



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**Centro de Ciencias Básicas**

**Departamento de Química**

**Tesis**

**Desarrollo *in vitro* y capacidad biosintética de raíces de  
Cactáceas transformadas con los genes silvestres de  
*A. rhizogenes*.**

**Presenta:**

**Alejandra Palomeque Carlín**

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**TUTOR:**

**Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch**

**COMITÉ TUTORAL**

**Dr. Felipe Tafoya Rangel  
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís**

**Aguascalientes, Ags. a 26 de junio de 2015**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

**ALEJANDRA PALOMEQUE CARLIN**  
**ALUMNA DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**PRESENTE.**

Estimada alumna:

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: **“Desarrollo *in vitro* y capacidad biosintética de raíces de Cactáceas transformadas con los genes silvestres de *A. rhizogenes*”**, 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., 17 de junio de 2015

“SE LUMEN PROFERRE”

EL DECANO

**M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

**MC. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**  
**P R E S E N T E**

Por medio de la presente, como miembro del Comité Tutorial designado de la estudiante **ALEJANDRA PALOMEQUE CARLIN**, con ID **42499**, quien realizó la tesis titulada: **Desarrollo *in vitro* y capacidad biosintética de raíces de Cactáceas transformadas con los genes silvestres de *A. rhizogenes***, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"Se Lumen Proferre"  
Aguascalientes, Ags., a 15 de junio de 2015.

**Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch**  
**Miembro del Comité Tutorial (Tutor)**

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES



ANIVERSARIO  
UAA

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

MC. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS  
P R E S E N T E

Por medio del presente como Miembro del Comité Tutorial designado de la estudiante **ALEJANDRA PALOMEQUE CARLIN** con ID 42499 quien realizó la tesis titulada: **DESARROLLO *IN VITRO* Y CAPACIDAD BIOSINTÉTICA DE RAÍCES DE CACTÁCEAS TRANSFORMADAS CON LOS GENES SILVESTRES DE *A. rhizogenes***, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

*"Se Lumen Proferre"*

Aguascalientes, Ags., a 17 de Junio de 2015.

Dr. Felipe Tafuya Rangel  
Miembro del Comité Tutorial (Asesor)

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Biología  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico

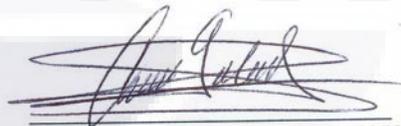
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

**MC. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**  
**P R E S E N T E**

Por medio de la presente, como miembro del Comité Tutorial designado de la estudiante **ALEJANDRA PALOMEQUE CARLIN**, con ID **42499**, quien realizó la tesis titulada: **Desarrollo *in vitro* y capacidad biosintética de raíces de Cactáceas transformadas con los genes silvestres de *A. rhizogenes***, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
San Luis Potosí, S.L.P. , a 15 de junio de 2015.



**Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís**  
**Miembro del Comité Tutorial**

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico  
c.c.p. archivo

## AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mi esposo.

A mis padres.

A mi hermano.

Al Doctor Eugenio Pérez Molphe Balch.

Al Doctor Felipe Tafoya Rangel.

Al doctor Ángel Gabriel Alpuche Solís.

A la MC. Lucía Isabel Chávez Ortiz.

A Martita.

A Lupita, Isaac, Shantal, Memo, Leo, Ernes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para estudios de doctorado [Beca No. 20211].

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero brindado al proyecto [CB-2011-01-00000000168997].

**INDICE GENERAL**

**RESUMEN**.....14

**ABSTRACT**.....17

**I.ANTECEDENTES**.....19

I.1. Las Cactáceas y su importancia fitoquímica.....19

I.2. ¿Qué son las raíces transformadas? .....24

I.3. Usos de las raíces transformadas. ....26

I.4. ¿Cómo se cultivan las raíces transformadas? .....31

**II.JUSTIFICACIÓN**.....35

**III. HIPÓTESIS DE TRABAJO**.....35

**IV. OBJETIVOS**. ....36

IV.1. Objetivo General. ....36

IV.2. Objetivos particulares.....36

**V. METODOLOGIA**. ....36

V.1. Etapa previa. ....36

    V.1.a. Material vegetal. ....36

    V.1.b. Mantenimiento de la cepa A4 de *Agrobacterium rhizogenes*....41

V.2. Con respecto al objetivo particular referente a la caracterización el desarrollo *in vitro* de las raíces transformadas bajo diferentes medios y condiciones de cultivo.....43

    V.2.a. Inducción de raíces transformadas. ....43

    V.2.b. Determinación del efecto de las diferentes concentraciones del medio de cultivo MS en la inducción de raíces transformadas. ....44

    V.2.c. Efecto del fotoperiodo y del medio cultivo en el crecimiento de las raíces transformadas. ....44

V.2.d. Efecto del fotoperiodo, tipo de soporte y del medio cultivo en el crecimiento de las raíces transformadas. ....45

V.2.f. Efecto del medio cultivo basal en el crecimiento de las raíces transformadas. ....45

V.2.e. Crecimiento de las raíces transformadas en un sistema de inmersión temporal RITA®.....46

V.3. Con respecto al objetivo particular referente a llevar a cabo la caracterización molecular de las raíces transformadas obtenidas. ....46

V.3.a. Análisis histoquímico para la actividad de GUS.....46

V.3.b. Ensayo fluorométrico de la actividad de GUS.....47

V.3.c. Verificación de transformación mediante PCR.....47

V.4. Con respecto al objetivo particular referente a realizar un escrutinio fitoquímico de betalaínas y alcaloides en las raíces transformadas y en las mismas especies bajo condiciones naturales para comparar su capacidad biosintética de dichos compuestos. ....48

V.4.a. Detección de Betalaínas. ....48

V.4.b. Análisis de alcaloides por cromatografía en capa fina (TLC).....48

V.5. Con respecto al objetivo particular referente al análisis de los compuestos de posible interés detectados en las raíces transformadas y la caracterización de su actividad biológica. ....49

V.5.a. Análisis de alcaloides por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. ....49

V.5b. Estudio de la actividad biológica de los extractos totales de las raíces transformadas. ....49

**VI. RESULTADOS Y DISCUSION.....51**

VI.1. Con respecto al objetivo particular referente a la caracterización el desarrollo *in vitro* de las raíces transformadas bajo diferentes medios y condiciones de cultivo.....51

    VI.1.a. Inducción de raíces transformadas. ....51

    VI.1.b. Determinación del efecto de diferentes medios basales, condiciones de fotoperiodo y tipos de soporte en el crecimiento de raíces transformadas. ....75

    VI.1.c. Crecimiento de las raíces transformadas en un sistema de inmersión temporal RITA®.....84

    VI.1.d. Generación de brotes a partir de cultivos de raíces transformadas.....87

VI.2. Con respecto al objetivo particular referente a llevar a cabo la caracterización molecular de las raíces transformadas obtenidas.....90

    VI.2.a. Análisis histoquímico para la actividad GUS.....90

    VI.2.b. Ensayo fluorométrico de la actividad GUS.....91

    VI.2.c. Verificación de transformación mediante PCR.....96

VI.3. Con respecto al objetivo particular referente a realizar un escrutinio fitoquímico de betalaínas y alcaloides en las raíces transformadas, y mismas especies en condiciones naturales, para comparar su capacidad biosintética. ....97

    VI.3.a. Detección de Betalaínas.....97

    VI.3.b. Análisis de alcaloides por cromatografía en capa fina (TLC).....103

VI.4. Con respecto al objetivo particular referente al análisis de los compuestos de posible interés detectados en las raíces transformadas y caracterización de su actividad biológica.....111

    VI.4.a. Análisis de alcaloides por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. ....111

VI.4.b. Estudio de la actividad biológica de los extractos totales de las raíces transformadas. ....118

**VII.CONCLUSIONES**.....120

**VIII. REFERENCIAS.** .....124

**IX. ANEXO A.**

**X. APENDICES.**



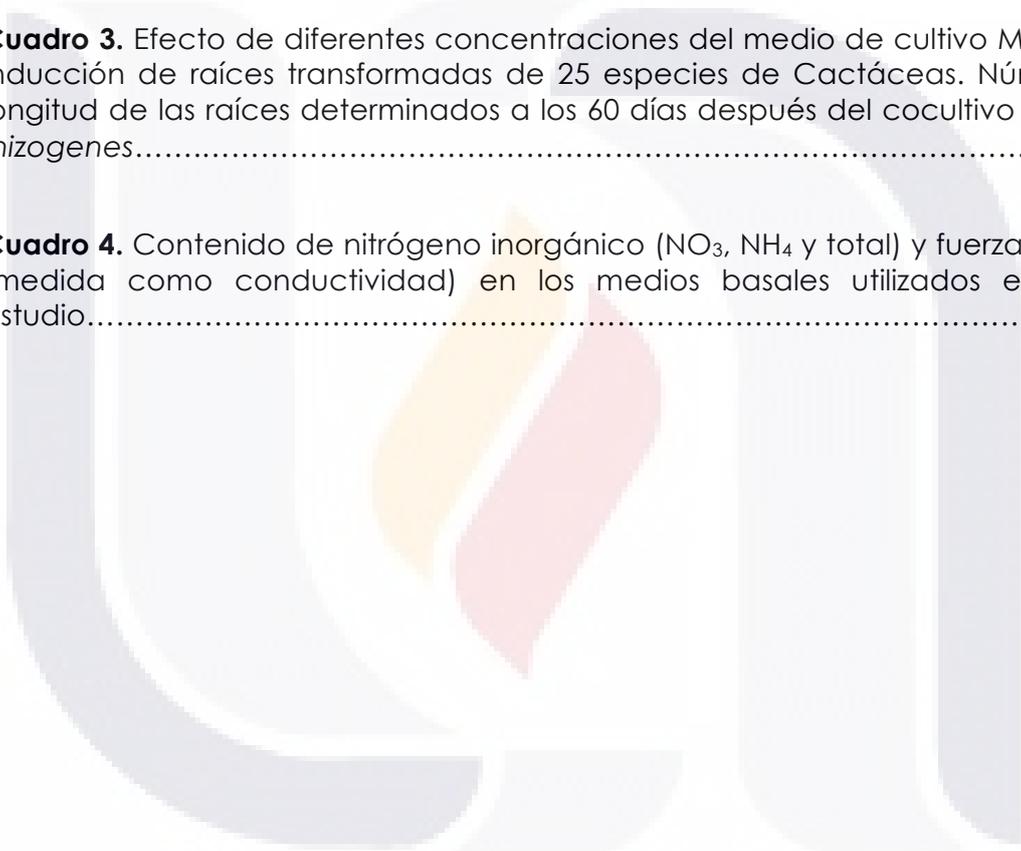
**INDICE DE TABLAS**

**Cuadro 1.** Listado de especies utilizadas en este estudio, distribución y observaciones.....37

**Cuadro 2.** Listado de oligos utilizados para análisis por PCR de la bacteria *A. rhizogenes* y de cultivos de raíces transformadas de cactáceas establecidas por transformación mediada por *A. rhizogenes* A4.....42

**Cuadro 3.** Efecto de diferentes concentraciones del medio de cultivo MS en la inducción de raíces transformadas de 25 especies de Cactáceas. Número y longitud de las raíces determinados a los 60 días después del cocultivo con *A. rhizogenes*.....53

**Cuadro 4.** Contenido de nitrógeno inorgánico ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$  y total) y fuerza iónica (medida como conductividad) en los medios basales utilizados en este estudio.....78



**INDICE DE FIGURAS**

**Figura 1.** Detección de los genes *rolB*, *gus*, *nptII*, *virD1* y *Vtc* en ADN de *A. rhizogenes*. Se utilizaron oligos para amplificar *rolB*, *gus*, *nptII*, *virD1* y *Vtc* (control negativo) en las reacciones corridas en los carriles 1, 2, 3, 4 y 5.....43

**Figura 2.** Eficiencia de transformación total de veinticinco especies de Cactáceas transformadas con *A. rhizogenes* A4. Se obtuvo el promedio de los resultados de la eficiencia de transformación de los diferentes tratamientos (medio MS al 25, 50, 75 y 100% de su potencia). Las barras muestran el error estándar. ....61

**Figura 3.** Eficiencia de transformación de diferentes cactáceas infectadas con *A. rhizogenes* A4 incubadas en diferentes concentraciones del medio MS (100, 75, 50 y 25%).....62

**Figura 4.** Eficiencia de transformación de diferentes cactáceas infectadas con *A. rhizogenes* A4 incubadas en diferentes concentraciones del medio MS (100, 75, 50 y 25%).....63

**Figura 5.** Número de raíces obtenidas por explante de diferentes cactáceas infectadas con *A. rhizogenes* A4 después de ser incubadas 60 días en diferentes concentraciones del medio MS (100, 75, 50 y 25%) por 60 días. Los resultados que se muestran son de diez repeticiones. Las barras indican la desviación estándar.....64

**Figura 6.** Número de raíces obtenidas por explante de diferentes cactáceas infectadas con *A. rhizogenes* A4 después de ser incubadas 60 días en diferentes concentraciones del medio MS (100, 75, 50 y 25%). Los resultados que se muestran son de diez repeticiones. Las barras indican la desviación estándar.....65

**Figura 7.** Crecimiento (medida como longitud en mm) de las raíces obtenidas mediante la infección de diferentes especies de cactáceas con *A. rhizogenes* A4 después de ser incubadas 60 días en diferentes concentraciones del medio MS (100, 75, 50 y 25%). Los resultados que se muestran son de diez repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. ....66

**Figura 8.** Crecimiento (medida como longitud en mm) de las raíces obtenidas mediante la infección de diferentes especies de cactáceas con *A. rhizogenes* A4 después de ser incubadas 60 días en diferentes concentraciones del medio MS (100, 75, 50 y 25%). Los resultados que se muestran son de diez repeticiones. Las barras indican la desviación estándar. ....67

**Figura 9.** Etapas iniciales de la inducción de raíces presuntamente transformadas de (a) *Echinocactus grusonii*, (b) *Echinocereus ferreirianus* var. *lindsayi*, (c) *E. knippelianus*, (d) (e) *E. schmolli*, (f) *Escontria chiotilla*, (g) *Ferocactus peninsulae*, (h) *Mammillaria carmenae*, (i) *M. theresae*, (j) *Matucana madisoniorum*, (k) *Opuntia amyoclea*, (l) *O. ficus-indica*, (m) *Polaskia chichipe*, (n) *Stenocereus stellatus*, (o) *S. thurbari* var. *thurberi* y (p) *Turbinicarpus pseudopectinatus*, infectadas con *A. rhizogenes*. ....68

**Figura 10.** Cinética de crecimiento relativo (en cm) de raíces presuntamente transformadas de (a) *Echinocactus grusonii*, (b) *E. platyacanthus*, (c) *Echinocereus ferreirianus* var. *lindsayi*, (d) *E. knippelianus* y (e) *E. schmollii* en un periodo de 60 días cultivadas en medio MS a diferentes concentraciones (100, 75, 50 y 25%).....69

**Figura 11.** Cinética de crecimiento relativo (en cm) de raíces presuntamente transformadas de (a) *Escontria chiotilla* (b) *Ferocactus peninsulae* (c) *Isolatocereus dumortieri*, (d) *Mammillaria carmenae* y (e) *M. theresae* en un periodo de 60 días cultivadas en medio MS a diferentes concentraciones (100, 75, 50 y 25%).....70

**Figura 12.** Cinética de crecimiento relativo (en cm) de raíces presuntamente transformadas de (a) *Matucana madisoniorum*, (b) *Melocactus curvispinus* var. *curvispinus*, (c) *Myrtillocactus schenckii*, (d) *Opuntia amyoclea* y (e) *O. ficus-indica* en un periodo de 60 días cultivadas en medio MS a diferentes concentraciones (100, 75, 50 y 25%).....71

**Figura 13.** Cinética de crecimiento relativo (en cm) de raíces presuntamente transformadas de (a) *Opuntia macrocentra* (b) *Peniocereus serpentinus* (c) *Polaskia chichipe* (d) *Stenocereus stellatus* y (e) *S. thurberi* var. *thurberi* en un periodo de 60 días cultivadas en medio MS a diferentes concentraciones (100, 75, 50 y 25%).....72

**Figura 14.** Cinética de crecimiento relativo (en cm) de raíces presuntamente transformadas de (a) *Turbinicarpus hoferi*, (b) *T. pseudopectinatus*, (c) *T. pseudomacroechele* var. *pseudomacroechele*, (d) *T. subterraneus* y (e) *T. swoboda* en un periodo de 60 días cultivadas en medio MS a diferentes concentraciones (100, 75, 50 y 25%).....73

**Figura 15.** Incremento en peso fresco (mg) de las raíces transformadas de (a) *Ferocactus peninsulae*, (b) *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, (c)

*Turbinicarpus lophophoroides*, (d) *T. pseudopectinatus* y (e) *T. schmiedickeanus* var. *schwarzii*, en medio MS al 100 y al 50% de su potencia bajo condiciones de luz y de obscuridad después de 60 días de cultivo. (f) Incremento en el peso fresco (mg) en las raíces transformadas de *T. lophophoroides* después de ser cultivadas 60 días en medio MS y B5 utilizando agar al 0.8% y hule espuma como soporte. ....77

**Figura 16.** Crecimiento de raíces transformadas expresado como incremento en peso fresco (mg) de *Escobaria chaffeyi* (a), *Ferocactus peninsulae* (b), *Mammillaria bocasana* var. *bocasana* (c), *Turbinicarpus lophophoroides* (d), *T. pseudopectinatus* (e) y *T. schmiedickeanus* var. *schwarzii* (f) después de treinta días de cultivo en doce medios de cultivo diferentes. Las barras representan el error estándar. Los valores indicados por la misma letra no difieren significativamente cuando  $p < 0.05$ , utilizando la prueba de rango múltiple de Tukey-Kramer. Se muestran los resultados combinados de dos experimentos independientes. ....82

**Figura 17.** Cultivo de raíces transformadas de (a) *Escobaria chaffeyii* (medio DKW), (b) *Ferocactus peninsulae* (medio N6), (c) *Mammillaria bocasana* var. *bocasana* (medio WPM), (d y e) dos morfologías diferentes de raíces transformadas de *T. lophophoroides* en medio semisólido MS y N&N respectivamente, (f) *T. pseudopectinatus* (medio WV3) y dos morfologías diferentes de raíces transformadas *Turbinicarpus schmiedickeanus* var. *shwarzii* en medio semisólido B5 (g) y DKW (h). ....83

**Figura 18.** Comparación en el incremento de biomas de raíces transformadas expresado como incremento en peso fresco (g), después de 30 días de cultivo en sistemas de inmersión temporal RITA® (R), y en medio MS semisólido (MS). Las barras representan el error estándar. No difieren significativamente cuando  $p < 0.05$ , utilizando la prueba de rango múltiple de Tukey-Kramer. Se muestran los resultados combinados de dos experimentos independientes. ....85

**Figura 19.** Secuencia de la obtención de biomasa de raíces transformadas de *T. lophophoroides* cultivadas en el sistema de inmersión temporal RITA®.....86

**Figura 20.** Generación de brotes transformados a partir de cultivos de raíces transformadas de *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*. Brote transformado de la misma especie, listo para ser transferido a tierra. Brote aclimatado en condiciones de invernadero. ....88

**Figura 21.** Brotes transformados generados a partir de cultivos de raíces transformadas de *Escobaria chaffeyii*.....88

**Figura 22.** Brotes transformados generados a partir de cultivos de raíces transformadas de *Turbincarpus laui* listos para ser transferidos a tierra. ....89

**Figura 23.** Brotes transformados generados a partir de cultivos de raíces transformadas de *Turbincarpus pseudopectinatus* listos para ser transferidos a tierra.....89

**Figura 24.** Tinción histoquímica para la expresión de GUS en raíces transformadas de (a) *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, (b) *Turbincarpus lophophoroides*, (c) *Ferocactus peninsulæ* (d) *Escobaria chaffeyii* (e) *T. pseudopectinatus* (f) *T. schmiedickeanus* var. *shwarzii* que fueron inducidas por inoculación con *A. rhizogenes*..... 91

**Figura 25.** Actividad GUS expresada en nm/min/mg de proteína a los 0, 5, 10, 15 y 20 min, en diferentes tejidos presuntamente transformados de *E. chafeyii*, *M. bocasana* var. *bocasana*, *Turbincarpus laui* y *T. pseudopectinatus*..... 94

**Figura 26A.** Actividad GUS expresada en nm/min/mg de proteína a los 0, 5, 10, 15 y 20 min, en (a) brotes regenerados a partir de dos líneas de raíces presuntamente transformadas de *Escobaria chafeyii*, (c) raíces transformadas y brotes regenerados (normal y vitrificado) a partir de raíces transformadas de *Turbincarpus laui*, (e) raíces transformadas y brotes regenerados (normal y vitrificado) a partir de raíces transformadas de *T. pseudopectinatus*. ....95

**Figura 26B.** Tinción histoquímica para la expresión de GUS en (a, b y c) brotes regenerados a partir de raíces transformadas de *Escobaria chafeyii*, (d) raíces transformadas de *T. laui* y (e) brotes regenerados de *T. pseudopectinatus* con X-gluc magenta (izquierda) y X-gluc azul (derecha). ....96

**Figura 27.** Detección de los genes *rolB*, *nptII*, *gus* y *virD1*. ADN en raíces transformadas de: *Escobaria chaffeyi* (a), *Ferocactus peninsulæ* (b), *T. pseudopectinatus* (c), y *T. schmiedeckeanus* var. *schwarzii* (d). Se utilizaron los oligos para amplificar los genes *nptII*[1], *rolB*[2], *gus*[3], *virD1*[4], y *vtc*[5] (como control negativo). ....97

**Figura 28.** Contenido de (a) ácido betalámico (b) betaxantinas y (c) betacianinas en mg/g de peso fresco en las raíces transformadas de diez especies de Cactáceas.....100

**Figura 29.** Barrido en espectrofotómetro de 400 nm a 600 nm de extracto metanólico de betalaínas de raíces transformadas de (a) *Escobaria chaffeyii*, (b) *Ferocactus peninsulæ* (c) *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, (d) *M. spacelata* var. *sphacelata* (e) *Turbincarpus lophophoroides* (f) *T. laui* (g) *T. pseudopectinatus* (h) *T. schmiedickeanus* var. *curvispinus* (i) *T. schmiedickeanus* var. *schwarzii*. .....101

**Figura 30.** Contenido de (a) ácido betalámico (b) betaxantinas y (c) betacianinas en mg/g de peso fresco en las raíces transformadas de *Turbincarpus laui* cultivadas en diferentes medios basales.....102

**Figura 31.** Cromatografía en capa fina cargando 20 µL de muestra bajo luz UV (264 nm). Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Myrtillocactus schenckii*, b: *Turbincarpus lophophoroides*, c: *T. laui*, d: *T. pseudopectinatus*, e: *T. schmiedickeanus* var. *curvispinus*, f: *T. schmiedickeanus* var. *shwarzii*.....106

**Figura 32.** Cromatografía en capa fina revelada con ninhidrina cargando 2 µL de muestra. Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Myrtillocactus schenckii*, b: *Turbincarpus lophophoroides*, c: *T. laui*, d: *T. pseudopectinatus*, e: *T. schmiedickeanus* var. *curvispinus*, f: *T. schmiedickeanus* var. *shwarzii*. .....106

**Figura 33.** Cromatografía en capa fina cargando 2 µL de muestra revelada con reactivo de Dragendorff y nitrito de sodio acuoso (10%). Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Myrtillocactus schenckii*, b: *Turbincarpus lophophoroides*, c: *T. laui*, d: *T. pseudopectinatus*, e: *T. schmiedickeanus* var. *curvispinus*, f: *T. schmiedickeanus* var. *shwarzii*. .....107

**Figura 34.** Cromatografía en capa fina cargando 2 µL de muestra revelada con reactivo de yodoplatinato. Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Myrtillocactus schenckii*, b: *Turbincarpus lophophoroides*, c: *T.*

*loui*, d: *T. pseudopectinatus*, e: *T. schmiedickeanus* var. *curvispinus*, f: *T. schmiedickeanus* var. *shwarzii*.....107

**Figura 35.** Cromatografía en capa fina cargando 20 µL de muestra revelada con ninhidrina. Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Myrtillocactus schenckii*, b: *Turbincarpus lopophoroides*, c: *T. laui*, d: *T. pseudopectinatus*, e: *T. schmiedickeanus* var. *curvispinus*, f: *T. schmiedickeanus* var. *shwarzii*.....108

**Figura 36.** Cromatografía en capa fina cargando 20 µL de muestra revelada con reactivo de Dragendorff y nitrito de sodio acuoso (10%). Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Myrtillocactus schenckii*, b: *Turbincarpus lopophoroides*, c: *T. laui*, d: *T. pseudopectinatus*, e: *T. schmiedickeanus* var. *curvispinus*, f: *T. schmiedickeanus* var. *shwarzii*.....108

**Figura 37.** Cromatografía en capa fina cargando 20 µL de muestra revelada con reactivo de yodoplatinato. Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Myrtillocactus schenckii*, b: *Turbincarpus lopophoroides*, c: *T. laui*, d: *T. pseudopectinatus*, e: *T. schmiedickeanus* var. *curvispinus*, f: *T. schmiedickeanus* var. *shwarzii*. .....109

**Figura 38.** Cromatografía en capa fina cargando 20 µL de muestra bajo luz UV (240 nm). Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Ariocarpus kotschoubeyanus*, b: *Echinocactus platyacanthus*, c: *Escobaria chaffeyi*, d: *Ferocactus peninsulae*, e: *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, f: *Mammillaria sphaelata* var. *sphaelata*.....109

**Figura 39.** Cromatografía en capa fina cargando 20 µL de muestra revelada con ninhidrina. Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Ariocarpus kotschoubeyanus*, b: *Echinocactus platyacanthus*, c: *Escobaria chaffeyi*, d: *Ferocactus peninsulae*, e: *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, f: *Mammillaria sphaelata* var. *sphaelata*.....110

**Figura 40.** Cromatografía en capa fina cargando 20 µL de muestra revelada con Reactivo Dragendorff y nitrito de sodio acuoso (10%). Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la

segunda de raíz transformada. a: *Ariocarpus kotschoubeyanus*, b: *Echinocactus platyacanthus*, c: *Escobaria chaffeyi*, d: *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, e: *Mammillaria sphacelata* var. *sphacelata*.....110

**Figura 41.** Cromatografía en capa fina cargando 20 µL de muestra revelada con reactivo de yodoplatinato. Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Ariocarpus kotschoubeyanus*, b: *Echinocactus platyacanthus*, c: *Escobaria chaffeyi*, d: *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, d: *Mammillaria sphacelata* var. *sphacelata*. .....111

**Figura 42.** Cromatograma del extracto alcaloides de *Mammillaria sphacelata* var *sphacelata* mostrando las diferencias de compuestos entre una raíz transformada (negro) y planta de campo completa (azul). Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la hordenina.....114

**Figura 43.** Cromatograma del extracto de alcaloides de *Mammillaria bocasana* var. *bocasana* mostrando diferencias en los compuestos de raíz transformada (azul) y planta completa (negro). Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la hordenina .....114

**Figura 44.** Cromatograma del análisis del extracto de alcaloides de *Ariocarpus kotschoubeyanus* mostrando las diferencias de compuestos entre una raíz transformada (negro) y planta de campo completa (azul). Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la hordenina.....115

**Figura 45.** Cromatograma del análisis del extracto de alcaloides de *Turbincarpus schmidickeanus* var. *curvispinus* (*Mammillaria oaxacensis*) mostrando las diferencias de compuestos entre una raíz transformada (negro) y planta de campo completa (azul). Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la hordenina .....115

**Figura 46.** Cromatograma del análisis del extracto de alcaloides de *Turbincarpus laui* mostrando las diferencias de compuestos entre una raíz transformada (negro) y planta de campo completa (azul). Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la hordenina .....116

**Figura 47.** Cromatograma del análisis del extracto de alcaloides de *Turbincarpus pseudopectinatus* mostrando las diferencias de compuestos entre una raíz transformada (negro) y planta de campo completa (azul).

Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la hordenina.....116

**Figura 48.** Cromatograma del análisis del extracto de alcaloides de *Turbinicarpus schmiedickeanus* var. *shwarzii* mostrando las diferencias de compuestos entre una raíz transformada (negro) y planta de campo completa (azul). Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la hordenina .....117

**Figura 49.** Cromatograma del análisis del extracto de alcaloides de *Escobaria chaffeyi* mostrando las diferencias de compuestos entre una raíz transformada (negro) y planta de campo completa (azul). Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la hordenina .....117

**Figura 50.** Cromatograma del análisis del extracto de alcaloides de *Turbinicarpus lophophoroides* mostrando las diferencias de compuestos entre una raíz transformada (negro) y planta de campo completa (azul). Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la hordenina .....118

**Figura 51.** Resultado de la prueba de difusión de discos sobre *E. coli* Top10 utilizando extractos totales de raíces transformadas de *T. lophophoroides* (100 mg/mL) (100), un compuesto comercial de hordenina como referencia (100 mg/mL) (H), cefotaxima (100 mg/mL) como control positivo (+), y agua destilada como control negativo (-).....119

## RESUMEN

Se transformaron explantes axénicos de veinticinco especies de la familia Cactaceae con la cepa de tipo agropina de *Agrobacterium rhizogenes* A4 con el plásmido ESC4 que contienen los genes *nptII* y *gus* para establecer cultivos de raíces transformadas. Se evaluó la eficiencia de transformación de dichas especies en diferentes concentraciones del medio basal de cultivo MS (100, 75, 50 y 25%), las cuales mostraron una gran variación incluso entre miembros del mismo género. La mayoría de las especies alcanza su pico de crecimiento máximo a los 30 o 45 días de cultivo, llegando a una fase estacionaria. La fase estacionaria de la mayoría de las especies tuvo una duración de varios meses, por lo que los cultivos de raíces transformadas se lograron establecer hasta después de cuatro a seis meses en la mayoría de las especies. Los cultivos establecidos de raíces transformadas de *Turbinicarpus lophophoroides* se cultivaron bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad donde mostraron un mayor incremento de biomasa comparado con su cultivo en oscuridad permanente. Se probó la espuma de poliuretano como soporte alternativo en el cultivo de raíces transformadas, el cual resultó en crecimiento semejante al obtenido en raíces cultivadas en agar.

Se evaluó la producción de biomasa de seis especies de cactáceas (*Escobaria chaffeyi*, *Ferocactus peninsulae*, *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, *Turbinicarpus lophophoroides*, *T. schmidickeanus* var. *shwarzii* y *T. pseudopectinatus*) en doce medios basales de cultivo diferentes. Se encontró que es necesario optimizar el tipo y concentración del medio de cultivo basal para cada especie estudiada, como se llevó a cabo en este estudio. La composición de los diferentes medios de cultivo afectó la morfología de las raíces transformadas, lo que también puede sugerir diferencias en la producción de metabolitos secundarios en estas líneas de raíces pilosas. Con a finalidad de disminuir costos de labor y de consumible se evaluó la producción de biomasa entre las de raíces transformadas cultivadas en medio de cultivo semisólido y en el sistema de inmersión temporal RITA®. No hubo diferencia significativa entre los dos tratamientos, sin embargo, las raíces

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

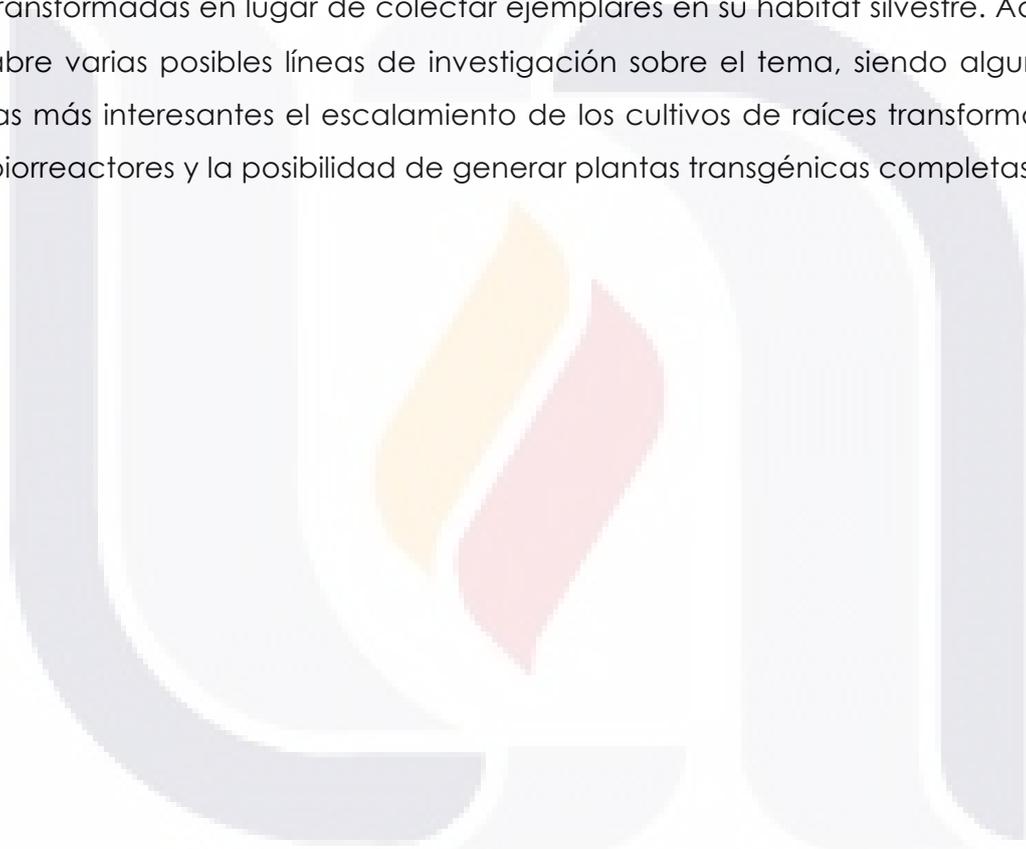
presentaban morfología homogénea y no generaron tejido calloso. Se generaron brotes a partir de los cultivos de raíces transformadas de manera espontánea. Se logró multiplicar estos brotes y aclimatarlos a condiciones de invernadero. Esto con la única finalidad de realizar estudios posteriores con este material vegetal. Mediante el análisis histoquímico para la actividad de GUS se confirmó la transformación exitosa de las raíces presuntamente transformadas mediante *A. rhizogenes*, observándose una coloración azul intensa en todos los tejidos presuntamente transformados de los cultivos ya establecidos de raíces transformadas. Se observaron diferencias en la actividad de GUS al comparar raíces transformadas y brotes (normales y vitrificados) de *E. chaffeyii*, *Turbinicarpus laui* y *T. pseudopectinatus* generados a partir de éstas mediante un ensayo fluorométrico. Se observó gran variación de la actividad de la enzima GUS entre las tres especies estudiadas, siendo *E. chaffeyii* la de mayor actividad. Las raíces transformadas mostraron mayor actividad de GUS que los brotes. Con la técnica PCR se confirmó la transferencia del T-DNA de *A. rhizogenes* al genoma de la planta amplificando los genes *rolB*, *nptII* y *gus*. También se aseguró que no se tratara del ADN de la bacteria analizando la presencia del gen *vir* que se encuentra fuera del T-DNA, por lo que no debe estar presente en tejidos vegetales transformados libres de *A. rhizogenes*.

Se detectaron betacianinas, betaxantinas y ácido betalámico en algunas especies de cactáceas. Se encontraron concentraciones significativas de ácido betalámico, precursor de estos pigmentos, en la mayoría de las especies. El contenido de betaxantinas es bajo en la mayoría de las especies, excepto en *Escobaria chaffeyii* donde fue aproximadamente 0.05 mg/g de peso fresco. El contenido de betacianinas fue mayor en *Turbinicarpus lophophoroides*, *E. chafeyii* y *T. laui*, lo que coincide con el contenido de ácido betalámico en estas especies. Se analizó el efecto del medio de cultivo sobre la producción de betalaínas en raíces transformadas de *T. laui*. La concentración de betacianinas fue mayor cuando se cultivaron en medio DKW y menor en medio WPM. Los diferentes medios de cultivo no modificaron la producción de betaxantinas en *T. laui*. Mediante la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se logró identificar al compuesto de tipo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

alcaloide más común en muchas especies de cactáceas, la hordenina, en la mayoría de las especies estudiadas. También se identificaron algunas beta-fenetilaminas, ambos compuestos son de interés farmacológico. El extracto total de raíces transformadas de *T. lophophoroides* no se presentó actividad bactericida ante la bacteria patógena *E. coli*.

Este estudio contribuye a la conservación y explotación racional de varias especies de cactáceas mexicanas al proveer un método para obtener compuestos útiles de una manera sustentable, o sea utilizando raíces transformadas en lugar de coleccionar ejemplares en su hábitat silvestre. Además, abre varias posibles líneas de investigación sobre el tema, siendo algunas de las más interesantes el escalamiento de los cultivos de raíces transformadas a biorreactores y la posibilidad de generar plantas transgénicas completas.



## ABSTRACT

Axenicly grown explants of twenty-five species of the family Cactaceae were inoculated with an *Agrobacterium rhizogenes* A4 agropine-type strain carrying the ESC4 plasmid, which contains the *nptII* and *gus* genes. The transformation efficiency of all species when cultured on different MS basal media concentrations (100, 75, 50 and 25%) showed great variation, even between members of the same genus. Most species reach their maximum growth at thirty to forty days of culture, reaching a stationary phase. The latter lasted for several months for most species, thus, hairy root cultures were established until after four to six months. Established hairy roots cultures of *Turbincarpus lophophoroides* were cultured under a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of darkness, best growth was achieved under light:dark conditions. Polyurethane foam was tested as an alternative for hairy root culture, which resulted in similar growth to the one obtained in roots grown in agar.

Biomass production was assessed for six cacti species (*Escobaria chaffeyi*, *Ferocactus peninsulae*, *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, *Turbincarpus lophophoroides*, *T. schmiedickeanus* var. *shwarzii* y *T. pseudopectinatus*) in twelve different basal culture media. We found it is necessary to optimize culture conditions for each individual species, as we did in this study. The compositions of the different media affected the hairy root morphology, which can suggest differences in secondary metabolite production in these hairy root lines. To decrease labor and consumable costs, we evaluated the production of biomass between species cultured in semisolid medium and the temporary immersion system RITA®. There was not a significant difference between these treatments, but hairy roots grown in bioreactors showed a homogenous morphology and did not generate callus tissue. Shoots were regenerated from hairy root cultures spontaneously. We managed to multiply these shoots *in vitro* and grow them in greenhouse conditions. These plants will allow us to study the morphology and other aspects of cacti regenerated plants in future investigations. We confirmed the successful

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

transformation of the hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes* with a GUS histochemical analyses, observing an intense blue coloration in the transformed tissues of the established hairy root cultures. There were differences in GUS activity when comparing transformed roots and shoots (normal and vitrified) of *E. chaffeyii*, *Turbinicarpus laui* y *T. pseudopectinatus* generated from the latter by a fluorometric assay. We observed great variation of GUS enzyme activity among the three species tested, *E. chaffeyii* had the highest activity. Transformed roots showed higher GUS activity than the regenerated plants. We also confirmed the transfer of T-DNA from *A. rhizogenes* to the plant genome by amplifying the *rolB*, *nptII* and *gus* genes by PCR. We also determined it was not bacterial contamination by amplifying the *vir* gene which is found outside the T-DNA region, so it should not be present in transformed plant tissues free of *A. rhizogenes*.

Betacyanins, betaxanthins and betalamic acid were detected in some cacti species. We found significant concentrations of betalamic acid in most species. The effect of basal culture media in betalain production was assessed in *Turbinicarpus laui*. Betacyanin concentration was higher when hairy roots were cultured in DKW medium an lower in WPM medium. We identified hordenine, the most common alkaloid-type compound in cacti, in most species studied by gas chromatography-mass spectrometry. We also identified some beta-phenethylamines, also compounds of pharmacological interest. The total extract of transformed roots did not show antibacterial activity in the pathogenic bacteria *E. coli*.

This study contributes to the conservation and rational conservation of many Mexican cacti species by providing a method to obtain useful compounds in a sustainable manner, by using transformed roots instead of collecting specimens from the wild. Also, this study opens several lines of investigation on the subject, one of the most interesting being the scaling-up of root cultures in bioreactors and the generating of complete transgenic plants.

## I. ANTECEDENTES.

### I.1. Las Cactáceas y su importancia fitoquímica.

La familia Cactaceae comprende alrededor de 1800 especies de plantas perennes suculentas (Boyle, 2007). Es endémica de América, siendo su rango de distribución desde Canadá hasta Argentina. Los miembros de esta familia son un grupo de plantas caracterizadas por altos niveles de endemismo (Ortega-Baes y Godínez-Álvarez, 2006), o sea que se encuentran restringidas a una región geográfica específica (Lomolino *et al.*, 2006). Estas plantas pueden desarrollarse en diferentes ecosistemas, aunque la diversidad más alta se encuentra en regiones áridas y semiáridas (Ortega-Baes y Godínez-Álvarez, 2006). México es el país con la mayor riqueza de especies y endemismos.

Las cactáceas juegan papeles importantes en sus ecosistemas por sus numerosas interacciones biológicas con otras plantas y animales. Estas plantas también son importantes debido a su valor ornamental (Boyle, 2007), ya que más de 300 especies de cactáceas son cultivadas para este fin. Algunas especies también representan fuentes de alimento para los humanos. Los cactus tienen algunas características ecológicas que los hacen vulnerables a las perturbaciones ambientales, como su distribución geográfica restringida, ciclo de vida largo y tasa de crecimiento individual baja. Además, los cactus también son afectados negativamente por actividades humanas, como su colecta ilegal, comercialización internacional y modificación de su hábitat. Actualmente, muchas especies de cactus se consideran amenazadas o en peligro de extinción, por lo que se les ha incluido en listas de especies en peligro de extinción (Ortega-Baes y Godínez-Álvarez, 2006). Las cactáceas han sido usadas como medicinas para tratar una variedad de enfermedades desde la época prehispánica. Muchos cactus presentan numerosas propiedades farmacológicas como diuréticos, laxantes, cardiotónicos, analgésicos, astringentes y antiparasíticos (Santos-Díaz *et al.*, 2010).

La mescalina es el alcaloide de mayor abundancia de dos especies de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cactáceas: *Lophophora williamsii* (peyote) y *Trichocereus pachanoi* (Cactus de San Pedro). Ambas especies han sido usadas por siglos como alucinógenos en rituales de culturas nativas de Norte y Sudamérica, respectivamente. Los alcaloides de *Trichocereus pachanoi* consisten principalmente de mescalina y fenetilaminas relacionadas. Se han extraído más de 56 alcaloides diferentes de *L. williamsii* (Santos-Díaz *et al.*, 2010), esta especie contiene una mezcla de mescalina y alcaloides del tipo tetrahydroisoquinolina, como pelotina, anhalonidina, lofoforina y anhalonina (Bruhn, 2008). Entre los alcaloides aislados con actividades alucinógenas, estimulantes y narcóticas de *Turbincarpus* spp. y *Ariocarpus* spp., se han encontrado siete derivados de  $\beta$ -fenetilaminas y cuatro derivados de tetrahydroisoquinolinas en especies del género *Turbincarpus* (Starha *et al.*, 1999). También se han encontrado mescalinas y otras fenetilaminas en *Opuntia cilindrica*, *Pereskia* spp., *Pereskiopsis* spp. e *Islaya* spp. Se conoce que la mescalina y sus análogos inhiben la transmisión colinérgica neurona-muscular, ya que bloquean la liberación de acetilcolina y afectan la conductancia de  $K^+$  (Santos-Díaz *et al.*, 2010). Varias especies de *Echinopsis* son utilizadas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades por médicos indígenas de Sudamérica, especialmente en Perú. Este uso se basa en sus propiedades psicoactivas por su contenido de mescalina. La especies más frecuentemente y ampliamente usadas son *Echinopsis pachanoi*, *Echinopsis peruviana* y *Echinopsis lageniformis*, los locales se refieren a éstas como Cactus de San Pedro (Ogunbodedea *et al.*, 2010).

Se identificaron las tetrahydroisoquinolinas: analidina, carnegina y salsolidina en tres especies del género *Neobuxbaumia* (*N. multiareolata*, *N. tetetzo* y *N. scoparia*) (Flores-Ortiz *et al.*, 2003). Starha (1996) encontró pequeñas cantidades de cinco alcaloides derivados de fenetilaminas y siete tetrahydroisoquinolinas en especies del cactus sudamericano *Gymnocalycium*. La especie *Cereus peruvianus* es una fuente importante de alcaloides útiles para tratar pacientes con cáncer de próstata y de mama (Oliviera y Da Machado, 2003).

Se han detectado más de 20 terpenos y esteroides en *Stenocereus*,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

*Epiphyllum, Myrtillocactus, Notocactus, Opuntia, Pereskia, Hylocereus, Lophocereus, Echinopsis y Nelloydia*, siendo el beta-sitosterol el más abundante (Santos-Díaz *et al.*, 2010). La estructura de los fitoesteroides es muy similar a los estrógenos humanos. Los esteroides vegetales pueden exhibir una acción semejante con esteroides animales, pudieran ser usados para tratar desórdenes menopáusicos o agentes anticonceptivos (Santos-Díaz *et al.*, 2010).

Las betalaínas son cromalcaloides nitrogenosos característicos de las diez familias del orden Caryophyllales, excepto la Caryophyllaceae y la Molluginaceae, las cuales acumulan antiocianinas. Las betalaínas sirven como pigmentos florales para la atracción de polinizadores y en frutos para favorecer la dispersión de semillas (Stintzing *et al.*, 2001). Las betalaínas protegen contra la luz UV, y también pueden actuar como fitoalexinas, pues muestran acción antiviral y antimicrobiana en plantas lesionadas por patógenos (Stintzing *et al.*, 2001). Se ha demostrado que pueden servir como osmorreguladores, además de tener propiedades antioxidantes y antiradicales en la planta (Cai *et al.*, 2003; Stintzing y Carle, 2004). La acumulación de pigmentos rojos durante inviernos con alta radiación y estrés por sequía pueden deberse al efecto fotoinhibidor de estos compuestos (Mosco, 2011). Las betacianinas en tallos de cactáceas, mayormente hipodermis y capas externas del clorénquima, suponen una protección de la radiación UV-B siendo que estos pigmentos tienen un pico de absorción en el rango de UV (270-280 nm) (Mosco, 2011).

Las betalaínas fueron reconocidas como colorantes de alimentos hasta principios de los años setentas. Por la diversidad estructural de sus betacianinas rojas-violeta y sus betaxantinas amarillo-naranja, se puede esperar un amplio rango de tonos (Stintzing *et al.*, 2001). Las betalaínas son pigmentos solubles en agua que son ampliamente usados como colorantes de alimentos, y tienen un amplio rango de actividades biológicas deseables como antioxidantes, antiinflamatorias, hepatoprotectoras, y anticancerígenas (Gerogiev *et al.*, 2010). Recientemente, se ha documentado que los colorantes naturales para

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

alimentos pueden inhibir la proliferación de células en una variedad de tumores humanos. Las betalainas también inhiben el crecimiento celular, inducen cambios estructurales y la fragmentación de células K562 en mieloides crónicos humanos (Osorio-Esquivel, 2011). Por otro lado, se han encontrado tres betacianinas principales en *H. polyrhizus*: betanina, filocactina y hilocerenina.

Los frutos de algunas cactáceas son una de las pocas fuentes naturales de betalainas y por esto se presentan como una alternativa atractiva para reemplazar los aditivos sintéticos, ya que éstas retienen su color a pH desde 3 hasta 7. Además, el sabor de las betalainas obtenidas a partir de estos frutos no alteran el sabor de los alimentos (Moßhammer *et al.*, 2005). La filocactina es la betacianina característica en flores y frutos de algunas cactáceas como *Schlumbergera buckleyi*. Los frutos comestibles de *Hylocereus polyrhizus* generan frutos comestibles, que son usados para colorear alimentos (Strack *et al.*, 2003).

Los frutos ricos en fitoquímicos antioxidantes, como la pitaya (*Stenocereus stellatus*), tienen un efecto benéfico, que retrasa las deficiencias del sistema nervioso central, además protegen al organismo del estrés oxidativo, reduciendo el riesgo de enfermedades crónicas, esto por su alto contenido de ácido ascórbico, fenoles y por su gran capacidad antioxidante (Beltrán-Orozco *et al.*, 2009). Prior *et al.*, (1998) también reportaron que con el consumo de 3-4 mmol Trolox eq d<sup>-1</sup>, equivalente a un consumo diario de 4 a 5 frutos de pitaya cereza o roja, o 3 o 4 frutos de pitaya blanca o amarilla, se da un incremento en la capacidad antioxidante del plasma sanguíneo.

Los fenoles tienen funciones como antibióticos, plaguicidas naturales, agentes protectores contra luz ultravioleta (UV) y como materiales aislantes para impermeabilizar las paredes celulares a gas y agua. Muchas propiedades de las plantas como su astringencia y sus efectos benéficos en la salud humana están asociadas con la presencia, tipo y contenido de sus compuestos fenólicos (Osorio-Esquivel, 2011). El consumo de polifenoles se ha correlacionado de manera inversa con la incidencia de varias enfermedades crónicas, como algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Saénz

et al., 2009). Los polifenoles más comunes encontrados en cactáceas son la quercetina y la isoramnetina (Stintzing et al., 2001; Wybraniec et al., 2007). Los polifenoles en tejido de frutos de *O. ficus-indica* cv. saboten son atractivos por sus propiedades antioxidantes (Stintzing et al., 2001).

*Opuntia* está listado en el *British Herbal Pharmacopoeia* como un remedio contra colitis, diarrea e hipertrofia prostática. El consumo de nopales se ha asociado con el tratamiento de hipoglicemia, diabetes no dependiente de insulina (tipo II), colesterol alto y obesidad (Fernández-López et al., 2002). Adicionalmente, tiene una acción antiinflamatoria y protege contra lesiones gástricas. Los extractos de flores y de frutos de cactáceas son benéficas para la hiperplasia prostática benigna (Wybraniec et al., 2007). Los xoconostles han sido usados en la medicina tradicional como tratamiento para diabetes, hipertensión, obesidad y problemas respiratorios. Recientemente, se reportó que el consumo de *O. joconostle* causa una reducción tanto en los niveles de colesterol como de glucosa sérica y un incremento en los niveles de insulina sérica. El xoconostle es una fuente rica de compuestos antioxidantes, como compuestos fenólicos y betacianinas (Osorio-Esquivel, 2011). El ácido cítrico es el ácido orgánico principal de las cactáceas, seguido por ácido málico. Las cactáceas son una buena fuente de vitamina C, mientras que los carotenoides, tiamina, riboflavina y niacina sólo se encuentran en cantidades traza (Wybraniec et al., 2007).

Los extractos de algunas cactáceas como *Nopalea cochenillifera* presentan una actividad contra microorganismos como *Candida albicans*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* (Gómez- Flores et al., 2006; Santos- Díaz et al., 2010). Robles-Zepeda et al. (2009), demostraron la actividad inhibitoria de los compuestos bioactivos de *Mammillaria huitzilopochtli* contra ocho hongos fitopatógenos. Los extractos de *Myrtillocactus geometrizans* inhiben al gusano de la plaga del maíz y a *Tenebrio molitor*, un insecto que ataca granos almacenados (Santos-Díaz et al., 2010).

## 1.2. ¿Qué son las raíces transformadas?

Las raíces transformadas se obtienen infectando tejidos de plantas con la bacteria considerada como el ingeniero genético natural, *Agrobacterium rhizogenes*, la cual es una bacteria del suelo Gram negativa (Zhou *et al.*, 2011). Porter (1991) reportó que más de 450 especies de plantas son susceptibles a la infección de *A. rhizogenes*. Cuando las plantas susceptibles son heridas en su medio natural, por un insecto o por algún daño mecánico, producen sustancias fenólicas simples como la acetosiringona que atraen a *A. rhizogenes* por quimiotaxis (Srivastava y Srivastava, 2007). Esta respuesta química induce los genes de la virulencia (*vir*), que son los responsables de transferir los fragmentos de T-DNA (ADN de transferencia) del plásmido Ri (plásmido inductor de raíces) de *A. rhizogenes* a las células de la planta. Posiblemente también son responsables de la integración cromosómica en el núcleo de las células receptoras (Zhou *et al.*, 2011; Srivastava y Srivastava, 2007). Esta interacción causa el síndrome de la raíz pilosa, donde pequeñas raíces surgen en el sitio de infección y proliferan rápidamente, ya que el plásmido Ri también codifica para la síntesis de auxinas. Las raíces transformadas usualmente aparecen entre una a cuatro semanas. Después de un corto periodo de adaptación, los cultivos de raíces transformadas pueden ser usados para producir metabolitos secundarios, semillas artificiales o plantas transgénicas (Georgiev *et al.*, 2007).

La mayoría de las cepas de *Agrobacterium* contienen solamente un T-DNA, pero algunos (como los de los plásmidos Ri) transfieren dos T-DNAs independientes, conocidos como T<sub>L</sub>-DNA y T<sub>R</sub>-DNA (Nilsson y Olsson 1997). Ambos se transfieren y se integran de manera independiente en el genoma de la planta huésped, pero la transferencia de T<sub>L</sub>-DNA es esencial para la inducción del síndrome de las raíces pilosas, y la transferencia de T<sub>R</sub>-DNA no provoca la formación de raíces en cultivos transformados (Nilsson y Olsson 1997; Sevón y Oksman-Caldentey, 2002). El T<sub>R</sub>-DNA contiene los genes (*iaaM* e *iaaH*) responsables de la biosíntesis de auxinas y los genes responsables de la síntesis de las opinas manopinas (*mas1*´ y *mas2*´) y agropina (*ags*) (Georgiev *et*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

*al.*, 2007). Las opinas son utilizadas por *A. rhizogenes* como la única fuente de carbono y nitrógeno para su crecimiento (Srivastava y Srivastava, 2007). El T-DNA tiene 18 ORFs (marcos abiertos de lectura), cuatro de los cuales son esenciales para la formación de raíces pilosas: ORF10, ORF11, ORF12 y ORF15, estos corresponden a los genes *rolA*, *rolB*, *rolC* y *rolD* respectivamente. El gen *rolB* es absolutamente esencial para la inducción de raíces pilosas (Georgiev *et al.*, 2007).

Una transformación genética exitosa puede demostrarse de dos formas: directa o indirectamente, detectando T-DNA u opinas, respectivamente (Sevon y Oksman- Caldentey 2002). Un marcador bioquímico (indirecto) efectivo para demostrar la naturaleza de la transformación del cultivo de raíces es la detección de la síntesis de opinas (Srivastava y Srivastava, 2007). Bais *et al.* (2001), confirmaron la transformación del cultivo de raíces pilosas por medio de la detección de opinas por electroforesis en papel. Aunque la síntesis de opinas es un buen indicador de que las raíces pilosas son en realidad raíces transformadas, la expresión de los genes que inducen la producción de opinas pueden volverse inestables con el tiempo (Sevon y Oksman- Caldentey 2002; Srivastava y Srivastava, 2007).

Un marcador genético (directo) confiable para confirmar la transformación de las raíces, es la localización del T-DNA en el genoma de la planta huésped. Existe un gran número de técnicas para demostrar y localizar la incorporación de T-DNA en el ADN cromosómico de la planta receptora, como la hibridación Southern. Otros métodos para verificar la naturaleza transformada de un tejido incluyen la detección la presencia de un gen foráneo en la secuencia de ADN por Dot blotting, la localización de T-DNA en tejido vegetal por hibridación *in situ*, la verificación de transgenes, y la determinación de cambios en una secuencia genética particular por la reacción de polimerasa en cadena (PCR). Es importante verificar que las plantas estén curadas de *Agrobacterium* para evitar falsos positivos si se usa el PCR (Srivastava y Srivastava, 2007).

El fenotipo de la raíz pilosa se caracteriza por un crecimiento rápido e

independiente de hormonas, falta de geotropismo, ramificación lateral y estabilidad genética (Guillon *et al.*, 2006; Rao y Ravishankar, 2002). Las raíces transformadas crecen tan rápido o incluso más rápido que las raíces normales (no transformadas). Esto se debe a que no requieren fitohormonas en el medio y a su ramificación extensa, la cual resulta en la presencia de muchos meristemos (Rao y Ravishankar, 2002).

La característica más importante de las raíces transformadas es su capacidad de sintetizar metabolitos secundarios específicos a la especie de la planta de la que se han desarrollado. Este fenómeno natural ha sido explotado en la biotecnología para generar cultivos de raíces transformadas (Zhou *et al.*, 2011).

### **1.3. Usos de las raíces transformadas.**

El amplio y diverso grupo de compuestos químicos producidos por las plantas, que incluyen alcaloides, antraquinonas, antocianinas, flavonoides, saponinas y terpenos, han jugado un papel importante en las industrias: farmacéutica, cosmética, perfumería, tintes, y saborizantes. Las plantas producen muchos de estos compuestos a través del metabolismo secundario. Los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento de la planta, y por esto se producen en pequeñas cantidades (Kim *et al.*, 2002). Sin embargo, estos productos exhiben muchas funciones biológicas vitales para la sobrevivencia, tales como responder al estrés (Hirai *et al.*, 2004) o mediadores de la polinización (Osbourn *et al.*, 2003). A la fecha, aún se desconoce la función exacta de la mayoría de los metabolitos secundarios (Kim *et al.*, 2002).

Los metabolitos secundarios se acumulan en tejidos especializados (por ejemplo en tricomas en diferentes etapas de desarrollo), haciendo que su extracción, aislamiento y purificación sea difícil. Estos compuestos usualmente tienen estructuras muy complicadas y/o exhiben quiralidad. Como consecuencia, en muchos casos la síntesis orgánica no es económicamente viable, por lo que la extracción de plantas silvestres ha sido el método más utilizado para obtener estos importantes metabolitos secundarios (Srivastava y

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Srivastava, 2007). Sin embargo, cosechar las plantas por sus metabolitos secundarios es un método destructivo, por lo que ha crecido el interés de generar raíces transformadas de especies de plantas medicinales (Guillon *et al.*, 2006; Kieran, 2001). Una de las limitaciones más importantes para la explotación comercial de raíces transformadas son los biorreactores apropiados para su cultivo (Gerogiev *et al.*, 2010). La mayor parte de los trabajos que examinan el crecimiento de raíces transformadas en biorreactores se ha enfocado en la producción de fitoquímicos (Ono y Tian, 2011).

Desde el descubrimiento de la morfina hace más de dos siglos, los alcaloides siguen siendo uno de los grupos más estudiados de los metabolitos secundarios de plantas. Actualmente, se conocen más de 15,000 alcaloides diferentes y se clasifican en diferentes subclases de acuerdo a su estructura química (Oksman- Caldentey *et al.*, 2007). A diferencia de los fenoles vegetales, que son abundantes a través del reino vegetal, los alcaloides se encuentran restringidos a ciertas familias de plantas o hasta ciertas especies. El aislamiento de alcaloides a partir de plantas es relativamente fácil comparado a otros compuestos vegetales. Esto ha facilitado el análisis y aislamiento de cantidades muy pequeñas de varios alcaloides usando métodos cromatográficos diversos (por ejemplo LC y GC) y el conocimiento de su estructura por medio de sistemas espectroscópicos (MS y NMR) (Oksman-Caldentey *et al.*, 2007).

Aunque los alcaloides han sido usados por décadas, se conoce muy poco sobre la biosíntesis de estos valiosos metabolitos secundarios (Oksman-Caldentey *et al.*, 2007). Su biosíntesis normalmente comienza a partir de amino ácidos e involucra docenas de intermediarios y enzimas (van der Heijden *et al.*, 2004). Muchas de estas enzimas han sido localizadas en compartimentos subcelulares diferentes al citosol. No sólo los genes enzimáticos sino también los reguladores maestros (por ejemplo factores de transcripción) tienen un papel importante en el control de la maquinaria de las rutas biosintéticas (van der Fits y Memelink, 2000). Los alcaloides purificados a partir de plantas, proveen muchos de los medicamentos utilizados en tratamientos de quimioterapia. La

productividad de metabolitos secundarios en plantas es baja, haciendo su producción comercial costosa (Karimi *et al.*, 2010).

La mayor ventaja de las raíces transformadas es que exhiben una capacidad biosintética igual o mayor para producir metabolitos secundarios comparado con las plantas madre (Kim *et al.*, 2002). Los cultivos de raíces transformadas han mostrado acumular metabolitos secundarios que sólo se concentran en la parte aérea de esa misma planta intacta. Además, las raíces transformadas son capaces de regenerar plantas enteras viables y de mantener su estabilidad genética durante su subcultivación y regeneración. Se ha encontrado que los cultivos de raíces transformadas también producen un espectro de metabolitos secundarios que no están presentes en la planta madre. Un sistema de raíces transgénicas, también ofrece un gran potencial para introducir genes adicionales en el plásmido Ri (especialmente con genes modificados) a células vegetales con sistemas donde *A. rhizogenes* sea el vector. Estos cultivos son una herramienta valiosa para el estudio de las propiedades bioquímicas y el perfil de expresión de genes de rutas metabólicas. Los cultivos de raíces transformadas también pueden usarse para dilucidar las enzimas claves e intermediarias involucradas en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Srivastava y Srivastava, 2007).

Las raíces transformadas son capaces de regenerar plantas enteras viables, y éstas son genéticamente estables. Sin embargo, en algunas ocasiones, estas plantas transgénicas muestran fenotipos alterados comparados con los controles. Las plantas regeneradas a partir de raíces transformadas (con el plásmido Ri) muestran el síndrome de las raíces pilosas, una expresión combinada del loci *rolABC* del plásmido Ri. Cada locus es responsable de una alteración fenotípica: *rolA* está asociado al acortamiento de los internodos y a las hojas arrugadas; *rolB* es responsable de los estigmas protuberantes y a la longitud reducida de los estambres; *rolC* causa el acortamiento de los internodos y una dominancia apical reducida. Las plantas pueden ser regeneradas de manera espontánea (directamente de las raíces) a partir de los cultivos de raíces transformadas o transfiriendo las raíces a un medio que contenga hormonas. El crecimiento rápido de las raíces

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

transformadas en medios libres de hormonas y la alta frecuencia de regeneración de plántulas permite la propagación clonal de fenotipos selectos (Palazon *et al.*, 1997). En los cultivos *in vitro*, las plantas que se regeneran a partir de raíces transformadas muestran crecimiento rápido, mayor formación de brotes laterales y rápido desarrollo de hojas, lo que los hace útiles para la micropropagación de plantas que son difíciles de multiplicar (Pérez-Molphe y Ochoa-Alejo, 1998). Los fenotipos alterados que son producto de plantas regeneradas a partir de raíces transformadas han mostrado ser útiles en programas de reproducción y mejoramiento de plantas (Giri y Narasu, 2000).

Los programas clásicos de reproducción de árboles son lentos, sin innovación y es difícil introducir genes para su manipulación genética por medio del entrecruzamiento de líneas madre. La transformación mediada por *A. rhizogenes* puede ser una alternativa útil, rápida, así como directa para la introducción y expresión de caracteres específicos. Se ha demostrado que se pueden mejorar especies leñosas recalcitrantes como el manzano, durazno, olivo y cerezo, por medio de la regeneración de árboles a partir de raíces transformadas. La transformación mediada por *A. rhizogenes* tiene el potencial de introducir genes foráneos específicos a sistemas de radicales (por ejemplo, resistencia a patógenos o plagas y resistencia a metales pesados) (Giri y Narasu, 2000).

Con la excepción de las secuencias de las orillas (bordes), ninguna de las otras secuencias del T-DNA se requieren para la transferencia. El resto del T-DNA puede ser remplazado con ADN foráneo introducido a células de las cuales plantas completas pueden regenerarse. Estas secuencias de ADN foráneas pueden heredarse establemente de manera Mendeliana (Zambryski *et al.*, 1989). La transformación mediada por *A. rhizogenes* tiene la ventaja de que cualquier gen foráneo de interés colocado en el vector binario puede ser transferido al clon transformado (Giri y Narasu, 2000). El papel de los genes *rol* en la oncogénesis no se comprende bien. Los oncogenes causan muchas alteraciones bioquímicas y fisiológicas en plantas transformadas y parecen actuar en una manera compleja, y en este aspecto son semejantes a los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

oncogenes animales (Bulgakov, 2008).

Las raíces transformadas no solo sirven para la síntesis de compuestos valiosos utilizados en las industrias farmacéutica, de alimentos y del perfume, sino también puede aplicarse a la degradación y biorremediación de sustancias tóxicas o decoloración de tintes (Pati *et al.*, 2009). Además, se ha reportado la producción de anticuerpos monoclonales a partir de raíces transformadas (Giri y Narasu, 2000). Otra ventaja de los cultivos de raíces transformadas es para los estudios enzimológicos. En raíces transformadas la proporción de tejido meristemático es alto, y el contenido de fenoles es menor que en raíces de plantas normales, lo que lleva a una mayor actividad enzimática (Giri y Narasu, 2000). Se han desarrollado también semillas artificiales encapsulando segmentos de raíces y primordios de vástagos. Como por ejemplo, los ápices de las raíces transformadas de *Panax ginseng* se han criopreservado; mismas que pueden regenerarse y cultivarse cuando sea necesario (Yoshimatsu *et al.*, 1996).

La habilidad para producir y almacenar alcaloides es considerada una de las características más importantes de varias especies de cactáceas. Los estudios que pretenden incrementar los niveles de alcaloides en tejidos vegetales son de gran importancia para su producción comercial, ya que los alcaloides presentan propiedades farmacéuticas y medicinales. El uso de cultivos vegetales para sintetizar productos naturales a gran escala se ha incrementado en los últimos veinte años y puede ser un método alternativo para incrementar la producción de alcaloides por cultivos de tejidos de cactáceas (Braz de Oliveira y Pires da Silva, 2003). González-Díaz *et al.* (2006), evaluaron la susceptibilidad de 65 especies de 22 géneros diferentes de cactáceas mexicanas a la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*. Treinta y cuatro de las especies evaluadas generaron raíces transformadas. También demostraron que las raíces transformadas de cactus conservan la misma capacidad de síntesis de compuestos alcaloides que las raíces normales (González-Díaz *et al.*, 2006).

#### **I.4. ¿Cómo se cultivan las raíces transformadas?**

Existe una gran variedad de fórmulas de medios basales disponibles para el cultivo de tejidos vegetales, estos difieren en concentración de sales totales (fuerza iónica) y nitrógeno. La forma y la cantidad de nitrógeno en el medio tienen diferentes efectos en la tasa de crecimiento, morfología y potencial de regeneración celular (Jain y Minocha, 2000). El procedimiento utilizado para inducir las raíces pilosas incluye el precultivo de explantes (partes de plantas heridas) y el cultivo de explantes con suspensiones de *A. rhizogenes* en condiciones asépticas. Los explantes son infectados con cepas de *A. rhizogenes* ya sea por inoculación directa con suspensiones bacterianas incubadas en un medio sólido, o por co-cultivo en medio líquido (Zhou *et al.*, 2010). En ambos casos, los explantes infectados deben ser transferidos a un medio sólido con antibióticos para eliminar las bacterias. Las transformaciones genéticas exitosas pueden corroborarse detectando T-DNA. Después de un corto periodo de adaptación en medios de Murashige y Skoog o Gamborg B5 libres de hormonas, los cultivos de raíces pilosas pueden ser usados para producir metabolitos y proteínas animales recombinantes (Georgiev *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2010).

La biosíntesis de metabolitos secundarios en raíces transformadas es controlada genéticamente, pero también es fuertemente influenciada por factores nutricionales y ambientales. Para mantener una densidad alta en el cultivo de raíces, las condiciones del cultivo deben mantenerse a niveles óptimos. La composición del medio de cultivo afecta la producción de metabolitos secundarios (Srivastava y Srivastava, 2007).

Las variables que han sido examinadas por su influencia en el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios en raíces transformadas incluyen: diferentes medios basales, niveles de sacarosa, el suministro de oxígeno y de reguladores del crecimiento, la naturaleza de las fuentes de nitrógeno y sus cantidades relativas, así como la concentración de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fosfatos. Se han reportado varios factores físicos que afectan la producción de metabolitos secundarios de raíces transformadas como: luz, temperatura, presencia de químicos que inducen estrés físico y la inducción de campos magnéticos (Srivastava y Srivastava, 2007).

El medio y la estimulación son maneras eficientes para incrementar la producción de metabolitos secundarios en raíces transformadas. La composición del medio es de gran importancia tanto en los procesos de crecimiento de raíces transformadas como en la producción de metabolitos secundarios en dichos sistemas de cultivo. Comúnmente, la composición del medio se modifica con respecto a la concentración de fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y otros macronutrientes. Algunos estudios han demostrado que las raíces transformadas que son cultivadas en medios convencionales como MS, B5 y White, dejan de crecer y comienzan a desarrollar tejido calloso. Las raíces pilosas de *Azadirachta indica* cultivadas en medio basal Ohyama y Nitsch produjeron un máximo rendimiento de azadiractina comparado con los rendimientos observados cuando fueron cultivadas en los medios basales de Gamborg y Murashige y Skoog (Satdive *et al.*, 2007).

Li y sus colegas (2008) mostraron que el medio líquido MS a la mitad de su concentración, fue el más apropiado para el crecimiento de raíces y producción del alcaloide tropano en *Anisodus acutangulus*. Romero *et al.*, (2009) reportaron que el uso del medio B5 de Gamborg a la mitad de su concentración suplementado con 3.0% de sacarosa, fue dos veces más efectivo que cualquier otro medio para mantener la producción de raíces transformadas en cultivos de *Echinacea*. En *Psoralea corylifolia*, se obtuvo un incremento en el rendimiento de daidzeína al incrementar el nivel de sacarosa en el medio, mientras que la producción de genisteína se vio favorecida al disminuir el nivel de sacarosa en el medio (Shinde *et al.*, 2010). La liberación de betacianina en raíces transformadas de *Beta vulgaris* se logró limitando el suministro de oxígeno. Un tratamiento de permeabilización usando Tween-80 (Polyoxietileno sorbilano monolaurato) provocó la liberación de altas cantidades de hiociamina en raíces de *Datura innoxia* sin efectos perjudiciales (Srivastava y Srivastava, 2007).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los reguladores y promotores de crecimiento han sido utilizados para incrementar el desarrollo de raíces transformadas y la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales. Las fitohormonas influyen diversos procesos del desarrollo de una planta, desde la germinación de la semilla hasta la formación de las raíces, brotes y flores. Éstas están involucradas en el crecimiento de la planta, su morfogénesis, y el metabolismo secundario. Bajo la mayoría de las circunstancias, una sola hormona puede regular múltiples rutas de biosíntesis de metabolitos y al mismo tiempo diferentes hormonas pueden influir en una misma ruta. El ácido jasmónico y su éster metílico, colectivamente llamados jasmonatos, inducen la biosíntesis de una variedad de metabolitos secundarios en diferentes especies vegetales, incluyendo alcaloides, terpenoides, glucosinolatos y fenilpropanoides (Memelink *et al.*, 2001; van der Fits y Memelink, 2000). Se ha demostrado que el óxido nítrico (NO) tiene un papel clave en la red de señalización que lleva a la biosíntesis de los metabolitos secundarios en plantas. Pan *et al.* (2010), mostraron que el tratamiento con ácido salicílico y etileno (etefón) resulta en un incremento significativo de vinblastina, vindolina y catarantina; mientras que el ABA y el ácido giberélico tuvieron una influencia negativa en la acumulación de estos tres importantes alcaloides encontrados en *C. roseus*.

Los promotores abióticos también juegan un papel importante en la acumulación de metabolitos secundarios en cultivos de raíces transformadas. Abbasi *et al.* (2007), evaluaron los efectos de la luz en la tasa de crecimiento y biosíntesis de CADs (derivados del ácido caféico) en cultivos de raíces de *Echinacea purpurea*. Sus resultados mostraron que los cultivos que recibieron el tratamiento con luz mostraban una morfología engrosada de manera radial comparándolos con los controles que fueron tratados en la oscuridad. Las raíces tratadas con luz acumularon niveles de antocianinas mayores, y la biosíntesis de CADs también se incrementó de manera significativa. Esto se debe a que la actividad de la fenilalanina amonio liasa se ve estimulada por la presencia de la luz (Abbasi *et al.*, 2007).

Durante años recientes, la metodología de Superficie de Respuesta se ha usado para la optimización en el desarrollo de muchos procesos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

biotecnológicos (Zhou *et al.*, 2011). Esta metodología consiste en un conjunto de técnicas utilizadas para estudiar la relación entre una respuesta y un conjunto de factores o variables independientes donde el objetivo es optimizar esta respuesta (Andressen *et al.*, 2009). Aplicando este modelo en las raíces transformadas de *Datura stramonium*, la optimización del nivel de hiosciamina fue de 212.7% al utilizar el medio B5-OP (optimizado) comparado con el control (medio B5) (Ryad *et al.*, 2010). El medio puede ser optimizado para el crecimiento de las raíces y para la producción de metabolitos de interés de manera simultánea, o se puede desarrollar una estrategia de dos etapas (crecimiento seguido por bioproducción), dependiendo de las relaciones entre la biosíntesis del producto y los parámetros necesarios para el crecimiento de las raíces (Georgiev *et al.*, 2007).

El hecho de que las raíces transformadas individuales tengan diferentes requerimientos de nutrientes, sugiere que las condiciones de cultivo deben ser optimizadas de manera separada para cada especie. La ingeniería metabólica ofrece nuevas perspectivas para mejorar la producción de metabolitos secundarios por medio de la sobre-expresión de genes individuales en cultivos de raíces pilosas (Srivastava y Srivastava, 2007). La producción de metabolitos secundarios se ha mejorado gracias a la localización de enzimas que se sobreexpresan en la planta (Hu and Du, 2006).

Algunas de las ventajas de los cultivos de raíces transformadas sobre los cultivos de células en suspensión son: estabilidad genotípica y bioquímica, citodiferenciación y su crecimiento en medio libre de hormonas. Estos factores juegan un papel vital durante la producción de metabolitos secundarios. Los cultivos de raíces transformadas exhiben la misma o mayor capacidad biosintética de producción de metabolitos secundarios comparados a sus raíces normales. Las raíces transformadas también han mostrado sintetizar nuevos metabolitos secundarios, que no están presentes en el tejido control (no transformado) (Srivastava y Srivastava, 2007).

El cultivo de raíces transformadas ofrece nuevas oportunidades para la producción de metabolitos secundarios de plantas *in vitro*. La aplicación de los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cultivos de raíces transformadas en la biotecnología es prometedor ya que ofrece una producción alta y estable de metabolitos secundarios, un crecimiento rápido independiente de auxinas y la posibilidad de adaptarse a sistemas de reactores. Estas ventajas convierten a las raíces pilosas en buenas alternativas a las tecnologías clásicas y hasta para cultivos de células en suspensión (Zhou *et al.*, 2011).

## **II. JUSTIFICACIÓN.**

La mayoría de las Cactáceas son especies amenazadas con distribuciones restringidas y poblaciones muy reducidas. Su estudio desde el punto de la fitoquímica, está limitado por su talla muy pequeña, desarrollo muy lento y baja eficiencia reproductiva. Por esto, no se ha podido aprovechar su capacidad de producir una gran cantidad de compuestos químicos (metabolitos secundarios) potencialmente útiles como fármacos, colorantes, antibióticos, plaguicidas naturales, etc. Las raíces transformadas de cactáceas representan una alternativa al uso de plantas tomadas del ambiente natural para el estudio y producción de los metabolitos de interés propios de estas especies. En este estudio estamos proponiendo un sistema biotecnológico para generar biomasa como fuente de metabolitos en condiciones de laboratorio.

## **III. HIPÓTESIS DE TRABAJO.**

Los diferentes tipos de medios y condiciones de cultivo hacen variar el desarrollo de las raíces transformadas, por lo tanto es posible fomentar un patrón de cultivo en condiciones tales que promueva una mayor generación de biomasa.

La capacidad biosintética en las raíces transformadas es igual o mayor a las mismas especies en condiciones naturales, por lo que las raíces transformadas representan una alternativa para la producción de compuestos de interés.

## IV. OBJETIVOS.

### IV.1. Objetivo General.

Caracterizar el desarrollo *in vitro* y conocer la capacidad biosintética de raíces transformadas de varias especies de Cactáceas.

### IV.2. Objetivos particulares.

**IV.2.a.** Generar y caracterizar el desarrollo *in vitro* de las raíces transformadas bajo diferentes medios y condiciones de cultivo.

**IV.2.b.** Llevar a cabo la caracterización molecular de las raíces transformadas obtenidas.

**IV.2.c.** Realizar un escrutinio fitoquímico de betalaínas y alcaloides en las raíces transformadas y las mismas especies en condiciones naturales para comparar su capacidad biosintética de dichos compuestos.

**IV.2.d.** Analizar los compuestos de posible interés detectados en las raíces transformadas y caracterizar su actividad biológica.

## V. METODOLOGIA.

### V.1. Etapa previa.

#### V.1.a. Material vegetal.

Se utilizaron cultivos *in vitro* de 25 especies diferentes de Cactáceas, pertenecientes a las subfamilias Cactoideae, Opuntioideae y Pereskioideae, tomadas del programa de micropropagación llevado a cabo en el Laboratorio de la Unidad de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Las especies utilizadas se muestran en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Listado de especies utilizadas en este estudio, distribución y observaciones. \*Categoría en la Lista Roja de la UICN.

<b>Especie</b>	<b>Distribución</b>	<b>Observaciones</b>
<i>Echinocactus grusonii</i>	Querétaro y Zacatecas	Amenazado por colecta ilegal. *En peligro
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Zacatecas	Uso medicinal, forraje y fabricación de dulce (biznaga y acitrón) *Casi amenazado
<i>Echinocereus ferreirianus</i> var. <i>lindsayi</i> ( <i>E. lindsayi</i> )	Baja California, Baja California Sur	Uso ornamental. *Preocupación menor
<i>Echinocereus knippelianus</i>	Coahuila y Nuevo León	Amenazado por colecta ilegal. *Preocupación menor
<i>Echinocereus schmollii</i>	Querétaro	Amenazado por actividades antropogénicas (minería y agricultura) *En peligro
<i>Escobaria chaffeyii</i>	México (Chihuahua y Coahuila) y Estados Unidos (Texas)	*Preocupación menor
<i>Escontria chioioides</i>	Guerrero, Michoacán, Oaxaca, Puebla	Domesticada, frutos comestibles. *Preocupación menor
<i>Ferocactus peninsulae</i>	Baja California y Baja California Sur	Uso ornamental y como alimento de ganado.

		*Preocupación menor
<i>Isolatocereus dumortieri</i> ( <i>Stenocereus dumortieri</i> )	Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México Distrito Federal, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Veracruz	Uso ornamental, como combustible y frutos comestibles. *Preocupación menor
<i>Mammillaria bocasana</i> var. <i>bocasana</i>	San Luis Potosí y Zacatecas	Uso ornamental en el comercio internacional. *Preocupación menor
<i>Mammillaria carmenae</i>	Tamaulipas	Uso ornamental. *Peligro crítico
<i>Mammillaria theresae</i>	Durango	Uso ornamental. *Peligro crítico
<i>Matucana madisoniorum</i>	Perú	Uso ornamental y venta ilegal en el mercado internacional. *Peligro crítico
<i>Melocactus curvispinus</i> var. <i>curvispinus</i> ( <i>M. oaxacensis</i> )	Colombia, Costa Rica, Cuba, Curazao, Guatemala, Honduras, México (Chiapas, Colima, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Veracruz), Nicaragua, Panamá, Venezuela	Uso ornamental, para hacer dulces y bebidas medicinales. *Preocupación menor

<i>Myrtillocactus schenckii</i>	Guatemala, México (Chiapas, Oaxaca, Puebla)	Frutos comestibles. *Preocupación menor
<i>Opuntia amyclae</i>	México	*Información insuficiente
<i>Opuntia ficus-indica</i>	México	Uso medicinal. *Información insuficiente
<i>Opuntia macrocentra</i>	México (Chihuahua, Coahuila, Durango, Sonora) y Estados Unidos (Arizona, Nuevo México, Texas)	Uso ornamental. *Preocupación menor
<i>Peniocereus serpentinus</i> ( <i>Nyctocereus serpentinus</i> )	Aguascalientes, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sinaloa	Uso ornamental. *Preocupación menor
<i>Polaskia chichipe</i>	Oaxaca y Puebla	Frutos comestibles *Preocupación menor
<i>Stenocereus stellatus</i>	Morelos, Oaxaca y Puebla	Uso ornamental, frutos comestibles, forrajes, bebidas alcohólicas y ornamental. *Preocupación menor

<i>Stenocereus thurberi</i> var. <i>thurberi</i>	México (Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Sinaloa) y Estados Unidos (Arizona)	Construcción de casas y medicinal. *Preocupación menor
<i>Turbincarpus hoferi</i>	Nuevo León	Uso ornamental y colecta ilegal. *Peligro crítico
<i>Turbincarpus laui</i>	San Luis Potosí	Uso ornamental. *Peligro crítico
<i>Turbincarpus lophophoroides</i>	San Luis Potosí	Uso ornamental y colecta ilegal. *Casi amenazada
<i>Turbincarpus pseudopectinatus</i>	Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas	Uso ornamental y colecta ilegal. *Preocupación menor
<i>Turbincarpus pseudomacroechele</i> var. <i>pseudomacroechele</i>	Hidalgo y Querétaro	Uso ornamental y medicinal. *En peligro
<i>Turbincarpus schmiedickeanus</i> var. <i>curvispinus</i>	Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas	Uso ornamental y colecta ilegal. *Casi amenazada
<i>Turbincarpus schmiedickeanus</i>	Nuevo León, San Luis	Uso ornamental y colecta

---

var. <i>schwarzii</i>	Potosí, Tamaulipas	ilegal. *Casi amenazada
<i>Turbinicarpus subterraneus</i> ( <i>Gymnocactus subterraneus</i> )	Nuevo León	Uso ornamental. *En peligro
<i>Turbinicarpus swoboda</i>	Nuevo León	Uso ornamental y colecta ilegal. *Peligro crítico

---

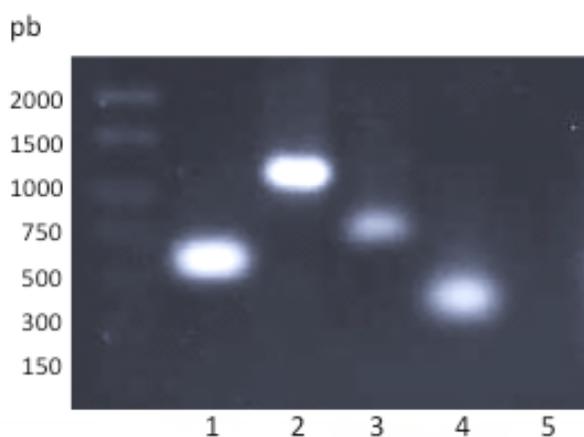
**V.1.b. Mantenimiento de la cepa A4 de *Agrobacterium rhizogenes*.**

Se utilizó la cepa tipo agropina A4 de *Agrobacterium rhizogenes* que contiene el plásmido silvestre pRiA4 que confiere el fenotipo de la raíz pilosa, y el vector binario pESC4 que contiene el gen *nptII* (con el promotor y terminador *nos*), y el gen *gus* (con el promotor *cab* y el terminador *ocs*) en la región T-DNA (Jofre-Garfias *et al.* 1997). La bacteria se cultivó en medio YMB líquido (Hooykaas *et al.*, 1997) con 50 mg/L de rifampicina y 50 mg/L de kanamicina a 28° C. El cultivo se mantuvo a lo largo del proyecto y se verificó por medio de PCR la presencia de los plásmidos de interés cada seis meses (Fig. 1). Para esto, se extrajo ADN genómico total con cloruro de sodio TRIS-EDTA-triton (STET) y lisozima para amplificar los genes *rolB*, *nptII*, *gus*, *virD1* y como control negativo se utilizó el primer *Vtc* que amplifica el gen que codifica para la cápside del virus de la tristeza de los cítricos (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Listado de oligos utilizados para análisis por PCR de la bacteria *A. rhizogenes* y de cultivos de raíces transformadas de cactáceas establecidas por transformación mediada por *A. rhizogenes* A4.

Gen	Secuencias de oligos 5'-3'	Tamaño del producto (pb)
<i>nptII</i>	TATTCGGCTATGACTGGGCA	517
	GCCAACGCTATGTCCTGAT	
<i>rolB</i>	ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA	780
	TTAGGCTTCTTCTTCAGGTTACTGCAGC	
<i>gus</i>	GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG	1200
	GTTACGCGTTGCTTCCGCCA	
<i>virD1</i>	ATGTCGCAAGGACGTAAGCCCA	450
	GGAGTCTTTCAGCAT GGAGCAA	
<i>Vtc<sup>z</sup></i>	GGTTGAACCATGGACGACGAAACAAAGAA	720
	ATTG	
	GGAACTCCACCATGGCGATAGAAACCGGGA	
	ATCGG	

<sup>z</sup>Control negativo



**Figura 1.** Detección de los genes *rolB*, *gus*, *nptII*, *virD1* y *Vtc* en ADN de *A. rhizogenes*. Se utilizaron oligos para amplificar *rolB*, *gus*, *nptII*, *virD1* y *Vtc* (control negativo) en las reacciones corridas en los carriles 1, 2,3,4 y 5.

**V.2. Con respecto al objetivo particular referente a la caracterización el desarrollo *in vitro* de las raíces transformadas bajo diferentes medios y condiciones de cultivo.**

**V.2.a. Inducción de raíces transformadas.**

El material vegetal utilizado fueron brotes creciendo de forma axénico *in vitro*. El tamaño y grosor de los brotes fue muy variable, dependiendo de la especie en particular. En todos los casos, se eliminó la parte apical y basal de los brotes y el tejido restante se cortó en segmentos transversales o discos de aproximadamente 4 mm de ancho. Se usaron 40 discos de tejido de cada una de las especies de Cactáceas utilizadas. Los discos se incubaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962; Apéndice 1) líquido sin hormonas conteniendo 100 mg/L de ácido cítrico y ácido ascórbico como antioxidantes. Los explantes se sumergieron en 50 mL de medio MS líquido con acetosiringona 200 mM y  $1 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup> de *A. rhizogenes* A4 por 30 minutos. Se eliminó el exceso de líquido de los explantes usando gasa estéril. Los explantes se incubaron en cajas Petri con 25 mL de medio MS semisólido en la obscuridad por 72 horas y después se sumergieron en medio MS líquido con 50 mg/L kanamicina y 250 mg/L cefotaxima. Los explantes se incubaron en la obscuridad a 25° C. Se subcultivaron cada 60 días hasta que se obtuvieran cultivos de raíces

transformadas para ser utilizados en estudios posteriores.

#### **V.2.b. Determinación del efecto de las diferentes concentraciones del medio de cultivo MS en la inducción de raíces transformadas.**

Se realizaron cuatro tratamientos diferentes: medio basal MS semisólido al 100, 75, 50 y 25% de su concentración conteniendo cefotaxima (250 mg/L) como antibiótico para eliminar a *A. rhizogenes* y kanamicina (50 mg/L) como agente de selección. Se transfirieron diez explantes a cada tratamiento del medio MS de selección. Las cajas se mantuvieron en la obscuridad a temperatura ambiente hasta observar la aparición de raíces. Se registró el crecimiento (en longitud) de las raíces obtenidas cada 15 días por un periodo de 60 días. Esto se realizó para cada una de las treinta especies mencionadas anteriormente. El Cuadro 3 muestra el porcentaje de explantes que generaron raíces presuntamente transformadas, el número de raíces generadas por explante y la longitud (en mm) de las raíces obtenidas para cada tratamiento y para el total de los explantes. Se realizaron curvas de cinética de crecimiento para todas las especies. Se utilizó el promedio del total de explantes que generaron raíz para analizar cada tratamiento. El crecimiento relativo se calculó utilizando la fórmula:  $R = (\ln n_2 - \ln n_1) / t_2 - t_1$  donde  $n_2$  es la longitud final (longitud alcanzada después de 15, 30, 45 y 60 días respectivamente),  $n_1$  es la longitud inicial;  $t_2$  es el tiempo final (15, 30, 45 y 60 días respectivamente) y  $t_1$ , el tiempo inicial.

#### **V.2.c. Efecto del fotoperiodo y del medio cultivo en el crecimiento de las raíces transformadas.**

Se utilizaron los medios MS y el Gamborg B5 (Gamborg *et al.* 1968) al 100 y al 50% de su concentración. Se añadió 3% de sacarosa y 8 g/L de agar (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) como agente gelificante a al medio MS a su concentración completa, y se ajustó el pH a 5.7 antes de esterilizar. Se añadió 2% de sacarosa y 3 g/L de Phytigel (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) como agente gelificante a al medio B5 a su concentración completa, y se ajustó el pH a 5.5 antes de esterilizar. Se utilizaron recipientes plásticos circulares, con un

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

diámetro de 10 cm y una profundidad de 3.5 cm con 200 mL de medio semisólido.

Las raíces se incubaron  $3 \pm 0.25$  g de raíces transformadas de *Turbinicarpus lophophoroides* a 25°C bajo condiciones de obscuridad y bajo un fotoperiodo de luz:obscuridad 16:8 ( $54 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Se tomó el peso fresco después de 30 días. Se realizaron cinco réplicas por tratamiento.

#### **V.2.d. Efecto del soporte y del medio cultivo en el crecimiento de las raíces transformadas.**

Se utilizaron los medios MS y el Gamborg B5 (Gamborg *et al.* 1968) al 100 y al 50% de su concentración preparados como en la sección anterior. Se utilizaron recipientes plásticos circulares, con un diámetro de 10 cm y una profundidad de 3.5 cm con 200 mL de medio semisólido. Se utilizaron recipientes de vidrio de 1 L en orientación horizontal con 200 mL de medio líquido y espuma de poliuretano como soporte. Las raíces se incubaron  $3 \pm 0.25$  g de raíces transformadas de *Turbinicarpus lophophoroides* a 25°C bajo un fotoperiodo de luz:obscuridad 16:8 ( $54 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Se tomó el peso fresco después de 30 días. Se realizaron cinco réplicas por tratamiento.

#### **V.2.e. Efecto del medio cultivo basal en el crecimiento de las raíces transformadas.**

Se utilizaron las sales basales de doce medios de cultivo diferentes: Anderson (1978, 1980), DCR (Gupta y Durzan 1985), DKW (Driver y Kuniyuki 1984), Gamborg B5 (Gamborg *et al.* 1968), Heller (Heller 1953), K&M (Kao y Michayluk 1975), MS (Murashige y Skoog 1962), N6 (Chu *et al.* 1975), N&N (Nitsch y Nitsch 1969), Westvaco WV3 (Coke 1996), White (White *et al.* 1963), y WPM (Lloyd y McCown 1981) (Apéndice 2). Se añadió 3% de sacarosa y 8 g/L de agar (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) como agente gelificante a todos los medios. Además, se agregaron las vitaminas y compuestos orgánicos del medio MS a todos los medios y se ajustó el pH a 5.7 antes de esterilizar.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los experimentos se llevaron a cabo en cajas Petri desechables con 25 mL de medio basal semisólido. Las placas se inocularon con  $0.5 \pm 0.015$  g de raíces transformadas de *Escobaria chaffeyi*, *Ferocactus peninsulæ*, *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, *Turbincarpus lophophoroides*, *Turbincarpus pseudopectinatus* y *Turbincarpus schmiedickeanus* var. *shwarzii*, se sellaron y se incubaron a 25°C. Los experimentos se llevaron a cabo bajo un fotoperiodo de luz:oscuridad 16:8 ( $54 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Se tomó el peso fresco después de 30 días. El experimento se llevó a cabo dos veces para cada especie y seis réplicas por tratamiento. Los datos se analizaron mediante un ANOVA y las medias se compararon utilizando la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

#### **V.2.f. Crecimiento de las raíces transformadas en un sistema de inmersión temporal RITA®.**

Se colocaron 2 g (peso fresco) de raíces transformadas de *Escobaria chaffeyi*, *Ferocactus peninsulæ*, *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, *Turbincarpus lophophoroides*, *Turbincarpus pseudopectinatus* y *Turbincarpus schmiedickeanus* var. *shwarzii* en el sistema de inmersión temporal (RITA®, Vitropic, Saint-Mathieu-de-Tréviers, France) con un tiempo de inmersión de 15 min cada tres horas. El biorreactor contenía 200 mL de medio MS líquido y se encontraba bajo un fotoperiodo de 16:8 luz:oscuridad. Se tomó el peso fresco después de 30 días de incubación. Todos los experimentos se llevaron a cabo dos veces para cada especie.

### **V.3. Con respecto al objetivo particular referente a llevar a cabo la caracterización molecular de las raíces transformadas obtenidas.**

#### **V.3.a. Análisis histoquímico para la actividad de GUS.**

Se localizó la expresión de GUS mediante una prueba histoquímica descrita por Stomp (1992). Después de la tinción, los tejidos se lavaron y se almacenaron en etanol 70% (v/v). Se realizaron seis repeticiones para cada especie. En los casos en los que se generó tejido calloso y brotes también se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sometió a la prueba histoquímica.

### **V.3.b. Ensayo fluorométrico de la actividad de GUS.**

Se extrajeron proteínas totales a partir de raíces transformadas, brotes y tejido calloso obtenidos de las mismas, de cuatro especies cactáceas: *E. chafeyii*, *M. bocasana* var. *bocasana*, *Turbinicarpus laui* y *T. pseudopectinatus*. Se trituraron 160 mg de tejido con un pistilo estéril, usando nitrógeno líquido. Se agregaron 500  $\mu$ l de buffer de extracción de proteína y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorff nuevo y se almacenó a -80°C hasta su uso. Se cuantificó el contenido de proteína total de las muestras por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se realizó una curva estándar de BSA (Apéndice 3) y se cuantificó proteína en los brotes transformados por medio de espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm. Las lecturas se realizaron por duplicado. Los resultados obtenidos de la concentración de proteínas totales en las muestras analizadas (Apéndice 4) se utilizaron para cuantificar indirectamente la producción de  $\beta$ -glucoronidasa mediante la siguiente fórmula:

$$\text{actividad GUS} = (\text{nmoles MUG hidrolizados}/\mu\text{g proteína total}) / \text{tiempo.}$$

Se añadieron 6  $\mu$ L del extracto de proteínas a 60  $\mu$ L del buffer de ensayo de GUS. Se colocaron 18  $\mu$ L de la solución anterior a 182  $\mu$ L de buffer de parada en una microplaca (tiempo cero). El resto de la solución se incubó a 37°C y se tomaron alícuotas de 18  $\mu$ L cada 5 minutos (hasta los 20 minutos) y se colocaron en el buffer de parada. Se leyó en un fluorómetro a 365 nm (longitud de onda de excitación) y 450 nm (longitud de onda de emisión).

### **V.3.c. Verificación de transformación mediante PCR.**

Se amplificaron mediante PCR los genes *rolB*, *nptII*, *gus* y *virD1* (el último para confirmar la ausencia de *A. rhizogenes* de las raíces transformadas, ya que *virD1* se encuentra afuera de la región T-DNA). El oligo *Vtc* se utilizó como control negativo. Se extrajo ADN genómico total de once especies de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cactáceas con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) como lo describió Wilkie (1997). Se amplificó el ADN de tres muestras diferentes de cada especie analizada. Los parámetros de la PCR fueron los siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, seguido por 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minutos de alineación a 55°C y 2 minutos de extensión a 72°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1.2% y se visualizaron bajo luz UV mediante la tinción con bromuro de etidio.

**V.4. Con respecto al objetivo particular referente a realizar un escrutinio fitoquímico de betalainas y alcaloides en las raíces transformadas y en las mismas especies bajo condiciones naturales para comparar su capacidad biosintética de dichos compuestos.**

**V.4.a. Detección de Betalainas.**

Se utilizaron extractos metanólicos de betalainas tomados a partir de tejido fresco de cultivos de raíces transformadas obtenidos de acuerdo al protocolo de Wybranieca *et al.* (2001), y congelado a -20°C. Se llevó a cabo un barrido de 400 a 600 nm en espectrofotómetro para observar el patrón de betacianinas, betaxantinas y ácido betalámico. Se analizaron raíces transformadas de las siguientes especies: *Escobaria chafeyii*, *Ferocactus peninsulae*, *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, *Mammillaria sphaelata* var. *sphaelata*, *Myrtillocactus schenkii* T. *loui*, *Turbinicarpus lophophoroides*, *T. pseudopectinatus*, *T. schmedickeanus* var. *curvispinus*, *T. schmedickeanus* var. *shwarzii*. Adicionalmente, se llevó a cabo la detección de betalainas en raíces transformadas de *T. loui* cultivado en 10 medios de cultivo diferentes.

**V.4.b. Análisis de alcaloides por cromatografía en capa fina (TLC).**

Se liofilizaron las raíces transformadas y el tejido vegetal (parte aérea y raíz) de plantas de invernadero correspondiente a las especies transformadas para obtener un extracto crudo. Se pesaron 120 mg del tejido y se añadió 60 µL NH<sub>4</sub>OH (10%), 1200 µL metanol y 1200 µL cloroformo y se sonicó por 45 min.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Se repitió tres veces la extracción, y el extracto filtrado se corrió en una placa de sílica gel de 20 x 20 cm. La fase móvil fue: butanol: cloroformo: NH<sub>4</sub>OH en una proporción 50:50:2.5. Se observaron las placas en luz UV, y se revelaron con ninhidrina, reactivo de Dragendorff (Makkar *et al.*, 2007) + nitrito de sodio acuoso (10%) y yodoplatinato (Makkar *et al.*, 2007) para identificar grupos amino y alcaloides.

**V.5. Con respecto al objetivo particular referente al análisis de los compuestos de posible interés detectados en las raíces transformadas y la caracterización de su actividad biológica.**

**V.5.a. Análisis de alcaloides por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.**

Se comparó el perfil de alcaloides de las raíces transformadas y la planta completa (parte aérea y raíz) utilizando los extractos crudos mencionados anteriormente. Los compuestos volátiles capturados en las fibras se analizaron por medio de cromatografía de gases (CG) y CG acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) empleando un equipo Agilent 6850 y empleando una columna capilar HP-5 (30 m; 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de grosor) acoplado a un detector de masas Agilent (modelo 5975C) y helio como gas acarreador. Se utilizaron las siguiente condiciones: 2 µL del extracto por inyección split-less pulsado a una columna capilar HP-5MS 30m. La temperatura de inyector fue de 200°C, la temperatura de la columna se mantuvo a 140°C por un minuto y se incrementó a 300°C a 30°C por minuto.

**V.5b. Estudio de la actividad biológica de los extractos totales de las raíces transformadas.**

Se realizó una prueba de actividad biológica mediante una prueba de difusión de discos (*Disc diffusion assay*) con *Escherichia coli* Top 10 usando el extracto de la especie *Turbinicarpus lophophoroides* y un producto comercial de hordenina como referencia, pues es el alcaloide que se ha podido

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

identificar en las raíces transformadas de esta especie para probar su efecto bactericida. La bacteria *E. coli* Top 10 se cultivó en medio LB líquido por 24 h para realizar un cultivo fresco en medio MHII semisólido (10 mg/L agar). El cultivo se incubó a 37°C por 24 horas. El inóculo utilizado en las pruebas se preparó por medio del método de suspensión directa de colonias a una densidad de 0.5 de acuerdo al McFarland Turbidity Standard. Esta densidad corresponde a  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL. En los siguientes 15 minutos se inocularon las placas de medio MHII con agar usando un hisopo estéril. Se colocaron los discos, cada uno en un cuadrante. Para el extracto de raíz transformada se colocaron 4 discos sobrepuestos. Esto para incrementar la cantidad de extracto utilizado para poder observar si existe algún efecto bactericida al incrementar el volumen del extracto. Se colocaron 5 µL del compuesto comercial de hordenina como referencia, 5 µL de agua destilada estéril como control negativo, 5 µL de cefotaxima (100 mg/mL) como control positivo y 20 µL del extracto acuoso total (100 mg/mL) de raíces transformadas de *T. lophophoroides* en el disco correspondiente. Las placas se incubaron a 37°C por 18 horas y se tomaron los resultados.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSION.

### VI.1. Con respecto al objetivo particular referente a la caracterización el desarrollo *in vitro* de las raíces transformadas bajo diferentes medios y condiciones de cultivo.

#### VI.1.a. Inducción de raíces transformadas.

Se midió el efecto de la concentración del medio de cultivo basal MS sobre la inducción de raíces transformadas en segmentos de tallo cocultivos con *A. rhizogenes* de 25 especies de Cactáceas (Cuadro 3). Las primeras raíces presuntamente transformadas comenzaron a aparecer a los 5 días después del cocultivo para algunas especies, ejemplo tres especies de *Opuntia*. Para muchas otras especies las primeras raíces aparecieron después de los 15 días de cocultivo. No se observó la generación de tejido calloso durante los 60 días de evaluación de crecimiento de las raíces presuntamente transformadas, excepto en *Turbiniacarpus pseudopectinatus* que desarrolló tejido calloso en muchos de los explantes transformados y a partir del cual generó las raíces pilosas. Algunos de los explantes transformados se oxidaron, ya que cualquier tejido herido excreta una gran cantidad de compuestos fenólicos que intervienen en el proceso de cicatrización y defensa contra patógenos (Pérez-Molphe *et al.*, 1999). Sin embargo, muchos de estos explantes oxidados desarrollaron raíces presuntamente transformadas en este estado.

La eficiencia de transformación total fue muy variable entre especies. Siendo la mayor *Echinocereus knippelianus*, seguida por *Peniocereus serpentinus* y *Opuntia macrocentra* con un porcentaje de transformación de 92.5, 85, y 80% respectivamente. De las 25 especies estudiadas, doce tuvieron una eficiencia de transformación total igual o mayor a 50%. Cuatro especies, tuvieron una eficiencia igual o menor a un 20%, estas son *Echinocereus ferreirianus* var. *lindsayii*, *Escontria chioioides*, *Isolatocereus dumortieri* y *Turbiniacarpus swoboda*, siendo la última la más baja con una eficiencia del 10%. Es evidente que la eficiencia total de transformación varía

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

significativamente incluso entre especies pertenecientes al mismo género. Por ejemplo, *E. knippelianus* tuvo la eficiencia de transformación más alta de todas, con un 92.5%, mientras que *E. ferreirianus* var. *lindsayi* (*E. lindsayi*), tuvo una eficiencia total de 17.5% (Fig. 2).

Cinco especies tuvieron una mayor eficiencia de transformación en el medio MS al 100% de su potencia que en el resto de los medios: *Echinocereus ferreirianus* var. *lindsayi*, *Echinocereus schmollii*, *Isolatocereus dumortieri*, *Stenocereus thurberi* var. *thurberi* y *Turbincarpus subterraneus* (Fig. 3 y 4). En el medio MS al 75% de su potencia se observó una máxima eficiencia de transformación en once especies: *Echinocactus grusonii*, *Escontria chioiottilla*, *Ferocactus peninsulae*, *Mammillaria theresae*, *Myrtillocactus schenckii*, *Opuntia amyaclea*, *O. macrocentra*, *Peniocereus serpens*, *Stenocereus stellatus*, *Turbincarpus hoferi* y *T. pseudomacrochele* var. *pseudomacrochele*. Por otro lado, *Echinocactus platyacanthus*, *Mammillaria carmenae*, *Matucana madisoniorum*, *Melocactus curvispinus* var. *curvispinus*, *Opuntia macrocentra*, *Polaskia chichipe*, *Turbincarpus pseudipectinatus* y *T. swoboda* presentaron una mayor eficiencia de transformación al ser incubados en medio MS al 50% de su potencia. Solamente tres especies respondieron favorablemente cuando cultivadas en medio MS al 25%, estas fueron: *Echinocereus knippelianus*, *Ferocactus peninsulae* y *Opuntia ficus-indica*. Se observa una mejor respuesta a la inducción de raíces transformadas cuando los explantes se incuban en medio MS al 75% de su potencia. Sin embargo, aunque esto es cierto para la mayoría de las especies, también existen algunas que respondieron mejor ante las demás concentraciones del medio MS probadas. Un limitado número de especies presenta su máxima eficiencia de transformación cuando se incuban en medio MS al 25% de su potencia. *Ferocactus peninsulae* tuvo una eficiencia de transformación máxima de 70% en dos concentraciones diferentes del medio MS (75 y 25%) por igual. También *O. macrocentra* tuvo una eficiencia de transformación máxima de 90% en dos concentraciones diferentes del medio MS (75 y al 50%) por igual (Fig. 3 y 4).

**Cuadro 3.** Efecto de diferentes concentraciones del medio de cultivo MS en la inducción de raíces transformadas de 25 especies de Cactáceas. Número y longitud de las raíces determinados a los 60 días después del cocultivo con *A. rhizogenes*.

<b>Especie</b>	<b>[MS]</b>	<b>Explantos que Generaron Raíz (%)</b>	<b>Número de Raíces por Explante (Media ± Desviación Estándar)</b>	<b>Longitud de Raíz (mm) (Media ± Desviación Estándar)</b>
<i>Opuntia amyoclea</i>	<b>100</b>	70	5.4 ± 2.8	4.5 ± 2.7
	<b>75</b>	80	4.1 ± 2.8	3.4 ± 2.4
	<b>50</b>	40	3.0 ± 1.2	2.4 ± 1.1
	<b>25</b>	30	5.3 ± 1	4.3 ± 1.6
	<b>Total</b>	55	4.5 ± 2.6	3.6 ± 2.4
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	<b>100</b>	40	4.5 ± 4.7	0.96 ± 1.2
	<b>75</b>	20	14 ± 9.9	4.5 ± 5.1
	<b>50</b>	50	10 ± 7.2	1.6 ± 1.4
	<b>25</b>	30	4.3 ± 1.5	0.5 ± 0.1
	<b>Total</b>	35	8.2 ± 6.6	1.9 ± 2.2
<i>Echinocactus grusonii</i>	<b>100</b>	50	12 ± 2.1	2.9 ± 0.7
	<b>75</b>	70	10.7 ± 5.2	2.4 ± 1.3
	<b>50</b>	50	8.4 ± 2.9	1.3 ± 0.5
	<b>25</b>	10	2 ± 0	0.2 ± 0
	<b>Total</b>	45	8.3 ± 4.3	1.7 ± 1.2
<i>Melocactus curvispinus</i> var. <i>curvispinus</i> ( <i>M. oaxacensis</i> )	<b>100</b>	40	23 ± 9.7	15.0 ± 6.0
	<b>75</b>	20	33 ± 2.8	19.1 ± 10.1
	<b>50</b>	60	16 ± 10.6	5.1 ± 2.8
	<b>25</b>	50	12.8 ± 13.9	3.5 ± 4.3
	<b>Total</b>	42.5	21.2 ± 12.07	10.7 ± 7.5
	<b>100</b>	80	4.5 ± 2.4	1.3 ± 3.2
	<b>75</b>	90	4.9 ± 6.0	1.9 ± 1.5

<i>Mammillaria theresae</i>	<b>50</b>	60	$7.8 \pm 3.9$	$1.7 \pm 0.8$
	<b>25</b>	50	$6.0 \pm 2.1$	$1.2 \pm 0.5$
	<b>Total</b>	70	$5.8 \pm 4.2$	$1.5 \pm 1.0$
<hr/>				
	<b>100</b>	20	$1 \pm 0$	$0.2 \pm 0.1$
	<b>75</b>	100	$3.6 \pm 1.8$	$1.5 \pm 1.0$
<i>Myrtillocactus schenckii</i>	<b>50</b>	90	$2.6 \pm 2.1$	$1.1 \pm 1.0$
	<b>25</b>	0	0	0
	<b>Total</b>	52.5	$1.8 \pm 2.0$	$0.7 \pm 1.0$
<hr/>				
	<b>100</b>	80	$9 \pm 6.7$	$10.3 \pm 7.7$
	<b>75</b>	90	$5.6 \pm 3.5$	$5.6 \pm 3.4$
<i>Opuntia macrocentra</i>	<b>50</b>	90	$4.3 \pm 2.4$	$5.1 \pm 2.9$
	<b>25</b>	60	$4 \pm 2.2$	$3.4 \pm 2.1$
	<b>Total</b>	80	$5.75 \pm 4.4$	$6.1 \pm 5.0$
<hr/>				
	<b>100</b>	30	$5.0 \pm 3.0$	$1.0 \pm 0.2$
	<b>75</b>	70	$7.4 \pm 2.9$	$3.7 \pm 2.4$
<i>Ferocactus peninsulae</i>	<b>50</b>	60	$10.2 \pm 6.8$	$3.1 \pm 2.2$
	<b>25</b>	70	$3.9 \pm 3.3$	$1.5 \pm 1.6$
	<b>Total</b>	57.5	$6.6 \pm 4.8$	$2.3 \pm 2.1$
<hr/>				
	<b>100</b>	20	$2.5 \pm 0.7$	$1.2 \pm 0.8$
	<b>75</b>	30	$2.3 \pm 1.5$	$1.2 \pm 0.9$
<i>Escontria chioioides</i>	<b>50</b>	10	$1.0 \pm 0$	$0.2 \pm 0$
	<b>25</b>	0	0	0
	<b>Total</b>	15	$1.5 \pm 1.2$	$0.6 \pm 0.8$
<hr/>				
	<b>100</b>	50	$12.4 \pm 7.8$	$5.0 \pm 3.5$
	<b>75</b>	30	$7.3 \pm 5.5$	$4.4 \pm 3.4$
<i>Turbinicarpus pseudipectinatus</i>	<b>50</b>	60	$7.0 \pm 4.3$	$2.8 \pm 1.8$
	<b>25</b>	10	$2.0 \pm 0$	$0.5 \pm 0$
	<b>Total</b>	37.5	$7.2 \pm 6.2$	$3.2 \pm 2.9$

	<b>100</b>	0	0	0
	<b>75</b>	10	6 ± 0	0.8 ± 0
<i>Turbincarpus swobodae</i>	<b>50</b>	20	7.5 ± 3.5	1.1 ± 0.8
	<b>25</b>	10	3 ± 0	0.4 ± 0
	<b>Total</b>	10	4.1 ± 3.7	0.6 ± 0.6
	<b>100</b>	50	3.6 ± 1.8	1.1 ± 0.5
	<b>75</b>	60	3.3 ± 2.1	1.2 ± 0.9
<i>Polaskia chichipe</i>	<b>50</b>	70	4.9 ± 2.0	1.9 ± 1.1
	<b>25</b>	30	3.0 ± 1.7	0.8 ± 0.5
	<b>Total</b>	52.5	3.7 ± 1.9	1.2 ± 0.9
	<b>100</b>	40	9.3 ± 11.9	3.6 ± 5.3
<i>Echinocereus ferreirianus</i> var. <i>lindsayi</i> ( <i>E. lindsayi</i> )	<b>75</b>	10	2 ± 0	0.3 ± 0
	<b>50</b>	20	5.5 ± 0.7	2.0 ± 0.9
	<b>25</b>	0	0	0
	<b>Total</b>	17.5	4.2 ± 8.1	1.5 ± 3.6
	<b>100</b>	30	3.3 ± 1.5	0.9 ± 1.0
	<b>75</b>	70	5.4 ± 4.0	1.3 ± 1.0
<i>Matucana madisoniorum</i>	<b>50</b>	80	5.9 ± 3.6	1.7 ± 1.2
	<b>25</b>	40	4.5 ± 1.7	0.8 ± 0.2
	<b>Total</b>	55	4.8 ± 3.2	1.2 ± 1.0
	<b>100</b>	90	8.2 ± 6.7	4.1 ± 3.3
	<b>75</b>	90	12.2 ± 6.7	7.1 ± 6.1
<i>Echinocereus knippelianus</i>	<b>50</b>	90	11.4 ± 7.8	5.1 ± 3.1
	<b>25</b>	100	8.5 ± 4.7	2.9 ± 1.6
	<b>Total</b>	92.5	10.3 ± 6.5	4.8 ± 4.0
	<b>100</b>	90	18.7 ± 8.3	5.0 ± 2.1
	<b>75</b>	90	21.4 ± 12.1	4.9 ± 3.1
<i>Mammillaria</i>	<b>50</b>	100	16 ± 7.8	3.1 ± 1.8

<i>carmenae</i>	<b>25</b>	10	17 ± 0	2.7 ± 0
	<b>Total</b>	72.5	18.5 ± 9.3	4.2 ± 2.4
	<b>100</b>	80	15.6 ± 8.0	9.0 ± 5.3
<i>Stenocereus thurberi</i> var. <i>thurberi</i>	<b>75</b>	70	9.6 ± 6.7	6.5 ± 4.9
	<b>50</b>	50	8.8 ± 7.4	5.0 ± 4.4
	<b>25</b>	10	2 ± 0	0.6 ± 0
	<b>Total</b>	52.5	11.3 ± 7.8	6.8 ± 5.0
	<b>100</b>	70	14.1 ± 6.2	4.1 ± 3.8
<i>Turbinicarpus hoferi</i>	<b>75</b>	80	11.5 ± 9.7	2.4 ± 2.1
	<b>50</b>	40	2.7 ± 1.5	0.5 ± 0.3
	<b>25</b>	30	5 ± 4.6	0.8 ± 0.7
	<b>Total</b>	55	9.9 ± 8.1	2.4 ± 2.8
	<b>100</b>	30	4 ± 2	0.5 ± 0.3
<i>Turbinicarpus pseudomacrochele</i> var. <i>pseudomacrochele</i>	<b>75</b>	80	6.1 ± 5.2	1.2 ± 1.0
	<b>50</b>	20	1 ± 0	0.4 ± 0.1
	<b>25</b>	20	6 ± 7.1	1.5 ± 1.8
	<b>Total</b>	37.5	5 ± 4.6	1.0 ± 1.0
	<b>100</b>	40	5.5 ± 3.4	5.2 ± 4.9
<i>Opuntia ficus-indica</i>	<b>75</b>	40	5.7 ± 4.5	3.3 ± 2.3
	<b>50</b>	40	6.5 ± 4.9	5.0 ± 4.7
	<b>25</b>	50	3.6 ± 1.8	3.0 ± 1.9
	<b>Total</b>	42.5	5.2 ± 3.6	4.0 ± 3.4
<i>Echinocereus schmollii</i>	<b>100</b>	80	5 ± 4.3	2.1 ± 1.7
	<b>75</b>	30	2.7 ± 1.1	1.2 ± 1.5
	<b>50</b>	30	1 ± 0	0.2 ± 0.06
	<b>25</b>	30	5 ± 3.6	2.0 ± 1.4
	<b>Total</b>	42.5	3.9 ± 3.5	1.6 ± 1.5
	<b>100</b>	90	3.9 ± 1.4	1.7 ± 1.5

<i>Peniocereus serpentinus</i>	<b>75</b>	100	2.3 ± 1.3	1.9 ± 1.8
<i>(Nyctocereus serpentinus)</i>	<b>50</b>	70	3.4 ± 1.8	1.1 ± 0.8
	<b>25</b>	80	2.4 ± 1.2	1.9 ± 0
	<b>Total</b>	85	3.0 ± 1.5	1.6 ± 1.3
	<b>100</b>	60	6.7 ± 2.7	1.2 ± 0.7
<i>Turbincarpus subterraneus</i>	<b>75</b>	50	3.2 ± 2.6	0.7 ± 0.4
<i>(Gymnocactus subterraneus)</i>	<b>50</b>	20	4 ± 1.4	0.9 ± 0.4
	<b>25</b>	20	3.5 ± 2.1	0.4 ± 0.1
	<b>Total</b>	37.5	4.7 ± 2.8	0.8 ± 0.6
	<b>100</b>	50	11.2 ± 6.6	2.1 ± 1.5
<i>Isolatocereus dumortieri</i>	<b>75</b>	30	8.3 ± 4.5	0.7 ± 0.6
<i>(Stenocereus dumortieri)</i>	<b>50</b>	0	0	0
	<b>25</b>	0	0	0
	<b>Total</b>	20	10.1 ± 5.7	1.3 ± 1.2
	<b>100</b>	20	4.5 ± 2.1	1.7 ± 1.5
	<b>75</b>	40	4.8 ± 4.3	1.9 ± 1.7
<i>Stenocereus stellatus</i>	<b>50</b>	30	4 ± 2	1.1 ± 0.8
	<b>25</b>	10	4 ± 0	1.9 ± 0
	<b>Total</b>	25	4.4 ± 2.8	1.6 ± 1.3

El número de raíces por explante se ve incrementado por la incubación de los explantes en medio MS al 100% de su concentración en once de las especies estudiadas: *E. grusonii*, *E. ferreirianus* var. *lindsayi*, *E. schmollii*, *E. chioioides*, *I. dumortieri*, *O. amyoclea*, *O. macrocentra*, *P. serpentinus*, *S. thurberi* var. *thurberi*, *T. hoferi* y *T. subterraneus* (Fig. 5 y 6). *Melocactus curvispinus*, presenta el mayor número de raíces por explante de todas las especies estudiadas con un  $33 \pm 2.8$  de raíces por explante después de 60 días, y también el mayor crecimiento de las raíces transformadas con una longitud máxima de  $19.1 \pm 10.1$  mm después de 60 días de cultivo en medio MS al 75% de su potencia para ambos parámetros medidos (Fig. 5). La importancia de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

evaluar el número de raíces por explante radica en que cada raíz procede de un evento de transformación independiente, lo cual nos puede indicar el número de células susceptibles a la infección por *A. rhizogenes*. Por ejemplo, tanto *Escontria chioitilla* como *Myrtillocactus schenkii* tuvieron menos de 5 raíces por explante en todos los tratamientos analizados, lo que nos indica que hubieron muy pocos eventos de transformación en los explantes de estas dos especies.

En algunas especies la concentración de medio basal puede favorecer tanto la eficiencia de transformación, así como otros factores como es el número de raíces por explante o el crecimiento de las raíces transformadas (longitud en mm). En el caso de *S. thurberi*, *T. subterraneus*, *I. dumortieri* y *E. schmollii*, se observa un mejor resultado para los tres factores evaluados cuando están incubados los explantes en medio MS a su concentración completa (Fig. 7 y 8). Sin embargo, *E. schmollii*, presentó medidas muy semejantes a estas en el número de explantes y crecimiento de raíces con medio MS al 25% de su potencia, siendo esta la única especie que muestra un mayor número de raíces por explante bajo estas condiciones de cultivo (Fig. 7). Aunque *O. amyctea*, *O. macrocentra* y *T. pseudopectinatus* no presentan su máxima eficiencia de transformación al 100%, si presentan un máximo número de raíces por explante y crecimiento de raíces en medio MS a esta concentración (Fig. 8). *E. knippelianus*, *M. carmenae*, *M. curvispinus* var. *curvispinus*, *M. schenckii*, *S. stellatus* y *T. pseudomacrochele* var. *pseudomacrochele* mostraron su máximo número de raíces por explante al ser cultivadas en medio MS al 75% de su potencia (Fig. 7 y 8). De éstas, *M. schenckii* y *S. stellatus* además presentan un máximo crecimiento de sus raíces y mejor eficiencia de transformación cultivadas en medio a dicha concentración (Fig. 8). Mientras que *E. platyacanthus*, *F. peninsulae*, *M. theresae*, *M. madisoniorum*, *O. ficus-indica*, *T. swoboda* generan un mayor número de raíces por explante en medio MS al 50% de su potencia. *T. swoboda*, *P. chichipe* y *M. madisoniorum* no solo tienen una eficiencia de transformación mayor en medio MS al 50%, sino que también generan un mayor número de raíces y crecimiento de las mismas bajo estas condiciones

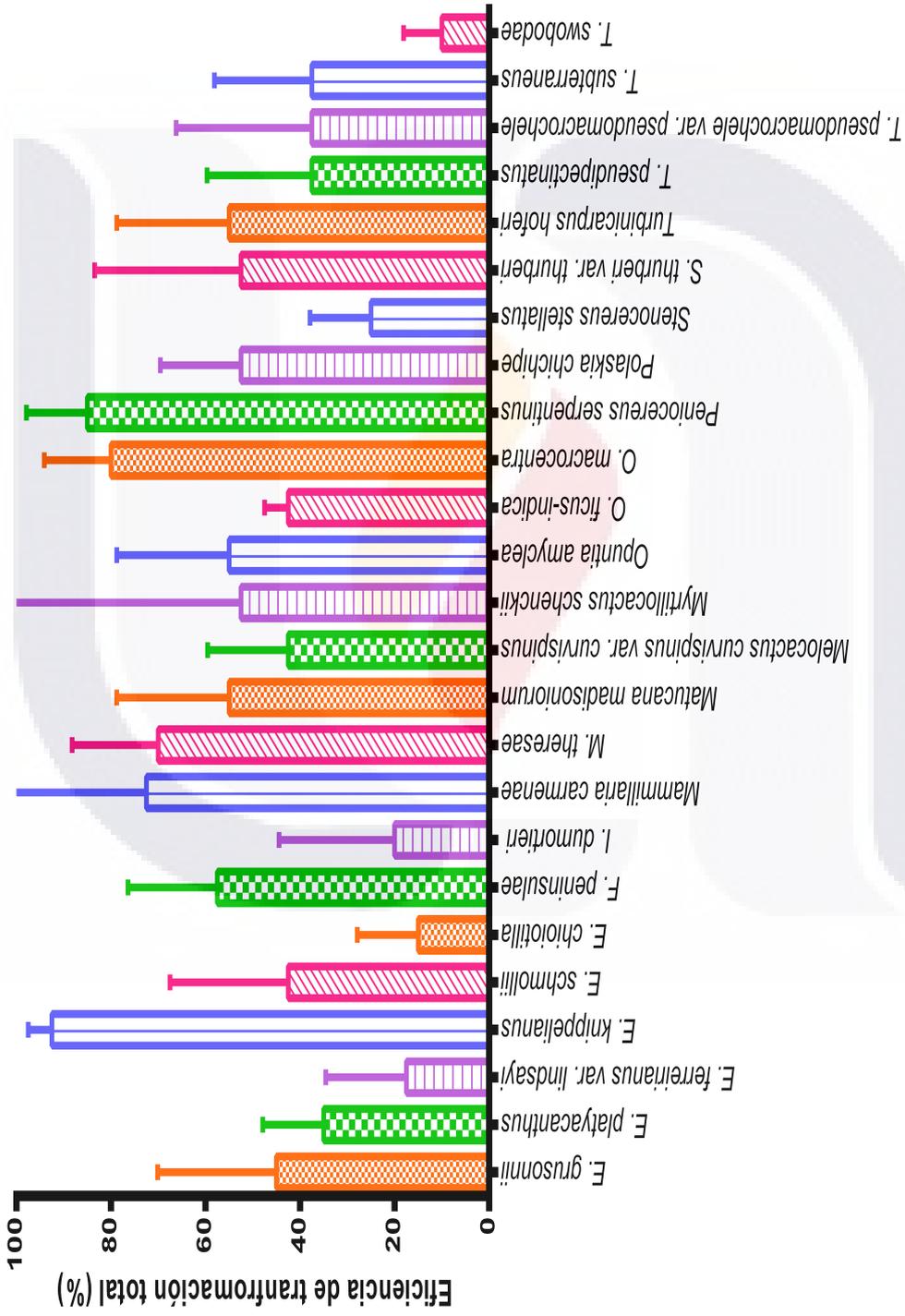
de cultivo. Algunas especies no generaron ninguna raíz bajo ciertas condiciones de cultivo, como *E. ferreirianus* var. *lindsayi*, *E. chioiotilla* y *M. schenckii* inoculadas en medio MS al 25% de su potencia y *T. swoboda* en medio MS a una concentración 100% (Fig. 7 y 8).

La mayoría de las especies (trece) generan raíces de mayor longitud cuando se cultivan en medio MS al 100% de su potencia, mientras que muy pocas generan raíces en medio MS a bajas concentraciones, como *S. stellatus*, *P. serpentinus*, *T. pseudomacrolele* var. *pseudomacrolele* (Fig. 8). Para este factor si se puede observar un patrón en el caso de especies que pertenecen a un mismo género como en el caso de las tres especies pertenecientes a *Opuntia*, que generan raíces más largas en medio MS al 100% de su potencia. En el caso del género *Turbiniacarpus*, solo tres de las cinco especies estudiadas presentan raíces más elongadas cuando se cultivan en medio MS al 100% de su concentración, mientras que las dos restantes lo hacen cuando el medio MS está al 50 y 25% de su potencia. *Echinocereus ferreirianus* var. *lindsayi* y *E. schmollii* generan raíces más largas en medio MS al 100%, mientras que *E. knippelianus* lo hace a un 75% de concentración del medio MS (Fig. 7).

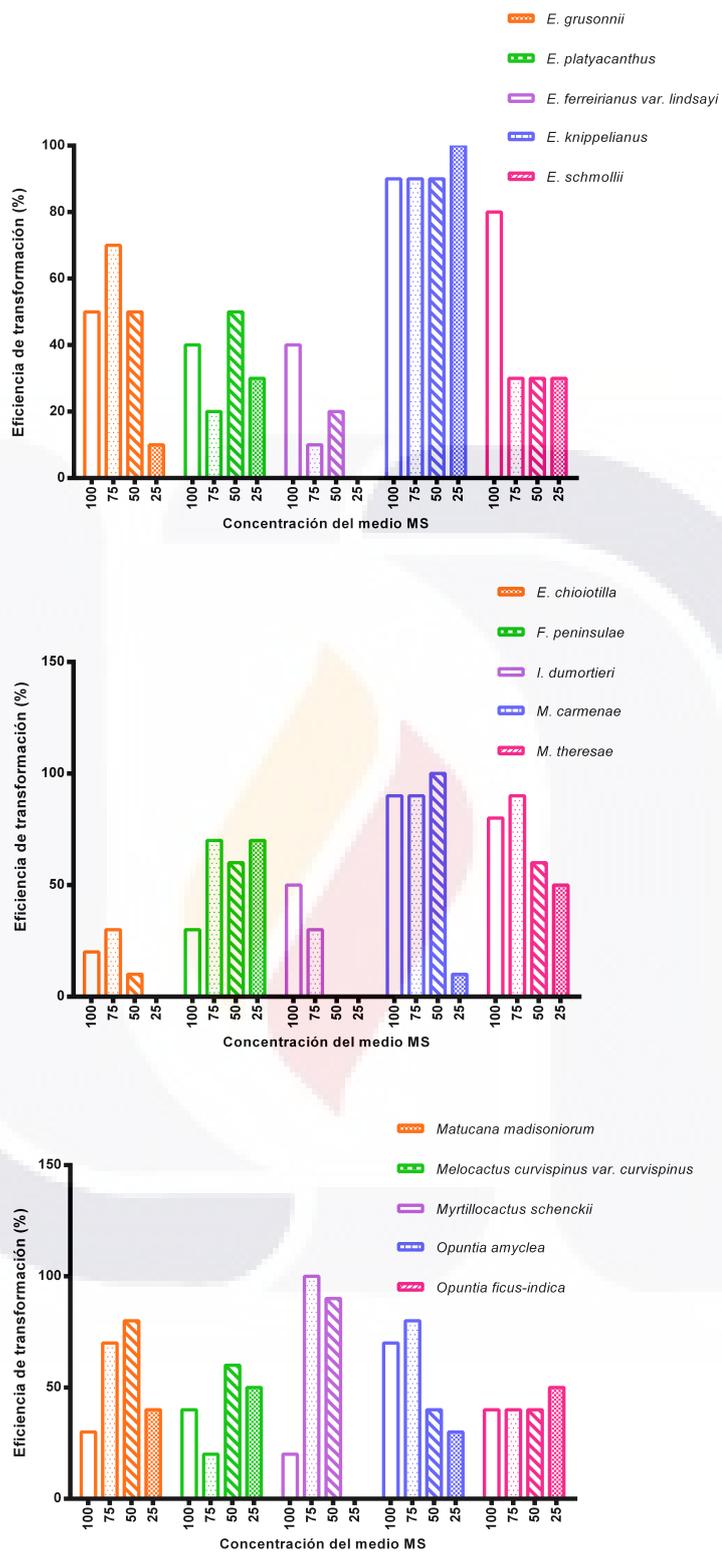
Las raíces presuntamente transformadas tenían una estructura delicada, muy pilosa y con muchas ramificaciones laterales (Figura 9). A diferencia del crecimiento normal de las raíces en dirección hacia la gravedad, estas ramificaciones mostraban un crecimiento ageotrópico. Además de raíces transformadas, se observaron raíces adventicias no transformadas en la superficie de los explantes. Sin embargo, las raíces no transformadas no proliferaron durante el subcultivo en medio semisólido de selección libre de hormonas, es probable que sea esta la razón de la disminución en el crecimiento relativo después de los algunos días de cultivo, como es el caso de *Echinocereus ferreirianus* var. *lindsayi* (Fig. 10c). Comparando esta especie con las otras dos estudiadas pertenecientes al mismo género, observamos que *E. knippelianus* continuó creciendo hasta la última medición, aunque desacelerando su crecimiento después de los 30 días de cultivo (Fig. 10d);

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

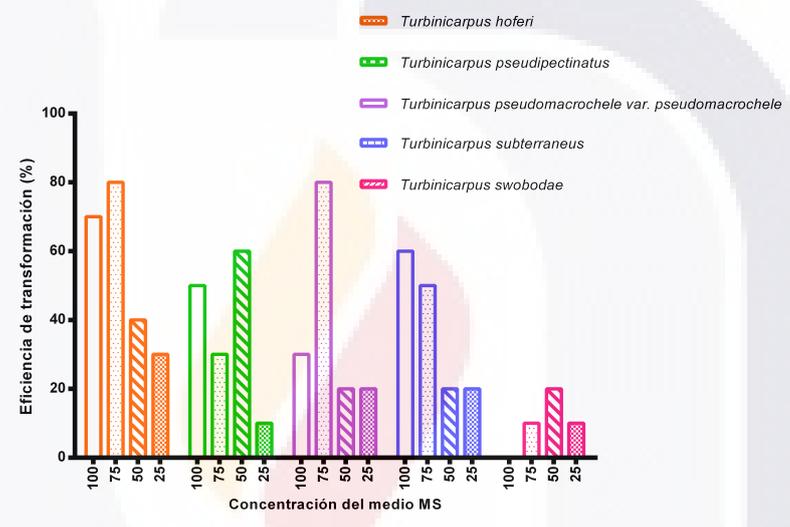
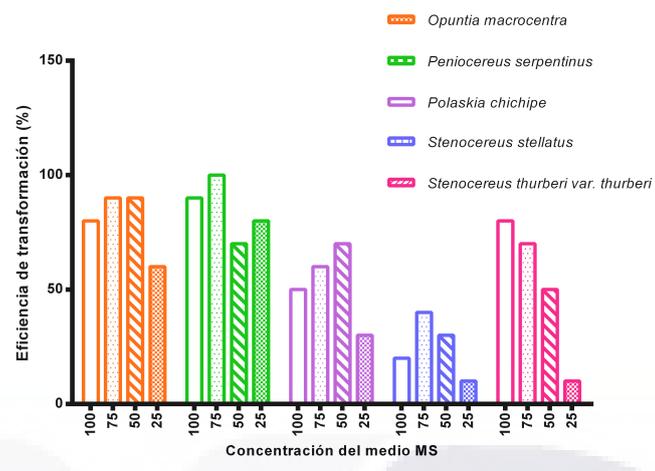
mientras que *E. schmollii* tuvo su pico de crecimiento máximo a los 45 días de cultivo (Fig. 10e). Muchas especies presentaron su máximo crecimiento antes de los sesenta días, y se observa una fase estacionaria después de los 30 o 45 días de cultivo. Para el caso de las dos especies del género *Mammillaria* estudiadas, se observa que ambas alcanzaron su fase estacionaria después del día 45 (Fig. 11 d y e). Esto mismo sucedió en *Echinocactus platyacanthus* (Fig. 10b), *Matucana madisoniorum* (Fig. 12a) y *Stenocereus thurberi* var. *thurberi*. *Opuntia ficus-indica* (Fig. 12e), a diferencia de *O. amyoclea* (Fig. 12d) siguió creciendo hasta los 60 días de cultivo en medio al 75 y 50. No obstante, *O. macrocentra* llegó a su fase estacionaria el día 30 (Fig. 13a). Así mismo, hubo más especies que alcanzaron su máximo crecimiento el día 30, como *Escontria chiotilla* (Fig. 11a), *Isolatocereus dumortieri* (Fig. 11c) y *Stenocereus stellatus* (Fig. 13d), entre otras. Como se observó en otros de los factores medidos, se presentó una gran variación en la cinética de crecimiento para las cinco especies de *Turbinicarpus* estudiadas. *T. hoferi* sigue creciendo hasta el día 60 cuando está en medio MS al 100%, mientras que alcanza su fase estacionaria a los 45 días si es cultivada en medio MS al 75% (Fig. 14s). Por otro lado, *T. pseudomacrochele* var. *pseudomacrochele* (Fig. 14c), solo presenta un crecimiento activo en medio MS al 25% alcanzando su fase estacionaria el día 45 de cultivo, mientras que *T. pseudopectinatus* y *T. swoboda* alcanzan su crecimiento máximo el día 30, ambos al ser cultivados en medio MS al 75% (Fig. 14b y e). Sin embargo, *T. swoboda* muestra una cinética de crecimiento muy semejante al estar cultivado en medio MS a su mínima concentración. Desafortunadamente la fase estacionaria de la mayoría de las especies tuvo una duración de varios meses. Los cultivos de raíces transformadas se lograron establecer hasta después de 4-6 meses en la mayoría de las especies.



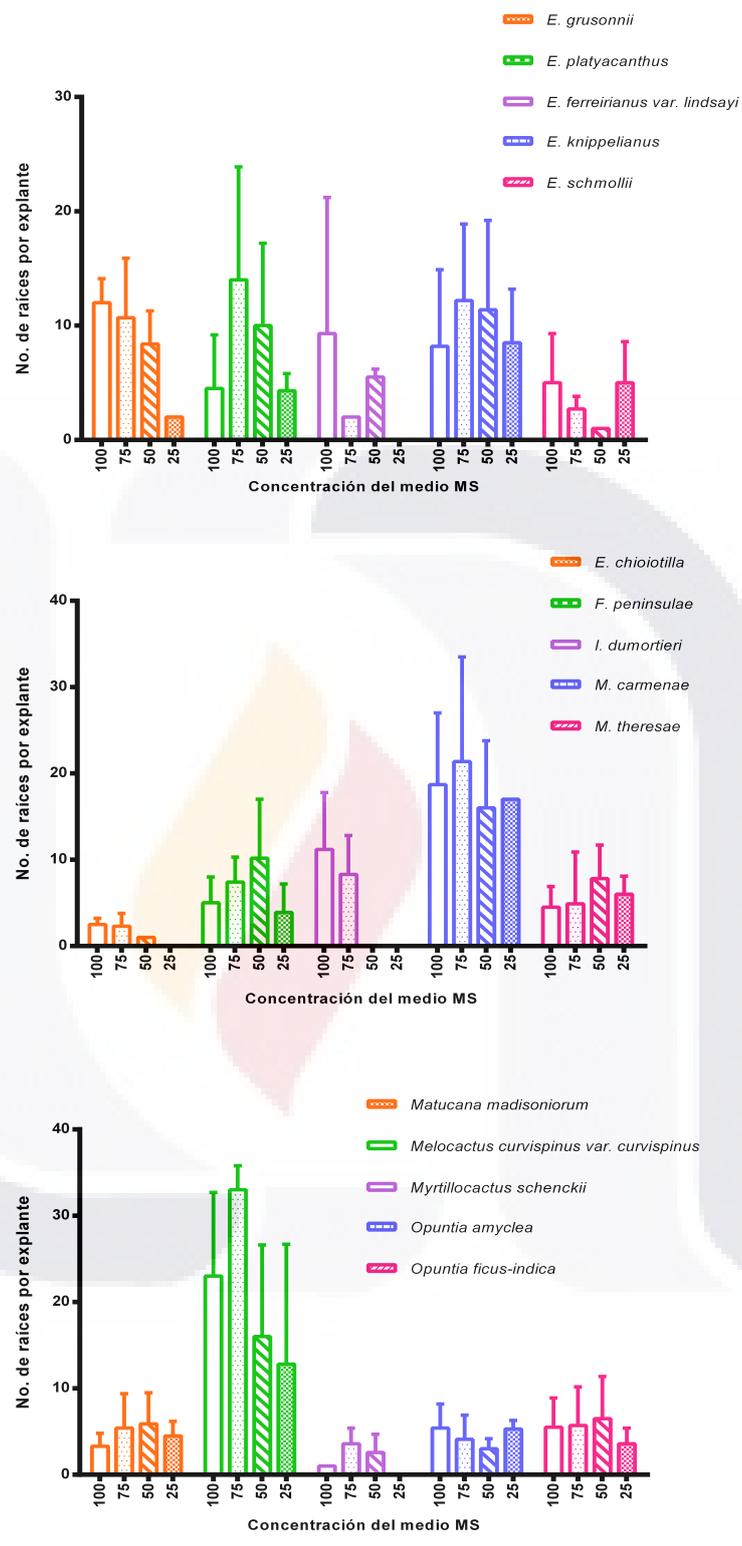
**Figura 2.** Eficiencia de transformación total de veinticinco especies de Cactáceas transformadas con *A. rhizogenes* A4. Se obtuvo el promedio de los resultados de la eficiencia de transformación de los diferentes tratamientos (medio MS al 25, 50, 75 y 100% de su potencia). Las barras muestran el error estándar.



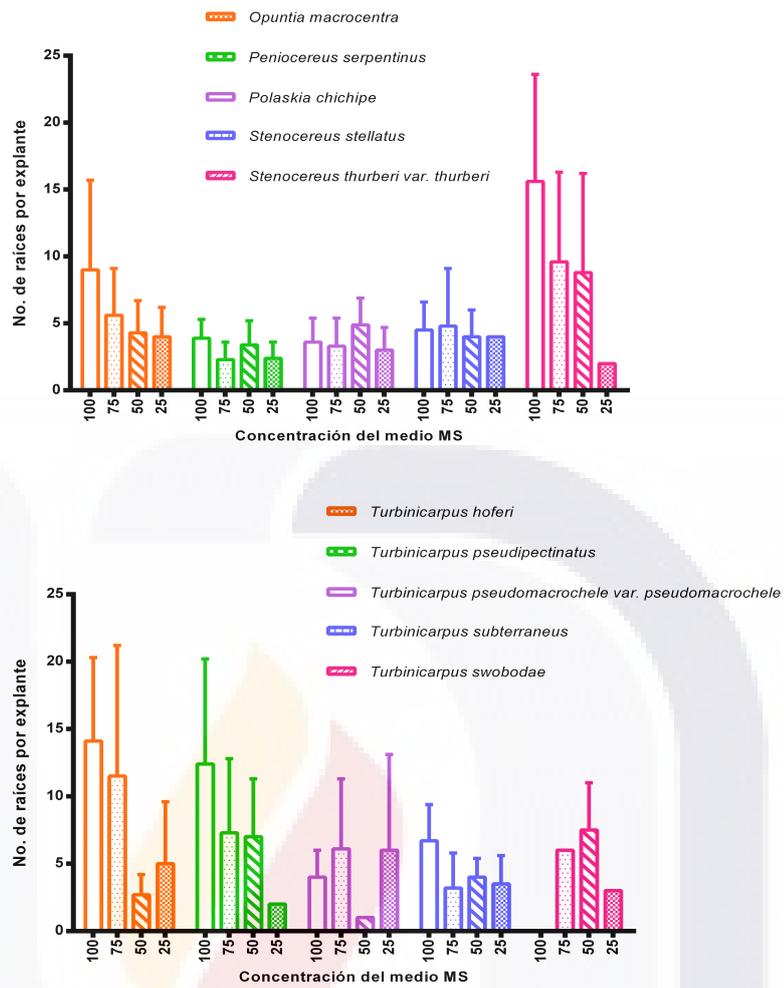
**Figura 3.** Eficiencia de transformación de diferentes cactáceas infectadas con *A. rhizogenes* A4 incubadas en diferentes concentraciones del medio MS (100, 75, 50 y 25%).



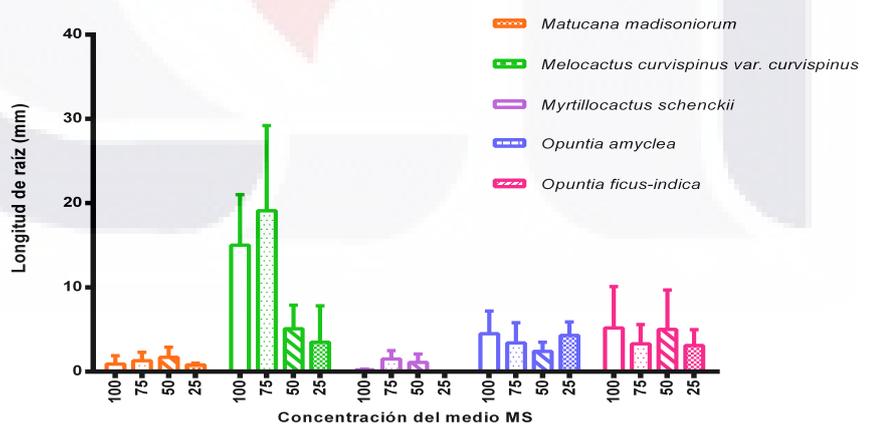
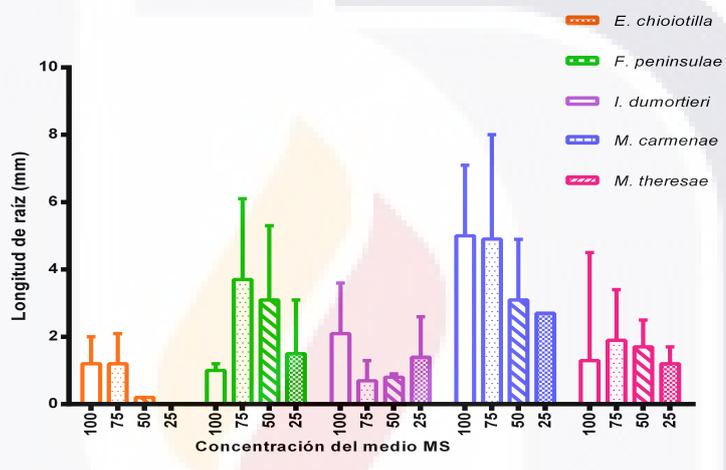
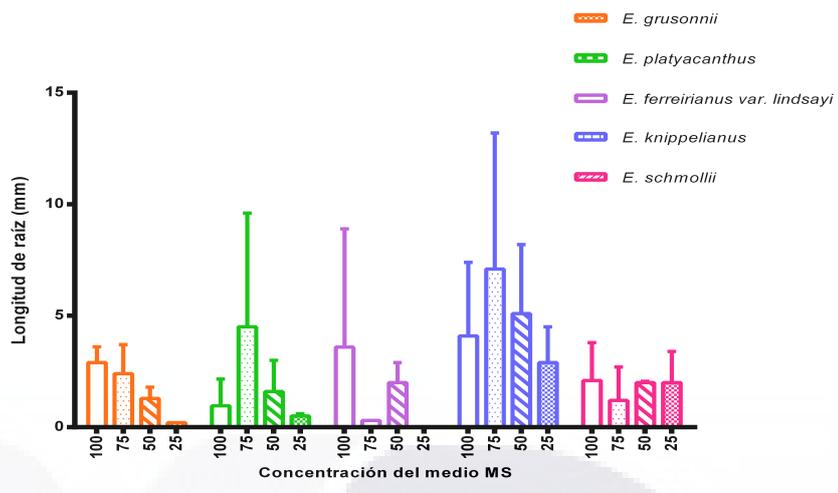
**Figura 4.** Eficiencia de transformación de diferentes cactáceas infectadas con *A. rhizogenes* A4 incubadas en diferentes concentraciones del medio MS (100, 75, 50 y 25%).



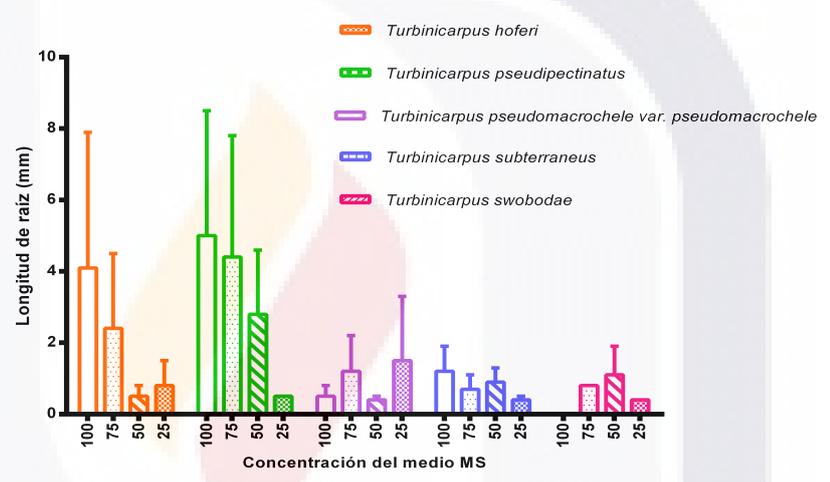
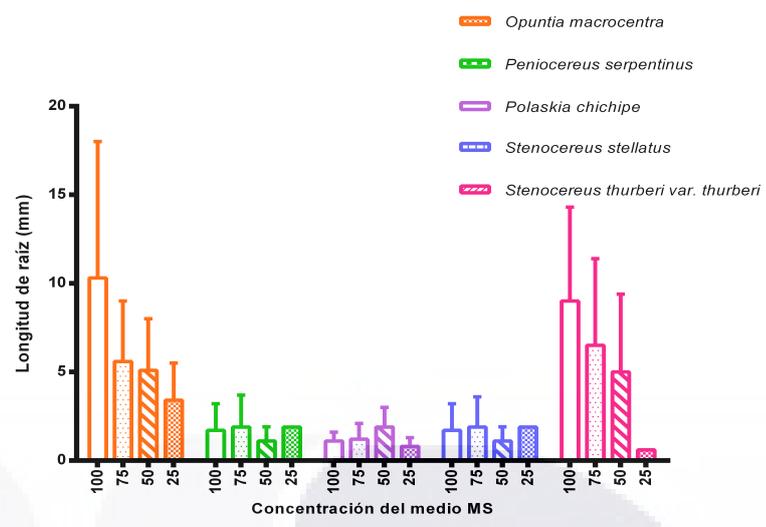
**Figura 5.** Número de raíces obtenidas por explante de diferentes cactáceas infectadas con *A. rhizogenes* A4 después de ser incubadas 60 días en diferentes concentraciones del medio MS (100, 75, 50 y 25%) por 60 días. Los resultados que se muestran son de diez repeticiones. Las barras indican la desviación estándar.



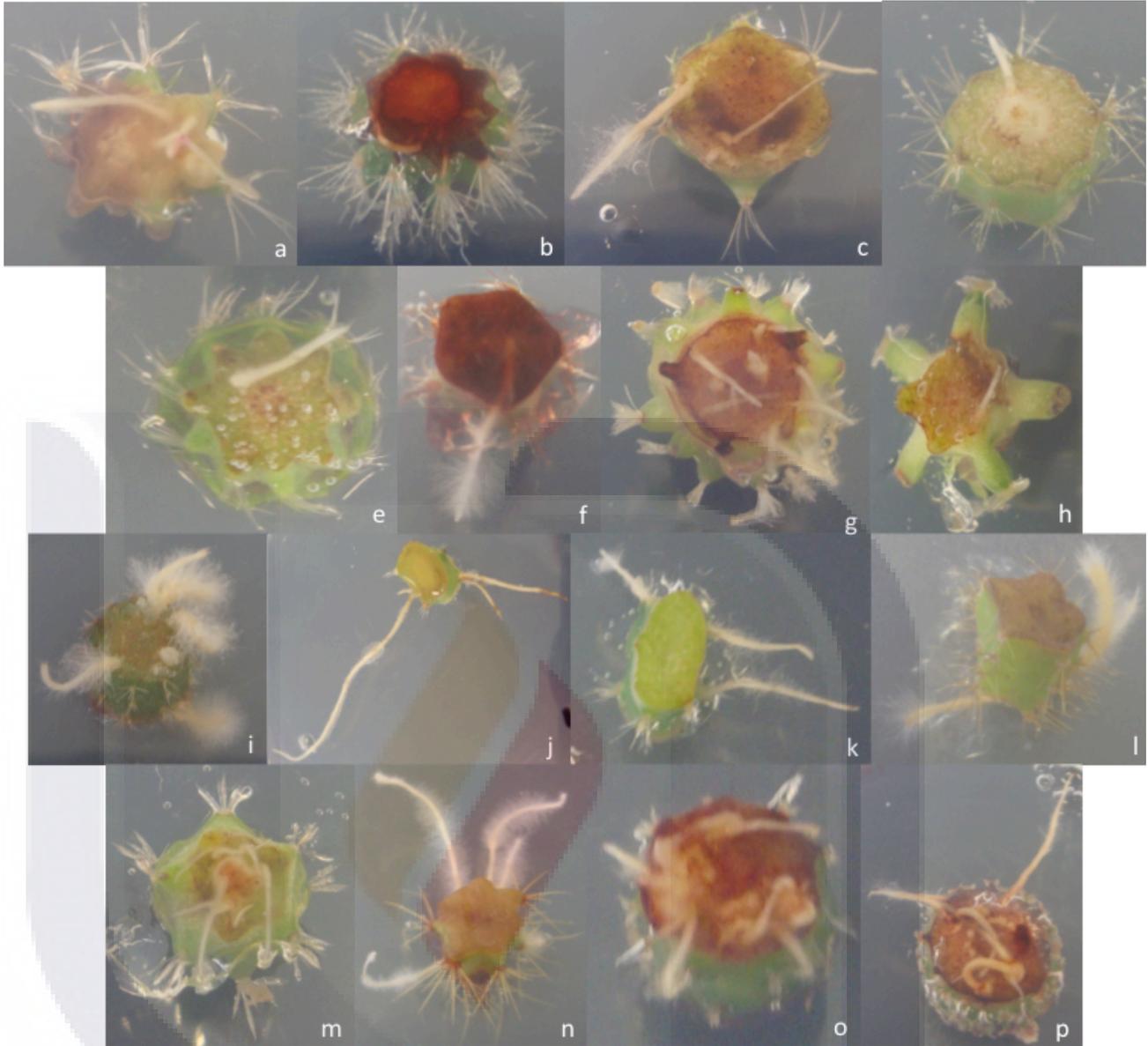
**Figura 6.** Número de raíces obtenidas por explante de diferentes cactáceas infectadas con *A. rhizogenes* A4 después de ser incubadas 60 días en diferentes concentraciones del medio MS (100, 75, 50 y 25%). Los resultados que se muestran son de diez repeticiones. Las barras indican la desviación estándar.



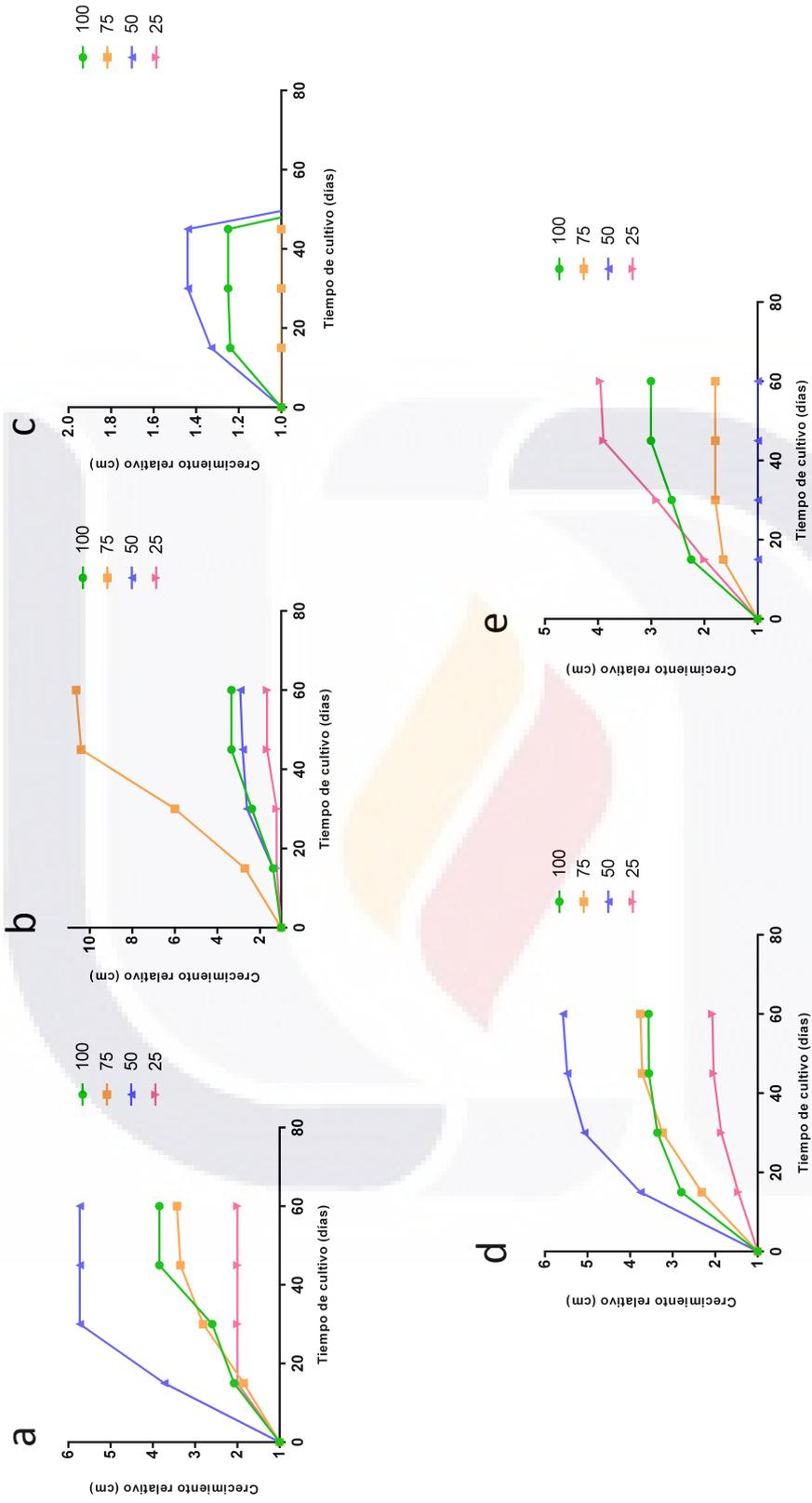
**Figura 7.** Crecimiento (medida como longitud en mm) de las raíces obtenidas mediante la infección de diferentes especies de cactáceas con *A. rhizogenes* A4 después de ser incubadas 60 días en diferentes concentraciones del medio MS (100, 75, 50 y 25%). Los resultados que se muestran son de diez repeticiones. Las barras indican la desviación estándar.



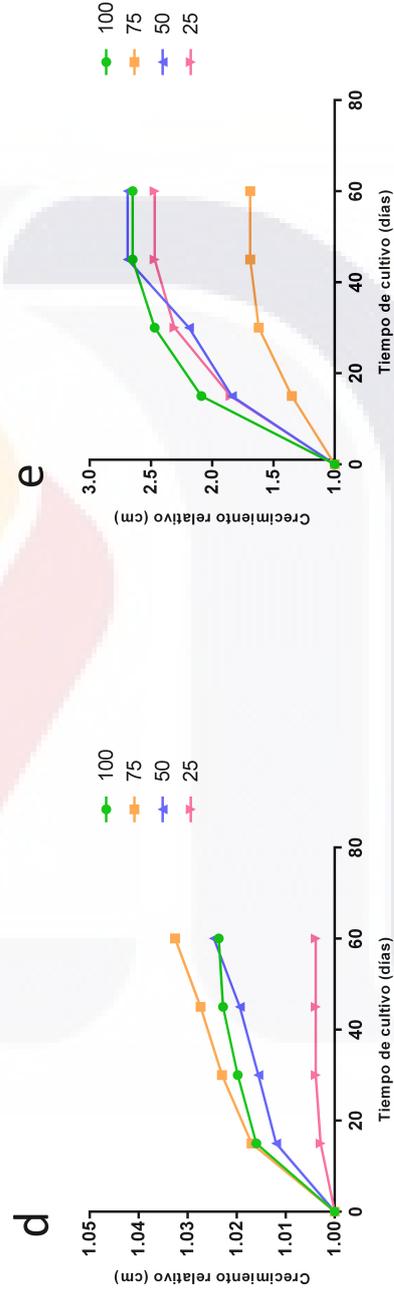
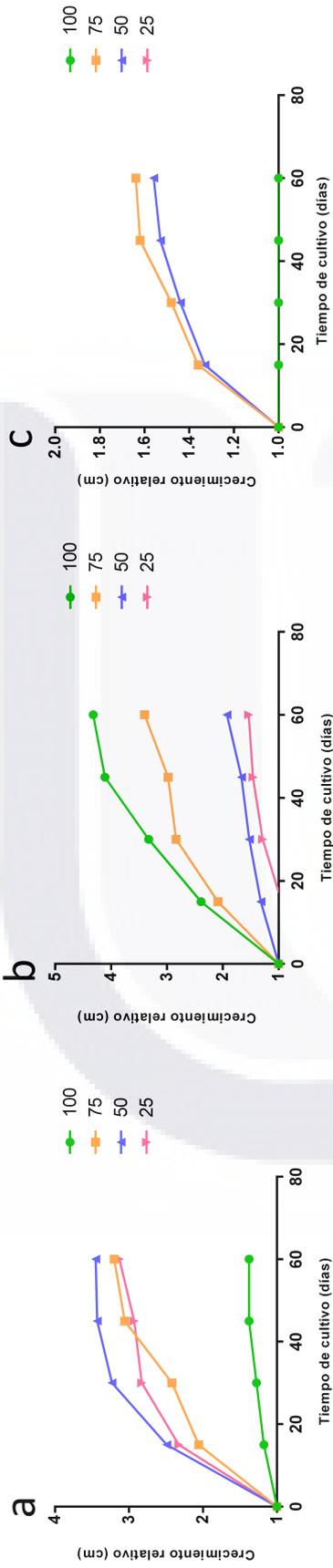
**Figura 8.** Crecimiento (medida como longitud en mm) de las raíces obtenidas mediante la infección de diferentes especies de cactáceas con *A. rhizogenes* A4 después de ser incubadas 60 días en diferentes concentraciones del medio MS (100, 75, 50 y 25%). Los resultados que se muestran son de diez repeticiones. Las barras indican la desviación estándar.



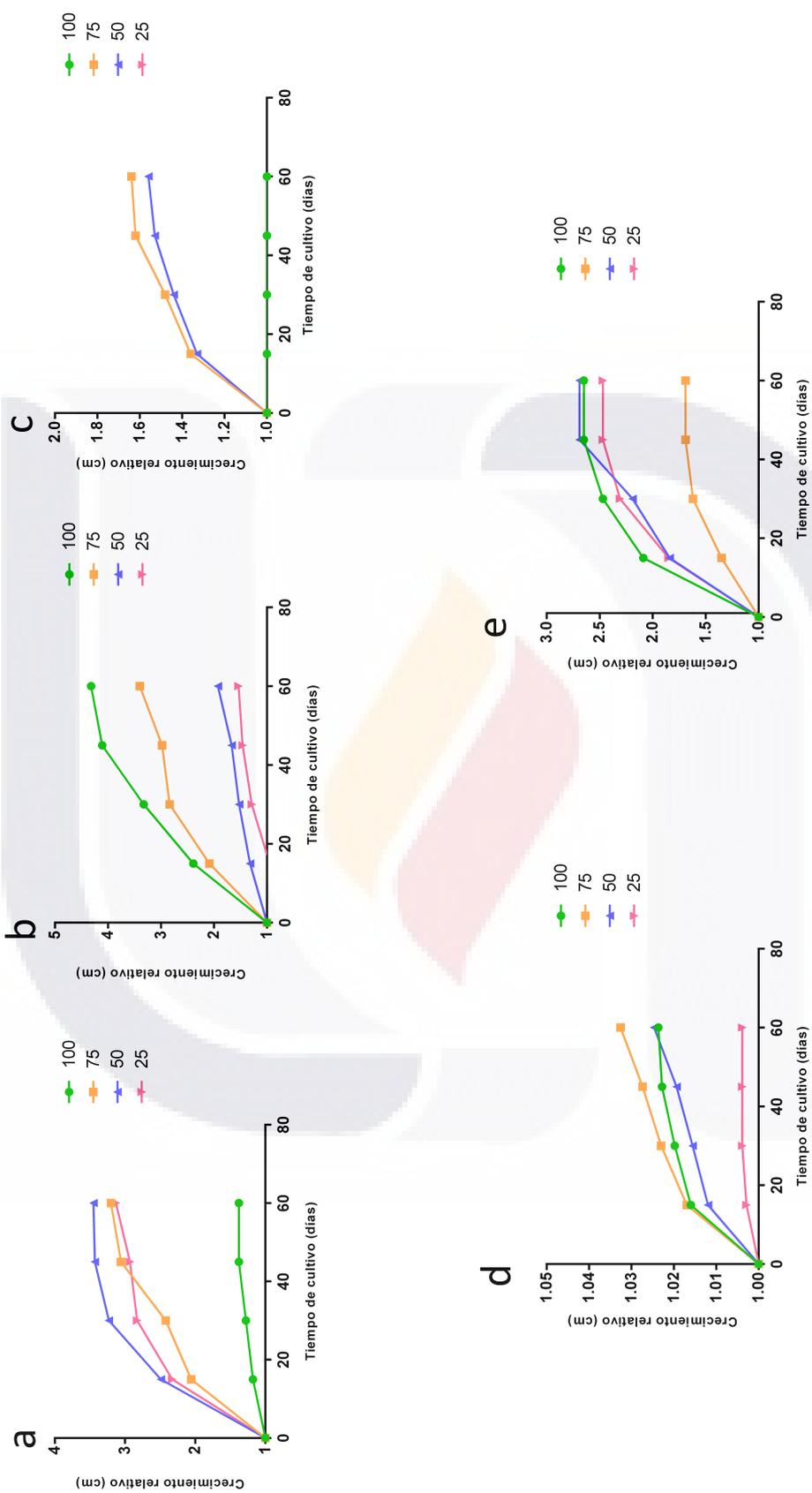
**Fig 9.** Etapas iniciales de la inducción de raíces presuntamente transformadas de (a) *Echinocactus grussoni*, (b) *Echinocereus ferreirianus* var. *lindsayi*, (c) *E. knippelianus*, (d) (e) *E. schmolti*, (f) *Escontria chiotilla*, (g) *Ferocactus peninsulæ*, (h) *Mammillaria carmenae*, (i) *M. theresae*, (j) *Matucana madisoniorum*, (k) *Opuntia amyoclea*, (l) *O. ficus-indica*, (m) *Polaskia chichipe*, (n) *Stenocereus stellatus*, (o) *S. thurbari* var. *thurberi* y (p) *Turbincarpus pseudopectinatus*, infectadas con *A. rhizogenes*.



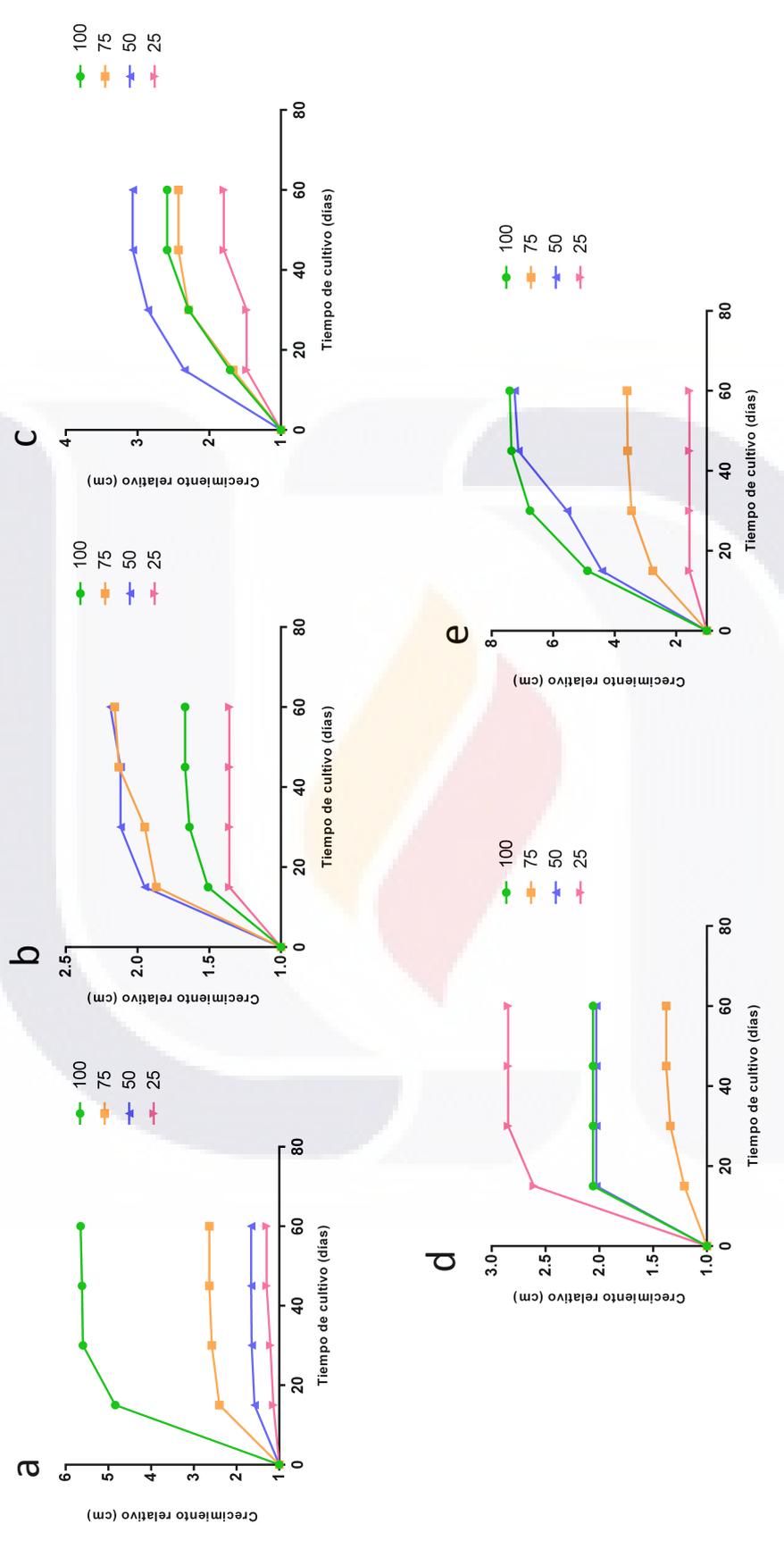
**Figura 10.** Cinética de crecimiento relativo (en cm) de raíces presuntamente transformadas de (a) *Echinocactus grusonii*, (b) *E. platyacanthus*, (c) *Echinocereus ferreirianus* var. *lindsayi*, (d) *E. knippelianus* y (e) *E. schmollii* en un periodo de 60 días cultivadas en medio MS a diferentes concentraciones (100, 75, 50 y 25%).



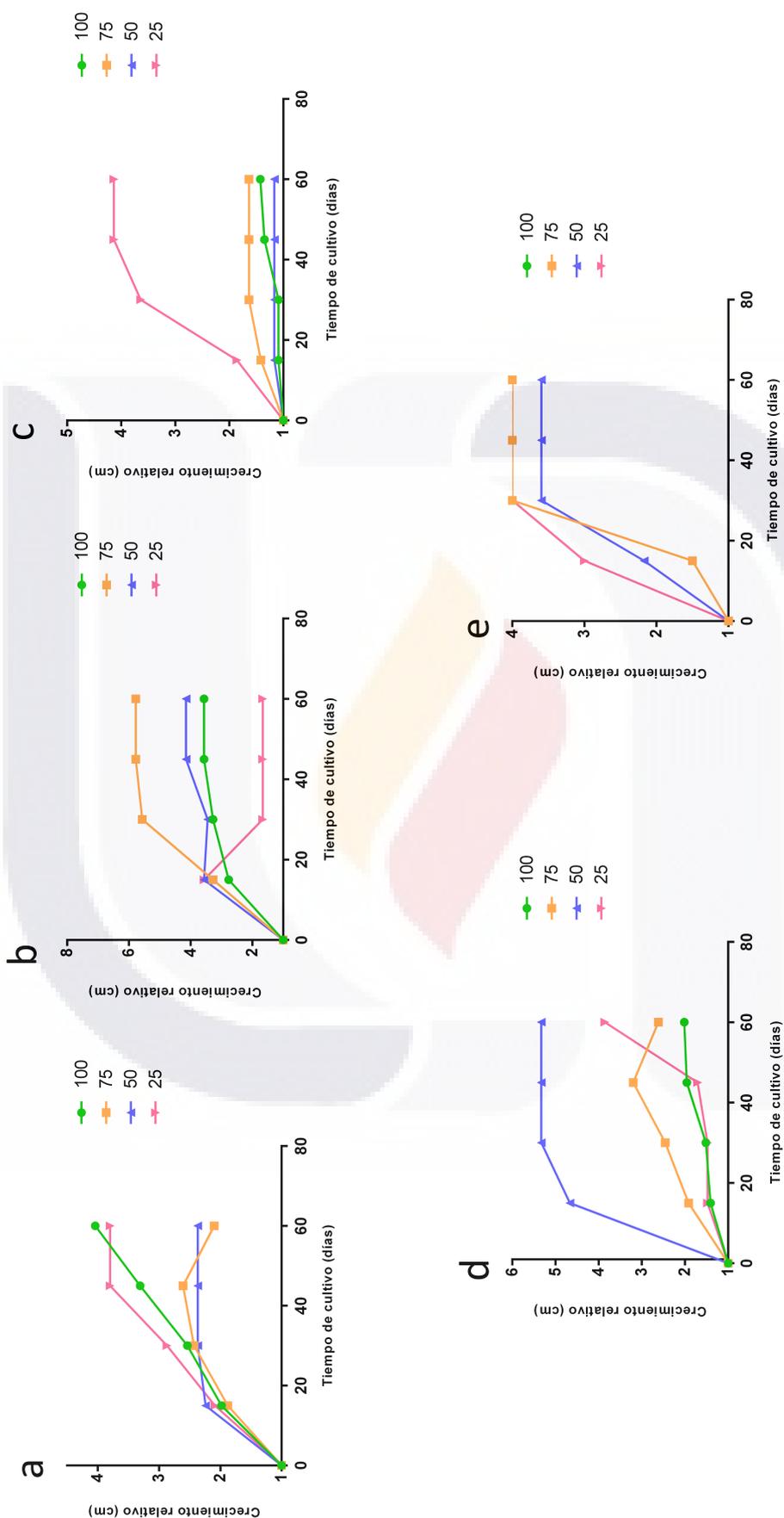
**Figura 11.** Cinética de crecimiento relativo (en cm) de raíces presuntamente transformadas de (a) *Escontria chioilla* (b) *Ferocactus peninsulæ* (c) *Isolatocereus dumortieri*, (d) *Mammillaria carmenae* y (e) *M. thesae* en un periodo de 60 días cultivadas en medio MS a diferentes concentraciones (100, 75, 50 y 25%).



**Figura 12.** Cinética de crecimiento relativo (en cm) de raíces presuntamente transformadas de (a) *Matucana madisoniorum*, (b) *Melocactus curvispinus* var. *curvispinus*, (c) *Myrtillocactus schenckii*, (d) *Opuntia amyclea* y (e) *O. ficus-indica* en un periodo de 60 días cultivadas en medio MS a diferentes concentraciones (100, 75, 50 y 25%).



**Figura 13.** Cinética de crecimiento relativo (en cm) de raíces presuntamente transformadas de (a) *Opuntia macrocentra* (b) *Peniocereus serpentinus* (c) *Polaskia chichipe* (d) *Stenocereus stellatus* y (e) *S. thurberi* var. *thurberi* en un periodo de 60 días cultivadas en medio MS a diferentes concentraciones (100, 75, 50 y 25%).



**Figura 14.** Cinética de crecimiento relativo (en cm) de raíces presuntamente transformadas de (a) *Turbinicarpus hoferi*, (b) *T. pseudimacrocchele*, (c) *T. pseudimacrocchele* var. *pseudimacrocchele*, (d) *T. swobodae* y (e) *T. swobodae* en un periodo de 60 días cultivadas en medio MS a diferentes concentraciones (100, 75, 50 y 25%).

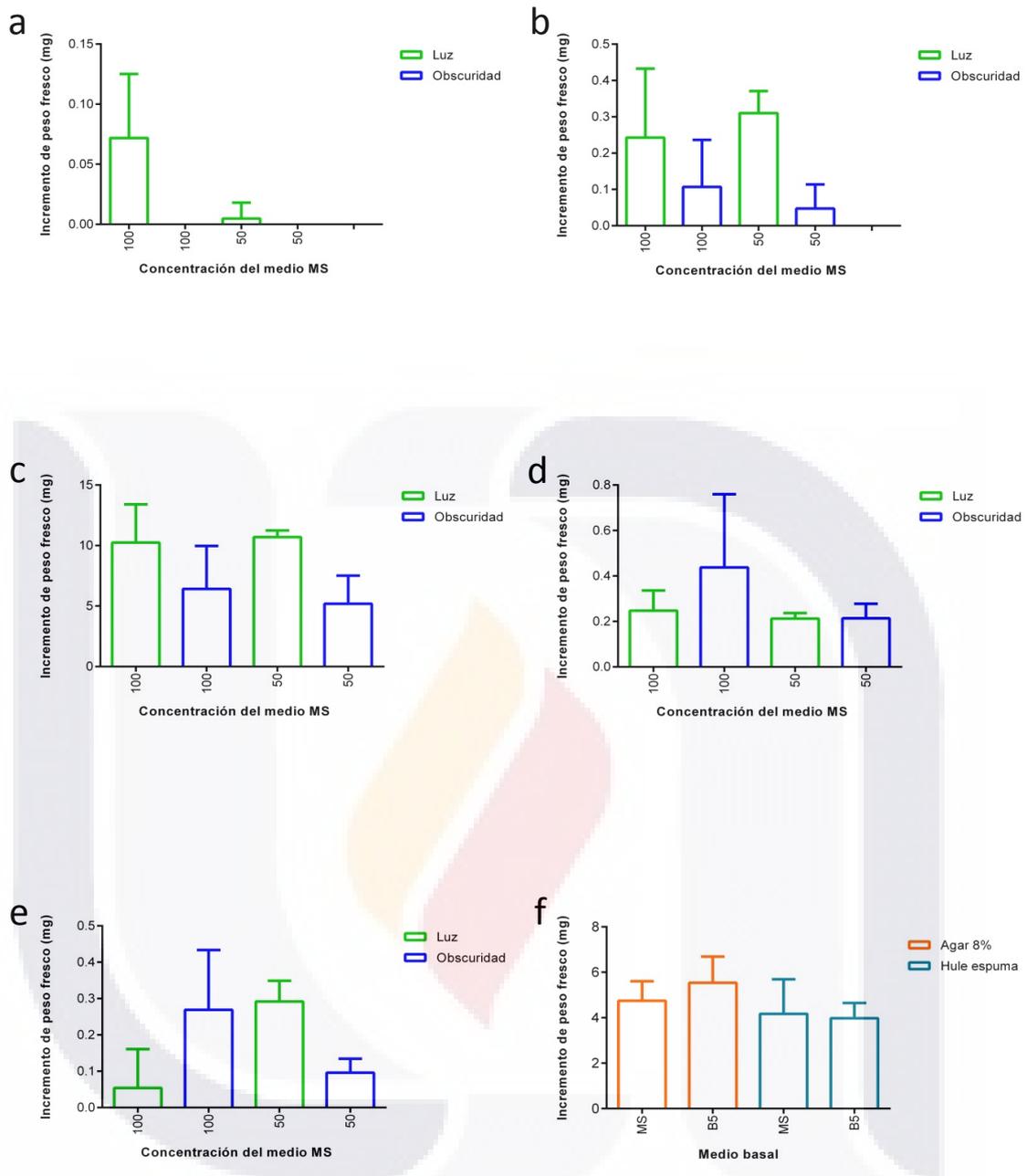
### VI.1.b. Determinación del efecto de diferentes medios basales, condiciones de fotoperiodo y tipos de soporte en el crecimiento de raíces transformadas.

Las raíces transformadas de cactus mostraron un patrón de ramificación activo y un crecimiento rápido en medio libre de hormonas. Se evaluó el crecimiento de los cultivos ya establecidos de raíces transformadas bajo condiciones de luz y de obscuridad a dos concentraciones diferentes del medio MS para las raíces transformadas de *Ferocactus peninsulæ*, *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, *Turbincarpus lophophoroides*, *T. pseudopectinatus* y *T. schmiedickeanus* var. *schwarzii*. Tanto las raíces transformadas de *Ferocactus peninsulæ*, como *Mammillaria bocasana* var. *bocasana* y *Turbincarpus lophophoroides* generaron más biomasa en condiciones de luz a ambas concentraciones del medio MS (Fig. 15a, b y c). Mientras que las raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* respondieron mejor al cultivo en la obscuridad, especialmente cuando la concentración del medio estaba MS al 100% de su potencia (Fig. 15d). Por otro lado, las raíces transformadas de *T. schmiedickeanus* var. *schwarzii* respondieron mejor a condiciones de luz en medio MS al 50%, y se obtuvieron resultados muy semejantes en medio MS al 100% en la obscuridad (Fig. 15e). De estos resultados, es evidente que de las especies valoradas, la que generó mas biomasa fue *T. lophophoroides*. Por esto se eligió probar si era susceptible cambiar el soporte de agar al 0.8% por hule espuma (espuma de poliuretano) para disminuir costos de labor y consumibles. Se observó que no ocurrieron diferencias significativas entre estos dos soportes en cuanto al incremento en biomasa de las raíces transformadas después de 30 días de cultivo bajo estas condiciones, sin embargo, ocurrió una mayor incidencia de contaminación (del 25%) en los recipientes con hule espuma como soporte. Young *et al.* (1991) reportó el uso exitoso de espuma de polipropileno como soporte en el crecimiento de brotes de jitomate. Sin embargo, Schwatzkopf *et al.* (1985), observó daños en tejidos de lechuga, betabel y papa cultivados utilizando espuma de polipropileno como soporte. Bhojwani y Rhazdan (1989) mencionan que para formular el medio apropiado para un sistema es bueno comenzar con medios basales bien conocidos como el MS o el B5. Por lo tanto, se probó en las raíces de *T. lophophoroides* utilizando medio basal B5 y hule

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

espuma. Para aquellas raíces que se cultivaron en agar se observó un mayor incremento en el peso de raíces transformadas que fueron cultivadas en medio B5, después de 30 días. Mientras que en aquellas cultivadas utilizando hule espuma no se observaron grandes diferencias (Fig. 15f). Aunque medios altos en sales han funcionado para varios sistemas, algunos cultivos crecen mejor con niveles de sales menores (Bhojwani y Rhazdan, 1989) como fue el caso de las raíces transformadas de *T. lophophoroides*.

El crecimiento de raíces se vio influenciado por el tipo de medio de cultivo utilizado. Basado en nuestros resultados, el medio óptimo debe ser determinado para cada especie de manera individual, ya que las respuestas de crecimiento son diferentes para cada taxón. Para poder relacionar la respuesta de los cultivos a las diferentes composiciones de los medios basales utilizados, se calculó su contenido nitrógeno inorgánico ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$  y N total), así como su fuerza iónica (concentración de sales totales medida como conductividad). La conductividad se midió utilizando un conductímetro Hach 44600 (Hach, Loveland, CO). Los medios de cultivo se agruparon de acuerdo a su contenido de nitrógeno (N) inorgánico (Cuadro 4), como de alto, medio y bajo contenido de N. Los medios basales con un contenido de N alto incluyen a los medios MS y DKW, con un contenido de N total de 60-40 mM. Los medios con un contenido medio de N (de 40-20 mM) son el N6, K&M, N&N y B5. Por último, los medios con un bajo contenido de N (20 mM o menos) incluyen al DCR, Anderson, WPM, WV3, Heller y White. Los medios también se clasificaron basándose en su fuerza iónica como alto, medio y bajo (Cuadro 4). Los medios White, Anderson y DCR se consideraron como medios bajos en sales, con conductividades desde 0.7 hasta 1 mili-Siemens por cm (mS/cm). Los medios con una concentración de sales media incluyen al WV3, Heller, N&N y WPM, con fuerzas iónicas de 1 a 2 mS/cm. Los medios B5, K&M, DKW, MS y N6, se consideraron altos por su contenido de sales que va desde 2 hasta 3 mS/cm.



**Figura 15.** Incremento en peso fresco (mg) de las raíces transformadas de (a) *Ferocactus peninsulae*, (b) *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, (c) *Turbincarpus lophophoroides*, (d) *T. pseudopectinatus* y (e) *T. schmidickeanus* var. *schwarzii*, en medio MS al 100 y al 50% de su potencia bajo condiciones de luz y de oscuridad después de 60 días de cultivo. (f) Incremento en el peso fresco (mg) en las raíces transformadas de *T. lophophoroides* después de ser cultivadas 60 días en medio MS y B5 utilizando agar al 0.8% y hule espuma como soporte.

**Cuadro 4.** Contenido de nitrógeno inorgánico (NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub> y total) y fuerza iónica (medida como conductividad) en los medios basales utilizados en este estudio.

Medio de cultivo <sup>z</sup>	NO <sub>3</sub> mmol/L	NH <sub>4</sub> mmol/L	N total mmol/L	Fuerza iónica (mS) <sup>y</sup>
White	2.5	0	2.5	0.7
Heller	7.1	0	7.1	1.4
WV3	9	0	9	1.24
WPM	8.2	4.9	13.1	1.75
Anderson	9.7	4.9	14.6	0.7
DCR	11.6	5	16.6	1
B5	24.7	1.9	26.6	2.2
N&N	18.3	8.9	27.2	1.7
K&M	26.6	7.8	34.4	2.2
N6	28	7	35	2.7
DKW	29.4	17.7	47.1	2.5
MS	39.4	20.6	60	2.6

<sup>z</sup>En orden ascendente con respecto a su concentración de N  
<sup>y</sup> mili-Siemens

Se probaron las sales basales de doce medios en el incremento de biomasa de raíces transformadas de *E. chaffeyii*, *Ferocactus peninsulae*, *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, *Turbincarpus lophophoroides*, *T. pseudpectinatus* y *T. schmiedickeanus* var. *schwarzii* (Anexo A). El crecimiento máximo (aproximadamente del 300%) se obtuvo con el medio DKW en dos especies: *E. chaffeyii* (Fig. 17a) y *T. schmiedickeanus* var. *schwarzii* (Fig. 17g y h), mientras que el incremento en biomasa fue significativamente más bajo en medio White (Fig. 16a y f). Esto se reportó en raíces pilosas de *Anisodus acutangulus*, donde el contenido de N total en el medio White (que es muy bajo comparado con el de otros medios basales) no fue ideal para el crecimiento de raíces transformadas (Li *et al.*, 2008). El medio DKW es alto en sales, con el contenido de N más alto, exceptuando el medio MS. M.

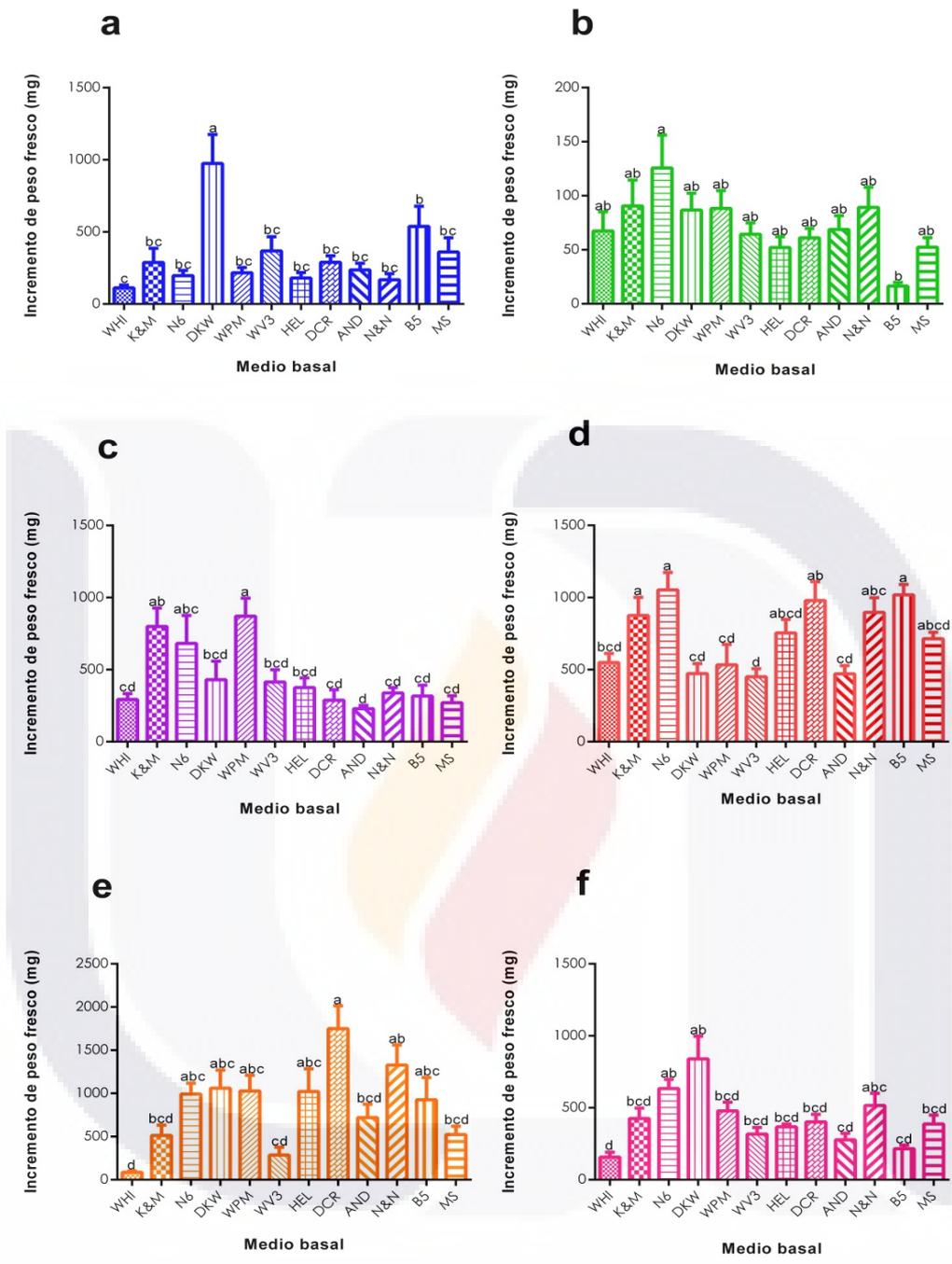
TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

*bocasana* var. *bocasana* (Fig. 17c ) duplicó el peso de su inóculo inicial al ser cultivado en los medios WPM y K&M (Fig. 16c). Los efectos benéficos del medio K&M también se han observado en las raíces transformadas de *Hyoscyamus albus* (Sauerwein y Shimomura, 1991) y *Trigonella foenum-graecum* (Merkli et al., 1997). La concentración total iónica del medio WPM es baja, en contraste, el medio K&M tiene un contenido alto de N y su fuerza iónica es alta también. Las raíces de *F. peninsulae* (Fig. 17b) mostraron un incremento en biomasa mayor en el medio N6 (incremento del 0.5 sobre el peso inicial) mientras su incremento en biomasa fue significativamente bajo en medio B5 (Fig. 16b). El medio B5 es diferente de otros medios por su alto contenido de NO<sub>3</sub>, pero también tienen una baja concentración de NH<sub>4</sub> (Sathyanarayana, 2007). Zhao et al. (2004) también obtuvieron un mayor crecimiento de raíces transformadas de *Saussurea medusa* utilizando medio N6. El medio N6 es alto en potasio (el cual es benéfico al crecimiento de los tejidos vegetales) [Hayashi et al., 1998] y tiene una fuerza iónica alta y un contenido de N medio. *T. lophophoroides* (Fig. 17d y e) también mostró un incremento del 200% en biomasa en medio N6, similar a los medios B5, K&M y DCR . En los demás medios se observó un crecimiento intermedio (Fig. 16d). Para *T. pseudopectinatus* se obtuvo un incremento seis veces mayor en generación de biomasa de las raíces transformadas de cultivadas en medio DCR (Fig. 16e), sin embargo, la mayor parte de este peso fue tejido calloso, lo que es indeseable ya que los tejidos indiferenciados son genética y bioquímicamente inestables. *T. pseudopectinatus* generó tejido calloso en todos los medios de cultivo, excepto en medio Heller, en el cual hubo un incremento cuatro veces mayor sobre el peso inicial. Esto es inesperado, ya que una fuente de N constante parece ser importante para mantener las células cultivadas en un estado indiferenciado (George et al., 2008). Además, el contenido de sales del medio Heller es bajo, no contiene NH<sub>4</sub> y contiene algunos compuestos innecesarios (Gamborg et al., 1976). No obstante, Mano et al. (1986) encontraron que el medio de cultivo Heller, es el más apto para el crecimiento de clonas de raíces transformadas de *Scopolia japonica*. *T. pseudopectinatus* también mostro un crecimiento bajo cuando se cultivó en medio White, así como *T. schmiedickeanus* var. *schwarzii* y *E. chaffeyi*. Estos resultados pueden relacionarse a la falta de NH<sub>4</sub> en este medio. La asimilación de N interfiere con

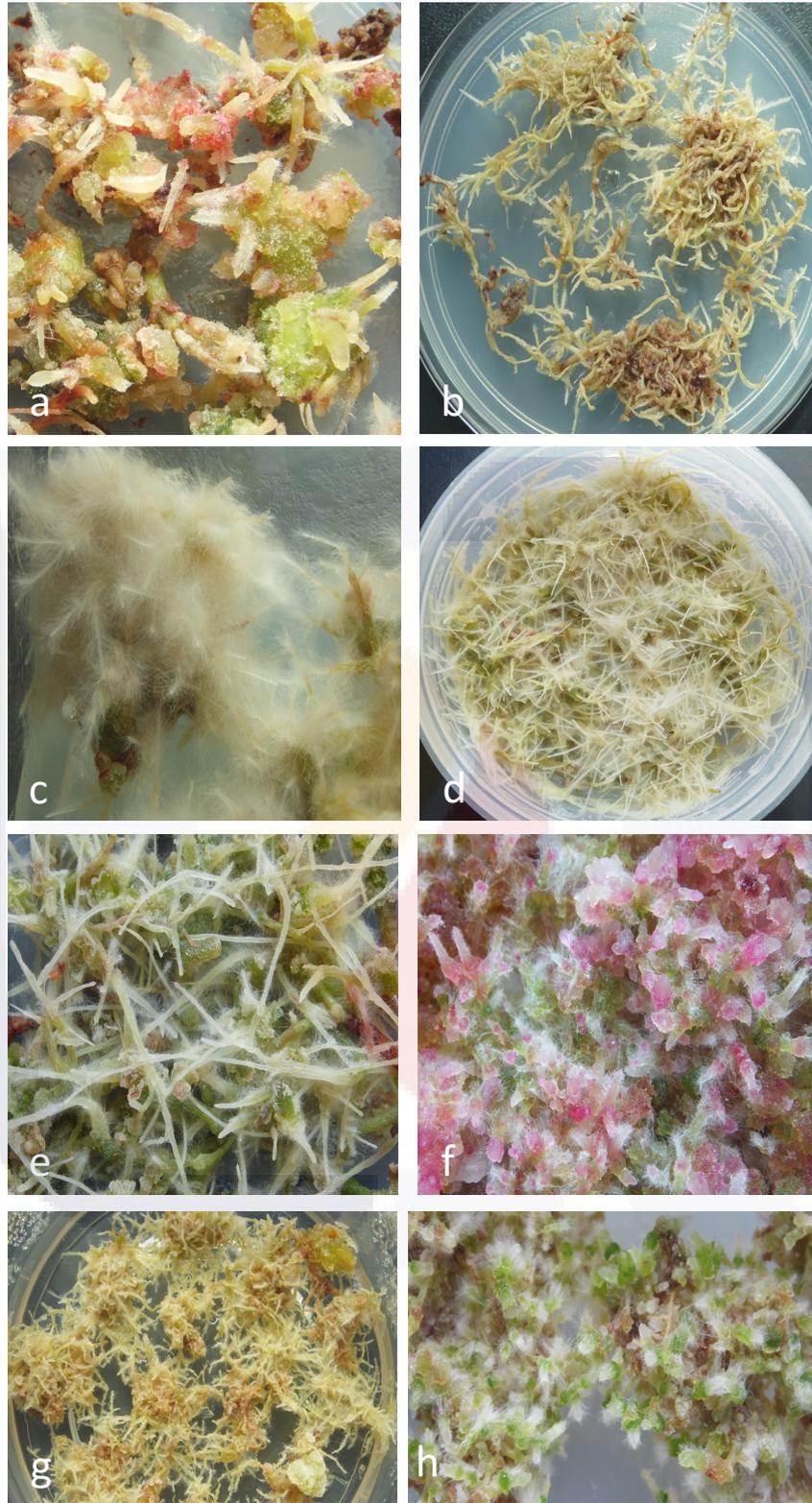
la distribución de materia seca y energía, lo que causa diferentes tasas de crecimiento en diferentes partes de la planta (Gamborg *et al.*, 1976). Aunque el nitrato es una fuente de N superior al  $\text{NH}_4$  en cuanto a su asimilación, el pH del medio se alcaliniza cuando se utiliza únicamente nitrato en su composición, y el añadir una pequeña cantidad de  $\text{NH}_4$  junto con el nitrato, disminuye este efecto (Bhojwani y Razdan, 1989). El medio MS es uno de los medios basales más comúnmente utilizados considerado alto en sales por su contenido de K y N (Tigiano y Gray, 2011) siendo su concentración iónica total de N veinticuatro veces mayor a la del medio White. Ambos extremos se muestran subóptimos para el cultivo de las raíces transformadas de todas las especies estudiadas en este trabajo. En experimentos con raíces transformadas de *Panax ginseng*, Sivakumar *et al.* (2005) también encontró que el medio MS generó un crecimiento y producción de biomasa bajos, indicando que la composición de nutrientes podía optimizarse. La fuerza iónica total del medio también afecta las respuestas morfogénicas de los explantes (callogénesis, embriogénesis somática, regeneración y micropropagación), dificultando el proceso de optimización del medio (Nas *et al.*, 2013). Se observaron diferencias en la morfología de las raíces pilosas cultivadas en diferentes medios basales (Fig. 17d, e, g y h). La des-diferenciación y morfología de las raíces transformadas es afectada por el medio de cultivo y también fue reportado para raíces transformadas de *Lobelia inflata* (Yonemitsu *et al.*, 1990). Los medios Anderson y N&N generaron raíces gruesas, densas y verdes, especialmente en *T. lophophoroides* (Fig. 17e). El medio Anderson tiene una fuerza iónica muy baja, y un contenido de N relativamente bajo, mientras que el medio N&N es considerado como intermedio en cuanto a su contenido de N y fuerza iónica y tiene la mitad de los macronutrientes que contiene el medio MS (Sathyanarayana, 2007). La depleción del N en cultivos provoca un incremento en el metabolismo de algunos compuestos libres de N basados en fenilpropanoides, como la lignina, que se asocian con la diferenciación de células engrosadas secundariamente (Hahlbrock, 1974). Los medios DCR,DKW y K&M que difieren tanto en contenido de N como en concentración de sales, generan raíces verdes e incrementan la ramificación lateral y la producción de pelos radicales. El medio N6 produce raíces muy pilosas y cantidades pequeñas de tejido calloso rosa. Los medios Heller, White y WV3 que no

contienen  $\text{NH}_4$  y tienen el contenido de N más bajo de todos los medios utilizados, produjeron raíces rosadas y tejido calloso (Fig. 17f). La coloración rosa de las raíces transformadas sugiere la producción de betalainas. Por lo tanto, parece que la composición de medio afectara la producción de metabolitos secundarios, que ha sido reportado previamente (Yonemitsu *et al.*, 1990; Nussbaumer *et al.*, 1998). Aunque el contenido de N y fuerza iónica parecen ser factores importantes en la producción de raíces transformadas, es difícil establecer una relación entre estas características del medio y la morfología de las raíces transformadas.





**Figura 16.** Crecimiento de raíces transformadas expresado como incremento en peso fresco (mg) de *Escobaria chaffeyi* (a), *Ferocactus peninsulae* (b), *Mammillaria bocasana* var. *bocasana* (c), *Turbinicarpus lophophoroides* (d), *T. pseudopectinatus* (e) y *T. schiedeckeanus* var. *schwarzii* (f) después de treinta días de cultivo en doce medios de cultivo diferentes. Las barras representan el error estándar. Los valores indicados por la misma letra no difieren significativamente cuando  $p < 0.05$ , utilizando la prueba de rango múltiple de Tukey-Kramer. Se muestran los resultados combinados de dos experimentos independientes.



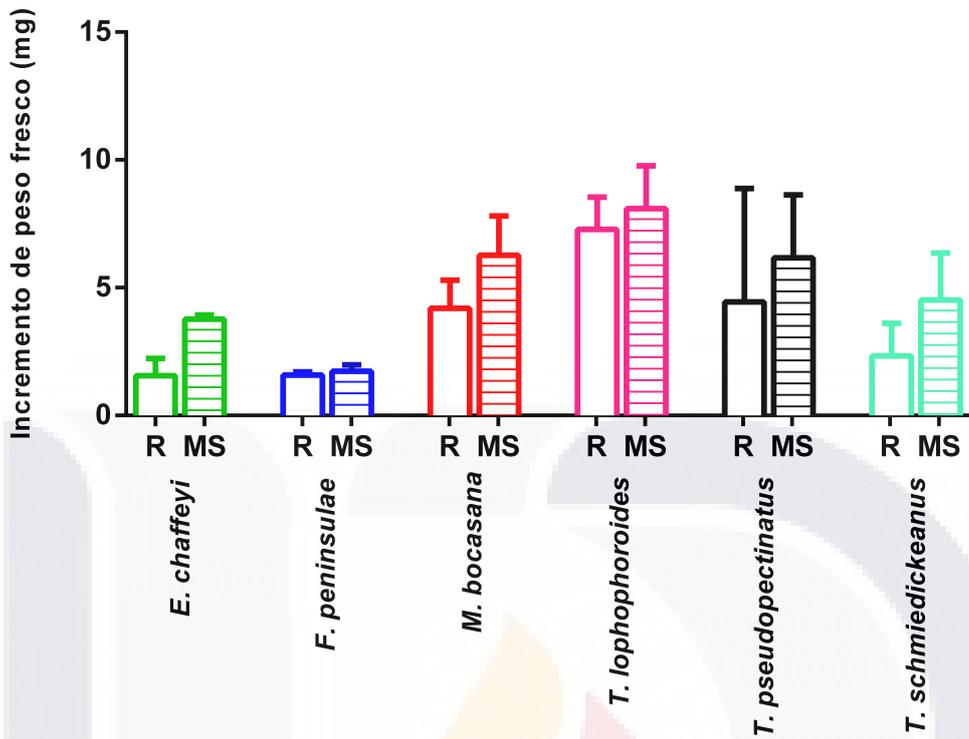
**Figura 17.** Cultivo de raíces transformadas de (a) *Escobaria chaffeyii* (medio DKW), (b) *Ferocactus peninsulae* (medio N6), (c) *Mammillaria bocasana* var. *bocasana* (medio WPM), (d y e) dos morfologías diferentes de raíces transformadas de *T. lophophoroides* en medio semisólido MS y N&N respectivamente, (f) *T. pseudopectinatus* (medio WV3) y dos morfologías diferentes de raíces transformadas *Turbinicarpus schmiedickeanus* var. *shwarzii*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

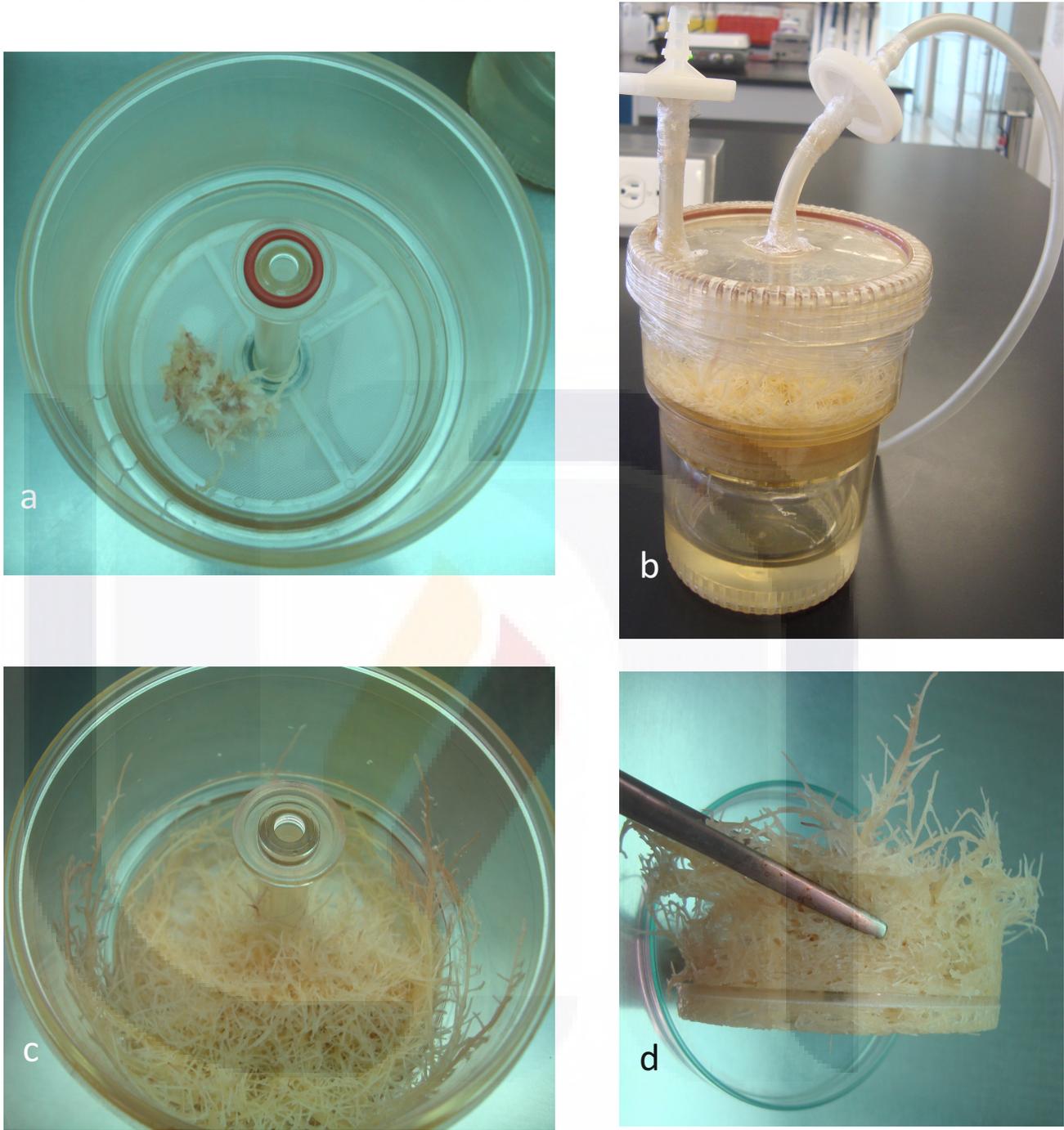
en medio semisólido B5 (g) y DKW (h).

**VI.1.c. Crecimiento de las raíces transformadas en un sistema de inmersión temporal RITA®.**

Para reducir los costos de labor y consumibles (Pavlov y Bley, 2006), se escaló el cultivo de raíces transformadas utilizando un sistema de inmersión temporal RITA® (Fig. 18). Un sistema de cultivo líquido provee la producción efectiva y rápida de las raíces transformadas transgénicas (Giri y Narasu 2000; Triplett *et al.*, 2008 ). Estos sistemas permiten el contacto temporal entre cultivos vegetales *in vitro* y el medio líquido, reduciendo problemas de hiperhidricidad asociados al cultivo de raíces pilosas en biorreactores (Georgiev *et al.*, 2007). En estos sistemas, las raíces transformadas de cactáceas crecieron sin mostrar variación morfológica o formación de tejido calloso, y mostraron una gran ramificación (excepto *T. pseudopectinatus*, en el que no se observó ramificación de las raíces). Estas observaciones son semejantes a las de Pavlov y Bley (2006) en raíces pilosas de *Beta vulgaris*. Por lo tanto, se lograron evadir los problemas asociados con el cultivo de raíces transformadas (limitación de nutrientes y oxígeno en tejidos centrales, crecimiento heterogéneo y necrosis) al utilizar estos biorreactores (Fig. 19). Las tasas de crecimiento de las raíces transformadas en los sistemas RITA® no fueron estadísticamente diferentes a los medios en medio semisólido (Fig. 18) aunque los experimentos solo se llevaron a cabo en medio MS.



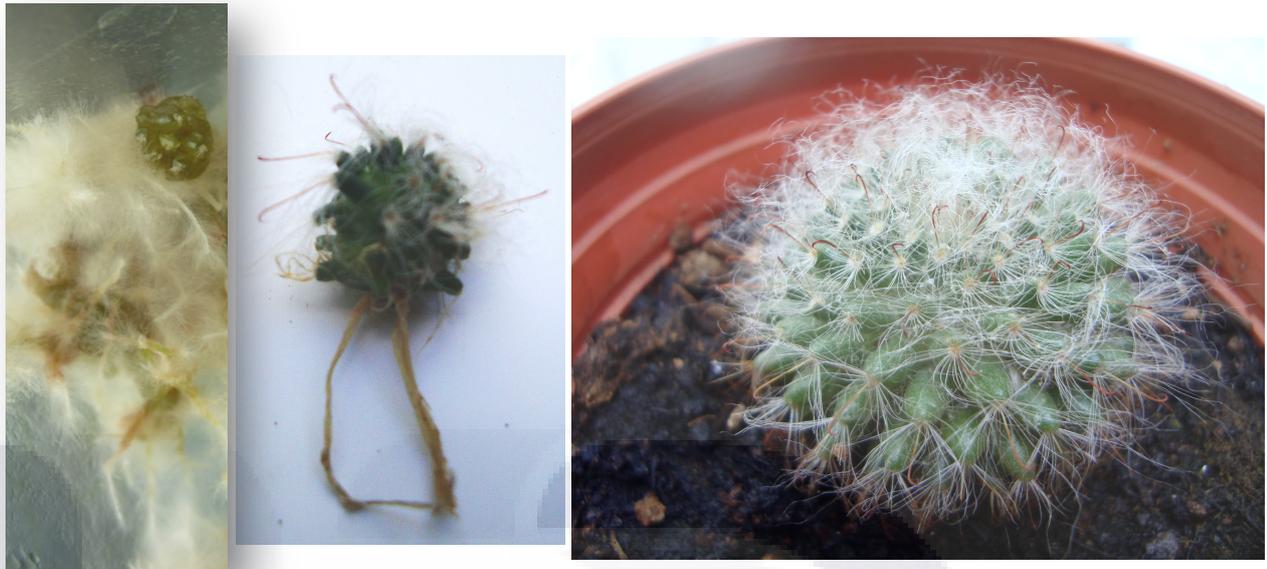
**Figura 18.** Comparación en el incremento de biomas de raíces transformadas expresado como incremento en peso fresco (g), después de 30 días de cultivo en sistemas de inmersión temporal RITA® (R), y en medio MS semisólido (MS). Las barras representan el error estándar. No difieren significativamente cuando  $p < 0.05$ , utilizando la prueba de rango múltiple de Tukey-Kramer. Se muestran los resultados combinados de dos experimentos independientes.



**Figura 19.** Secuencia de la obtención de biomasa de raíces transformadas de *T. lophophoroides* cultivadas en el sistema de inmersión temporal RITA@.

#### VI.1.d. Generación de brotes a partir de cultivos de raíces transformadas.

Si bien no era el objetivo de este trabajo, se observó la generación espontánea de brotes a partir de los cultivos de raíces transformadas de *E. chaffeyii*, *M. bocasana* var. *bocasana*, *T. laui* y *T. pseudopectinatus* (Fig. 20, 21, 22 y 23). Al haberse regenerado a partir de raíces transformadas, es de suponerse que estos brotes conserven los mismos transgenes que poseen los tejidos que los originaron. Para confirmar esto, los brotes se analizaron mediante una prueba histoquímica (Fig. 26) y un ensayo fluorométrico de GUS (Fig. 25) y se amplificaron los genes *nptIII*, *rolB* y *gus* por PCR y se demostró su naturaleza transgénica. Los brotes se separaron del cultivo de raíces y se cultivaron de manera independiente. Las plantas regeneradas de las raíces transformadas de varias especies de plantas tienen fenotipos característicos, como internodos cortos, hojas arrugadas y una masa de raíces abundante con ramificaciones laterales extensas (Kajikawa *et al.*, 2010). A la fecha no existen reportes de descripciones morfológicas de brotes transformados de Cactáceas regenerados a partir de raíces transformadas. La generación de estas plantas abre una línea muy interesante de investigación acerca de cómo los genes silvestres de *A. rhizogenes* podrían afectar la peculiar morfología de las cactáceas. Esto debido a que en estas plantas no hay hojas ni entrenudos como tales, que son las estructuras más afectadas por estos genes en otros grupos de plantas (Spena *et al.*, 1987). Se logró la micropropagación de estos brotes en medio MS adicionado con 0.5-1 mg/mL de benzil adenina (BA). Algunos de estos brotes fueron exitosamente transferidos a tierra (Fig. 20) y se observó que son más resistentes a la aclimatación (Reyes-Silva, comunicación personal). Ya que México es centro de origen de estas especies, y su estatus es delicado, se ha tenido mucho cuidado con el aislamiento de estos brotes transformados de los normales. La importancia de estos brotes radica en los estudios histológicos, morfológicos y moleculares que pueden derivar de la disponibilidad de estas plantas transgénicas regeneradas.



**Figura 20.** Generación de brotes transformados a partir de cultivos de raíces transformadas de *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*. Brote transformado de la misma especie, listo para ser transferido a tierra. Brote aclimatado en condiciones de invernadero.



**Figura 21.** Brotes transformados generados a partir de cultivos de raíces transformadas de *Escobaria chaffeyi*.



**Figura 22.** Brotes transformados generados a partir de cultivos de raíces transformadas de *Turbinicarpus laui* listos para ser transferido a tierra.



**Figura 23.** Brotes transformados generados a partir de cultivos de raíces transformadas de *Turbinicarpus pseudopectinatus* listos para ser transferido a tierra.

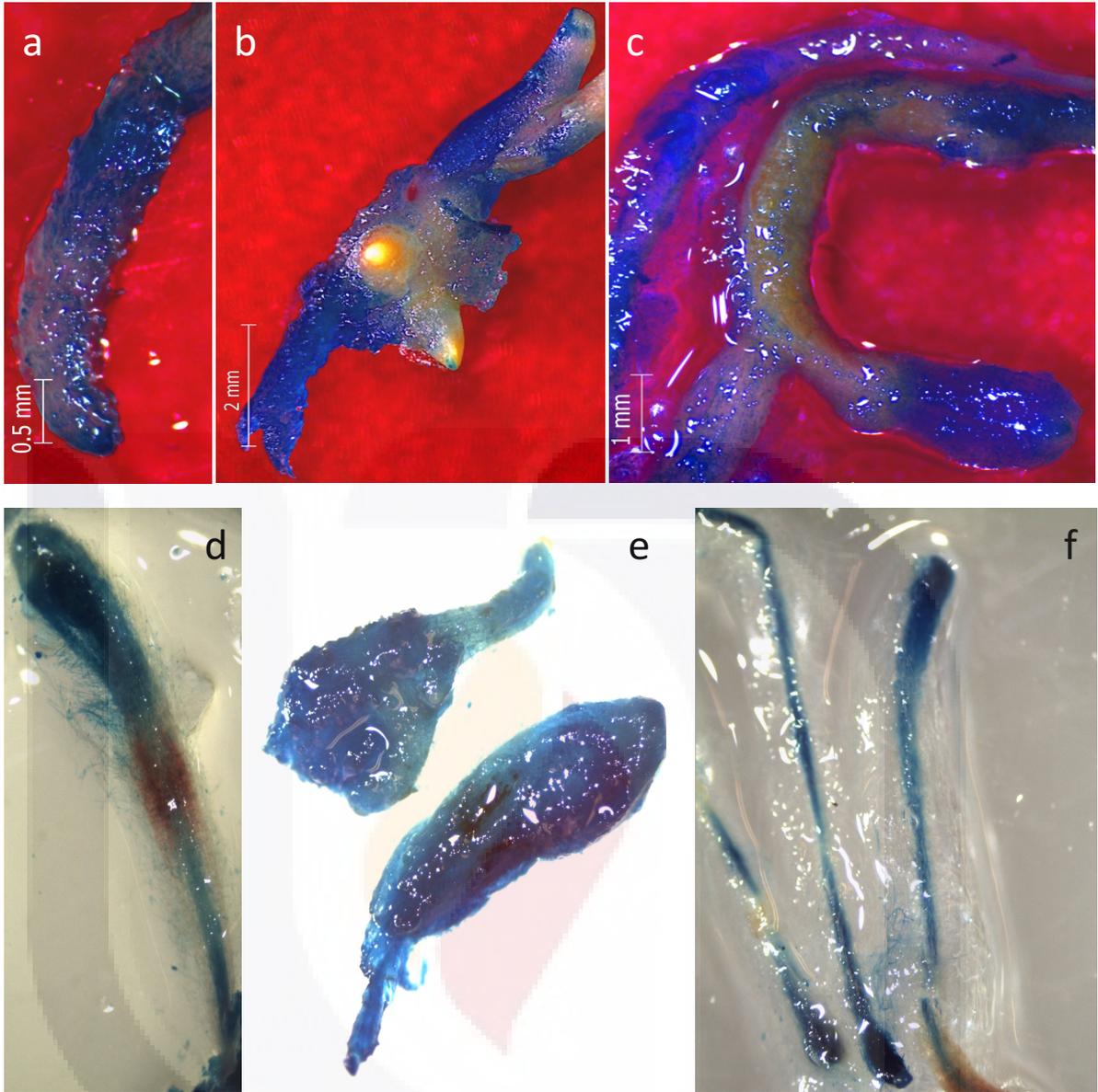
TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

**VI.2. Con respecto al objetivo particular referente a llevar a cabo la caracterización molecular de las raíces transformadas obtenidas.**

**VI.2.a. Análisis histoquímico para la actividad GUS.**

Jefferson *et al.* (1987) describieron el uso de la beta-glucuronidasa (GUS) como un marcador para el estudio de expresión genética en plantas. La expresión del gen GUS en tejidos vegetales puede probarse cualitativamente mediante un ensayo histoquímico. Producto de nuestro trabajo experimental, se observó una coloración azul correspondiente a la actividad del producto del gen *gus* presente en el genoma de las especies seleccionadas para el resto de los experimentos (Fig. 24) confirmando así la exitosa transformación de los cultivos de raíces pilosas establecidos en nuestro laboratorio.





**Figura 24.** Tinción histoquímica para la expresión de GUS en raíces transformadas de (a) *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, (b) *Turbincarpus lophophoroides*, (c) *Ferocactus peninsulae* (d) *Escobaria chaffeyii* (e) *T. pseudopectinatus* (f) *T. schmiedickeanus* var. *shwarzii* que fueron inducidas por inoculación con *A. rhizogenes*.

**VI.2.b. Ensayo fluorométrico de la actividad GUS.**

La expresión de GUS también puede medirse cuantitativamente mediante un ensayo fluorométrico. La enzima GUS degrada el sustrato comercial ácido 4-metilumbeliferil-beta-D-glucorónico (MUG) y lo convierte en metilumbeliferona (MU) fluorescente. Este ensayo se llevó a cabo en brotes

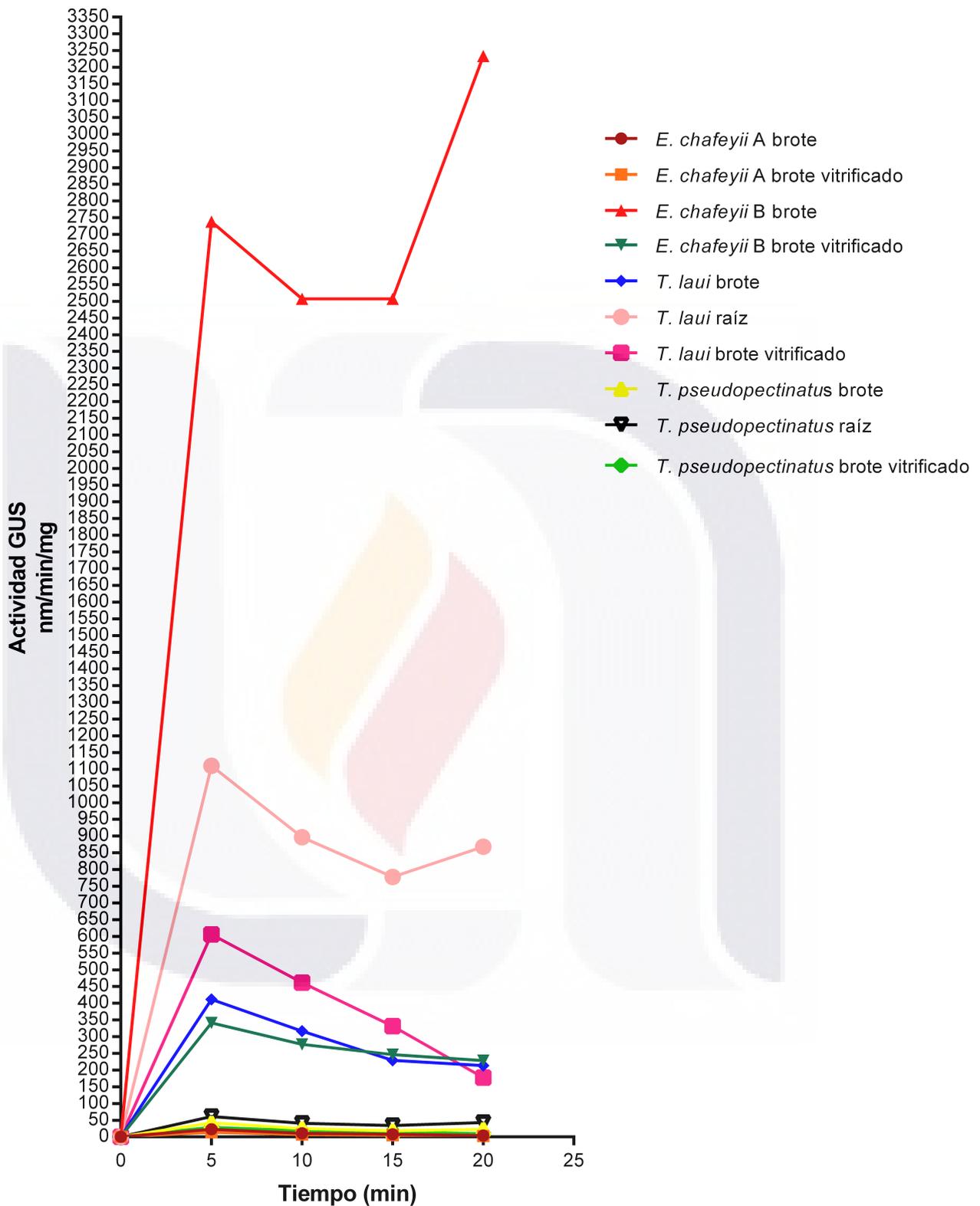
regenerados a partir de las raíces transformadas, así como brotes vitrificados del mismo origen y raíces transformadas para comparar la expresión de este gen en diferentes órganos y tejidos. La cuantificación comparativa de la expresión de diferentes tipos de tejidos requiere un ensayo fluorométrico sensible (Jefferson *et al.*, 1987).

Se observaron respuestas en los diferentes tejidos y especies analizadas (Fig. 25). En el caso de *Escobaria chaffeyii*, se tomaron brotes regenerados a partir de dos líneas de cultivos de raíces transformadas (A y B). Se observó que para los brotes originados por la línea A no existió actividad de GUS confirmando que se trata de brotes. Por otro lado, los brotes regenerados a partir de la línea B (tanto normales como vitrificados) muestran actividad de GUS. Sin embargo, es importante la diferencia de esta actividad comparando los brotes normales con los vitrificados, siendo mucho mayor en brotes normales, alcanzando más de 3000 nm/mg de proteína a los 20 minutos, aunque dicha actividad alcanzó un nivel similar desde los 5 minutos (Fig. 26A y 26B). Para *T. laui*, se observó una mayor actividad GUS en raíces transformadas (mayor a 1000 nm/mg de proteína a los 5 min) que en ambos tipos de brotes. Los brotes normales mostraron una mayor actividad GUS que los vitrificados, lo cual se puede explicar por mayor contenido de agua que implica un menor contenido de proteínas totales en una misma medida de peso (Fig. 26A y 26B). Los resultados en *T. pseudopectinatus* fueron similares en cuanto a tejidos analizados. Sin embargo, la actividad de GUS máxima fue de aproximadamente 60 nm/mg de proteína a los 5 min (Fig. 26A y 26B). Los brotes de *E. chaffeyii* regenerados a partir de la línea B de raíces transformadas fueron los que mostraron la actividad GUS más alta en todas las muestras analizadas. Se obtuvo el pico máximo a los 5 minutos para casi todas las muestras sugiriendo que hubo una mayor concentración de enzima que de sustrato en el ensayo, degradándolo en muy poco tiempo.

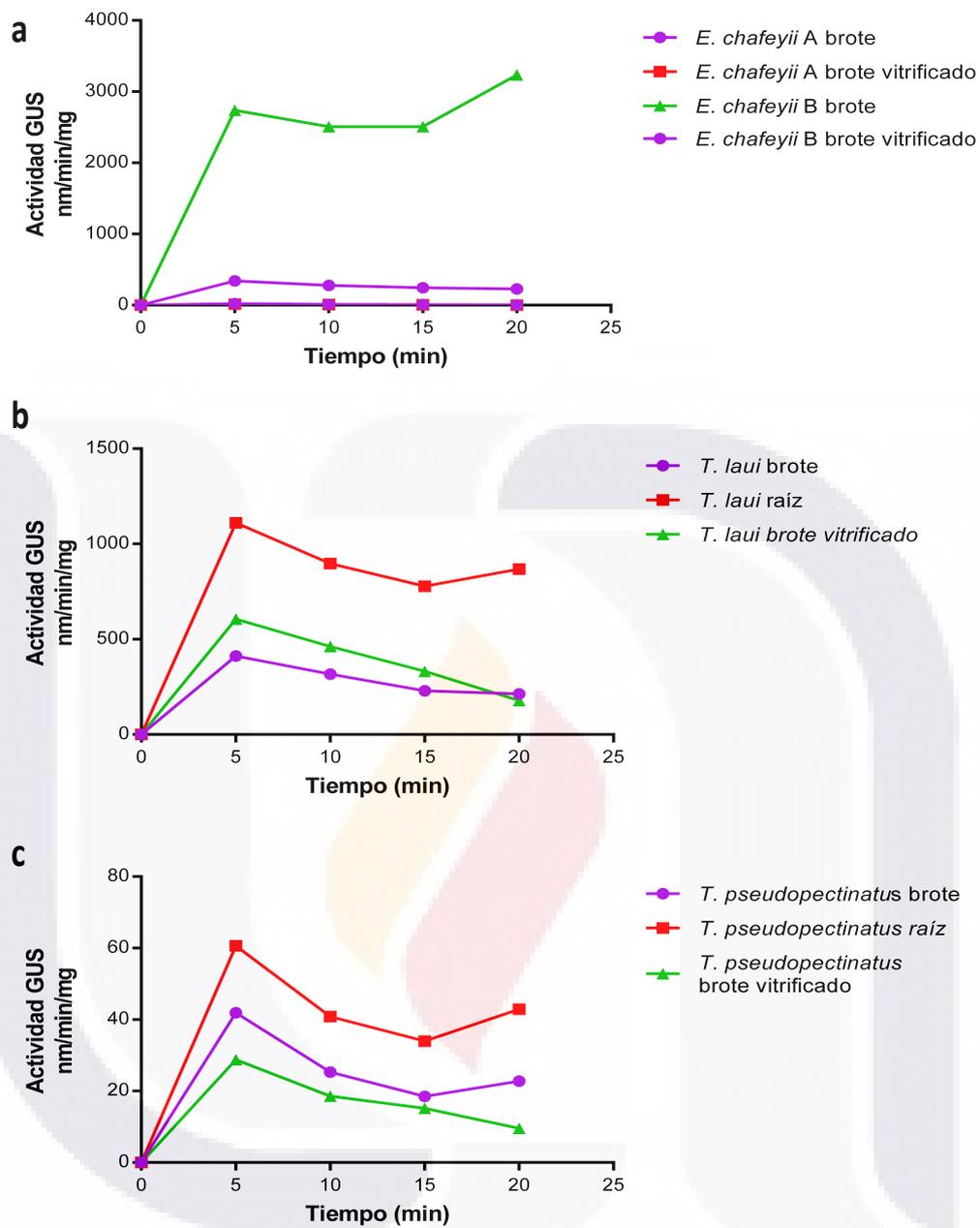
Generalmente, la expresión de un gen luego de quince días de transformado se observa como una indicación de integración estable al

genoma de la célula (Jasik *et al.*, 2011), los tejidos utilizados para nuestros análisis llevaban varios meses de subcultivo. Jasik *et al.*, 2011 analizaron la expresión de GUS en diferentes tejidos de brotes regenerados de *Brassica napus* y consideraron como positivos únicamente aquellos tejidos con una actividad de más de 10 nmol 4-MFU/mg proteína/hora, considerada como muy alta. Se puede considerar que todas nuestras muestras en las que se obtuvo una actividad de GUS fueron positivas ya que exhiben cantidades hasta 300 veces mayores a la establecida en cuestión de minutos, no horas.

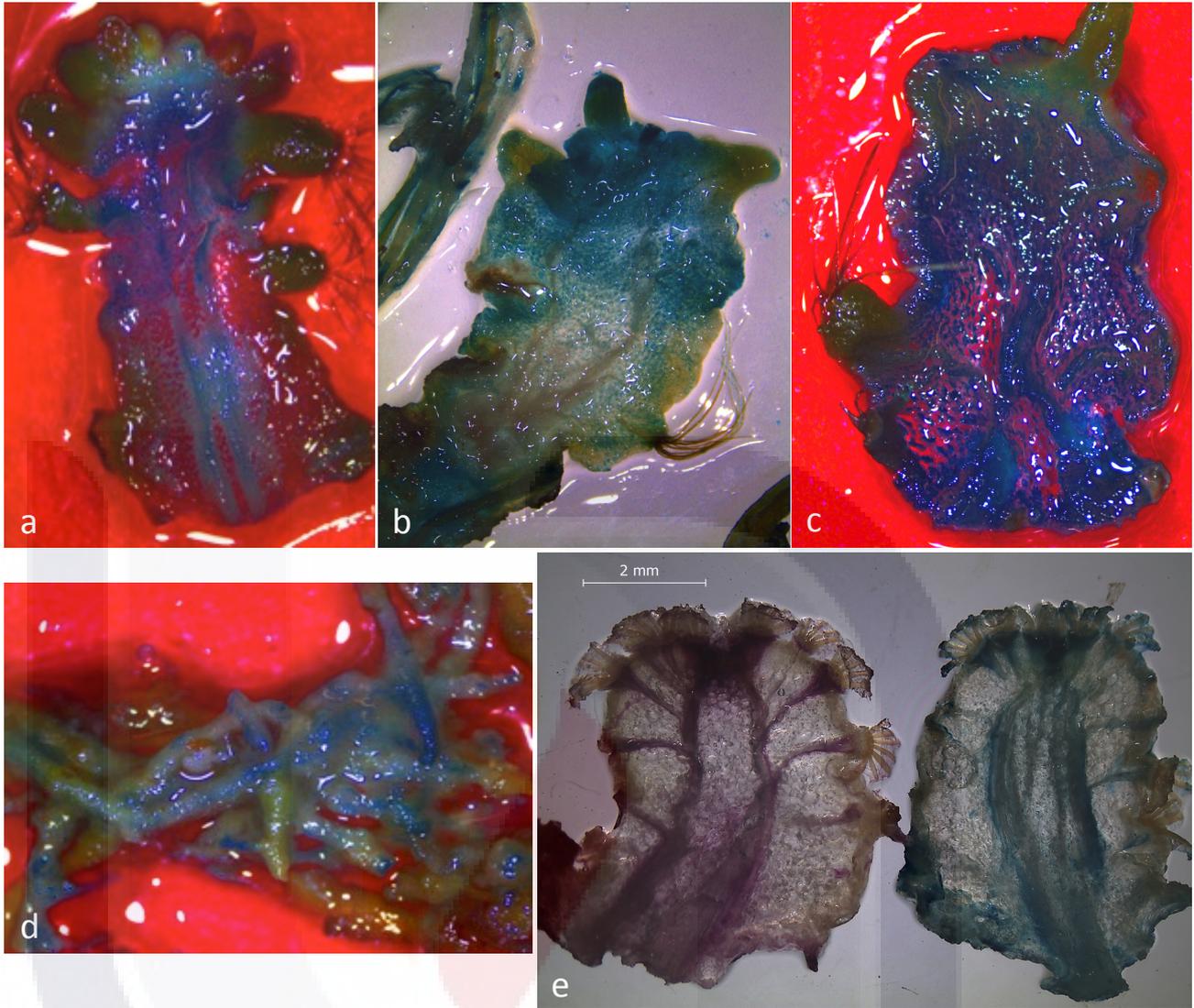




**Figura 25.** Actividad GUS expresada en nm/min/mg de proteína a los 0, 5, 10, 15 y 20 min, en diferentes tejidos presuntamente transformados de *E. chafeyii*, *M. bocasana* var. *bocasana*, *Turbinicarpus laui* y *T. pseudopectinatus*.



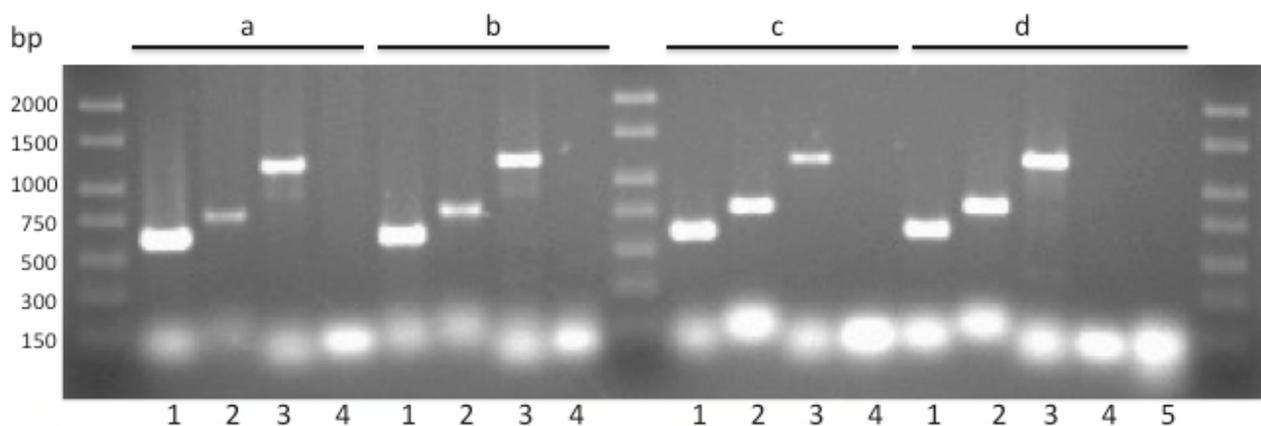
**Figura 26A.** Actividad GUS expresada en nm/min/mg de proteína a los 0, 5, 10, 15 y 20 min, en (a) brotes regenerados a partir de dos líneas de raíces presuntamente transformadas de *Escobaria chafeyii*, (c) raíces transformadas y brotes regenerados (normal y vitrificado) a partir de raíces transformadas de *Turbinicarpus laui*, (e) raíces transformadas y brotes regenerados (normal y vitrificado) a partir de raíces transformadas de *T. pseudopectinatus*.



**Figura 26B.** Tinción histoquímica para la expresión de GUS en (a, b y c) brotes regenerados a partir de raíces transformadas de *Escobaria chafeyii*, (d) raíces transformadas de *T. laui* y (e) brotes regenerados de *T. pseudopectinatus* con X-gluc magenta (izquierda) y X-gluc azul (derecha).

### VI.2.c. Verificación de transformación mediante PCR .

El PCR (Fig. 27) confirmó la transformación exitosa de estas raíces mediada por *A. rhizogenes*. En el carril cuatro de la Fig. 27 se observa que no amplificó la reacción de PCR para el gen *virD1*, lo cual nos indica que ya no está presente *A. rhizogenes* en los cultivos de raíces transformadas, y que la presencia de los genes de la región T-DNA de la bacteria se integraron en el genoma de la planta.



**Figura 27.** Detección de los genes *rolB*, *nptII*, *gus* y *virD1*. ADN en raíces transformadas de: *Escobaria chaffeyi* (a), *Ferocactus peninsulae* (b), *T. pseudopectinatus* (c), y *T. schmiedeckeanus* var. *schwarzii* (d). Se utilizaron los oligos para amplificar los genes *nptII*[1], *rolB*[2], *gus*[3], *virD1*[4], y *vtc*[5] (como control negativo).

**VI.3. Con respecto al objetivo particular referente a realizar un escrutinio fitoquímico de betalainas y alcaloides en las raíces transformadas, y mismas especies en condiciones naturales, para comparar su capacidad biosintética.**

#### **VI.3.a. Detección de Betalainas.**

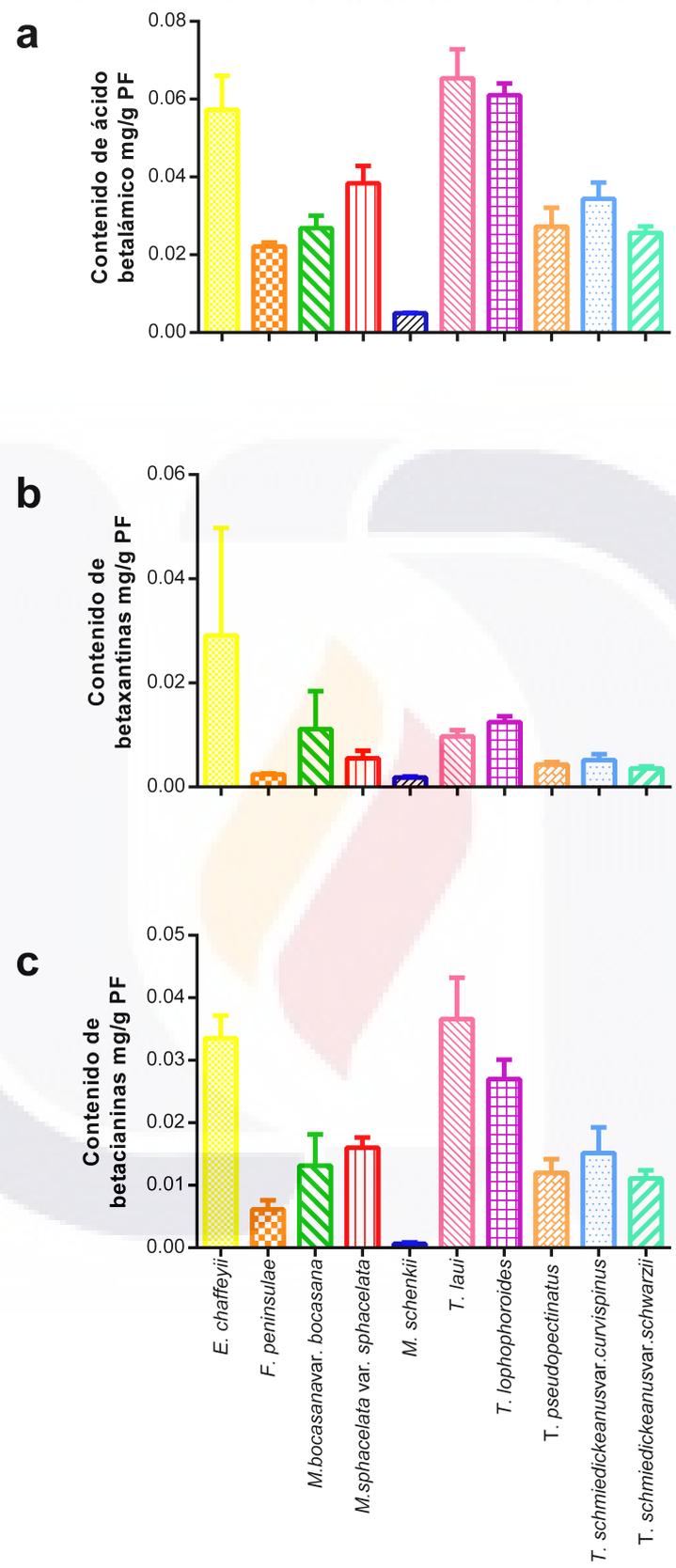
Se observaron gran variedad en el contenido de betalainas entre raíces transformadas de las diferentes cactáceas analizadas (Fig. 28). El contenido de betaxantinas fue bajo en la mayoría de las especies, excepto en *Escobaria chaffeyii* donde fue aproximadamente 0.05 mg/g de peso fresco. El contenido de betacianinas fue mayor en *T. lophophoroides*, *Escobaria chafeyii* y *T. laui*, lo que coincide con el contenido de ácido betalámico en estas especies (Fig. 28 y 29). Esto puede deberse a que las betalainas se están degradando rápidamente durante el análisis. También sugiere que existe la posibilidad de inducir una mayor síntesis de betalainas ya que este es su precursor. Ocurrió muy poca producción de ácido betalámico y betalainas en *Myrtyllocactus schenkii* (Fig. 28-29a y c). El cultivo de células y tejidos vegetales bajo condiciones *in vitro* resultaron en cambios significativos en el metabolismo, especialmente el metabolismo secundario, y por lo tanto en el contenido de

metabolitos Se ha reportado en varias plantas cultivadas *in vitro* que producen betalaínas un cambio significativo tanto en la proporción de betacianinas/betaxantinas como la concentración de betacianinas (Gerogiev *et al.*, 2010).

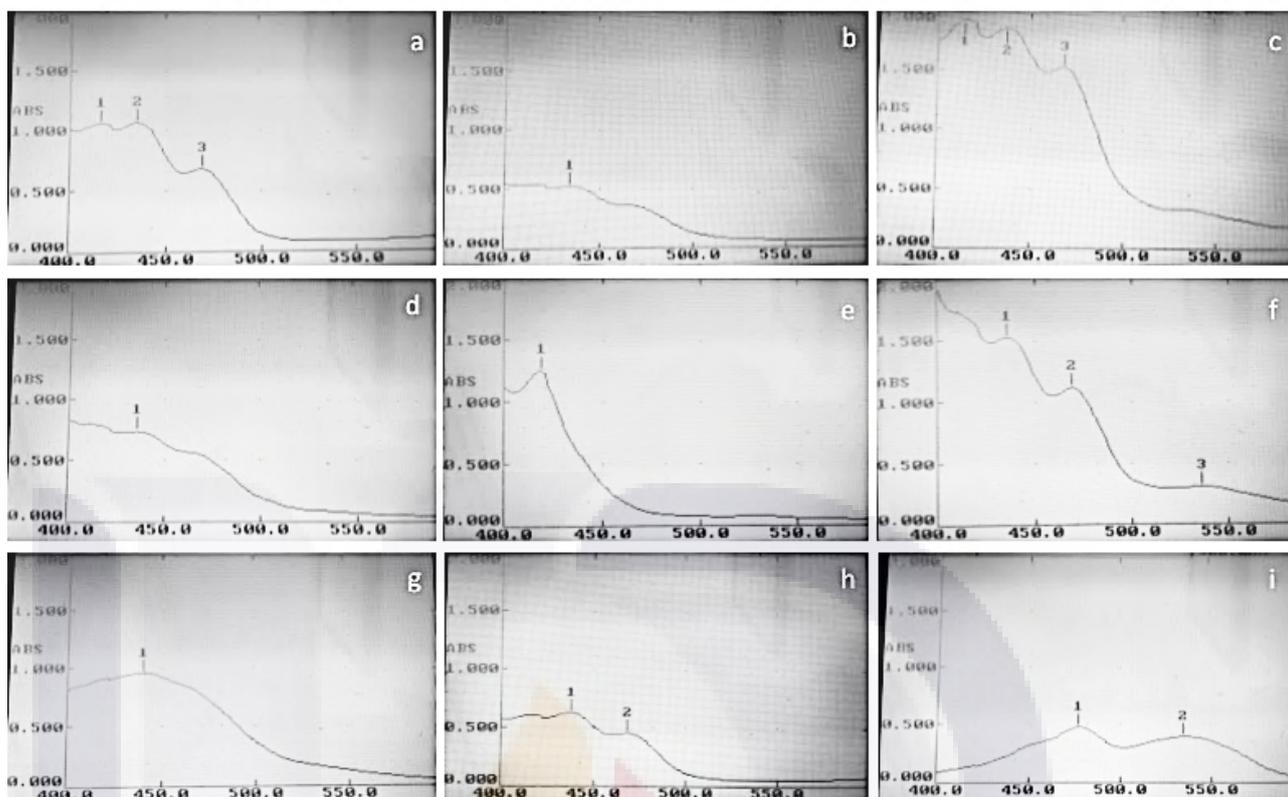
No se encontró ningún reporte de contenido de betalaínas en raíces transformadas de cactáceas. Se buscaron reportes de contenidos de betalaínas de las plantas intactas o los frutos de éstas, de las especies analizadas. No se encontró información sobre *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, pero si para algunas otras especies del género, y el contenido total de betacianinas iba desde 0.016 hasta 0.172 mg/g de peso fresco del fruto en las diferentes especies analizadas en el estudio conducido por Wybraniec y Nowak-Wydra (2007). El contenido de betacianinas para las raíces transformadas de esta especie es de aproximadamente 0.015 mg/g de peso fresco, sin embargo el protocolo de extracción y manejo de las muestras pudo ocasionar la degradación de los pigmentos que son altamente fotosensibles y oxidables. No existe información sobre contenido de betalaínas para ninguna de las demás especies analizadas, probablemente porque su distribución limitada, poblaciones restringidas y pequeña talla, las conviertan en poco atractivas para su extracción. Sin embargo, se ha reportado que los genes *rol* del T-DNA Ri inducen un gran número de cambios en la sensibilidad a reguladores de crecimiento y/o el metabolismo de las hormonas de la planta. Además, la transformación de tejidos vegetales mediante la infección de *A. rhizogenes* ha mostrado un incremento en la producción de ciertos metabolitos (Kajikawa *et al.*, 2010). La acumulación de betalaínas por estrés inducido en Cactaceae solo se ha demostrado para *Opuntia macrocentra*, donde las betacianinas se acumulan en los tallos como respuesta a frío o estrés por sequía (Powell y Weedon, 2004). Las condiciones de cultivo *in vitro* pudieron estar sometiendo a estos tejidos a estrés provocando la producción de estos compuestos en las raíces transformadas, o cambios en la organización de su genoma (Gerogiev *et al.*, 2007). Wybraniec *et al.* (2010) demostraron que el estrés lumínico induce la síntesis de betacianinas específicas en tallos de cactus y pueden servir como biomarcadores. Los cultivos de raíces estaban

expuestos a luz, por lo que este factor pudo haber incrementado la producción de betalaínas en las raíces transformadas, ya que esta respuesta no se observa cuando las raíces se cultivan en la obscuridad. Sería interesante en un futuro analizar la capacidad antioxidante de estos extractos, ya que Georgiev *et al.* (2010) encontraron que los extractos de betalaínas obtenidos de raíces transformadas de *Beta vulgaris* tenían mayor actividad antioxidante que los extractos obtenidos de betabeles maduros. Esto se relacionó con concentraciones incrementadas (más de veinte veces) de compuestos fenólicos concomitantes asociados, que pueden tener efectos sinérgicos con las betalaínas.



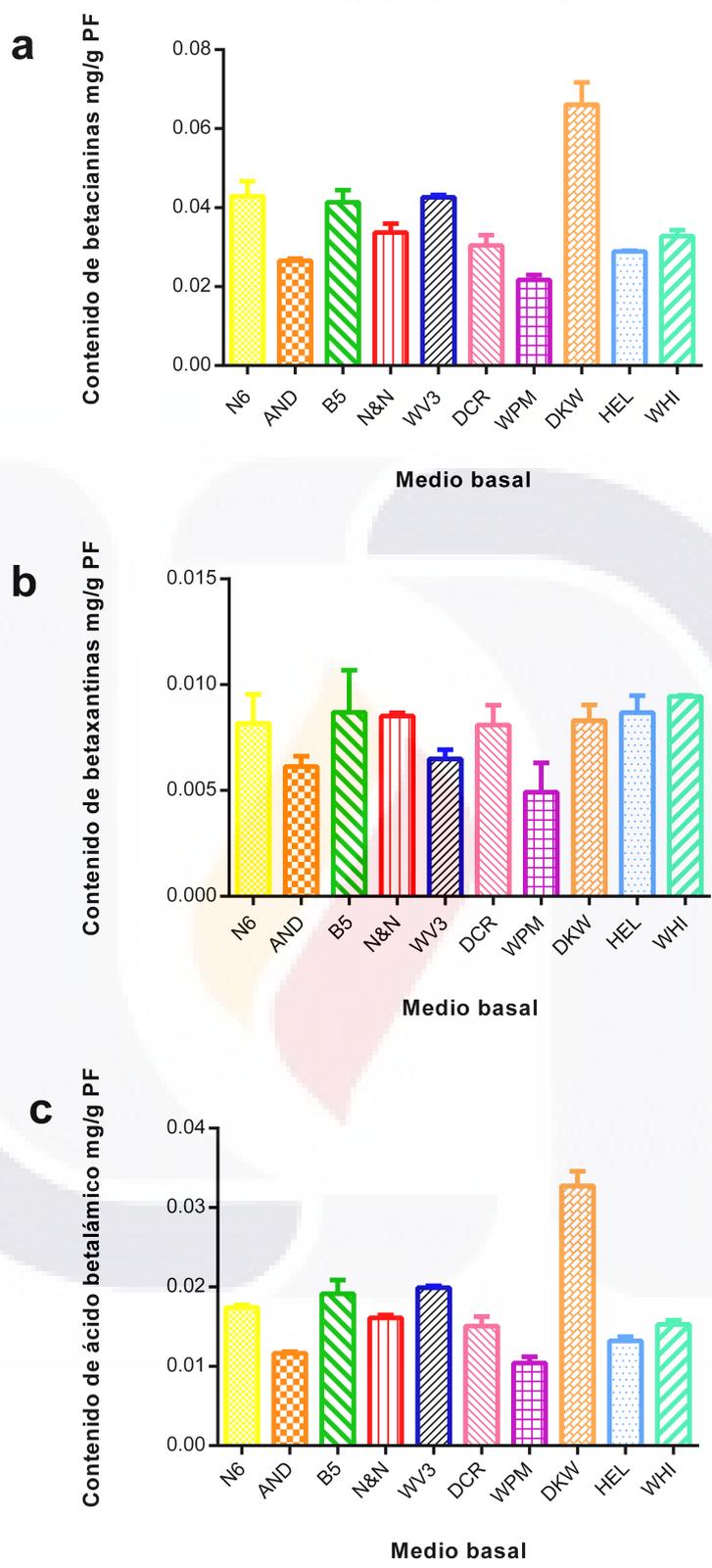


**Figura 28.** Contenido de (a) ácido betalámico (b) betaxantinas y (c) betacianinas en mg/g de peso fresco en las raíces transformadas de diez especies de Cactáceas.



**Figura 29.** Barrido en espectrofotómetro de 400 nm a 600 nm de extracto metanólico de betalainas de raíces transformadas de (a) *Escobaria chaffeyii*, (b) *Ferocactus peninsulae* (c) *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, (d) *M. spacelata* var. *sphacelata* (e) *Turbinicarpus lophophoroides* (f) *T. laui* (g) *T. pseudoplectinatus* (h) *T. schmidickeanus* var. *curvispinus* (i) *T. schmidickeanus* var. *schwarzii*.

Se observó un mayor contenido de ácido betalámico y betacianinas en las raíces transformadas de *T. laui* cuando se cultivaron en medio basal DKW (Fig. 30a y c). En el medio WPM es donde se observó una menor cantidad de estos dos compuestos. El medio DKW es considerado un medio rico en N, con altos contenidos de nitrógeno y fuerza iónica, mientras que el medio WPM presenta una fuerza iónica intermedia y contenido de N muy bajo. El contenido de betaxantinas parece no variar mucho en diferentes medios de cultivo (Fig. 30b). Condori *et al.* (2010) y Shinde *et al.* (2010) mencionan que el medio basal de cultivo, particularmente el contenido de nutrientes, ha tenido un gran impacto sobre el crecimiento de raíces transformadas, por lo que se ha convertido en un blanco para maximizar la acumulación de fitoquímicos en raíces transformadas.



**Figura 30.** Contenido de (a) ácido betalámico (b) betaxantinas y (c) betacianinas en mg/g de peso fresco en las raíces transformadas de *Turbinicarpus laui* cultivadas en diferentes medios basales.

### VI.3.b. Análisis de alcaloides por cromatografía en capa fina (TLC).

Los patrones de alcaloides observados en las placas de TLC mostraron tanto diferencias como algunas fracciones semejantes entre las raíces transformadas y la planta madre, demostrando que la capacidad biosintética de las raíces transformadas es diferente a la de las plantas completas. En ambas placas vistas bajo luz UV se observaron colores vivos en las muestras de la planta intacta y en muestras de raíces transformadas se observaron varias fracciones pero de diferente coloración (Fig. 31 y 38). El reactivo de ninhidrina (Fig. 32, 35 y 39) se une a aminas primarias y secundarias dando colores rosa a violeta. Los reactivos de Dragendorff (Fig. 33, 36 y 40) y de yodoplatinato (Fig. 34, 37 y 41) se usan para identificar alcaloides, el primero dando manchas de color naranja-café y el segundo manchas azul-morado oscuro. Se observó que en algunas muestras (*T. lophophoroides*), el patrón de compuestos tipo alcaloide fue muy semejante en la planta completa y en el extracto de raíces transformadas. Mientras, en los extractos de raíces transformadas de *T. laui*, *T. pseudopectinatus* y *T. schmidickeanus* var. *klinkerianus* se observaron que las fracciones de alcaloides son más intensas en los extractos de raíces transformadas que en los de la planta madre. También podemos observar que algunas fracciones presentes en las raíces transformadas de las especies antes mencionadas y en *Mammillaria sphaelata* var. *sphaelata*, no están presentes en la planta intacta. En otros casos, como *Escobaria chaffeyii*, *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, *Myrtillocactus schenckii* y *T. schmidickeanus* var. *shwarzii* podemos observar que existen algunas fracciones presentes en los extractos de la planta madre que no están presentes en los de las raíces transformadas. Se observaron patrones diferentes entre el extracto de raíces transformadas y la planta madre para todas las especies estudiadas con los tres diferentes reveladores. En muchas de las muestras, se observaron más fracciones y manchas más intensas en los extractos de las plantas madre con respecto a las raíces transformadas (Fig. 40, 41 y 42), excepto para *Escobaria chafeyii* y *Mammillaria sphaelata* var. *sphaelata* donde se observaron unas fracciones en los extractos de las raíces transformadas que no se pueden ver en el extracto de las plantas madre. Al

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

comparar la capacidad biosintética de las raíces transformadas con la de la planta madre, podemos decir que ocurre mucha variabilidad de especie a especie. Habiendo especies donde los patrones de alcaloides son muy semejantes, otras donde la planta madre produce más alcaloides que las raíces transformadas, y por último otras especies en las que se observa una mayor biosíntesis de alcaloides en las raíces transformadas. Las clases de fitoquímicos más importantes producidos en raíces transformadas son terpenoides, alcaloides y fenólicos. También se han identificado fitoquímicos nuevos en raíces transformadas (Ono y Tian, 2011).

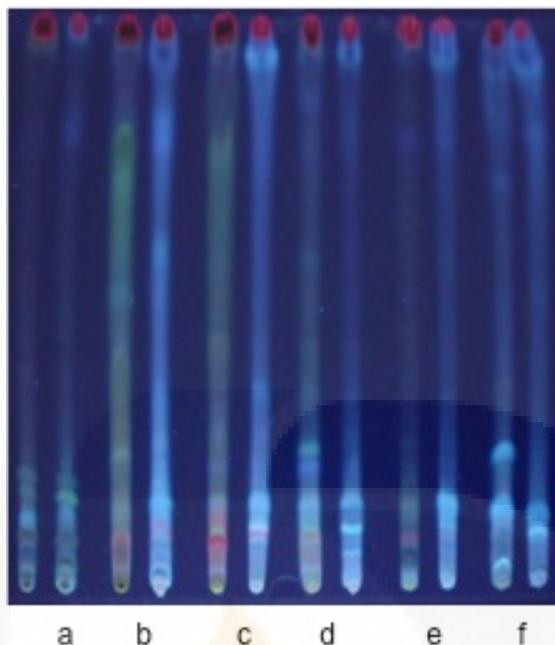
Esto es de gran interés, ya que las plantas se han considerado fábricas de químicos, por su habilidad para producir fitoquímicos industrial y farmacéuticamente importantes. Sin embargo, el mayor problema de extraer fitoquímicos de tejido vegetal normal es que su crecimiento y la capacidad biosintética está significativamente impactada por el estrés ambiental (Ono y Tian, 2011). Por lo tanto, las raíces transformadas son una alternativa atractiva como fuente de fitoquímicos por su estabilidad genética, su capacidad biosintética comparable a la de la planta nativa, y su producción de biomasa significativa, tal como se ha observado para algunas de las especies analizadas en este trabajo. Además, las raíces transformadas con frecuencia acumulan fitoquímicos a un nivel más alto que cultivos de células/tejido calloso que contienen células indiferenciadas (Ono y Tian, 2011). La producción de fitoquímicos en raíces pilosas es afectada por la incorporación de los genes T-DNA en el genoma del hospedero y el tamaño o nivel de ploidía del genoma de las células. Se ha observado que el loci del gen *rol* (*rolA*, *rolB* y *rolC*) juega un papel determinante en el incremento de la producción de fitoquímicos en células transformadas. En una etapa previa de este trabajo, se comprobó la integración de el gen *rolB* al genoma vegetal. La función bioquímica de *rol* es desconocida, pero su expresión se ha visto relacionada con el mantenimiento de niveles estables de fitoquímicos como antraquinonas en *Rubia cordifolia* por siete años (Shkryl et al., 2008). Shkryl et al. (2008) demostraron que la presencia o ausencia de varios genes T-DNA (responsables de la inducción de raíces o síntesis de auxina y opina) influyen en la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

morfología, crecimiento, expresión de genes biosintéticos y acumulación de metabolitos en raíces transformadas de *C. roseus*.



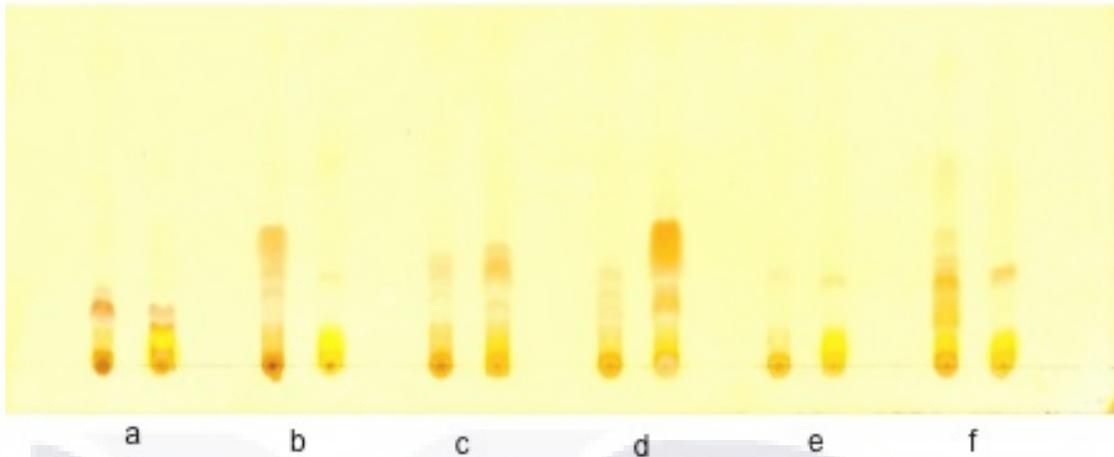
TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



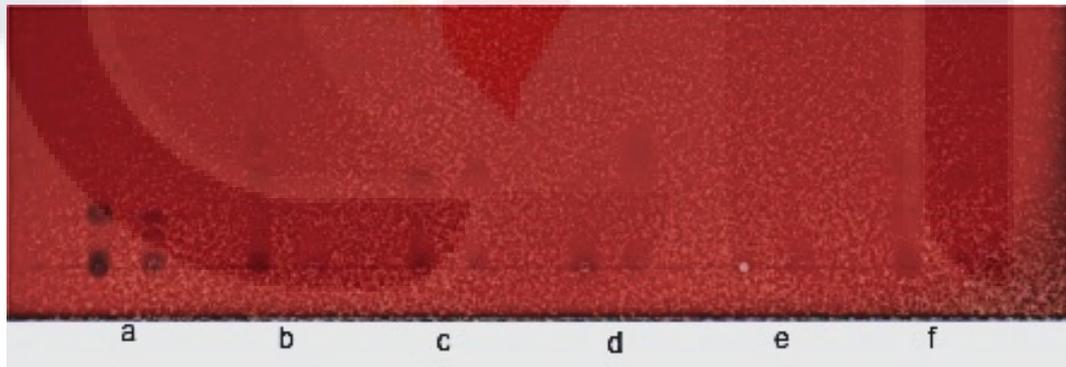
**Figura 31.** Cromatografía en capa fina cargando 20  $\mu$ L de muestra bajo luz UV (264 nm). Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Myrtillocactus schenckii*, b: *Turbinicarpus lopophoroides*, c: *T. laui*, d: *T. pseudopectinatus*, e: *T. schmiedickeanus* var *curvispinus*, f: *T. schmiedickeanus* var *shwarzii*.



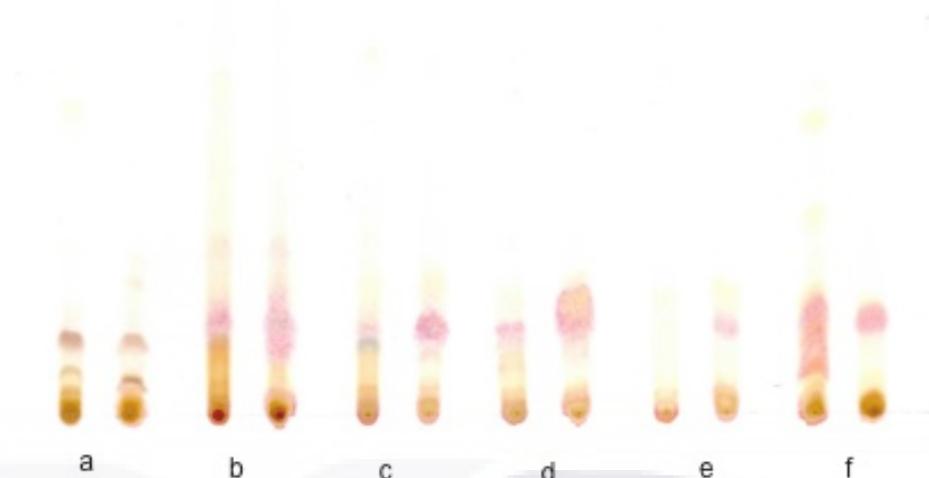
**Figura 32.** Cromatografía en capa fina revelada con ninhidrina cargando 2  $\mu$ L de muestra. Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Myrtillocactus schenckii*, b: *Turbinicarpus lopophoroides*, c: *T. laui*, d: *T. pseudopectinatus*, e: *T. schmiedickeanus* var *curvispinus*, f: *T. schmiedickeanus* var *shwarzii*.



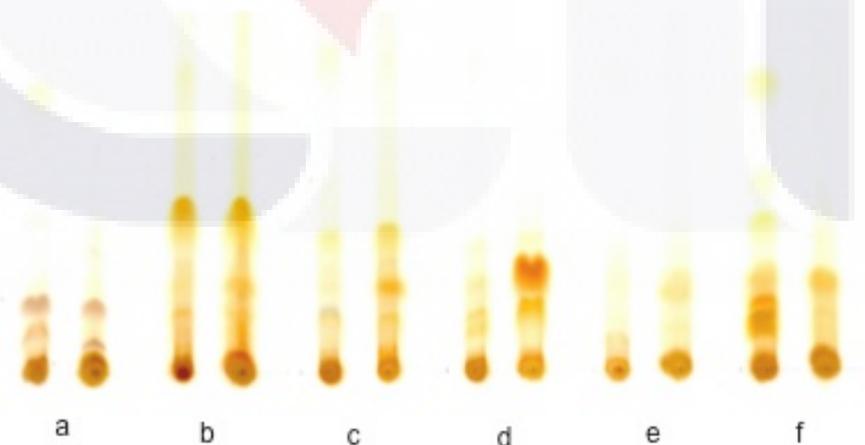
**Figura 33.** Cromatografía en capa fina cargando 2  $\mu$ L de muestra revelada con reactivo de Dragendorff y nitrito de sodio acuoso (10%). Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Myrtillocactus schenckii*, b: *Turbincarpus lopophoroides*, c: *T. laui*, d: *T. pseudopectinatus*, e: *T. schmiedickeanus* var *curvispinus*, f: *T. schmiedickeanus* var *shwarzii*.



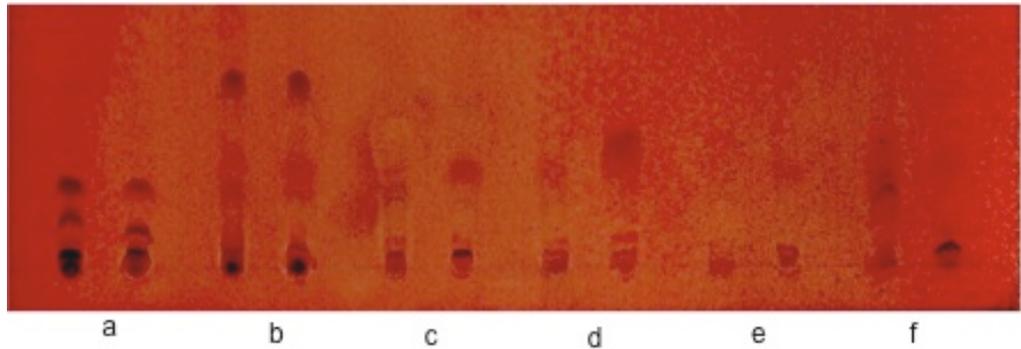
**Figura 34.** Cromatografía en capa fina cargando 2  $\mu$ L de muestra revelada con reactivo de yodoplatinato. Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Myrtillocactus schenckii*, b: *Turbincarpus lopophoroides*, c: *T. laui*, d: *T. pseudopectinatus*, e: *T. schmiedickeanus* var *curvispinus*, f: *T. schmiedickeanus* var *shwarzii*.



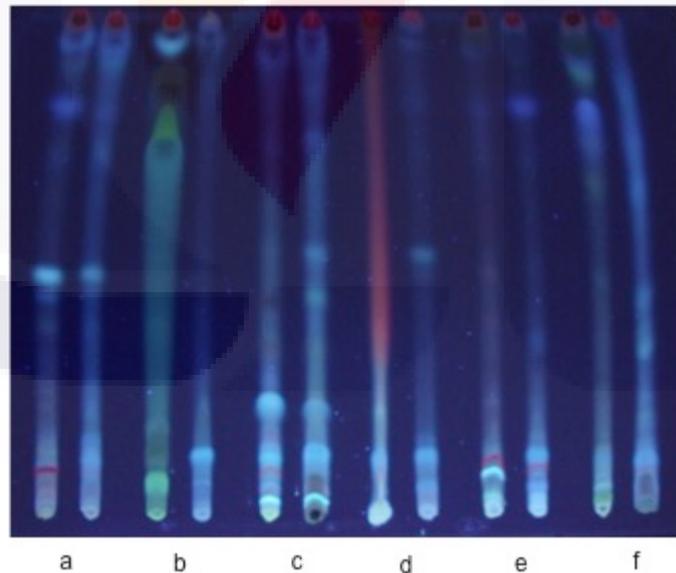
**Figura 35.** Cromatografía en capa fina cargando 20  $\mu$ L de muestra revelada con ninhidrina. Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Myrtillocactus schenckii*, b: *Turbinicarpus lopophoroides*, c: *T. laui*, d: *T. pseudopectinatus*, e: *T. schmiedickeanus* var *curvispinus*, f: *T. schmiedickeanus* var *shwarzii*.



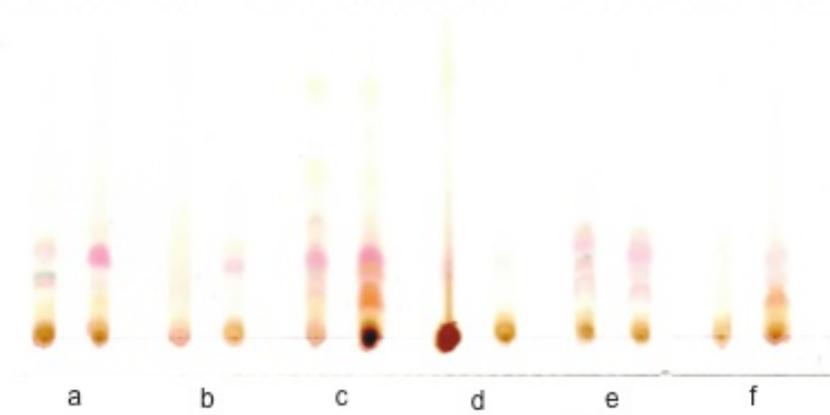
**Figura 36.** Cromatografía en capa fina cargando 20  $\mu$ L de muestra revelada con reactivo de Dragendorff y nitrito de sodio acuoso (10%). Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Myrtillocactus schenckii*, b: *Turbinicarpus lopophoroides*, c: *T. laui*, d: *T. pseudopectinatus*, e: *T. schmiedickeanus* var *curvispinus*, f: *T. schmiedickeanus* var *shwarzii*.



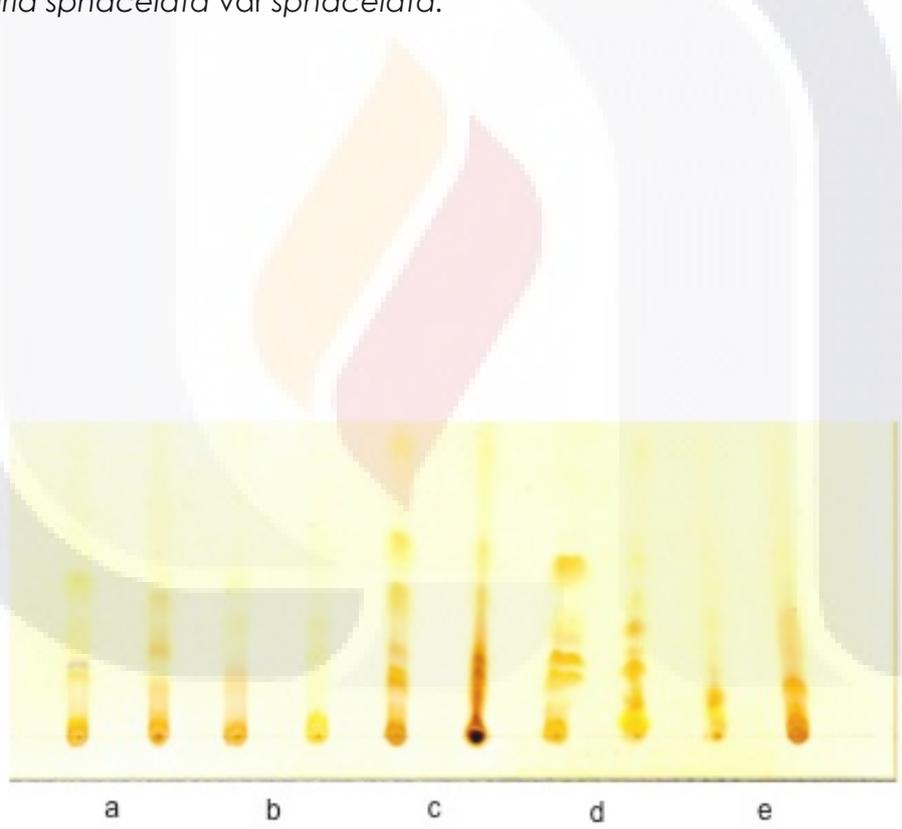
**Figura 37.** Cromatografía en capa fina cargando 20  $\mu$ L de muestra revelada con reactivo de yodoplatinato. Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Myrtillocactus schenckii*, b: *Turbinicarpus lopophoroides*, c: *T. laui*, d: *T. pseudopectinatus*, e: *T. schmiedickeanus* var *curvispinus*, f: *T. schmiedickeanus* var *shwarzii*



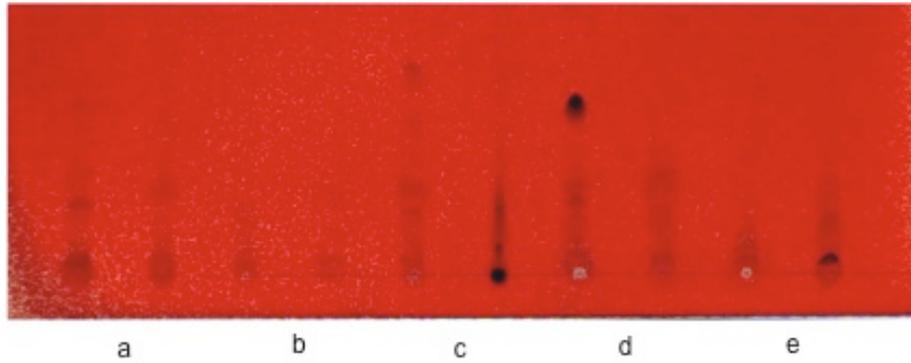
**Figura 38.** Cromatografía en capa fina cargando 20  $\mu$ L de muestra bajo luz UV (240 nm). Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Ariocarpus kotschoubeyanus*, b: *Echinocactus platyacanthus*, c: *Escobaria chaffeyi*, d: *Ferocactus peninsulae*, e: *Mammillaria bocasana* var *bocasana*, f: *Mammillaria sphaedelata* var *sphaedelata*.



**Figura 39.** Cromatografía en capa fina cargando 20  $\mu$ L de muestra revelada con ninidrina. Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Ariocarpus kotschoubeyanus*, b: *Echinocactus platyacanthus*, c: *Escobaria chaffeyi*, d: *Ferocactus peninsulae*, e: *Mammillaria bocasana* var *bocasana*, f: *Mammillaria sphacelata* var *sphacelata*.



**Figura 40.** Cromatografía en capa fina cargando 20  $\mu$ L de muestra revelada con Reactivo Dragendorff y nitrito de sodio acuoso (10%). Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Ariocarpus kotschoubeyanus*, b: *Echinocactus platyacanthus*, c: *Escobaria chaffeyi*, d: *Mammillaria bocasana* var *bocasana*, e: *Mammillaria sphacelata* var *sphacelata*.



**Figura 41.** Cromatografía en capa fina cargando 20  $\mu\text{L}$  de muestra revelada con reactivo de yodoplatinato. Los carriles están ordenados por pares, la primera muestra es extracto de la planta completa, la segunda de raíz transformada. a: *Ariocarpus kotschoubeyanus*, b: *Echinocactus platyacanthus*, c: *Escobaria chaffeyi*, d: *Mammillaria bocasana* var *bocasana*, e: *Mammillaria sphaecelata* var *sphaecelata*.

**VI.4. Con respecto al objetivo particular referente al análisis de los compuestos de posible interés detectados en las raíces transformadas y caracterización de su actividad biológica.**

**VI.4.a. Análisis de alcaloides por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.**

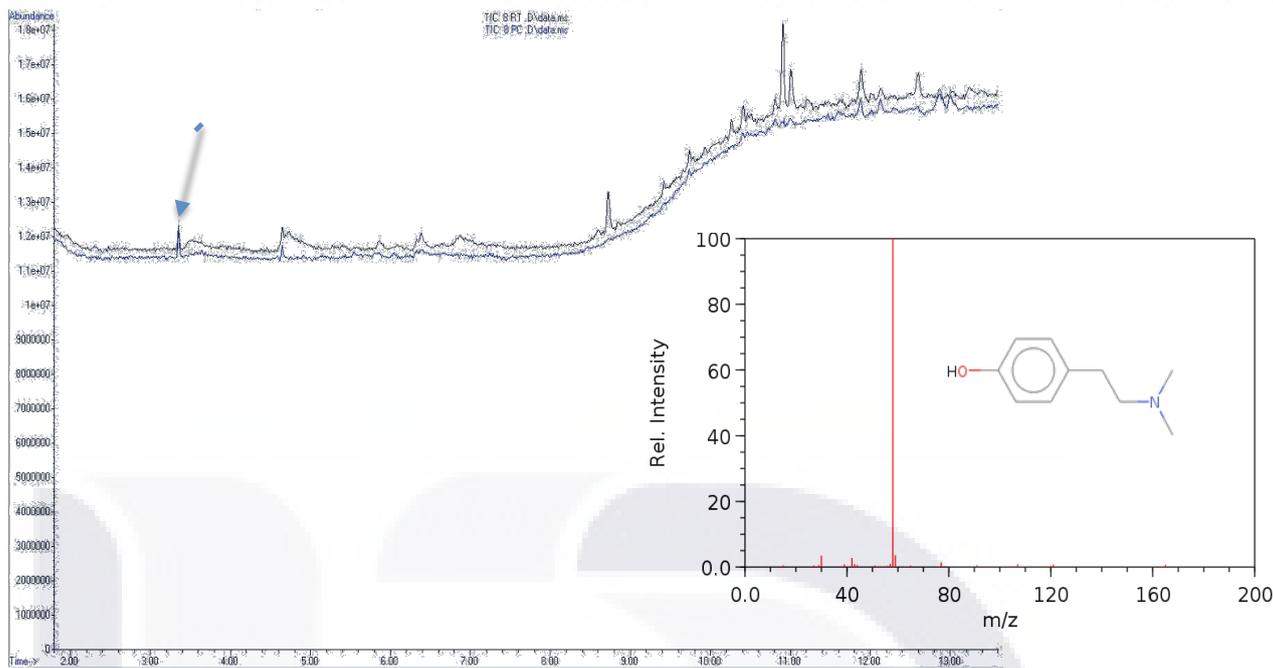
Se observó que los perfiles de producción de alcaloides son semejantes en la mayoría de las especies, lo cual coincide con lo observado en las cromatografías en capa fina. Aunque el análisis no fue de carácter cuantitativo, ya que no se contó con estándares, se inyectó la misma cantidad de muestra a la misma concentración, por lo que los resultados son comparativos entre las muestras. Como se menciona en la sección anterior, algunas raíces producen los mismos compuestos que las plantas madre, algunas en menor cantidad, y algunas en mayor cantidad o compuestos que no se observan en las plantas madre (Fig. 42-50). Esto es común en cultivos de raíces transformadas, ya que Gerogiev *et al.* (2010) encontraron rutósido o rutina en altas concentraciones únicamente en los cultivos de raíces

transformadas, mientras que el ácido clorogénico solo lo pudieron detectar en las plantas intactas de *B. vulgaris*. Se cree que los genes *rol* afectan el crecimiento y desarrollo de las raíces transformadas e induce la síntesis de metabolitos secundarios encendiendo la transcripción de los genes de defensa por medio de un mecanismo aún desconocido (Bulgakov, 2008). El principal compuesto encontrado en la mayoría de las especies es la hordenina y algunas beta-fenetilaminas, consideradas alcaloides por sus efectos fisiológicos, y como compuestos fenólicos por su estructura química. No es inusual encontrar hordenina ya que es el alcaloide principal de muchos cactus incluyendo varias especies de *Turbiniacarpus*. La producción de hordenina en la plantas no parece estar bajo control genético fuerte, pero responde a cambios ambientales del entorno de la planta, por lo que se cree que puede tener un papel protector en plantas bajo condiciones de estrés (Lovett *et al.*, 1994). Todas las plantas del género *Turbiniacarpus*, además de otros géneros, se clasifican comúnmente como peyotes, tal vez indicando alguna relación con *Lophophora*. Las plantas conocidas como peyote tienen una reputación de ser usadas como estimulantes, enervantes, narcóticos o alucinógenos (Starha *et al.*, 1999). Se han identificado siete beta-fenetilaminas y cuatro tetrahidroisoquinolinas en plantas intactas de especies del género *Turbiniacarpus*, en cantidades significativas (Starha *et al.*, 1999). En estudios de Starha *et al.* (1999) el porcentaje de la fracción de total de alcaloides de hordenina en *T. schmiedeckianus* var. *shwarzii* fue de aprox 0.52%, 91.69% en *T. lophophoroides*, y 62.11% en *T. pseudopectinatus*. Starha *et al.*, (1999) encontraron algunos otros alcaloides en estas especies como: beta-fenetilaminas, tiramina, mescalina, anhalinina, anhalonidina, pelotina. No se tiene información acerca del contenido de compuestos tipo alcaloide en las demás especies analizadas, sin embargo, se reporta que en *Mammillaria microcarpa* se encontró hordenina, tiramina, metiltiramina, sinefrina (Howe *et al.*, 1977).

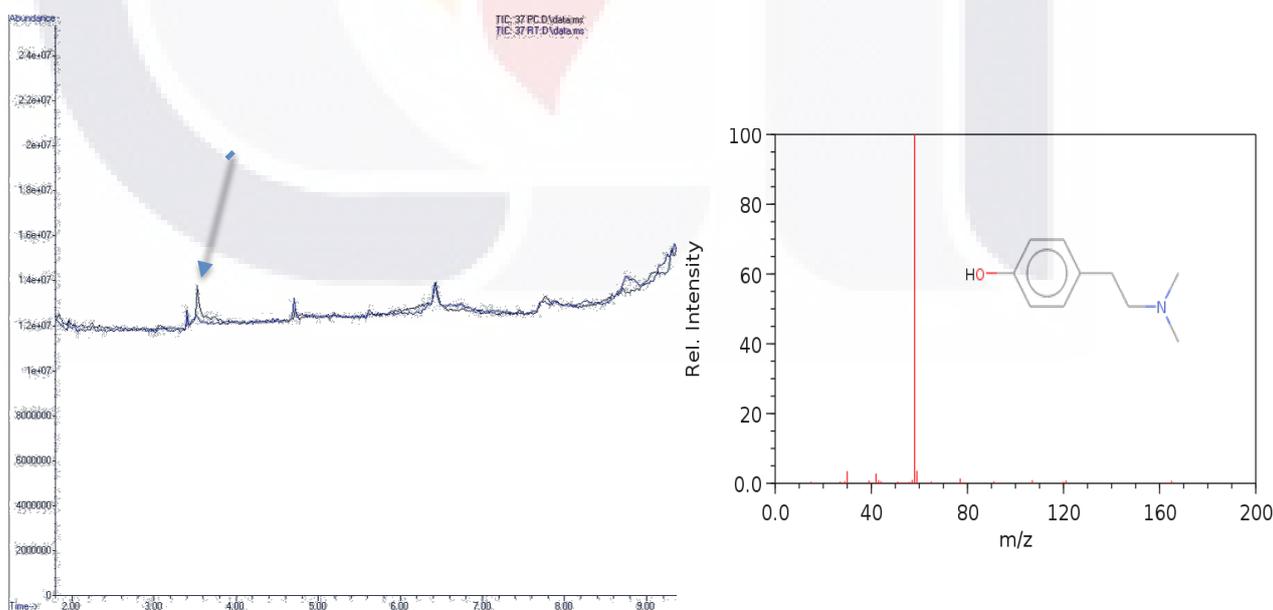
La hordenina es una droga adrenérgica de acción indirecta (Hapke y Strathmann, 1995) con actividad anticolinesterasa (Schweitzer y Wright, 1938) y tiene varios efectos útiles como la estimulación de la liberación de gastrina, la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

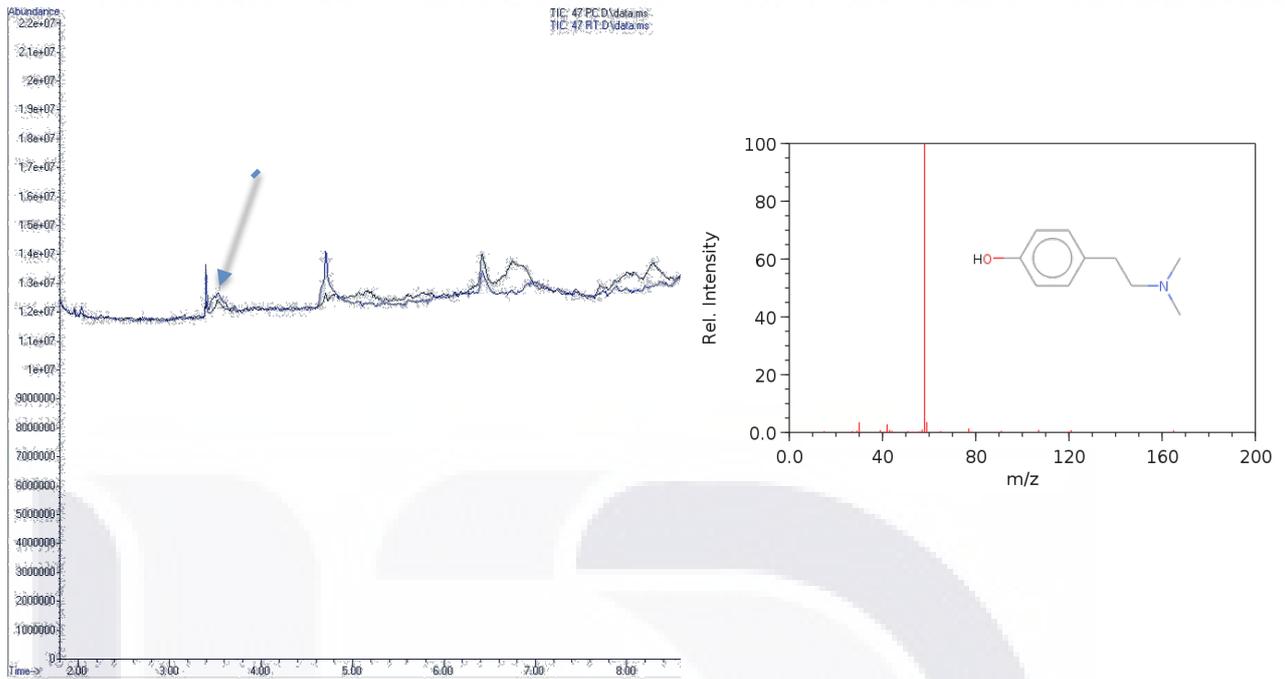
inhibición de monoamino oxidasa B y propiedades antibacterianas (Rao, 1970; Barwell *et al.*, 1989; Yokoo *et al.*, 1999). También se ha mostrado que puede inhibir la melanogénesis en melanocitos humanos (Kim *et al.*, 2013). Experimentos en animales intactos muestran que la hordenina muestra un efecto inotrópico en el corazón, incrementa la presión sistólica y diastólica, el volumen de sangre periférica e inhibe los movimientos intestinales (Hapke y Strathmann, 1995). También puede afectar el sistema nervioso simpático (Barwell *et al.*, 1989). Las beta-fenetilaminas tienen un efecto marcado tipo anfetamina que se ha demostrado en animales pre-tratados con un inhibidor de la monoamino oxidasa. Induce un incremento en la motilidad espontánea en ratones, anorexia en ratas y perros, hipertermia en ratones y ratas y una diferencia en letalidad entre ratones aislados y gregarios (Mantegazza y Riva, 1963). Existe interés en los derivados de B- fenetilamina (PEA) en parte, por su posible papel en la esquizofrenia paranoica, reflejada en la activación de receptores de serotonina (5-HT) en el sistema nervioso central de ratas (Sloviter, 1980). Boehringer Ingelheim Pharma KG publicó una patente en la que describe varios derivados de feniletilamina, el procedimiento para su preparación y su empleo como medicamentos (Anderskewitz *et al.*, 1991), lo cuales pueden administrarse por vía tópica, oral, transdermal, nasal, parenteral o por inhalación. Destacan múltiples posibilidades de aplicación en el sector terapéutico como: artritis, asma, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, por ejemplo bronquitis crónicas, carencia de antitripsina, psoriasis, colitis ulcerosa, enfermedades inflamatorias del intestino, gastropatía o enteropatía inducida por antiflogísticos no esteroides, fibrosis quística, enfermedad de Alzheimer, choque, lesiones por reperfusión/isquemias, aterosclerosis, esclerosis múltiple. También mencionan que se pueden tratar enfermedades o estados en los que tiene importancia el paso de células procedentes de la sangre, a través del endotelio vascular, al tejido (por ejemplo metástasis) o enfermedades y estados en los que la combinación del LTB<sub>4</sub> o de otra molécula (por ejemplo 12-HETE) con el receptor de LTB<sub>4</sub> tiene una influencia sobre la proliferación de las células (por ejemplo leucemia mielocítica crónica) (Anderskewitz *et al.*, 1991).



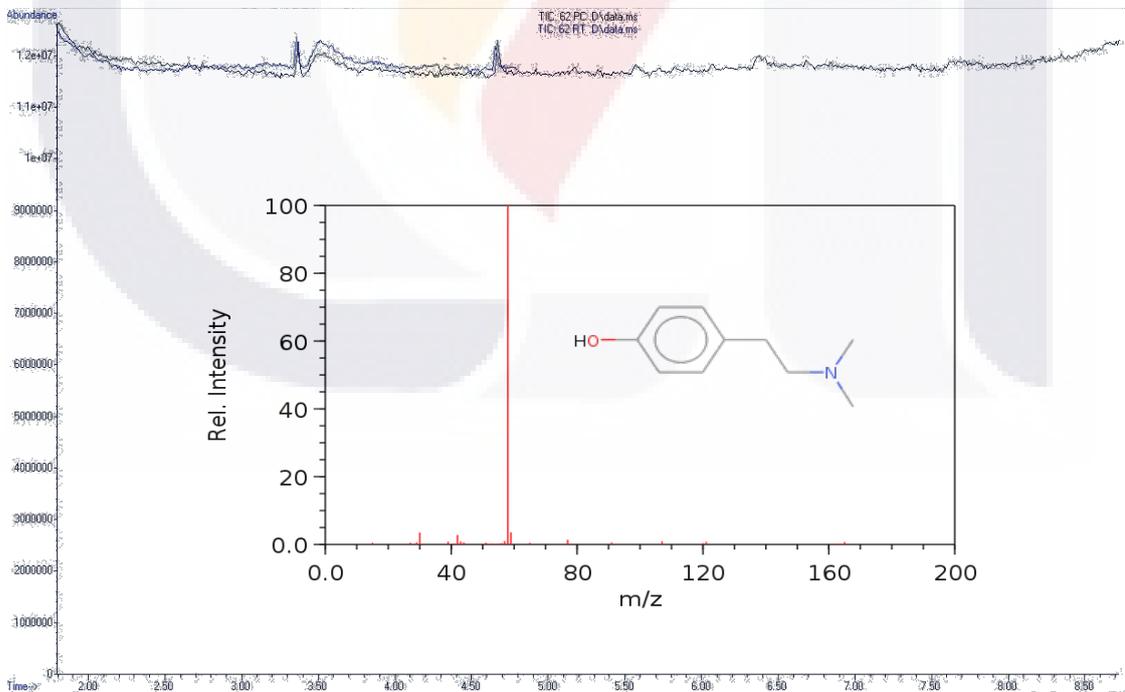
**Figura 42.** Cromatograma del extracto alcaloides de *Mammillaria sphacelata* var. *sphacelata* mostrando las diferencias de compuestos entre una raíz transformada (negro) y planta de campo completa (azul). Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la hordenina.



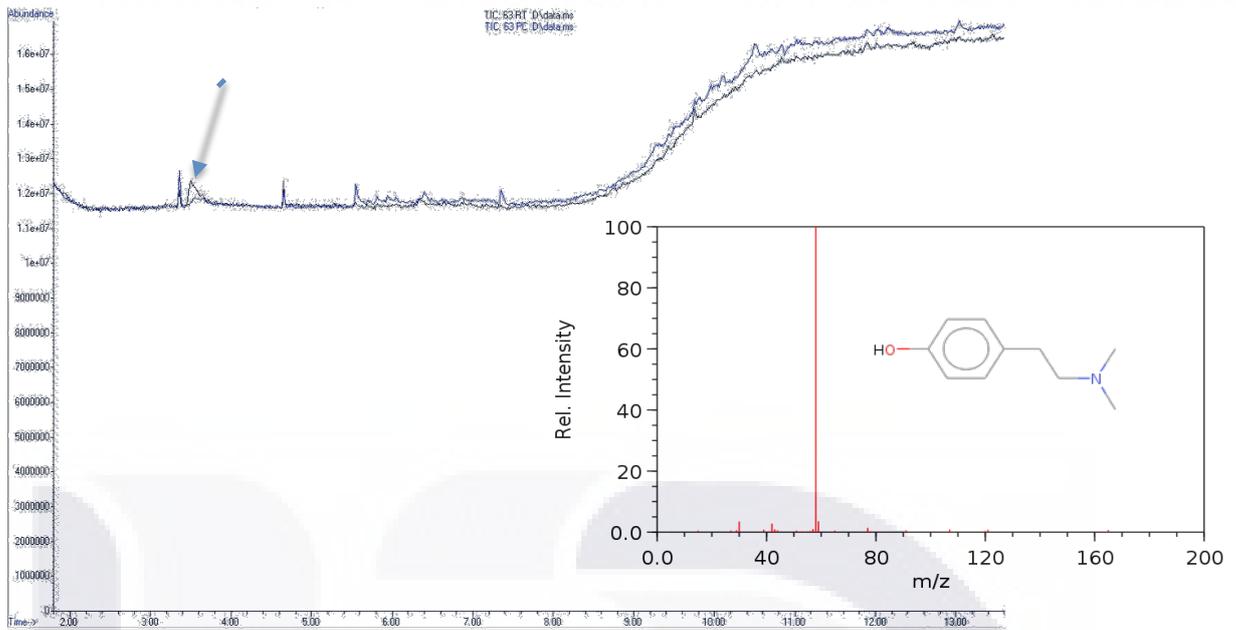
**Figura 43.** Cromatograma del extracto de alcaloides de *Mammillaria bocasana* var. *bocasana* mostrando diferencias en los compuestos de raíz transformada (azul) y planta completa (negro). Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la hordenina.



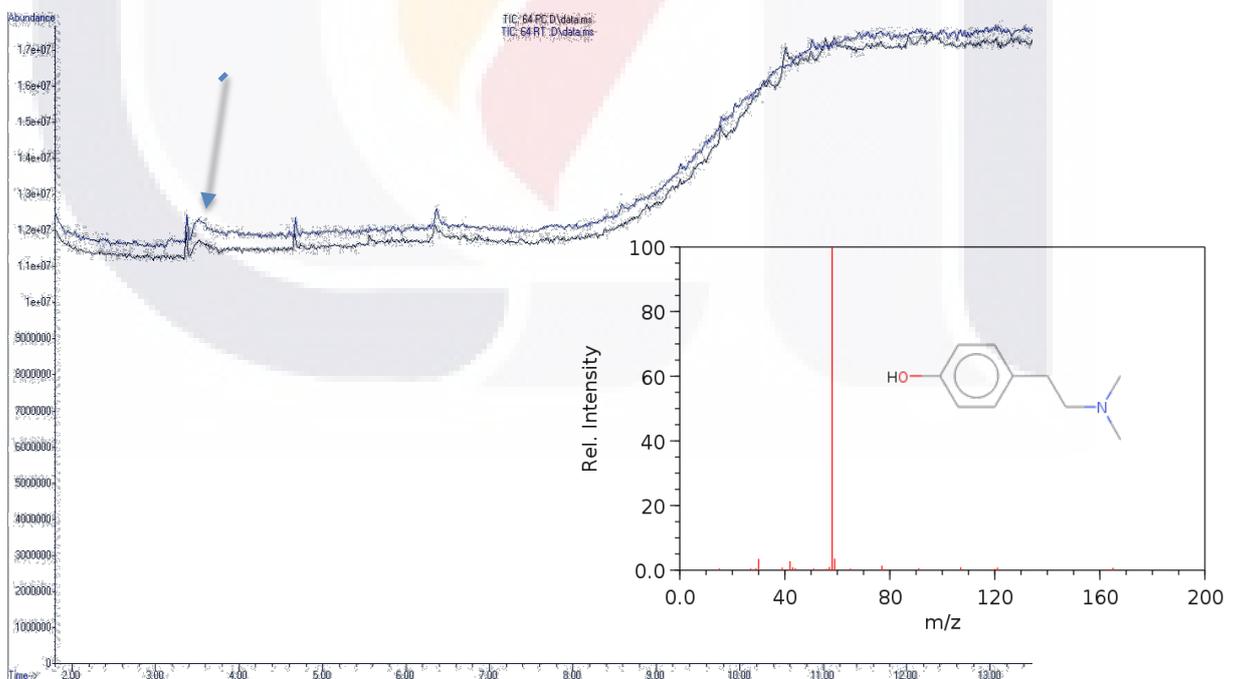
**Figura 44.** Cromatograma del análisis del extracto de alcaloides de *Ariocarpus kotschoubeyanus* mostrando las diferencias de compuestos entre una raíz transformada (negro) y planta de campo completa (azul). Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la hordenina.



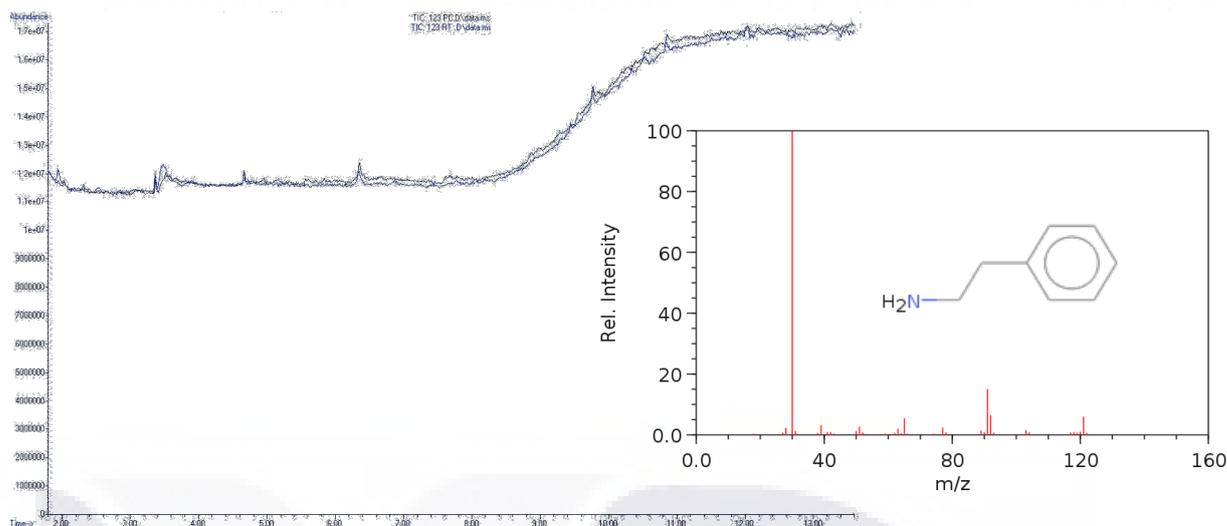
**Figura 45.** Cromatograma del análisis del extracto de alcaloides de *Turbinicarpus schmidickeanus* var. *curvispinus* (*Mammillaria oaxacensis*) mostrando las diferencias de compuestos entre una raíz transformada (negro) y planta de campo completa (azul). Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la hordenina.



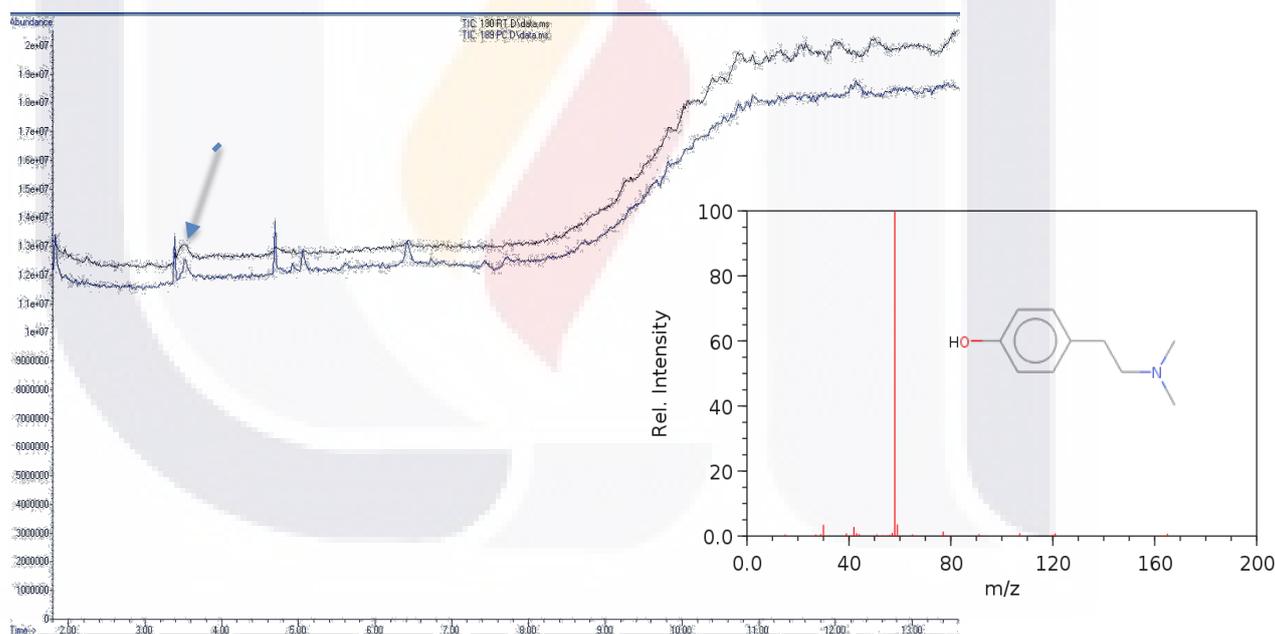
**Figura 46.** Cromatograma del análisis del extracto de alcaloides de *Turbinicarpus laui* mostrando las diferencias de compuestos entre una raíz transformada (negro) y planta de campo completa (azul). Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la hordenina.



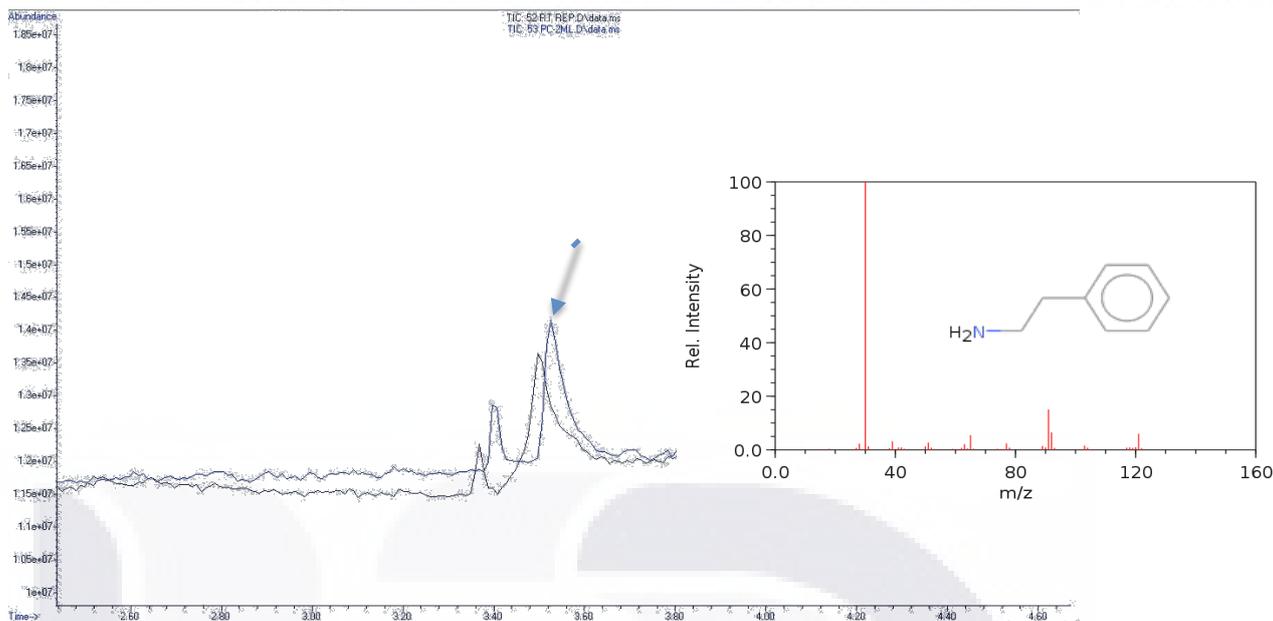
**Figura 47.** Cromatograma del análisis del extracto de alcaloides de *Turbinicarpus pseudopectinatus* mostrando las diferencias de compuestos entre una raíz transformada (negro) y planta de campo completa (azul). Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la hordenina.



**Figura 48.** Cromatograma del análisis del extracto de alcaloides de *Turbinicarpus schmiedickeanus* var. *schwarzii* mostrando las diferencias de compuestos entre una raíz transformada (negro) y planta de campo completa (azul). Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la  $\beta$ -fenetilamina.



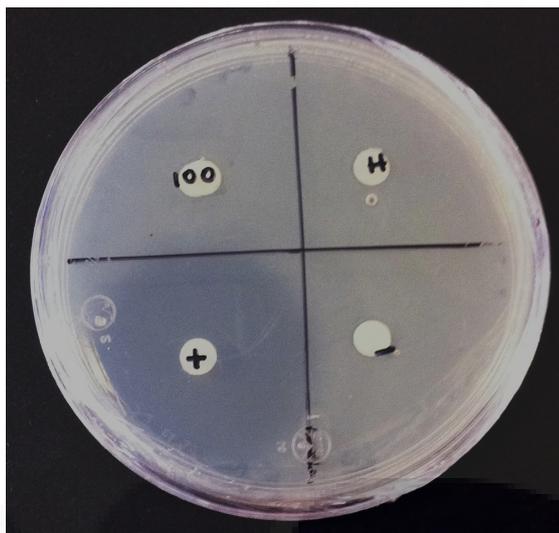
**Figura 49.** Cromatograma del análisis del extracto de alcaloides de *Escobaria chaffeyi* mostrando las diferencias de compuestos entre una raíz transformada (negro) y planta de campo completa (azul). Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la hordenina.



**Figura 50.** Cromatograma del análisis del extracto de alcaloides de *Turbinicarpus lophophoroides* mostrando las diferencias de compuestos entre una raíz transformada (negro) y planta de campo completa (azul). Espectro de masas del pico indicado por la flecha, correspondiente a la hordenina.

#### V.4.b. Estudio de la actividad biológica de los extractos totales de las raíces transformadas.

Se observó que el compuesto de referencia hordenina (en su presentación comercial) no tuvo ningún efecto bactericida, y el extracto total de las raíces transformadas de *T. lophophoroides* a una concentración de 100 mg/mL tampoco mostró tal efecto (Fig. 54). Esto tiene sentido, ya que el compuesto tipo alcaloide principal encontrado en las raíces transformadas de esta especie fue la hordenina. Sin embargo, existe un reporte de Yokoo *et al.* (1999) quienes le atribuyen propiedades antibacterianas a este compuesto. Se requieren de mucho más estudios para poder confirmar o descartar la actividad biológica de estos extractos, sin embargo, en este trabajo se realizó sólo esta prueba preliminar ya que así estaba contemplado en el diseño del proyecto.



**Figura 51.** Resultado de la prueba de difusión de discos sobre *E. coli* Top10 utilizando extractos totales de raíces transformadas de *T. lophohporoides* (100 mg/mL) (100), un compuesto comercial de hordenina como referencia (100 mg/mL) (H), cefotaxima (100 mg/mL) como control positivo (+), y agua destilada como control negativo (-).

## VII. CONCLUSIONES

### **Caracterización el desarrollo *in vitro* de las raíces transformadas bajo diferentes medios y condiciones de cultivo.**

- La eficiencia de transformación de las especies de la familia Cactaceae incluidas en este estudio mostraron una gran variación incluso entre miembros del mismo género, por lo que se sugiere se evalúen de manera individual. Se tuvieron eficiencias de transformación desde un rango del 10% en el caso de *T. swoboda*, hasta del 92.5 de *E. knippelianus*. La eficiencia de transformación se vio influenciada por la concentración del medio de cultivo MS, ya que se observaron variaciones importantes inter e intraespecíficas. Se obtuvo una mejor respuesta en cuanto a la frecuencia de transformación en medio MS al 75% de su potencia. No obstante, el número de raíces por explante se vio incrementado por la incubación de los explantes transformados en medio MS al 100% para la mayoría de las especies. Sin embargo, la especie que mostró un mayor número de raíces fue *Melocactus curvispinus* con  $33 \pm 2.8$  raíces por explante después de 60 días de cultivo en medio MS al 75%. La longitud de las raíces, se vio relacionada con el número de raíces por explante, ya que un gran número de especies generó raíces más largas cuando se cultivó en medio MS al 100%. Finalmente, las curvas de crecimiento relativo también mostraron diferencias consistentes con los resultados de los análisis anteriores. La mayoría de las especies alcanza su pico de crecimiento máximo a los 30 o 45 días de cultivo, llegando a una fase estacionaria. La fase estacionaria de la mayoría de las especies tuvo una duración de varios meses, por lo que los cultivos de raíces transformadas se lograron establecer hasta después de 4-6 meses en la mayoría de las especies.
- La mayoría de los cultivos de raíces transformadas respondieron mejor al ser cultivadas bajo condiciones de luz, excepto *T. pseudopectinatus* y *T. schmiedickeanus* var. *schwarzii*. Las raíces transformadas de *T. lophophoroides* son las que presentaron un mayor incremento de biomasa. El usar hule espuma como soporte da buenos resultados de crecimiento, pero se observa un mayor índice de contaminación.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Es necesario optimizar el tipo y concentración del medio de cultivo basal para cada especie estudiada, como se llevó a cabo en este estudio. Cuatro de las seis especies estudiadas (*E. chaffeyi*, *T. schmiedickeanus* var. *shwarzii*, *F. peninsuale* y *T. lophophoroides*) produjeron mayor cantidad de biomasa cuando se cultivaron en medios con concentración de sales altas (DKW y N6 respectivamente), aunque el medio con el mayor contenido de N (MS) no resultó ideal para el crecimiento de raíces transformadas. En contraste, *M. bocasana* var. *bocasana* mostró su máximo crecimiento cuando se cultivó en medio WPM, que tiene una concentración de sales media y un contenido bajo de N. La recomendación para *T. pseudopectinatus* es cultivarlo en medios bajos en N, como el medio Heller para evitar la generación de tejido calloso, ya que esto ocurrió en todos los medios de contenido medio-alto de N. La composición de los diferentes medios de cultivo afectó la morfología de las raíces transformadas, lo que también puede sugerir diferencias en la producción de metabolitos secundarios en estas líneas de raíces pilosas. Deben llevarse a cabo más estudios para caracterizar estas probables diferencias en la producción de metabolitos.
  - En cuanto al crecimiento de las raíces transformadas en un sistema de inmersión temporal RITA®, aunque no hubo diferencia significativa en la producción de biomasa entre las de raíces transformadas cultivadas en medio de cultivo semisólido y en el sistema de inmersión temporal RITA®, se considera una respuesta positiva, ya que las raíces presentaban morfología homogénea y no generaron tejido calloso. Además de estas ventajas, al utilizar estos biorreactores se disminuyeron costos de labor y de consumibles.
  - Se generaron brotes a partir de los cultivos de raíces transformadas de manera espontánea. Se logró multiplicar estos brotes y aclimatarlos a condiciones de invernadero. Esto con la única finalidad de realizar estudios posteriores con este material vegetal. Si bien la generación de plantas transgénicas no era un objetivo en este trabajo, esto se logró para algunas de las especies estudiadas, lo cual puede abrir nuevas líneas de investigación acerca de cómo los genes silvestres de *A.*

*rhizogenes* podrían afectar la peculiar morfología de las cactáceas. La generación de plantas transgénicas de estas especies no estaba reportada en la literatura científica.

### **Caracterización molecular de raíces transformadas.**

- Mediante el análisis histoquímico para la actividad de GUS se confirmó la transformación exitosa de las raíces presuntamente transformadas mediante *A. rhizogenes*, observándose una coloración azul intensa en todos los tejidos presuntamente transformados de los cultivos ya establecidos de raíces transformadas.
- Mediante el ensayo fluorométrico se observaron diferencias en la actividad de GUS al comparar raíces transformadas y brotes (normales y vitrificados) generados a partir de éstas. Se observó gran variación de la actividad de la enzima GUS en las tres especies estudiadas, siendo *E. chaffeyii* la de mayor actividad. Tanto las raíces de *T. laui* como las de *T. pseudopectinatus* mostraron mayor actividad de GUS que los brotes.
- Con la técnicas PCR se confirmó la transferencia del T-DNA de *A. rhizogenes* al genoma de la planta amplificando los genes *rolB*, *nptII* y *gus*. También se aseguró que no se tratara del ADN de la bacteria analizando la presencia del gen *vir* que se encuentra fuera del T-DNA, por lo que no debe estar presente en tejidos vegetales transformados libres de *A. rhizogenes*.

### **Análisis de betalaínas y alcaloides en las raíces transformadas**

- Se detectaron betacianinas, betaxantinas y ácido betalámico en algunas especies de cactáceas. Se detectaron concentraciones significativas de ácido betalámico, precursor de estos pigmentos, en la mayoría de las especies. El contenido de betaxantinas es bajo en la mayoría de las especies, excepto en *Escobaria chaffeyii* donde fue aproximadamente 0.05 mg/g de peso fresco. El contenido de betacianinas fue mayor en *Turbinicarpus lophophoroides*, *E. chafeyii* y *T. laui*, lo que coincide con el contenido de ácido betalámico en estas

especies. La concentración de betacianinas fue mayor en las raíces transformadas de *T. laui* cuando se cultivaron en medio DKW y menor en medio WPM. Los diferentes medios de cultivo no modificaron la producción de betaxantinas en *T. laui*. Sería interesante en un futuro analizar la capacidad antioxidante de estos extractos.

**Análisis de los compuestos de posible interés detectados en las raíces transformadas y caracterización de su actividad biológica.**

- Mediante la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se logró identificar al compuesto de tipo alcaloide más común en muchas especies de cactáceas, la hordenina, en la mayoría de las especies estudiadas. También se identificaron algunas beta-fenilaminas, ambos compuestos son de interés farmacológico.
- El extracto total de raíces transformadas de *T. lophophoroides* no se presentó actividad bactericida ante la bacteria patógena *E. coli*.

Este estudio contribuye a la conservación y explotación racional de varias especies de cactáceas mexicanas al proveer un método para obtener compuestos útiles de una manera sustentable, o sea utilizando raíces transformadas en lugar de coleccionar ejemplares en su hábitat silvestre. Además, abre varias posibles líneas de investigación sobre el tema, siendo algunas de las más interesantes el escalamiento de los cultivos de raíces transformadas a biorreactores y la posibilidad de generar plantas transgénicas completas.

## VIII. REFERENCIAS.

- Abbasi, B.H., Tian, C.L., Murch, S.J., Saxena, P.K., Liu, C.Z. 2007. Light-enhanced caffeic acid derivatives biosynthesis in hairyroot cultures of *Echinacea purpurea*. *Plant Cell Reports* 26:1367–1372.
- Anderskewitz, R., Birke, F., Hans-Michael, J. 2002. Patente Europea número 2177308 Boehringer Ingelheim Pharma KG Ingelheim am Rhein, Alemania.
- Andressen, D., Manoochehri, I., Carletti, S., Llorente, B., Tacoronte, M., Vilema, M. 2009. Optimización de la proliferación *in vitro* de Jojoba con la aplicación del diseño compuesto central rotatable e inoculación con rizobacterias. *Bioagro* 21(1): 41-48.
- Arido José Braz de Oliveira, A.J., Pires da Silva, M.F. 2003. Alkaloid production by callous tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 104 (2): 149-155.
- Bais, H. P., George, J., Ravishankar, G. A., and Sudha, G. 2001. Influence of exogenous hormones on growth and secondary metabolite production in hairy root cultures of *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local. *In vitro Cellular Developmental Biology Plant*. 37: 293–299.
- Barwell, C.J., Basma, A.N., Lafi, M.A., Leake, L.D. 1989. Deamination of hordenine by monoamine oxidase and its action on vasa deferentia of the rat. *Journal of Pharmacology* 4: 421–423.
- Beltrán-Orozco, M.C., Oliva-Coba, T.G., Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G. 2009. Ascorbic acid, phenolic content, and antioxidant capacity of red, cherry, yellow and white types of pitaya cactus fruit (*Stenocereus stellatus* riccobono). *Agrociencia* 43: 153-162.
- Bhojwani, S.S., Razdan, M.K. 1989. *Plant tissue culture: theory and practice*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Boyle, T. 2007. Cacti. Chapter 13. Flower Breeding and Genetics. Anderson ed. 361 pp.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Braz de Oliveira, A.J., Pires da Silva- Machado, M.F. 2003. Alkaloid Production by Callous Tissue Cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 104: 149- 155.

Bruhn, J.G., El-Seedi, H.R., Stephanson, N., Shulgin, A.T. 2008. Ecstasy Analogues Found in Cacti. *Journal of Psychoactive Drugs* 219 :40 (2): 219- 222.

Bulgakov, V.P. 2008. Functions of rol genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances* 26: 318–324.

Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H. 2003. Antioxidant activity of betalains from plants of Amaranthaceae. *J. Agric. Food Chemistry* 51, 2288–2294.

Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., Chu, C.Y., Bi, F.Y. 1975. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Science Sin* 18:659–668.

Coke, J.E. 1996. Basal nutrient medium for *in vitro* cultures of loblolly pines. US Patent 5:534,434.

Condori, J., Sivakumar, G., Hubstenberger, J., Dolan, M.C., Sobolev V.S., Medina-Bolivar F. 2010. Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated stilbenoids arachidin-1 and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: Effects of culture médium and growth stage. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 310-318.

Driver, J.A., Kuniyuki, A.H. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock.

Horticultural Science 19:507–509.

Fernández-López, J.A., Castellar, R., Obón, J.M., Almela, L. 2002. Screening and mass-spectral confirmation of betalains in cactus pears. *Chromatographia* 56:591–595.

Flores-Ortiz, C.M., Dávila, P., Portilla, L.B.H. 2003. Alkaloids from *Neobuxbaumia* species (Cactaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 581–585.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151–158 .

Gamborg, O.L., Murashige, T., Thorpe, T.A., Vasil, I.K. 1976. Plant tissue culture media. *In Vitro* 12:473–478.

George, E.F., Michael, A.H., De Klerk, G.J. 2008. The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients. en: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds) *Plant propagation by tissue culture*. Springer, Dordrecht, pp 65–113.

Georgiev, M.I., A. I. Pavlov, Bley T. 2007. Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiological Biotechnology* 74:1175–1185.

Georgiev, V.G., Weber, J., Kneschke, E.M., Denev, P.N., Bley, T., Pavlov, A.I. 2010. Antioxidant activity and phenolic content of betalain extracts from intact plants and hairy root cultures of the red beetroot *Beta vulgaris* cv. detroit dark red. *Plant Foods Human Nutrition* 65:105–111.

Giri, A., Narasu, M.L. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances* 18: 1–22.

Gómez- Flores, R., Tamez-Guerra, P., Tamez-Guerra, R., Rodríguez-Padilla, C., Monreal-Cuevas, E., Hauad-Marroquin, L.A., Córdova- Puente, C., Rangel-Llanas, A. 2006. In Vitro antibacterial and antifungal activities of *Nopalea cochenillifera* Pad extracts. *American Journal of Infectious Disease*. 2: 1-8.

- González-Díaz, M.C., Pérez-Reyes, M.E., 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.
- Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P.K., Rideau, M., Gantet, P. 2006. Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends in Biotechnology* 24 (9): 403-409.
- Gupta, P.K., Durzan, K.J. 1985. Shoot multiplication from mature Douglasfir and sugar pine. *Plant Cell Reports* 4:177-179.
- Hahlbrock, K. 1974. Correlation between nitrate uptake, growth and changes in metabolic activities of cultured plant cells. en: *Tissue culture and plant science*. Academic, London, pp 363-378.
- Hapke, H.J., Strathmann, W. 1995. Pharmacological effects of hordenine. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 102(6): 228-232.
- Hayashi, Y., Kyojuka, J., Shimamoto, K. 1988. Hybrids of rice (*Oryza sativa* L.) and wild *Oryza* species obtained by cell fusion. *Molecular Gene Genetics* 214:6-10.
- Heller, R. 1953. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Annual Science Natural Botanical Biology Veg* 14:1-223.
- Hirai M.Y., Yano M., Goodenowe D.B., Kanaya S., Kimura T., Awazuhara M., Arita M., Fujiwara T., Saito K. 2004. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana* *National Academy of Science USA* 101: 10205-10210.
- Howe, C. Mclaughlin, J.M., Statz, D. 1977. N-methyltyramine and hordenine from *Mammillaria microcarpa roberta*. *Phytochemistry* 16: 151.
- Hu, Z. B., Du, M. 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering.

Jornal of International Plant Biology. 48: 121–127.

Jain, S.M., Minocha, S.C. 2000. Molecular biology of woody plants Vol 1. Kluwer Academic Publishers, Springer Science, Dordrecht.

Jasik, J., Schiebold, S., Rolletschek, H., Denolf, P., Van Adenhove, K., Altmann, T., Borisjuk, L. 2011. Subtissue-Specific Evaluation of Promoter Efficiency by Quantitative Fluorometric Assay in Laser Microdissected Tissues of Rapeseed. *Plant Physiology* 157: 563–573.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. 1987. GUS fusions: Glucuronidase as sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6:3901–3907.

Kajikawa, M., Morikawa, K., Abe, Y., Yokota, A., Akashi, K. 2010. Establishment of a transgenic hairy root system in wild and domesticated watermelon (*Citrullus lanatus*) for studying root vigor under drought. *Plant Cell Reports* 29:771–778.

Kao, K.N., Michayluk, M.R. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* 126:105–110.

Karimi, N., Mofid, M.R., Ebrahimi, M., Naderi, R. 2010. Effect of areoles and culture medium on callus induction and regeneration *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *Trakia Journal of Sciences* 8 (2): 31-35.

Kieran PM, Macloughlin PE, Malone DM. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology* 1997;59:39–52.

Kim, Y. J., Wyslouzil, B. E., Weathers, P. J. 2002. Invited review: secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 38: 1–10.

Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Veselova M.V., Bulgakov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Y.N. 2007. The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *Journal of Biotechnology* 128:681–692.

Lloyd, G., McCown, B. 1981. Commercially feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings of the International Plant Propagator Society* 30:421–427.

Li, L., Wang, J., Wang, W., Lu, Y., Wang, Y.L., Zhou, G.Y., Kai, G.Y. 2008. Optimization of induction and culture conditions and tropane alkaloid production in hairy roots of *Anisodus acutangulus*. *Biotechnology Bioengineering* 13:606–612.

Lomolino, M.V., Riddle, R.R., Brown, J.H. 2006. *Biogeography*. 3a ed. Sinauer Associates. USA. 845 pp.

Lovett, J.V., Houlst, A.H.C., Christen, O. 1994. Biologically active secondary metabolites of barley. IV. Hordenine production by different barley lines. *Journal of Chemical Ecology*, 20, 1945–1954.

Mantegazza P., Riva, M. 1963. Amphetamine-like activity of  $\beta$ -phenethylamine after a monoamine oxidase inhibitor *in vivo*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 15(1): 472-478.

Makkar, P. S., Becker, K. 2001. *Alkaloids En: Methods in Molecular Biology*, vol. 393: *Plant Secondary Metabolites*. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Mano, Y., Nabeshima, S., Matsui, C., Ohkawa, H. 1986. Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agricultural Biological Chemistry* 50:2715–2722.

Nitsch, J.P., Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163:85–87

Memelink, J., Verpoorte, R., Kijne, W. 2001. Organization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in Plant Science* 6:212–219.

Merkli, A., Christen, P., Kapetanidis, I. 1997. Production of diosgenin by hairy root

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. Plant Cell Reports 16:632–636.

Moßhammer, M.R., Stintzing, F.C, Carle, R. 2005. Development of a process for the production of a betalain-based colouring foodstuff from cactus pear. Innovative Food Science and Emerging Technologies 6: 221– 231.

Mosco, A. 2012. Localización de betacianinas en tejido del tallo de cactus. Revista Mexicana de Biodiversidad 83: 413-420.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 15:473–497.

Nas, M.N., Bolek, Y., Sevgin, N. 2013. Shortcut to long-distance developing of a tissue culture medium: micropropagation of mature almond cultivars case study. Turkish Journal of Botany 37:1134–1144.

Nilsson, O., Olsson, O. 1997. Getting to the root: the role of the *Agrobacteriumrhizogenesrol*-genes in the formation of hairy roots. Physiology Plantarum 100:463–473.

Nussbaumer, P., Kapétanidis, I., Christen, P. 1998. Hairy roots of *Datura candida* D. aurea: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. Plant Cell Reports 17:405–409.

Ogunbodedea, O., McCombsa, D., Trout, K., Daleyc, P., Terrya,M. 2010. New mescaline concentrations from 14 taxa/cultivars of *Echinopsis* spp. (Cactaceae) ("SanPedro") and their relevante to shamanic practice. Journal of Ethnopharmacology 131: 356–362.

Oksman-Caldentey, K.M., Hakkinen S.T., Rischer H. 2007. Metabolic engineering of the alcaloid biosynthesis in plants: functional genomics approaches. Chapter 4. Applications of Plant Metabolic Engineering 109–127.

Oliveira, A.J.B., Da Machado, M.F.P.S. 2003. Alkaloid production by callous tissue

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). Applied Biochemical Biotechnology 104: 149–155.

Ono, N.N., Tian, L. 2011. The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities. Plant Science 180(3):439–446.

Ortega-Baes, P., Godialnez-Alvarez, H. 2006. Global diversity and conservation priorities in the Cactaceae. Biodiversity and Conservation 15: 817–827.

Osborn A.E., Qi X.Q., Townsend B, Qin B. 2003. Dissecting plant secondary metabolism – constitutive chemical defences in cereals. New Phytologist 159: 101–108.

Osorio-Esquivel, O., Ortiz-Moreno, A., Álvarez, V.B., Dorantes-Álvarez, L. A., Giusti, M.M. 2011. Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. Food Research International 44: 2160–2168.

Palazon, J., Cusido, R.M., Roig, C., Pinol, M.T. 1998. Expression of the *rol* gene and nicotine production in transgenic hairy roots and their regenerated plants. Plant Cell Reports 17:384–90.

Pan Q.F., Chen Y., Wang Q., Yuan F., Xing S.H., Tian Y.S., Zhao J.Y., Sun X.F., Tang K.X. 2010. Effect of plant growth regulators on the biosynthesis of vinblastine, vindoline and catharanthine in *Catharanthus roseus*. Plant Growth Regulators 60:133–141.

Pavlov, A., Bley, T. 2006. Betalains biosynthesis by *Beta vulgaris* L. Hairy root culture in a temporary immersion cultivation system. Process Biochemistry 41:848–852

Pérez-Molphe E, Ochoa-Alejo N. 1998. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes* transformed tissues. Plant Cell Reports 17:591–6.

Porter, J.R. 1991. Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium*

rhizogenes. Critical Reviews in Plant Science 10:387–421.

Powell, A. M., Weedin, J. F. 2004. Cacti of the Trans-Pecos & adjacent areas. Texas Tech University Press, Lubbock, Texas. 509 p.

Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, O'Brien, J.C., Lischner, N., Ehlenfeldt M., Kalt, W., Krewer, G., Mainland, M.C. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species. Journal of Agricultural Food Chemistry 46: 2686-2693.

Rao, R.S., and Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20: 101– 153.

Robles-Zepeda, R.E., Jiménez-Estrada, M., Navarro-Ocaña, Saad-Villegas, A.I., Brunner, I., Ruiz-Bustos, E. 2009. Secondary metabolites induction in *Mammillaria huitzilopochtli* (Cactaceae) and evaluation of the fungicidal activity. African Journal of Biotechnology 8 (16) : 3874-3878.

Romero, F.R., Delate, K., Kraus, G.A., Solco, A.K., Murphy, P.A., Hannapel, D.J. 2009. Alkamide production from hairy root cultures of *Echinacea*. In Vitro Cellular Developmental Biology Plant 45:599–609.

Ryad, A., Lakhdar, K., Majda, K.S., Samia, A., Mark, A., Corinne, A.D., Eric, G. 2010. Optimization of the culture medium composition to improve the production of hyoscyamine in elicited *Datura stramonium* L. hairy roots using the Response Surface Methodology (RSM). International Journal of Molecular Science 11:4726–4740.

Satdive, R.K., Fulzele, D.P., Eapen, S. 2007. Enhanced production of azadirachtin by hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Jussby elicitation and media optimization. Journal of Biotechnology 128:281–289.

Saénez, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P. 2009. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) Food Chemistry

114: 616–622.

Santos-Díaz, M. S., Pérez-Molphe, E., Ramírez-Malagón, R., Núñez-Palenius, H. G., Ochoa-Alejo, N. 2010. Mexican Threatened Cacti: Current Status and Strategies for their Conservation. In: Tepper, G.H. (Ed). Species Diversity and Extinction. Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-61668-343-6. pp. 1-60.

Sathyanarayana, B.N. 2007. Plant tissue culture: practices and new experimental protocols. International Publishing House, New Delhi.

Sauerwein, M., Shimomura, K. 1991. Alkaloid production in hairy roots of *Hyoscyamus albus* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Phytochemistry* 30: 3277–3280.

Schweitzer, A. Wright A.S. 1938. Action Of Hordenine Compounds On The Central Nervous Systems. *Journal of Physiology* 92: 422-438.

Sevon, N., Oksman-Caldentey, K.M. 2002. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Medica* 68: 859–868.

Shedbalkar, U.U., Adki, V.S., Jadhav, J.P., Bapat, V.A. 2010. *Opuntia* and Other Cacti: Applications and Biotechnological Insights. *Tropical Plant Biology* 3: 136–150.

Shinde, A.N., Malpathak, N., Fulzele, D.P. 2010. Impact of nutrient components on production of the phytoestrogens daidzein and genistein by hairy roots of *Psoralea corylifolia*. *Journal of Natural Medicine* 64: 346–353.

Shkryl, Y.N., Veremeichik, G.N., Bulgakov, V.P., Tchernoded, G.K., Mischenko, N.P., Fedoreyev, S.A., Zhuravlev, Y.N. 2008. Individual and combined effects of the

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

*rolA*, *B*, and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. *Biotechnological Bioengineering* 100: 118–125.

Sivakumar, G., Yu, K.W., Hahn, E.J., Paek, K.Y. 2005. Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors. *Current Science* 89: 641–649.

Sloviter R.S., Connor, J.D., Drust, E.G.. 1980. Serotonergic properties of  $\beta$ -phenethylamine in rats. *Neuropharmacology* 19 (11): 1071–1074.

Srivastava, S., Srivastava A.K. 2007. Hairy Root Culture for Mass Production of High-Value Secondary Metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology* 27:29–43.

Starha, R. 1996. Alkaloids from the Cactus Genus *Gymnocalycium* (Cactaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 24 (1): 85-86.

Starha, R., Chybidziurova, A., Lacny, Z. 1999. Alkaloids of the genus *Turbinicarpus* (Cactaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 27: 839-841.

Schwartzkopf, S.H., Tibbitts, T.W., Langhans, R.W. 1985. Elimination of toxicity from polyurethane foam plugs used for plant culture. *HortScience* 20(3): 448-449.

Rao, G.S. 1970. Identity of peyocactin, an antibiotic from peyote (*Lophophora williamsii*), and hordenine, *Jornal Pharm Pharmacology* 22: 544–545.

Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R. 2001. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *European Food Research Technology*. 212 :396–407 .

Stomp, A.M. 1992. Histochemical localization of  $\beta$ -glucuronidase. In: Gallagher SA (ed) *GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression*. Academic, San Diego, pp 103–113.

Strack, D., Vogt, T., Schliemann W. 2003. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* 62: 247–269.

Trigiano, R.N., Gray, DJ. 2011. Plant tissue culture, development, and biotechnology. CRC Press, Boca Raton.

Triplett, B.A., Moss, S.C., Bland, J.M., Dowd, M.K. 2008. Induction of hairy root cultures from *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* to produce gossypol and related compounds. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 44: 508–517.

van der Fits L., Memelink J. 2000. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* 289: 295–297.

van der Heijden R., Jacobs, D.I., Snoeijs, W., Hallard, D., Verpoorte, R. 2004. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Current Medical Chemistry* 11: 607–628.

White, P.R. 1963. The cultivation of animal and plant cells, 2nd edn. Ronald Press, New York.

Wilkie, S. 1999. Isolation of total genomic DNA. En: Clark MS (ed) Plant molecular biology: a laboratory manual. Springer, Berlin.

Wybraniec, S., Platznerb, I., Gereshc, S., Gottlieb H.G., Haimberge, M., Mogilnitzkie, M., Mizrahi, Y. 2001. Betacyanins from vine cactus *Hylocereus polyrhizus*. *Phytochemistry* 58:1209–1212.

Wybraniec, S., Nowak-Wydra, B., Mitka, K., Kowalski, P., Mizrahi, Y. 2007. Minor betalains in fruits of *Hylocereus* species. *Phytochemistry* 68: 251–259.

Yokoo, Y., Kohda, H., Kusumoto, A., Naoki, H., Matsumoto, N., Amachi, T., Suwa, Y., Fukazawa, H., Ishida, H., Tsuji, K., Nukaya, H. 1999. Isolation from beer and structural determination of a potent stimulant of gastrin release. *Alcohol Alcohol*. 34: 161–168.

Yonemitsu, L.H., Shimomura, K., Satake, M., Mochida, S., Tanaka, M., Endo, T., Kaji, A.

1990. Lobeline production by hairy root culture of *Lobelia inflata*. *Plant Cell Reports* 9: 307–310

Yoshimatsu, K., Yamaguchi, H., Shimomura, K. 1996. Traits of *Panax ginseng* hairy roots alter cold storage and cryopreservation. *Plant Cell Reports*. 15:555–60.

Zambryski, P., Tempe, J., Schell, J. 1989. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* 56: 193–201.

Zhao, D., Fu, C., Chen, Y., Ma, F. 2004. Transformation of *Saussurea medusa* for hairy roots and jaceosidin production. *Plant Cell Reports* 23: 468–474

Zhou, M.L., Zhu, X.M., Shao, J.R., Wu, Y.M., Tang, Y.X. 2010. Transcriptional response of the catharanthine biosynthesis pathway to methyl jasmonate/nitric oxide elicitation in *Catharanthus roseus* hairy root culture. *Applied Microbiological Biotechnology* 88: 737–750.

Zhou, M., Zhu, X. Shao, J., Tang, Y., Wu, Y. 2011. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Applied Microbiological Biotechnology* 90: 1229–1239.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ANEXO A.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

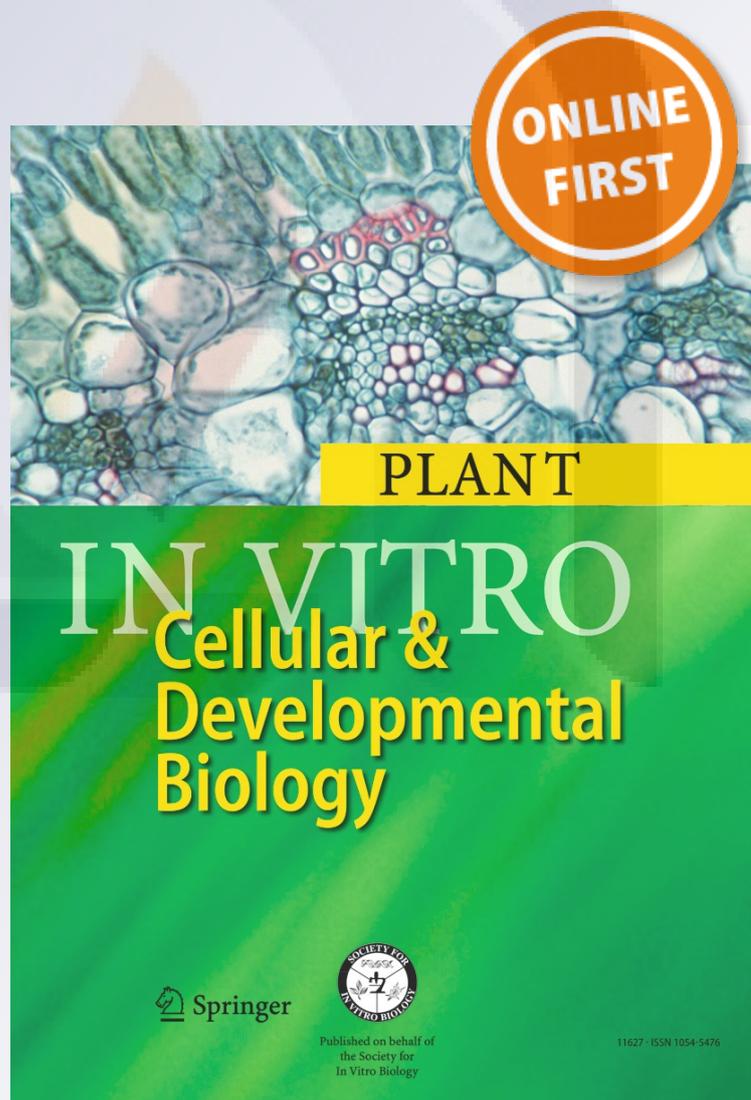
*Effects of different culture media and conditions on biomass production of hairy root cultures in six Mexican cactus species*

**Alejandra Palomeque Carlín, Felipe Tafoya, Angel G. Alpuche Solís & Eugenio Pérez-Molphe-Balch**

**In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**

ISSN 1054-5476

In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant  
DOI 10.1007/s11627-015-9681-1



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by The Society for In Vitro Biology. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**

# Effects of different culture media and conditions on biomass production of hairy root cultures in six Mexican cactus species

Alejandra Palomeque Carlin · Felipe Tafoya ·  
Angel G. Alpuche Solís · Eugenio Pérez-Molphe-Balch

Received: 28 May 2014 / Accepted: 25 February 2015 / Editor: Neftali Ochoa-Alejo  
© The Society for In Vitro Biology 2015

**Abstract** To establish cactus hairy root lines, axenically grown *Escobaria chaffeyi*, *Ferocactus peninsulae*, *Mammillaria bocasana* subsp. *bocasana*, *Turbincarpus lophophoroides*, *Turbincarpus pseudopectinatus*, and *Turbincarpus schmidickeanus* subsp. *schwarzii* explants were inoculated with an *Agrobacterium rhizogenes* A4 agropine-type strain carrying the ESC4 plasmid, which contains the *nptII* and *gus* genes. Cactus hairy roots showed an active branching pattern and fast growth on hormone-free medium. Twelve different basal culture media were tested for biomass production of these six species. Our results showed that medium optimization needs to be performed for each individual species, as growth responses differed among taxa. Maximum hairy root growth was obtained on Driver and Kuniyuki Walnut (DKW) medium for *E. chaffeyi* and *T. schmidickeanus* subsp. *schwarzii* (3-fold weight increase over starting weight in 30 d for both species). *M. bocasana* subsp. *bocasana* responded best when cultured on WPM medium, doubling the initial inoculum weight. *F. peninsulae* and *T. lophophoroides* showed a maximum biomass increase when cultured on N6 medium (0.5- and 2-fold increases over starting weight, respectively, in 30 d). *T. pseudopectinatus* generated callus tissue on all basal media except for Heller medium, on which hairy root weight increased 4-fold over

the starting weight in 30 d. Culture medium was also found to affect hairy root morphology of all species tested. Scaling-up of the hairy root cultures was achieved by using the temporary immersion system RITA®.

**Keywords** *Agrobacterium rhizogenes* · Basal culture media · Cactaceae · Hairy roots · Temporary immersion systems

## Introduction

The Cactaceae family includes approximately 130 genera and 2000 species. Cacti have been used as food, medicine, fodder, and raw material. They are also excellent sources of pigments and show numerous pharmacological properties, including diuretic, laxative, cardiogenic, analgesic, astringent, and anti-parasitic properties (Santos-Díaz *et al.* 2010). The high levels of endemism, low population numbers, low individual densities, and high levels of horticultural interest make the cactus family one of the most endangered plant families in the world (Hernández and Bárcenas 1995, 1996). *Escobaria chaffeyi* (Britton & Rose) N.P. Taylor is subject to special protection under Mexican law (NOM-059-SEMARNAT-2010; Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales 2010). Greater than 50% of the commercialized cactus species belong to the *Mammillaria*, *Turbincarpus*, and *Ferocactus* genera (Bárcenas Luna 2003). *Ferocactus peninsulae* (F.A.C. Weber) Britton & Rose is used for candy production (Dubrovsky 1998). *Mammillaria bocasana* subsp. *bocasana* Poselg. (Fitz and Fitz 2009) is listed under the “subject to special protection” category in the NOM-059-SEMARNAT-2010, but it qualifies as a “minor concern” according to the International Union for the Conservation of Nature (IUCN) Red List of Threatened Species (RLTS). *Turbincarpus*

A. P. Carlin · E. Pérez-Molphe-Balch (✉)  
Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940,  
20131 Aguascalientes, Ags., México  
e-mail: eperezmb@correo.uaa.mx

F. Tafoya  
Departamento de Biología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México

A. G. Alpuche Solís  
División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., San Luis Potosí, México

species are commonly classed as “peyotes” by indigenous people (Starha *et al.* 1999) and are of great phytochemical interest because they produce diverse alkaloids with hallucinogenic, stimulant, and narcotic activities (Santos-Díaz *et al.* 2010). These compounds have not been fully studied or exploited, since *Turbincarpus* are small and have low growth rates, which limits tissue availability for secondary metabolite extraction (De la Rosa-Carrillo *et al.* 2012). Additionally, all *Turbincarpus* species are listed in CITES Appendix I (Fitz and Fitz 2009), are considered subject to special protection or “threatened” within the NOM-059-SEMARNAT-2010, and are listed as vulnerable or critically endangered in the IUCN RLTS (Fitz *et al.* 2013a, b; Smith *et al.* 2013).

Hairy roots are widely used as a transgenic tool for the production of metabolites and the study of gene function in plants (Veena and Taylor 2007). Hairy roots are both genetically and biochemically stable when compared to cell suspension cultures (Thimmaraju *et al.* 2008). Extraction from field-grown plants has been the major method used to economically obtain important secondary metabolites (Zhou *et al.* 2011). Harvesting plants is destructive, however, so there has been a growing interest in generating hairy roots from medicinal plant species (Guillon *et al.* 2006). The secondary metabolites produced by hairy roots are the same as those usually synthesized in intact parent plants, with similar or higher yields (Karuppusamy 2009). To obtain a high-density culture of hairy roots, culture conditions should be maintained at the optimum level (Srivastava and Srivastava 2007). Sivakumar *et al.* (2005) identified nutrient availability as the major chemical factor to be considered in scale-up and suggested that mineral elements are an important regulatory factor in hairy root growth and biomass. Individual hairy root types may have different requirements for nutrient conditions; thus, culture conditions should be optimized separately for each species and for individual clones (Srivastava and Srivastava 2007). There are many different formulations of media available for plant growth culture, which differ in total salt concentration (ion strength) and nitrogen content. Both the form and the amount of nitrogen in the medium have significant effects on cell growth rate, cell morphology, and regeneration potential (Jain and Minocha 2000). Inorganic nitrogen is supplied in the medium in the form of either nitrate or ammonium (Bhojwani and Razdan 1989). The aim of this study was to find the culture conditions that optimize hairy root biomass production in six cactus species (*E. chaffeyi*, *F. peninsulae*, *M. bocasana* subsp. *bocasana*, *Turbincarpus lophophoroides* [Werdermann] Buxbaum, *Turbincarpus pseudopectinatus* [Backeberg] Glass & R. Foster, and *Turbincarpus schmiedickeanus* subsp. *schwarzii* [Shurly] N.P. Taylor) by comparing the effects of 12 different culture media (Anderson, B5, DCR, Driver and Kuniyuki Walnut (DKW), Heller, K&M, Murashige and Skoog (MS), N6, N&N, White, WPM, and WV3 basal media) and a temporary immersion

culture system on the growth of hairy root cultures. These efforts were undertaken to provide a sustainable source of secondary metabolites produced by these cactus species and to discourage poaching.

## Materials and Methods

**Hairy root induction.** *In vitro* explants of *E. chaffeyi*, *F. peninsulae*, *M. bocasana* subsp. *bocasana*, *T. lophophoroides*, *T. pseudopectinatus*, and *T. schmiedickeanus* subsp. *schwarzii* were taken from a propagation program carried out in the biotechnology laboratory at the Autonomous University of Aguascalientes. The *Agrobacterium rhizogenes* A4 agropine-type strain used in these experiments contains the wild-type plasmid pRiA4, which confers the hairy root phenotype, and the binary vector pESC4, which contains the *nptII* gene (with the *nos* promoter and terminator) and the *gus* gene (with the *cab* promoter and the *ocs* terminator) in the T-DNA region (Jofre-Garfías *et al.* 1997). The bacteria were grown in YMB liquid medium (Hooykaas *et al.* 1977) with 50 mg/L rifampicin and 50 mg/L kanamycin at 28°C.

Hairy root lines were obtained by infection of stem discs with the *A. rhizogenes* A4 strain. Stem discs (approximately 4 mm wide) were incubated in hormone-free liquid MS medium containing 100 mg/L citric and ascorbic acids as antioxidants. The explants were then immersed in 50 mL of liquid MS (Murashige and Skoog 1962) medium containing 25 µL of 200 mM acetosyringone and  $1 \times 10^8$  cells mL<sup>-1</sup> of the bacteria for 30 min. Excess liquid was removed from explants using sterile muslin. Explants were incubated in plates with 25 mL semisolid MS medium in the dark for 72 h and then immersed in liquid MS medium containing 500 mg/L cefotaxime for 30 min to remove excess bacteria. Stem discs were then transferred to plates with 25 mL semisolid MS media containing 50 mg/L kanamycin and 250 mg/L cefotaxime. The explants were incubated in the dark at 25°C. These were subcultured every 60 d until hairy root cultures were obtained and used for further studies.

**Hairy root transformation confirmation.** Histochemical localization of GUS expression was performed as described by Stomp (1992). After staining, tissues were washed and stored in 70% (v/v) ethanol. The *rolB*, *nptII*, *gus*, and *virD1* genes (the latter to confirm the absence of *A. rhizogenes* from the hairy root clones, since *virD1* is located outside the T-DNA region) were amplified by PCR. The template was total genomic DNA, extracted with hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) as described by Wilkie (1997). The *Vtc* primer (Table 1), which amplifies the gene encoding the Citrus tristeza virus capsid, was used as a negative control. PCR parameters were as follows: initial denaturation at 94°C for 4 min,

**Table 1.** List of primers used for PCR analyses of cactus hairy root cultures established after *A. rhizogenes* A4-mediated transformation

Gene	Primer sequences 5'–3'	Product size (bp)
<i>nptII</i>	TATTCGGCTATGACTGGGCA GCCAACGCTATGTCCTGAT	517
<i>rolB</i>	ATGGATCCCAAATTGCTATTCTTCCACGA TTAGGCTTCTTCTTCAGGTTTACTGCAGC	780
<i>gus</i>	GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA	1200
<i>virD1</i>	ATGTCGCAAGGACGTAAGCCCA GGAGTCTTTCAGCAT GGAGCAA	450
<i>Vtc<sup>z</sup></i>	GGTTTGAACCATGGACGACGAAACAAAGAA ATTG GGA ACTCCACCATGGCGATAGAAACCGGGA ATCGG	720

<sup>z</sup> Negative control

followed by 30 cycles of 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing at 55°C, and 2 min extension at 72°C. The PCR products were analyzed by 1.2% agarose gel electrophoresis and visualized under UV light after ethidium bromide staining.

**Hairy root growth on different culture media.** Twelve different basal culture media were used: Anderson (1978, 1980), DCR (Gupta and Durzan 1985), DKW (Driver and Kuniyuki 1984), Gamborg B5 (Gamborg *et al.* 1968), Heller (Heller 1953), K&M (Kao and Michayluk 1975), MS (Murashige and Skoog 1962), N6 (Chu *et al.* 1975), N&N (Nitsch and Nitsch 1969), Westvaco WV3 (Coke 1996), White (White 1963), and WPM (Lloyd and McCown 1981). All media were supplemented with 3% sucrose and 8 g/L agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) as a gelling agent. Vitamins from MS medium were added, and pH was adjusted to 5.7 before autoclaving. Conductivity was measured after sterilization with a Hach 44600 Conductivity/TDS meter (Hach, Loveland, CO). The culture media used can be grouped according to their inorganic nitrogen (N) content (Table 2) as high, medium, and low. High-N media include MS and DKW, with total N content from 60 to 40 mM; medium-N media are N6, K&M, N&N, and B5, with total N content from 40 to 20 mM; and low-N media, which contain 20 mM or less total N and include DCR, Anderson, WPM, WV3, Heller, and White media. Media can also be classified as high, medium, and low based on their ion strength (total salt concentration, measured as conductivity; Table 2). White, Anderson, and DCR media can be grouped as low-salt media, with conductivities ranging from 0.7 to 1 milli-Siemens per cm (mS/cm). Medium-salt media include WV3, Heller, N&N, and WPM, with ionic strengths from 1 to 2 mS/cm. B5, K&M, DKW, MS, and N6 are considered high-salt media (2 to 3 mS/cm). Experiments were performed in disposable petri dishes containing 25 mL semisolid basal medium. The plates were

**Table 2.** Inorganic nitrogen content (NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, and total) and ionic strength (measured as conductivity) in the basal media used in this study

Culture medium <sup>z</sup>	NO <sub>3</sub> (mM)	NH <sub>4</sub> (mM)	Total N (mM)	Ionic strength (mS) <sup>y</sup>
White	2.5	0	2.5	0.7
Heller	7.1	0	7.1	1.4
WV3	9	0	9	1.24
WPM	8.2	4.9	13.1	1.75
Anderson	9.7	4.9	14.6	0.7
DCR	11.6	5	16.6	1
B5	24.7	1.9	26.6	2.2
N&N	18.3	8.9	27.2	1.7
K&M	26.6	7.8	34.4	2.2
N6	28	7	35	2.7
DKW	29.4	17.7	47.1	2.5
MS	39.4	20.6	60	2.6

<sup>z</sup> Media are listed in increasing concentration of total N<sup>y</sup> milli-Siemens

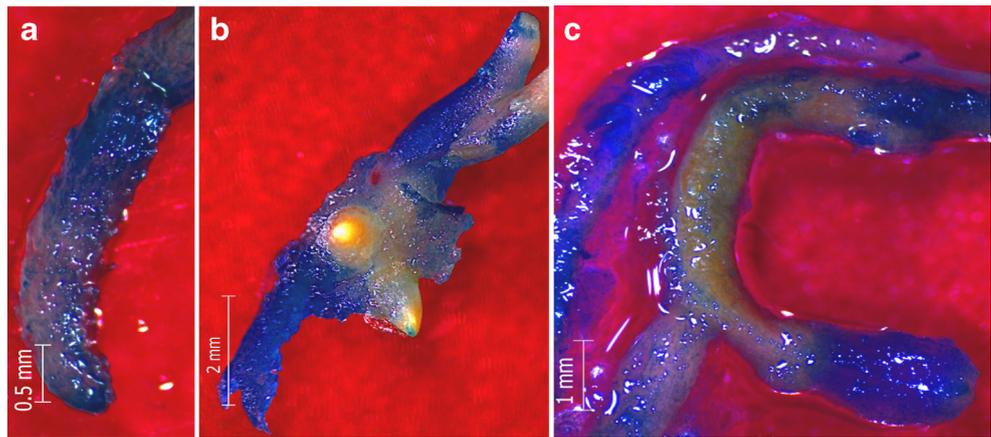
inoculated with 0.5±0.015 g of transformed roots, sealed, and incubated at 25°C. Experiments were held under a 16:8 light/dark photoperiod (54 μmol/m<sup>2</sup>/s). Fresh weight was measured after 30 d. This experiment was conducted twice for all the species, each experiment with six replicates per treatment for each species. Data were analyzed by ANOVA, and means were compared using the Tukey–Kramer multiple comparison test with a significance level of  $p \leq 0.05$ .

**Hairy root growth in a RITA® temporary immersion system.** Hairy roots (2 g fresh weight) were placed in a temporary immersion system (RITA®, Vitpropic, Saint-Mathieu-de-Trévières, France) with an immersion time of 15 min every 3 h. The bioreactor was filled with 200 mL of liquid MS (Sathyanarayana 2007), under a 16:8 light/dark photoperiod. Fresh weight was measured after 30 d of incubation. All experiments were performed twice for each species.

## Results and Discussion

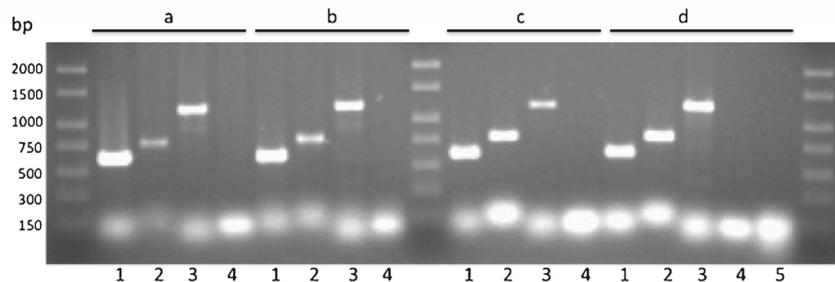
The cactus hairy roots showed an active branching pattern and fast growth on hormone-free medium. Both the GUS assay and PCR confirmed the successful transformation of these roots with *A. rhizogenes* (Figs. 1 and 2). Root growth was strongly influenced by the type of culture medium (Fig. 3). Based on our results, the optimum medium needed to be determined for each individual species, as growth responses differ among taxa. Among the 12 basal culture media tested, maximum growth was obtained on DKW medium for two species: *E. chaffeyi* (Fig. 4b) and *T. schmidickeanus* subsp.

**Figure 1.** Histochemical staining for GUS expression in hairy roots of *M. bocasana* subsp. *bocasana* (a), *T. lophophoroides* (b), and *F. peninsulæ* (c) induced by *A. rhizogenes* inoculation.



*Schwarzii* (Fig. 4h) (an approximately 3-fold increase over the starting weight for both species), whereas the biomass was significantly lower for both species on White medium (Fig. 3a, f). This was also reported for *Anisodus acutangulus* hairy roots, where the total N content on White media (which is very low compared to other basal media) was not ideal for hairy root growth (Li *et al.* 2008). DKW medium is a high-salt medium, with the highest N content of all media used except for MS medium. *M. bocasana* subsp. *bocasana* hairy roots (Fig. 4d) responded best when cultured on WPM and K&M media, doubling the initial inoculum weight (Fig. 3c). The beneficial effects of K&M medium was also observed in *Hyoscyamus albus* (Sauerwein and Shimomura 1991) and *Trigonella foenum-graecum* (Merkli *et al.* 1997) hairy roots. The total ionic concentration in WPM medium is low; in contrast, K&M medium has relatively high-N content and high ionic strength. *F. peninsulæ* hairy roots (Fig. 4c) showed the greatest biomass increase when cultured on N6 medium (0.5-fold increase over the starting weight) whereas the biomass was significantly lower on B5 medium (Fig. 3b). B5 medium differs from other media in having much a much higher level of  $\text{NO}_3$ , but it also has a low concentration of  $\text{NH}_4$  (Sathyanarayana 2007). Zhao *et al.* (2004) also achieved the best growth of *Saussurea medusa* hairy roots by using N6 medium. The N6 medium is high in potassium (which is beneficial to the growth of plant tissues [Hayashi *et al.* 1988]) and

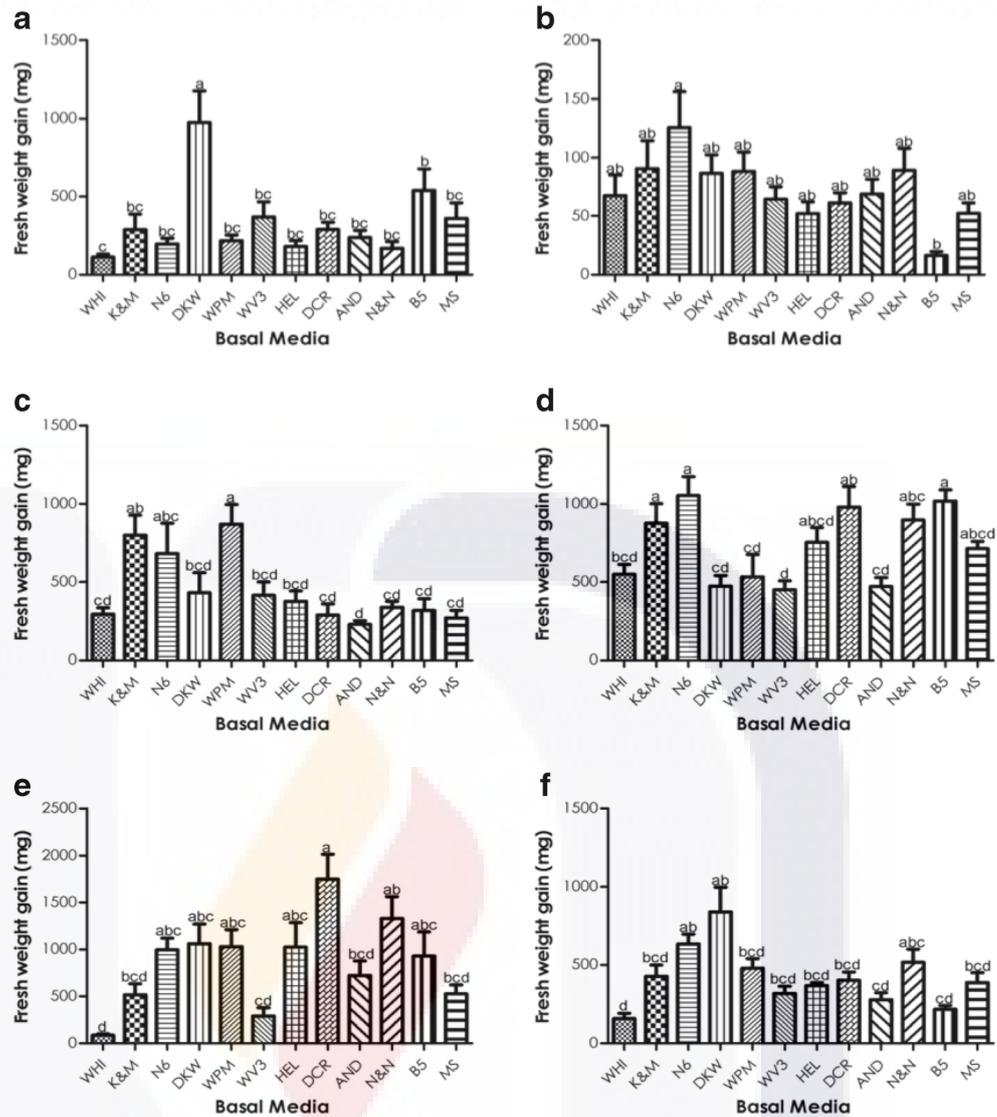
has high ionic strength and medium-N content. *T. lophophoroides* (Fig. 4e) also showed the greatest biomass increase on N6 medium (a 2-fold increase over the starting weight), but B5, K&M, and DCR media produced similar results. On the other media, intermediate growth was observed (Fig. 3d). A 6-fold weight increase for *T. pseudopectinatus* hairy roots was obtained on DCR medium (Fig. 3e); however, most of the weight was due to the production of callus tissue, which is undesirable because undifferentiated tissues are genetically and biochemically unstable. *T. pseudopectinatus* generated callus tissue on all basal media except for Heller medium, on which hairy root weight increased 4-fold over the starting weight. This was unexpected because a readily available supply of nitrogen seems to be important to maintaining cultured cells in an undifferentiated state (George *et al.* 2008). Additionally, the salt content in the Heller medium is low, it has no  $\text{NH}_4$ , and it contains some unnecessary compounds (Gamborg *et al.* 1976). Nevertheless, Mano *et al.* (1986) found the most suitable medium for the growth of *Scopolia japonica* hairy root clones to be Heller medium. *T. pseudopectinatus* also showed poor growth when cultured on White basal medium, as did *T. schmidieckeanus* subsp. *schwarzii* and *E. chaffeyi*. These results might be due to the lack of  $\text{NH}_4$  in White medium. Nitrogen assimilation interferes with the allocation of dry matter and energy, which causes different growth rates of plant parts (Gamborg *et al.*



**Figure 2.** Detection of the *rolB*, *nptII*, *gus*, and *virD1* genes. DNA from transformed roots of *E. chaffeyi* (a), *F. peninsulæ* (b), *T. pseudopectinatus* (c), and *T. schmidieckeanus* subsp. *schwarzii* (d).

Primers for amplifying *nptII*, *rolB*, *gus*, *virD1* (outside the T-DNA region), and *Vtc* (negative control) were used in the reactions run in lanes 1, 2, 3, 4, and 5, respectively.

**Figure 3.** Hairy root growth, expressed as fresh weight gain (mg), after 30-d culture on 12 different basal media of *E. chaffeyi* (a), *F. peninsulæ* (b), *M. bocasana* subsp. *bocasana* (c), *T. lophophoroides* (d), *T. pseudoplectinatus* (e), and *T. schmedickeanus* subsp. *schwarzii* (f). Bars represent standard error. Values marked with the same letter do not significantly differ at  $p < 0.05$ , using the Tukey–Kramer multiple range test. Combined results are shown for two independent experiments. See Materials and Methods and Table 2 for medium descriptions. AND Anderson, HEL Heller, WHI White.



1976). Although nitrate is far superior to ammonium as a source of nitrogen, the pH of the medium drifts toward alkalinity when nitrate is used alone, and adding a small amount of ammonium compound together with nitrate slows this drift (Bhojwani and Razdan 1989). MS medium, one of the most commonly used basal media, is considered a high-salt medium due to its K and N salt contents (Trigiano and Gray 2011), and it has a total ion concentration of N 24 times higher than that of White medium. Both extremes were shown to be sub-optimal for hairy root cultures of all species tested. In experiments with *Panax ginseng* hairy roots, Sivakumar *et al.* (2005) also found that MS medium resulted in low hairy root growth and biomass, indicating that the nutrient composition could be optimized. Total ionic strength of the medium also affects explant morphogenic reactions (callogenesis, somatic embryogenesis, regeneration, and micropropagation), making the medium optimization process more complex and difficult (Nas *et al.* 2013). Differences in hairy root morphology were

observed between hairy roots cultured on different basal media (Fig. 4g, h). The dedifferentiation and morphology of hairy roots are strongly affected by culture medium, as was reported for *Lobelia inflata* hairy roots (Yonemitsu *et al.* 1990). Anderson and N&N media generated thick, green, tightly packed roots, especially in *T. lophophoroides* (data not shown). Anderson medium has very low ionic strength and relatively low-N content, while N&N medium is considered to have medium salt and N contents, and it has half of MS medium's macronutrients (Sathyanarayana 2007). The depletion of N in batch cultures triggers an increase in the metabolism of some N-free compounds based on phenylpropanes, such as lignin, which are associated with the differentiation of secondarily thickened cells (Hahlbrock 1974). DCR, DKW, and K&M media, which differ in N content and salt concentration, produced green roots and showed increased lateral branching and a profusion of root hairs. N6 media produced very hairy roots and some pink callus tissue. Heller, White,

**Figure 4.** (a) Hairy root culture of *T. lophophoroides* in temporary immersion system RITA® (MS liquid medium). (b–f) Hairy root cultures in semisolid medium of *E. chaffeyi* (DKW medium) (b), *F. peninsulæ* (N6 medium) (c), *M. bocasana* var. *bocasana* (WPM medium) (d), *T. lophophoroides* (N6 medium) (e), and *T. pseudopectinatus* (WV3 medium) (f). (g–h) Two different morphologies of *T. schmedickeanus* subsp. *schwarzii* in B5 (g) and DKW (h) semisolid medium.

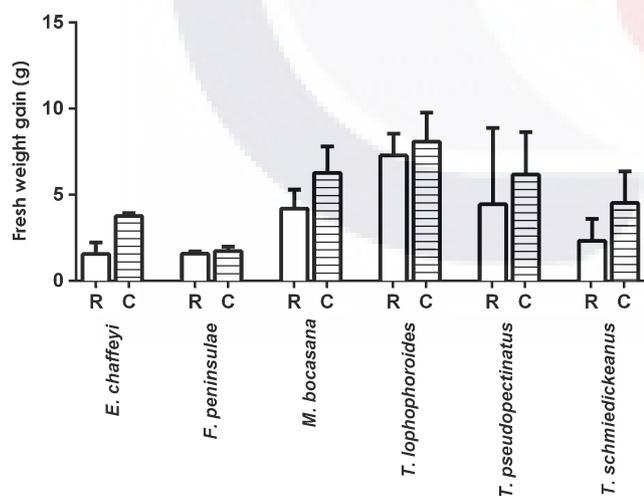


and WV3 media, which contain no  $\text{NH}_4$  and have the lowest N content of the media used, produced pink roots and callus tissues (Fig. 4f). Pink coloration of the hairy roots suggests the production of betalains. Thus, it appears that medium composition affected secondary metabolite production, which has

been reported previously (Yonemitsu *et al.* 1990; Nussbaumer *et al.* 1998). Although N content and total ionic strength seem to be important factors in hairy root biomass production, it is hard to establish a relationship between these medium characteristics and root morphology.

To reduce the costs of labor and consumables (Pavlov and Bley 2006), scaling-up of cactus hairy root cultures was achieved by using RITA<sup>®</sup> temporary immersion systems (Fig. 4a). These systems allow temporary contact between the plant *in vitro* cultures and the liquid medium, reducing hyperhydricity problems sometimes associated with bioreactor cultivation of transformed root cultures (Georgiev *et al.* 2007). In these systems, cactus hairy roots grew with no morphologic variations or callus tissue formation and with intensive branching (except for *T. pseudopectinatus*, in which branching was rarely observed). These observations are similar to those of Pavlov and Bley (2006) in *Beta vulgaris* hairy root cultures. Therefore, the main problems associated with hairy root cultivation (*i.e.*, nutrient and oxygen limitation of central tissue mass, which leads to non-homogeneous growth and necrosis) were avoided by using these bioreactors. Cactus hairy root growth rates were not statistically different in RITA<sup>®</sup> systems than on semisolid medium (Fig. 5). However, the experiments were carried out with MS medium only.

In conclusion, basal media conditions for cactus hairy root culture need to be optimized in a species-specific manner, as was done in this study. Four of the six species tested (*E. chaffeyi*, *T. schmidickeanus* subsp. *schwarzii*, *F. peninsulae*, and *T. lophophoroides*) produced higher biomass when cultured on media with high-salt concentrations and relatively high to medium-N content (DKW and N6, respectively), though the medium with the highest N content (MS) was not ideal for hairy root growth. In contrast, *M. bocasana* subsp. *bocasana* showed the best results when cultured on WPM, which has a medium-salt concentration and



**Figure 5.** Comparison of biomass increase of cactus hairy roots, expressed in fresh weight gain (g), after 30-d culture in RITA<sup>®</sup> temporary immersion systems containing liquid MS medium (R) and on semisolid MS medium as control (C) for the six cactus species. The growth rates were not significantly different between the two culture methods. Bars represent standard error. Combined results are shown for two independent experiments.

low-N content. *T. pseudopectinatus* should be cultured on low-N medium such as Heller medium to avoid callus generation, which occurred on all media with medium to high-N content. Different culture media affected hairy root morphology for all of the species tested, which may also suggest differences in secondary metabolite production in these hairy root lines. Further studies need to be conducted to characterize these probable metabolite differences. This study will contribute to the conservation of these six Mexican cacti by providing a method for obtaining the useful compounds found in these species in a sustainable manner, *i.e.*, by using hairy roots instead of collecting wild specimens.

**Acknowledgments** We thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) for their financial support (Project: CB-2011-0100000000168997) and for the PhD grant given to APC. We thank Bernardo Pérez Zamorano for his help in preparing the manuscript.

## References

- Anderson WC (1978) Tissue culture propagation of rhododendrons. *In Vitro* 14:334
- Anderson WC (1980) Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*. *Acta Hort* 112:13–20
- Bárceñas Luna RT (2003) Chihuahuan Desert cacti in Mexico: an assessment of trade, management, and conservation. priorities. Part II. In: Robbins CS (ed) Prickly trade: trade and conservation of Chihuahuan Desert cacti. TRAFFIC North America, World Wildlife Fund, Washington, DC. [http://www.traffic.org/species-reports/traffic\\_species\\_plants5.pdf](http://www.traffic.org/species-reports/traffic_species_plants5.pdf). Cited 15 Feb 2015
- Bhojwani SS, Razdan MK (1989) Plant tissue culture: theory and practice. Elsevier Science Publishers, Amsterdam
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY (1975) Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sin* 18:659–668
- Coke JE (1996) Basal nutrient medium for *in vitro* cultures of loblolly pines. US Patent 5:534,434
- De la Rosa-Carrillo ML, Domínguez-Rosales MS, Pérez-Reyes ME, Pérez-Molphe-Balch E (2012) Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género *Turbincarpus*. *Interciencia* 37: 114–120
- Driver JA, Kuniyuki AH (1984) *In vitro* propagation of *Paradox* walnut rootstock. *HortSci* 19:507–509
- Dubrovsky JG (1998) Discontinuous hydration as a facultative requirement for seed germination in two cactus species of the Sonoran Desert. *J Torrey Bot Soc* 125:33–39
- Fitz MB, Fitz MWA (2009) *Mammillaria bocasana*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. [www.iucnredlist.org/](http://www.iucnredlist.org/). Cited 26 May 2013
- Fitz MB, Fitz MWA, Sotomayor M, Smith M (2013a) *Turbincarpus pseudopectinatus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. [www.iucnredlist.org/](http://www.iucnredlist.org/). Cited 13 November 2013
- Fitz MB, Fitz MWA, Sotomayor M, Smith M (2013b) *Turbincarpus schmidickeanus*. In IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. [www.iucnredlist.org/](http://www.iucnredlist.org/). Cited 11 November 2013

- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151–158
- Gamborg OL, Murashige T, Thorpe TA, Vasil IK (1976) Plant tissue culture media. *In Vitro* 12:473–478
- George EF, Michael AH, De Klerk GJ (2008) The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds) *Plant propagation by tissue culture*. Springer, Dordrecht, pp 65–113
- Georgiev MI, Pavlov AI, Bley T (2007) Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:1175–1185
- Guillon S, Trémoullaux-Guiller J, Pati PK, Rideau M, Gantet P (2006) Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends Biotechnol* 24:403–409
- Gupta PK, Durzan KJ (1985) Shoot multiplication from mature Douglas-fir and sugar pine. *Plant Cell Rep* 4:177–179
- Hahlbrock K (1974) Correlation between nitrate uptake, growth and changes in metabolic activities of cultured plant cells. In: Street HE (ed) *Tissue culture and plant science*. Academic, London, pp 363–378
- Hayashi Y, Kyzuzuka J, Shimamoto K (1988) Hybrids of rice (*Oryza sativa* L.) and wild *Oryza* species obtained by cell fusion. *Mol Gen Genet* 214:6–10
- Heller R (1953) Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann Sci Nat Bot Biol Veg* 14:1–223
- Hernández HM, Bárcenas RT (1995) Endangered cacti in the Chihuahuan Desert: I. Distribution patterns. *Conserv Biol* 9:1176–1188
- Hernández HM, Bárcenas RT (1996) Endangered cacti in the Chihuahuan Desert: II. Biogeography and conservation. *Conserv Biol* 10:1200–1209
- Hooykaas PJJ, Klapwijk PM, Nuti MP, Schilperoort RA, Rörsch A (1977) Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent *Agrobacteria* and to *Rhizobium ex planta*. *J Gen Microbiol* 98:477–484
- Jain SM, Minocha SC (2000) *Molecular biology of woody plants*, vol 1. Kluwer Academic Publishers, Springer Science, Dordrecht
- Jofre-Garfias AE, Villegas-Sepúlveda N, Cabrera-Ponce JL, Adame-Alvarez RM, Herrera-Estrella L, Simpson J (1997) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Amaranthus hypochondriacus*: light- and tissue-specific expression of pea chlorophyll *a/b*-binding protein promoter. *Plant Cell Rep* 16:847–852
- Kao KN, Michayluk MR (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* 126:105–110
- Karuppusamy S (2009) A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *J Med Plant Res* 3:1222–1239
- Li L, Wang J, Wang W, Lu Y, Wang Y, Zhou G, Kai G (2008) Optimization of induction and culture conditions and tropane alkaloid production in hairy roots of *Anisodus acutangulus*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 13:606–612
- Lloyd G, McCown B (1981) Commercially feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb Proc Int Plant Propagator Soc* 30:421–427
- Mano Y, Nabeshima S, Matsui C, Ohkawa H (1986) Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agric Biol Chem* 50:2715–2722
- Merkli A, Christen P, Kapetanidis I (1997) Production of diosgenin by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. *Plant Cell Rep* 16:632–636
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Nas MN, Bolek Y, Sevgin N (2013) Shortcut to long-distance developing of a tissue culture medium: micropropagation of mature almond cultivars case study. *Turk J Bot* 37:1134–1144
- Nitsch JP, Nitsch C (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science* 163:85–87
- Nussbaumer P, Kapetanidis I, Christen P (1998) Hairy roots of *Datura candida* × *D. aurea*: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Rep* 17:405–409
- Pavlov A, Bley T (2006) Betalains biosynthesis by *Beta vulgaris* L. hairy root culture in a temporary immersion cultivation system. *Process Biochem* 41:848–852
- Santos-Díaz MS, Pérez-Molphe E, Ramírez-Malagón R, Núñez-Palenius HG, Ochoa-Alejo N (2010) Mexican threatened cacti: current status and strategies for their conservation. In: Tepper GH (ed) *Species diversity and extinction*. Nova Science Publishers, Inc., New York, pp 1–60
- Sathyanarayana BN (2007) *Plant tissue culture: practices and new experimental protocols*. International Publishing House, New Delhi
- Sauerwein M, Shimomura K (1991) Alkaloid production in hairy roots of *Hyoscyamus albus* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Phytochemistry* 30:3277–3280
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (2010) <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documents/Ciga/agenda/DOFsr/DO2454.pdf>. Cited 15 Feb 2015
- Sivakumar G, Yu KW, Hahn EJ, Paek KY (2005) Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors. *Curr Sci* 89:641–649
- Smith, M, Fitz MWA, Fitz MB, Sotomayor M (2013) *Turbinicarpus lophophoroides*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. [www.iucnredlist.org/](http://www.iucnredlist.org/). Cited 13 November 2013
- Srivastava S, Srivastava AK (2007) Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Crit Rev Biotechnol* 27:29–43
- Starha R, Chybidziurova A, Lacny Z (1999) Alkaloids of the genus *Turbinicarpus* (Cactaceae). *Biochem Syst Ecol* 27:839–841
- Stomp AM (1992) Histochemical localization of  $\beta$ -glucuronidase. In: Gallagher SA (ed) *GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression*. Academic, San Diego, pp 103–113
- Thimmaraju R, Venkatachalam L, Bhagyalakshmi N (2008) Morphometric and biochemical characterization of red beet (*Beta vulgaris* L.) hairy roots obtained after single and double transformations. *Plant Cell Rep* 27:1039–1052
- Trigiano RN, Gray DJ (2011) *Plant tissue culture, development, and biotechnology*. CRC Press, Boca Raton
- Veena V, Taylor CG (2007) *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 43:383–403
- White PR (1963) *The cultivation of animal and plant cells*, 2nd edn. Ronald Press, New York
- Wilkie S (1997) Isolation of total genomic DNA. In: Clark MS (ed) *Plant molecular biology: a laboratory manual*. Springer, Berlin, pp 3–14
- Yonemitsu LH, Shimomura K, Satake M, Mochida S, Tanaka M, Endo T, Kaji A (1990) Lobeline production by hairy root culture of *Lobelia inflata*. *Plant Cell Rep* 9:307–310
- Zhao D, Fu C, Chen Y, Ma F (2004) Transformation of *Saussurea medusa* for hairy roots and jaceosidin production. *Plant Cell Rep* 23:468–474
- Zhou ML, Zhu XM, Shao JR, Tang YX, Wu YM (2011) Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1229–1239

**IX. APENDICES**

**Apéndice 1.** Preparación del medio basal de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962).

**Soluciones concentradas**

**Solución A. Concentración 1000X. Volumen 50 mL.**

Cloruro de calcio	CaCl <sub>2</sub> - 2H <sub>2</sub> O	22.0 g
-------------------	---------------------------------------	--------

**Solución B. Concentración 1000X. Volumen 50 mL.**

Yoduro de potasio	KI	41.50 mg
Cloruro de cobalto	CoCl <sub>2</sub> - 6H <sub>2</sub> O	1.25 mg

**Solución C. Concentración 400X. Volumen 50 mL.**

Fosfato monobásico de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.4 g
Acido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.124 g
Molibdato de sodio	NaMoO <sub>4</sub>	0.005 g

**Solución D. Concentración 400X. Volumen 50 mL.**

Sulfato de magnesio	MgSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O	7.4 g
Sulfato de manganeso	MnSO <sub>4</sub> - H <sub>2</sub> O	0.340 g
Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O	0.172 g
Sulfato de cobre	CuSO <sub>4</sub> - 5H <sub>2</sub> O	0.50 g

**Solución E. Concentración 300X. Volumen 100 mL.**

Sulfato ferroso	FeSO <sub>4</sub> - 2H <sub>2</sub> O	0.557 g
EDTA disódico	Na <sub>2</sub> EDTA	0.745 g

**Solución F. Concentración 100X. Volumen 100 mL.**

Glicina	20.00 mg
Pirridoxina HCl	5.00 mg
Acido nicotínico	5.00 mg
Tiamina HCl	1.00 mg
Mio inositol	1.00 g

1. En un vaso de precipitados colocar unos 850 ml de agua destilada.  
Agregar volumen indicado de las soluciones concentradas.

<b>Solución</b>	<b>Volumen (ml)</b>
A	1
B	1
C	2.5
D	2.5
E	5
F	10

2. Pesar, añadir y agitar hasta disolver, los siguientes compuestos:

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

3. Ajustar el pH del medio a 5.7 NaOH o HCl 0.1 N. Aforar a 1 litro con agua destilada.
4. Si se trata de medio semisólido, agregar el gelificante y disolverlo calentando (se recomienda por rapidez utilizar horno de microondas).
5. Agregar los reguladores del crecimiento en caso de requerirlos, antes de ajustar el pH del medio de cultivo.

Distribuir en los recipientes de cultivo y esterilizar.

**Apéndice 2.** Formulación de los medios de cultivo utilizados en este estudio.

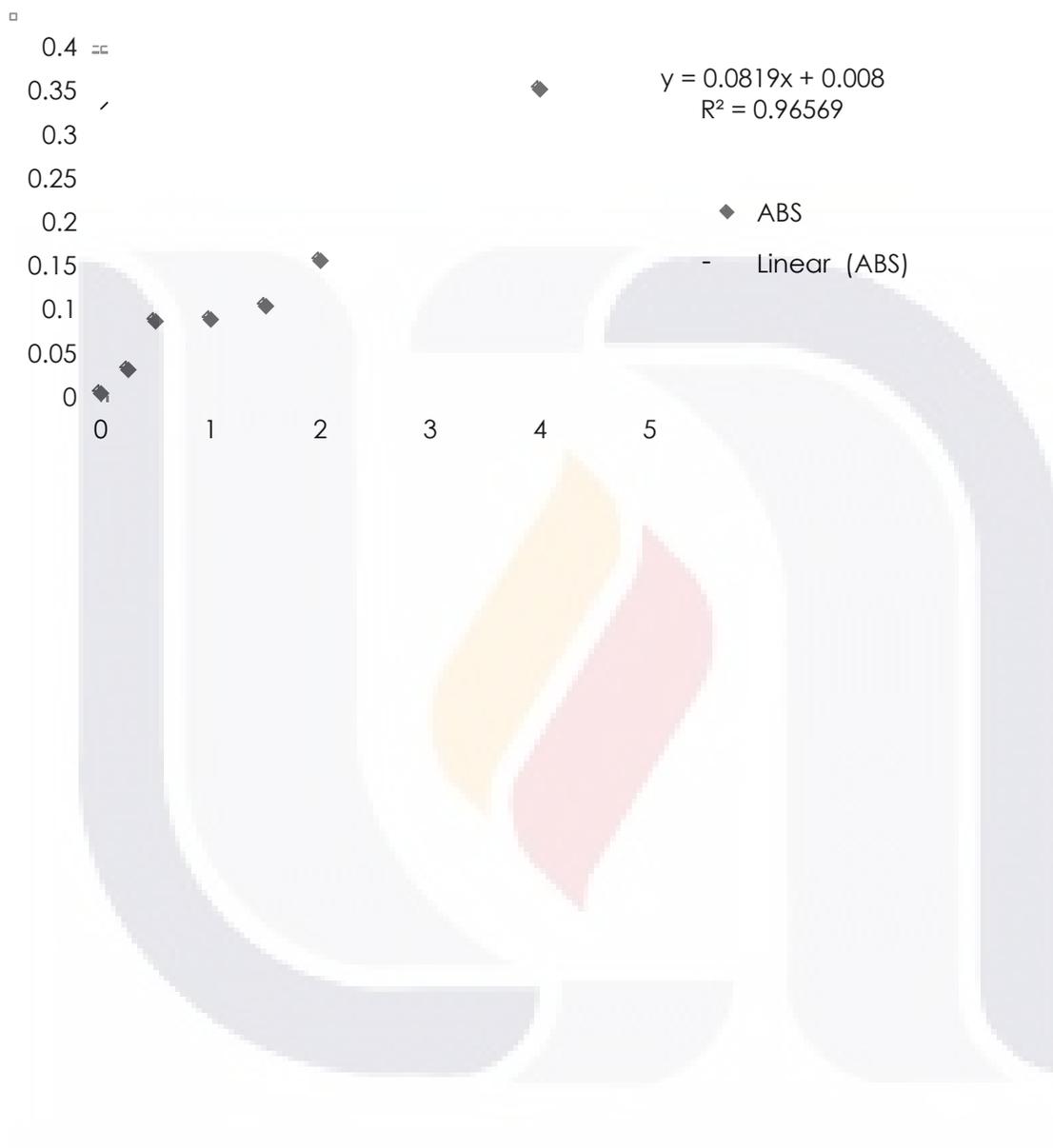
COMPUESTO/MEDIO	AND	B5	DCR	DKW	HEL	K&M	MS	N6	N&N	WHI	WPM	WV3
<b>Ácido Borico</b>	6.2	3	6.2	4.8	1	3	6.2	1.6	10	1.5	6.2	31
<b>Ácido Fólico</b>									0.5			
<b>Ácido Molíbdico (Sal de Sodio) 2H<sub>2</sub>O</b>	0.25	0.25	0.25	0.39		0.25	0.25		0.25		0.25	0.25
<b>Ácido Nicotínico (Ácido Libre)</b>		1					0.5		5		0.5	
<b>Cloruro de Aluminio 6H<sub>2</sub>O</b>					0.0543							
<b>Cloruro de Calcio, Anhidro</b>	332.2	113.24	64.14	112.5	56.7	453	332.2	125.33	166		72.5	452.88
<b>Cloruro de Cobalto 6H<sub>2</sub>O</b>	0.025	0.025	0.025			0.025	0.025					0.025
<b>Cloruro de Níquel</b>			0.025	0.005								
<b>Cloruro de Potasio</b>					750	300				65		656.79
<b>Cloruro Férrico</b>					1							
<b>D-Biotina</b>									0.05			
<b>Fosfato de Potasio Monobásico</b>			170	265		170	170	400	68		170	270
<b>Fosfato de Sodio</b>	330.6	150		108.75						16.5		

<b>Monobásico</b>													
<b>Glicina (Base Libre)</b>								2	2	2			
<b>Mlo-Inositol</b>		100					100	100	100	100	1000		
<b>Na<sub>2</sub> EDTA 2H<sub>2</sub>O</b>	74.5	37.26	37.3	45.4			37.26	37.26	37.25	37.26	37.3		
<b>Nitrato de Amonio</b>	400		400	1416			600	1650		720	400		
<b>Nitrato de Calcio</b>			386.31	1367						208.5	386		
<b>Nitrato de Potasio</b>	480	2500	340				1900	1900	2830	950	80	910.06	
<b>Nitrato de Sodio</b>					600								
<b>Nitrato de Zinc 6H<sub>2</sub>O</b>				17									
<b>Piridoxina HCl</b>		1						0.5		0.5		0.5	
<b>Sodio Ferroso EDTA</b>												36.7	
<b>Sulfato Cúprico 5H<sub>2</sub>O</b>	0.025	0.025	0.25	0.25	0.03	0.025	0.025			0.025	0.001	0.25	0.25
<b>Sulfato de Amonio</b>		134							463				
<b>Sulfato de Magnesio, Anhidro</b>	180.7	122.09	180.7	361.49	122.1	146.55	180.7	3.3	90.372	351.62	180.7	903.79	
<b>Sulfato de Manganeso H<sub>2</sub>O</b>	16.9	10	22.3	33.8	0.0758	10	16.9			18.9	5.31	22.3	15.16
<b>Sulfato de Potasio</b>				1559									990
<b>Sulfato de Sodio</b>										200			
<b>Sulfato de Zinc 7H<sub>2</sub>O</b>	8.6	2	8.6	1			2	8.6	1.5	10	3	8.6	8.6

<b>Sulfato Ferroso 7H<sub>2</sub>O</b>	55.7	27.8	27.8	33.8		27.85	27.8	27.85	27.8	2.5	27.85
<b>Tiamina HCl</b>		10					0.1		0.5		1 0.4
<b>Trióxido de Molibdeno</b>					0.03					0.0001	
<b>Yoduro de Potasio</b>	0.3	0.75	0.83	0.01		0.75	0.83	0.8		0.75	0.83



**Apéndice 3.** Curva patrón de BSA (ABS) para la cuantificación de proteínas totales.



**Apéndice 4.** Contenido de proteínas totales en diferentes tejidos de cuatro especies de cactáceas cuantificado por el método Bradford.

<b>Muestra</b>	<b>Tejido</b>	<b>Proteínas totales (mg/mL)</b>
<i>E. chafeyii</i> A	brote	0.2928
<i>E. chafeyii</i> B	brote vitrificado	0.3479
<i>E. chafeyii</i> B	brote	0.3308
<i>E. chafeyii</i> A	callo	0.3442
<i>T. laui</i>	brote	0.4127
<i>T. laui</i>	raíz	0.2121
<i>T. laui</i>	callo	0.2886
<i>T. pseudopectinatus</i>	brote	0.2489
<i>T. pseudopectinatus</i>	raíz	0.2265
<i>T. pseudopectinatus</i>	brote vitrificado	0.2629
<i>M. bocasana</i>	brote	0.2821