



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y
APLICADAS.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

**Hacia el diseño del protocolo para obtener plantas
transgénicas de cactáceas.**

T E S I S

Para obtener el título de

LICENCIADO EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

QUE PRESENTA:

ALEJANDRA LARA VARGAS

Director de Tesis:

DRA. SVETLANA SHISHKOVA

Sinodales:

- **Presidente Dra. Carmen Nina Pastor Colón**
 - **Secretario Dra. Verónica Lira Ruan**
- **Suplente 1 Dr. Gustavo Rodríguez Alonso**
- **Suplente 2 Dra. Elizabeth Cordoba Martínez**

Cuernavaca, Morelos

Febrero 2023

Esta tesis se llevó a cabo en el Instituto de biotecnología de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Svetlana Shishkova, en el laboratorio de Biología del desarrollo de la raíz. El proyecto fue parcialmente financiado por los donativos UNAM-DGAPA-PAPIIT IN201318, IN210221 y CONACyT CF2019-30430.

Alejandra Lara Vargas recibió una beca por concepto de titulación de licenciatura de los proyectos IN201318 y IN202022.

Agradecimientos

A mi familia por haberme dado los medios para poder desarrollar mi carrera académica, sin ellos nada de lo que he logrado sería posible. A mi padre por siempre darme los recursos necesarios para poder estudiar, a mi madre porque sin ella yo no hubiera podido llegar tan lejos ayudándome en todo momento. A mi abuela, por ser mi gran amiga y confidente toda la vida, quien no pudo ver este momento, pero a quien llevo todo el tiempo en la mente y corazón. A mi hermano, por estar allí conmigo.

A la Dra. Svetlana Shishkova por todo su apoyo en el tiempo que desarrolle tanto mi primera estancia de investigación como mi tesis, gracias por su disponibilidad y enseñanzas, las llevaré conmigo toda la vida.

Al Dr. Gustavo Rodríguez Alonso por toda la ayuda técnica y académica en la realización de este trabajo. Por brindarme su apoyo, pero sobre todo su amistad en momentos muy difíciles e importantes de mi vida, por pasar tantos momentos de alegría y enseñanza; nunca olvidaré todos los consejos, anécdotas y siempre estaré agradecida contigo.

A la Dra. Selene Napsucialy Mendivil, por todo su apoyo técnico durante la realización de este trabajo.

A la IBI. Marcela Ramírez Yarza por todo su apoyo técnico durante la duración de este trabajo.

A la Dra. María del Rocío Reyero Saavedra por su ayuda en la modificación de figuras dentro de la tesis.

A mis compañeros del laboratorio: Héctor, Pablo, Sofía, Ramcés García, Mayra, Felipe; por siempre ayudarme en lo que necesitara, pasar momentos tan divertidos y ser un gran laboratorio. Los llevaré siempre en el corazón.

A los licenciados Kimberly Castañeda Gutiérrez y Jair Flores por ser mis grandes amigos y cómplices en esa etapa de mi vida, son los mejores amigos que la Universidad me pudo dar.

Al M.C. Enrique Raúl Olguin por estar conmigo casi toda mi etapa universitaria; por ser mi apoyo en momentos sumamente complicados, pero también por darme momentos de suma felicidad, por abrirme las puertas de tu casa y corazón, muchas gracias.

Al Dr. Marco Antonio Rivera Islas, por todo su apoyo durante mi etapa universitaria y por ser un gran amigo en mi vida.

Índice General

Agradecimientos.....	4
Índice de tablas y figuras.....	7
Lista de abreviaturas.....	8
Resumen.....	9
Abstract.....	10
Introducción.....	11
La familia <i>Cactaceae</i>	11
Morfología de las cactáceas.....	11
Subfamilias de la familia <i>Cactaceae</i>	11
Estructura de la raíz.....	13
.....	14
Tipos de crecimiento de la raíz.....	14
Regulación genética del mantenimiento del meristemo apical de la raíz.....	15
Inducción y propagación de callos <i>in vitro</i> : el papel de las fitohormonas auxina y citocinina.....	16
Papel de la auxina y citocina en la organogénesis <i>in vitro</i>	17
Antecedentes.....	17
Justificación.....	19
Objetivo General.....	20
Objetivos particulares.....	20
Materiales y métodos.....	21
Esterilización y germinación de semillas.....	21
Análisis de tipo de crecimiento de raíz primaria.....	21
Inducción de callos.....	22
Propagación de callos.....	22
Regeneración de brotes a partir de los callos.....	22
Ensayos de resistencia a antibiótico kanamicina.....	22
Resultados.....	23
Análisis del tipo de crecimiento de la raíz primaria de <i>Mammillaria haageana</i> y <i>Echinopsis mirabilis</i>	23
Inducción y propagación de callos de <i>Mammillaria haageana</i> y <i>Echinopsis mirabilis</i>	25
Experimentos de regeneración de brotes a partir de los callos de <i>Mammillaria haageana</i> y <i>Echinopsis mirabilis</i>	26

Discusión.....	39
Conclusiones.....	44
Perspectivas.....	45
Referencias	46

Índice de tablas y figuras

Figura 1.- Estructura general de la raíz en *Arabidopsis thaliana*.

Figura 2.- Plántulas de *Mammillaria haageana* y *Echinopsis mirabilis* al microscopio estereoscópico.

Figura 3.- Raíces aclaradas de *Mammillaria haageana* y *Echinopsis mirabilis* observadas al microscopio óptico.

Figura 4.- Obtención de los explantes utilizados en la inducción de callos.

Figura 5.- Callos generados a partir de los individuos 1, 3, 5, 8-11 de *Mammillaria haageana*.

Figura 6.- Callos generados a partir de los individuos E1, E2, E3 y E4 de *Echinopsis mirabilis*.

Figura 7.- Brotes obtenidos a partir de callos de *Mammillaria haageana* en medio Medio Inductor de Brotes.

Figura 8.- Brotes obtenidos a partir de callos de *Mammillaria haageana* en medio Medio Inductor de Callos.

Tabla 1.- Resultados del primer experimento de análisis de la tolerancia a kanamicina de los callos no transformados M3 de *Mammillaria haageana*.

Tabla 2.- Resultados del primer experimento de análisis de la tolerancia a kanamicina de los callos no transformados M5 de *Mammillaria haageana*.

Tabla 3.- Resultados del primer experimento de análisis de la tolerancia a kanamicina de los callos no transformados M10 de *Mammillaria haageana*.

Tabla 4.- Resultados del primer experimento de la tolerancia a kanamicina de los callos no transformados E1 de *Echinopsis mirabilis*.

Tabla 5.- Resultados del primer experimento de la tolerancia a kanamicina de los callos no transformados E2 de *Echinopsis mirabilis*.

Tabla 6.- Resultados del primer experimento de la tolerancia a kanamicina de los callos no transformados E3 de *Echinopsis mirabilis*.

Tabla 7.- Resultados del primer experimento de la tolerancia a kanamicina de los callos no transformados E4 de *Echinopsis mirabilis*.

Tabla 8.- Crecimiento de callos de *Mammillaria haageana* y *Echinopsis mirabilis* en medio Medio Inductor de Callos sin kanamicina.

Lista de abreviaturas

ANA	Ácido Naftalenácetico
BA	Bencilaminopurina
d.p.g.	Días post germinación
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGTA	Ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)- <i>N,N,N,N</i> -tetraacetic acid
GFP	Green fluorescent protein
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de Magnesio heptahidratado
KOH	Hidróxido de Potasio
LS	Linsmaier y Skoog
MIB	Medio inductor de brote
MIC	Medio inductor de callos
MTSB	Microtubule stabilizing buffer
mL	Mililitro
mg/L	Miligramos sobre litros
mm	Milimetro
NaI	Yoduro de sodio
RAM	Root Apical Meristem
SCR	SCARECROW
SHR	SHOOT ROOT
μ m	Micrometros

Resumen

La familia *Cactaceae* abarca aproximadamente 1600 especies descritas, muchas de ellas se han adaptado exitosamente a los ambientes áridos y semiáridos. En trabajos previos del laboratorio se ha reportado que varias especies pertenecientes a la familia *Cactaceae* presentan el patrón de crecimiento determinado de la raíz primaria como consecuencia del agotamiento del meristemo apical de la raíz (RAM por sus siglas en inglés) (Dubrovsky 1997, Shishkova *et al.* 2013). Una vez que el RAM se agota, es decir, en el ápice de la raíz ya no quedan células con capacidad de dividirse; todas las células se diferencian y la raíz cesa su crecimiento. Se ha sugerido que el patrón de crecimiento determinado de la raíz primaria y las raíces laterales en cactáceas es una adaptación evolutiva, ya que esto permite a una planta desarrollar un sistema radical rápidamente y establecerse en ambientes áridos y semiáridos. Sin embargo, los mecanismos moleculares que están involucrados en el mantenimiento del RAM en cactáceas no se conocen. Para estudiar la regulación genética del mantenimiento y agotamiento del meristemo apical de la raíz en cactáceas, es necesario desarrollar un protocolo para obtener plantas transgénicas de cactáceas, por ejemplo, mediante el co-cultivo de explantes de plantas asépticas con *Agrobacterium tumefaciens*, la selección de los callos transformados y regeneración de plantas transgénicas completas. En este trabajo, se llevaron a cabo los pasos iniciales del desarrollo de dicho protocolo utilizando dos especies de cactáceas con ciclo de vida corto (~1.5-2 años desde la germinación hasta la floración), las cuales son *Mammillaria haageana* ssp. *haageana* y *Echinopsis mirabilis*. Se reportan las condiciones de inducción y propagación de los callos de las dos especies, así como regeneración de brotes a partir de callos de *M. haageana* que fueron propagados durante más de un año. Además, planeando el uso de kanamicina como agente selectivo en futuros experimentos de transformación analizamos la tolerancia de los callos no transformados a este antibiótico. Nuestros resultados muestran que las concentraciones de la auxina y citocinina utilizadas en el medio para inducir callos son apropiadas para la inducción y propagación de callos de ambas especies de cactáceas. Asimismo, encontramos que la concentración necesaria para prevenir el crecimiento de los callos no transformados es mayor para *E. mirabilis* que para *M. haageana*.

Abstract

The *Cactaceae* family includes ~1,600 species, most of them are well adapted to arid or semi-arid environments. In the previous work of the laboratory, it was reported that many *Cactaceae* species show determinate growth of the primary root as a consequence of root apical meristem (RAM) exhaustion (Dubrovsky 1997, Shishkova et al. 2013). Upon RAM exhaustion, all cells of the root apex differentiate and the root stops growing. It has been suggested that the determinate root growth of the primary and lateral roots of *Cactaceae* represents an evolutionary adaptation, allowing rapid seedling establishment in desert environments. Nevertheless, the molecular mechanisms of RAM maintenance and determinate root growth in the *Cactaceae* family are poorly understood. In order to study genetic regulation of the RAM maintenance and exhaustion a protocol to obtain transgenic *Cactaceae* plants is needed, for example, via in vitro transformation of plant explants by *Agrobacterium tumefaciens*, selection of transgenic calli and subsequent plant regeneration. In this work, the initial steps of the development of such a protocol for two species with a short life cycle (~ 1.5-2 years from germination to flowering), namely, *Mammillaria haageana* ssp. *haageana* and *Echinopsis mirabilis*, were performed. We report conditions for induction and propagation of calli of both *Cactaceae* species, and for regeneration of shoots from calli of *M. haageana* cultivated for more than a year. Furthermore, for the planned employment of kanamycin as a selective agent in the future transformation experiments, we estimate tolerance of non-transformed calli to this antibiotic. We showed that the induction and propagation of calli from both species were successful, and for *M. haageana* we obtained regenerants from calli. The kanamycin concentration that prevents growth of the non-transformed calli, was higher for *E. mirabilis* than for *M. haageana*.

Introducción

La familia *Cactaceae*

La familia *Cactaceae* incluye ~1600 especies que, en su mayoría, se encuentran distribuidas a lo largo del continente americano. La mayoría de las especies se encuentran en las zonas áridas o semiáridas, aunque también podemos encontrarlas en zonas méxicas, es decir, con mayor humedad. Esta familia está dividida en cuatro subfamilias; para su descripción se utilizó principalmente el libro de Anderson (2001).

Morfología de las cactáceas

Las cactáceas cuentan con órganos comunes para las plantas angiospermas, las cuales son: raíz, tallo, hojas (que pueden ser modificadas en cactáceas), flores que pueden ser muy variables en distintas especies; frutos y semillas. Sin embargo, como las cactáceas están adaptadas a la supervivencia en climas áridos y semiáridos, estos órganos pueden tener características morfológicas particulares, como son: presencia de areolas en el tallo, característica única dentro de la familia *Cactaceae*, que son brotes modificados a partir de las cuales se desarrollan espinas, flores y gloquidias; también en tres de las cuatro subfamilias (*Cactoideae*, *Opuntioideae* y *Maihuenioideae*) se aprecia la succulencia en el tallo (Anderson 2001). Además, la mayoría de las raíces de las cactáceas generalmente se extienden cerca de la superficie del suelo; lo que les permite absorber el agua de un modo mucho más eficiente durante las escasas precipitaciones (Dubrovsky 1997).

Subfamilias de la familia *Cactaceae*

La subfamilia *Cactoideae* es la más extensa y alberga aproximadamente 1200 especies dentro de 110 géneros. Los miembros de esta subfamilia se caracterizan por presentar tallos succulentos, sin hojas verdaderas; en su lugar desarrollan espinas (hojas modificadas) que emergen de las areolas (brotes modificados) en los tallos. Normalmente se encuentran en zonas áridas y semiáridas, aunque algunas especies epifitas pueden desarrollarse en zonas méxicas. Dentro de esta subfamilia

se encuentran las dos especies en las que se enfocará este proyecto: *Mammillaria haageana* ssp. *haageana* y *Echinopsis mirabilis*.

La subfamilia *Opuntioideae* está compuesta por plantas que generalmente son arbustivas, aunque existen algunas especies arborescentes, con tallos generalmente segmentados y frecuentemente aplanados. Además, las areolas presentan no solo espinas grandes, sino también gloquidias, que son espinas cortas y delgadas, generalmente poco visibles. Las areolas pueden desarrollar también hojas, las cuales suelen ser no planas, pequeñas y en muchas especies, pero no siempre, efímeras. Las flores usualmente son laterales, sésiles y diurnas. La subfamilia está dividida en aproximadamente 15 géneros, cuyas especies se distribuyen usualmente en zonas áridas, semiáridas y mésicas.

Las plantas de la subfamilia *Pereskioideae* pueden ser arbustos o trepadoras; los tallos son redondos, tienen areolas con hojas verdaderas y espinas. Pueden presentar flores solitarias o en forma de inflorescencias. Antes en esta subfamilia se reconocía un solo género *Pereskia*, pero posteriormente se dividió en dos géneros y dos subfamilias, respectivamente: *Pereskia* y *Leuenbergeria* (Walker *et al.* 2018), con 17-18 especies en total, las cuales se encuentran distribuidas desde Argentina hasta México, principalmente en zonas mésicas (Anderson 2001).

Por último, la subfamilia *Maihuenioideae* contiene solamente dos especies del género *Maihuenia*, su distribución es restringida a Chile y Argentina. Las plantas de esta subfamilia tienen tallos cortos, suculentos y cilíndricos; hojas pequeñas (redondeadas o cilíndricas) y persistentes (Anderson 2001).

Para prosperar en ambientes áridos y semiáridos, muchas especies de cactáceas han desarrollado adaptaciones, por ejemplo, la suculencia del tallo que les permite albergar agua y nutrientes o el patrón de crecimiento determinado de la raíz primaria que se ha visto involucrado en el establecimiento de la planta.

Estructura de la raíz.

La raíz es el órgano encargado de funciones esenciales como el anclaje y establecimiento de la planta, así como absorción, transporte de agua y nutrientes disueltos en ella (Taiz & Zeiger 2006) y, en algunos casos, puede almacenar nutrientes. Se han descrito tres zonas de desarrollo en la raíz (Figura 1): en el ápice de la raíz se encuentra la zona meristemática, o el Meristemo Apical de la raíz (RAM por sus iniciales en inglés “Root Apical Meristem”), que es una región con una alta tasa de división celular, en donde se originan las células responsables del crecimiento longitudinal de la raíz.

Cuando las células dejan de dividirse, se desplazan de la zona meristemática a la zona de elongación, en donde ocurre el alargamiento celular longitudinal. Luego, las células totalmente elongadas entran a la zona de diferenciación, o de maduración, que es la región en donde las células se diferencian, es decir, alcanzan las características particulares que las distinguen en tipos celulares específicos. En esta zona las células epidérmicas de la raíz desarrollan pelos radicales, los cuales participan en la absorción de agua y nutrimentos (Taiz & Zeiger 2006, Verbelen *et al.* 2006). Adicionalmente, en el ápice de la raíz encontramos la cofia o caliptra, cuya función principal es proteger a la zona meristemática de daños mecánicos. También, las células de cofia perciben varios estímulos, por ejemplo, de la gravedad y secretan mucopolisacáridos, mejor conocidos como mucilago, que favorece que la raíz pueda penetrar en el suelo (Taiz & Zeiger 2006).

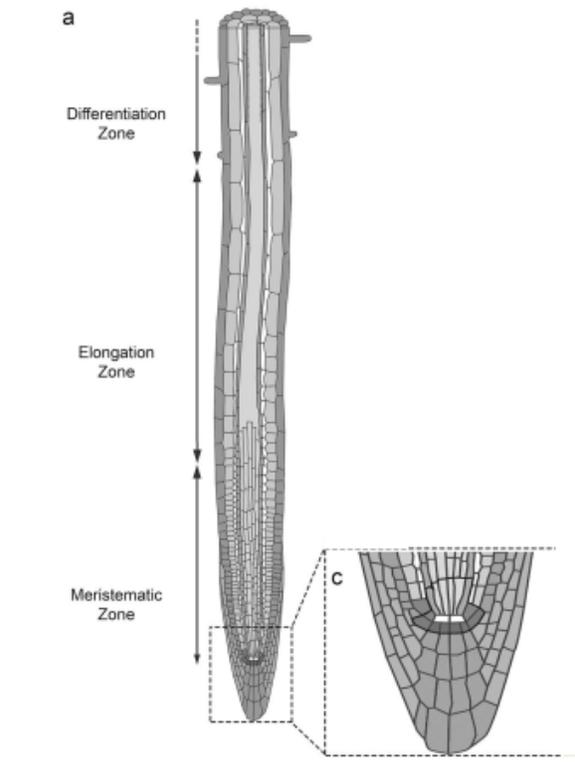


Figura 1. Estructura general de la raíz. Se muestran las tres zonas de desarrollo. (tomado y modificado de Rodríguez-Alonso *et al*, 2018).

Tipos de crecimiento de la raíz

Generalmente, en la raíz las tres zonas de desarrollo descritas anteriormente están activas por largos periodos, a este tipo de crecimiento se le denomina crecimiento indeterminado de la raíz. A diferencia de esto, en el crecimiento determinado de la raíz, el RAM está activo por un periodo corto; después de esto, todas las células del ápice de la raíz se diferencian como consecuencia del agotamiento del meristemo y por lo tanto, la raíz deja de crecer (Dubrovsky 1997).

Se ha propuesto que el crecimiento determinado de la raíz primaria de cactáceas podría tener un impacto en un establecimiento rápido de la plántula debido a la inducción temprana de raíces laterales, como se demostró en *Stenocereus gummosus*, además del desarrollo de pelos radicales en toda la superficie de la raíz como consecuencia de diferenciación de todas las células del ápice de la raíz, lo que favorece una captación más eficiente de agua, escasa en zonas áridas y semiáridas (Dubrovsky 1997).

Regulación genética del mantenimiento del meristemo apical de la raíz.

Los mecanismos moleculares del crecimiento determinado de la raíz de cactáceas no se conocen. La mayor parte del conocimiento de los mecanismos genéticos del desarrollo de la raíz se obtuvo en estudios de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), los cuales permitieron describir varias vías de mantenimiento del RAM. Una de estas vías depende de los genes parcialmente redundantes *PLETHORA* (*PLT*): *PLT1*, *PLT2*, *PLT3*, y *PLT4*, también llamado *BABY BOOM* (*BBM*) pertenecientes a la superfamilia AP2/ERF. Los factores de transcripción *PLT* están implicados en la especificación del centro quiescente, mantenimiento del RAM y la definición de zonas de desarrollo de la raíz. Las plantas mutantes de *plt1 plt2* tienen una raíz primaria más corta, la cual termina su crecimiento poco tiempo después de la germinación, debido al agotamiento del RAM. Es decir, la raíz primaria de las mutantes dobles *plt1 plt2* tiene crecimiento determinado (Aida *et al.* 2004; Galinha *et al.* 2007). Otra vía de mantenimiento del RAM en *Arabidopsis* incluye los cofactores de transcripción *SCARECROW* (*SCR*) y *SHORT-ROOT* (*SHR*) de la familia GRAS: las mutantes de pérdida de función *shr* y *scr* de esta especie modelo, muestran fenotipo de crecimiento determinado de la raíz primaria (Helariutta *et al.* 2000; Sabatini *et al.* 2003).

Como parte del estudio de los mecanismos de crecimiento determinado de la raíz en nuestro laboratorio, en 2018 se publicó el análisis del transcriptoma ensamblado *de novo* del ápice de la raíz de *Pachycereus pringlei*, especie perteneciente a la familia *Cactaceae*, en tres etapas de desarrollo de la raíz (Rodríguez-Alonso *et al.* 2018). En este artículo con la información disponible de los estudios de *Arabidopsis* también se infirió una red de regulación genética en el ápice de la raíz de *P. pringlei* y se propusieron genes candidatos a estar involucrados en el mantenimiento del meristemo apical de la raíz en cactáceas. Para poder analizar el posible papel de los genes candidatos en el agotamiento de la raíz de cactáceas, es necesario realizar su análisis funcional. Una de las herramientas más eficaces para este tipo de estudios es el análisis de plantas transgénicas con niveles de expresión reducidos o aumentados de los genes de interés. Uno de los métodos más utilizados para la obtención de las plantas transgénicas es la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Para transformar las cactáceas *in vitro*, está contemplado co-cultivar explantes de plantas con *Agrobacterium tumefaciens*,

obtener callos transgénicos y regenerar brotes a partir de ellos. En este trabajo se analizará la eficiencia de formación y propagación de los callos de las especies de nuestro interés

Inducción y propagación de callos *in vitro*: el papel de las fitohormonas auxina y citocinina

Los callos son un grupo de células poco diferenciadas con capacidad pluripotencial, que son capaces de regenerar a una planta completa (Jones *et al.* 2013). Los callos se obtienen a partir de órganos separados de las plantas, o sus partes, llamados explantes. Los explantes se colocan sobre medio de cultivo para la inducción de callos (MIC), el cual contiene altas concentraciones de las fitohormonas auxina y citocinina (Ikeuchi *et al.* 2013). Después de verificar que es posible inducir y propagar callos de manera *in vitro*, bajo ciertas condiciones estos han sido utilizados ampliamente en ensayos biotecnológicos, como es la transformación de plantas.

La auxina es una fitohormona que está involucrada en varios procesos durante el desarrollo de la planta, como son desarrollo de raíces y otros órganos, la polinización y fertilización, (Taiz & Zeiger 2006). También son moléculas de señalización clave en respuestas de tropismo a diferentes estímulos: como la gravedad, humedad, luz y obstáculos físicos.

Por su parte, las citocininas son fitohormonas que controlan la división celular y por lo tanto son importantes en el crecimiento y desarrollo de la planta. En presencia de una concentración aproximadamente igual de auxinas y citocininas en medios de cultivo, se induce la desdiferenciación y proliferación celular en los explantes, resultando en la formación de los callos *in vitro* a través del control de la actividad de las ciclinas dependientes de cinasas (Taiz & Zeiger 2006)

Se ha reportado que para la formación de callo a partir de explantes de varias especies vegetales es necesario adicionar a los medios de cultivo las fitohormonas auxinas y citocininas. Por lo general, una proporción intermedia de auxinas y citocininas en los medios de cultivo promueve la formación de callos, mientras que una proporción mayor de auxina que de citocinina promueve la formación de raíces, y con una proporción mayor de citocinina con respecto a auxina se promueve la formación de brotes (Skoog & Miller 1957), para pasar posteriormente, si así se desea, a la regeneración de plantas completas.

Papel de la auxina y citocina en la organogénesis *in vitro*.

Como se mencionó anteriormente, la organogénesis *in vitro* en gran parte depende de las proporciones de auxina y citocinina en el medio de cultivo. Es muy importante mencionar que también depende del genotipo de la planta (Shishkova *et al.* 2007). En general, se reconocen tres fases del proceso de regeneración de órganos, como brotes o raíces, a partir de los callos: primero, las células de los callos adquieren la capacidad de responder a las señales producidas por las fitohormonas para la producción de órganos; lo que corresponde a la segunda fase del proceso es la formación de brote (mayor concentración de citocinina con respecto a auxina) o de raíz (mayor concentración de auxina con respecto a citocinina) dependiente de las fitohormonas adicionadas al medio de cultivo. Por último, durante la tercera fase, la organogénesis continua independientemente de las fitohormonas exógenas (Munetaka 1999).

Antecedentes

Anteriormente en el laboratorio se han establecido las condiciones para la inducción y propagación de callos de *S. gummosus* y *Ferocactus peninsulæ* así como para la regeneración de raíces a partir de ellos (Shishkova *et al.* 2007).

En el trabajo mencionado se utilizaron 5 medios MIC para inducción de callos de *S. gummosus* y *F. peninsulæ*; se observó una mayor inducción de callos a partir de explantes provenientes de hipocótilo y cotiledones con respecto a los provenientes de explantes de raíz utilizando concentraciones altas de auxina (ANA, ácido 1-naftalenácético), 5 mg/L y de citocinina (BA, 6-bencilaminopurina), 5 mg/L, en este mismo medio los callos se propagaban más rápidamente que en los medios con menores concentraciones de auxina y/o citocinina. Tanto la inducción, como la propagación de callos fue más eficiente en condición de fotoperiodo de 12 h luz/oscuridad que en oscuridad continua (Shishkova *et al.* 2007). Utilizando varios medios con diferentes concentraciones de auxina y citocinina para inducir raíces fue posible regenerar raíces a partir de callos para ambas especies. Además, se evidenció que el genotipo de la planta de cada una de estas dos especies tuvo un

papel fundamental para lograr la regeneración de raíces y que las raíces regeneradas de los callos presentan el patrón de crecimiento determinado. Este hallazgo sugiere que el patrón de crecimiento determinado de la raíz de cactáceas es un carácter muy robusto y no depende del tipo de la raíz y, lo más importante, nos provee de un sistema útil para explorar la regulación genética del tipo de crecimiento de la raíz mediante la modificación de la expresión de genes en raíces de distintos tipos.

Posteriormente, se demostró la posibilidad de obtener callos transformados de *S. gummosus* con el fin de regenerar raíces transformadas a partir de ellos y realizar un análisis funcional de genes candidatos participantes en la regulación genética del mantenimiento y agotamiento del RAM. La transformación de *S. gummosus* se llevó a cabo con un co-cultivo de explantes con *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 con el plásmido pBI121-GFP que porta el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), bajo la regulación de un promotor constitutivo y el gen *nptII*, que confiere resistencia al antibiótico kanamicina (Moreno-Anzures 2010). En ese trabajo de tesis, partiendo de 100 plántulas se obtuvieron 200 explantes de cotiledón e hipocótilo de *S. gummosus*. Después del co-cultivo de los explantes con la bacteria, estos se colocaron en medio adicionado con el agente selectivo kanamicina; se desarrollaron callos a partir de siete explantes, cinco explantes de hipocótilo y dos de cotiledón, es decir, la eficiencia de transformación fue baja. Para varios de los callos transformados se detectó la expresión de la proteína verde fluorescente, o se demostró por PCR la integración del marcador de resistencia a kanamicina *nptII*. Sin embargo, no se logró regenerar raíces a partir de los callos transformados. En otro proyecto de tesis (Pacheco-Mendoza 2015) se transformaron explantes de *S. gummosus* y *F. peninsulae*, con la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*, la cual es menos agresiva y no tiende a resultar en necrosis de los explantes después del co-cultivo, pero tiene un intervalo de hospederos más pequeño: En el trabajo mencionado se obtuvieron los callos transformados de ambas especies, pero la eficiencia de transformación y el porcentaje de explantes que se necrotizaron sin inducir callos transformados, fueron similar a los de los experimentos con la cepa EHA105. Hasta el momento no se logró regenerar raíces a partir de los callos transformados.

Posteriormente, en el laboratorio se empleó otro enfoque, el de utilizar especies de cactáceas con ciclo de vida corto para poder regenerar plantas completas

transformadas y de ellas obtener las semillas transgénicas. Esto permitiría analizar el patrón de crecimiento de la raíz primaria después de modificar los niveles de expresión de los genes candidatos. Como primer paso en este camino, se ha establecido el protocolo de la regeneración de plantas a partir de callos de *Turbinicarpus pseudomacrolele* ssp. *minimus*, una especie con ciclo de vida corto. A partir de los callos generados de algunos individuos se logró obtener una gran cantidad, hasta varios cientos, de brotes regenerados, en medios para regenerar brotes (MIB) con altas concentraciones de BA y concentraciones bajas o nulas de auxina ANA (Hernández-Bermúdez trabajo de maestría). Sin embargo, no se llegó a desarrollar un protocolo de transformación, ya que las semillas de esta especie que estuvieron disponibles dejaron de germinar rápidamente.

Justificación

Actualmente no se conocen los mecanismos genéticos del mantenimiento y agotamiento del RAM que llevan al crecimiento determinado en la raíz primaria en cactáceas. Para investigarlos, es muy útil tener un protocolo para poder obtener plantas transgénicas de cactáceas con crecimiento determinado de la raíz primaria. Esto permitirá analizar el papel de los genes candidatos, ya sea inhibiendo o aumentando su expresión.. Si al realizar estas acciones el tipo de crecimiento de la raíz primaria en las plantas transgénicas se ve alterado, esto nos indicará que el gen analizado está involucrado en el control del crecimiento determinado. Lograr la transformación con especies de ciclo de vida corto como son *Echinopsis mirabilis* y *Mammillaria haageana*, da una ventaja sobre las otras especies analizadas, las cuales tienen ciclos de vida más largos. Además, *E. mirabilis* es una especie capaz de auto polinizarse permitiendo obtener semillas eficientemente en el invernadero del Instituto de Biotecnología-UNAM. Aunque *M. haageana* es una especie de polinización cruzada, la colaboración con investigadores del Jardín botánico de la UNAM tenemos acceso a semillas de esta especie. Para las especies con ciclo de vida corto es factible obtener las semillas transgénicas a partir de las plantas transformadas y así poder analizar el papel de los genes candidatos en la regulación del crecimiento determinado de la raíz primaria de las cactáceas.

La transformación de especies vegetales mediante *Agrobacterium tumefaciens* es uno de los métodos más eficientes para la obtención de plantas transgénicas. El desarrollo y estandarización del protocolo de obtención de plantas transgénicas de cactáceas con un ciclo de vida corto permitirá emplear su aplicación en la investigación de los mecanismos moleculares que regulan el crecimiento determinado de la raíz. En este trabajo de tesis se atendieron las primeras etapas de elaboración de dicho protocolo: se caracterizaron los procesos de inducción y propagación de callos de *E. mirabilis* y *M. haageana*, la tolerancia de callos no transformados de estas especies al antibiótico kanamicina y se exploró la posibilidad de obtener brotes a partir de los callos.

Objetivo General

Analizar la viabilidad de inducción y propagación de los callos, así como de la regeneración de brotes a partir de ellos, de las especies *Mammillaria haageana* y *Echinopsis mirabilis*.

Objetivos particulares

- Analizar el tipo de crecimiento de la raíz primaria de *M. haageana* y confirmar el crecimiento determinado de la raíz de *E. mirabilis*.
- Inducir y propagar callos de estas dos especies.
- Examinar la posibilidad de regenerar brotes a partir de los callos de estas dos especies.
- Evaluar la tolerancia al agente selectivo kanamicina de los callos no transformados de estas dos especies.

Materiales y métodos

Esterilización y germinación de semillas

Se trabajó con dos especies: *Echinopsis mirabilis* Speg. Y *Mammillaria haageana* ssp *haageana* Pfeiff. Las semillas de *M. haageana* y *E. mirabilis* fueron esterilizadas con una solución desinfectante Superkill (cloro comercial al 60% con 0.08% de Tritón X-100) durante 20 min, posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril de 10 min cada uno.

Las semillas esterilizadas se colocaron en cajas Petri en medio Linsmaier y Skoog (LS) 0.2x sin sacarosa, con 0.8% de agar. En todos los experimentos se utilizaron las cajas Petri con diámetro de 9 cm. Las cajas se dejaron en posición vertical en una incubadora a 28°C con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. En esta incubadora se realizaron todos los experimentos de la inducción y propagación de los callos y regeneración de los brotes.

Análisis de tipo de crecimiento de raíz primaria

Se llevó un registro de la longitud de la raíz primaria desde la germinación de la semilla hasta que la raíz primaria de la plántula cesó su crecimiento (los datos preliminares del laboratorio sugieren que la raíz primaria de las dos especies exhibe crecimiento determinado). Después de esto se tomaron fotografías de la plántula y su raíz primaria en el microscopio estereoscópico Olympus szx7 y el programa Infinity Capture. La raíz primaria de cada plántula analizada se aclaró conforme al siguiente protocolo: las raíces fueron cortadas con un bisturí del hipocótilo y se pusieron en solución de fijación la cual contiene 0.1% de Tritón X-100, 3% paraformaldehído y MTSB (Microtubule stabilizing buffer, que contiene 7.56 g de PIPES, 0.62 g de MgSO₄·7H₂O y 0.95 g de EGTA en 400 ml de agua estéril, ajustando el pH a 6.9 con KOH, (Pasternak, T. *et al.* 2015) al 0.2x. Una vez puestas en esta solución las raíces se incubaron en total oscuridad por 7 días a 4°C y después se cambiaron a una solución de cambio compuesta de glicerol al 30% y DMSO (Dimetilsulfóxido) al 2%. Las raíces se dejaron incubándose por 24 hrs en oscuridad a 4°C; después de esto se les retiró la solución de cambio y se añadió una solución de aclaración la cual contiene 17g de NaI, DMSO al 2%, glicerol 65%

y 0.04 g de tiosulfato de sodio en un volumen final de 25 mL. Una vez pasado este proceso las raíces se montaron en portaobjetos individuales y se observaron bajo el microscopio óptico Olympus BX 53, las fotografías se tomaron con la cámara Photometrics Cool SNAP cf. Se utilizó el programa QED Capture v2.033

Inducción de callos

Se cortaron plántulas de 3 a 4 semanas de edad con un bisturí estéril en dos o tres partes (explantes). Los explantes se trasladaron a cajas Petri con medio para inducción de callos (MIC), MS 1X con 5 mg/L de 6-Bencilaminopurina (BA), 5 mg/L de ácido 1-naftalenacético (ANA), 3% de sacarosa y 0.8% de agar. Después de adicionar hormonas el pH del medio se ajusta a 5.7. Todos los medios utilizados en este trabajo fueron autoclaveados a temperatura de 120° por 20 min en una autoclave "Tomy".

Propagación de callos

Cuatro semanas después de colocar los explantes en el medio MIC, los callos formados se cortaron con un bisturí estéril, tratando de separar los callos de los explantes. Tanto los callos como los explantes se subcultivaron en nuevas cajas Petri en el medio MIC fresco. Los siguientes subcultivos de los callos se efectuaron cada 4 semanas aproximadamente.

Regeneración de brotes a partir de los callos

Después de algunos subcultivos de los callos en el medio MIC, al formarse una cantidad considerable de callos, éstos se subcultivaron al medio MIC para propagación de los callos, y también a diferentes medios para regenerar brotes (MIB) en los que, en comparación con el medio MIC, cambió la concentración de auxina. El medio MIB1 tuvo 1 mg/L de ANA y 5 mg/L BA, el medio MIB2 tuvo 0.1 mg/L de ANA y 5 mg/L BA y el medio MIB3 tuvo 5 mg/L de BA; no se le adicionó ANA. Aproximadamente, 4 semanas después del primer subcultivo en los medios MIB se llevó a cabo segundo subcultivo de callos en el mismo medio MIB.

Ensayos de resistencia a antibiótico kanamicina

Se colocaron diez fragmentos de callos de un tamaño aproximado 7 mm de diámetro en cada caja con el medio MIC adicionado con kanamicina en distintas concentraciones: 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L y 200 mg/L, así como en el medio control sin kanamicina. Se utilizaron callos generados de las distintas plantas.

Durante cuatro semanas de cultivo, una vez por semana se escanearon las cajas para registrar el crecimiento y el estado de los callos en los cinco medios. Transcurridas las cuatro semanas, diez fragmentos de callo de un tamaño aproximado 7 mm de diámetro se cambiaron a medio fresco con la misma concentración de kanamicina y se cultivaron por cuatro semanas más.

Resultados

Análisis del tipo de crecimiento de la raíz primaria de *Mammillaria haageana* y *Echinopsis mirabilis*

Se germinaron las semillas de *M. haageana* y *E. mirabilis* en medio sólido LS 0.2X sin sacarosa, se registró el crecimiento de la raíz cada 24 horas a partir del momento de la germinación. A las 48 h después de la germinación era evidente la presencia de pelos radicales en el ápice de la raíz primaria, la cual era menor a 1 cm en todas las plántulas analizadas. En el caso de *E. mirabilis*, a las 24 horas después de la germinación se apreciaba la raíz primaria sin pelos radicales en el ápice, a las 48 h la mayoría de plántulas ya presentaban pelos radicales en el ápice y para las 72 h todas las plántulas analizadas ya presentaban pelos radicales en el ápice de la raíz. Una vez que se observaron pelos radicales emergiendo de células epidérmicas del ápice, se tomaron fotografías de las plántulas en el microscopio estereoscópico. Tanto *M. haageana* como *E. mirabilis* (Figura 2) presentaban pelos radicales en el ápice de la raíz, esto fue confirmado observando las raíces aclaradas en el microscopio óptico. En las fotografías obtenidas para *M. haageana* (Figura 3A) se aprecia la presencia de pelos radicales emergidos de células epidérmicas en el ápice, esto junto con el alargamiento de las células del ápice nos indican que todas las células de la raíz primaria están totalmente diferenciadas y, por lo tanto, el RAM se encuentra agotado. En el presente trabajo no se pudo obtener una fotografía de la raíz primaria con el RAM agotado de *E. mirabilis*: el ápice de la raíz que se veía en las preparaciones, al parecer, no fue la raíz primaria, sino, raíz lateral (Figura 3B). Sin embargo, el ápice de la raíz lateral observada estaba cubierto con pelos radicales, es decir, mostró signos de agotamiento del RAM, lo que sugiere que la raíz primaria o no se desarrolló, o su meristemo se agotó en menos de un día después de la germinación. El estudio más detallado del desarrollo de la raíz primaria de *E. mirabilis* y del tiempo de agotamiento de su RAM se realizó en la tesis de licenciatura de Corín Pacheco (Pacheco-Blancas 2022). En la Figura 3B se

aprecia la fotografía de una raíz lateral de primer orden de *E. mirabilis* a los 4 días post germinación (d.p.g.)



Figura 2.- Plántulas de *Mammillaria haageana* a los 2 d.p.g, magnificación 1.6x (A) y *Echinopsis mirabilis* a los 3 d.p.g, magnificación 1.25x (B). Barra de escala de 1 mm.

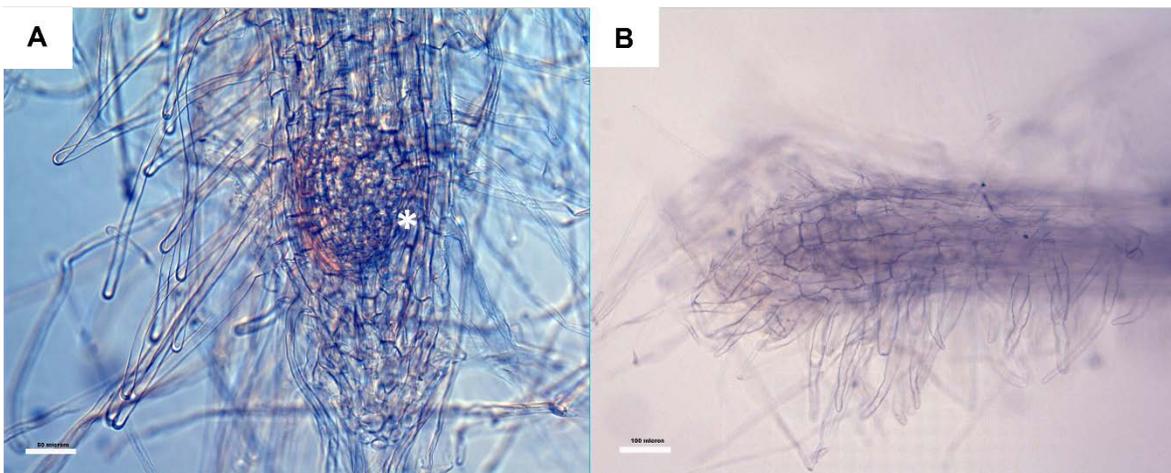


Figura 3. Ápice de la raíz primaria de *Mammillaria haageana* (A) y el ápice de una raíz lateral de *E. mirabilis* (B). A: Se observa la presencia de pelos radicales emergidos de las células epidérmicas del ápice de la raíz, y de un primordio de la raíz lateral muy cerca del ápice de la raíz primaria (señalado con un asterisco). B: Se observan pelos radicales emergidos de las células epidérmicas del ápice de la raíz lateral. Fotografías tomadas en microscopio óptico con el objetivo de 20x para *M. haageana* y de 10x para *E. mirabilis*, barra de escala igual a 50 μm para *M. haageana* y 100 μm para *E. mirabilis*.

Inducción y propagación de callos de *Mammillaria haageana* y *Echinopsis mirabilis*

Los brotes de las plántulas obtenidas de semillas germinadas de *M. haageana* y *E. mirabilis*, se cortaron en dos mitades, como lo muestra la Figura 4. Estos dos explantes de cada plántula fueron utilizados para la inducción de callo de ambas especies. Los explantes se colocaron en medio para inducción de callos (MIC) con 5 mg/L de ácido 1-naftalenácetico (ANA) y 5 mg/L de 6-bencilaminopurina (BA). Se observó la inducción de los primeros callos de *M. haageana* y *E. mirabilis* a los 15 y 20 días aproximadamente después de poner los explantes en medio MIC, respectivamente. Inicialmente, se obtuvieron callos de 11 individuos de *M. haageana* y de 6 individuos de *E. mirabilis*; después, por contaminación de algunos de los callos se siguieron propagando callos de 7 individuos de *M. haageana* (Figura 5) y de 4 individuos de *E. mirabilis* (Figura 6). Como ya se mencionó anteriormente, la especie *M. haageana* es de polinización cruzada y las semillas se obtuvieron del campo, lo más probable, los individuos tuvieron genotipos distintos. Con respecto a *E. mirabilis*, como la especie es de autopolinización y las semillas utilizadas provinieron de la misma planta madre, con una muy alta probabilidad el genotipo de los individuos fue el mismo. Los callos de *M. haageana* y *E. mirabilis* se indujeron durante los meses de febrero y abril de 2020, respectivamente, y desde entonces se estuvieron propagando en medio MIC y se utilizaron para los experimentos de los objetivos particulares 2, 3 y 4.

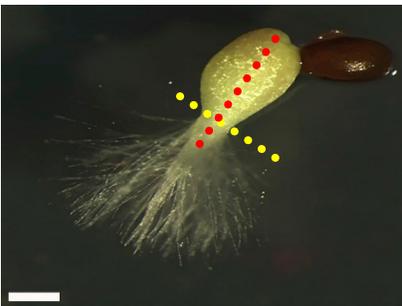


Figura 4. Obtención de los explantes utilizados en la inducción de callos. Las líneas punteadas muestran los cortes en el brote de las plántulas. Barra de escala de 1 mm.

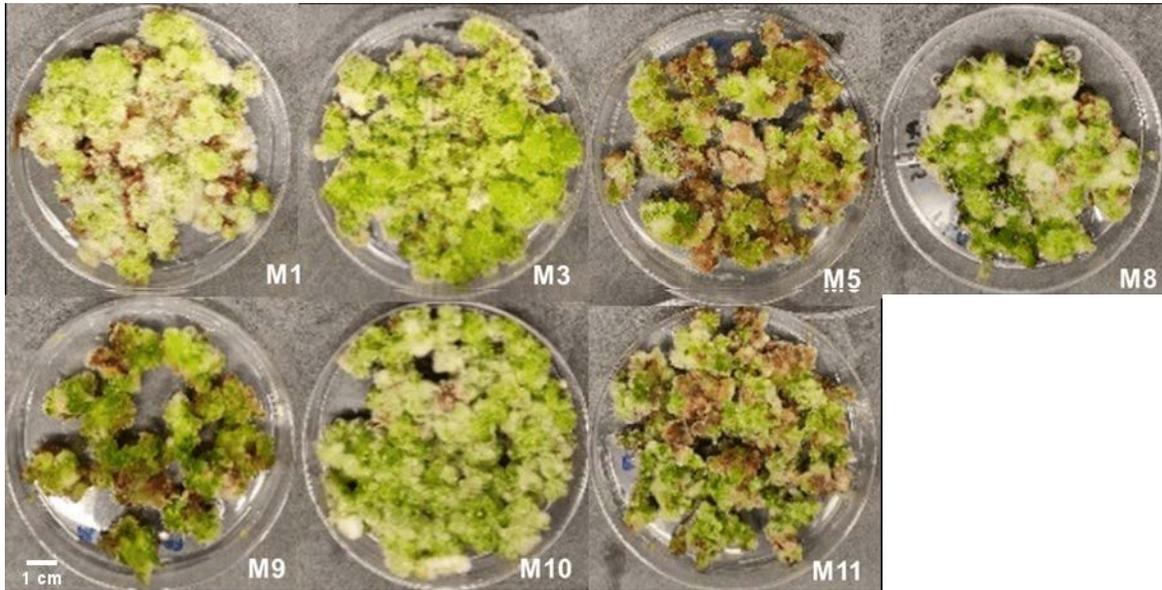


Figura 5. Callos generados a partir de los individuos 1, 3, 5, 8-11 de *Mammillaria haageana* (M1, M3, M5, M8-M11, respectivamente). Diámetro de la caja Petri = 9 cm.

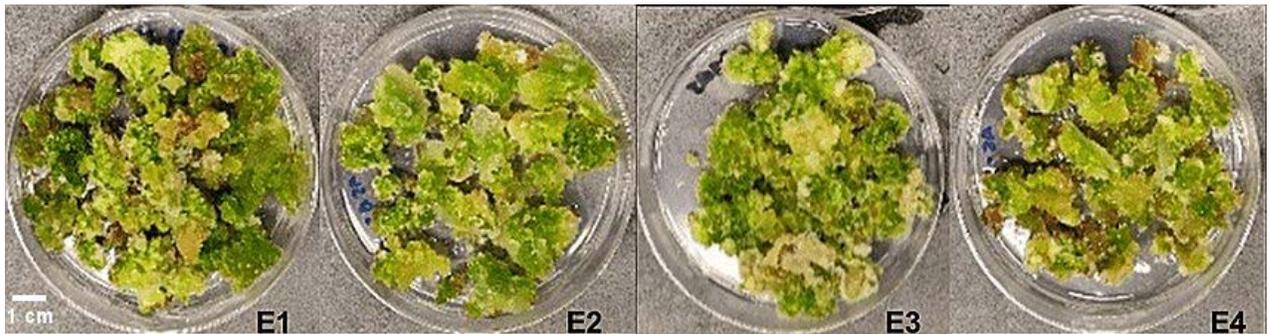


Figura 6. Callos generados a partir de los individuos 1, 2, 3 y 4 de *Echinopsis mirabilis* (E1, E2, E3 y E4, respectivamente). Diámetro de la caja Petri = 9 cm.

Experimentos de regeneración de brotes a partir de los callos de *Mammillaria haageana* y *Echinopsis mirabilis*

Realizamos el ensayo para examinar la posibilidad de regenerar brotes de ambas especies. Para esto subcultivamos callos propagados en medio MIC a tres medios inductores de brote (MIB1, MIB2 y MIB3), los que contenían la misma concentración de citocinina BA (5mg/L) y concentraciones variables de auxina ANA; el medio MIB 1 con 1 mg/L de ANA, el medio MIB2 con 0.1 mg/L de ANA y el medio MIB3 sin ANA.

Para *M. haageana* se obtuvieron brotes a partir de los callos M3, M8, M9, M10, en los medios MIB1 y MIB3. Los regenerantes se obtuvieron en el segundo subcultivo para M9 y M10, mientras que para los individuos M3 y M8 hasta el tercer subcultivo en los medios MIB (Figura 7). También, después de varios meses de propagación de los callos se obtuvieron brotes a partir de los callos M1, M5, M8 y M10 después de dejar los callos en la misma caja por aproximadamente 5 a 6 semanas en el medio MIC, durante las cuales se propagaron grandes cantidades de callo, se consumió el medio por completo y los callos empezaron a secarse (Figura 8). En resumen, se obtuvieron brotes a partir de los callos inducidos de seis plantas y no hubo regeneración de brotes a partir de los callos inducidos de solo una planta de *M. haageana*, M11.

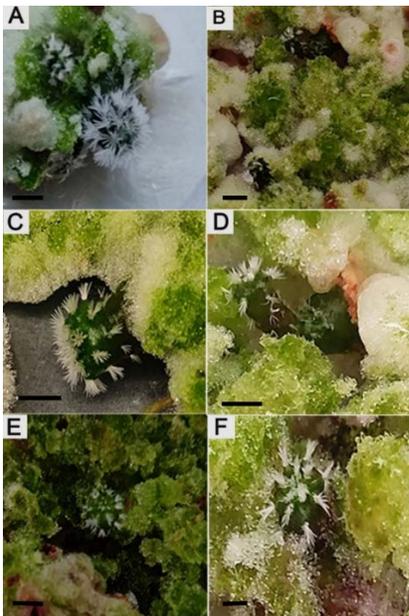


Figura 7.- Brotes obtenidos a partir de callos de *Mammillaria haageana* en medio MIB. Brotes emergidos a partir de callo: M8 en el medio MIB1 (A); M8 en el medio MIB3 (B), M9 en el medio MIB1 (C); M9 en medio MIB3 (D); M9 en medio MIB1 (E); M10 en medio MIB1 (F). Barra de escala de 0.5 cm.

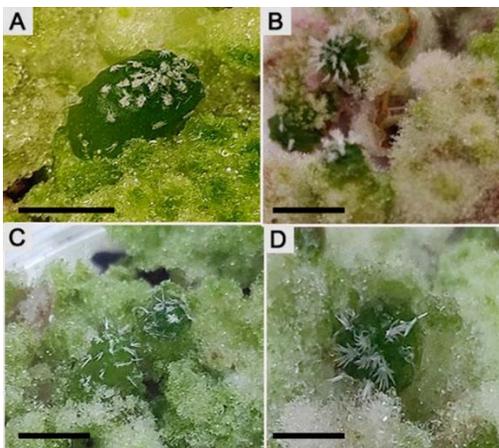


Figura 8.- Brotes obtenidos a partir de callos M1 (A), M5 (B), M8 (C), M10 (D) de *Mammillaria haageana* en medio MIC. Barra de escala de 0.5 cm.

Para *E. mirabilis* hasta el momento no se registró el desarrollo de brotes a partir de ningún callo en los medios utilizados.

Evaluación de la tolerancia al agente selectivo kanamicina en los callos no transformados de *Mammillaria haageana* y *Echinopsis mirabilis*.

En los experimentos de transformación tenemos planeado utilizar kanamicina como agente selectivo. Por esta razón, en el presente trabajo evaluamos la tolerancia de los callos no transformados de ambas especies al antibiótico kanamicina. Para esto, se cultivaron estos callos en medios con concentraciones crecientes del antibiótico. En estos experimentos se llevaron a cabo dos subcultivos, de 4 semanas. Al inicio de cada experimento se colocaron 10 fragmentos de callo de aproximadamente 7 mm de diámetro en cada una de cajas con medio MIC con las siguientes concentraciones de kanamicina: 0 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L y 200 mg/L; se monitoreó el comportamiento de los callos por 4 semanas y después de ello se realizó un segundo subcultivo en el medio correspondiente para cada grupo de callos por 4 semanas adicionales. Para el segundo subcultivo, se volvieron a colocar 10 fragmentos de callo de aproximadamente 7 mm de diámetro: dependiendo del crecimiento de los callos durante el primer subcultivo se tomó una parte de los fragmentos de callos, si se registró su crecimiento, o los callos completos cuando estos no crecieron. Para el segundo subcultivo se utilizaron medios con las mismas concentraciones de kanamicina. Se realizaron 2 réplicas independientes del ensayo para los callos M3, M5 y M10 de *M. haageana*. La elección de estos callos se debió a la disponibilidad de suficiente cantidad de callos recién propagados para el momento del inicio del experimento. En ambos experimentos independientes se obtuvieron resultados similares; en las tablas 1, 2 y 3 (4ta fila) se puede apreciar que durante el primer subcultivo de 4 semanas en medios con concentraciones ≥ 50 mg/L de kanamicina, los callos comenzaron a presentar signos de estrés, como cambio de coloración de verde a marrón claro u oscuro; la mayoría de los callos desde este primer subcultivo dejaron de crecer. Para los callos M10 (Tabla 3) en concentraciones ≥ 50 mg/L de antibiótico el callo presentó signos de estrés menos severo en comparación con los callos provenientes de M3 y M5: es decir, presentó un color marrón claro y un crecimiento

mayor. Finalmente, después del segundo subcultivo de 4 semanas, es decir, de 8 semanas de estar en contacto con el antibiótico, los fragmentos de callos M3, M5 y M10 en medios con concentraciones ≥ 50 mg/L de kanamicina (Tablas 1, 2, 3; última fila) presentaron signos claros de estrés: cambio de color a marrón oscuro y el cese del crecimiento, es decir, cada callo tuvo el mismo diámetro al inicio y al final del subcultivo. Sin embargo, se notó una diferencia entre el aspecto de callos generados de distintos individuos después de 8 semanas en el medio con la concentración de 25 mg/L de kanamicina: los callos de M3 presentan signos claros de estrés, mientras que para los callos M10 y M5 los signos de estrés fueron notablemente menores (Tabla 3).

Para *E. mirabilis* el ensayo se llevó a cabo del mismo modo descrito anteriormente; se utilizaron los callos obtenidos de todos los individuos que se propagaban para el momento de iniciar el experimento: E1, E2, E3 y E4. Para esta especie también se llevaron a cabo dos replicas independientes: en el primer experimento se realizaron ambos subcultivos de 4 semanas cada uno y en el segundo experimento solo alcanzamos a documentar los datos del primer subcultivo de 4 semanas. En ambos experimentos se obtuvieron resultados similares, para todos los callos analizados el efecto más fuerte en el cese del crecimiento y posible necrosis (el cambio de color de los callos a marrón) se registró en medios a partir de 50mg/L de kanamicina.

Al final de las primeras 4 semanas, los fragmentos de callos E1 (Tabla 4) en medios con las cuatro concentraciones de kanamicina presentaron signos de estrés, como cambio de coloración a un tono marrón claro; además, la mayoría de los callos en este primer subcultivo, cuando existe la posibilidad de que la kanamicina no penetra a todo el calo, crecieron. Durante el segundo subcultivo de 4 semanas los mismos callos se colocaron en medios con la misma concentración de antibiótico para aumentar la probabilidad de que este penetrara totalmente en cada fragmento: por esta razón los experimentos duraron 8 semanas. Para la semana 8 en todos los medios con kanamicina todos los callos detuvieron su crecimiento y presentaron un color marrón oscuro. Para los fragmentos de callos E2 (Tabla 5) después de 4 semanas se observó un incremento en los signos de estrés al presentar un cambio de color a marrón en todos los medios con kanamicina; al final de este tiempo los callos que estuvieron en medio con kanamicina dejaron de crecer. Para la octava semana, es decir, dos subcultivos de cuatro semanas, todos los callos en medio con kanamicina presentaban un color marrón y cesaron completamente su crecimiento.

Pasadas 4 semanas los fragmentos de callos E3 (Tabla 6) en concentraciones de 50 mg/L de kanamicina en el medio presentaron un color marrón claro, mientras que los fragmentos con otras concentraciones de kanamicina (25 mg/L, 100 mg/L y 200 mg/L) presentaron un color marrón oscuro. Después de 8 semanas la coloración de los fragmentos de callo fue similar a la descrita a las 4 semanas: los fragmentos en 50 mg/L de kanamicina en el medio presentaron un color marrón claro mientras que los fragmentos de callo en otras concentraciones de kanamicina en el medio presentaron un color marrón oscuro, pero en todas las concentraciones de kanamicina los callos no crecieron entre la cuarta y la octava semana de los experimentos.. Los fragmentos de callos E4 (tabla 7) cultivados por 4 semanas en el medio con 50 mg/L de kanamicina presentaron un color marrón oscuro, y los callos en las otras 3 concentraciones de antibiótico en el medio presentaron un color marrón claro. Los callos no crecieron en todos los medios con el antibiótico. A las 8 semanas los fragmentos de callo en contacto con kanamicina presentaron una coloración marrón claro a oscuro ligero, y los callos no crecieron desde las 4 hasta las 8 semanas de estar con el antibiótico. Al final del segundo subcultivo, es decir, de la octava semana de presencia del antibiótico en el medio, todos los callos no crecieron en medios con kanamicina al menos durante las últimas cuatro semanas del experimento y presentaban una diferencia en su coloración con respecto a los fragmentos de los callos al inicio del experimento.

Tabla 1. Resultados del primer experimento de análisis de la tolerancia a kanamicina de los callos no transformados M3 de *Mammillaria haageana*.

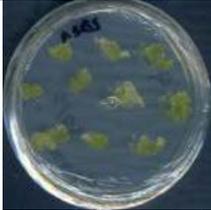
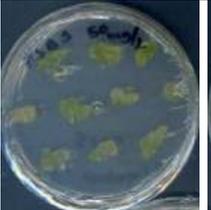
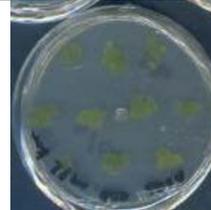
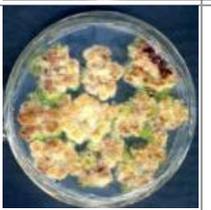
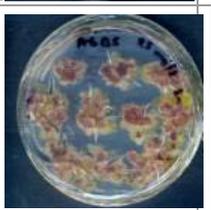
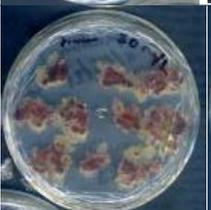
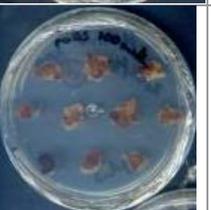
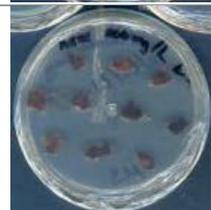
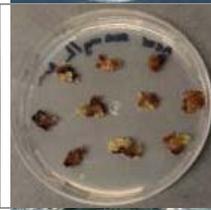
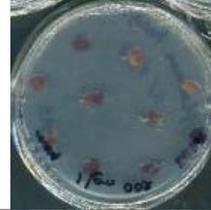
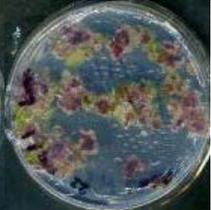
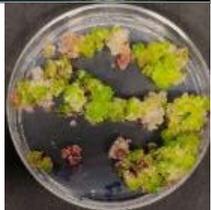
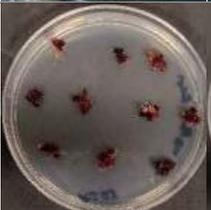
<i>Mammillaria haageana</i> Callos obtenidos del individuo M3					
Kan	0 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	200 mg/L
Semana 0					
4ta semana					
4ta semana *					
4ta semana**					
8va semana					
8va semana*					

*vista superior, **Inicio del segundo subcultivo

NOTA: las fotografías marcadas como 4ta semana y 4ta semana** (inicio del segundo subcultivo) tienen un color diferente ya que después de subcultivo las fotografías fueron tomadas un día después, por lo que pueden apreciarse con un color distinto los callos en estas dos filas.

Diámetro de la caja Petri= 9 cm.

Tabla 2. Resultados del primer experimento de análisis de la tolerancia a kanamicina de los callos no transformados M5 de *Mammillaria haageana*.

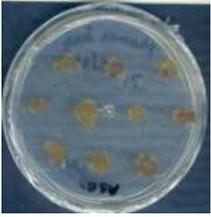
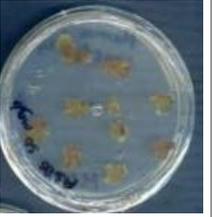
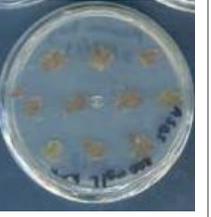
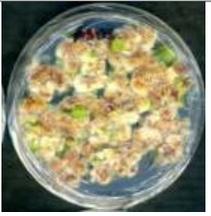
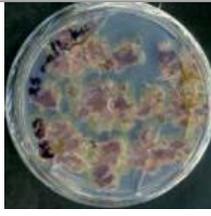
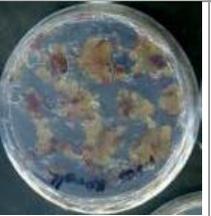
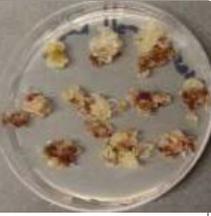
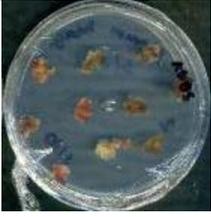
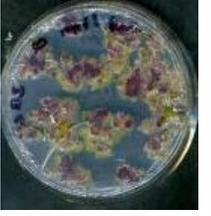
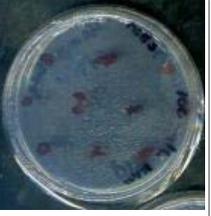
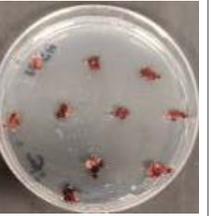
<i>Mammillaria haageana</i> Callos obtenidos del individuo M5					
Kan	0 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	200 mg/L
Semana 0					
4ta semana					
4ta semana*					
4ta semana**					
8va semana					
8va semana*					

*vista superior, **Inicio del segundo subcultivo
Diámetro de la caja Petri= 9 cm.

Tabla 3. Resultados del primer experimento de análisis de la tolerancia a kanamicina de los callos no transformados M10 de *Mammillaria haageana*.

Mammillaria haageana

Callos obtenidos del individuo M 10

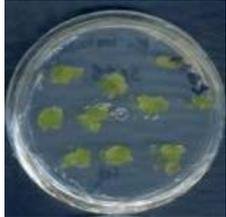
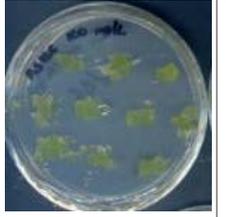
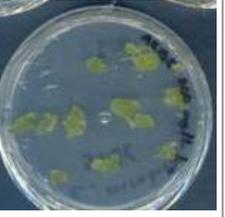
kan	0 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	200 mg/L
Semana 0					
4ta semana					
4ta semana*					
4ta semana**					
8va semana					
8va semana*					

*vista superior, **Inicio del segundo subcultivo. Diámetro de la caja Petri = 9 cm.

Tabla 4.- Resultados del primer experimento de la tolerancia a kanamicina de los callos no transformados E1 de *Echinopsis mirabilis*.

Echinopsis mirabilis

Callos obtenidos del individuo E1

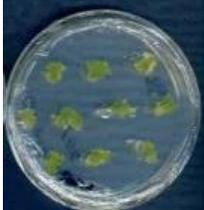
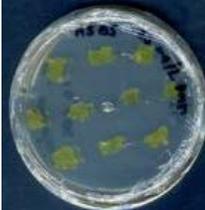
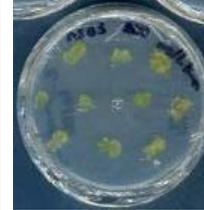
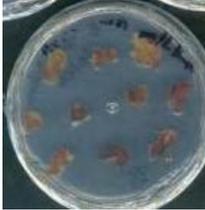
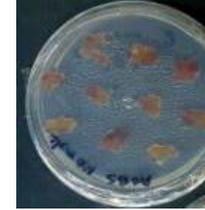
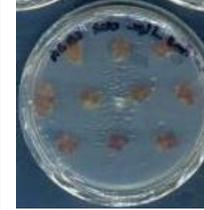
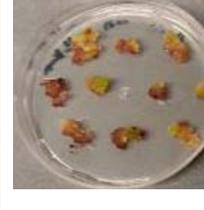
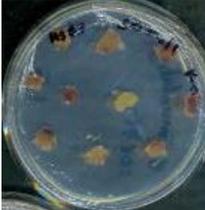
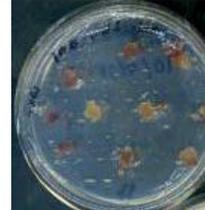
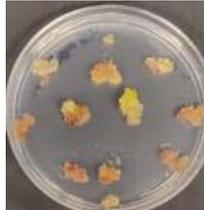
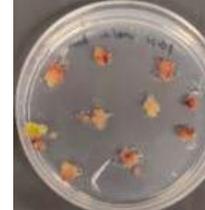
Kan	0 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	200 mg/L
Semana 0					
4ta semana					
4ta semana *					
4ta semana **					
8va semana					
8va semana *					

*vista superior, **Inicio del segundo subcultivo.. Diámetro de la caja Petri= 9 cm.

Tabla 5.- Resultados del primer experimento de la tolerancia a kanamicina de los callos no transformados E2 de *Echinopsis mirabilis*.

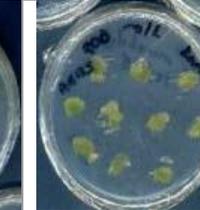
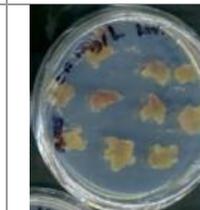
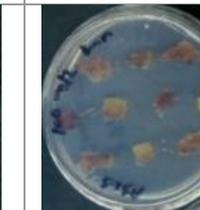
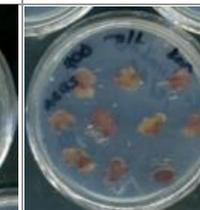
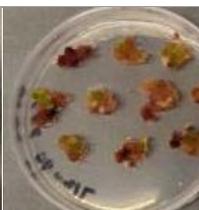
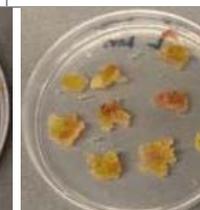
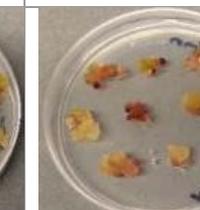
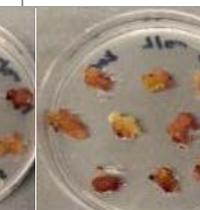
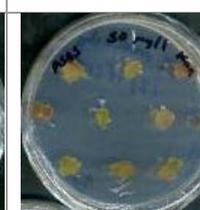
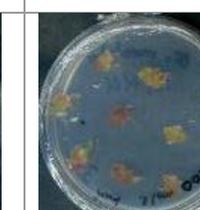
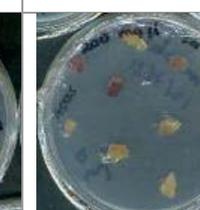
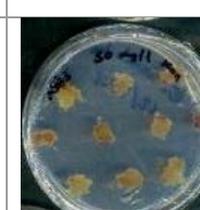
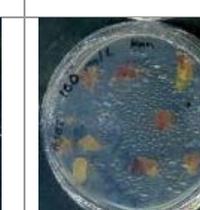
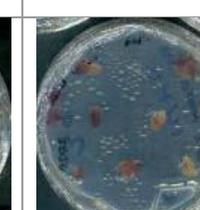
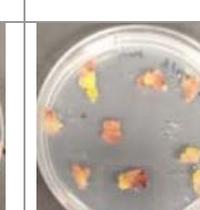
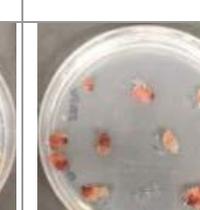
Echinopsis mirabilis

Callos obtenidos del individuo E2

Kan	0 mg/L	25mg/L	50mg/L	100 mg/L	200 mg/L
Semana 0					
4ta semana					
4ta Semana *					
4ta semana**					
8va semana					
8va semana*					

*vista superior, **Inicio del segundo subcultivo. Diámetro de la caja Petri= 9 cm.

Tabla 6. Resultados del primer experimento de la tolerancia a kanamicina de los callos no transformados E3 de *Echinopsis mirabilis*.

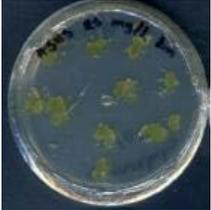
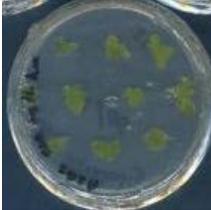
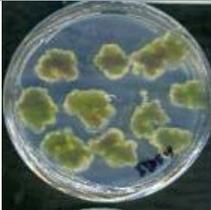
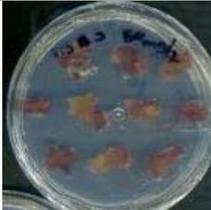
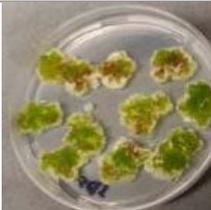
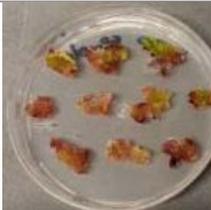
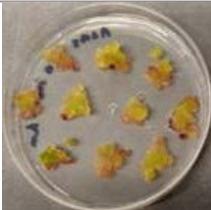
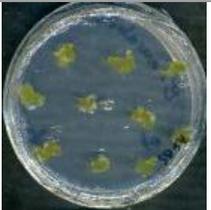
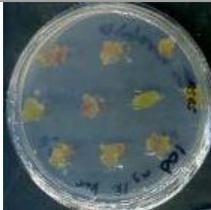
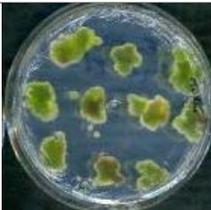
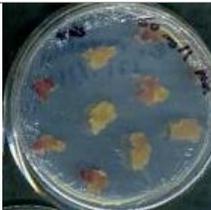
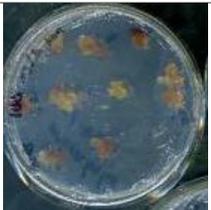
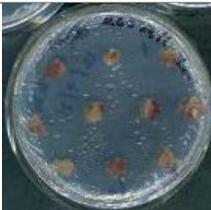
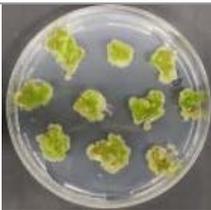
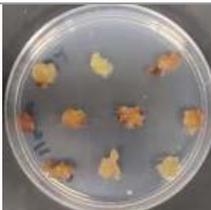
<i>Echinopsis mirabilis</i>					
Individuo: E3					
Kan	0 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	200 mg/L
Semana 0					
4ta semana					
4ta semana*					
4ta semana**					
8va semana					
8va semana*					

*vista superior, **Inicio del segundo subcultivo. Diámetro de la caja Petri= 9 cm.

Tabla 7.- Resultados del primer experimento de la tolerancia a kanamicina de los callos no transformados E4 de *Echinopsis mirabilis*.

Echinopsis mirabilis

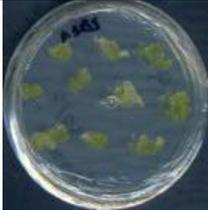
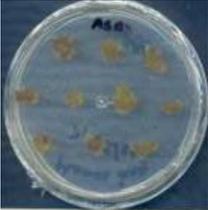
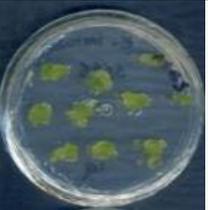
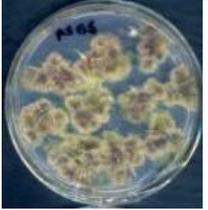
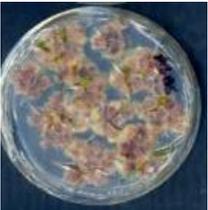
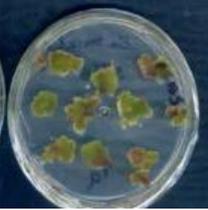
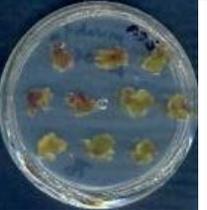
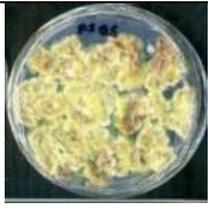
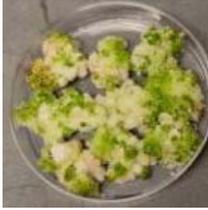
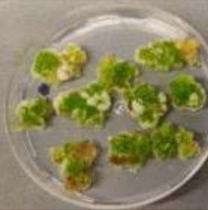
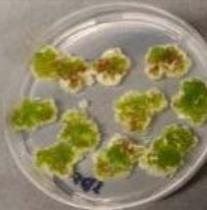
Individuo: E4

kan	0 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	200 mg/L
Semana 0					
4ta semana					
4ta semana *					
4ta semana **					
8va semana					
8va semana *					

*vista superior, **Inicio del segundo subcultivo
Diámetro de la caja Petri= 9 cm.

Como un resultado adicional de estos experimentos de tolerancia a kanamicina de los callos de ambas especies, se detectó una diferencia en el crecimiento de los callos de *M. haageana* y *E. mirabilis* en medio MIC sin kanamicina en las fotografías documentadas cada semana para ambas especies: el callo de *M. haageana* creció más en comparación con el callo de *E. mirabilis* (Tabla 8).

Tabla 8. Crecimiento de callos de *Mammillaria haageana* y *Echinopsis mirabilis* en medio MIC sin kanamicina.

	<i>Mammillaria haageana</i>			<i>Echinopsis mirabilis</i>	
t	M3	M5	M10	E1	E4
Semana 0					
Semana 2					
Semana 4					
Semana 4*					

* Vista superior

Diámetro de la caja Petri= 9 cm.

Discusión

Hasta el momento no se conoce la regulación genética del agotamiento del RAM y el crecimiento determinado de la raíz primaria en cactáceas. Sin embargo, del trabajo anterior del grupo (Rodríguez-Alonso *et al.* 2018) y de artículos publicados se sugirieron varios genes candidatos que pudieran estar involucrados en estos procesos, tales como los *PLT*, *WOX5*, *SCR* y *SHR*, involucrados en el mantenimiento del RAM en *Arabidopsis* (Aida *et al.* 2004; Galinha *et al.* 2007; Helariutta *et al.* 2000; Sabatini *et al.* 2003). Para poder identificar el papel de genes candidatos en desarrollo de la raíz de cactáceas, una herramienta muy eficiente es realizar un análisis funcional sobreexpresando o inhibiendo en cactáceas estos genes candidatos y caracterizar el fenotipo resultante y para ello es importante estandarizar los pasos para la obtención de un protocolo para tener plantas transgénicas de cactáceas.

En este proyecto de tesis utilizamos otras dos especies de cactáceas: *Mammillaria haageana* y *Echinopsis mirabilis*. Para muchas especies de la subfamilia *Cactoideae*, la más grande de las cactáceas, se demostró el crecimiento determinado de la raíz primaria (Shishkova *et al.* 2013, Morales-Castillo 2018; Pacheco-Blancas 2022; Lara-Vargas *et al.* 2022). *M. haageana* y *E. mirabilis*, además, tienen un ciclo de vida corto: las plantas de esta especie empiezan a florecer aproximadamente a 1.5-2 años de edad. Esta característica les hace útiles para poder realizar un análisis funcional de los genes candidatos involucrados en el crecimiento determinado de la raíz primaria. Otro aspecto importante para considerar es que *E. mirabilis* tiene la ventaja de ser autopolinizable, por lo cual no es necesario que intervengan polinizadores para que se pueda efectuar la fecundación y poder obtener semillas, sino que un solo individuo puede llevar a cabo el proceso de fecundación; a diferencia de *M. haageana*, la cual solo produce semillas de polinización cruzada.

En este proyecto se trabajó en inducir y propagar callos de *M. haageana* y *E. mirabilis*, para posteriormente examinar la posibilidad de la regeneración de brotes a partir de callos de estas dos especies. Después de describir las condiciones para regeneración de brotes *in vitro*, es posible pasar a la etapa de obtención de plantas transgénicas mediante la transformación *in vitro* de estas especies utilizando *A. tumefaciens* para el análisis funcional de genes candidatos.

La primera etapa del proyecto consistió en analizar el tipo de crecimiento de la raíz primaria en ambas especies, esto para corroborar que estas especies serían adecuadas para realizar el análisis funcional de los genes candidatos en el mantenimiento del meristemo en la raíz primaria. Observando al microscopio la raíz primaria aclarada de varias plantas de *M. haageana* encontramos los signos de diferenciación celular en el ápice: las células epidérmicas en la posición del meristemo desarrollaron pelos radicales y todas las células ya se habían elongado, otra característica de las células de la raíz de plantas, las cuales pasan a la etapa de diferenciación.

Aunque en *E. mirabilis* pudimos apreciar signos de diferenciación celular en el ápice de una raíz lateral, no logramos observar el ápice de la raíz primaria sin la presencia de raíces laterales de primer orden, a pesar de haber colectado la raíz pocas horas después de haber notado la presencia de pelos radicales en el ápice, como normalmente se había realizado con las especies de cactáceas anteriormente analizadas. Esto puede deberse a que no hay, o hay muy poca proliferación celular en el meristemo apical de la raíz primaria y que las células más bien van hacia un proceso de expansión, lo que promueve la emergencia de raíces laterales. Para evaluar esto en *E. mirabilis* será necesario estudiar el desarrollo de la raíz primaria desde las primeras horas post germinación y verificar la diferenciación de las células del ápice en la raíz primaria.

A partir de las plántulas asépticas de ambas especies, se obtuvieron los explantes de las mitades del brote, de los cuales se indujeron callos en el medio MIC que en el trabajo anterior del grupo (Shishkova *et al.* 2007) demostró ser el mejor entre cinco medios MIC, es decir el suplementado con auxina y citocinina en proporción igual (5 mg/L de cada fitohormona). Para ambas especies se logró la inducción de callos en medio MIC a partir de los explantes utilizados; durante realización del trabajo estos callos se propagaron en el mismo medio por aproximadamente 15 meses.

Para *M. haageana* se reportaron condiciones para micro propagación *in vitro* (Martínez-Vázquez y Rubluo 1989), para lo que se emplearon medios con citocinina (6-bencilaminopurina) en concentraciones de 1.0 y 2.0 mg/L y sin auxinas para activar los meristemas axilares en explantes de brote. Asimismo, para *E. mirabilis* se ha reportado trabajo donde describan condiciones para cultivo *in vitro* a través

de la activación de areolas utilizando regularmente medios de cultivo como el MS con altas concentraciones de citocinina en el medio (Martínez Vázquez 2014).

En el caso del ensayo de la regeneración de brotes, este se llevó a cabo con callo propagado por aproximadamente 9 meses para los callos de ambas especies analizadas; el ensayo de regeneración de brotes duró aproximadamente 4 meses, durante las cuales se hicieron cuatro subcultivos de callos obtenidos a partir de cada individuo en tres medios MIB. En este ensayo se logró la regeneración de brotes a partir de los callos M3, M8, M9, M10, de *M. haageana* en los medios MIB1 (ANA 1 mg/L, BA 5 mg/L) y MIB3 (BA, 5mg/L). Un resultado interesante de nuestro trabajo es la regeneración de brotes de *M. haageana* de los individuos M1, M5, M8 y M10 a partir de callos en medio MIC. Aunque, como se mencionó anteriormente, en general las concentraciones altas de citocinina y auxina en la etapa de inducción de callos resultan en desdiferenciación de células de los explantes y divisiones celulares y posteriormente en la propagación de callos, la sensibilidad de cada especie particular a las distintas hormonas es diferente (Zale *et al.* 2004). Como se demostró en este trabajo, las concentraciones altas de citocinina y auxina en proporción cercana a 1 en los medios de cultivo pueden permitir la regeneración de brotes de *M. haageana* a partir de los callos. Además, tanto en el medio MIC, como en los medios MIB la mayoría de los brotes regenerados se desarrollaron después de un periodo aproximado de 6 semanas, cuando casi todo el medio de cultivo se consumió por los callos y se disminuyó la humedad dentro de la caja Petri. Entonces, aunque la combinación y concentraciones de hormonas son factores importantes, el genotipo de la planta es muy importante para la regeneración de brotes a partir de callo. Adicionalmente, aunque no se ha reportado la inducción de brotes *in vitro* en cactáceas como resultado de estrés nutrimental o hídrico, si ha sido descrita para varias otras especies, por ejemplo, el arroz (Jain *et al.* 1996). Entonces, en la regeneración de brotes después de varias semanas post-subcultivo pudieron influir las condiciones de cultivo, es decir, el estrés nutrimental e hídrico. También, otra probable explicación sea que al inducir callo a partir de explantes de brote no fueron excluidas las células del meristemo apical de brote, lo cual pudiera interferir en la regeneración de brotes en callos. Sin embargo, como los callos de *M. haageana* fueron propagados por aproximadamente 7 meses antes de los experimentos de regeneración, es muy poco probable que la organización del

meristemo apical del brote se mantuvo conservada en los múltiples ciclos de propagación de las células de callos.

Finalmente, se realizó un ensayo de tolerancia al antibiótico kanamicina de los callos no transformados para las dos especies; la razón por la que se realizó este ensayo es que este antibiótico se utilizará para seleccionar callos transformados después de co-cultivarlos con *A. tumefaciens*. Kanamicina como agente en la selección de callos y plantas transformadas ha sido ampliamente utilizada en muchas especies vegetales (Valvekens *et al.* 1988). Las cepas de *A. tumefaciens* portadoras de los plásmidos pIG121 y pBI121-GFP con el gen *NPT II* que confiere resistencia a la kanamicina, ya fueron utilizados en el laboratorio para seleccionar callos transformados de *S. gummosus* y *F. peninsulae* (Anzúrez-Moreno 2010, Pacheco-Mendoza 2015). En general, antes de llevar a cabo el proceso de transformación de las especies de interés mediada por *A. tumefaciens* es necesario revisar la tolerancia de los callos no transformados al agente selectivo que se utilizará. El ensayo se realizó para las dos especies, utilizando callos inducidos de 3 individuos (M3, M5 y M10) para *M. haageana* y de 4 individuos (E1, E2, E3, E4) para *E. mirabilis*. Para esto, 10 fragmentos de callo de diámetro aprox. 7 mm se colocaron en medio MIC con las siguientes concentraciones de kanamicina: 0 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L y 200 mg/L. Después de 4 semanas de cultivar los callos en los medios mencionados, se realizó un segundo subcultivo de 4 semanas más. Para el segundo subcultivo, 10 fragmentos de callos de diámetro aprox. 7 mm se transfirieron de cada medio al medio fresco con las mismas concentraciones de kanamicina.

Para *M. haageana* al final de los dos ensayos de 8 semanas se obtuvieron los siguientes resultados: en todos los callos analizados (M3, M5 y M10) en las concentraciones de kanamicina ≥ 50 mg/L en medio MIC se presentaban signos evidentes de estrés como cambio de color a un marrón oscuro y un cese del crecimiento entre la cuarta y la octava semana de los ensayos. Por otra parte, hubo algunas diferencias entre los callos M3 con respecto a M10 y M5 en el medio con la concentración de 25 mg/L de kanamicina a las 8 semanas del ensayo: los fragmentos de callos M3 no crecieron y presentaban signos de estrés como cambio de color a marrón oscuro, mientras que para M10 y M5 la mayoría de los fragmentos de callos mantuvieron el color verde y crecieron a pesar de estar en medio con antibiótico. Cabe mencionar, que para los callos del individuo M10 después de 4

semanas del primer subcultivo en medios con kanamicina en las concentraciones ≥ 50 mg/L, el callo presentaba signos de estrés moderados, como cambio de coloración de verde a un marrón tenue, a diferencia de los callos M3 y M5, los cuales desde las primeras 4 semanas presentaron un cambio de color evidente a marrón oscuro en medios con ≥ 50 mg/L y ≥ 100 mg/L de kanamicina, respectivamente. Estos experimentos permiten proponer la concentración de kanamicina en medio MIC con 50 mg/L de kanamicina para selección de callos transformados de *M. haageana*, en el cual la probabilidad de crecimiento de callos de falsos positivos, es decir, no transformados y por ende no resistentes a kanamicina, sería baja.

En cambio, para *E. mirabilis* después de dos subcultivos de 4 semanas, es decir, de 8 semanas en total, se observó que la concentración de kanamicina en la cual la mayoría de los callos presentaron signos evidentes de estrés como cambio de color a marrón y el cese del crecimiento fue desde los 50 mg/L, para callos originados de los cuatro individuos analizados. Cabe destacar que en medio con concentraciones ≤ 100 mg/L de kanamicina, a diferencia de los callos de *M. haageana*, la mayoría de los callos de *E. mirabilis* no presentaban cambios fuertes en su coloración.

A partir del ensayo de tolerancia a kanamicina, me fue posible observar una diferencia en el crecimiento de los callos de *M. haageana* con respecto de *E. mirabilis*, conservando las mismas condiciones de temperatura y las concentraciones de reguladores del crecimiento en el MIC sin kanamicina. Una de las posibles explicaciones de esto es que las concentraciones de las fitohormonas u otros componentes del medio MIC para *E. mirabilis* no sean las óptimas para este propósito; como mencioné anteriormente, no han sido descrito los requerimientos para la inducción y propagación de callo en *E. mirabilis*, por lo que podría ser necesario explorar nuevos medios de cultivo, el uso de otras auxinas y citocininas, o probar nuevas concentraciones de las mismas. Por el otro lado, para desarrollo del protocolo de transformación lo que importa es la posibilidad de regenerar brotes y no la tasa del crecimiento de los callos. Si con el mismo medio MIC o con posibles otros se llegan a tener una buena eficiencia de regeneración de brotes, la meta de estos experimentos será lograda, sin importar la tasa de crecimiento de los callos. El crecimiento más lento de los callos incluso puede ser una ventaja, cuando estos se necesitan propagar por tiempos largos: se disminuye la cantidad de consumibles y se puede alargar el tiempo de los subcultivos. Adicionalmente, es posible que el metabolismo de *E. mirabilis* sea más lento que el de *M. haageana*, lo cual podría

explicar las diferencias en la tasa de crecimiento de los callos entre estas dos especies en medio sin kanamicina y el efecto de kanamicina para la selección de callos no transformados, así como la de velocidad de propagación en el medio MIC.

Conclusiones

- La raíz primaria de *Mammillaria haageana* tiene crecimiento determinado.
- El medio para inducción de callos (MIC) formulado con MS al 1x, 5 mg/L de ANA y 5 mg/L de BA y pH de 5.7 utilizado es adecuado para la inducción y propagación de callos de *M. haageana* y *Echinopsis mirabilis*.
- Con la combinación utilizada de los medios de inducción de callos y de inducción de brotes (MIB) se logró regenerar brotes a partir de callos de *M. haageana* cultivados por aproximadamente un año, pero no fue así para *E. mirabilis*.
- Los resultados obtenidos sugieren el uso de medios con 50 mg/L de kanamicina para la selección de callos transformados de *M. haageana*. Los callos no transformados de *E. mirabilis*, al parecer, son más tolerantes a kanamicina. Sin embargo, la concentración de 50 mg/L de kanamicina parece ser suficiente para la selección de callos transformados.

Perspectivas

- Llevar a cabo la regeneración de planta completa enraizando los brotes obtenidos de *M. haageana*.
- Probar otras auxinas y citoninas, otras relaciones auxina/citocinina y analizar el efecto del uso de más de una auxina en el medio para la inducción de callos de *E. mirabilis* y la regeneración de brotes a partir de callos.
- Analizar el desarrollo de la raíz primaria de *E. mirabilis* en distintos momentos desde la germinación hasta el agotamiento del meristemo, aproximadamente 2 d.p.g.
- Llevar a cabo el ensayo de transformación con *A. tumefaciens* de *M. haageana* y *E. mirabilis*.

Referencias

- Aida, M.; Beis, D.; Heidstra, R.; Willemsen, V.; Blilou, I.; Galinha, C.; Nussaume, L.; Noh, Y. S.; Amasino, R. y Scheres, B. (2004). The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell*, 119(1), 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.018>.
- Binns, A. y Campbell, A. (2001). *Agrobacterium tumefaciens* -mediated Transformation of Plant Cells . *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–6. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001492>.
- Cheng, Z. J.; Zhu, S. S.; Gao, X. Q. y Zhang, X. S. (2010). Cytokinin and auxin regulates *WUS* induction and inflorescence regeneration in vitro in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 29(8), 927–933. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0879-8>.
- Dubrovsky, J. G., y Gómez-Lomelí, L. F. (2003). Water deficit accelerates determinate developmental program of the primary root and does not affect lateral root initiation in a Sonoran Desert cactus (*Pachycereus pringlei*, Cactaceae). *American Journal of Botany*, 90(6), 823–831. <https://doi.org/10.3732/ajb.90.6.823>.
- Dubrovsky. (1997). Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert *Cactaceae*; its organization, cellular basis, and ecological significance. *Planta*, 203(1), 85–92. <https://doi.org/10.1007/s00050168>.
- Galinha, C.; Hofhuis, H.; Luijten, M.; Willemsen, V.; Blilou, I., Heidstra, R. y Scheres, B. (2007). *PLETHORA* proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature*, 449(7165), 1053–1057. <https://doi.org/10.1038/nature06206>.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M. T., & Benfey, P. N. (2000). The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell*, 101(5), 555–567. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80865-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80865-X).
- Hwang, I.; Sheen, J. y Müller, B. (2012). Cytokinin signaling networks. *Annual*

Review of Plant Biology, 63, 353–380. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105503>.

Inzé, D. y De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics*, 40, 77–105. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090431>.

Jain, R. K.; Jain, S. y Wu, R. (1996). Stimulatory effect of water stress on plant regeneration in aromatic Indica rice varieties. *Plant Cell Reports*, 15(6), 449–454. <https://doi.org/10.1007/BF00232074>.

Jones, R.; Ougham, H.; Thomas, H. y Waaland, S. (2013). *The molecular life of plants*. Wiley-Blackwell. P.p. 358-370 http://www.123library.org/book_details/?id=20087.

Kakimoto, T. (2003). Perception and Signal Transduction of Cytokinins. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 605–627. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134802>.

Lara-Vargas A.; Rodríguez-Alonso G.; Pacheco-Blancas C.y Shishkova S. (2022). Towards development of a protocol to obtain transgenic Cactaceae plants. Memorias del congreso Nacional de Bioquímica 2022, México.

Martínez-Vázquez, O. y Rubluo, A. (1989). *In-vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada . *Journal of Horticultural Science*, 64(1), 99–105. <https://doi.org/10.1080/14620316.1989.11515933>.

Martínez Vázquez, J. P. (2014). *Generación y cultivo de raíces transformadas en cactáceas sudamericanas*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Centro de Ciencias Básicas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. Páginas totales 75.

M. F. F., y Gratton, J. (1992). Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. *Bradleya*, 10(10), 33–48. <https://doi.org/10.25223/brad.n10.1992.a4>.

Morales-Castillo S. (2018). Crecimiento determinado de la raíz primaria en cactáceas. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica del Estado de Morelos. México, Páginas totales 50.

Moreno-Anzures N.E. (2010). Diseño del protocolo para obtener tejidos y raíces transgénicas de *Stenocereus gummosus*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. Páginas totales 46

Otten, L. (2001). Ti Plasmids. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–5. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0000477>.

Ozawa, S.; Yasutani, I.; Fukuda, H.; Komamine, A. y Sugiyama, M. (1998). Organogenic responses in tissue culture of srd mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 125(1), 135–142. <https://doi.org/10.1242/dev.125.1.135>.

Pacheco-Blancas, C. (2022). Caracterización de *Echinopsis Mirabilis* como organismo modelo para estudios moleculares y de desarrollo en cactáceas. Tesis de licenciatura, Universidad Politécnica del Estado de Morelos, México, páginas totales 70.

Pacheco-Mendoza J. (2015), Obtención de callos y raíces transgénicas de las cáctaceas desérticas *Stenocereus gummosus* y *Ferocactus peninsulæ*". Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México, Páginas totales 58.

Padikasan, I. A.; Chinnannan, K.; Kumar, S. y Subramaniyan, G. (2018). Agricultural biotechnology: Engineering plants for improved productivity and quality. In *Omics Technologies and Bio-engineering: Volume 2: Towards Improving Quality of Life*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815870-8.00006-1>.

Pasternak, T., Tietz, O., Rapp, K., Begheldo, M., Nitschke, R., Ruperti, B., & Palme, K. (2015). Protocol: an improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants. *Plant methods*, 11, 50. <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0094-2>

Rodriguez-Alonso, G.; Matvienko, M., López-Valle, M. L.; Lázaro-Mixteco, P. E.;

- Napsucially-Mendivil, S.; Dubrovsky, J. G. y Shishkova, S. (2018). Transcriptomics insights into the genetic regulation of root apical meristem exhaustion and determinate primary root growth in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26897-1>
- Sabatini, S.; Heidstra, R.; Wildwater, M. y Scheres, B. (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes and Development*, 17(3), 354–358. <https://doi.org/10.1101/gad.252503>.
- Sablowski, R. (2011). Plant stem cell niches: From signalling to execution. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(1), 4–9. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.08.001>.
- Shishkova, S.; García-Mendoza, E.; Castillo-Díaz, V.; Moreno, N. E.; Arellano, J. y Dubrovsky, J. G. (2007). Regeneration of roots from callus reveals stability of the developmental program for determinate root growth in Sonoran Desert Cactaceae. *Plant Cell Reports*, 26(5), 547–557. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0269-4>
- Shishkova, S.; Las Peñas, M. L.; Napsucially-Mendivil, S.; Matvienko, M.; Kozik, A.; Montiel, J.; Patiño, A. y Dubrovsky, J. G. (2013). Determinate primary root growth as an adaptation to aridity in Cactaceae: Towards an understanding of the evolution and genetic control of the trait. *Annals of Botany*, 112(2), 239–252. <https://doi.org/10.1093/aob/mct100>.
- Skoog, F. Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11, 118–130.
- Su, Ying H.; Zhao, X. Y.; Liu, Y. B.; Zhang, C. L.; O'Neill, S. D. y Zhang, X. S. (2009). Auxin-induced *WUS* expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 59(3), 448–460. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03880.x>.
- Su, Ying Hua; Liu, Y. B. y Zhang, X. S. (2011). Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, 4(4), 616–625. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr007>.
- Sugiyama, M. (2002). [Organogenesis in vitro]. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme*, 47(12 Suppl), 1587–1592.

- Taiz, L. y Zeiger, E. (2002). *Plant physiology*. Tercera edición Sinauer Associates. Sunderland, MA, USA. Capítulo 16.
- Valvekens, D.; Montagu, M. V. y Lijsebettens, M. V. (1988). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(15), 5536–5540. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.15.5536>.
- Verbelen, J.-P.; Cnodder, T. De, Le, J.; Vissenberg, K. y Baluška, F. (2006). The Root Apex of *Arabidopsis thaliana* Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities . *Plant Signaling & Behavior*, 1(6), 296–304. <https://doi.org/10.4161/psb.1.6.3511>.
- Walker, J. F.; Yang, Y.; Feng, T.; Timoneda, A.; Mikenas, J.; Hutchison, V.; Edwards, C.; Wang, N.; Ahluwalia, S.; Olivieri, J.; Walker-Hale, N.; Majure, L. C.; Puente, R.; Kadereit, G.; Lauterbach, M.; Eggli, U.; Flores-Olvera, H.; Ochoterena, H.; Brockington, S. F.; ... Smith, S. A. (2018). From cacti to carnivores: Improved phylotranscriptomic sampling and hierarchical homology inference provide further insight into the evolution of *Caryophyllales*. *American Journal of Botany*, 105(3), 446–462. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1069>.
- Zale, J.M.; Borchardt-Wier, H and Kidwell, K.K.. Callus Induction and Plant Regeneration from Mature Embryos of a Diverse Set of Wheat Genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **76**, 277–281 (2004). <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000009248.32457.4c>



VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e.

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **LARA VARGAS ALEJANDRA** con número de matrícula **20164009370** cuyo título es:

“Hacia el diseño del protocolo para obtener plantas transgénicas de cactáceas”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 24 de enero del 2023

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

Dra. Carmen Nina Pastor Colón
Dra. Verónica Lira Ruan
Dra. Svetlana Shishkova
Dr. Gustavo Rodríguez Alonso
Dr. Elizabeth Cordoba Martínez

(Presidente).
(Secretario).
(Vocal).
(Suplente).
(Suplente)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2023-01-24 10:54:33 | Firmante

Dkc6dDzp0QIhRXv1IAGgV4XkF4W478Y/Fih/xZsr/BclRfL45OqrKF5ny/MHJMrl7p8c+dwPDIUB4y3I5p5QjY2XnlQaia+YIDlfrRGVn2G5UkuosAXezluPxXFCQtMR/AR9Drd5XiaDq+1LJw6q0tH4Eb38euZQjbjPK8TaaW8MEemeebwLhTKe1clx6dBaVOOLk7QbSMIEr6mPohktedeZFSnFI7y0aLapUedZ3Br7L3+giJ8MPWSNSSHu5kXfE1f753qU2zmdkZA3zs1atpDBnplWib/7V/RrsFpJslFHhs+gpY1L41HPAvU/0X8EflEFP6CmWb4Tsv/KI81Q==

VERONICA LIRA RUAN | Fecha:2023-01-24 13:40:01 | Firmante

pnXjTMFIRdsOabzBBnbzK8I0RGC43vGuXPJJ6ZMMb3qtqWdwKpcbExZTsvREhY7fwOZdrYXUIX8mV92sb5dGhLG7+X1+tf+KP7+055HIS4od2hBDtxUceaeU53dmghpn1filV71GEL1bxJkQZsA9okdMuBznp0x2tIvXJESdqD/JncuOEKMWT2/pUOAIZ95046wHf1j1q3omqL8oXBC+9wMaPzmEcAdDPk2/FytjDsh8liiDDYvyfdeNenFioLcickrB/IXJ4/OwoGknLd/SiFY001e2KrxW6s7VjVVLgNRzRfh35fyfQU1+7QbmqgR5UZEkiXyBC7FKzR+woA==

ELIZABETH CORDOBA MARTÍNEZ | Fecha:2023-02-15 11:33:22 | Firmante

I3VazfqYlZ4Aq9Qeaemne651Tj8gnBswr2JY6Rq5tfJbrxlqgXqHfRZVmvVWqfU8OFSzlaxSJ2SM3LmnTspm05kNhwieE9bu/oq0QbWrVgGaC4ceWOhh4oMAknDEmSkMFWGUeyxMAc5s1WQXbvH85Eetsj+wgT51CyFPDI07/vwRSyX2iOzDU0BiAY5yVftzVDPnyNa/mNVBf69mPQsO2fgoT7vsFZSEBP34ofjaswYN0cN+oBShzYqhsdfHrtipXAV3PheHH1CoG3u67cv4Q2uP/RyVtN3TZ+H0u2s9KYDO3AGlPr9IYWrDZzEVHLeTaZCRA0ngsZab3/m8FNw==

SVETLANA SHISHKOVA | Fecha:2023-02-20 10:08:16 | Firmante

fmkMPkRWcbV7Q12jIsvJSBzsPwAvuC83JQ+vIEC49xpH2qzoms3Ofqe/nVvEvu6Di9Nk2bJbdZ6FpD+vv5YNwpKwqcsKjijm+OlcV/zNho5mCywnMC7uwJcQTVOCqLA4QBiyEWNmjv7OVczq1pb+NqWc8XVvmiNCdBrouxpAzWOZuFgDu/PSJgAQwt+aVtTuFiWjGCrQc377Ng5PCLCPvSo8sF/AnsiJxPjtGX7/YOm+d3DQKTgyezCBdmxGCcXtOaoq3bmdhKSLM0I0LvniiwChyelMnrAHJ0x/HYIctOuyYwSNDzBoQK5qMwnThZjq2iKIMI8Thd5WurZIDsw==

GUSTAVO RODRÍGUEZ ALONSO | Fecha:2023-02-20 12:15:33 | Firmante

ekfillGFUfhzcP+iNgMDC9s92umYhblua4aSD1pBzT3J0fbRpw6LWM/Uu6wmxalVfVnPadGkav/gv0A+o9amjKpsdurPh7NIJG6s+ghbTF5wO+SzdaaNxowAyZx0kG5hjoi7A9PKlRttESn2gqUQ+Zg1Wk9498MAyGiPkhyftwETTPju4/PK21nCFc4WuF4hCjMdx7UnagivGcXANcYHn6oUISXCsRiwlK+43wWZdfRFg69KGg0R0kKn93wEqO++70m693QcOrF2p6TmZ47xPHmKWAHGA7NrU1J6AXptWXfiYBakLqYhvx3ydp0pDcCSvqF14McZf14RbWSsw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



0pDdBC7b1

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/HdvLId5cPbDY1NlIjUyujpiea1Fz89nB>

