



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

**GENERACIÓN Y CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE CACTÁCEAS
SUDAMERICANAS**

PRESENTA

Juan Pablo Martínez Vázquez.

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.**

TUTOR

Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch

COMITÉ TUTORAL

M. en C. Lucía Isabel Chávez Ortiz
Dr. José Francisco Morales Domínguez

Aguascalientes, Ags., 21 de noviembre de 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

L.A.Q.B. JUAN PABLO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL
ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.
P R E S E N T E.

Estimado (a) alumno (a) Martínez:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "GENERACIÓN Y CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE CACTÁCEAS SUDAMERICANAS", 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., 19 de noviembre de 2014
"SE LUMEN PROFERRE"
EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLAGOS



c.c.p.- Interesado
JJRG,mjda



UNIVERSIDAD AUTONOMA
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 del presente como tutor designado del estudiante **JUAN PABLO MARTÍNEZ VÁZQUEZ**, con ID 68752, quien realizó la tesis titulada: **GENERACIÓN Y CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE CACTÁCEAS SUDAMERICANAS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él 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.

A T E N T A M E N T E

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 11 de noviembre de 2014.

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch
Tutor de tesis

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

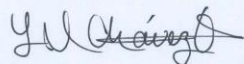


M. en C. JOSE DE JESUS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS
P R E S E N T E

Por medio de la presente y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, y en calidad de miembro del Comité Tutorial de el alumno **JUAN PABLO MARTINEZ VAZQUEZ** con ID 68752, quien realizó la tesis titulada "Generación y cultivo de raíces transformadas de cactáceas sudamericanas", emito un **VOTO APROBATORIO** para que el alumno proceda a imprimir su tesis y a continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se lumen proferre"
Aguascalientes, Ags., 20 de noviembre de 2014



M.C. Lucía Isabel Chávez Ortiz
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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química



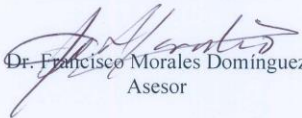
ANIVERSARIO
UAA

M en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
P r e s e n t e:

Por medio de este conducto, le comunico que el alumno **Juan Pablo Martínez Vázquez** egresado de la Maestría en Ciencias en el área de Biotecnología Vegetal, ha concluido satisfactoriamente su trabajo de tesis titulado **“GENERACIÓN Y CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE CACTÁCEAS SUDAMERICANAS”** que defenderá en el examen de titulación correspondiente.

Por lo anterior se considera que puede proceder a realizar los trámites administrativos correspondientes y se le asigne la fecha de examen de grado.

ATENTAMENTE
“SE LUMEN PROFERRE”


Dr. Francisco Morales Domínguez
Asesor

Aguascalientes, Ags. A 19 de noviembre de 2014

AGRADECIMIENTOS.

Me complace de sobremanera a través de este trabajo exteriorizar mi sincero agradecimiento a la Universidad Autónoma de Aguascalientes en su Departamento de Química y en ella a los distinguidos docentes quienes con su profesionalismo y ética puesto de manifiesto en las aulas enrumba a cada uno de los que acudimos con sus conocimientos que nos servirán para ser útiles a la sociedad.

A mi Comité Tutorial, encabezado por el Doctor Eugenio Pérez Molphe Balch, al Doctor José Francisco Morales Domínguez y la Maestra Lucía Chávez Ortiz quienes con su experiencia, han sido la guía idónea durante el proceso que ha llevado el realizar esta tesis, me han brindado el tiempo necesario y la información para que este anhelo llegue a ser felizmente culminada.

A todos y cada uno de mis compañeros y amigos que trabajan en el laboratorio de Biotecnología, por darme su tiempo y conocimientos cuando más lo necesité.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis (Beca número 486792, proyecto de investigación CB-2011-01-000000000168997).

DEDICATORIA.

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Papá y Mamá.

A tu amor, paciencia, comprensión y sacrificios para que yo pudiera cumplir con este tan anhelado objetivo. Por inspirarme a ser mejor para ti, ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de ti, gracias por estar siempre a mi lado.

Lety.

A mi HIJO, el motivo y la razón que me ha llevado a seguir superándome día a día, para alcanzar mis más preciados ideales de superación, para afrontar los momentos más difíciles y descubrir que cuando se quiere alcanzar algo en la vida, no hay tiempo ni obstáculo que lo impida para poderlo LOGRAR.

Pablito.

Gracias a esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarme toda su apoyo, ahora me toca regresar un poquito de todo lo inmenso que me han otorgado.

A mis maestros que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida, a todos y cada uno de ellos les dedico cada una de estas páginas de mi tesis.

ÍNDICE GENERAL.

ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
1. MARCO TEÓRICO.....	10
1.1 Cactáceas.....	10
1.2 Cactáceas sudamericanas.	12
1.2.1 <i>Echinopsis ancistrophora</i>	12
1.2.2 <i>Echinopsis huotii subsp. vallegrandensis</i>	13
1.2.3 <i>Echinopsis mirabilis</i>	14
1.2.4. <i>Eriosyce aurata</i>	15
1.2.5 <i>Eulychnia breviflora</i>	17
1.2.6 <i>Frailea castanea</i>	18
1.2.7 <i>Gymnocalycium chubutense</i>	19
1.2.8 <i>Matucana madisoniorum</i>	21
1.3 Metabolitos de interés que producen las cactáceas.	22
1.4 Cultivo de tejidos vegetales.	24
1.5 Medios de cultivo.	24
1.6 Micropropagación.	24
1.7 Métodos de transformación genética.	25
1.7.1 Transformación mediada por <i>Agrobacterium</i>	25
1.7.2 Genes marcadores.	27
1.7.3 Marcadores de selección.	27
1.7.4 Marcadores de información.	27
1.8 Transformación mediada por <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	28
1.9 Cultivo <i>in vitro</i> de raíces.	30
1.9.1 Antecedentes del cultivo de raíces transformadas.....	34

2. JUSTIFICACIÓN.....	35
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo general.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	36
4. MATERIALES.....	36
4.1 Material biológico.....	36
5. METODOLOGÍA.....	37
5.1 Germinación de semillas <i>in vitro</i>	37
5.1.1 Desinfección de semillas de cactáceas.....	37
5.1.2 Siembra e incubación de las semillas.....	37
5.2 Propagación de cactáceas por medio de la activación de areolas (yemas axilares) <i>in vitro</i>	37
5.3 Transformación genética de cactáceas.....	38
5.3.1 Cultivo de <i>A. rhizogenes</i> A4/pESC4 en medio YM.....	38
5.3.2 Análisis para comprobar la presencia de los genes <i>nptII</i> , <i>GUS</i> , <i>rolB</i> y <i>VirD1</i> en <i>A. rhizogenes</i> A4/pESC4.....	38
5.3.3 Aislamiento del ADN de <i>A. rhizogenes</i>	38
5.3.4 Identificación de los genes <i>nptII</i> , <i>GUS</i> , <i>rolB</i> y <i>VirD1</i> en <i>A. rhizogenes</i> A4/pESC4 mediante PCR.....	39
5.3.5 Electroforesis de productos amplificados.....	41
5.3.6 Inducción de raíces transformadas en cactáceas.....	41
5.4 Mantenimiento y propagación de las raíces <i>in vitro</i>	42
5.4.1 Ensayo histoquímica para β -glucoronidasa (<i>GUS</i>).....	42
5.4.2 Extracción de ADN de raíces presuntamente transformadas en cactáceas.....	43
5.4.3 Montaje de la PCR y Electroforesis para ADN de raíces transformadas.....	44

6	RESULTADOS.	44
6.1	Establecimiento y propagación de material vegetal <i>in vitro</i> de las especies seleccionadas para el proyecto.	44
6.1.1	Germinación de semillas <i>in vitro</i>	44
6.1.2	Propagación de cactáceas por medio de la activación de yemas <i>in vitro</i>	46
6.1.2.1	Propagación de cactáceas por medio de la activación de yemas <i>in vitro</i> medio MS + 0.5 mg/litro de B.A.	46
6.2	Inducción de raíces transformadas en explantes a través del cocultivo con <i>A. rhizogenes</i>	51
6.2.1	Prueba de portación de genes de <i>A. rhizogenes</i> A4/pESC4.	51
6.2.2	Transformación genética de cactáceas.	52
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	58
	CONCLUSIONES.	65
	BIBLIOGRAFÍA.	66

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Sistemas eficientes de producción *in vitro* de metabolitos secundarios tomado de (Pérez-Molphe-Balch, et al., 1999)..... 23

Tabla 2. Producción de Metabolitos secundarios en cultivos de raíces transgénicas tomado de (Benítez, 2005)..... 33

Tabla 3: Reactivos para preparar la mezcla de reacción en la técnica de PCR. 40

Tabla 4. Reactivos para realizar el ensayo histoquímico para β -glucoronidasa (GUS)..... 43

Tabla 5: Germinación de especies de cactáceas para establecimiento y propagación de material vegetal 45

Tabla 6: Resultados del esquema de micropropagación por activación de yemas *in vitro* de cactáceas en medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA..... 47

Tabla 7: Respuesta de las 6 especies de cactáceas en la producción de brotes al medio MS + 0.5 mg/litro de B.A y MS + 1.0 mg L⁻¹ de BA..... 47

Tabla 8: Respuesta de las 8 especies de cactáceas ante la infección con *A. rhizogenes*. 53

ÍNDICE DE FIGURAS.

Fig. 1: *Echinopsis ancistrophora*. Cactácea en su hábitat natural (Anderson, 2001)..... 13

Fig. 2: *Echinopsis huotii subsp vallegrandensis*. Fotografiado en la provincia de Vallegrande, Bolivia (Anderson, 2001)..... 14

Fig. 3: *Echinopsis mirabilis*. Cactácea producida por micropropagación *in vitro* (Uhlig, 2005).. 15

Fig. 4: *Eriosyce aurata*. Espécimen encontrado en la pre cordillera andina (Anderson, 2001)..... 16

Fig. 5: *Eulychnia breviflora*. Fotografiado en la costa norte de Chile (Anderson, 2001)..... 17

Fig. 6: *Frailea castanea*. Cactácea en su hábitat natural a ras del suelo (Anderson, 2001).. 19

Fig. 7: *Gymnocalycium chubutense*. Fotografía que muestra la anatomía de la planta (Anderson, 2001).. 20

Fig. 8: *Matucana madisoniorum*. Plántula en su estado libre (izquierda) y producida por micropropagación *in vitro* (derecha) (Anderson, 2001)..... 21

Fig. 9.- Esquema del plásmido Rt de *Agrobacterium tumefaciens* tomado de (Levitus, et al., 2010)..... 28

Fig. 10.- Infección por *Agrobacterium*. Las sustancias fenólicas liberadas por la planta activan la maquinaria de transferencia tomado de (Levitus, et al., 2010)..... 29

Fig. 11. Propagación de cactáceas por medio de la activación de yemas *in vitro* medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de B.A y MS + 1.0 mg L⁻¹ de B.A..... 48

Fig. 12. Plántulas de *Echinopsis ancistrophora*. (a) Obtenida *in vitro*, (b) en medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA, (c) cultivadas en medio MS + 1 mg L⁻¹ de BA con brotación multiple..... 48

Fig. 13. Plántulas de *Echinopsis mirabilis*. (a) Obtenida *in vitro*, (b) en medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA, (c) cultivadas en medio MS + 1 mg L⁻¹ de BA con brotación multiple..... 49

Fig. 14. Plántulas de *Echinopsis huotii subsp vallegrandensis*. (a) Obtenida *in vitro*, (b) en medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA, (c) cultivadas en medio MS + 1 mg L⁻¹ de BA con brotación múltiple..... 49

Fig. 15. Plántulas de *Eriosyce aurata*. (a) Obtenida *in vitro*, (b) en medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA, (c) cultivadas en medio MS + 1 mg L⁻¹ de BA con brotación múltiple... 50

Fig. 16. Plántulas de *Eulychnia breviflora*. (a) Obtenida *in vitro*, (b) en medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA, (c) cultivadas en medio MS + 1 mg L⁻¹ de BA con brotación múltiple..... 50

Fig. 17. Plántulas de *Gymnocalycium chubutense*. (a) Obtenida *in vitro*, (b) en medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA, (c) cultivadas en medio MS + 1 mg L⁻¹ de BA con brotación múltiple..... 51

Fig. 18. Electroforesis en gel de agarosa de ADN obtenido por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir de la extracción de ADN de cultivo modificado de *A. rhizogenes* teñido con bromuro de etidio..... 52

Fig. 19. Número promedio de raíces generadas por la infección de *A. rhizogenes*. El nivel de significancia estadística es *=P<0.05, ****P<0.001..... 53

Fig. 20. Longitud promedio de las raíces generadas por la infección de *A. rhizogenes*. El nivel de significancia estadística es *=P<0.05, ****P<0.001..... 54

Fig. 21. Actividad GUS (%) de las raíces generadas por la infección de *A. rhizogenes*. 54

Fig. 22. Inducción de raíces peludas en explantes de a) *E. vallegrandensis* y b) *G. chubutense* infectadas con *A. rhizogenes*. Prueba histoquímica para la expresión de GUS en raíces transformadas de c) *E. vallegrandensis* y d) *G. chubutense*..... 55

Fig. 23. Inducción de raíces peludas en explantes de a) *E. ancistrophora* y b) *E. mirabilis* infectadas con *A. rhizogenes*. Prueba histoquímica para la expresión de GUS en raíces transformadas de c) *E. ancistrophora* y d) *E. mirabilis*..... 56

Fig. 24. Detección de los genes *rolB*, *nptII* y *virD1* en *A. rhizogenes*, *Echinopsis ancistrophora*, *E. mirabilis*, *E. huotii subsp vallegrandensis*, y *Gymnocalycium chubutense* por análisis de PCR. 57

RESUMEN.

Se desarrollaron sistemas para la propagación *in vitro* a través de la activación areolas (yemas axilares) para *Echinopsis ancistrophora*, *Echinopsis mirabilis*, *Echinopsis huotii subsp vallegrandensis*, *Eriosyce aurata*, *Eulychnia breviflora* y *Gymnocalycium chubutense*. Como fuente de explantes se usaron plántulas germinadas *in vitro*. Se logró la formación de brotes múltiples a partir de las yemas en medio basal MS con 3% de sacarosa, 10 g L⁻¹ agar y suplementado con 0.5 mg L⁻¹ y 1.0 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BA). Las eficiencias más altas de producción de brotes fluctuaron entre 4.9 en *Eulychnia breviflora* hasta 14.4 brotes por explante en *Echinopsis huotii subsp vallegrandensis* en medio basal MS suplementado con 1.0 mg L⁻¹ de BA.

Además se evaluó la susceptibilidad a *A. rhizogenes* en *Echinopsis ancistrophora*, *Echinopsis mirabilis*, *Echinopsis huotii subsp vallegrandensis*, *Eriosyce aurata*, *Eulychnia breviflora*, *Gymnocalycium chubutense*, *Frailea castanea* (*Frailea asteroides*) y *Matucana madisoniorum*. Los explantes fueron tomados de plantas cultivadas *in vitro* y fueron inoculados con *Agrobacterium rhizogenes* A4 cepa de tipo agropina que contiene el plásmido silvester RiA4 y el vector binario pESC4 con los genes *nptII* y *gus*. Raíces presuntamente transformadas se produjeron directamente de heridas o a partir de tejido calloso generado en cuatro de las especies evaluadas, *Echinopsis ancistrophora*, *E. mirabilis*, *E. huotii subsp vallegrandensis*, y *Gymnocalycium chubutense*. La frecuencia de la formación de raíces pilosas, el número de raíces por explante y sus tasas de crecimiento fueron variables entre las especies analizadas. En las cuatro especies restantes, la producción de raíces transformadas no se observó bajo las condiciones utilizadas en estos experimentos. La detección histoquímica de la actividad de la β - glucuronidasa (GUS) demostró la expresión de este gen extraño en las raíces peludas. Los análisis de PCR demostraron la presencia de los genes *rolB* y *nptII* en el ADN de las raíces transformadas.

ABSTRACT.

In vitro propagation systems by means of areole activation were developed for *Echinopsis ancistrophora*, *E. mirabilis*, *Echinopsis huotii subsp vallegrandensis*, *Eriosyce aurata*, *Eulychnia breviflora* and *Gymnocalycium chubutense*. *In vitro* germinated seedlings were used as source of explants. Multiple shoot formation from areoles was achieved on MS basal with 3% sucrose, 10 g L⁻¹ agar and medium supplemented with 0.5 mg L⁻¹ and 1.0 mg L⁻¹ of 6-benzylaminopurine (BA). Efficiencies ranged from 4.9 shoots per explant in *Eulychnia breviflora* to 14.4 shoots per explant in *Echinopsis huotii subsp vallegrandensis* in MS basal medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ of 6-benzylaminopurine (BA).

Also susceptibility to *Agrobacterium rhizogenes* was evaluated in *Echinopsis ancistrophora*, *E. mirabilis*, *E. huotii subsp vallegrandensis*, *Eriosyce aurata*, *Eulychnia breviflora*, *Gymnocalycium chubutense*, *Frailea castanea (Frailea asterioides)* y *Matucana madisoniorum*. Stem discs taken from *in vitro* cultured plants were inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* A4 agropine-type strain that contains the wild RiA4 plasmid and the binary vector pESC4 with the *nptII* and *gus* genes. Hairy roots were produced directly from wounds, or starting from calli generated on the wounded surface, in four of the evaluated species, *Echinopsis ancistrophora*, *E.mirabilis*, *E. huotii subsp vallegrandensis*, y *Gymnocalycium chubutense*. The frequency of hairy roots formation, the number of roots per explant and its growth rates were variable among the tested species. In the four remaining species the production of transformed roots was not observed under the conditions used in these experiments. Histochemical detection of β -glucuronidase (GUS) activity demonstrated the expression of this foreign gene in the hairy roots. PCR analyses demonstrated the presence of the *rolB* and *nptII* genes in the DNA of the transformed roots.

INTRODUCCIÓN.

Se desarrollaron sistemas para la propagación *in vitro* a través de la activación areolas (yemas axilares) para *Echinopsis ancistrophora*, *Echinopsis mirabilis*, *Echinopsis huotii subsp vallegrandensis*, *Eriosyce aurata*, *Eulychnia breviflora* y *Gymnocalycium chubutense*. Como fuente de explantes se usaron plántulas germinadas *in vitro*.

Además se evaluó la susceptibilidad a *A. rhizogenes* en *Echinopsis ancistrophora*, *Echinopsis mirabilis*, *Echinopsis huotii subsp vallegrandensis*, *Eriosyce aurata*, *Eulychnia breviflora*, *Gymnocalycium chubutense*, *Frailea castanea (Frailea asteroides)* y *Matucana madisoniorum*. Los explantes fueron tomados de plantas cultivadas *in vitro* y fueron inoculados con *Agrobacterium rhizogenes* A4 cepa de tipo agropina que contiene el plásmido silvester RiA4 y el vector binario pESC4 con los genes *nptII* y *gus*.

La detección histoquímica de la actividad de la β - glucuronidasa (GUS) demostró la expresión de este gen extraño en las raíces peludas. Los análisis de PCR demostraron la presencia de los genes *rolB* y *nptII* en el ADN de las raíces transformadas.

1. MARCO TEÓRICO.

1.1 Cactáceas.

Las cactáceas son una familia muy grande de plantas sin hojas, de larga vida, tallos carnosos de diferentes formas y tamaños, sobre los que nacen agrupaciones de espinas. Una planta suculenta es capaz de almacenar agua para sobrevivir en un clima árido. Viven desde hace muchos años, en una variedad de hábitats, y tienen una amplia gama de formas desde simples y ramificados, hasta globosos y columnares, y algunos son esencialmente subterráneos. Suelen ser grandes, solitarios y coloridos, con numerosos segmentos que muestran una transición gradual de las brácteas de sépalos a pétalos, y cada flor es bisexual tanto con un pistilo y muchos estambres. Los cactus son las únicas plantas que poseen aréolas, una muy modificada yema lateral o brote enano que produce espinas y flores. Diversos en forma y tamaño, los cactus también han sido de gran importancia para los seres humanos que viven en las zonas áridas o regiones semiáridas del Hemisferio Occidental (Anderson, 2001).

Las Cactáceas habitan de forma natural sólo en América con una excepción, el cactus epifito *Rhipsalis baccifera*, que también se puede encontrar en el África tropical, Madagascar, en las islas del Océano Índico, y en Sri Lanka, a donde seguramente fue dispersado por aves. La gama de Cactus en América se encuentra desde Canadá hasta el extremo más meridional de América del Sur y se pueden encontrar en hábitats que varían extremadamente de desiertos secos a selvas exuberantes y tropicales. Esta amplia diversidad de hábitats ha resultado en muchas formas y tamaños de cactus. Aunque algunos cactus del desierto puede parecer materia muerta, sus flores son casi siempre de extraordinaria belleza (Anderson, 2001).

La familia Cactáceae comprende unas 2,000 especies de plantas principalmente en América Central y América del Sur, de las cuales alrededor de 715 especies de cactáceas existen en México, de éstas el 80% son endémicas (Retes-Pruneda, *et al.*, 2007).

Las cactáceas cumplen un papel muy importante en los aspectos ecológico, cultural, social, medicinal y económico, ya que algunos de sus frutos y tallos forman parte de la dieta de los pueblos indígenas de zonas áridas y semiáridas del continente; por otro lado, son utilizados como forraje, otras por su rareza y belleza como ornamentales las cuales llegan a tener costos elevados en Estados Unidos, Europa y Asia. Con respecto a sus propiedades curativas contienen sustancias químicas de interés farmacológico e industrial tales como alcaloides, saponinas y antibióticos (Anderson, 2001).

En cuanto al aspecto ecológico son plantas que se adaptan muy bien a suelos pobres en materia orgánica, durante el día cierran sus estomas para evitar la evapotranspiración, por la noche los abren para absorber la humedad del aire además tienen en sus raíces micorrizas capaces de fijar el nitrógeno del aire. En el plano social y cultural es importante señalar que esta diversidad ha sido alterada por la modificación de sus ecosistemas, poniendo a varias de ellas en serios problemas de sobrevivencia (Retes-Pruneda, *et al.*, 2007).

Entre los factores que afectan a las poblaciones silvestres se encuentran la ganadería, agricultura, asentamientos humanos, construcciones de vías de comunicación, materiales para construcción y la extracción ilegal de plantas para el comercio nacional e internacional. Por otro lado, los cactus poseen características ecológicas como sus distribuciones geográficas restringidas, ciclos de vida largos y tasas de crecimiento reducidas, que los hacen especialmente sensibles a las perturbaciones ambientales. Además, sus tasas de reproducción son también muy bajas, ya que muchas especies no se reproducen vegetativamente, y la producción de semillas es escasa debido a fenómenos como la autoincompatibilidad. Por su parte, las plántulas son muy susceptibles a las pudriciones causadas por hongos, a la depredación y a los factores ambientales adversos, lo que hace que sólo una proporción muy baja llegue al estado adulto. Esto ocasiona que el reclutamiento de nuevos individuos en las poblaciones sea mínimo (Retes-Pruneda, *et al.*, 2007).

1.2 Cactáceas sudamericanas.

En un rango de este a oeste, los cactus habitan en todo el subcontinente de Sur América. También exhiben un amplio rango altitudinal, desde *Opuntia galapageia* a nivel del mar hasta *Austrocyllindropuntia floccosa* a 4.500 m en los Andes. Los géneros tropicales *Harrisia*, *Hylocereus*, *Melocactus*, *Pereskia*, *Pilosocereus* y *Rhipsalis* se encuentran a través de las latitudes ecuatoriales (Anderson, 2001).

Uno de los dos centros principales de la diversidad de cactus es América del Sur, ocupa las zonas áridas y semiáridas del sudoeste de los Andes, que incluye partes de Perú, Bolivia, Chile, Argentina y el este de Brasil, incluye la vegetación catanga seca, la zona de campo rupestre rocoso y vegetación montañosa. Los géneros de cactáceas mejor representadas en este centro son la *Browningieae*, *Notocactaeae*, *Trichocereaeae*, *Cereaeae*, *Rhipsalideae* y *Hylocereaeae* (Anderson, 2001). Las comunidades con cactáceas se encuentran principalmente en las vertientes occidentales y valles profundos interiores de la Cordillera Andina. Los biotopos sobre los que se asientan son muy característicos por su escasa estabilidad, con ríos de fango, riadas de derrubios y desprendimientos (Strahler, 1992).

A continuación se describen las especies seleccionadas para el proyecto:

1.2.1 *Echinopsis ancistrophora*.

Son plantas solitarias o grupos de formación. Tallos globosos deprimidos, de color verde oscuro brillante, de 8 cm de diámetro. Costillas de quince a veinte, rectas, dividido en muchos tubérculos pequeños. Columna central única por lo general, rara vez hasta cuatro columnas, a veces ausente, curvada, marrón claro, de 2 cm de largo. Espinas radiales de tres a diez, flexibles, curvadas hacia atrás, de color blanquecino, de 1,5 cm de largo. Flores soportadas lateralmente, abiertas durante el día, de todos los colores, van de blancas, a veces con tinte rosáceo, hasta color rojo oscuro, sin perfume, de 12 a 16 cm de largo, tubos

florales delgados. Frutas oblongas, de color verde a morado-verdoso, secas, de 16 mm de largo y 8 mm de diámetro (Anderson, 2001).



Fig. 1: *Echinopsis ancistrophora*. Cactácea en su hábitat natural (Anderson, 2001).

Se distribuye desde el oeste de Argentina hasta el sur de Bolivia. Se reconocen cuatro subespecies de *Echinopsis ancistrophora*. La subespecie *ancistrophora* tienen flores de diversos colores, se encuentra desde el sur de Salta, Argentina, adyacente a la frontera sur de Bolivia. La subespecie *arachnacantha* se presenta más al norte en la región de Samaipata, Santa Cruz, Bolivia, es más pequeña, y tiene flores de color amarillo a amarillo-naranja. La subespecie *cardenasiana* se presenta en Tarija, Bolivia; y tiene flores de violeta-rosado a rojas. Subespecie *pojoensis* produce plantas más grandes con flores rojizas, sino crece cerca de Pojo, Cochabamba, Bolivia (Anderson, 2001).

Su estado de conservación según la Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable se encuentra como restringida, escasa y/o amenazada (SIB, 2010). Además según CITES (2013) lo registra con el nivel CITES II que corresponde a peligro moderado, comercio con limitaciones y controles locales.

1.2.2 *Echinopsis huotii* subsp. *Vallegrandensis*.

Las plantas son solitarias en un principio, después sufren una ramificación basal para formar pequeños acúmulos. Tienen tallos de globosos a cilíndricos, erectos, de color

verde oscuro, de 35 cm de alto y 8 cm de diámetro. De nueve a once costillas, con muescas, de 1,2 cm de alto. Aréolas de color blanco-amarillento. De una a cuatro espinas centrales, erguidas, en forma de punzón, color marrón, de 4 cm de largo. Espinas radiales de nueve a once, en forma de aguja, de 2 cm de largo. Flores blancas en posición lateral, de 17 a 20 cm de largo (Anderson, 2001).



Fig. 2: *Echinopsis huotii*. Fotografiado en la provincia de Vallegrande, Bolivia (Anderson, 2001).

Se encuentra principalmente en Bolivia. Se reconocen dos subespecies de *Echinopsis huotii*. Subespecie *huotii* tiende a ser cilíndrica, con cuatro espinas centrales. Subespecies *vallegrandensis* tiende a ser globosa, rara vez superior a 9 cm de altura, con sólo una espina central; que se limita a la provincia de Vallegrande (Anderson, 2001).

1.2.3 *Echinopsis mirabilis*.

Planta solitaria, cilíndrica, de color verde-amarillento sin brillo, de 12 a 15 cm de alto y 2 cm de diámetro. Con once costillas ligeramente onduladas. Con una columna central, erecta, recta, de 1 a 1.5 cm de largo. Espinas radiales de nueve a catorce, delgadas y rectas. Flores blancas, situadas cerca de las puntas de los tallos, estrechas con forma de

embudo, de 11 a 12 cm de largo. Frutas de 3.5 a 4 cm de largo y 5 a 6 cm de diámetro (Anderson, 2001).



Fig. 3: *Echinopsis mirabilis*. Cactácea producida por micropropagación *in vitro* (Uhlrig, 2005).

Se encuentra principalmente en Santiago del Estero, Argentina. Su hábitat es preferentemente debajo de arbustos en las praderas planas hasta la base de la montaña, a una altitud 500 - 1000 msnm (Anderson, 2001).

Según CITES (2013) lo registra con el nivel CITES II que corresponde a peligro moderado, comercio con limitaciones y controles locales.

1.2.4. *Eriosyce aurata*.

Son plantas de subglobosas a globosas, a veces alargadas, solitarias, de color verde, de 10 a 50 cm de diámetro, con puntas desnudas o poco lanosas en el tallo. Presentan raíces fibrosas. Areolas grandes y ovaladas, de 14 a 18 mm por 6 a 8 mm. Costillas de 24 a 42 o más aumentando con la edad, deprimidas entre areolas. Espinas como agujas curvadas hacia arriba, de color amarillento, algunas veces grisáceo. Espinas centrales de cuatro a ocho, fuertemente curvadas hacia arriba, de 25 a 45 mm de largo. Espinas radiales de doce a dieciséis, de 25 a 40 mm de largo. Flores numerosas, hasta 75 por corona, presentes en

areolas mayores, dispuestas en espirales, con forma de embudo, de color amarillo a rojizo, con un largo de 3-3,5 cm y 2,2 cm de diámetro; tiene tubos florales completamente cubiertos por lana densa y cerdas (Anderson, 2001). Frutos secos, alargados, cubiertos por lana y con el resto de la flor en el extremo superior. Semillas negras, de 1,9 a 2,9 por 1,3 a 2 mm (Kiesling *et al.*, 2008).



Fig. 4: *Eriosyce aurata*. Espécimen encontrado en la pre cordillera andina (Anderson, 2001).

Es endémica de la pre cordillera andina de Chile, se distribuye desde el norte de Santiago hasta justo por encima de Copiapó, Atacama y Valparaíso (Anderson, 2001). Sus preferencias de hábitat son en laderas rocosas en la pre cordillera andina con una marcada preferencia por exposiciones soleadas, en forma discontinua a través de su distribución.

Sus principales amenazas actuales y potenciales son por cosecha, pérdida o degradación de su hábitat por causas antrópicas y su colecta por parte de coleccionistas. Además esta especie tiene muy baja regeneración natural, debido principalmente a la extrema sensibilidad de la plántula a la sequía y a su depredación por insectos y otros animales. Su estado actual de conservación se debe, en parte, a que es usada para alimentar al ganado doméstico. En épocas de falta de forraje, cosa usual en la región, individuos muy antiguos son cortados por la mitad y ofrecidos al ganado. En algunas comunidades hacen dulce de “sandillón” causando un gran daño a las poblaciones locales. También es común observar ejemplares de esta especie en jardines. Ellos han sido extraídos de la naturaleza y

sólo vivirán unos pocos meses fuera de su hábitat. Por último, sus semillas son colectadas y vendidas al extranjero Su estado de conservación vigente en Chile para esta especie está en vulnerable (Kiesling *et al.*, 2008). Además según CITES (2013) lo registra con el nivel CITES II que corresponde a peligro moderado, comercio con limitaciones y controles locales.

1.2.5 *Eulychnia breviflora*.

Plantas arbóreas, de 3 a 7 m de altura, muy ramificado desde la base, a menudo con troncos cortos bien desarrollados, de tallo casi erecto de 8 a 11 cm de diámetro, de color gris o verde oscuro. Costillas de diez a diecisiete, algo tuberculados, a veces surcada entre areolas. Sus aréolas se encuentran muy juntas, con lana gruesa y pelos. Espinas de 10 a 30, a menudo pobremente diferenciadas como centrales y radiales, de color marrón, convirtiéndose en gris con la edad. Espinas centrales de una a dos, erectas y robustas, de 10 a 20 cm de largo. Espinas radiales de diez a veinte, de 1,8 cm de largo, divergentes. Flores rosa pálido o blanco, de 5 a 7 cm de largo; aréolas de tubos florales y pericarpelos sin cerdas duras, cubiertos de escamas angostas y areolas con fieltro oscuro y largos pelos amarillentos, lanosos y crespos, que cubren totalmente el exterior de la flor (Anderson, 2001). Frutos globosos y carnosos, ácidos, de 5 a 6 cm de diámetro (Kiesling *et al.*, 2008).

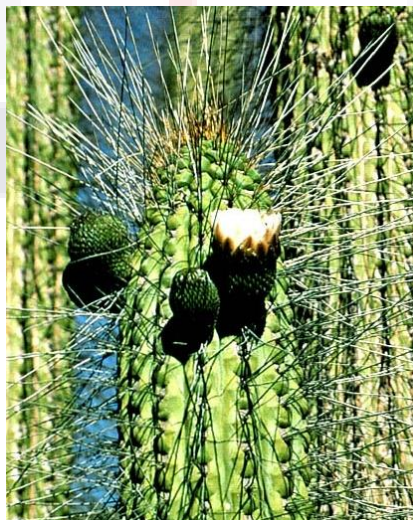


Fig. 5: *Eulychnia breviflora*. Fotografiado en la costa norte de Chile (Anderson, 2001).

Especie endémica de Chile, se distribuye a lo largo de la costa norte (Anderson, 2001), desde el sur de La Serena en la Región de Coquimbo hasta las cercanías de Tal-Tal en la Región de Antofagasta. Sus preferencias de hábitat son terrazas y laderas rocosas de exposición norte y oeste, en ambientes costeros y litorales en la zona norte, y ocasionalmente en ambientes arenosos (Squeo *et al.*, 2008).

Sus principales amenazas actuales y potenciales: Dentro de su amplia distribución latitudinal se desarrollan diversas actividades antrópicas que pueden afectar su hábitat, como caminos costeros, centrales eléctricas y construcción de cercos, además de que es parasitado por *Tristerix aphyllus* (Squeo *et al.*, 2008).

Según CITES (2013) lo registra con el nivel CITES II que corresponde a peligro moderado, comercio con limitaciones y controles locales.

1.2.6 *Frailea castanea (Frailea asteroides)*.

Planta solitaria, globosa deprimida, de color rojizo oscuro a marrón chocolate, en ocasiones de azul-verde a gris-verde, de 4 cm de alto y de 3 a 5 cm de diámetro. Tuberculosa de raíces cónicas. De ocho a catorce costillas bajas y convexas poco visibles. Con areolas pequeñas. De tres a once espinas de color marrón oscuro, aplanadas contra la superficie del vástago y apuntando hacia el suelo, de 0.5 a 1.5 mm de largo. Flores bastante grandes de color amarillo pálido, de 4 cm de largo. Fruta verde amarillenta. Se reproduce por semillas con proceso fácil, crecimiento rápido y floración precoz (Gómez, 2006).



Fig. 6. *Frailea castanea*. Cactácea en su hábitat natural a ras del suelo (Anderson, 2001).

Se distribuye principalmente en el sur de Brasil y norte de Uruguay (Anderson, 2001), aunque también se encuentra en Paraguay. En su hábitat crece a ras del suelo, en planicies herbáceas, enterrándose en la estación seca (Gómez, 2006).

Según CITES (2013) lo registra con el nivel CITES II que corresponde a peligro moderado, comercio con limitaciones y controles locales.

1.2.7 *Gymnocalycium chubutense* (*Echinocactus gibbosus* var. *chubutense* Spegazzini 1902).

Las plantas de *Gymnocalycium chubutense* son generalmente solitarias, globosas de tallos simples, pocas veces columnares, de color oscuro azul-verde, de 12 a 15 cm de alto y 10 a 12 cm de diámetro, de doce a diecinueve costillas interrumpidas por surcos transversales y con una giba grande angulosa, claramente dentada. Espinas centrales de una a tres, a menudo ausentes, de color pardo claro a casi negro, rectas y rígidas, con un largo de 3,5 cm. Espinas radiales de siete a quince, semejantes a las centrales. Producen flores blancas o a veces rojizas, acampanadas, de 6 cm de largo (Anderson, 2001). Con frutas de

varias formas, de color verde oscuro, de 5 a 8 cm de longitud, ovoides. Semillas negras, de 1,5 cm de diámetro, acampanadas, con hilo basal oval, testa verrugosa, con la cutícula parcialmente desprendida (Kiesling, 2003).



Fig. 7. *Gymnocalycium chubutense*. Fotografía que muestra la anatomía de la planta (Anderson, 2001).

Su distribución es generalizada en el sur de Argentina en altitudes de 10 a 450 metros sobre el nivel del mar, desde San Luis, Mendoza, S de La Pampa y Buenos Aires hasta Neuquén, Río Negro y Chubut, se encuentran especialmente en Trelew, Chubut, Península de Valdés, Argentina a una altitud de 120 metros (Anderson, 2001). Crece entre los matorrales y piedras bajo un clima semi-árido caracterizado por una precipitación anual de 240 mm (Hunt, 2006). En su amplia distribución presenta numerosas variaciones, lo que dio origen a muchos nombres específicos y varietales (Kiesling, 2003).

Son plantas comunes, aunque no abundantes en una o más regiones, según la Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable se encuentra en la lista roja preliminar de las plantas endémicas de la Argentina (SIB, 2010). Además según CITES (2013) lo registra con el nivel CITES II que corresponde a peligro moderado, comercio con limitaciones y controles locales.

1.2.8 *Matucana madisoniorum* (*Borzicactus madisoniorum* Hutchison 1963, *Submatucana madisoniorum* Backeberg 1966, *Loxanthocereus madisoniorum* Buxbaum 1974, *Eomatucana madisoniorum* F. Ritter 1981).

Plantas generalmente solitarias, a veces ramificadas basalmente. De tallos aplanados globosos a anchos columnares, sin brillo de color gris verdoso, de 15 cm de altura y 10 cm de diámetro. Costillas de siete a doce, grandes, planas y acanaladuras transversales. De cero a cinco espinas de color marrón-negruzco, convirtiéndose en gris con la edad, curvadas, flexibles y fácilmente desmontables, de 30 mm de largo. Flores con forma estrecha de embudo, de color rojo anaranjado, de 10.8 cm de largo y 4-5 cm de diámetro. De frutos globosos, peludos, de 2 cm de diámetro, de colores rojo, naranja y blanco, florece en varias oleadas durante todo el verano.



Fig. 8. *Matucana madisoniorum*. En su estado libre (izquierda) y producido por micropropagación *in vitro* (derecha) (Anderson, 2001).

Es endémica de Amazonas en Perú, se distribuye al noreste de Bagua, Amazonas, Perú, en las elevaciones de 400-1000 msnm (Anderson, 2001).

Según CITES (2013) lo registra con el nivel CITES II que corresponde a peligro moderado, comercio con limitaciones y controles locales, aunque *Matucana madisoniorum* se ha recogido en gran medida y tiene una distribución muy limitada, y su supervivencia a largo plazo está en duda (Anderson, 2001).

1.3 Metabolitos de interés que producen las cactáceas.

La familia Cactácea se caracteriza por poseer un gran número de metabolitos secundarios, una de las características más distintivas es que contienen alcaloides y pigmentos (compuestos nitrogenados) como lo son las betalaínas (betacianinas y betaxantinas). Por ejemplo, se sabe que *Lophophora williamsii* tiene más de 50 alcaloides diferentes con fenetilaminas y tetrahidroisoquinolinas presentes. Los triterpenos, esteroides y esteroides también se producen en la familia (Anderson, 2001).

La utilización de los compuestos secundarios ha estado limitada debido al lento crecimiento que presentan las plantas productoras; por ejemplo, las especies de *Coptis* requieren cinco a seis años de desarrollo antes que puedan utilizarse para la extracción de berberina. De igual forma, para aislar la shikonina de las raíces de *Lithospermum erythrorhizon*, la planta necesita crecer de cinco a siete años para que este metabolito represente el 1 a 2 % de la biomasa, concentración necesaria para hacer factible y económicamente viable la extracción del pigmento. Asimismo, se requiere esperar hasta veinte años para que de la corteza del árbol *Cinchona ledgeriana* se puedan extraer niveles apropiados de quinina (Pérez-Molphe-Balch, *et al.*, 1999).

Otro de los factores que limitan la producción de metabolitos secundarios es que una gran cantidad de ellos son generados por las plantas en muy bajas concentraciones (0.0005 % del peso seco), lo que ocasiona que sea indispensable procesar grandes cantidades del material vegetal para aislar pocos gramos o algunos cuantos miligramos del metabolito buscado. Un problema adicional que se presenta para la producción de compuestos naturales de plantas es que algunos metabolitos secundarios tienen una distribución taxonómica tan estrecha o específica que hace que sólo se puedan obtener de una o de un número muy limitado de especies, muchas de las cuales no han sido domesticadas, por lo que se depende de poblaciones silvestres no siempre abundantes o accesibles. Lo anterior hace que estos productos alcancen precios considerables. Dado el interés económico y científico que ofrecen estos compuestos secundarios, y considerando la

gran variabilidad en el abasto del material vegetal para efectuar la extracción de ellos, desde hace ya algún tiempo una cantidad considerable de empresarios, industriales y científicos relacionados con esta área, se han dedicado a explorar formas alternativas para la producción de compuestos naturales de plantas.

Entre esas opciones, el uso del cultivo de células, tejidos y órganos vegetales *in vitro* en condiciones asépticas ha tenido gran aceptación (Pérez-Molphe-Balch, *et al.*, 2012). El cultivo de tejidos se ha utilizado para obtener un gran número de metabolitos secundarios. Entre los metabolitos secundarios más estudiados se encuentran las antocianinas y las betalaínas (betacianinas (rojas) y betaxantinas (amarillas)). La acumulación de betalaínas se ha descrito en *Beta vulgaris*, *Amaranthus*, y *Myrtillocactus geometrizans* (Santos, *et al.*, 2005).

Tabla 1. Sistemas eficientes de producción *in vitro* de metabolitos secundarios tomado de (Pérez-Molphe-Balch, *et al.*, 1999).

ESPECIE	METABOLITO	A	B	A/B
<i>Dioscorea deltoidea</i>	diosgenina	2	2	1
<i>Coffea arabica</i>	cafeína	1.6	1.6	1
<i>Coptis japonica</i>	berberina	7	7	1
<i>Macleaya cordata</i>	protopina	0.4	0.32	1.25
<i>Catharanthus roseus</i>	ajmalicina	1	0.3	3
<i>Coleus blumei</i>	ac. rosmarínico	15	3.6	5
<i>Panax ginseng</i>	ginsenosidos	27	4.5	6
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	chiconina	14	1.5	9.3
<i>Morinda citrifolia</i>	antraquinonas	18	2.5	8
<i>Nicotiana tabacum</i>	nicotina	2.5	0.7	3.6
<i>Nicotiana tabacum</i>	ubiquinona 10	0.18	0.003	60
<i>Cassia tora</i>	antraquinonas	6	0.6	10
<i>Catharanthus roseus</i>	catarantina	0.24	0.002	77

1.4 Cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos en su más amplia acepción puede ser definido como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (protoplastos, células, tejidos u órganos) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. Generalmente es común dividir las técnicas del cultivo de tejidos en dos grandes grupos: a) cultivos en medios semisólidos y b) cultivos en medios líquidos. Para el establecimiento de los cultivos utilizando cualquiera de los sistemas es necesario tener en cuenta algunos aspectos generales comunes relacionados con el explante, la asepsia, el medio de cultivo y las condiciones de incubación (Levitus, *et al.*, 2010).

1.5 Medios de cultivo.

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre seis y cuarenta compuestos. Básicamente, suministran: una fuente de carbono, minerales, vitamínicas, reguladores del crecimiento y un agente gelificante (en el caso de medios semisólidos) (Levitus, *et al.*, 2010).

1.6 Micropropagación.

La micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Dependiendo de las características de la planta y del objetivo perseguido, puede realizarse a través de tres vías: brotación de yemas adventicias, producción de yemas *de novo* y embriogénesis somática (Levitus, *et al.*, 2010).

La micropropagación presenta cuatro etapas principales: 1) establecimiento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación de vástagos o embriones, 3) enraizamiento y 4) aclimatación de las plántulas. En algunos casos tiene importancia considerar una etapa

previa (Etapa 0) que es la etapa de preparación de los explantes para el establecimiento (Levitus, *et al.*, 2010).

1.7 Métodos de transformación genética.

Estos métodos pueden dividirse en:

a) Transformación indirecta, mediada por el uso de vectores biológicos (*Agrobacterium*, virus) o liposomas que participan del proceso de transferencia.

b) Transformación genética directa, métodos físicos mediante los cuales, por distintos mecanismos no biológicos se induce la permeabilidad de la célula al ADN (mediante electroporación, agentes químicos, microláser, microinyección, ultrasonidos o bombardeo) para que se introduzca a la célula (Levitus, *et al.*, 2010).

La pared celular constituye un obstáculo para la entrada del ADN a la célula vegetal que todos los métodos de transformación genética tienen que superar de algún modo. La técnica elegida por el investigador es un factor muy importante para el correcto desarrollo de la transformación.

1.7.1. Transformación mediada por *Agrobacterium*.

Quizás la técnica más versátil y ampliamente utilizada es la transformación mediada por *Agrobacterium*. El descubrimiento de la capacidad de *Agrobacterium* de introducir ADN en células vegetales supuso una revolución en la transformación ya que constituye uno de los sistemas más efectivos para introducir material genético en plantas (Levitus, *et al.*, 2010).

Las bacterias del género *Agrobacterium* son Gram-negativas, aeróbicas obligadas y viven en el suelo. Ellas son capaces de desarrollar un crecimiento saprofítico o parasítico. El género comprende cuatro especies fitopatogénicas, dos de ellas ampliamente estudiadas (*A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*). Ambas especies son capaces de infectar una amplia variedad de especies de dicotiledóneas. La patogénesis se inicia a partir de heridas, provocando la proliferación de las células individuales infectadas. El sistema mediado por

A. tumefaciens es el más estudiado y utilizado en la transformación de plantas (Levitus, *et al.*, 2010).

Así, *A. tumefaciens* causa tumores, enfermedad que se conoce como ‘agalla de la corona’ y *A. rhizogenes* induce la proliferación de raíces dando lugar a la enfermedad denominada ‘raíz en cabellera’ (Levitus, *et al.*, 2010).

La virulencia de las distintas cepas de *Agrobacterium* es diferente en cada especie, e incluso en distintas variedades. Experimentos de inoculación preliminares deberían ser realizados para comprobar la compatibilidad entre la especie hospedadora y la estirpe de *Agrobacterium* antes de llevar a cabo la transformación (Cervera *et al.*, 1998).

Al realizar un análisis del método de transformación cabe destacar dos aspectos actualmente en desarrollo, por un lado, continúa el interés en extender el uso de la transformación mediada por *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* a especies que no son hospedantes naturales de la bacteria. Por otro lado, los métodos de transformación genética actualmente en uso requieren de genotipos con una excelente respuesta al cultivo *in vitro*, lo cual resulta en una clara limitación cuando se desea aplicar esta tecnología a los materiales usados por los mejoradores, los que generalmente no poseen esta característica (Levitus, *et al.*, 2010).

La capacidad patogénica de estas bacterias está asociada a la presencia de megaplásmidos (150-200 kilopares de bases o Kb) llamados Ti (por ‘tumor-inducing’ o inductor de tumores) y Ri (por ‘root-inducing’ o inductor de raíces) respectivamente. El T-ADN contiene genes, llamados oncogenes, que se expresan eficientemente en la célula vegetal infectada y producen síntesis de hormonas vegetales, responsables de la proliferación anormal del tejido además de los cambios metabólicos y también los genes responsables de la transferencia y posterior inserción del ADN. Además, contiene los genes responsables de la síntesis de opinas (fuente de carbono y nitrógeno para la bacteria) (Levitus, *et al.*, 2010). Este ADN-T está delimitado por unos bordes de 25 nucleótidos que son las secuencias reconocidas por la maquinaria de transferencia (Fig. 2).

1.7.2 Genes marcadores.

En un ensayo de transformación son muy pocas las células que llegan a ser transformadas. Con los genes marcadores es posible reconocer y seleccionar las células que han sido transformadas (Miki y McHugh, 2004). Los genes marcadores se introducen junto al gen quimérico que queremos expresar en la planta. Hay dos tipos de marcadores, de selección e informadores.

1.7.3 Genes de selección.

Confieren ventaja a las células transformadas frente a las no transformadas en un medio selectivo. El agente selectivo suele ser un antibiótico o un herbicida. Dentro de estos genes el más utilizado, es el gen de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) que confiere resistencia frente a antibióticos de la familia de los aminoglicósidos, como la kanamicina (Dolgov y Firsov, 1999). Son pocas las ocasiones en que se ha utilizado el gen de resistencia a higromicina (*hpt*) (Dolgov y Firsov, 1999) o el gen de resistencia al herbicida 'basta' (Druart *et al.*, 1998).

1.7.4 Genes reporteros.

Dan a la célula que ha incorporado el gen una característica que la hace distinguible de las demás. Suelen ser genes que codifican para enzimas que actúan sobre sustratos cromogénicos, fluorogénicos o emisores de fotones, de tal manera que cuando añadimos el sustrato al medio podemos identificar las células transformadas visualmente. El más usual es el gen de la β -glucuronidasa (*uidA* o *gusA*), aislado de *E. coli.*, que hidroliza β -glucurónidos (Vancanneyt *et al.*, 1990); utilizando el sustrato apropiado aparece un precipitado azul sobre las células transformadas.

1.8 Transformación mediada por *A. rhizogenes*.

El desarrollo de la patogénesis causada por *A. rhizogenes* representa una situación única en la naturaleza: la transferencia de un elemento genético (T-ADN) de un organismo procariota a un organismo eucariota superior, con su subsiguiente integración y expresión en el genoma hospedante (Levitus, *et al.*, 2010).

A. rhizogenes contiene un plásmido, llamado Ri, que induce la formación de raíces por lo que su utilización con especies leñosas difíciles de enraizar es de gran interés. Los genes implicados en esta inducción son *rol A*, *rol B* y *rol C*, situados en el ADN-T de *A. rhizogenes*, siendo *rol B* el que parece ser más importante en el proceso de enraizamiento. En el caso de transformación mediada por *A. rhizogenes* se suele utilizar el plásmido Ri sin desarmar y, además, se introduce otro plásmido con los genes foráneos entre los bordes reconocidos por la maquinaria de transferencia. En este caso la región *vir* actúa tanto en *cis* como en *trans*, es decir, a la célula vegetal son transferidos tanto el ADN-T de *A. rhizogenes* como los genes quiméricos. El gen bacteriano *ipt*, situado en el ADN-T, está implicado en la síntesis de citoquininas. Provoca un aumento en los niveles endógenos de citoquininas y reduce la dominancia apical, haciendo que la planta tenga un aspecto más achaparrado. Esto da la posibilidad de obtener árboles más pequeños, más ramificados y con igual o mayor producción frutícola, optimizando así la relación producción-superficie cultivada. Este gen ya ha sido introducido en melocotonero con buenos resultados (Smigocki y Hammerschlag, 1991).

Un aspecto destacable de esta bacteria es que usa la respuesta de la planta a las heridas (cicatrización y defensa) como quimioatractivo y activador del proceso de patogénesis. Luego de la adhesión de la bacteria a la célula vegetal, etapa en la que están involucrados genes cromosómicos bacterianos (*chv A*, *chv B*, *chv E*, *cel*, *psc A* y *att*), se produce el procesamiento y la transferencia del T-ADN, mediados por los genes *vir* (por virulencia) que son inducidos por azúcares y compuestos fenólicos producidos por las células vegetales heridas (Levitus, *et al.*, 2010).

Además de los genes bacterianos incluidos en el plásmido, para que la bacteria sea capaz de infectar las células vegetales, son necesarios determinados genes cromosómicos de virulencia *chv*, implicados tanto en el movimiento quimiotáctico bacteriano como en la unión de la bacteria a receptores específicos de la célula vegetal (Fig. 10).

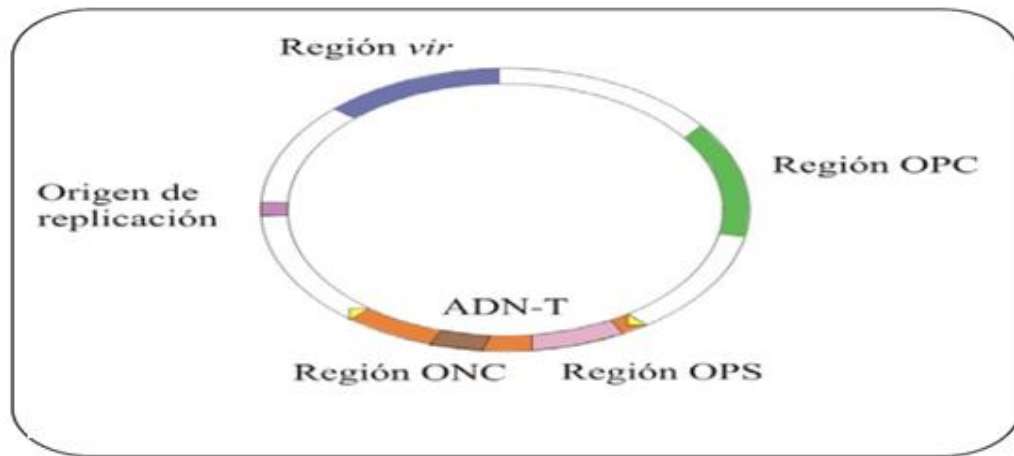


Fig. 9.- Esquema del plásmido Rt de *Agrobacterium tumefaciens* tomado de (Levitus, *et al.*, 2010).

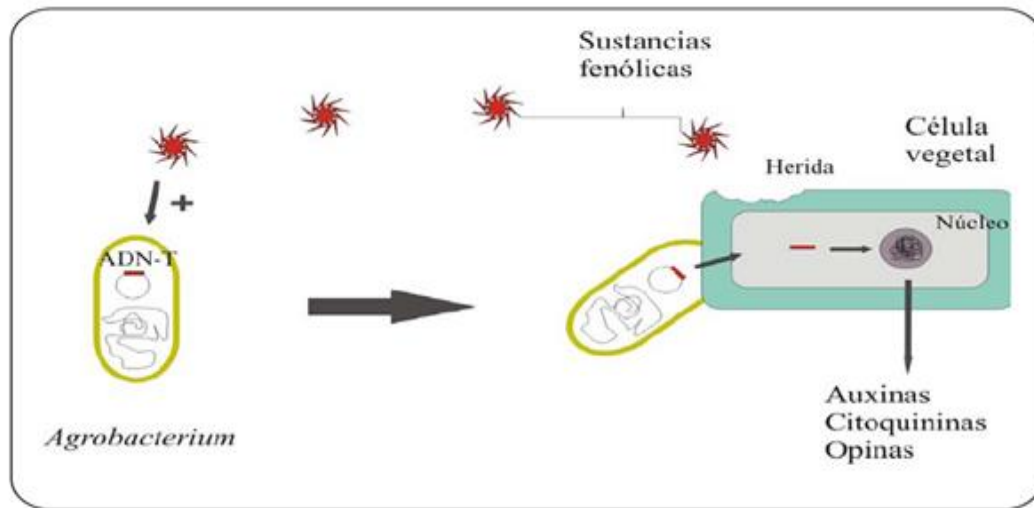


Fig. 10.- Infección por *Agrobacterium*. Las sustancias fenólicas liberadas por la planta activan la maquinaria de transferencia tomado de (Levitus, *et al.*, 2010).

Desafortunadamente, este sistema presenta varios inconvenientes. Uno es que el rango de huéspedes es más limitado que en *A. tumefaciens* y otro es que la expresión de los genes del ADN-T en las plantas confiere fenotipos aberrantes a las mismas. Para solucionar este tipo de problemas se ha introducido el gen *rol B* en un vector binario de *A. tumefaciens* (Rugini y Mariotti, 1991).

En cactáceas se ha trabajado principalmente con *Agrobacterium tumefaciens*, aunque puntualmente también se ha utilizado *Agrobacterium rhizogenes* y biolística. No ha sido descrito el uso de otras técnicas de transformación en esta familia (Levitus, *et al.*, 2010).

Pérez Molphe *et al.* (2012) reportaron la infección *in vitro* con *Agrobacterium rhizogenes* A4 de 112 especies de cactáceas. Los géneros en los que fue posible obtener raíces transformadas fueron *Acharagma*, *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Browningia*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Echinomastus*, *Epithelantha*, *Escobaria*, *Ferocactus*, *Frailea*, *Hylocereus*, *Isolatocereus*, *Leuchtenbergia*, *Mammillaria*, *Mammilloidya*, *Matucana*, *Melocactus*, *Myrtillocactus*, *Neobuxbaumia*, *Pelecypora*, *Pilosocereus*, *Polaskia*, *Selenicereus*, *Stenocereus*, *Thelocactus* y *Turbiniacarpus*.

1.9 Cultivo *in vitro* de raíces.

White (1934), cultivó exitosamente apices aislados de raíces de tomate, siendo uno de los importantes logros dentro del cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo *in vitro* de raíces, es un modelo de gran interés para el estudio de los procesos metabólicos que se llevan a cabo en estos órganos y que se relacionan con el metabolismo de carbohidratos, síntesis de vitaminas, síntesis de reguladores del crecimiento, producción de metabolitos secundarios, absorción y translocación de nutrientes, así como también se han utilizado en cocultivo, para poder ver su interacción con microorganismos como virus, *Rhizobium*, nematodos y micorrizas, además de en raíces

transformadas por *A. rhizogenes* (Toivonen, 1993; Bécard y Piché, 1990; Oksman et al., 1994; Boisson-Dernier et al., 2001).

La respuesta de las raíces de cultivo *in vitro*, varía dependiendo del genotipo, medio de cultivo y condiciones de incubación, así como del tiempo en que las raíces pueden ser mantenidas creciendo (Oksman, *et al.*, 1994). Con respecto a lo anterior se definen tres grupos de especies (Pérez-Molphe y Alejo-Ochoa, 1998):

- 1) Raíces que pueden desarrollarse indefinidamente *in vitro*, las cuales requieren únicamente del medio adecuado y de los subcultivos apropiados. Las raíces de tomate, clavo y datura, así como otras especies muestran este comportamiento.
- 2) Raíces que crecen y se desarrollan *in vitro*, durante periodos variables de tiempo, pero que no se ha logrado que lo hagan de manera indefinida, por lo tarde o temprano, se presenta una disminución paulatina en la tasa de crecimiento, se inhiben la formación de raíces laterales y el cultivo finalmente muere. Este comportamiento se ha visto en raíces de chícharo y trigo.
- 3) Raíces que hasta el momento, no se ha logrado se desarrollan *in vitro*, ni siquiera por periodos limitados de tiempo. A este grupo pertenecen la mayoría de las especies leñosas. Algunas raíces leñosas, como el limón se han podido desarrollar indefinidamente *in vitro*, a través de su transformación genética con *A. rhizogenes*.

Actualmente se pueden tener dos clases de raíces de cultivo: 1) raíces normales las cuales se mantienen durante la adición de un medio adecuado y auxinas, 2) raíces transformadas las cuales tan solo requieren del medio adecuado, y no requieren de la aplicación exógena de auxinas. Estas últimas se obtienen mediante la transformación de cualquier tejido vegetal, al ser infectados con la bacteria fitopatógena *A. rhizogenes*, esta integra un inductor del enraizamiento en el genoma del tejido vegetal infectado (Chilton *et al.*, 1982; Legue et al., 1996). Esta técnica requiere el desarrollo previo de una metodología de regeneración *in vitro* de la especie vegetal que se desee transformar genéticamente.

El cultivo *in vitro* de raíces para la producción de metabolitos secundarios ha adquirido gran interés en los últimos años (Tabla 1). Esto se debe al redescubrimiento de las raíces no solo por sus funciones tradicionales como soporte mecánico y captación de agua y sales, sino también como fuente importante de productos químicos que luego son traslocados al resto de la planta.

El estudio y producción de metabolitos secundarios se comenzaron a utilizar hace cuarenta años; estos sistemas generalmente obtenidos a través de un balance hormonal en el medio de cultivo, son difíciles de establecer, y además las raíces presentan un crecimiento lento. Este inconveniente pudo ser solucionado por medio del cultivo de raíces transformadas, obtenidas a través de la infección con cepas patogénicas de *A. rhizogenes* (Talou, *et al.*, 1994).

Las cactáceas tienen la capacidad de sintetizar y acumular una gran diversidad de metabolitos como alcaloides, terpenos, esteroides y betalainas. Sin embargo, en la mayoría de los casos aún no han sido estudiados ni se han aprovechado. Esto se debe en gran medida al tamaño pequeño, lento crecimiento y la amenaza de extinción que hay sobre muchas especies, factores que dificultan el acceso a un suministro continuo y suficiente de tejido vegetal para la extracción de estos compuestos (Pérez-Molphe-Balch, *et al.*, 2012).

La generación y cultivo de raíces transformadas de estas especies puede ser una alternativa muy eficiente para disponer de una fuente de biomasa a partir de la cual puedan obtenerse metabolitos de interés sin necesidad de coleccionar y sacrificar plantas. Para que esto sea factible, es necesario conocer las condiciones adecuadas para que los cultivos se mantengan vivos por tiempo indefinido, y con altas tasas de generación de biomasa (Pérez-Molphe-Balch, *et al.*, 2012).

Además, una estrategia que actualmente se utiliza para incrementar la producción de metabolitos secundarios vegetales, es la utilización de cultivos de raíces transformadas con *A. rhizogenes* (Nieto, *et al.*, 2005).

Tabla 2. Producción de Metabolitos secundarios en cultivos de raíces transgénicas (tomado de Benítez, 2005).

ESPECIE VEGETAL	METABOLITO SECUNDARIO
<i>Aconitum heterophyllum</i>	Acónitos
<i>Ajuga replansvar. Atropurpurea</i>	Fitoecdisteroides
<i>Ambrosia spp.</i>	Poliacetilenos y tiofenos
<i>Amsonia elliptica</i>	Alcaloidesindolicos
<i>Anisodus luridus</i>	Alcaloides tropánicos
<i>Armoracial laphthifolia</i>	Peroxidasa, isoperoxidasa, fusicoccina
<i>Artemisia absinthum</i>	Aceites esenciales
<i>Artemisia annua</i>	Artemisinina
<i>Astragalus mongholicus</i>	Saponina de cicloartanos
<i>Atropa belladonna</i>	Atropina
<i>Azadirachta indica</i>	Azadirachtina
<i>Beta vulgaris</i>	Pigmentos de betalaína
<i>Bidens spp.</i>	Poliacetilenos y tiofenos
<i>Brugmansia candida</i>	Alcaliodestropánicos
<i>Calystegia sepium</i>	Cuscohigrina
<i>Campánula médium</i>	Poliacetilenos
<i>Carthamus sp.</i>	Tiofenos
<i>Cassia obtusifolia</i>	Antraquinona, pigmentos polipeptidicos
<i>Catharanthus roscus</i>	Alcaloides indolicos, ajmalicina
<i>Catharanthus tricophyllus</i>	Alcaloides indolicos
<i>Centranthus ruber</i>	Valepotriatos
<i>Chaenatisdo uglasis</i>	Tiarrubrinias
<i>Cinchonaledgeriana</i>	Quinina
<i>Colcuforskohlii</i>	Forskolina
<i>Coreopsis sp.</i>	Poliacetileno
<i>Datura candida</i>	Escopolamina, hiosciamina
<i>Datura stramonium</i>	Hiosciamina, sesquiterpenos
<i>Daucus carota</i>	Flavonoides, antocianina
<i>Digitalis purpurea</i>	Glucósidos cardioactivos
<i>Duboisia leichhardtii</i>	Escopolamina
<i>Duboisia myoporoides</i>	Escopolamina
<i>Echinacea purpurea</i>	Alcamidas.
<i>Fagra zanthoxylids</i>	Benzofenatridina, furoquino
<i>Fagopyrum sp.</i>	Flavanol
<i>Fragaria sp.</i>	Polifenol
<i>Geranium thubergee</i>	Taninos
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Flavonoides
<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	Saponina
<i>Hyoseyamus albus</i>	Alcaloides tropánicos
<i>Hyoseyamus muticus</i>	Alcaloides tropánicos
<i>Lactuca virosa</i>	Lactonas de sesquiterpenos
<i>Leontopodium alpinum</i>	Antocianinas y aceites esenciales
<i>Linum flavum</i>	Lignanos
<i>Lippia dulcis</i>	Sesquiterpenos
<i>Lithospermun erythorhrizon</i>	Shikonina, benzoquinona

1.9.1 Antecedentes del cultivo de raíces transformadas.

A. rhizogenes se ha utilizado para una cantidad importante y variada de funciones, introducir genes en raíces de resistencia a nematodos en caña de azúcar (Cai, 2003), producir raíces capaces de remover uranio de soluciones acuosas (Eapen *et al.*, 2003), inducir un mejor enraizamiento en las plantas transformadas (Gutiérrez-Pesce *et al.*, 1998), transformar *Agave salmiana* para resolver la lenta reproducción y crecimiento (Tempe, 1989; Lambert, *et al.*, 1992), micropropagar y transformar la papita de campo (Reyes *et al.*, 2008), toronja y lima dulce (Pérez Molphe y Serna Pérez, 2004), transformar especies con dificultades en el enraizamiento, son solo algunas de las más relevantes.

A. rhizogenes ha sido utilizado para la formación e incremento de pelos radicales que han sido apropiados para la producción de metabolitos secundarios por su estabilidad y alta producción. Entre los metabolitos secundarios producidos en raíces transformadas se encuentran terpenoides (Ayadi y Tremouillaux-Guiller, 2003) hiosciamina y escopolamina (Moyano *et al.*, 2003). Los cultivos de raíces transformadas son una fuente potencial de compuestos farmacéuticos (Sevon y Oksman-Caldentey., 2002).

Nieto *et al.* (2005) reportó la obtención de raíces transformadas genéticamente de *Solanum chrysotrichum* utilizando cepas de *A. rhizogenes* para la obtención de saponinas bioactivas.

Se han establecido cultivos de raíces transformadas de *Solanum eleagnifolium Cav.* y *Tagetes laxa Cabrera*. *Solanum eleagnifolium Cav.* es una especie nativa productora de solasodina, presente en la planta como el glucósido solamargina; *Tagetes laxa Cabrera* es una especie productora de tiofenos. Por ser estas moléculas fácilmente degradadas es una alternativa eficaz para remplazar a los insecticidas usados en la actualidad (Talou, *et al.*, 1994).

2. JUSTIFICACIÓN.

El estudio y producción de metabolitos secundarios *in vitro* se comenzaron a hacer hace cuarenta años; estos sistemas generalmente son obtenidos a través de un balance de reguladores de crecimiento vegetal en el medio de cultivo, sin embargo presentan varias dificultades, tales como: son difíciles de establecer, los tejidos cultivados presentan un crecimiento lento, además de que una gran cantidad de los metabolitos secundarios son generados en muy bajas concentraciones, lo que ocasiona que sea indispensable procesar grandes cantidades del material vegetal para aislar el metabolito buscado. Muchos de estos inconvenientes son superados cuando se utilizan cultivos de raíces transformadas. La familia Cactáceae se caracteriza por sintetizar un gran número metabolitos secundarios. Uno de los dos centros principales de la diversidad de las cactáceas es América del Sur, estas comunidades de cactáceas se encuentran poco estudiadas y algunas de ellas se encuentran en peligro de extinción. Es importante señalar que esta diversidad ha sido alterada por la modificación de sus ecosistemas y por la extracción ilegal de plantas para el comercio nacional e internacional. Actualmente no existen protocolos para la propagación *in vitro* ni para la generación de raíces transformadas de muchas de estas especies de gran interés. Por lo anterior, este trabajo pretendió desarrollar sistemas para propagar *in vitro* y generar raíces transformadas de varias especies de cactáceas originarias de América del Sur.

Estos inconvenientes actualmente son solucionados por medios de cultivos de raíces transformadas obtenidas a través de la infección con cepas patogénicas de *A. rhizogenes*.

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general.

Propagar *in vitro* y generar líneas de raíces transformadas de algunas especies de cactáceas nativas de América del Sur.

3.2 Objetivos específicos.

- Establecer y propagar *in vitro* material vegetal de las especies seleccionadas para el proyecto.
- Inducir raíces transformadas en explantes a través del cocultivo con *Agrobacterium rhizogenes*.
- Mantener y propagar las raíces transformadas obtenidas.
- Demostrar la naturaleza transgénica de las raíces obtenidas a través de ensayos histoquímicos para el gen Uid A (GUS) y para los otros transgenes mediante PCR.

4. MATERIALES.

4.1 Material biológico.

Material vegetal.

Semillas de *Echinopsis ancistrophora*, *E. mirabilis*, *E. huotii* (*E. vallegrandensis*), *Erioseye aurata*, *Eulychnia breviflora* y *Gymnocalycium chubutense*.

Plántulas de *Frailea castanea* (*Frailea asteroides*) y *Matucana madisoniorum* obtenidos del Banco de Germoplasma de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Cepa bacteriana.

A4 de *Agrobacterium rhizogenes* la cual lleva el plásmido silvestre RiA4 y el vector binario pESC4 con los genes *nptII* y *gus* (A4/pESC4).

5. METODOLOGÍA.

5.1 Germinación de semillas *in vitro*.

5.1.1 Desinfección de semillas de cactáceas.

Se lavaron las semillas tres veces en agua corriente con unas gotas de jabón líquido (Dermocleen) durante tres minutos con agitación magnética. Después se lavaron por treinta segundos con etanol al 70 %, se eliminó rápidamente el etanol y se enjuagó dos veces con agua corriente. A continuación se desinfectaron las semillas con hipoclorito de sodio (cloralex) al 10 % por 20 minutos bajo agitación suave, el recipiente se llenó hasta 1.5 cm antes del borde, se tapó con papel aluminio y no se abrió solo hasta encontrarse en la campana de flujo laminar. Ya en la campana se eliminó el cloralex, se enjuagaron las semillas tres veces con agua destilada estéril y con la ayuda de una espátula estéril se separaron las semillas.

5.1.2 Siembra e incubación de las semillas.

Del vaso de precipitados que contiene las semillas desinfectadas, se tomaron una a una las semillas y se sembraron en recipientes con medio Murashige & Skoog (MS) (1962) con la ayuda de pinzas estériles. Se colocaron de tres a cuatro semillas en cada recipiente, separadas y en contacto con el medio de cultivo. Los recipientes se sellaron, etiquetaron y se llevaron a un cuarto de cultivo a una temperatura de incubación de entre 24 y 26 °C. Se mantuvieron en observación constante y se eliminaron los recipientes contaminados.

5.2 Propagación de cactáceas por medio de la activación de areolas (yemas axilares) *in vitro*.

Se seleccionó una especie de cactácea de interés ya establecida *in vitro*. Se inocularon frascos con medio MS adicionado con 0.5 mg L⁻¹ de Bencilaminopurina (BA) con segmentos de tejido. Esto se realizó eliminando la parte basal de las plántulas y/o brotes, y

sembrando con la herida hacia el medio manteniendo su polaridad, el número de explantes en cada recipiente de cultivo y las condiciones fueron homogéneas para todos los recipientes y tratamientos. Los frascos se incubaron a 25 °C bajo luz continua. Se mantuvieron en observación constante y se eliminaron los recipientes contaminados. La respuesta de las plántulas (crecimiento y producción de brotes) en el medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA fue revisada de manera continua. Cuando la respuesta fue poco favorable, las plántulas se transfirieron a medio MS + 1.0 mg L⁻¹ de BA trabajando de la misma forma que para el medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA que se indicó anteriormente.

5.3 Transformación genética de cactáceas.

5.3.1 Cultivo de *A. rhizogenes* A4/pESC4 en medio YM.

Se midieron 35 ml de medio YM en una probeta graduada y se vaciaron en un matraz de 50 ml, esto se realizó por triplicado. Se agregaron al medio YM 35 µl de la solución de Rifampicina 50 mg/ml y 35 µl de la solución de Kanamicina 50 mg/ml a cada matraz de tal manera que se encontraran a una concentración de 50 mg L⁻¹ y se agitaron para homogenizar. Con un asa estéril se tomó una muestra de una placa con cultivo de la bacteria *A. rhizogenes* A4/pESC4 y se inoculó en los matraces. Se sellaron, etiquetaron y llevaron a incubar en estufa a 28 °C de 48 a 72 horas.

5.3.2 Análisis para comprobar la presencia de los genes *nptII*, *GUS*, *rolB* y *VirD1* en *A. rhizogenes* A4/pESC4.

5.3.3 Aislamiento del ADN de *A. rhizogenes*.

Se tomaron 1.5 ml del cultivo bacteriano líquido en un tubo para microcentrífuga, se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos para colectar la bacteria y se eliminó el sobrenadante. La pastilla bacteriana se resuspendió en 350 µl de STET (NaCl 0.1 M, EDTA 1 mM a pH 8 y tritón X-100 5 % p/V) adicionado con Lisozima y se incubó por 30 minutos

a 37 °C. Después se pasó a un baño de agua hirviendo por 40 segundos, se enfrió a temperatura ambiente en baño de hielo y se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se añadieron 40 µl de acetato de sodio 2.5 M pH 5.2 y 420 µl de isopropanol frío. Se dejó precipitar 2 horas a -20 °C. Después se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos, se decantó y lavó la pastilla con etanol al 70%. Con baño maría se eliminó el etanol de la pastilla y se resuspendió en 40 µl de agua desionizada estéril. Se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Nota: Se colocaron en un recipiente con cloro todos aquellos materiales que estuvieron en contacto con la bacteria viva. Asimismo, se añadió cloro a los sobrenadantes que pudieron contener bacterias vivas y al propio cultivo cuando ya no fue requerido.

5.3.4 Identificación de los genes *nptII*, *GUS*, *rolB* y *VirD1* en *A. rhizogenes* A4/pESC4 mediante PCR.

Primers:

Para la detección del gen *nptII* (Fragmento esperado de 517 pb). Gen localizado en el plásmido ESC4:

NPT II-1: 5´TATTCGGCTATGACTGGGCA3´
 NPT II-2: 5´GCCAACGCTATGTCCTGAT3´

Para la detección del gen *Gus* (Fragmento esperado de 1200 pb) Gen localizado en el plásmido ESC4:

GUS-1: 5´GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG3´
 GUS-2: 5´GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA3´

Para la detección del gen *RolB* (Fragmento esperado de 780 pb) Gen localizado en el plásmido Ri:

ROLB-1: 5' ATGGATCCCA AATTGCTATTCCTTCCACGA 3'

ROLB-2: 5' TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC 3'

Para la detección del gen *VirD1* (fragmento esperado 450 pb) Gen localizado en el plásmido Ri:

VIRD1-1: 5' ATGTCGCAAGGACGTAAGCCCA 3'

VIRD1-2: 5' GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA 3'

Procedimiento:

Se preparó la Mezcla de Reacción para cada gen a amplificar de acuerdo a la tabla 3.

Tabla 3. Reactivos para preparar la mezcla de reacción para la técnica de PCR.

SOLUCIÓN	VOLUMEN
Agua	9.5 µl
2x ReadyMix RED Taq SIGMA*	12.5 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
ADN	1 µl
TOTAL	25 µl

Después se llevaron los tubos al termociclador y se inició el programa de amplificación. El programa se muestra a continuación.

Programa: *LINK 1* (TermocicladorBio Rad Gene Cyclor)

AMPLIA (TermocicladorTechne TC 312)

1 ciclo	94 °C	4 min
	55 °C	1 min
	72 °C	3 min
30 ciclos	94 °C	1 min
	55 °C	1 min
	72 °C	3 min
1 ciclo	72 °C	7 min

5.3.5 Electroforesis de productos amplificados.

Se corrieron 25 µl de los productos (de PCR) en un gel de agarosa al 1.25%. En el primer carril se colocó el marcador de peso molecular para PCR de 2000, 1500, 1000, 750, 500, 300, 150 y 50 kilobases, y en los carriles las muestras obtenidas por la amplificación. Se corrió la electroforesis a 40 V hasta que el frente avanzó de 5 a 6 cm. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó bajo luz ultravioleta. Se tomaron fotografías y registraron resultados.

5.3.6 Inducción de raíces transformadas en cactáceas.

Medios de cultivo:

Para la primera parte (Cocultivo):

- a) Medio MS líquido con 3% de sacarosa y antioxidantes (100 mg L⁻¹ de ácido cítrico y 100 mg L⁻¹ de ácido Ascórbico, esterilizados por filtración).
- b) Medio MS líquido con 3% de sacarosa.
- c) Medio MS con 3% de sacarosa y 8 g L⁻¹ de agar como gelificante.

Para la segunda parte:

d) Medio MS líquido con 3% de sacarosa y 500 mg L⁻¹ de Claforán*.

e) Medio de selección. MS con 3% de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar como gelificante, 50 mg L⁻¹ de kanamicina como agente selectivo y 250 mg L⁻¹ de Claforán* para eliminar a la bacteria. Medio MS líquido.

* Esterilizado por filtración.

Procedimiento:

Se añadieron 50 µl de acetosiringona 100 mM y 5 ml del cultivo bacteriano al frasco con medio MS líquido sin antioxidantes (medio b). Se cortaron 30 explantes transversales delgados de 4 a 5 mm de espesor de la cactácea seleccionada e inmediatamente se llevaron a un frasco con medio MS líquido con antioxidantes (medio a). Una vez que se obtuvieron todos los explantes, se transfirieron al frasco con bacteria y acetosiringona (medio b) y se incubaron por 30 min. Se sacaron los explantes de la suspensión bacteriana, se eliminó el exceso de líquido colocándolos suavemente sobre gasa estéril y se transfirieron a cajas con medio MS sólido sin antibióticos (medio c). Se incubaron a 28 °C en la obscuridad por 72 horas. Al alcanzarse este tiempo de incubación, los explantes se pasaron del medio de cocultivo a los frascos con medio MS líquido y Claforán (medio d) para eliminar el exceso de bacteria y se incubaron por 30 minutos. Al terminar, los explantes se pasaron al medio semisólido de selección (medio e) y se incubaron a 25 °C en la obscuridad por 20 días. El día 21 se transfirieron los cultivos a luz. Se tomaron resultados cuando hubo raíces claramente visibles.

5.4 Verificación de la transformación de las raíces.

5.4.1 Ensayo histoquímica para β-glucoronidasa (GUS).

Se procedió a preparar la siguiente solución de reacción:

Tabla 4. Reactivos para realizar el ensayo histoquímico para β -glucoronidasa(GUS).

Solución	Volumen	Concentración
Buffer fosfatos 1M	100 μ l	100 mM
EDTA 0.25 M	40 μ l	10 mM
Ferrocianuro de Potasio 5 mM	100 μ l	0.5 mM
Ferricianuro de Potasio 5 mM	100 μ l	0.5 mM
Triton 10%	10 μ l	0.10%
X-gluc 40 mM	50 μ l	2.0 mM
Agua destilada	600 μ l	
Total	1 000 μl	

Se cubrió el tejido con la solución de reacción y se incubo a 37 °C hasta obtener un precipitado azul o magenta (depende del substrato usado). Se lavó varias veces con etanol al 70% para fijar el tejido y eliminar las clorofilas. Se almacenó en etanol al 70% hasta su uso. Los tejidos se conservan en etanol al 70% por tiempo indefinido siempre y cuando no se sequen.

5.4.2 Extracción de ADN de raíces presuntamente transformadas en cactáceas.

Se pesaron de 30 a 330 mg de tejido vegetal y se congelaron a -20 °C por 24 horas para su uso posterior. Se tomó el tejido vegetal y se pasó a un mortero para macerar el tejido con nitrógeno líquido para romper la pared celular. Después se añadió 700 μ l de la solución de extracción precalentada a 60 °C y se homogenizo con ayuda de un vortex, se incubó 20 minutos a 60 °C agitando ocasionalmente. Al terminar se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadió un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (saturado en TE) y se agitó manualmente por 2 minutos. Después se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo añadiendo un volumen de isopropanol frio. Se incubó por 24 horas a -20 °C. Al cumplirse el tiempo se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavó la pastilla 2 veces con etanol al 80% y se secó la pastilla en parrilla eléctrica a 50 °C. Al finalizar se resuspendió la pastilla en 50 μ l de agua destilada estéril.

5.4.3 Montaje de la PCR y Electroforesis para ADN de raíces transformadas.

Utilizar el procedimiento descrito para ADN de *A. rhizogenes*.

Antes de correr la técnica de PCR se tomaron se tomaron 10 µl de la suspensión del ADN obtenido en la extracción y se resuspendió en 490 µl de agua destilada estéril. Esta solución se leyó en un espectrofotómetro UV-VISIBLE para obtener la concentración de ADN y proteínas. Además se leyó a 260 y 280 nm. para conocer la relación de ADN 260/280 para determinar la concentración adecuada de ADN para llevar a cabo la PCR.

6. RESULTADOS.

6.1 Establecimiento y propagación de material vegetal *in vitro* de las especies seleccionadas para el proyecto.

6.1.1 Germinación de semillas *in vitro*.

Este proceso se realizó con la finalidad de obtener la mayor cantidad de material vegetal en condiciones axénicas, y así, establecer un sistema de propagación que nos brinde el material a transformar. En la tabla 5 aparecen los resultados obtenidos en once especies de cactáceas sudamericanas *Acanthocalycium violaceum*, *Arequipa erectocylindrica*, *Azureocereus hertlingianus*, *Copiapoa coquimbana*, *C. esmeraldana*, *C. hypogaea*, *Echinopsis albispinosa*, *E. ancistrophora*, *E. mirabilis*, *E. huotii subsp vallegrandensis*, *Eriusyce aurata*, *Eulychnia breviflora*, *Gymnocalycium carminanthum*, *G. chubutense*, *G. hossei*, *G. valnicekianum*, *Lobivia pygmaea* y *Parodia camargensis*. Después de obtener resultados, se descartaron aquellas especies con porcentajes de germinación muy bajos ya que no se pudo generar el material necesario para el resto de las etapas del proyecto. Con las demás se continuó con el proceso de multiplicación de brotes.

Los resultados muestran a cinco especies, *Copiapoa esmeraldana*, *Echinopsis mirabilis*, *E. huotii subsp vallegrandensis*, *Eriusyce aurata* y *Eulychnia breviflora*, que lograron porcentajes de germinación mayores al 60 %. Además estas especies no

presentaron problemas de contaminación. Estos resultados, aunque no son el único parámetro a considerar, son necesarios para determinar las especies a trabajar en el proyecto. Las especies con mayor porcentaje de germinación se perfilan como algunas de las elegidas. Todas las plántulas generadas en el proceso fueron transferidas para su crecimiento y posterior formación de brotes a medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA.

Tabla 5: Germinación de especies de cactáceas para establecimiento y propagación de material vegetal.

CACTÁCEA	SEMILLAS				
	CANTIDAD	TOTAL CONTAMINADAS	TOTAL GERMINADAS	% CONTAMINADAS	% GERMINACION
<i>Acanthocalycium violaceum</i>	25	0	6	0	24
<i>Arequipa erectocylindrica</i>	92	61	24	66	26
<i>Azureocereus hertlingianus</i>	19	16	1	84	5
<i>Copiapoa coquimbana</i>	27	0	11	0	41
<i>Copiapoa esmeraldana</i>	23	0	14	0	61
<i>Copiapoa hypogaea</i>	21	9	3	43	14
<i>Echinopsis albispinosa</i>	24	0	1	0	4
<i>Echinopsis ancistrophora</i>	48	0	16	0	33
<i>Echinopsis mirabilis</i>	24	0	18	0	75
<i>Echinopsis vallegrandensis</i>	25	0	20	0	80
<i>Eriusyce aurata</i>	25	0	19	0	76
<i>Eulychnia breviflora</i>	27	0	22	0	81
<i>Gymnocalycium carminanthum</i>	57	0	2	0	4
<i>Gymnocalycium chubutense</i>	43	0	20	0	47
<i>Gymnocalycium hossei</i>	26	0	7	0	27
<i>Gymnocalycium valnicekianum</i>	47	6	7	13	15
<i>Lobivia pygmaea</i>	22	0	7	0	32
<i>Parodia camargensis</i>	17	0	6	0	35

6.1.2 Propagación de cactáceas por medio de la activación de yemas *in vitro*.

6.1.2.1 Propagación de cactáceas por medio de la activación de yemas *in vitro* medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA y MS + 1.0 mg L⁻¹ de BA.

Ocho especies de cactáceas sudamericanas, *Copiapoa hypogaea*, *Echinopsis ancistrophora*, *E. mirabilis*, *E. huotii subsp vallegrandensis*, *Eriocyce aurata*, *Eulychnia breviflora*, *Gymnocalycium chubutense* y *Lobivia pygmaea* se eligieron para continuar con el proceso de multiplicación de brotes *in vitro* y sus plántulas fueron transferidas a medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA (tabla 6). Todas las especies anteriores registraron una buena cantidad de plántulas, además dichas especies muestran también tasas de crecimiento que van de media a alta. Las plántulas de las especies *Copiapoa hypogaea*, *Echinopsis ancistrophora* y *Lobivia pygmaea* generadas en el proceso fueron mantenidas para su crecimiento y formación de brotes a medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA ya que, tuvieron cantidades de brotes superiores a las demás en este medio, el resto fueron transferidas a medio MS + 1.0 mg L⁻¹ de BA debido a su baja producción de brotes.

Después del análisis de la tabla 6 se decidió que las especies de las que se contaba con más ejemplares y tasas de crecimiento media y alta se seleccionarían para continuar en las siguientes etapas de la multiplicación de brotes *in vitro*. Las especies seleccionadas son las siguientes: *Echinopsis ancistrophora*, *E. mirabilis*, *E. huotii subsp vallegrandensis*, *Eriocyce aurata*, *Eulychnia breviflora* y *Gymnocalycium chubutense*, estas se probaron además en medio MS + 1.0 mg L⁻¹ de BA.

Se generaron brotes en ambas concentraciones de BA. La especie *E. huotii subsp vallegrandensis* obtuvo una respuesta significativamente mejor con el tratamiento con 1 mg L⁻¹ de BA, generó un promedio de 14.4 brotes por explante. El resto de las especies generaron entre 4.9 y 11.6 brotes por explante en el mismo tratamiento (tabla 7).

En la mayoría de las especies se obtuvieron plántulas con una morfología normal, sólo en el caso de la especie *Gymnocalycium chubutense* algunas plántulas obtenidas

mostraron una morfología anormal, hiperhidratándose y generando tejido calloso en el tratamiento con 1 mg L⁻¹ de BA, sin embargo, las areolas continuaron la producción de brotes.

Tabla 6: Resultados del esquema de micropropagación por activación de yemas *in vitro* de cactáceas en medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA.

CACTÁCEA	PLÁNTULAS EN MEDIO MS + 0.5 mg L ⁻¹ BA			
	PLANTULAS TRANSFERIDAS	BROTOS GENERADOS	CRECIMIENTO	TOTAL DE PLÁNTULAS
<i>Copiapoa hypogaea</i>	3	12	BAJO	15
<i>Echinopsis ancistrophora</i>	16	12	ALTO	28
<i>Echinopsis mirabilis</i>	17	3	ALTO	20
<i>Echinopsis vallegrandensis</i>	14	0	ALTO	14
<i>Eriogyce aurata</i>	17	2	ALTO	19
<i>Eulychnia breviflora</i>	20	3	MEDIO	23
<i>Gymnocalycium chubutense</i>	20	6	ALTO	26
<i>Lobivia pygmaea</i>	6	19	BAJO	25

Tabla 7: Respuesta de las 6 especies de cactáceas en la producción de brotes en medio MS + 0.5 mg L⁻¹ BA y MS + 1.0 mg L⁻¹ de BA. Promedio ± DE.

CACTÁCEA	MEDIO MS + 1.0 mg L ⁻¹ de BA		MEDIO MS + 0.5 mg L ⁻¹ BA	
	TOTAL DE BROTOS GENERADOS	BROTOS POR EXPLANTE	TOTAL DE BROTOS GENERADOS	BROTOS POR EXPLANTE
<i>Echinopsis ancistrophora</i>	659.0	11.6 ± 3.5	12.0	1.7 ± 0.8
<i>Echinopsis mirabilis</i>	227.0	9.5 ± 3.7	3.0	1.0 ± 0.0
<i>Echinopsis vallegrandensis</i>	909.0	14.4 ± 3.1	0.0	0.0 ± 0.0
<i>Eriogyce aurata</i>	483.0	8.5 ± 2.8	2.0	0.3 ± 0.5
<i>Eulychnia breviflora</i>	138.0	4.9 ± 2.2	3.0	0.4 ± 0.5
<i>Gymnocalycium chubutense</i>	308.0	5.1 ± 1.0	7.0	1.0 ± 0.8

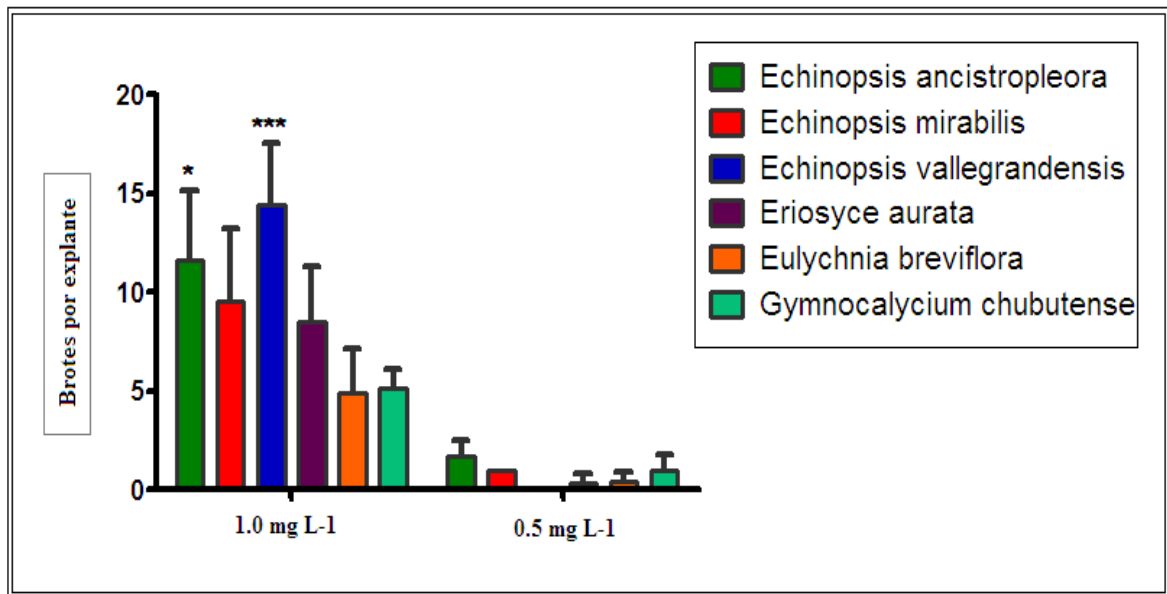


Fig. 11. Propagación de cactáceas por medio de la activación de yemas *in vitro* medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA y MS + 1.0 mg L⁻¹ de BA. El nivel de significancia estadística es *=P<0.05, ***P<0.001

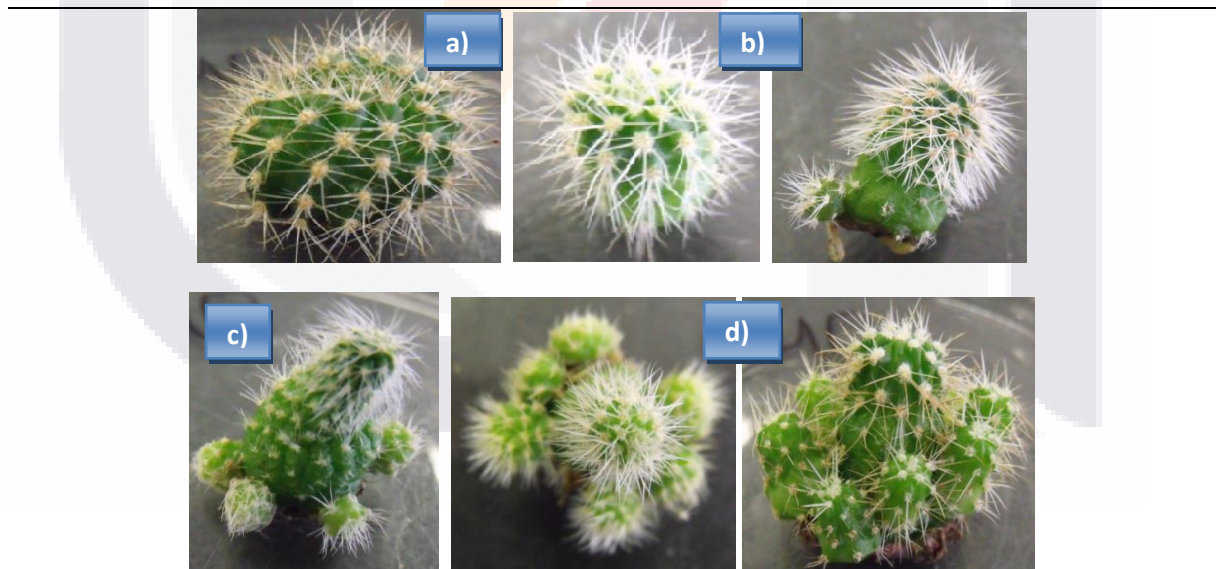


Fig. 12. Plántulas de *Echinopsis ancistropleora*, (a) obtenidas *in vitro*, (b, c) medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA, (d) medio MS + 1 mg L⁻¹ de BA con brotación múltiple.

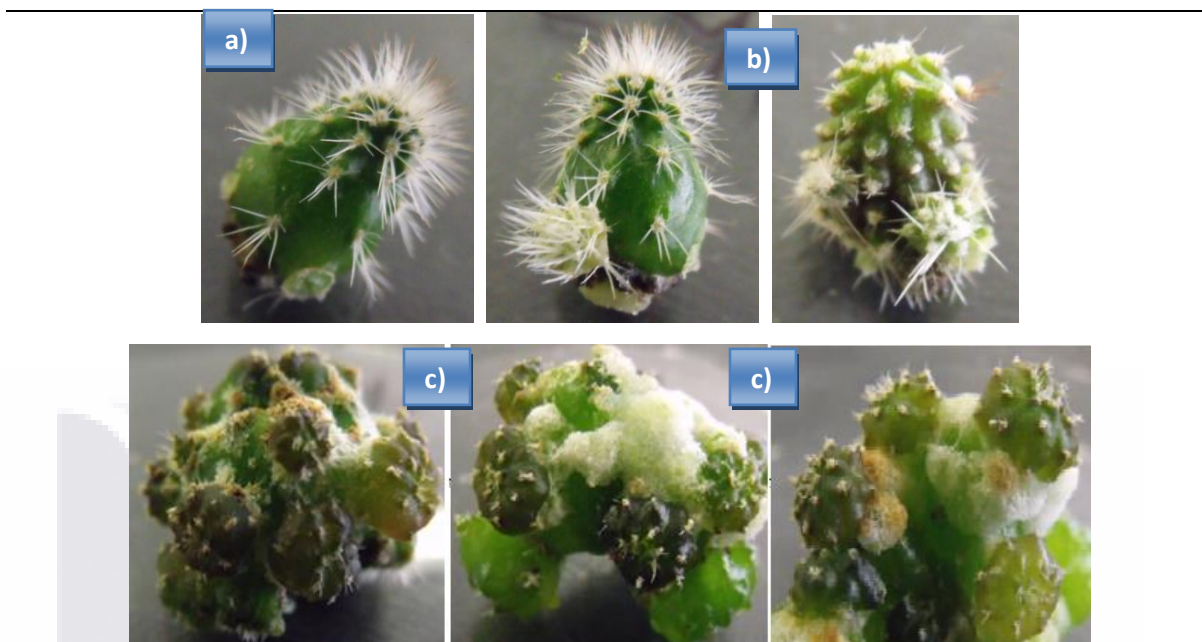


Fig. 13. Plántulas de *Echinopsis mirabilis*. (a) Obtenida *in vitro*, (b) cultivadas en medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA, (c) cultivadas en medio MS + 1 mg L⁻¹ de BA con brotación múltiple.

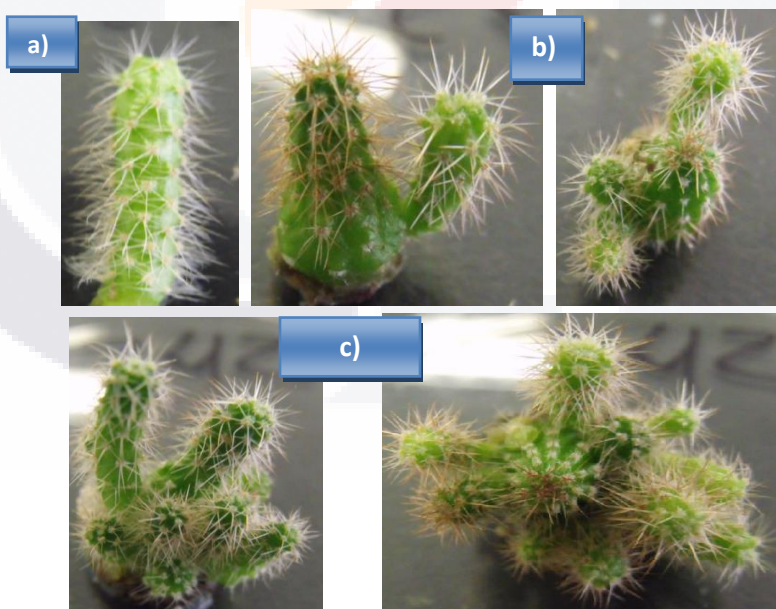


Fig. 14. Plántulas de *Echinopsis huotii subsp. vallegrandensis*. (a) Obtenidas *in vitro*, (b) medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA, (c) medio MS + 1 mg/L de BA con brotación múltiple.

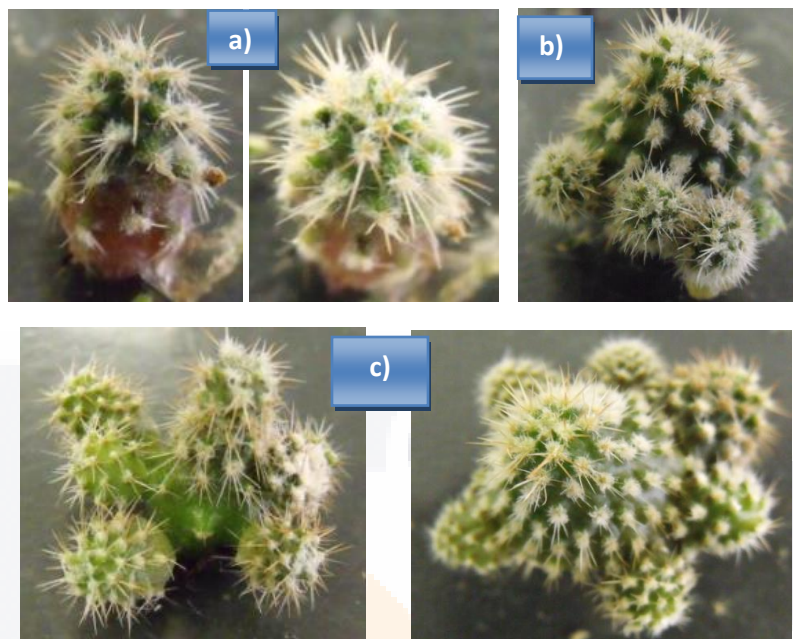


Fig. 15. Plántulas de *Eriogyne aurata*. (a) obtenidas *in vitro*, (b) cultivada en medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA, (c) cultivadas en medio MS + 1 mg/ L⁻¹ de BA con brotación múltiple.

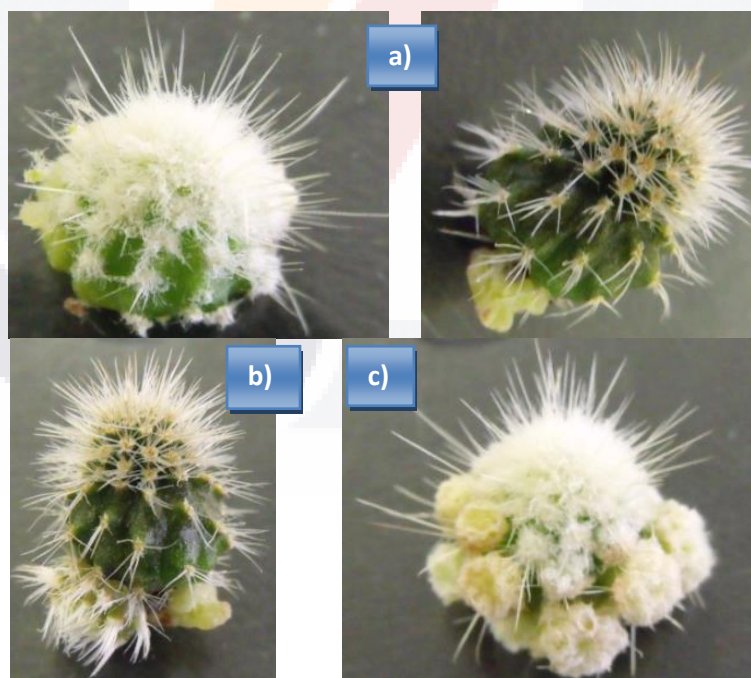


Fig. 16. Plántulas de *Eulychnia breviflora*. (a) Obtenidas *in vitro*, (b) en medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de B.A., (c) cultivada en medio MS + 1 mg L⁻¹ de B.A con brotación múltiple.

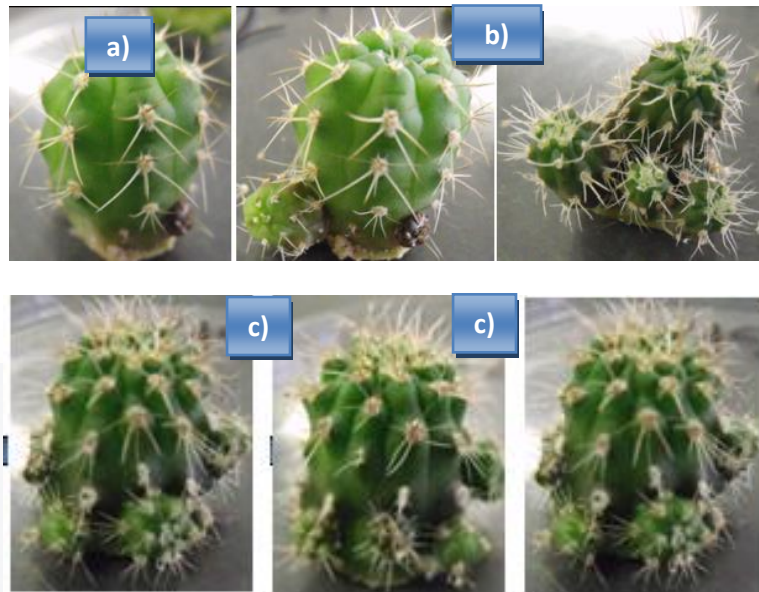


Fig. 17. Plántulas de *Gymnocalycium chubutense*. (a) Obtenida *in vitro*, (b) en medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de BA, (c) cultivadas en medio MS + 1 mg L⁻¹ de BA con brotación múltiple.

6.2 Inducción de raíces transformadas en explantes a través del cocultivo con *A. rhizogenes*.

6.2.1 Análisis para comprobar la presencia de los genes *nptII*, *GUS*, *rolB* y *VirD1* en *A. rhizogenes* A4/pESC4.

Los datos que se muestran a continuación corresponden a la prueba que se realizó a la bacteria *A. rhizogenes* antes de iniciar las transformaciones. Como resultado se muestra la figura 24 correspondiente al gel de agarosa donde se desarrolló la electroforesis del ADN extraído de la bacteria a trabajar, se puede observar la presencia de los genes *nptII*, *GUS*, *rolB* y *VirD1* de los plásmidos Ri y el vector binario. Con esto verificó que la cepa a utilizar portaba todos los plásmidos y genes de interés, por lo que se utilizó para los procesos posteriores.

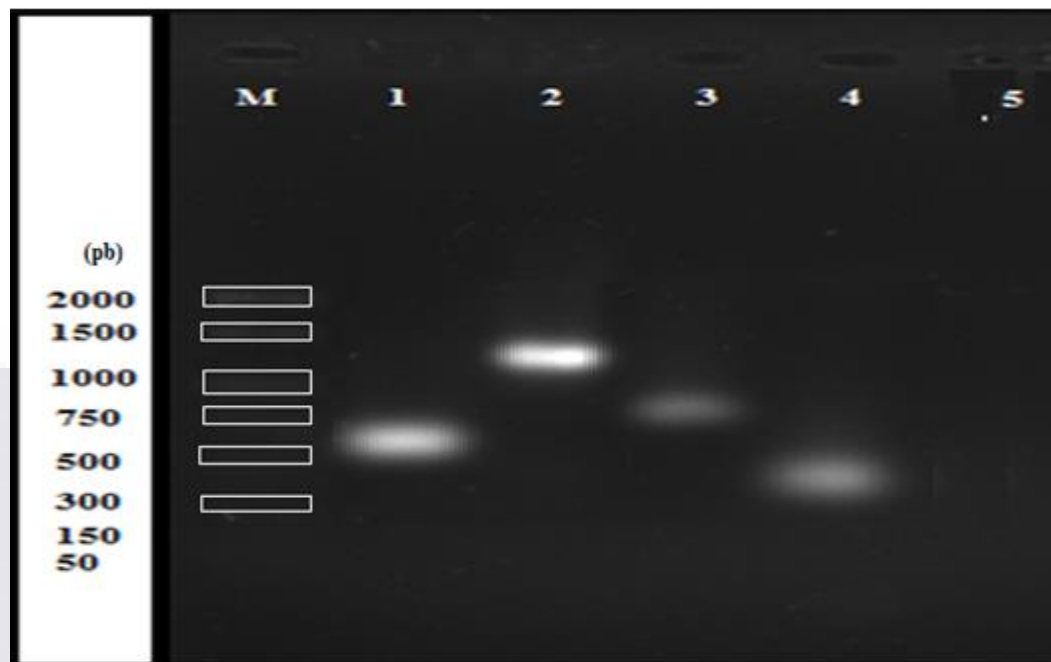


Fig. 18. Electroforesis en gel de agarosa de ADN obtenido por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir de la extracción de ADN de *A. rhizogenes* teñido con bromuro de etidio. Las manchas blancas en el gel corresponden a los genes amplificados.

M) Marcador de peso molecular, 1) Gen NPT II (517 pb), 2) Gen GUS (1200 pb), 3) Gen ROLB (780 pb), 4) VIRD1 (450 pb), 5) Gen VTC.

6.2.2 Transformación genética de cactáceas.

De quince a treinta días después de la infección con *A. rhizogenes*, las raíces presuntamente transformadas comenzaron a salir en la superficie de las heridas de algunos de los explantes de cactus cultivadas en medio MS libre de reguladores de crecimiento vegetal con 50 mg L⁻¹ kanamicina. El porcentaje de explantes que presentaron raíces se encontró entre 0 y 31 % (Tabla 8). La cantidad y longitud de las raíces fue variable entre los explantes de cada especie y entre las especies sometidas a prueba. En algunas especies la primera respuesta después de la infección era la formación de callos en la superficie de la herida, y las raíces presuntamente transformadas surgieron a partir de este tejido calloso.

Estos resultados se obtuvieron utilizando ácido ascórbico y ácido cítrico como antioxidantes en medio MS y acetosiringona en el medio de suspensión bacteriana.

Después de 90 días de la infección con *A. rhizogenes*, de las ocho especies sometidas a transformación solo *Echinopsis ancistrophora*, *E.mirabilis*, *E. huotii subsp vallegrandensis*, y *Gymnocalycium chubutense* tuvieron la formación de raíces peludas, mientras que las especies *Erioseyce aurata*, *Eulychnia breviflora*, *Frailea castanea (Frailea asteroides)* y *Matucana madisoniorum* no respondieron a la infección.

Tabla 8: Respuesta de las 8 especies de cactáceas ante la infección con *A. rhizogenes*.

ESPECIE	EXPLANTES	NÚMERO			LONGITUD DE			RAÍCES CON
	CON RAÍCES (%)	RAÍCES POR EXPLANTE			LAS RAÍCES (mm)			ACTIVIDAD GUS (%)
<i>Echinopsis ancistrophora</i>	17	4.5	±	4.3	7.7	±	3.8	59
<i>Echinopsis mirabilis</i>	7	4.4	±	2.1	7.4	±	3.4	50
<i>Echinopsis vallegrandensis</i>	44	4.0	±	2.5	7.0	±	3.0	25
<i>Erioseyce aurata</i>	0	0.0	±	0.0	0.0	±	0.0	0
<i>Eulychnia breviflora</i>	0	0.0	±	0.0	0.0	±	0.0	0
<i>Gymnocalycium chubutense</i>	15	8.1	±	5.9	7.0	±	2.6	69
<i>Frailea asteroidis</i>	0	0.0	±	0.0	0.0	±	0.0	0
<i>Matucana madisoniorum</i>	0	0.0	±	0.0	0.0	±	0.0	0

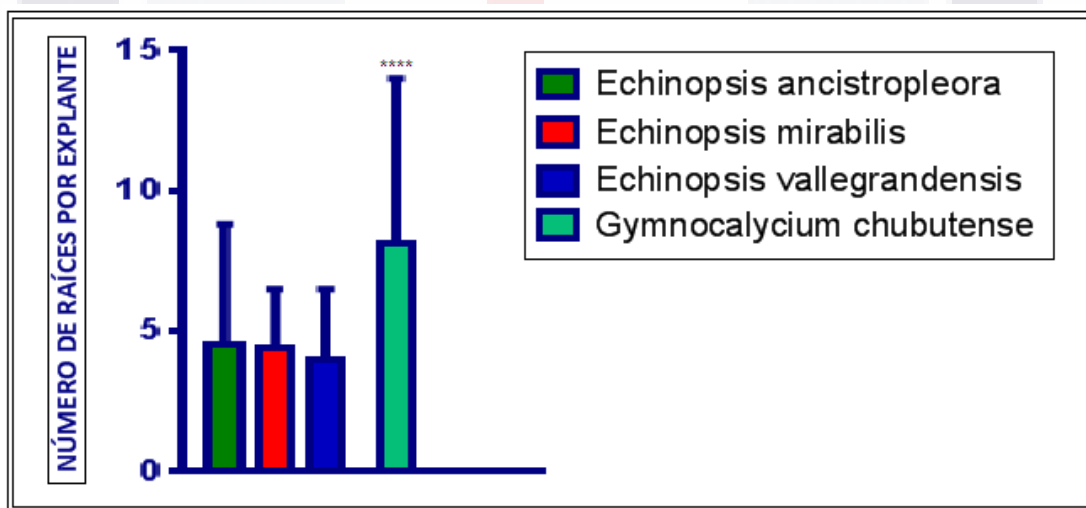


Fig. 19. Número promedio de raíces generadas por la infección de *A. rhizogenes*. El nivel de significancia estadística es *=P<0.05, ****P<0.001

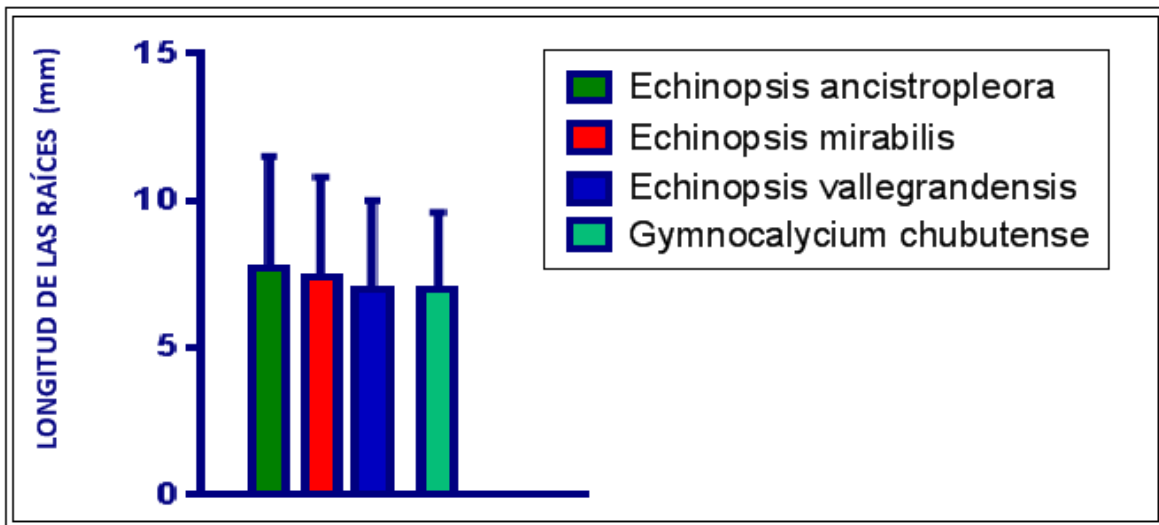


Fig. 20. Longitud promedio de las raíces generadas por la infección de *A. rhizogenes*.
El nivel de significancia estadística es *=P<0.05, ****P<0.001

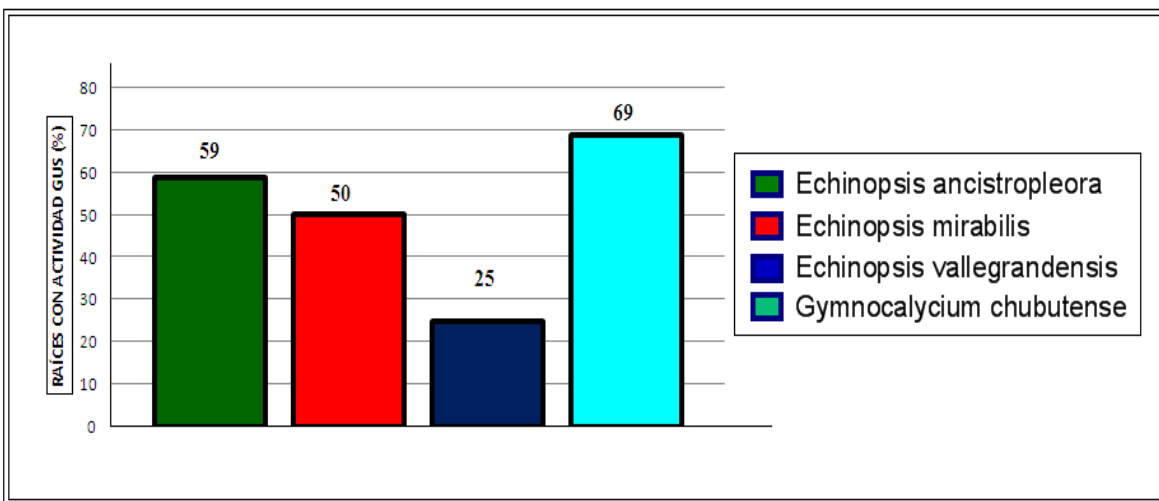


Fig. 21. Actividad GUS (%) de las raíces generadas por la infección de *A. rhizogenes*.



Figura 22. Inducción de raíces en explantes de a) *E. vallegrandensis* y b) *G. chubutense* infectadas con *A. rhizogenes*. Prueba histoquímica para la expresión de GUS en raíces transformadas de c) *E. vallegrandensis* y d) *G. chubutense*.

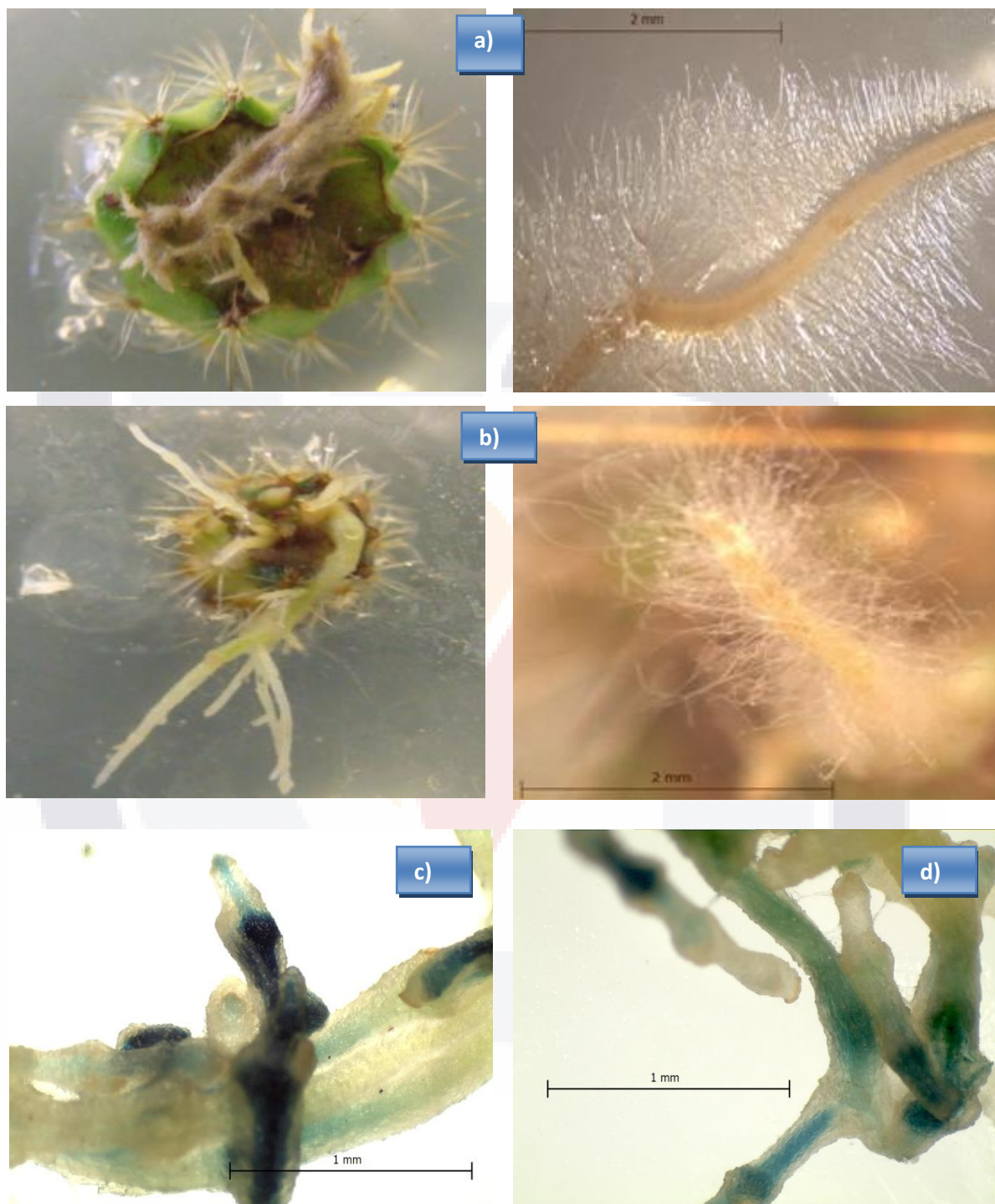


Figura 23. Inducción de raíces en explantes de a) *E. ancistrophora* y b) *E. mirabilis* infectadas con *A. rhizogenes*. Prueba histoquímica para la expresión de GUS en raíces transformadas de c) *E. ancistrophora* y d) *E. mirabilis*

El crecimiento de las raíces transformadas también fue variable entre las especies analizadas, mostrando una longitud desde 0,5 hasta 19.5 mm después de 90 días de cultivo. En la mayoría de las especies se observó que la tasa de crecimiento más alta en los primeros 30 días.

El crecimiento de las raíces transformadas también fue variable entre las especies analizadas, mostrando incrementos en la longitud desde 0,5 hasta 19.5 mm después de 90 días de cultivo. En la mayoría de las especies, se observó que la tasa de crecimiento más alta en los primeros 30 d.

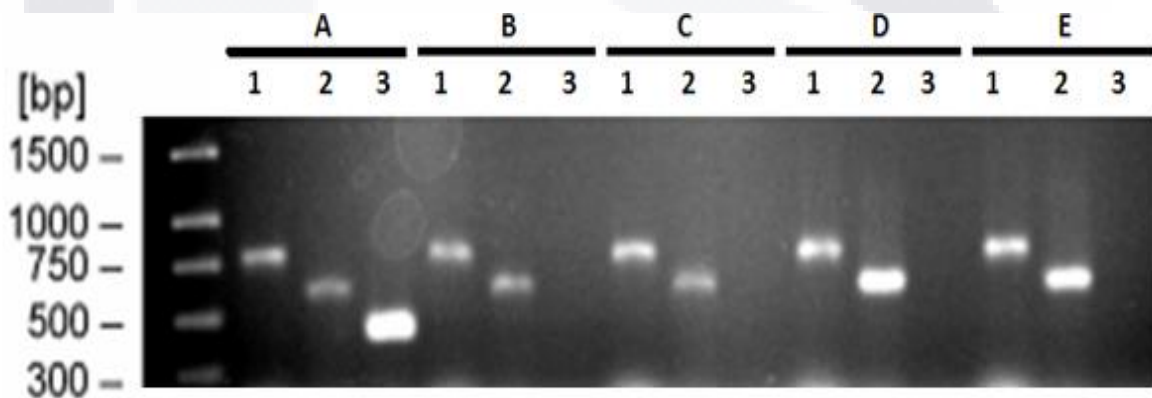


Fig. 24. Detección de los genes *rolB*, *nptII* y *virD1* en *A. rhizogenes*, *Echinopsis ancistrophora*, *E.mirabilis*, *E. huotii subsp vallegrandensis*, y *Gymnocalycium chubutense* por análisis de PCR. A: *A. rhizogenes* A4 pESC4; B-E: ADN obtenido a partir de raíces transformadas de *Echinopsis ancistrophora* (B), *E.mirabilis* (C), *E. huotii subsp vallegrandensis* (D), y *Gymnocalycium chubutense* (E). Columnas 1: Primers para detección de *rolB*; columnas 2: primers para detección de *nptII*; columnas 3: primers para detección de *virD1*.

La naturaleza transgénica de las raíces generadas por la infección de *A. rhizogenes* se confirmó mediante ensayos histoquímicos (GUS) (fig. 28 y 29) y análisis de PCR. La actividad GUS se demostró en las raíces transformadas de 4 de las 8 especies de cactus probadas. Las frecuencias de las raíces GUS positivos variaron de 25 a 69 % en las especies

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sensibles (Tabla 8, Fig. 21). Además se realizó la prueba a raíces de brotes de los explantes infectados con *A. rhizogenes* dando resultados negativos a la prueba. En las especies positivas para la formación de raíces y para el análisis de GUS, los resultados de PCR también fueron positivos, fragmentos de 1200, 780 y 517 pb correspondientes a los genes *GUS*, *rolB* y *nptII* respectivamente fueron amplificados en muestras de ADN (Fig. 30).

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Bajo el esquema de multiplicación de brotes *in vitro* empleado se generaron brotes en ambos tratamientos con 0.5 y 1 mg L⁻¹ de BA. Sin embargo, una respuesta significativamente mejor de todas las especies se obtuvo con el tratamiento con 1 mg L⁻¹ de BA. Las especies generaron promedios desde 4.9 hasta 14.4 brotes por explante para el mismo tratamiento. Únicamente se realizaron dos tratamientos, 0.5 mg L⁻¹ de BA y 1 mg L⁻¹ de BA, cabe mencionar que la BA está entre las dos citocininas más empleadas para la propagación de cactáceas a través de la activación de areolas junto a la isopentiladenina (2iP) (Hubstenberger *et al.*, 1992), por lo que, para realizar un esquema de micropropagación más efectivo se podrían probar concentraciones más altas de BA además de probar con 2iP. Otros sistemas de micropropagación utilizando ambos reguladores de crecimiento (BA y 2iP) con otras especies de cactáceas han reportado eficiencias de 14 brotes por explante en *Mediocactus coccineus* (Infante, 1992), 13.7 y 12.8 brotes por explante en *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis*, respectivamente (Pérez-Molpheb Balch y Dávila-Figueroa, 2002) y 13.8 brotes por explante en *Opuntia ficus-indica* (García-Saucedo *et al.*, 2005). Las especies *Echinocereus knippelianus*, *Echinocereus schmollii*, *Mammillaria carmenae*, *M. herrerae*, *Escontria chiotilla* y *Polaskia chichipe* respondieron significativamente mejor a los tratamientos con 1 mg L⁻¹ de BA.

La multiplicación *in vitro* de cactáceas también se ha alcanzado a través de otras vías de propagación, como la organogénesis, en *Turbinicarpus laui* (Mata-Rosas *et al.*, 2001), *Selenicereus megalanthus* (Pelah *et al.*, 2002), *Pelecyphora aselliformis* (Santos-

Díaz *et al.*, 2003) y *Mammillaria albicoma* (Wyka *et al.*, 2006), sin embargo, además de una eficiencia similar o superior a la obtenida a través de la activación de areolas, estos también reportaron la generación de tejido calloso como paso intermedio en el proceso de regeneración. En este trabajo sólo se observó la generación de tejido calloso en explantes de la especie *Gymnocalycium chubutense* cultivados en 1 mg L⁻¹ de BA. Sin embargo, aun en estos casos los brotes se generaron a partir de las areolas y no del tejido calloso.

Después de 90 días de la infección con *A. rhizogenes* A4, de las ocho especies sometidas a transformación solo cuatro, *Echinopsis ancistrophora*, *E. mirabilis*, *E. huotii* subsp *vallegrandensis*, y *Gymnocalycium chubutense* mostraron la formación de raíces presuntamente transformadas, mientras que las especies *Erioseyca aurata*, *Eulychnia breviflora*, *Frailea castanea* (*Frailea asteroides*) y *Matucana madisoniorum* no respondieron a la infección con la cepa usada y en las condiciones probadas.

Existen diferentes factores que intervienen en la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Estos factores varían de acuerdo a la especie vegetal pero se deben tener en cuenta los siguientes aspectos: edad de la planta, tipo de tejido a transformar, cepa de *Agrobacterium* seleccionada para transformar, tiempo y condiciones e inoculación del tejido con *Agrobacterium*, densidad y período de precultivo de la bacteria y presencia de necrosis en el tejido de la planta causada por *Agrobacterium* (Grevelding *et al.*, 1993; Salas *et al.*, 2001; Chakrabarty *et al.*, 2002, Ko *et al.*, 2003).

Con el objetivo de inducir la expresión de los genes *vir* y facilitar la transformación se han utilizado diferentes inductores como son los compuestos glucosa, acetosiringona y azacitidina; los resultados en el porcentaje de plantas transformadas varían de acuerdo a la especie vegetal evaluada y a la concentración utilizada (Chakrabarty *et al.*, 2002; Boase *et al.*, 1998). Se ha demostrado en otras especies de plantas que la adición de acetosiringona para el co-cultivo aumenta la frecuencia de explantes con raíces transformadas (Henzi *et al.*, 2000). Recientemente se ha descrito que la exposición de líneas celulares de *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana* y *Ageratum conyzoides* a sustancias inhibitoras de la síntesis de purinas y pirimidinas como la azaserina y acivicina eleva hasta 180 veces la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

frecuencia de transformación en comparación con aquellas líneas que no habían sido tratadas con estos compuestos (Roberts *et al.*, 2003).

Los ácidos cítrico y ascórbico impiden la oxidación de compuestos fenólicos excretados por los explantes heridos, un proceso que probablemente inhibe la transformación. Otro factor que favoreció la aparición y el crecimiento de raíces transformadas fue el uso de PPM para eliminar *Agrobacterium*. En experimentos anteriores, cefotaxima (200 a 400 mg m⁻³) se utilizó para este propósito con resultados insatisfactorios. La cefotaxima fue aparentemente tóxico para las células cactus y causado una alta mortalidad entre explantes.

Blanco *et al.* (2003) montaron un experimento para optimizar la eficiencia en la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*, secciones de zanahoria fueron co-cultivadas con acetosiringona, floriglucinol y una combinación de ambos. La mayor eficiencia en la transformación (75%) se obtuvo con el uso de acetosiringona (100 mM) en combinación con floriglucinol (25 mg L⁻¹). En adición, los resultados obtenidos con el uso de acetosiringona y cefotaxima (500 mg L⁻¹) muestran que el proceso de transformación mejoró en casi un 8% con respecto a la adición de solo acetosiringona.

La transferencia del ADN-T en algunos explantes ha sido fuertemente disminuida por la producción por parte de la planta de especies reactivas de oxígeno las cuales probablemente activan procesos de muerte celular programada o necrosis tisular generando una barrera de células muertas alrededor del tejido infectado. Aunque estos compuestos promueven la necrosis del tejido, se han introducido diferentes inhibidores de enzimas que participan en este proceso para aumentar los porcentajes de plantas transformadas. Algunos tratamientos anti-necróticos aplicados durante el proceso de transformación incluyen la adición de agentes reductores, inhibición por calor de enzimas que participan en el proceso oxidativo, reducción del pH y la adición de inhibidores de enzimas. Los compuestos más ampliamente utilizados son: inhibidores de etileno (AgNO₃), inhibidores de oxidasas y peroxidasas (quelantes de cobre y hierro, compuestos tiólicos como L-cisteína, tiosulfato de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sodio y glutatión, DTT) (Olhoft et al., 2001; Olhoft y Somers 2001; Chakrabarty *et al.*, 2002).

Estudios sobre el proceso de tumorigénesis han revelado que el desarrollo del tumor producido por *Agrobacterium* no se obtiene a altas temperaturas debido a un cambio conformacional de la proteína *virA* que ocurre a temperaturas cercanas a 32 °C (Jin *et al.*, 1993). Otros estudios mostraron que aunque la inducción óptima de los genes *vir* es a 25 °C la transferencia del ADN-T fue óptima a una temperatura de 19 °C (Fullner *et al.*, 1996). Estos trabajos resaltan la importancia de la temperatura de co-cultivo durante la transformación. La temperatura óptima para el co-cultivo depende del tipo de planta y explante, y se resalta que es mejor el uso de temperaturas cercanas o inferiores a 25 °C. Además, temperaturas por encima de 25 °C causan un mayor necrosis del tejido y una reducción en la tasa de transformación (Salas *et al.*, 2001; Chakrabarty *et al.*, 2002).

En general las condiciones de luz durante el co-cultivo varían considerablemente si se compararan diferentes protocolos de transformación de plantas y este factor no ha sido evaluado ampliamente. Zambre *et al.* (2003) utilizó callos de *Phaseolus acutifolius* y segmentos de raíz de *A. thaliana* en co-cultivo con *Agrobacterium* con diferentes condiciones de luz como oscuridad continua, fotoperiodo 16h luz/ 8h oscuridad y luz continua. En este estudio se concluyó que la actividad del gen GUS está altamente correlacionada con el período de luz, siendo mayor la actividad cuando se utilizó luz continua para los dos tipos de explantes.

Hasta hace muy poco *Agrobacterium* era el único genero conocido con la capacidad para transferir genes en las plantas. Sin embargo muy recientemente se ha demostrado que otras especies de bacterias incluyendo, *Rhizobium sp.* NGR234, *Sinorhizobium meloti* y *Mesorhizobium loti* pueden volverse competentes para integrar genes en las plantas si se les introduce un plásmido Ti desarmado y un vector binario (Broothaerts, *et al.*, 2005). Es posible que en el futuro, otras bacterias se conviertan en una alternativa para la transferencia de genes en las plantas. Basados en esta información, la posibilidad de crear sistemas de transformación usando otro vector biológico, podría

eficientar los porcentajes de transformación de las especies de cactáceas que se lograron transformar, así como obtener resultados positivos en las que no mostraron la producción de raíces en esta investigación.

La naturaleza transgénica de las raíces generadas por la infección con *A. rhizogenes* fue confirmada mediante ensayos histoquímicos GUS y análisis de PCR. La actividad GUS se demostró en raíces transformadas en 4 de las 8 especies de cactus probadas. Las frecuencias de GUS raíces positivas variaron de 25 a 69 % en el susceptibles especies (Tabla 8, Fig. 21). En las especies positivas para la formación de raíces y para el análisis de GUS, los resultados de PCR también fueron positivos, ya que se encontraron fragmentos amplificados de 1200, 780 y 517 pb en el ADN, que coinciden con los genes GUS, rolB y nptII. En el total de las muestras de raíces analizadas, el fragmento de 450 pb correspondiente al gen virD1 no se ha encontrado, por lo que el posibilidad de que los resultados sean causados por contaminación con *A. rhizogenes* se descarta (fig. 2). Es además, de todas las especies que generaron raíces en el medio de selección mostraron raíces que no presentaron actividad de GUS, por lo tanto, estas raíces se consideraron los escapes. La presencia de una proporción significativa de escapes en algunas de las especies susceptibles, podría ser debido al hecho de que la sensibilidad a la kanamicina entre especies de cactus ensayados es diferente. En estos experimentos sólo una concentración de kanamicina se utilizó para todas las especies analizadas.

Los genes marcadores desempeñan un papel crucial en los procedimientos de transformación, Los marcadores de selección confieren un fenotipo dominante en las células transformadas porque invariablemente causan la adición de un nuevo carácter no asociado normalmente con las células sin transformar. Los caracteres que pueden ser usados para seleccionar células transformadas de células no transformadas se dividen en dos clases: aquellos que confieren o viabilidad o letalidad celular en presencia de un agente selectivo; y aquellos que confieren a las células transformadas alguna característica física distinguible. Las frecuencias de transformación de células vegetales son generalmente bajas, así que muchos sistemas de transformación usan marcadores que aseguren la supervivencia de las células transformadas en presencia de un agente selectivo.

CUANDO SE DESARROLLA UN PROCEDIMIENTO DE SELECCIÓN CON UN GEN MARCADOR DEBEN CONSIDERARSE TAMBIÉN LA NATURALEZA DEL TEJIDO DIANA Y EL SISTEMA DE INTRODUCCIÓN DEL ADN. Por ejemplo, los tejidos verdes pueden ser más sensibles a agentes que afecten a procesos localizados en plastos que las células de callo. Además, la exposición de las células del callo a elevados niveles de estos agentes durante el proceso de selección pueden afectar a la regeneración de las plantas verdes o al desarrollo plastídico. Con otros agentes selectivos, la supervivencia de células transformadas bajo condiciones selectivas puede verse afectada por la liberación de compuestos tóxicos (por ejemplo compuestos fenólicos) por las células no transformadas circundantes. Los marcadores de selección que requieren un agente selectivo pueden no ser muy útiles en los procedimientos de selección como el desarrollo de quimeras a elevada frecuencia. Esto es debido a que los sectores transformados de las plantas quiméricas frecuentemente dependen de las células no transformadas para el aporte de nutrientes. Por ello se han usado marcadores visibles para seleccionar plantas quimeras generadas por biolística en meristemas apicales.

Además, otro factor importante es el agente selectivo, este suele ser un antibiótico o un herbicida. Dentro de estos genes el más utilizado, es el gen de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) que confiere resistencia frente a antibióticos de la familia de los aminoglicósidos, como la kanamicina (Dolgov y Firsov, 1999). Son pocas las excepciones en que se ha utilizado el gen de resistencia a higromicina (*hpt*) (Dolgov y Firsov, 1999) o el gen de resistencia al herbicida 'basta' (Druart *et al.*, 1998).

Por último la elección correcta del agente de información es necesaria para el éxito de un sistema de transformación, estos agentes suelen ser genes que codifican para enzimas que actúan sobre sustratos cromogénicos, fluorogénicos o emisores de fotones, de tal manera que cuando añadimos el sustrato al medio podemos identificar las células transformadas visualmente. El más usual, el sistema de gen marcador de la D-glucuronidasa (GUS, *uidA* o *gusA*) se ha probado que resulta muy versátil en numerosas investigaciones, aislado de *E. coli.*, que hidroliza β -glucurónidos (Vancanneyt *et al.*, 1990) y aparece un precipitado azul sobre las células transformadas. Una limitación típica de este

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sistema, sin embargo, es que el procedimiento histoquímico para la detección de la expresión de GUS requiere generalmente sacrificar el tejido. Por ello también se han desarrollado marcadores usados para visualizar la expresión génica en tejidos vegetales vivos. Alguno de estos ya se han constituido como marcadores muy útiles para la transformación de la planta entera (Meyer *et al.*, 1987; Herman & Marks, 1989) o para determinar el destino de las células transformadas en tejidos quiméricos. Los marcadores histológicos confieren fenotipos distinguibles en presencia de un sustrato que es suplementado de manera exógena. Los agentes histológicos clásicos incluyen sustratos cromogénicos que reaccionan con constituyentes celulares (Gahan, 1984; Vaughn, 1987). Los anticuerpos también pueden ser usados para detectar proteínas en un procedimiento conocido como inmunohistoquímica (Harlow y Lane, 1988; Harris y Outlaw, 1990). De forma similar, la expresión génica en cuanto a niveles de mRNA puede ser visualizada por hibridación *in situ* (Raikhel *et al.*, 1989). El uso de marcadores morfológicos en la transferencia génica a plantas se ve incrementado a medida que el control de los genes relacionados con caracteres morfológicos se va haciendo posible. Las plantas transgénicas que sobreexpresan peroxidasa extracelular son susceptibles de marchitarse, y la sobreexpresión de fitocromos tiene numerosos efectos pleiotrópicos. La morfología de las plantas que selectivamente expresan un producto tóxico de un gen en un tejido específico también puede ser detectada. Aprovechando que las plantas son organismos vistosamente coloreados, las mutaciones que afectan a la síntesis de pigmentos son raramente perjudiciales y se han usado de manera destacable como marcadores en plantas durante decenas de años. Muchos de los pigmentos más universales (y coloridos) únicos en plantas son las antocianinas o los compuestos similares relacionados con flavonoides. Hace unos años se clonaron un cierto número de genes asociados a la producción de antocianinas (Mol *et al.*, 1988; Ludwig y Wessler, 1990). Algunos de ellos son genes estructurales que codifican enzimas involucrados en la biosíntesis de las antocianinas, mientras que otras codifican factores en *trans* que regulan la expresión de los genes estructurales a nivel transcripcional.

CONCLUSIONES.

Bajo el esquema de multiplicación de brotes *in vitro* utilizando 1 mg L⁻¹ de BA para la generación de brotes a partir de areolas se obtuvieron respuestas significativamente mejores con todas las especies de trabajo.

Se logró desarrollar un sistema de multiplicación de brotes *in vitro* de *Echinopsis ancistrophora*, *E. mirabilis*, *E. huotii* subsp *vallegrandensis*, *Eriusyce aurata*, *Eulychnia breviflora*, y *Gymnocalycium chubutense* con buenos resultados comparados con sistemas de micropropagación para especies distintas; esto porque para estas especies no existe un sistema de multiplicación de brotes *in vitro* y estos resultados muestran el primer esquema que se reporta. Sin embargo, existe aún la posibilidad de mejorarlo realizando un escrutinio hormonal con mayores concentraciones de BA, 2iP y/o otras citocininas.

Se logró la transformación de *Echinopsis ancistrophora*, *E.mirabilis*, *E. huotii* subsp *vallegrandensis* y *Gymnocalycium chubutense* mediada por *A. rhizogenes*, destacando este punto ya que estos resultados muestran el primer sistema de transformación que se reporta. Por otro lado las especies *Eriusyce aurata*, *Eulychnia breviflora*, *Frailea castanea* (*Frailea asteroides*) y *Matucana madisoniorum* no respondieron a la infección por el método utilizado.

Se comprobó la presencia de los transgenes para GUS, ntpII y rolB mediante análisis histoquímicos (GUS) y PCR en las especies *Echinopsis ancistrophora*, *E.mirabilis*, *E. huotii* subsp *vallegrandensis* y *Gymnocalycium chubutense*.

BIBLIOGRAFÍA.

Anderson, E.F. 2001. The cactus family. Timber Press. Portland, Oregon.

Becard, G., y Fortin, J. A. 1998. Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed root. *New Phytol.* 108: 211-218.

Benítez Burraco, Antonio. 2005. Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas. Editorial Reverté. Barcelona, España.

Blanco, M., Valverde, R. y Gómez L. 2003. Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía Costarricense.* 27(1): 19-28.

Boase, M. R., Butler, R. C. and Borst, N. K. 1998. *Chrysanthemum* cultivar-*Agrobacterium* interactions revealed by GUS expression time course experiments. *Scientia Horticulturae.* 77: 89-107.

Boisson-Demier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Becard, G., Rosemberg, C., and Baker, D. G. 2001. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interact.* 695-700.

Broothaerts, W, Mitchell, H.J., Weir, B., Kaines, S., Smith, M.A., Yang, W., Mayer, J. E., Roa-Rodríguez, C. and Jefferson, R.A. 2005. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature.* 433 (7026): 583-584.

Cai, D. 2003. Sporamin-mediated resistance to beet cyst nematodes (*Heterodera schachtii* Schm.) is dependent on trypsin inhibitory activity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hairy roots. *Plant Molecular Biology.* 51: 839-849.

Casanova E, Trillas M.I., Moysset L. and Vainstein A. 2005. Influence of rol genes in floriculture. *Biotechnol Adv.* 23 (1): 3-39.

Chakrabarty, R. Viswakarma, N. ; Bhat, S. R. ; Kirti, P. B., Singh, B. D. and Chopra, V. L. 2002. *Agrobacterium* mediated transformation of cauliflower: optimization of protocol and development of Bt-transgenic cauliflower. *Journal of Bioscience.* 27 (5): 495-502.

Chilton, M. Tepper, D. A. Petit, David, C. Casse-Delbart, F. and Tempé, J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295: 432-434.

Chiu C., Niwa Y., Zeng W., Hirano T., Kobayashi H. and Sheen J. 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology* 6: 325-330.

Churiyah, G. A. and Bambang, P. 2011. Induction of *Trichosanthes cucumerina* var. *anguina* Hairy Roots Using *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 for Production of bioactive Protein. *Micribiology Indonesia.* 5 (3). 125-131.

CITES. 2013. Convención Sobre El Comercio Internacional De Especies Amenazadas De Fauna Y Flora Silvestres. Cuidados y Usos de las Plantas Suculentas. Usos de las Plantas Suculentas. Suculentas ante la Ley. <http://www.cites.org/esp/disc/how.php>

Confalonieri M., Belenghi B., Balestrazzi A., Negri S., Facciotto G., Schenone G. and Delledonne M. 2000. Transformation of elite white poplar (*Populus alba* L.) cv. "Vilafranca" and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Reports*, 19: 982 delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Reports.* 20: 706-711.

De Oliveira S.A., da Silva-Machado M.F.P., Prioli A.J. y Aparecida-Mangolin C. 1995. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *In Vitro Cellular and*

Developmental Biology-Plant 31: 47–50.

Dolgov S.V. and Firsov A.P. 1999. Regeneration and *Agrobacterium* transformation of sour cherry leaf discs. *Acta Horticulturae*, 484: 577-579.

Druart P., Delporte F., Brazda M., Ugarte-Ballon C., da Câmara Machado A., Laimer daCâmara Machado M., Jacquemin J. y Watillon B. 1998. Genetic transformation of cherry trees. *Acta Horticulturae*, 468: 71-76.

Eapen, S. 2003. Potential for rhizofiltration of uranium using hairy root cultures of *Brassica juncea* and *Chenopodium amaranticolor*. *Environmental Research*. 91 (2): 127-133.

Fullner, K. J.; Lara, J. C. and Nester, E. W. 1996. Pilus assembly by *Agrobacterium* TDNA transfer genes. *Science*. 173; 1107-1109.

Galán De Mera Antonio y Gómez Carrión José. 2001. *The cactus communities in Southern Peru. New data on Corryocaction brevistyli alliance.* *Acta Botánica Malacitana* 26. Laboratorio de Botánica, Universidad San Pablo-CEU, Lima, Perú.

García-Saucedo P.A., Valdez-Morales M., Valverde M.E., Cruz-Hernández A. y Paredes-López, O. 2005. Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80:215–219.

Generali M. C., Ríos W., Álvarez M. A., y Escandón A. S. 2006. Puesta a punto de un protocolo de agroinfección en *Calibrachoa excellens*. El uso de *Agrobacterium rhizogenes* como una herramienta para el mejoramiento en ornamentales. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires. 321-324.

Gómez Sánchez Antonio. 2006. Enciclopedia ilustrada de los cactus y otras suculentas. Editorial Floramedia. Madrid, España. 66.

Grevelding, C. Fantes, V., Kemper, E., Schell, J. and Masterson, R. 1993. Single-copy T-DNA insertions in *Arabidopsis* are the predominant form of integration in rootderived transgenics, whereas multiple insertions are found in leaf discs. *Plant Molecular Biology*. 23(4): 847-860.

Henzi, M.X., Christey, M.C, McNeil, D.L. 2000. Factors that influence *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). *Plant Cell Rep.* 19: 994-999.

Hernández H.M. y Godínez A. H. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26:33-52.

Hubstenberger J.F., Clayton P.W. and Phillips G.C. 1992. Micropropagation of cacti (Cactaceae). Bajaj Y.P.S. Ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 20: 49-68.

Hunt, D., Taylor, N. P. and Charles, G. 2006. International Cactaceae Systematics Group. "*The New Cactus Lexicon*". dh books,

Infante R. 1992. *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31:155-159.

Jin, S. G., Prusti, R. K., Roitsch, T., Ankenbauer, K. and Nester, E.W. 1993. The regulatory *virA* protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not function at elevated temperatures. *Journal of Bacteriology*. 175; 6830-6835.

Kiesling R, Larroca J., Faúndez L., Metzging D. y Albesiano S. 2008. Cactaceae. En: Zuloaga FO, M Belgrano & O Morrone (eds) *Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur* (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Volumen 2. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 107. www.mma.gob.cl/clasificacionespecies/.../Eriosyce_aurata.pdf

Kiesling, R. 2003. Flora de San Juan. República Argentina. Volumen II. Estudio Sigma.

Ko, T. S., Lee S, Krasnyanski S. and Korban S. 2003. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. *Theoretical and Applied Genetics*. 107 (3): 439-447

Kurtz, E. B. 1963. Pollen morphology of the Cactaceae. *Grana Palynol.* IV. 3:367–372.

Leuenberger, B. E. 1976. Die pollen Morphologie der Cactaceae *Dissertationes. Botanicae*, 1: 321.

Levitas G., Echenique V., Rubinstein C., Hopo E. and Mroginski L. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Ediciones Instituto Nacional De Tecnología Agropecuaria.

Mante S., Morgens P.H., Scorza R., Cordts J.M. and Callahan A.M. 1991. *Agrobacterium*-mediated transformation of plum (*Prunus domestica*L) hypocotyl slices and regeneration of transgenic plants. *Biotechnology*, 9: 853-857.

Mata-Rosas M., Monroy de la Rosa M.A., Moebius-Goldammer K. y Chávez-Ávila V.M. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 37:400-404.

Moyano, E., Katja, J., PaÈivi, T., Palazoan, J., Cusido, R., Ojeda-Zacarias, M., Rodriguez-Fuentes, H. y Gutierrez-Diez, A. 2009. Micro propagación de Cactáceas. VII Simposium-taller “Producción y Aprovechamiento del Nopal en el noreste de México”. *Revista Salud Pública y Nutrición*. Edición especial No. 2.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Nieto, I., Arellano, J. y Villarreal M. L. 2005. Obtención de raíces transformadas de *Solanum chrysotrichum*, para la producción de saponinas antifúngicas. Sociedad mexicana de biotecnología y bioingeniería.

Oksman-Caldentey, K., M. N. Sevón, L. Vanhala y R. Hiltunen. 1994. Effect of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism of transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 38: 263-272.

Olhoft, P and Somers, D. A. 2001. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA. *Plant Cell Reports*. 20; 706-711.

Olhoft, P. M. 2001. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary node cells. *Plant Cell Reports*. 20; 731-737.

Pelah D., Kaushik R.A., Mizrahi Y. y Sitrit Y. 2002. Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71:81-84.

Pérez Molphe Balch, E y Serna Pérez, A. 2004. Generación de raíces y plántulas transgénicas de toronja y lima dulce mediante el uso de *Agrobacterium rhizogenes*. *Revista Fitotecnica Mexicana*. 251-259.

Pérez-Molphe-B., E., y Ochoa-Alejo, N. 1998. Regeneration of Transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed tissues. *Plant cell* 17: 591-596.

Pérez-Molphe-Balch E, Suárez-Mercado RS, Dávila-Galván A, De la Rosa-Carrillo L.M.L, Chávez-Ortiz L.I. y González-Díaz, M.C. 2012. Desarrollo de raíces transformadas de cactáceas bajo diferentes condiciones de cultivo *in vitro*. Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Contribuciones Orales y Carteles V Congreso Mexicano de Cactáceas y Suculentas.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Pérez-Molphe-Balch E., Suárez-Mercado R.S., Dávila-Galván A., De la Rosa-Carrillo L.M.L., Chávez-Ortiz, L.I. y González-Díaz MC. 2012. Generación de raíces transformadas de Cactáceas a través de la infección *in vitro* con *Agrobacterium rhizogenes* A4. Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Contribuciones Orales y Carteles V Congreso Mexicano de Cactáceas y Suculentas.

Pérez-Molphe-Balch E. y Dávila-Figueroa C.A. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 38:73-78.

Pérez-Molphe-Balch, E., Ramírez-Malagón, R., Nuñez-Palenius, H.G., Ochoa-Alejo, N. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. ISBN 968-6259-62-7.

Pinaolm, T., Teemu H. T. and Kirsi-Marja, O. C. 2003. Effect of pmt gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. *Journal of Experimental Botany*. 54 (381): 203-11.

Quiala, E., Montalvo, G. y Matos, J. 2004. Empleo de la Biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas. *Biotecnología Vegetal* 4 (4): 195 – 199.

Quiala, E., Montalvo, Grecia y Matos, Jesús. 2007. Empleo de la Biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas*. 4 (3): 56-58.

Retes-Pruneda J. L., Valadez-Aguilar M., Pérez-Reyes M. E. y Pérez-Molphe-Balch E. 2007. Propagación *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). *Bol.Soc.Bot.Méx.*81.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Reyes Contreras, A. M., Almanza Sánchez, L., Sánchez Pérez, J. C. y Alvarado Rodríguez, M. 2008. Transformación genética de *Solanum cardiophyllum* mediada por *Agrobacterium rhizogenes*. Revista Investigación Científica, 4 (2), Nueva época.

Roberts, R. L., Metz, M., Monks, D. E., Mullaney, M. L, Hall, T. and Nester, E. W. 2003. Purine synthesis and increased *Agrobacterium tumefaciens* transformation of yeast and plants. Proceedings of the Natural Academy of Sciences. 100 (11): 6634- 6639.

Salas, M. G., Park S.H and Smith R.H. 2001. Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. Plant Cell Reports. 20; 701-705.

Sanford J.C. 1990. Biolistic plant transformation. Physiologia Plantarum, 79: 206-209.

Santos Díaz, M. S., Velásquez García, Y. y González Chávez, M. 2005. Producción de pigmentos por callos de *Mammillaria candida* SCHEIDWEILER (CACTACEAE). Agrociencia 39: 619-626. 2005.

Santos-Díaz M.D.S., Méndez-Ontiveros R., Arredondo-Gómez A. y Santos-Díaz M.D.L. 2003. *In Vitro* organogenesis of *Pelecypora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39:480–484.

Schneider K.E., Speranzini D. and Biggs A.R. 1992. Ontogeny of shoot regenerants on excised immature peach embryos. Canadian Journal of Plant Science, 72(2): 497-506.

Schuerman P.L. and Dandekar A.M. 1993. Transformation of temperate woody crops – Progress and Potentials. Scientia Horticulturae, 55: 101-124.

Sevon, N. and Oksman-Caldentey, K. M. 2002. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. Medical Plant. 10: 859-868.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Sheen J., Hwang S., Niwa Y., Kobayashi H. and Galbraith D. 1995. Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *The Plant Journal*, 8: 777-784.

Sistema de Información de Biodiversidad. Administración de Parques Nacionales. www.sib.gov.ar». <http://www.sib.gov.ar/ficha/PLANTAE>.

Smigocki, A.C. and Hammerschlag F.A. 1991. Regeneration of plants from peach embryo cells infected with a shooty mutant strain of *Agrobacterium*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116: 1092-1097.

Squeo F. A., Arancio G., Gutiérrez J. R., Letelier L., Arroyo M., León-Lobos P. y Rentería-Arrieta L. 2008. Flora Amenazada de la Región de Atacama y Estrategias para su Conservación. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena. VIII. 72.

Talou Rodríguez, J., Álvarez, M. A. y Giulietti, A. M. 1994. Cultivos de raíces transformadas: Producción de Soladina por *Solanum eleagnifolium Cav.* y de tiofenos por *Tagetes laxa Cabrera*. *Dominguezia*. 11 (1).

Tempe, J. and Casse-Delbart, F. 1989. Plant gene vectors and genetic transformation. *Agrobacterium* Ri plasmids in cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 6 *Molecular Biology of Plant Nuclear Genes* Eds. Academic Press. San Diego. 26-51.

Uhlig Matthias. 2005. Cactus y otras suculentas. Editorial Hispano Europea. Barcelona, España.

Vancanneyt G., Schmidt R., O'Connor-Sanchez A., Willmitzer L. y Rocha-Sosa M. 1990. Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular General Genetics*, 220: 245-250.

Wyka T., Hamerska M. and Wróblewska M. 2006. Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87:27–32.

Yamamoto T., Iketani H., Ieki H., Nishizawa Y., Notsuka K., Hibi T., Hayashi T. and Matsuta N. 2000. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Reports*, 19: 639-646.

Zambre, M., Terryn, N., Clercq, J., De Buck, S., Dillen, W., Van Montagu, M., Van Der Straeten, M. and Angenon, G. 2003. Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Planta*. 216; 580–586.

Zuo J., Niu Q.W., Ikeda Y. and Chua N.H. 2002. Marker-free transformation: increasing transformation frequency by the use of regeneration-promoting genes. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 173-180.

