol B*, 13) gen *gus*; *M. sphacelata* var *sphacelata* 14) gen *rol B*, 15) gen *Vir D*, 16) gen *nptII* y 17) gen *gus*

5.7 Análisis cualitativo de metabolitos secundarios mediante cromatografía en capa fina (TLC)

En las cromatografías con extractos tanto de raíces transformadas como de tejido normal de 10 cactáceas se comprobó la presencia de metabolitos secundarios donde se obtuvieron resultados diferentes tanto al ser visualizadas en UV a 365nm, como al revelarse con el reactivo de Dragendorff y de Marquis, para el caso de este último los resultados se observaron en UV.

Al observarlas después de correr las placas en UV se detectan diferentes fracciones y colores, como rojizo, amarillo y azul en todas las especies probadas lo cual indica que pertenecen a diferentes metabolitos (Figura 30), donde algunos de los cuales son similares cualitativamente entre los extractos de raíces transformadas y tejido normal. Sin embargo, algunas bandas que se observan en el extracto de tejido normal no se ven en las raíces transformadas y viceversa.

Para el caso de las placas reveladas con el reactivo de Dragendorff ocho especies mostraron patrones de bandeo de color naranja a amarillo que muestran ser de distintos metabolitos secundarios que los observados en UV (Figura 31), se observan fracciones cualitativamente similares entre los extractos de raíces transformadas y las plantas completas sin transformar, pero al igual que en las placas expuestas a UV sólo se observó una fracción en el extracto de raíces transformadas de *Coryphantha durangensis*.

En cuanto a las placas reveladas con el reactivo de Marquis se obtuvieron fracciones en cinco especies tanto naranjas, amarillo brillante y algunas oscuras (Figura 32). En la especie *Coryphantha macromeris* sólo había una fracción del tejido normal.

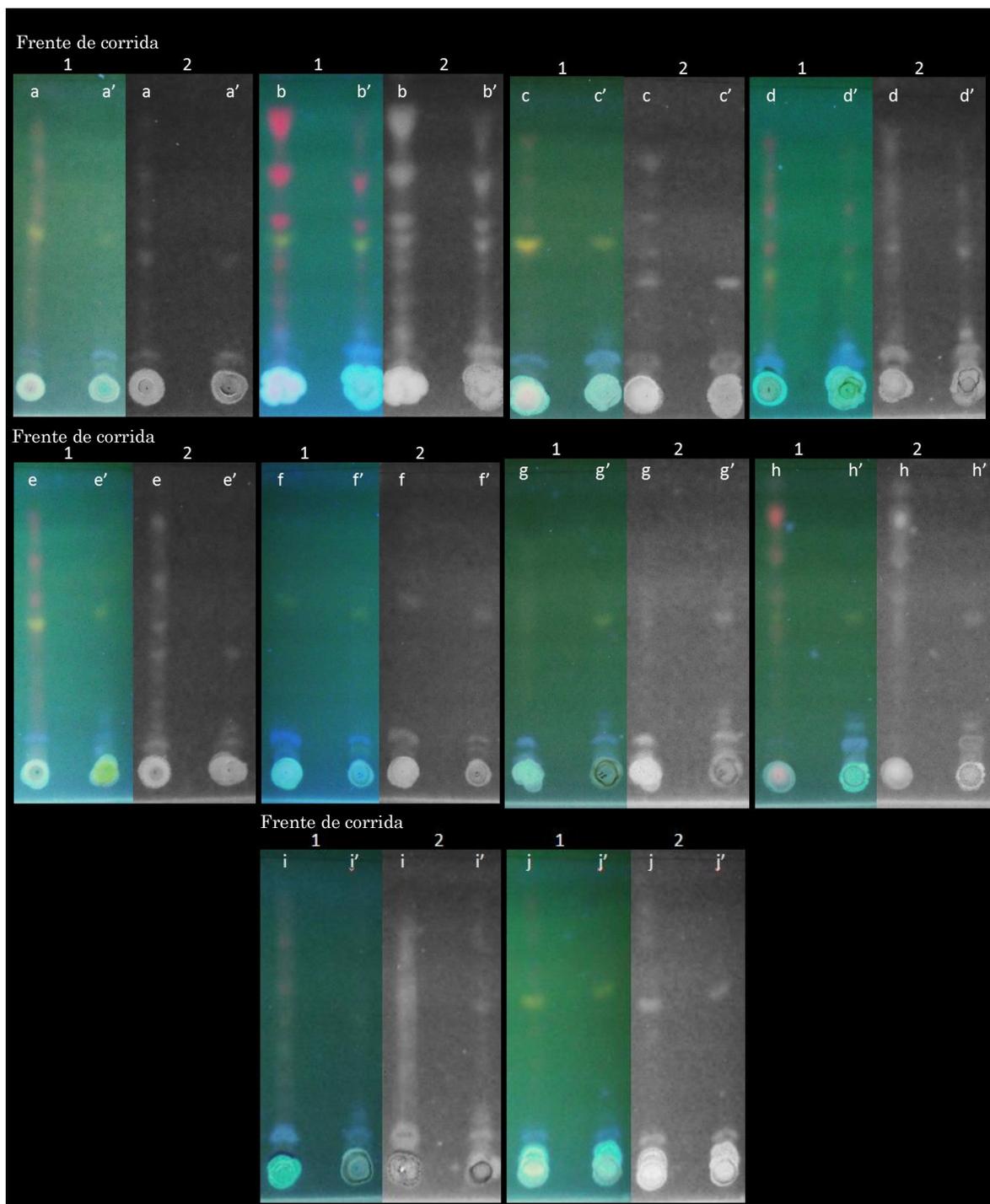


Figura 30. Cromatogramas de raíces transformadas y tejido normal expuestas en UV a 365 nm. Imágenes: a y a') *Echinocereus schmollii*; b y b') *Mammillaria bocasana* var *bocasana*; c y c') *M. hutchisoniana* subsp. *louisae*; d y d') *M. sphacelata* var *sphacelata*; e y e') *Myrtillocactus schenckii*; f y f') *Browningia candelaris*; g y g') *Coryphantha clavata*; h y h') *C. durangensis*; i y i') *C. macromeris*; j y j') tejido calloso de *E. knippelianus* (*E. knippelianus* var *kruegeri*). Nota: las letras con apostrofe son raíces transformadas y sin apostrofe es tejido normal. 1= Foto original; 2 = Foto en blanco y negro para detallar las fracciones.

Frente de corrida

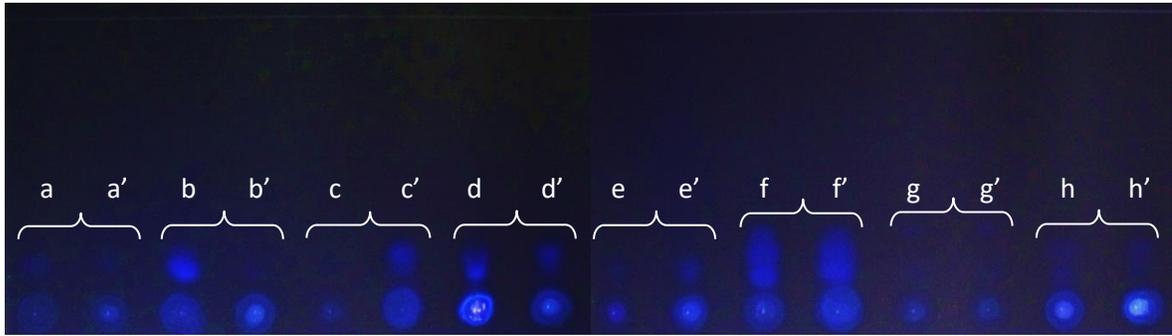


Figura 31. Cromatogramas de raíces transformadas y tejido normal reveladas con reactivo de Dragendorff. Imágenes: a y a') *Browningia candelaris*; b y b') *Coryphantha clavata*; c y c') *C. durangensis*; d y d') *C. macromeris*; e y e') *Echinocereus schmollii*; f y f') *Mammillaria bocasana* var *bocasana*; g y g') *Mammillaria hutchisoniana* subsp. *louisae*; y h y h') *Mammillaria sphacelata* var *sphacelata*. Nota: las letras con apostrofe son raíces transformadas y sin apostrofe es tejido normal. Se invirtieron los colores de las fotografías para contrastar las fracciones.

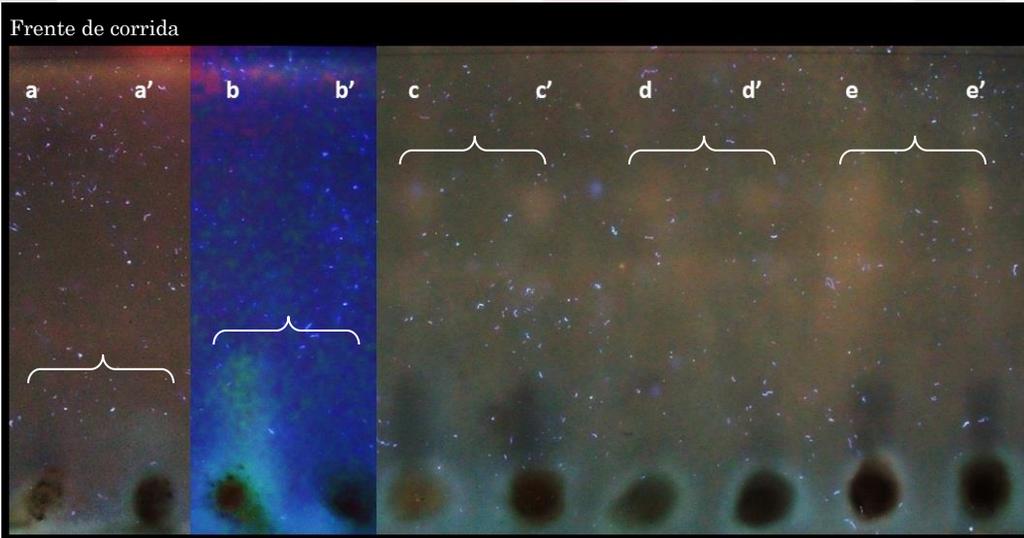


Figura 32. Cromatogramas de raíces transformadas y tejido normal reveladas con reactivo de Marquis expuestas en UV. Imágenes: a y a') *Coryphantha clavata*; b y b') *C. macromeris*; c y c') *Mammillaria bocasana* var *bocasana*; d y d') *M. hutchisoniana* subsp. *louisae*; e y e') *M. sphacelata* var *sphacelata*. Nota: las letras con apostrofe son raíces transformadas y sin apostrofe es tejido normal.

5.8 Cultivo masivo de raíces transformadas

Después de haberse cultivado las raíces presuntamente transformadas en los diferentes sistemas de cultivo, las raíces de ciertas especies continuaron creciendo y manteniéndose en medio de selección semisólido por ejemplo en las especies *Coryphantha durangensis*, *C. macromeris*, *Mammillaria bocasana* var *bocasana*, *M. sphacelata* var *sphacelata* se logró el cultivo masivo (Figura 32); y en las especies *Browningia candelaris*, *Coryphantha clavata*, *Echinocereus knippelianus* (*E. knippelianus* var *kruegeri*), *Echinocereus schmollii*, *Mammillaria carmenae* y *Myrtillocactus schenckii* se consiguió mantener y que continuaran generando raíces aunque en menor medida que las especies anteriores.

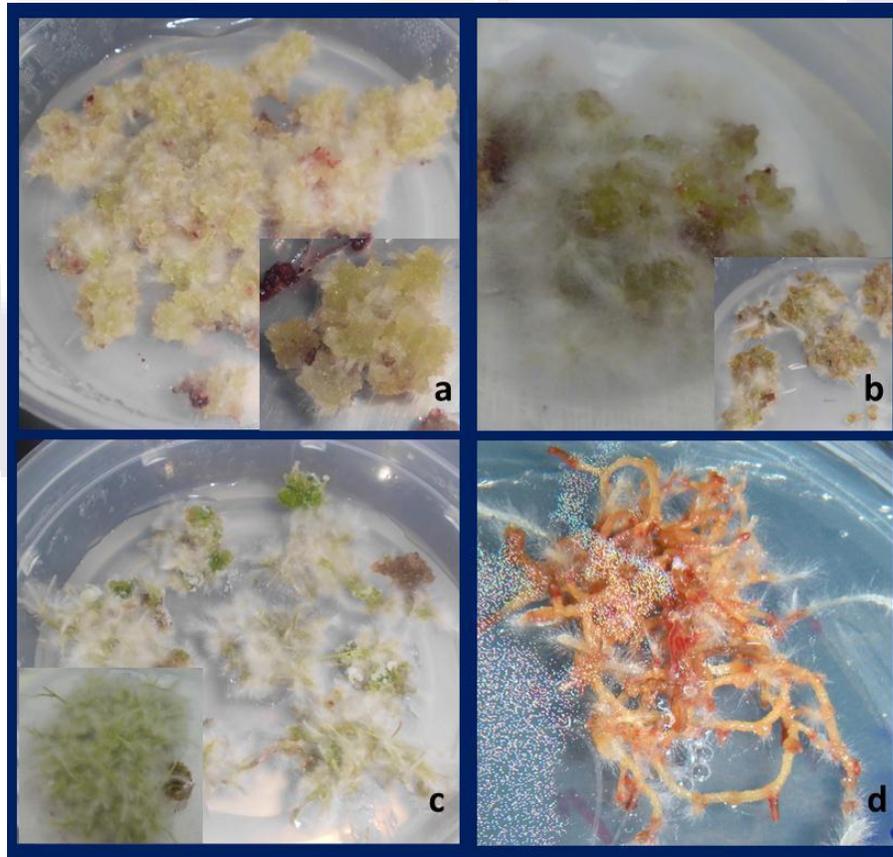


Figura 33. Crecimiento masivo de raíces inducidas con *A. rhizogenes*. Raíces de cactáceas cultivadas en medio de selección después de resembrarse cada 2 meses por aproximadamente 12 meses. Imágenes: a) *Coryphantha durangensis*; b) *Mammillaria sphacelata* var *sphacelata*; c) *Mammillaria bocasana* var *bocasana*; y d) *Coryphantha macromeris*.

6. Discusión

En el presente trabajo se indujo la producción de raíces transformadas en 56 especies de cactáceas mexicanas, en el híbrido *Epicatus* y en 3 especies sudamericanas, de 21 géneros diferentes, obteniéndose una respuesta positiva en el 85% de estas, es decir en 51 especies, de la cuales el 60% presentaron 5 o más explantes con raíces, 13.7% con 10 o más, y el 17.6% con 15 o más explantes con raíces. De las especies que generaron raíces el 31.4% presentaron 5 o más raíces por explante y el 11.8% presentaron más de 10. Todos los géneros fueron susceptibles a la infección con *A. rhizogenes*; en cuanto a el híbrido *Epicatus* la susceptibilidad fue negativa. El primer reporte acerca de la posibilidad de producir raíces transformadas en cactáceas fue hecho por Porter (1991), quien probó en seis especies, donde se encontraron resultados negativos, concluyendo que las cactáceas no eran susceptibles a la infección con *Agrobacterium rhizogenes*. Sin embargo, González *et al.* (2006) reportó generación de raíces en 53 especies de cactáceas que fueron inducidas a la transformación con *A. rhizogenes*.

Se infectaron 33 especies con *A. rhizogenes* A4 por primera vez en el presente estudio, las cuales pertenecen a los géneros ya analizados por González *et al.* (2006) y a los géneros *Browningia*, *Echinofossulocactus*, *Echinomastus*, *Frailea*, *Hylocereus*, *Isolatocereus*, *Matucana*, *Myrtillocactus*, *Polaskia*, *Selenicereus* y el híbrido *Epicatus*, estos últimos no se habían probado anteriormente. Comparando los resultados, de las especies que ya habían sido probadas con *A. rhizogenes* A4 con los obtenidos en este trabajo, estos fueron similares en 17 especies de 27, siendo en ambas ocasiones susceptibles. Pero en siete especies se encontraron resultados diferentes, donde en tres que habían sido positivas en el presente estudio no resultó de esta manera, y por el contrario en cuatro especies que hubo respuesta negativa en

esta ocasión se obtuvo susceptibilidad positiva. Lo anterior se puede deber a que se usaron diferentes sustancias para eliminar a la bacteria, a la susceptibilidad de cada célula a la transformación con *A. rhizogenes*, y a los diferentes factores que determinan el éxito de la transformación. Solamente en una especie no se tomaron resultados debido a que la planta madre se encontraba contaminada pero ya había el reporte de que es susceptible.

La generación de raíces transformadas nos permiten obtener metabolitos importantes para la sociedad sin alterar la biodiversidad de las plantas utilizadas, ya que se les induce la transformación a plantas que se encuentran cultivadas *in vitro*, en este caso particular la cactáceas fueron obtenidas del banco de germoplasma del laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Por otro lado, una vez que se obtienen las raíces transgénicas se pueden obtener los metabolitos secundarios a partir de estas raíces, en vez de extraer plantas de su medio natural.

De las 60 especies que se seleccionaron, 52 se encuentran en el Apéndice II del CITES, que son especies que no están necesariamente amenazadas de extinción pero que podrían llegar a estarlo a menos que se controle estrictamente su comercio (CITES, 2011). Además 3 especies se encuentran en el Apéndice I, que incluyen las especies sobre las que se cierne el mayor grado de peligro entre las especies de fauna y de flora incluidas en los Apéndices de la CITES (CITES, 2011). De las 51 especies que generaron raíces 46 especies se encuentran en el Apéndice II del CITES, y 3 especies, que desarrollaron raíces, se encuentran en el Apéndice I del CITES.

Al realizarse la inoculación, primeramente se obtuvieron los explantes los cuales fueron puestos en medio líquido con antioxidantes, tanto ácido cítrico como el ácido ascórbico, los cuales disminuyeron la oxidación, pero aun así hubo

oxidación en mayor o menor medida en todas de las especies, el cual se presenta por la generación de compuestos fenólicos y nitrogenados (Trease y Evans, 1984) después de ser heridas las plantas, este proceso de oxidación probablemente inhibe la transformación (González *et al.*, 2006).

Para la preparación del medio de selección se uso kanamicina (50 mg/L), debido a que se utilizó el gen *nptII* (neomicina fosfotransferasa II) como agente selectivo, el cual codifica proteínas que participan en la reacción de transposición que inactiva por fosforilación aminoglucósidos tales como la kanamicina, la neomicina, geneticina y paromomicina (Berg *et al.*, 1975), por lo que es una manera de discriminar a las raíces transformadas de las no transformadas. Al inicio algunas raíces que se generaron incluso antes de pasarse al medio de selección después de poco tiempo detuvieron su crecimiento y los explantes dejaron de generar raíces, esto pudo ser debido a que los explantes de algunas especies tienen la capacidad de generar raíces *in vitro* sin necesidad de enraizadores ni de estar transformados, por lo que al estar por varios días en presencia de kanamicina las raíces dejaron de crecer hasta necrosarse, sin embargo no se afirma que las raíces que se generaron y se mantuvieron durante los dos meses que se tomaron los resultados estén transformados genéticamente, ya que como indica González *et al.* (2006) el desarrollo de la raíz en los explantes, no implica que dicha raíz o explante contenga los transgenes, ya que se pueden presentar “escapes” y traducirse en resistencias a el medio de selección con kanamicina, por lo cual se realizaron otras pruebas para comprobar que realmente las raíces obtenidas estuvieran transformadas. Asimismo como se mencionó en la metodología sólo se tomaron en cuenta las raíces generadas después de dos meses de que se generó la primer raíz, ya que aunque algunos explantes empezaron a generar raíces después, esto pudo ser debido al agotamiento o la inactivación de la

kanamicina. Se pudo comprobar debido a que se sembraron estos explantes, pero sin tomar resultados, y ya no continuaron creciendo.

Asimismo en el medio de selección se agregó Claforán, esto para eliminar la bacteria, sin embargo, en estudios previos donde se uso el Claforán (cefotaxime) se obtuvieron resultados insatisfactorios, debido a que fue tóxico para las células de cactus y causó una alta mortalidad entre explantes (González *et al.*, 2006), lo cual también se observó en el presente estudio, ya que las raíces que estaban en contacto con el medio cuando era pequeñas ya no crecían y se necrosaban, y las raíces que alcanzaron un mayor tamaño por no estar en contacto directo en el medio de selección crecían normalmente, al sembrarse a lo dos meses y ponerse el lado del explante con raíces que si habían crecido en contacto con el medio continuaron creciendo y sólo las raíces pequeñas dejaron de crecer y no se generaron raíces nuevas en esta parte. Por tal motivo, en el estudio antes mencionado se usó el PPM para eliminar la bacteria, el cual tiene la característica de no afectar el desarrollo de las plantas, sobre todo de aquellas que son muy sensibles al uso de antibióticos, además de que su valor económicos es menor al de varios antibiótico (Blanco *et al.*, 2003). En lo referente a las cactáceas, el uso de PPM fue un factor que favoreció la aparición y el crecimiento de raíces transformadas (González *et al.*, 2006). No obstante, a pesar de tener esta información no se utilizó el PPM debido a que ya no se distribuye en el país.

Los explantes a los que se les indujo la transformación comenzaron a generar raíces entre 15 y 30 días después de que se pusieron en el medio de selección, concordando con González *et al.* (2006) que observó que el desarrollo de raíces en medio selectivo con kanamicina se presentó en los primeros 15 a 30 días (Georgiev *et al.*, 2007).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Varias especies presentaron una gran cantidad de ramificaciones, en las raíces adventicias generadas, como se indica en el Cuadro 4, donde el 20% de las especies que generaron raíces presentaron una gran cantidad de ramificaciones y el 27% mostraron algunos explantes con ramificaciones. Además estas y otras especies mostraron pelos radicales y raíces horizontales (plagiotrópicas), que son características de las raíces transformadas con *A. rhizogenes* las cuales exhiben crecimiento de raíces plagiotrópicas, un alto grado de ramificaciones laterales, profusión de los pelos de la raíz, y tasas de mayor crecimiento (Tepfer, 1989; Georgiev *et al.*, 2007). En cuanto a los pelos radicales se observaban en la mayoría de las especies, en algunos en la mayor parte de las raíces y ramificaciones y en otros a la mitad de la raíz o cerca del meristemo radicular, este fenotipo es causado por la expresión de los genes *rol* (Tepfer, 1990).

Las curvas de crecimiento indican que conforme pasaba el tiempo aumentaba la longitud, esto en 45 especies, además de que el mayor crecimiento se dio dentro de los primeros 30 días, esto después de haberse sembrado de forma individual en el medio de selección. No obstante, las respuestas fueron diferentes, ya que como se mencionó 45 especies siguieron creciendo pero las 6 especies restantes ya no continuaron creciendo, de las especies que crecieron algunas presentaron un crecimiento hasta aproximadamente los 40 días donde se visualiza en las curvas de crecimiento una meseta, pudiendo ser porque dejaban de crecer entrando al parecer en latencia, o porque fue más lento su crecimiento, en cambio otras especies presentaron un crecimiento exponencial. Sin embargo, al sembrarse los explantes, muchas de las raíces que ya no crecían continuaron creciendo. Igualmente, se observaron varias diferencias entre los mismos géneros, por ejemplo *Coryphantha*, *Mammillaria* y *Peniocereus* presentaron especies que generaron raíces y otras que no, por otro lado, en el género *Echinocereus* donde

se probaron 10 especies, todas generaron al menos una raíz presuntamente transformada, González *et al.* (2006) sugiere que hay géneros más susceptibles a la transformación con la cepa A4. Además hubo muchas diferencias en el porcentaje de explantes que generaron raíces, en el porcentaje de raíces exhibidas así como en el crecimiento en longitud, esto entre los diferentes géneros, entre especies del mismo género, pero también entre los mismo explantes de la misma especie. No se pueden explicar estas diferencias, debido a que había explantes que provenían de la misma planta y se sometieron a las mismas condiciones de incubación y de medio. Esto puede ser debido a que cada célula que compone el 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 (González *et al.*, 2006) además de que el éxito de la transformación del tejido y la inducción de la raíz depende de varios factores como lo son las especies, edad y tipo de tejido vegetal (Sevon y Oksman, 2002), como ocurrió en *Coryphantha clavata* con 16.2 raíces por explante, pero con una desviación estándar de 12.49; *Mammillaria hutchisoniana* subsp. *louisae* con el mayor número de explantes que generaron raíces; y *Browningia candelaris* con el mejor crecimiento en cuanto a longitud. Se observa en el Cuadro 3 que los resultados de longitud y de número de raíces presentaron desviaciones estándar altas por la gran diferencia que hay entre explantes de la misma especie.

En lo referente al sistema de cultivo *in vitro* en medio líquido con y sin agitación, en las curvas de crecimiento se ve que algunas especies en vez de aumentar de peso lo redujeron, a pesar de que todas desarrollaron raíces nuevas excepto *Isolatocereus dumortieri* (*Stenocereus dumortieri*), aunque si se ramificaron ciertos explantes, en medio líquido sin agitación. Esto nos dice que a pesar de generar raíces, el incremento no se representó en la biomasa, lo cual podría ser por varios factores que se observaron al probar estos sistemas

de cultivo, como la absorción de agua, ablandamiento, desprendimiento de raíces, espinas y areolas, así como raíces débiles y quebradizas por el mismo ablandamiento, además los explantes con tejido calloso se deshacían al ponerlos en el medio líquido. Otra desventaja es que tienden a contaminarse tanto por levaduras como por hongos, por tal razón se perdió mucho material vegetal. A pesar de estas complicaciones se observó que hubo generación de raíces nuevas (mayormente en el medio líquido), crecimiento de raíces y ramificaciones (estos dos últimos especialmente en el medio líquido con agitación).

La especie *Browningia candelaris* en el sistema de inmersión temporal (RITA®) comenzó su crecimiento desde el segundo día, finalmente presentó 15 raíces con una gran longitud (esto se observó de forma cualitativa, por no poderse medir al estar rotas sus raíces), con muchas ramificaciones y engrosamiento de las raíces (contrastándolo con lo obtenido en el medio semisólido). Un explante de *Myrtillocactus schenckii* también se colocó en este sistema pero en este hubo generación de raíces a los trece días, por último tuvo un total de 16 raíces gruesas, pero varias eran muy pequeñas, pudiendo ser que para esta especie se necesite un tiempo de inmersión diferente, ya que como se ha señalado cada especie responde diferente a cada tratamiento como en los sistemas de cultivo anteriores. Los resultados obtenidos se compararon con el método convencional mediante una curva de crecimiento relativo, donde su crecimiento fue muy similar, no obstante este sistema sólo se probó en un explante de dos especies diferentes, en comparación con el cultivo semisólido en oscuridad donde se tomaron en cuenta los 14 explantes en *B. candelaris* y 12 en *M. schenckii* que generaron raíces (en la primera transformación). Asimismo el mayor número de raíces en medio semisólido también fue de 15 en dos explantes de *B. candelaris* y uno de 16 en *M. schenckii*. Se recomienda probar este sistema con más explantes o en otro tipo de biorreactores, con diferentes

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tiempos y frecuencias de inmersión, y condiciones como en oscuridad, debido a que en este estudio sólo se trató en dos especies por no tener suficiente material, esto es importante debido a que las raíces son una gran fuente de fitoquímicos (González *et al.*, 2006) ya se han reportado varios tipos de biorreactores que han sido usados exitosamente para el cultivo de raíces transformadas, como: tanques agitados convencionales, tanques agitados con un impulsor por separado, columnas de burbujeo, reactores de lecho de niebla y reactores de tipo globo (Curtis, 2000). Se observaron desventajas en el sistema de inmersión temporal utilizado, una de ellas fue que el medio a veces no bajaba en el tiempo en que estaba programado y que las raíces se desprendían, por lo que no se pudo sacar a pesar hasta el final del ensayo para no dañar las raíces; y en la especie *B. candellaris* se presentaron otras desventajas como lo fue que las raíces atravesaban la membrana del biorreactor, y se desprendieron las raíces al sacar el explante por tal motivo no se pudieron medir.

La generación de raíces en medio de selección (con kanamicina) y el crecimiento de estas raíces al estarse resembrando en este medio, indican que las raíces generadas están transformadas, pero se realizan otros análisis, ya que como se señaló anteriormente se pueden presentar “escapes”, por lo que se realiza la prueba GUS el cual es específico para la actividad enzimática del gen β -glucoronidasa (GUS) por lo cual es una prueba contundente. Para esto se usa el gen *gus* como gen reportero debido a que este no se encuentra en forma natural en las plantas y su enzima (β -D-glucoronidasa) cataliza el rompimiento de enlaces glucosídicos por lo que en tejidos transformados la actividad de esta enzima se localiza por un color azul (Glick y Pasternak, 1998), de las 45 especies a las que se les hizo la prueba GUS el 93.33% (42 especies de 16 géneros) presentaron una coloración azul, principalmente en la base y ápice de la raíz principal, en ramificaciones y en el sistema vascular, es decir mostraron actividad GUS y por lo tanto indica que se inserto el fragmento del plásmido al

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

haber hecho la inducción de la transformación. En las especies en las que fue negativa la prueba pero si tuvieron crecimiento en el medio con kanamicina puede ser debido a que no se transfirieron durante la infección los genes de la β -glucoronidasa. Por otra parte, también se le realizó esta prueba histoquímica a los brotes de tres especies, los cuales no tuvieron actividad GUS; y también al tejido calloso de cuatro especies donde en todas se presentó una coloración azul en la mayor parte del tejido, lo cual concuerda con González *et al.* (2006) que al analizar el tejido callos de tres especies también tuvieron actividad GUS.

Otra prueba, para detectar que la transformación genética fue exitosa, es usando tanto la reacción de la cadena polimerasa (PCR) o hibridaciones Southern blot (Georgiev *et al.*, 2007), en este estudio se realizó la PCR para detectar la presencia de los genes *rol B*, que es absolutamente esencial para la inducción de la raíz pilosa (Nilsson y Olsson, 1997); el gen *Vir D*, el cual supuestamente se eliminó ya que se encuentra en el plásmido de la bacteria que no se transfiere por lo que no debe de estar presente este gen al momento de realizar la PCR de las raíces; también se detecta el gen *nptII* y el gen *gus*. Donde en siete especies se encontró al menos uno de los genes de interés sin la presencia del gen *Vir D*, en 10 especies se encontró el gen *Vir D* más uno o dos de los genes de interés, y en 4 especies se encontraron todos los genes (Cuadro 6), el tamaño de las bandas obtenidas de los genes examinados coinciden con el esperado que se muestra en el Cuadro 2. En lo referente a la presencia del gen *Vir D*, esto indicaría que si se encuentra en la raíz no esta transformada y que lo que encontramos es a la bacteria la cual no confirió el fragmento de ADN con los genes de interés; pero también puede ser que sea un falso negativo, esto ocurre debido a que no es muy fácil eliminar la bacteria, pudiendo ser que se encuentre esta todavía pero que si se hayan insertado los genes de interés al explante que se le indujo la transformación. Por otro lado una de las especies sólo amplificó el gen *Vir D* lo cual podría significar que los otros genes se

insertaron pero a otra parte del tejido. No obstante, todas las especies probadas excepto una fueron positivas a la prueba GUS. En cuanto a las especies en las que la amplificaron fue negativa puede ser debido a que las cactáceas contienen metabolitos secundarios que podrían inhibir la amplificación catalizada por la *Taq* polimerasa (Porebski *et al.* 1997). De tal manera que se comprobó que la transformación genética de las raíces obtenidas fue exitosa además de la amplificación del gen *nptII*, *rol B* o del gen *gus*, también la generación y el crecimiento de las raíces en presencia de kanamicina, y el resultado positivo al ensayo GUS.

De las especies que se eligieron para este trabajo, se tiene conocimiento que la especie *Isolatocereus dumortieri* contiene triterpenos con actividad antitumoral y antinociceptivos (Kinoshita *et al.*, 2000), y también de que *Carnegiea gigantea*, *Cephalocereus senilis*, *Coryphantha durangensis*, *C. elephantidens*, *C. macromeris*, *C. radians*, *Echinocereus enneacanthus*, *Mammillaria senilis*, *Matucana madisoniorum*, *Melocactus curvispinus*, *Myrtillocactus geometrizans*, *Pachycereus pringlei* y *Peniocereus greggii* contienen compuestos enteógenos importantes en la medicina (Berger, 2003), de estos sólo se realizó extracción de *Coryphantha durangensis* y *C. macromeris*, debido a que no se contaba con material vegetal o por no tener suficiente de este para su análisis, aunque cuatro de las especies usadas en el estudio pertenecen a los géneros ya reportados.

El análisis de metabolitos secundarios se realizó de manera cualitativa mediante cromatografías en capa fina (TLC) la cual se desarrolló en la oscuridad con un sistema de solventes de tolueno-acetato de etileno-dietilamina (70:20:10) el cual sirve para detectar los principales alcaloides de la mayoría de los medicamentos, se usaron extractos de raíces transformadas de 10 cactáceas (sólo en una especie era tejido calloso que fue positivo a la prueba GUS) donde en todas se observaron metabolitos secundarios al observarse las placas en luz

UV a 365 nm donde se vieron varias fracciones y de diferentes colores (rojizo, amarillo y azul), lo cual indica que no se afecta la síntesis de metabolitos por el proceso de transformación. En las especies *Mammillaria bocasana* var *bocasana*, *M. sphacelata* var *sphacelata*, *Browningia candelaris* y *Echinocereus knippelianus* (*E. knippelianus* var *kruegeri*) se observaron que las fracciones eluyeron a la misma distancia pero se observaban con diferentes intensidades, en el resto al menos una de las fracciones se encontraba a la misma distancia, según Flores *et al.* (1987) se ha observado que raíces generadas a partir del sistema Ri ADN-T son capaces de producir los mismos niveles del alcaloide que las plantas no transformadas, con la ventaja de una mayor tasa de crecimiento de las raíces, pero también se observó que había patrones que sólo se observaba en el extracto del tejido normal de la planta completa de las cuales 5 se obtuvieron del invernadero y 5 del banco de germoplasma.

En las placas que se revelaron con el reactivo de Dragendorff se exhibieron metabolitos secundarios tipo alcaloide en ocho especies de las diez analizadas, sin embargo en *Coryphantha durangensis* sólo hubo fracciones en el extracto de sus raíces transformadas, se puede resaltar que esta especie presentó metabolitos secundarios tanto al revelarse con este reactivo como al visualizarla en UV a 365nm, y como ya se menciona anteriormente esta especie contiene compuestos enteógenos importantes (Berger, 2003), lo cual nos podría indicar que los patrones observados pertenecen a este tipo de compuestos. En el resto de las especies se presentaron las fracciones a la misma distancia, aunque la intensidad se visualiza diferente entre extractos en algunas especies, pudiendo ser que sea el mismo compuesto.

Las placas que se revelaron con el reactivo de Marquis se obtuvieron resultados en solamente cinco especies donde en las especies *Mammillaria bocasana* var *bocasana*, *M. hutchisoniana* subsp. *louisae* y *M. sphacelata* var *sphacelata* los patrones de bandeo fueron muy similares, en *Coryphantha*

clavata ambos extractos tuvieron un patrón de bandeo a la misma altura pero se refleja un color diferente al visualizarse en UV, por último *C. macromeris* sólo se ve un patrón en el tejido normal, en lo que respecta a esta última especie se obtuvieron resultados en los tres cromatogramas y se tiene reporte de que esta planta se utiliza en el norte de México con fines médicos por contener compuestos enteógenos como la macromerina, así como sustancias que tomadas de forma oral no son efectivas, hordenina, normacromerina y otras fenetilaminas y metiltiraminas, pero para obtener un poco de estas sustancias se necesitan varios ejemplares (Berger, 2003).

Tanto *Coryphantha clavata*, *C. macromeris*, *Mammillaria bocasana* var *bocasana*, *Mammillaria hutchisoniana* subsp. *louisae* y *Mammillaria sphaelata* var *sphaelata* mostraron patrones de bandeo en UV a 365 nm, igualmente al reverse tanto con el reactivo de Dragendorff como con el de Marquis.

En algunas de las especies probadas se logró mantener las raíces por un largo tiempo y hasta un crecimiento masivo en cuatro especies (*Coryphantha durangensis*, *Mammillaria sphaelata* var *sphaelata*, *Mammillaria bocasana* var *bocasana* y *Coryphantha macromeris*), esto al continuarse resembrado las raíces cada dos meses, pero como se mencionó anteriormente se perdió mucho tejido vegetal en los medio líquidos con y sin agitación, por lo que esto se pudo haber presentado en un mayor cantidad de especies por lo que hay que continuarse probando otros sistemas de cultivo y principalmente los biorreactores que fueron los que tuvieron un mejor crecimiento aparte del cultivo en medio semisólido, pudiendo ser diferentes tipos de biorreactores como los mencionados anteriormente o mediante el diseño de uno para que no sea tan costoso y poder tener varios para así probar muchos explantes de diferentes especies.

Este estudio contribuye al conocimiento de cuales especies de cactáceas son susceptibles a la inducción de raíces transformadas por *A. rhizogenes*, sobre todo las que no se habían probado anteriormente, así como la respuesta de estas especies como lo es la generación y crecimiento de raíces y callo, relativamente en poco tiempo, en presencia de kanamicina, y los resultados positivos a las pruebas GUS y a la PCR que nos señalan que son raíces transformadas, lo cual nos permitiría obtener metabolitos secundarios de interés, como se demostró al llevarse a cabo las cromatografías, sin dañar a las especies del medio natural y sin tener que esperar demasiado tiempo ya que como se ha mencionado estas especies son de muy lento crecimiento y sobre todo que la mayoría de las especies de esta familia se encuentran en peligro de extinción. Por esto se recomienda continuar con el estudio de estas raíces y sus compuestos con otras técnicas como lo son los análisis instrumentales para cuantificar, identificar, aislar y purificar estos metabolitos que podrían ser importantes para la industria alimentaria y farmacéutica.

7. Conclusión

La evaluación de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* en raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* en varias especies de cactáceas se evaluó de manera exitosa en 16 especies mostrando que cada una responde diferente a cada tratamiento, sin embargo el método mas efectivo fue el medio semisólido según lo obtenido en las curvas de crecimiento relativo.

En este trabajo se reporta por primera vez la susceptibilidad de once géneros más el híbrido *Epicatus* a la transformación con *A. rhizogenes*.

De las 60 especies tratadas con *A. rhizogenes* A4 el 85% generaron raíces en medio de selección con Kanamicina; el híbrido *Epicatus* tuvo resultado negativo. La especie con mayor cantidad de raíces por explante fue *Coryphantha clavata*, el mayor número de explantes lo presentó la especie *Mammillaria hutchisoniana* subsp. *louisae* y *Browningia candelaris* mostró el mayor crecimiento en longitud, pero en general estas respuestas fueron muy variadas entre géneros, especies y entre los explantes de las mismas especies.

De acuerdo a las curvas de crecimiento basadas en la biomasa, se obtuvo muy poco crecimiento en el sistema de cultivo en medio líquido con y sin agitación, comparado con el método convencional, por lo que se recomienda medir su crecimiento por otro método.

En lo referente al sistema de inmersión temporal (RITA®) se obtuvo un buen crecimiento desde los primeros días; con una gran cantidad de ramificaciones y alargamiento de raíces en una de las especies, asimismo para ambas especies analizadas se obtuvo una gran generación de raíces y engrosamiento de las mismas.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

El análisis comparativo de la generación de raíces en los diferentes tratamientos reveló que el uso de un sistema de cultivo con este propósito es específico para cada especie.

De 45 especies de las que se contaba con material, el 93.33% revelaron ser positivas a la prueba GUS y siete de 25 especies probadas fueron positivas a la PCR.

En la cromatografía en capa fina de los extractos obtenidos, de raíces transformadas generadas *in vitro* y de tejido normal, mostraron fracciones similares en algunos casos pero también hubieron diferencias en algunas donde sólo se encontraban en tejido normal o solamente en raíces transformadas por lo que la transformación para el caso de las especies analizadas podría afectar el proceso de síntesis de metabolitos secundarios o ser distintas por estar expuestas a diferentes condiciones y tipos de estrés. Por tal motivo se recomienda analizar los metabolitos secundarios de ambos tejidos de una manera cuantitativa y caracterizarlos. Sin embargo según lo obtenido en este análisis las raíces transformadas permitirían obtener metabolitos importantes para la sociedad sin alterar su biodiversidad.

Se logró mantener y cultivar raíces transformadas de diez especies al resembrarlas cada dos meses en medio de selección semisólido.

8. Glosario

Absorbancia

Cuando un haz de luz incide sobre un cuerpo traslúcido, una parte de esta luz es absorbida por el cuerpo, y el haz de luz restante atraviesa dicho cuerpo. A mayor cantidad de luz absorbida, mayor será la absorbancia del cuerpo, y menor cantidad de luz será transmitida por dicho cuerpo.

Acetosiringona

Compuesto fenólico que liberan los tejidos vegetales como respuesta a heridas. Inductor de la localización de los genes *vir*.

Areola

Yema lateral o axilar muy especializada, o un brote o rama pequeño.

Agrobacterium rhizogenes

Es una bacteria del suelo gram negativa que tiene forma de vara o bacilo perteneciente a la familia Rhizobiaceae.

Agropina

Tipo de opina que controlan la biosíntesis de opinas y auxinas.

Alcaloides

Metabolitos secundarios de las plantas sintetizados a partir de aminoácidos, que tienen en común su hidrosolubilidad a pH ácido y su solubilidad en solventes orgánicos a pH alcalino. Son nitrogenados y tienen efectos psicoactivos.

Antioxidantes

Molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.

Auxina

Grupo de fitohormonas que funcionan como reguladoras de crecimiento vegetal, esencialmente provocan la elongación de las células.

Biobalística

Procedimiento mediante el cual se introduce el ADN en las células por medio de partículas microscópicas (micropartículas) aceleradas a velocidades supersónicas, que atraviesan la pared y la membrana celular.

Biorreactor

Recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo. El cual puede ser un dispositivo o sistema empleado para hacer crecer células o tejidos en operaciones de cultivo celular. En términos generales, un biorreactor busca mantener ciertas condiciones ambientales propicias para el organismo o sustancia química que se cultiva.

Brote

Renuevo de una planta.

Cactácea

Familia de plantas suculentas y, en su gran mayoría, espinosas, conocidas en conjunto como cactus.

Callo

Es una masa de células no diferenciadas. En las plantas las células del callo son aquéllas que cubren una herida.

Campana de extracción de gases

Gabinetes que permiten el manejo de productos químicos que emiten vapores potencialmente peligrosos aislándolos del ambiente general reduciendo al mínimo la exposición e impidiendo que provoquen intoxicaciones por inhalación.

Campana de flujo laminar

Recinto que permite controlar la contaminación microbiológica en el aire mediante dos procedimientos simultáneos. Uno la introducción de aire estéril por medio de filtros absolutos HEPA o ULPA ya que éstos retienen partículas desde 0.1 micras en adelante y el segundo procedimiento es introducir esa

masa de aire ultrafiltrado en un ambiente confinado a velocidades muy bajas en una sola dirección evitando contaminación exterior.

Cepa bacteriana

Conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos, una característica.

Claforán

Antibiótico cefalosporínico de amplio espectro.

Cocultivo celular

Procedimiento mediante el cual las células, ya sean células procariotas o eucariotas, pueden cultivarse en condiciones controladas.

Cromatografía en capa fina

Tipo de cromatografía donde la fase estacionaria es una capa delgada de un material depositado sobre un soporte, a este conjunto se le llama placa. La fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes, llamada eluyente, que se mueve por la fase estacionaria por capilaridad.

Cultivo *in vitro*

Método de propagación de plantas en condiciones estériles y con instalaciones especiales.

Electroporación

Es un significativo aumento de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular causado por un campo eléctrico aplicado externamente.

Enteógeno

Sustancia vegetal o preparado de sustancias vegetales, con propiedades psicotrópicas, que cuando se ingiere provoca un estado modificado de conciencia.

Explante

Tejido vivo separado de su órgano propio y transferido para su crecimiento a un medio artificial.

Fotoperiodo

Cambios de iluminación que reciben las plantas.

Gen marcador

Genes que confieren propiedades fenotípicas a la resistencia a algún antibiótico específico, los cuales se colocan en la misma construcción genética con el gen de interés que se quiere analizar.

Gen reportero

Al igual que el gen marcador se coloca en la misma construcción genética que el gen de interés, en este caso el producto del gen reportero permite visualizar fácilmente la expresión de este.

Sistema de Inmersión temporal

Sistemas semi-automatizados en la propagación *in vitro*. Basado en el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con los explantes por un corto período de tiempo y la consecuente renovación de la atmósfera gaseosa, para evitar hiperhidricidad de los tejidos y acumulación de gases tóxicos.

Kanamicina

Antibiótico aminoglucósido, básico e hidrosoluble.

Marcos de lectura abierta

Secuencia de ADN comprendida entre un codón de inicio (AUG) de la traducción y un codón de terminación, descontando las secuencias que corresponden a los intrones en caso de haberlas.

Metabolitos secundarios

Compuestos químicos sintetizados por las plantas con una distribución restringida que cumplen funciones no esenciales en ellas, ya que no intervienen en el metabolismo primario, pero si intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente.

Opinas

Derivados de aminoácidos que produce la planta al ser infectada con *Agrobacterium* y que son fuente de energía de la bacteria, principalmente de carbono y nitrógeno.

Oxidación

Reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante.

Reacción en cadena de la polimerasa

Técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN partiendo de un mínimo, en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN.

Planta transgénica

Plantas a las que se les ha introducido un fragmento de ADN foráneo en el genoma de sus células; cuando aquél se expresa, confiere a las plantas características nuevas que antes no poseía.

Plásmido

Moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico. Están presentes normalmente en bacterias.

Rifampicina

Antibiótico bactericida del grupo de las rifamicinas. Es un componente semisintético derivado de *Amycolatopsis rifamycinica*.

Transformación genética

Aplicación de las técnicas de ingeniería genética y de cultivos de tejidos vegetales *in vitro* para la mejora de las plantas, la investigación de procesos del desarrollo o la producción de compuestos y de respuestas a estímulos abióticos y bióticos.

Vector binario

Vectores más usados para la transformación de plantas y se encuentran en una gran variedad. Se diferencia del plásmido Ri en el tamaño, el número de sitios de restricción del ADN-T, la presencia de genes reporteros, los orígenes de replicación y el antibiótico de selección en bacterias y plantas.

 β -Glucoronidasa

Enzima que cataliza la hidrólisis de los glucuronósidos a glucuronatos y alcoholes.



9. Bibliografía

1. Anderson, E.F. 2001. The Cactus Family. Timber Press. Portland. 776 pp.
2. Andrade-Lima, D. 1981. The *caatingas dominium*. Revista Brasil. Bot. 4: 149-163
3. Arias, S. 1993. Cactáceas: conservación diversidad en México. Rev. Soc. Mex. Historia Natural. 44: 109-115
4. Azcón-Biesto, J. y Talón, M. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. 1ª ed. McGraw-Hill/Interamericana. Madrid. pp 12-213
5. Berg, D.E., Davies J., B. Allet y Rochaix, J.D. 1975. Transposition of R factor genes to bacteriophage lambda. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72: 3628-3632
6. Berger, M. 2003. Cactus enteógenos. Cañamo ediciones. Barcelona. 229 pp
7. Blanco, M., Valverde, R. y L. Gómez. 2003. Optimización de la Transformación Genética con *Agrobacterium rhizogenes*. Agronomía Costarricense. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 27(001): 19-28
8. Bravo-Hollis, H. y Sánchez-Mejorada, H. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp 1-148
9. Bravo-Hollis, H. y Sánchez-Mejorada, H. 1991. Las Cactáceas de México. Vol. III. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp 501-535
10. Bravo-Hollis, H. y Sánchez-Mejorada, H. 1995. El Interesante Mundo de las Cactáceas. Fondo de Cultura Económica. México. pp 9-203
11. Cadiz, N.M., J.M. Vivanco y Flores, H.E. 2000. Coculture of *Pachyrhizus erosus* (L.) hairy roots with Rhizobium spp. In Vitro Cell. 36: 238-242
12. Christey, M.C. 2001. Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. In Vitro Cell. 37: 687-700
13. CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre). 22 de septiembre de 2011.

- Disponible en: http://www.cites.org/esp/resources/pub/checklist11/Indice_de_especies_CITES.pdf
14. Curtis, W.R. 2000. Hairy roots, bioreactor growth. In: Spier RE. Ed. Encyclopedia of cell technology. Vol 2. Wiley, New York, pp 827-841
 15. Davioud, E., Petit, A., Tate, M.E., Ryder, M.H., y J. Tempe. 1988. Cucumopine—a new T-DNA-encoded opine in hairy root and crown gall. *Phytochemistry*. 27: 2429-2433
 16. Diouf, D., Gherbi, H., Prin, Y., Franche, C., Duhoux, E., y D. Bogusz. 1995. 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
 17. Flores, H.E., Hoy, W.H. y L.J. Pickard. 1987. Secondary metabolites from root cultures. *TIBTECH*. 5:64-69
 18. Flores, H.E., Dai, Y.-R., Cuello, J. L., Maldonado-Mendoza, I. E., y V.M. Loyola-Vargas. 1993. Green roots. Photosynthesis and photoautotrophy in an underground plant organ. *Plant Physiol.* 101: 363-371
 19. Flores, H.E., Vivanco, J. M. y V. Loyola-Vargas. 1999. Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends Plant Sci.* 4: 220-226
 20. Forde, B.G. 2002. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annu Rev Plant Biol.* 53: 203-224
 21. Fuller, D. y S. Fitzgerald. 1987. Conservation and commerce of cacti and other succulents. World Wildlife Fund. Washington, D.C. 264 pp
 22. Gelvin, S.B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67: 16-37
 23. Georgiev, M.I., Pavlov A.I. y T. Bley. 2007. Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74: 1175-1185

24. Gibson, A. y P. Nobel. 1986. The cactus primer. Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts. 286 pp
25. Giri, A. y M.L. Narasu. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*. 18: 1-22
26. Glick, B. y J. Pasternak. 1998. *Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA*. 2nd ed. American Society for Microbiology. pp 427-478
27. González-Díaz, M.C., M.E. Pérez-Reyes y Pérez-Molphe-Balch, E. 2006. *In vitro* analysis of susceptibility to *Agrobacterium rhizogenes* in 65 species of Mexican cacti. *Biologia Plantarum*. 50(3): 331-337
28. Grant, J. E., Dommissé, E. M., y Conner, A. J. 1991. Gene transfer to plants using *Agrobacterium*. In: Murray, D. R., ed. *Advanced methods in plant breeding and biotechnology*. Wallingford: CAB International. pp 50-73
29. Guillon, S., Tremouillaux-Guiller, J., Pati, P.K., Rideau, M., y P. Gantet. 2006. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Curr Opin Plant Biol*. 9: 341-346
30. Hansen, H., Jorgensen, J. E., Stougaard, J., y Marcker, K. A. 1989. Hairy roots – a short cut to transgenic root nodules. *Plant Cell Rep*. 8: 12-15
31. Hansen, G., Vaubert, D., Clerot, D., Tempe, J., y J. Brevet. 1994. A new open reading frame, encoding a putative regulatory protein, in *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *C R Acad Sci III*. 317: 49-53
32. Henzi, M.X., Christey, M.C., y D.L. McNeil. 2000. Factors that influence *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. 179talic). – *Plant Cell Rep*. 19: 994-999
33. Hernández, H.M. y H. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*. 26: 33-52

34. Herrera-Estrella, L. Jofre y Garfias, A. Argüello-Astorga, G. y Simpson, J. 1997. Transformación genética de plantas. Avance y Perspectiva. Vol. 16
35. Hodges, L.D., Cuperus, J., y Ream, W. 2004. *Agrobacterium rhizogenes* GALLS protein substitutes for *Agrobacterium tumefaciens* single-stranded DNA-binding protein VirE2. J Bacteriol 186: 3065-3307
36. Hong, S.B., Hwang, I., Dessaux, Y., Guyon, P., Kim, K.S., y Farrand, S.K. 1997. A T-DNA gene required for agropine biosynthesis by transformed plants is functionally and evolutionarily related to a Ti plasmid gene required for catabolism of agropine by *Agrobacterium* strains. J Bacteriol 179: 4831-4840
37. Hunt, D. 1992. CITES cactaceae checklist. Royal Botanic Gardens, Kew. Surrey. 190 pp
38. Inomata, S., Yokoyama, M., Gozu, Y., Shimizu, T., y M. Yanagi. 1993. Growth pattern and ginsenoside production of *Agrobacterium*-transformed *Panax ginseng* roots. – Plant Cell Rep. 12: 681-686
39. Imai, T., Okazaki, S., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K. y H., Yuasa. 2006. Triterpenoid saponins from cultural plants of *Stenocereus stellatus* (Cactaceae). J Nat Med. 60: 49-53
40. Isogai, A., Fukuchi, N., Hayashi, M., Kamada, H., Harada, H., y A. Suzuki. 1990. Mikimopine, an opine in hairy roots of tobacco induced by *Agrobacterium rhizogenes*. Phytochemistry. 29: 3131-3134
41. Jarvis, C. E. 1979. Trade in cacti and other succulent plants in the United Kingdom. Cact. Succ. J. Gr. Brit. 41: 113-118
42. Joubert, P., Beaupere, D., Lelievre, P., Wadouachi, A., Sangwan, R.S., y B.S. Sangwan-Norreel. 2002. Effect of phenolic compounds on *Agrobacterium vir* genes and gene transfer induction—a plausible molecular mechanism of phenol binding protein activation. Plant Sci. 162: 733-743

43. Kim, Y.J., Wyslouzil, B.E., y P.J. Weathers. 2002. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 38:1-10
44. Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., Kondo, N., y H. Yuasa. 1992. New triterpenes from *Trichoceseus bridgesii*. *J NatProd*. 55: 953-955
45. Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., Kondo, N., y H. Yuasa. 2000. A new triterpenoid saponin from *Isolatocereus dumortieri*. *J Nat Prod*. 63: 701-703
46. Mano, Y., Nabeshima, S., Matsui, C., y H. Ohkawa. 1986. Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agric Biol Chem*. 50: 2715-2722
47. Mariotti, D., Fontana, G. S., Santini, L., y P. Costantino. 1989. Evaluation under field conditions of the morphological alterations ('hairy root phenotype') induced on *Nicotiana tabacum* by different Ri plasmid T-DNA genes. *J. Genet. Breed*. 43: 157-164
48. Meyer, A., Tempe, J., y Costantino. 2000. 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. Minnesota. Pp 93-139
49. Morales Rubio, M.E., Verde Star, J., Cárdenas, A.O., Rivas, M.C., y J.F. Treviño Neávez. 2004. Estudio fitoquímico de tallos y frutos de la pitaya agria de Baja California. *Revista Salud Pública y Nutrición (RESPYN)*. UANL. Edición Especial No. 1
50. Morales Rubio, M.E., Verde, S.M.J., Oranday, C. A., Rivas, M.C., Arévalo, N.K., Treviño, N.J.F., Carranza, R.P., y V.D., Cruz E. 2007. Actividad Biológica de *Lophocereus schottii* (Engelman) Britton and Rose. *Revista Salud Pública y Nutrición (RESPYN)*. UANL. Edición Especial. 7: 1-3
51. Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N.S., Kataoka, M., Tanaka, N., y K. Yoshida. 2001. 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
52. Nilsson, O., y O. Olsson. 1997. Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes* rol-genes in the formation of hairy roots. *Physiol Plantarum.* 100: 463-473
53. Nobel, P. 1998. Los incomparables Agaves y Cactus. Ed. Trillas. México. pp 11-114
54. Okazaki, S., Kinoshita, K., Koyama, K., Kunio, T., y Y. Hiroshi. 2007. New triterpene saponins from *Stenocereus eruca* (Cactaceae). *Journal of Natural Medicines.* 61(1): 24-29
55. Park, S.U. y 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
56. Pavlov, A., Kovatcheva, P., Georgiev, V., Koleva, I., y M. Ilieva. 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
57. Payne, J., Hamill, J.D., Robins, R.J., y M.J.C. Rhodes. 1987. Production of hyoscyamine by hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Planta Med.* 53: 474-478
58. Pérez-Molphe-Balch, E., Ramírez, R., Núñez, H., y N. Ochoa. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. 1ª ed. UAA/FOMES. México. pp 9-152
59. Porebski, S., Bailey, L. y R. Baun. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant. Mol. Biol. Rep. Ontario*

60. Porter, J.R. 1991. Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. Crit. Rev. Plant Sci. 10: 387-421
61. Rahman, L., Ikenaga, T., y Y. Kitamura. 2004. Penicillin derivatives induce chemical structure-dependent root development, and application for plant transformation. Plant Cell Rep. 22: 668-677
62. Riker, A.J., Banfield, W.M., Wright, W.H., Keitt, G.W., y H.E. Sagen. 1930. Studies on infectious hairy root of nursery-apple tree. J Agric Res. 41: 507-540
63. Rodríguez-Garza, R.G., González-González, G.M., Verde-Star, M.J., Morales-Rubio, M.E.; Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A., Núñez-González, M.A., y J.F. Treviño-Neávez. 2011. Bioprospección de la actividad antimicótica de extractos metanólicos de *Ariocarpus kotschoubeyanus* y *Ariocarpus retusus*. Polibotánica. 31: 143-155.
64. Sánchez-Mejorada, H. 1982. México's problems and programmes monitoring trade in common and endangered Cacti. Cact. Succ. J. Gr. Brit. 44: 36-38
65. Schmülling, T., Schell, J., y A. Spena. 1988. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. EMBO J. 7: 2621-2629
66. Sevon, N., y Oksman-Caldentey, K.M. 2002. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. Planta Med. 68: 859-868
67. Shanks J.V. y Morgan J. 1999. Plant "hairy root" culture. Curr Opin Biotechnol 10: 151-155
68. Smith, E.F., y C.O. Townsend. 1907. A plant-tumor of bacterial origin. Science 25: 671-673
69. Takizawa, T., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., Kondo, N., Yuasa, H., y K. Kawai. 1993. A new type of triterpene from *Trichocereus pachanoi*. J Nat Prod. 56: 2183-2185

70. Takizawa, T., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., Kondo, N., y H. Yuasa. 1995. A new triterpene from *Rathbunia alamosensis*. J Nat Prod. 58: 1913-1914
71. Tepfer, D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. Cell 37: 959-967
72. Tepfer, D. 1989. 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. W., eds. Plant-microbe interactions. Molecular and genetic perspectives. New York: McGraw-Hill. 3: 294-342
73. Tepfer, D. 1990. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. Physiol. Plant. 79: 140-146
74. Trease, G. y Evans, W. 1984. Farmacognosia. Continental. México. pp 437-843
75. Trick, H.N. y Finer, J.J. 1997. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium* mediated transformation. Transgenic Res 6: 329-336
76. Veena, V. y Taylor, C.G. 2007. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. In Vitro Cell. 43: 383-403
77. Waller, G.R. y E.K. Nowacki. 1978. Alkaloid biology and metabolism in plants. Plenum Press. New York
78. Wagner, H., y S. Blatt. 1996. Plant Drug Analysis. Segunda edición. Springer-Verlag. Berlin. 384 pp
79. Weller, S.A., Stead, D.E., y J.P. Young. 2006. Recurrent outbreaks of root rot in cucumber and tomato are associated with a monomorphic, cucumopine, Ri-plasmid harboured by various Alphaproteobacteria. EMS Microbiol Lett 258: 136-43

80. Weising, K., y G. Kahl. 1996. Natural genetic engineering of plant cells: the molecular biology of crown gall and hairy root disease. *World J Microbiol Biotechnol.* 2: 327-351
81. White, F. F., Taylor, B. H., Huffman, G. A., Gordon, M. P., y E. W. Nester. 1985. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.* 164: 33-44
82. Wu, T., Wittkamper, J., y H.E. Flores. 1999. Root herbivory in vitro: interactions between roots and aphids grown in aseptic co-culture. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 35: 259-264
83. Yadav, N.S., Van der Leyden, J., Bennett, D.R., Barnes, W.M., y Chilton, M-D. 1982. Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 6322-6326
84. Yang, Y., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., Kondo, N., y H. Yuasa. 1998. New Triterpenes from *Machaerocereus eruca*. *J Nat Prod.* 61: 456-460
85. Zuloaga, F.O., Morrone, O., Belgrano, M.J., Marticorena C., y E. Marchesi. 2008. Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 107(1): 1-983; 107(2): 985-2286; 107(3): 2287-3348

10. Anexos

Preparación de soluciones para la extracción de ADN

STET

Tris HCl pH 8	10 mM
NaCl	0.1 M
EDTA pH8	1 mM
Triton X-100	5 % p/v

Se diluyeron las soluciones stock tomadas del laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Tris HCl 1M se diluyó 1:100 pH 8
 Para 10ml se agregaron 100µl de Tris HCl 1M

NaCl 5M se diluyó 1:50
 Para 100ml se agregaron 200µl de NaCl 5M

EDTA 0.5M (500mM) se diluyó 1:500
 Para 10ml se agregaron 20 µl de EDTA 0.5M

Triton X-100 5% p/v por lo tanto se pesaron 0.05 g/10ml

Para 10 ml de solución STET: se agregaron todas las soluciones antes mencionadas en agua desionizada estéril y se aforo a 10 ml.

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

Mezcla de reacción para PCR

2X Read Mix REDTaq Sigma

MgCl ₂ número	catalogo R2648
Tris-HCl	20mM
pH	8.3
KCl	100 mM
MgCl ₂	3 mM
Gelatina	0.002%
Mezcla dNTP	0.4 mM (dATP, dCTP, dGTP, TTP)
Estabilizadores.	
Taq ADN Polimerasa	0.06 U/μl.

Ciclo PCR

Link 1 (Termociclador BioRad Gene Cycle)

AMPLIA (Termociclador Techne TC 312)

1 ciclo

94°C 4 min

55°C 1 min

72°C 3 min

3 ciclos

94°C 1 min

55°C 1 min

72°C 3 min

1 ciclo

72°C 7 min

Kanamicina (50 mg/ml)

La preparación de 25ml de kanamicina se realizó pesando 1.25gr de kanamicina en un vaso de precipitado estéril, para tener un stock de 50 mg/ml, después se diluyó en 25ml de agua destilada estéril, ya homogenizada la kanamicina se filtro por un filtro estéril con ayuda de una jeringa, para eliminar cualquier contaminante, en campana de flujo laminar, después se distribuyo en tubos Eppendorff estériles (500 y 1000 μ l según lo necesario) estos se refrigeraron a -20°C .

Rifampicina (50 mg/ml)

Se tomó una cápsula de Rifampicina de 300mg se disolvió en 6 ml, para tener un stock de 50mg/ml, de etanol absoluto, finalmente se colocó en un frasco ámbar y se refrigero a -20°C .

Antioxidantes (100 mg/ml)

Se tomaron 2 g de ácido cítrico y 2 gramos de ácido ascórbico y se diluyeron en 20 ml de agua destilada, para tener un stock de 100 mg/ml, se agitó, después se filtró con una jeringa por un filtro estéril, se hicieron alícuotas de 500 μ l en tubos Eppendorff estériles, y se refrigero a -20°C .

Soluciones concentradas

Solución A

Concentración: 1000 X.	Volumen: 50 mL	
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	22.000 g

Solución B

Concentración: 1 000 X.	Volumen: 50 mL	
Yoduro de potasio	KI	41.50 mg

Cloruro de cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.25 mg

Solución C

Concentración: 400 X. Volumen: 50 mL

Fosfato monobásico de K KH_2PO_4 3.400 g

Ac. Borico H_3BO_3 0.124 g

Molibdato de sodio NaMoO_4 0.005 g

Solución D

Concentración: 400 X. Volumen: 50 mL

Sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.400 g

Sulfato de manganeso $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.340 g

Sulfato de zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.172 g

Sulfato de cobre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.50 mg

Solución E

Concentración: 200 X. Volumen: 100 mL

Sulfato ferroso $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.557 g

EDTA disódico $\text{Na}_2\text{ EDTA}$ 0.745 g

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

Solución 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 a 4°C.

Solución de reacción para GUS

Buffer de fosfatos 1M	100 μ l	100 mM
EDTA 0.25 M	40 μ l	10 mM
Ferrocianuro de K 5 mM	100 μ l	0.5 mM
Ferricianuro de K 5 mM	100 μ l	0.5 mM
Triton 10%	10 μ l	0.1 %
X-gluc 40 mM	50 μ l	2.0 mM
Agua destilada	600 μ l	

 Total 1000 μ l

Buffer de fosfatos 1M

Fosfato monobásico de Na 12.0 g por cada 100 mL

Fosfato dibásico de Na 14.2 g por cada 100 mL

pH de 7

EDTA 0.25 M

Se disolvió 0.465 g en 50 mL de buffer fosfatos 100mM, pH 7

Ferrocianuro de potasio 5 mM

Se disolvió 105 mg en 50 mL de buffer fosfatos 100 mM, pH 7

X-Glu (5 bromo - 4 cloro - 3 indol β -D glucorónido) 40 mM

Se disolvió 5.2 mg en 250 μ L de dimetilformamida

Solución utilizada en la extracción de ADN por el método de CTAB

CTAB	4 %
NaCl	1.4 M
Tris HCl pH8	100 mM
<i>B</i> -mercaptoetanol	2 %. Se añade rápidamente antes de usar

Absorbancias de los extractos de ADN

Especies	Pesos mg	Abs 260	Abs 280	Relación ADN 260/280	[] de ADN $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	[] de proteínas $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
<i>Browningia candelaris</i>	100	0.045	0.038	1.2	1.496	24.05
<i>Cephalocereus senilis</i>	140	0.065	0.053	1.23	2.181	33.03
<i>Coryphantha clavata</i>	140	0.031	0.025	1.26	1.07	14.86
<i>Coryphantha durangensis</i>	80	0.050	0.034	1.46	1.896	15.21
<i>Coryphantha macromeris</i>	100	0.062	0.046	1.35	2.248	24.05
<i>Coryphantha radians</i>	30	0.025	0.013	1.86	1.075	1.936
<i>Echinocereus knippelianus</i> (<i>E. knippelianus</i> var <i>kruegeri</i>)	100	0.058	0.036	1.62	2.375	11.57
<i>Echinocereus pulchellus</i> subsp. <i>weinbergii</i>	70	0.093	0.056	1.65	3.806	16.71
<i>Echinocereus schmollii</i>	140	0.248	0.187	1.33	8.866	102.6
<i>Echinomastus erectocentrus</i>	30	0.045	0.029	1.55	1.787	10.93
<i>Hylocereus undatus</i>	60	0.61	0.041	1.49	2.361	17.44
<i>Isolatocereus dumortieri</i> (<i>Stenocereus dumortieri</i>)	80	0.179	0.135	1.33	6.407	73.42
<i>Mammillaria carmenae</i>	80	0.006	0.003	1.85	0.275	0.502
<i>Mammillaria bocasana</i> var <i>bocasana</i>	130	0.273	0.180	1.52	10.67	72.84
<i>Mammillaria hutchisoniana</i> subsp. <i>louisae</i>	110	0.036	0.020	1.77	1.536	4.322
<i>Mammillaria jaliscana</i>	120	0.074	0.045	1.63	3.020	14.42
<i>Mammillaria oteroi</i>	80	0.250	0.188	1.33	8.949	102.2
<i>Mammillaria perbella</i> (<i>M. pseudoperbella</i>)	40	0.050	0.028	1.276	2.111	6.129
<i>Mammillaria solisioides</i>	60	0.049	0.024	2.04	2.221	0.220
<i>Mammillaria sphacelata</i> var <i>sphacelata</i>	120	0.017	0.010	1.71	0.725	2.574
<i>Mammillaria theresae</i>	70	0.002	-0.002	-1	0.178	-4.157
<i>Mammilloidia candida</i> (<i>Mammillaria candida</i>)	60	0.058	0.038	1.51	2.272	15.60
<i>Melocactus curvispinus</i> var <i>curvispinus</i> (<i>M. oaxacensis</i>)	120	0.076	0.072	1.22	2.544	39.06
<i>Myrtillocactus schenckii</i>	70	0.038	0.021	1.84	1.649	3.194
<i>Polaskia chichipe</i>	80	0.150	0.140	1.07	4.355	104.6

Cálculos de las diluciones para ajustar los volúmenes finales de resuspensión de la extracción de ADN

<i>Browningia candelaris</i> 1.469 µg -- 1 µL 2.938 µg -- 2 µL	1:9 --- 0.33 µg/µL 2 µL de ADN + 16 µL de Agua = 18 µL	<i>Cephalocereus senilis</i> 2.181 µg -- 1 µL 4.362 µg -- 2 µL	1:14 --- 0.31 µg/µL 2 µL de ADN + 26 µL de Agua = 28 µL
<i>Coryphantha clavata</i> 1.840 µg -- 1 µL 3.680 µg -- 2 µL	1:12 --- 0.31 µg/µL 2 µL de ADN + 22 µL de Agua = 24 µL	<i>Coryphantha durangensis</i> 1.896 µg -- 1 µL 3.792 µg -- 2 µL	1:12 --- 0.32 µg/µL 2 µL de ADN + 22 µL de Agua = 24 µL
<i>C. macromeris</i> 2.248 µg -- 1 µL 4.496 µg -- 2 µL	1:14 --- 0.32 µg/µL 2 µL de ADN + 26 µL de Agua = 28 µL	<i>C. radians</i> 1.075 µg -- 1 µL 2.150 µg -- 2 µL	1:7 --- 0.31 µg/µL 2 µL de ADN + 12 µL de Agua = 14 µL
<i>Echinocereus knippelianus</i> 2.375 µg -- 1 µL 4.750 µg -- 2 µL	1:15 --- 0.32 µg/µL 2 µL de ADN + 28 µL de Agua = 30 µL	<i>E. pulchellus</i> 3.806 µg -- 1 µL 7.612 µg -- 2 µL	1:25 --- 0.30 µg/µL 2 µL de ADN + 48 µL de Agua = 50 µL
<i>E. schmollii</i> 8.860 µg -- 1 µL 17.72 µg -- 2 µL	1:55 --- 0.32 µg/µL 2 µL de ADN + 108 µL de Agua = 110 µL	<i>Echinomastus erectocentrus</i> 1.787 µg -- 1 µL 3.574 µg -- 2 µL	1:11 --- 0.32 µg/µL 2 µL de ADN + 20 µL de Agua = 22 µL
<i>Hylocereus undatus</i> 2.361 µg -- 1 µL 4.722 µg -- 2 µL	1:15 --- 0.31 µg/µL 2 µL de ADN + 28 µL de Agua = 30 µL	<i>Isolatocereus dumortieri</i> 6.407 µg -- 1 µL 12.814 µg -- 2 µL	1:42 --- 0.31 µg/µL 2 µL de ADN + 82 µL de Agua = 84 µL
<i>Mammillaria carmenae</i> 0.275 µg -- 1 µL 0.550 µg -- 2 µL	1:1 --- 0.55 µg/µL Sin diluir	<i>M. bocasana</i> 10.67 µg -- 1 µL 21.34 µg -- 2 µL	1:60 --- 0.36 µg/µL 2 µL de ADN + 118 µL de Agua = 120 µL
<i>M. hutchisoniana</i> 1.536 µg -- 1 µL 3.072 µg -- 2 µL	1:10 --- 0.31 µg/µL 2 µL de ADN + 18 µL de Agua = 20 µL	<i>M. jaliscana</i> 3.020 µg -- 1 µL 6.040 µg -- 2 µL	1:20 --- 0.30 µg/µL 2 µL de ADN + 38 µL de Agua = 40 µL
<i>M. oteroi</i> 8.949 µg -- 1 µL 17.89 µg -- 2 µL	1:59 --- 0.30 µg/µL 2 µL de ADN + 116 µL de Agua = 118 µL	<i>M. perbella</i> 2.111 µg -- 1 µL 4.222 µg -- 2 µL	1:13 --- 0.32 µg/µL 2 µL de ADN + 24 µL de Agua = 26 µL
<i>M. solisioides</i> 2.221 µg -- 1 µL 4.442 µg -- 2 µL	1:14 --- 0.32 µg/µL 2 µL de ADN + 26 µL de Agua = 28 µL	<i>M. sphacelata</i> 0.725 µg -- 1 µL 1.450 µg -- 2 µL	1:4 --- 0.36 µg/µL 2 µL de ADN + 6 µL de Agua = 8 µL
<i>M. theresae</i> 0.178 µg -- 1 µL 0.356 µg -- 2 µL	1:1 --- 0.36 µg/µL Sin diluir	<i>Mammilloidya candida</i> 2.272 µg -- 1 µL 4.544 µg -- 2 µL	1:15 --- 0.30 µg/µL 2 µL de ADN + 28 µL de Agua = 30 µL
<i>Melocactus curvispinus</i> 2.544 µg -- 1 µL 5.088 µg -- 2 µL	1:16 --- 0.32 µg/µL 2 µL de ADN + 30 µL de Agua = 32 µL	<i>Myrtillocactus schenckii</i> 1.649 µg -- 1 µL 3.298 µg -- 2 µL	1:10 --- 0.33 µg/µL 2 µL de ADN + 18 µL de Agua = 20 µL
<i>Polaskia chichipe</i> 4.355 µg -- 1 µL 8.710 µg -- 2 µL	1:26 --- 0.34 µg/µL 2 µL de ADN + 50 µL de Agua = 52 µL		

Reactivos de revelado para las cromatografías

Reactivo de Dragendorff (Wagner y Blatt, 1996)

Utilidad: Detecta Alcaloides y compuestos nitrogenados heterocíclicos.

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

Solución B: Se disolvió 8 g de Yoduro de potasio en 30 mL de agua.

Solución madre: Se mezclaron 1:1 las soluciones A y B.

Reactivo en aerosol: Se mezcló 1 mL de la solución madre con 2 mL de ácido acético glacial y 10 mL de agua.

Intensificación de manchas: después de colocar el reactivo de DRG, a la placa se le puso un segundo aerosol de nitrito de sodio acuoso al 10%. Esto intensificó algunas manchas y otras que no se distinguían a simple vista se lograron ver con esta solución.

Las soluciones se prepararon en la campana de extracción de gases.

Reactivo de Marquis (Wagner y Blatt, 1996, modificado)

Utilidad: Detecta alcaloides derivados de morfina.

Se diluyeron 3 mL de formaldehído en 100 mL de ácido sulfúrico concentrado. Las placas se dejaron secar en la campana de extracción con aire, después se expusieron a luz solar hasta que secaron completamente y se observó en UV 365 nm.

Las soluciones se prepararon en campana de extracción de gases.