



TESIS

**MICROPROPAGACIÓN *in vitro* Y TRANSFORMACIÓN  
GENÉTICA DE *Heliopsis longipes* PARA LA  
PRODUCCIÓN DE AFININA**

QUE PRESENTA:

**BIOL. JOSÉ MANUEL GONZÁLEZ CASTAÑEDA**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. JUAN FLORENCIO GÓMEZ LEYVA**

REVISORES DE TESIS:

**DRA. IRMA GUADALUPE LÓPEZ MURAIRA  
DRA. PAOLA ANDREA PALMEROS SUÁREZ**

---

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROBIOTECNOLOGÍA**

---

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. ABRIL, 2018.



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
Instituto Tecnológico de Tlajomulco  
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

Tlajomulco de Zúñiga, Jal., 06/mzo./2018

OFICIO No. DEPI/062/2018

**Asunto:** Autorización de impresión de tesis

**C. BIOL. JOSÉ MANUEL GONZÁLEZ CASTAÑEDA**  
**CANDIDATO AL GRADO DE MAESTRÍA**  
**PRESENTE**

Por este conducto, tengo el agrado de comunicarle que el Comité Tutorial asignado a su trabajo de tesis titulado "**Micropropagación *in vitro* y transformación genética de *Heliopsis longipes* para la producción de afinina**", ha informado a esta División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPI), que están de acuerdo con el trabajo presentado. Por lo anterior, se le autoriza a que proceda con la impresión definitiva de su trabajo de tesis.

Esperando que el logro del mismo sea acorde con sus aspiraciones profesionales, reciba un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

*Educando para la Sociedad Actual y los Retos del Futuro*



**DR. ISAAC ANDRADE GONZÁLEZ**  
**JEFE DE LA DEPI**

S.E.P  
TECNM  
14DIT0003E  
IT TLAJOMULCO  
DIV. DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN

C.c.p. L.I. Andrea Torres Rico.- Jefa del Departamento de Servicios Escolares.  
Expediente

IAG/mjvs.

Km. 10 Carretera a San Miguel Cuyutlán – Mpio. Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco  
C.P. 45640, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. Tels. Conmut. (33) 3772-4426 ó 27 Ext.123,  
e-mail: [depi\\_tlajomulco@tecnm.mx](mailto:depi_tlajomulco@tecnm.mx) [www.ittlajomulco.edu.mx](http://www.ittlajomulco.edu.mx)



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, bajo la dirección del Dr. Juan Florencio Gómez Leyva.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios porque él hace posible todo.

A mi madre, pues solo ella podía darme la oportunidad.

A mi padre por su apoyo incondicional.

Al Dr. Juan Florencio Gómez Leyva por brindarme su amistad y su apoyo en todos los aspectos necesarios para completar el trabajo.

A mis asesoras la Dra. Irma Guadalupe López Muraira y Dra. Paola Andrea Palmeros Suárez por sus aportaciones, comentarios y revisiones que ayudaron a mi formación.

A CONACyT por la beca otorgada, pues sin ella no me hubiera sido posible realizar una maestría.

A los panteras pues comprendieron la escases de mi tiempo.

A mi hermana Rosa por apoyarme con la preparación de los alimentos y el vestir.

A mi comadre que siempre me animo a estudiar.

A Brenda porque fue ella la que sufrió mi estrés, y me dio la calma necesaria cuando más la necesitaba.

A Ale por sus exigencias que me motivan siempre.

A mis compañeros Carlos, Jair, David, Pedrito, Cris, e Hilda que cargaron el yugo de la maestría conmigo.

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1	Generalidades de <i>Heliopsis longipes</i> .....	3
2.2	Alcamidas en plantas .....	6
2.3	Alcamidas en <i>Heliopsis longipes</i> .....	7
2.4	Cultivo de tejidos vegetales. Micropropagación y regeneración <i>in vitro</i> .....	9
2.5	Reguladores de crecimiento .....	14
2.6	Microsatélites ISSR .....	16
2.7	Transformación genética <i>in vitro</i> .....	17
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	22
<b>4</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
5.1	Objetivo general .....	24
5.2	Objetivos específicos .....	24
<b>6</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	25
6.1	MATERIAL BIOLÓGICO .....	25
6.2	Herborización de <i>H. longipes</i> en el herbario DEL ITT .....	26
6.3	Micropropagación <i>in vitro</i> de <i>H. longipes</i> .....	26
6.3.1	Germinación de semillas .....	26
6.3.2	Desinfección de segmentos nodales .....	26
6.3.3	Evaluación de medios de cultivo y hormonas de crecimiento .....	27
6.3.4	Aclimatación de plántulas .....	30
6.3.5	Extracción de ADN .....	30

6.3.6	Análisis genético empleando marcadores ISSR .....	30
6.4	Transformación genética .....	33
6.4.1	Extracción de ADN bacteriano .....	33
6.4.2	Amplificación por PCR de genes <i>Vir D</i> y <i>Rol B</i> .....	33
6.4.3	Cultivo de <i>A. rhizogenes</i> .....	34
6.4.4	Co-cultivo con <i>A. rhizogenes</i> .....	34
6.4.5	Análisis molecular de plantas transformadas .....	37
<b>7</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>38</b>
7.1	Herborización de <i>H. longipes</i> .....	38
7.2	Germinación de aquenios .....	38
7.3	Desinfección de segmentos nodales.....	39
7.4	Evaluación de medios de cultivo y reguladores de crecimiento .....	40
7.4.1	Comparación entre medio MS y MS 0.5X.....	40
7.4.2	Efecto de 6-bencilaminopurina (BAP).....	41
7.4.3	Efecto del ácido naftalenacético (ANA) en segmentos nodales y hojas de <i>H. longipes</i> .....	44
7.4.4	Efecto de la combinación del medio MS 0.5X adicionado con 0.03 mg/L de BAP con diferentes concentraciones de ANA.....	47
7.4.5	Efecto del ácido indolacético (AIA) y concentración de sacarosa elevada .....	48
7.4.6	Efecto de medios líquidos adicionados con 0.03 mg/L de BAP y 0.03 mg/L de BAP y ANA.....	51
7.4.7	Gelificantes .....	52
7.4.8	Aclimatación de plántulas .....	55
7.4.9	Perfil genético empleando microsatélites .....	56
7.5	Extracción de ADN bacteriano y corroboración de genes <i>Rol B</i> y <i>Vir D</i> ... ..	59

7.6	Transformación genética.....	59
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>67</b>
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>69</b>

## INDÍCE DE FIGURAS

	Pág
<b>Figura 1</b> Esquema de órganos de <i>H. longipes</i> .	<b>4</b>
<b>Figura 2</b> Presentación, tamaño y precio de las raíces de chilcuague para el mercado en diferentes localidades.	<b>6</b>
<b>Figura 3</b> Principales compuestos bioactivos de <i>H. longipes</i> .	<b>8</b>
<b>Figura 4</b> Etapas de organogénesis somática.	<b>10</b>
<b>Figura 5</b> Representación esquemática del plásmido Ri tipo agropina de <i>A. rhizogenes</i> .	<b>18</b>
<b>Figura 6</b> Interacciones moleculares durante la transferencia del T-DNA de <i>Agrobacterium</i> sp. a la planta hospedera.	<b>20</b>
<b>Figura 7</b> Esquema general de trabajo.	<b>25</b>
<b>Figura 8</b> Raíz, semilla y planta de <i>H. longipes</i> .	<b>26</b>
<b>Figura 9</b> Esquema de transformación genética.	<b>34</b>
<b>Figura 10</b> Segmento nodal de <i>H. longipes</i> herborizado incorporado al herbario del Instituto Tecnológico de Tlajomulco.	<b>38</b>
<b>Figura 11</b> Explantes de <i>H. longipes</i> con diferentes concentraciones de BAP, en medio MS 0.5X.	<b>42</b>
<b>Figura 12</b> Explantes de <i>H. longipes</i> en diferentes concentraciones de BAP.	<b>43</b>
<b>Figura 13</b> Formación de callo en segmentos nodales y hojas de <i>H. longipes</i> empleando diferentes concentraciones de ANA.	<b>47</b>
<b>Figura 14</b> Explantes de <i>H. longipes</i> en diferentes tratamientos.	<b>49</b>
<b>Figura 15</b> Explantes de <i>H. longipes</i> tratados con 0.03 mg/L de BAP en diferentes tipos de medio.	<b>52</b>
<b>Figura 16</b> Explantes de <i>H. longipes</i> en medio sólidos.	<b>55</b>
<b>Figura 17</b> Explantes aclimatados de <i>H. longipes</i> .	<b>56</b>
<b>Figura 18</b> ISSR para visualizar la variabilidad genética entre las plantas madre e <i>in vitro</i> de <i>H. longipes</i> .	<b>58</b>



<b>Figura 19</b>	Análisis de similitud de Jaccard para los patrones de bandeo de las plantas madre (Planta M), <i>in vitro</i> (Planta I. V.) de <i>H. longipes</i> y <i>T. diversifolia</i> .	<b>58</b>
<b>Figura 20</b>	Amplificación por PCR de los genes <i>RolB</i> y <i>VirD</i> de las cepas AR1500 ATCC15834 y K599.	<b>59</b>
<b>Figura 21</b>	Amplificaciones por PCR de los genes <i>RolB</i> y <i>VirD</i> .	<b>60</b>
<b>Figura 22</b>	Amplificaciones PCR de los genes <i>RolB</i> y <i>VirD</i> .	<b>61</b>
<b>Figura 23</b>	Explantes transformados <i>H. longipes</i> .	<b>62</b>
<b>Figura 24</b>	Explantes necrosados de <i>H. longipes</i> por exceso de <i>A. rhizogenes</i> .	<b>64</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

		Pág
<b>Cuadro 1</b>	Propiedades del extracto de chilcuague	<b>5</b>
<b>Cuadro 2</b>	Microgramos por gramo de peso seco de alcanidas y decanoato de bornilo presentes en plantas de <i>H. longipes</i> de dos regiones diferentes.	<b>9</b>
<b>Cuadro 3</b>	Concentraciones de reguladores de crecimiento para micropropagación de asteráceas.	<b>13</b>
<b>Cuadro 4</b>	Trasformación genética en algunas especies de la familia Asterácea.	<b>21</b>
<b>Cuadro 5</b>	Sitios donde fue recolectado el material vegetal en el municipio de Xichú, Guanajuato.	<b>25</b>
<b>Cuadro 6</b>	Tratamientos utilizados para la desinfección de segmentos nodales.	<b>27</b>
<b>Cuadro 7</b>	Concentraciones de fitohormonas utilizadas en los diferentes tratamientos.	<b>28</b>
<b>Cuadro 8</b>	Criterios utilizados para la evaluación de las variables fenolización y callo.	<b>29</b>
<b>Cuadro 9</b>	Oligonucleótidos probados para los microsátélites.	<b>31</b>
<b>Cuadro 10</b>	Componentes utilizados en la PCR.	<b>32</b>
<b>Cuadro 11</b>	Variables utilizadas en los diferentes experimentos realizados para la transformación genética de <i>H. longipes</i> .	<b>35</b>
<b>Cuadro 12</b>	Porcentajes obtenidos por los tratamientos utilizados para la desinfección de segmentos nodales.	<b>40</b>
<b>Cuadro 13</b>	Comportamiento de explantes en diferentes medios.	<b>41</b>
<b>Cuadro 14</b>	Efecto de los medios MS, MS 0.5X y MS 0.5X más 0.1 y 0.5 mg/L de BAP.	<b>42</b>
<b>Cuadro 15</b>	Efecto de los medios MS 0.5X y MS 0.5X más 0.03, 0.06 y 0.09 mg/L de BAP.	<b>43</b>

<b>Cuadro 16</b>	Comportamiento de los medios MS 0.5X, y MS 0.5X más 0.1,0.5 y 1 mg/L de ANA para hojas y segmentos nodales de <i>H. longipes</i> .	<b>45</b>
<b>Cuadro 17</b>	Efecto de los medios MS 0.5X, MS 0.5X con 0.03 mg/L de BAP y MS 0.5X más 0.03 mg/L de ANA y BAP en explantes de <i>H. longipes</i> .	<b>48</b>
<b>Cuadro 18</b>	Resultados de los tratamientos MS 0.5X, MS 0.5X con 60 g/L de sacarosa y MS 0.5X más 0.03, 0.06, 0.09, 0.5 y 1 mg/L de AIA en explantes de <i>H. longipes</i> .	<b>50</b>
<b>Cuadro 19</b>	Efecto de los tratamientos MS 0.5X, MS 0.5X con 0.03 mg/L de BAP y MS 0.5X más 0.03 mg/L de ANA y BAP en explantes de <i>H. longipes</i> .	<b>51</b>
<b>Cuadro 20</b>	Resultados de los tratamientos MS 0.5X con 3 g/L de Gel rite y MS 0.5X con 8, 10 y 12 g/L agar-agar en explantes de <i>H. longipes</i> .	<b>54</b>
<b>Cuadro 21</b>	Absorbancias presentadas con el espectrofotómetro	<b>57</b>

## RESUMEN

*Heliopsis longipes* (Asterácea) es la planta con mayor importancia económica dentro de su género, debido a que sus extractos presentan propiedades bactericidas, fungicidas, anestésicas, antimutagénicas, anticonceptivas entre otras. La mayoría de las características anteriormente mencionadas las confieren un grupo de metabolitos secundarios denominados alcanidas, siendo la afinina el compuesto más abundante, encontrado principalmente en las raíces de *H. longipes*. Debido al gran potencial biotecnológico de este modelo vegetal, en este trabajo se desarrolló un protocolo para su micropropagación *in vitro*, y se inició con su transformación genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes*. Para su micropropagación se utilizaron segmentos nodales provenientes de plantas madre y se emplearon diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento en medio MS al 50% (0.5X). El mayor número de brotes por explante se obtuvo empleando una concentración de BAP de 0.03 mg/L generándose 6.12 y 11.5 brotes en promedio por explante para medio sólido y líquido respectivamente. El mejor tratamiento para la formación de callo fue el medio MS con 1 mg/L de ANA con hasta 75% de explantes con desorganización celular. Para la formación de raíces, las hojas tratadas con 1 mg/L de ANA mostraron 2.55 raíces por explante y un 50% de explantes con raíz. También los segmentos nodales tratados con 0.06 mg/L de AIA mostraron tres raíces promedio por explante con presencia de raíz del 100%, así mismo el tratamiento con 12 g/L de agar mostró 2.12 raíces promedio por explante y un 100% de segmentos nodales con presencia de raíz.

La transformación genética tuvo un éxito de cuatro por ciento con el uso de la cepa silvestre de *A. rhizogenes* ATCC15834, sin embargo, las raíces obtenidas no tuvieron desarrollo en el medio sin reguladores de crecimiento. El mejor antibiótico para la eliminación de bacteria fue cefotaxima 500 mg/L. Solo las hojas pudieron ser transformadas y el tratamiento de explantes con 0.03 mg/L de BAP previo a la infección de *A. rhizogenes* mostró un aumento en la formación de callo de los explantes tratados.

## 1 INTRODUCCIÓN

La necesidad alimentaria debido al incremento desmedido de la población ha promovido el uso de metabolitos secundarios como alternativa de control para diferentes fitopatógenos, pues estos resultan ser más amigables con el ambiente y menos dañinos para el consumidor. Además, gracias a la popularidad de la herbolaria, el tratamiento etnomédico y la búsqueda de nuevos tratamientos usando biomoléculas, se ha incrementado la demanda de metabolitos bioactivos. Las plantas son la principal fuente terrestre de metabolitos secundarios, los cuales pueden encontrarse en diferentes órganos de la planta y presentan diferentes propiedades como: bactericida, insecticida, fungicida, entre otros. Los metabolitos secundarios más estudiados han sido los alcaloides, sin embargo, hay otros de gran importancia como las alcanoides, que poseen una estructura originada de la condensación de un ácido graso y una amina, y están presentes en las familias: *Aristolochiaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Convolvulaceae*, *Euphorbiaceae*, *Menispermaceae*, *Piperaceae*, *Rutaceae*, y *Solanaceae* (Ríos *et al.*, 2003).

*Heliopsis longipes* S.F. Blake mejor conocida como “chilcuague” es una planta que pertenece a la familia Asteraceae endémica de la región central de México, la cual presenta una variedad de propiedades medicinales, fungicidas, bactericidas, analgésicas, anticonceptivas, antiinflamatorias entre otras, debido a su principal compuesto activo llamado afinina, el cual se encuentra hasta en un 0.73% del peso seco de sus raíces (López *et al.*, 2011). Diversos factores han provocado que el chilcuague se encuentre cada vez menos disponible, entre los cuales destaca su recolección, debido a que provoca la destrucción de la planta, así como su desarrollo tardío (dos a tres años), factor por el cual no abastece la demanda actual. Por lo anterior, es necesario buscar alternativas que permitan impedir la pérdida de esta especie empleando métodos biotecnológicos como la micropropagación *in vitro* y la transformación genética, con el fin de conservar la especie en su ambiente y satisfacer su demanda (Hernández, 2009).

Los métodos de propagación alternativa como la micropropagación *in vitro* ofrecen una aceleración a gran escala de la propagación, mejoramiento de los cultivos,

conservación y alternativas para optimizar la producción de metabolitos de especies medicinales (Ríos *et al.*, 2003).

La transformación genética de plantas ha permitido incrementar la cantidad de metabolitos secundarios sintetizados por diversos géneros de plantas, entre los que se encuentran plantas medicinales. El empleo de una técnica indirecta para transformar genéticamente diversas plantas modelo mediante el uso de *A. rhizogenes* permite obtener una alta tasa de crecimiento, estabilidad genética, concentraciones elevadas de producción de metabolitos secundarios (permanentemente) y síntesis endógena de fitohormonas (Ortiz, 2008).

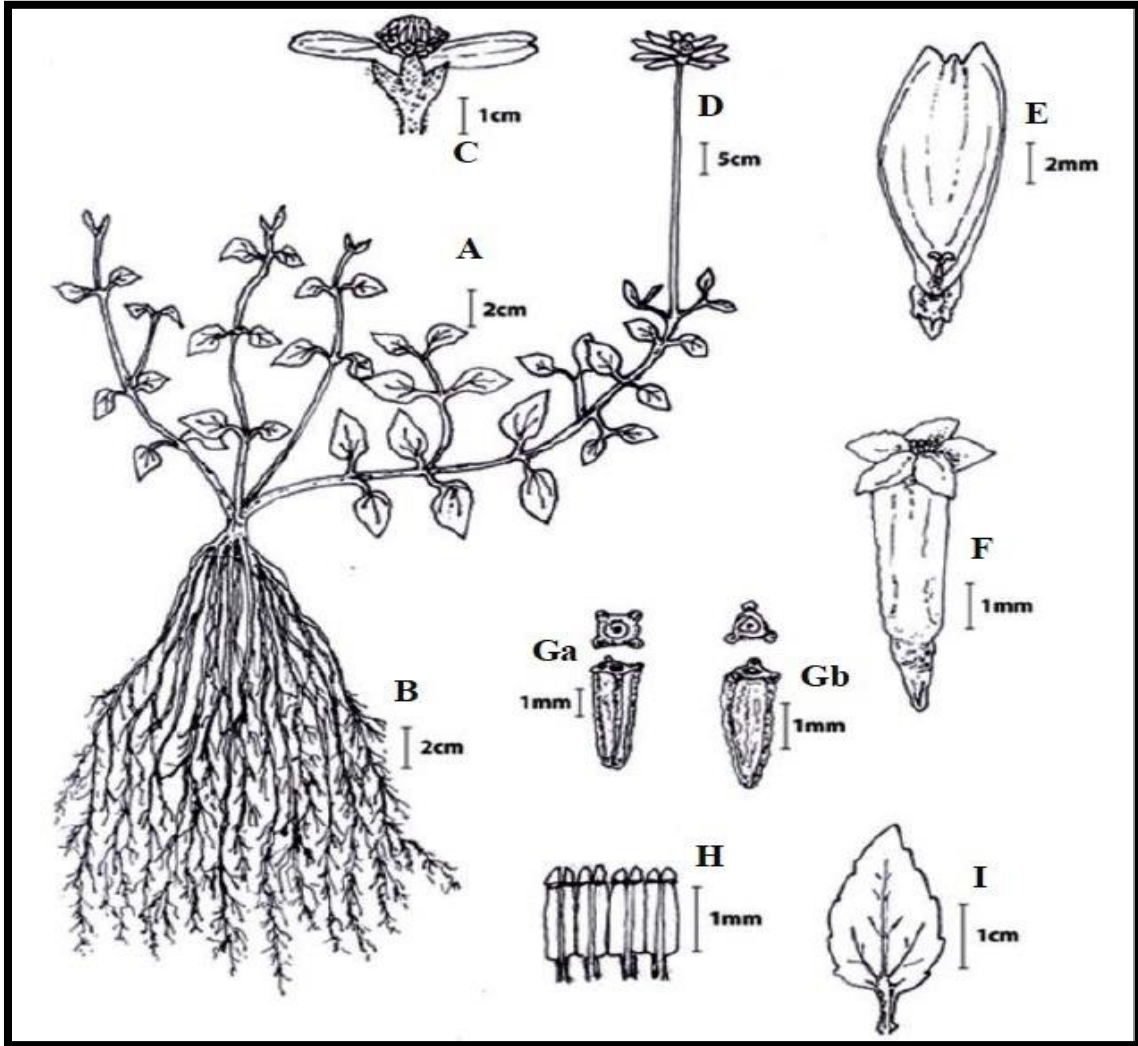
En este trabajo se obtuvo por primera vez un protocolo de micropropagación *in vitro* para *H. longipes*. Así mismo se realizó la transformación genética de *H. longipes* con *A. rhizogenes*.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de *Heliopsis longipes*

El género *Heliopsis* pertenece a la tribu Heliantheae de la familia Asteraceae y está compuesto por 14 especies, de las cuales ocho son endémicas de México, sin embargo, este género se distribuye desde la región de las grandes planicies y el oriente de Estados Unidos, hasta Bolivia. El género se caracteriza por presentar plantas perennes o anuales; hojas opuestas o alternas, subenteras a dentadas; cabezuelas terminales o axilares; involucro hemisférico a anchamente campanulado, sus brácteas de tamaño subigual, las exteriores a menudo herbáceas; receptáculo convexo a cónico, provisto de páleas persistentes; flores liguladas fértiles, sus corolas sésiles (carentes de tubo), persistentes, amarillas, rojas o moradas; flores del disco hermafroditas aunque a veces mayormente estériles, sus corolas tubulosas, amarillas, amarillo-cafés o moradas; anteras con las bases brevemente aflechadas; ramas del estilo de las flores hermafroditas lineares, aplanadas, provistas de apéndice corto y aquenios gruesos, tres a cuatro angulares, de vilano ausente (García *et al.*, 2004).

*H. longipes* (A. Gray) S.F. Blake, 1924 es la especie mas importante de su género a nivel económico y se caracteriza por ser una planta herbácea perenne de 20 a 70 cm, de hojas opuestas ovadas de 2 a 4 cm aserradas con peciolo cortos; cabezuelas amarillas y pedúnculo largo (Fig. 1); Esta planta habita en bosques bajos de *Pinus cembroides*, suelos blancos, pedregosos o someros y a una altitud de 2100 m.s.n.m, en un clima templado subhúmedo, con una temperatura media anual de entre 14 y 20 °C y de 600 a 800 mm de precipitación media anual (Lopez, 2007). Las raíces de la planta miden de 15 a 30 cm de largo por 2 mm de ancho y estan cubiertas por una corteza oscura que cubre un eje leñoso y amarillento. *H. longipes* es endémica de México en las regiones de Guanajuato, al sur de San Luis Potosí y en la Sierra Gorda de Querétaro, localizada en el norte del estado (Castro, 2009).



**Figura. 1.** Esquema de los órganos de *H. longipes*. A. Hábito. B. Raíz. C. Cabezuela. D. Pedúnculo. E. Flor lingulada. F. Flor del disco. Ga. Aquenio de flor lingulada. Gb. Aquenio de flor del disco. H. Estambres. I. Hoja; (tomada de Cilia, 2007).

*H. longipes* es conocida con diferentes nombres en las diferentes regiones donde habita la planta como: ichcha, chilcuan (chile de víbora), chilmécatl (raíces con sabor a chile), chilicauau, raíz azteca, raíz de oro y chicuau (Castro, 2009). La raíz de oro, como es mejor conocida en la actualidad, ha demostrado tener propiedades insecticidas, bactericidas, fungicidas entre otras, algunas de estas propiedades son mostradas en el cuadro 1.

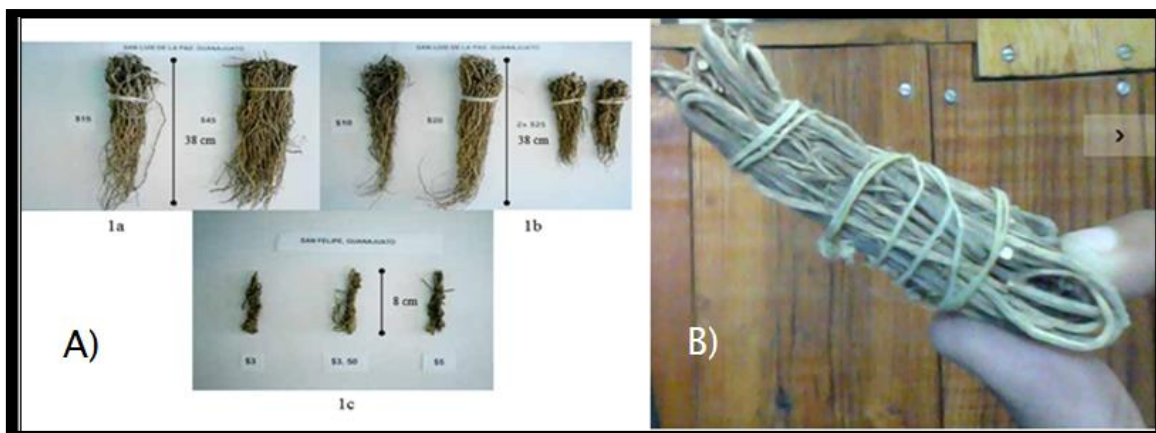


**Cuadro 1.** Propiedades del extracto de chilcuague.

Autor	Propiedad	Actividad
Henández, 2009	Regulador de crecimiento	Promueve el crecimiento de las plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .  Estimula la formación de brotes.
Molina <i>et al.</i> , 2004	Fungicida	Estimula el crecimiento e incremento en la biomasa de raíces. <i>Rhizoctoni asolani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Sclerotium cepivorum</i> , <i>Fusarium sp.</i>
	Bactericida	<i>Verticillium sp</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Erwinia carotovora</i> , <i>Bacillus subtilis</i> etc.
Castro, 2009; Cilia, 2007 y Hernández, 2013	Saborizante, insecticida, fungicida y bactericida.	<i>Escherichia coli</i> , hongos fitopatógenos, para infecciones de aparato respiratorio y digestivo, aftas bucales, algunas variedades de herpes, pie de atleta, anestésico, paludismo, entre otros.
Arriaga <i>et al.</i> , 2013	Anticoceptivo (1) y antimutagenico (2).	1)Ratones, 2) 2)2-Aminoanthrance (2-AA) y norfloxacin (NOR) inductores de mutagénesis en <i>Salmonella typhimurium</i> .

Todas las propiedades mencionadas anteriormente, se atribuyen a los metabolitos denominados alcanidas presentes en las raíces del chilcuague, de las cuales la que se encuentra en mayor concentración es la afinina.

Debido a la gran variedad de propiedades que presenta el chilcuague, sus raíces presentan una alta demanda en nuestro país, la cual es cubierta por comerciantes establecidos e informales que reciben el chilcuague de recolectores de las regiones endémicas. El chilcuague es vendido por manojos primarios (20 y 65 g) y secundarios (20 y 30 g) en los diferentes estados de la República, sin embargo, en los mercados de las regiones de las cuales es endémico es más barato que en los otros estados; por ejemplo, en Guadalajara el manajo secundario tiene un valor de 30 pesos en el Mercado Corona, mientras que San Luis Potosí y San José Iturbide, Gto. se encuentra de 3 a 5 pesos (Fig. 2).



**Figura 2. A)** Presentación, tamaño y precio de las raíces de chilcuague para el mercado, en diferentes localidades. 1a y 1b. Raíces primarias vendidas en San Luis de la Paz Guanajuato. 1c. raíces secundarias de San Felipe Guanajuato (López, 2007). **B)** Raíz secundaria vendida en el Mercado Corona, Guadalajara Jalisco.

## 2.2 Alcanidas en plantas

Las alcanidas son un grupo de metabolitos secundarios bioactivos, de aproximadamente 200 compuestos, están formadas por una condensación química de un ácido con una amina, esta unión se forma gracias a la combinación de dos rutas metabólicas: la ruta fenilpropanoide y la ruta de síntesis de ácidos grasos. La

parte ácida de las alcanidas proveniente de ácidos grasos, puede tener la cadena de ocho a dieciocho carbonos y es generalmente alifática. Cuando esta cadena es alifática, las alcanidas pueden ser separadas en dos grupos dependiendo del tipo de enlaces insaturados que presenten, las alcanidas olefínicas, con al menos un doble enlace y las alcanidas acetilénicas, con al menos un triple enlace (García, 2004; Domínguez y Juárez, 2011).

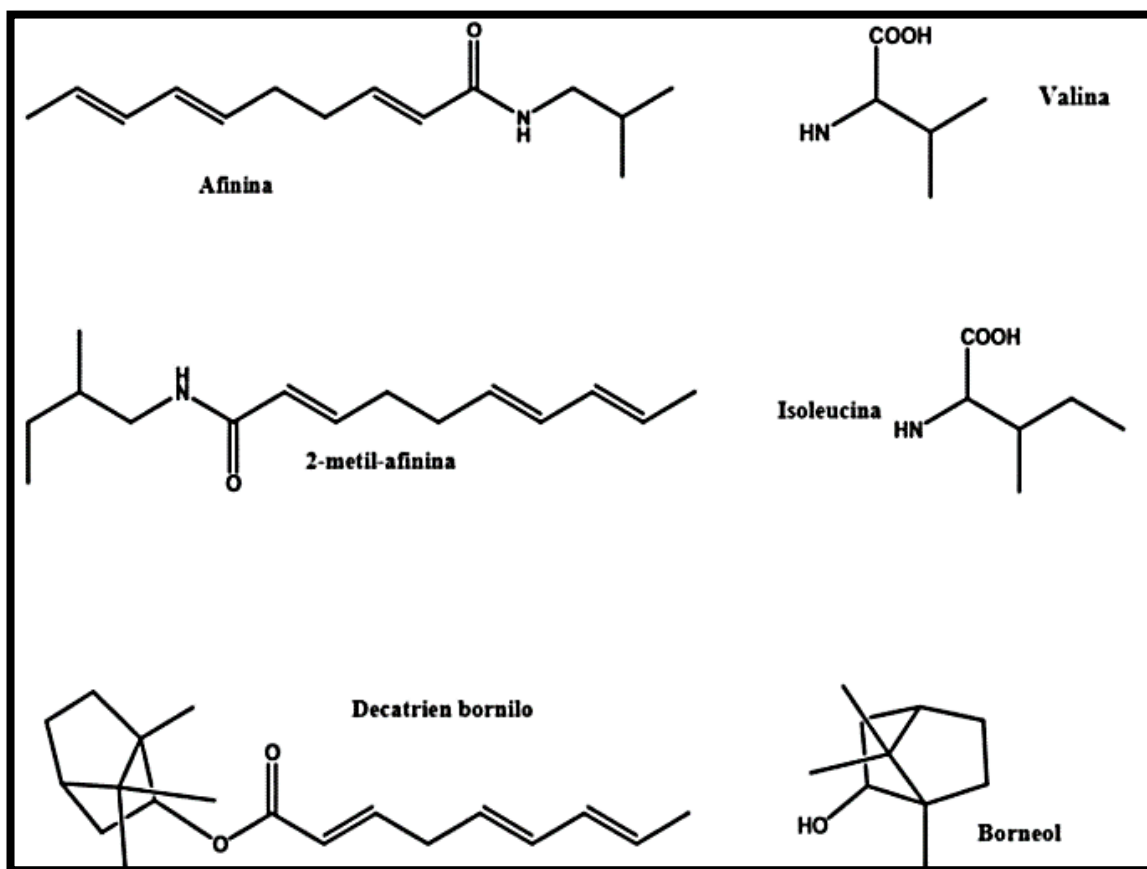
Las alcanidas han sido encontradas en 10 familias de plantas: *Aristolochiaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Convolvulaceae*, *Euphorbiaceae*, *Menispermaceae*, *Piperaceae*, *Rutaceae* y *Solanaceae* de las cuales *Asteraceae*, *Piperaceae* y *Rutaceae* han presentado la mayor cantidad de especies con alcanidas presentes. Las alcanidas pueden concentrarse en diferentes órganos de las plantas que las producen, por ejemplo: en las raíces de *Heliopsis longipes*, *Acmella oppositifolia*, *Asiasarum heterotropoides* y *Cissampelos glaberrima*; en las hojas y tallos de *Phyllanthus fraternus*, en el pericarpio de *Zanthoxylum piperitum* y *Piper* spp.; en las placentas de *Capsicum* spp. y en los tubérculos de *Lepidium meyenii* (Ríos, 2003).

Se ha identificado que las alcanidas presentan actividad bactericida, fungicida e insecticida, seguramente como medio de adaptación para sobrevivir a condiciones adversas, así mismo han sido usadas con fines medicinales por numerosas civilizaciones para diferentes padecimientos como dolores de garganta, dolores de muelas entre otros. Recientemente también se les ha encontrado funciones reguladoras de crecimiento que inducen la germinación, respuesta de las hojas ante ataques de patógenos y estimulación de crecimiento de diferentes órganos (López, 2007; Ríos, 2003 y Hernández, 2009).

### **2.3 Alcanidas en *Heliposis longipes***

El primer aislamiento de la alcanida afinina de las raíces de *H. longipes*, fue realizado por Acree *et al.*, en 1945, quienes pensaron que la planta en estudio era *Erigeron affinis* y por eso dieron el nombre de afinina al compuesto que encontraron. La afinina, N-isobutil-2E, 6Z, 8E -decatrienamida es la alcanida de mayor presencia en la raíz del chilcuague con un 0.73% del peso seco de la raíz y un 43.23% del peso seco del extracto total etanólico, sin embargo hay otras alcanidas presentes

en este extracto que son difíciles de aislar y están relacionadas con las propiedades benéficas de la planta como la 2-metil-afinina (2-metil-butil-decatrien, 2E, 6Z, 8E – amida), el éster de borneol, entre otras que se presentan a continuación (Fig. 3 y cuadro 2) (Hernández, 2009; López, 2011). La afinina es un aceite amarillo viscoso, soluble en disolventes no polares (cloroformo, éter, benceno, etc.) y prácticamente insoluble en soluciones ácidas y alcalinas. Tiene una absorción de longitud de onda máxima de 228.5 nm, punto de ebullición de 114°C a 0.2mm Hg de presión, punto de fusión de 23°C y peso molecular de 221.33. (Merck, 1983).



**Figura 3.** Principales compuestos bioactivos de *H. longipes* (Hernández, 2009).

**Cuadro 2.** Microgramos por gramo de peso seco de alcanidas y decanoato de bornilo presentes en plantas de *H. longipes* de dos regiones diferentes Puerto de Tablas y San Cristobal. Tomada de García, 2004.

Metabolito	<i>H. longipes</i>	
	Pto. Tablas	San Cristóbal
<i>N</i> -isobutil-decamida	t	-
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> ,-mono <i>en</i> -decamida	t	-
<i>N</i> -isobutil-6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> -dien-decamida	t	1
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> -trien-decamida	7,827	3,968
<i>N</i> -isobutil-2 <i>Z</i> - <i>en</i> -8,10-diin-undecamida	173	29
<i>N</i> -(2-metilbutil)-2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> -trien-decamida	430	262
<i>N</i> -isobutil-2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i> -dien-8,10-diin-undecamida	340	149
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> - <i>en</i> -8,10-diin-undecamida	393	88
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dien-8,10-diin-undecamida	136	62
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>E</i> -tetraen-dodecamida	-	12
2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> -trien-decanoato de bornilo	70	21
<i>N</i> -(2-metilbutil)-2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>E</i> -tetraen-dodecamida	-	-
Total	9,369	4,592

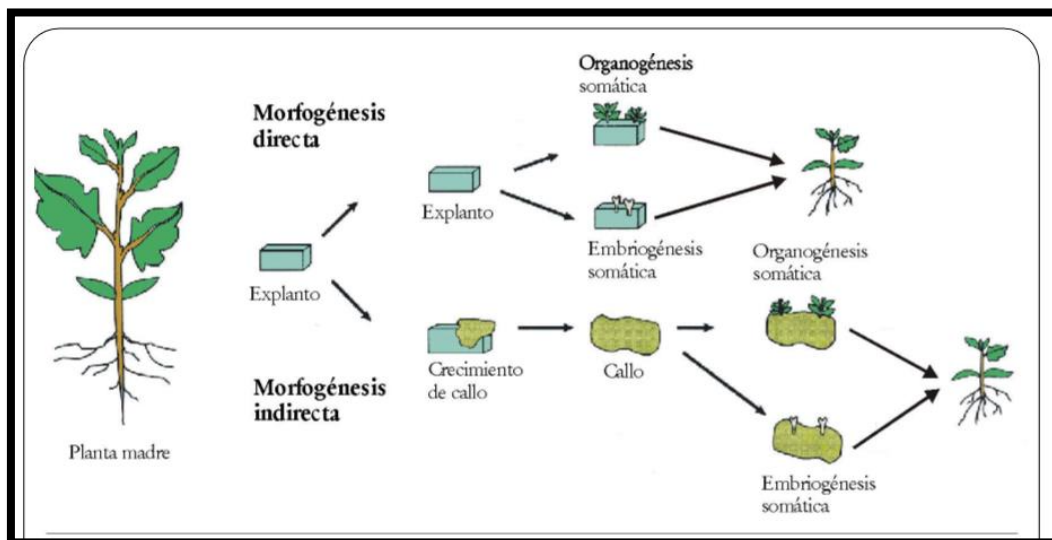
La letra t indica la presencia de compuestos en niveles inferiores a la evaluación cuantitativa.

#### 2.4 Cultivo de tejidos vegetales. Micropropagación y regeneración *in vitro*

La micropropagación *in vitro* es un sistema de cultivo de tejidos que permite la obtención de plantas completas a partir de estructuras meristemáticas o semillas, la cual puede llevarse por medio del cultivo de yemas, nudos y/o meristemas. La regeneración *in vitro* en cambio permite obtener nuevos individuos a partir de tejidos, células somáticas y células gaméticas, esta puede llevarse a cabo por medio

de la organogénesis (directa e indirecta) o la embriogénesis somática, las cuales brindan la obtención de un gran número de plantas bien desarrolladas, asépticas, genéticamente idénticas y en condiciones controladas en poco tiempo (Salazar, 2005). Lo que la hace una técnica adecuada cuando se tiene que trabajar con especies de poblaciones limitadas (Izquierdo, 2006; Pace, 2009).

Tanto la micropropagación como la regeneración se basan en la totipotencia celular que tienen las plantas, que es la capacidad de generar una planta completa a partir de una sola célula. Para que la totipotencia sea expresada, las células deben pasar primero por una diferenciación (reversión de una célula diferenciada a un estado meristemático), lo cual les permite responder a los estímulos ambientales y del cultivo expresando así su potencial organogénico. La inducción de formación de yemas en tejido somático es nombrada organogénesis somática, y puede ser indirecta si existe una formación de callo anticipadamente o directa si ocurre sin formación de callo (Fig. 4) (Petri, 2005).



**Figura 4.** Etapas de organogénesis somática (tomada de Petri, 2005).

En los sistemas de micropropagación y regeneración hay varios factores que pueden afectar el éxito de los mismos, entre estos están el tipo de explante a partir del cual se regenerará una planta, los componentes del medio de cultivo, las condiciones del medio de cultivo y el genotipo del explante. La mayoría de autores

usan hojas, cotiledones y algunos hasta protoplastos como explante. Los explantes deben provenir de material en fase de proliferación, de edad juvenil y si es posible de subcultivos parecidos a los cuales se quiere transplantar para facilitar su adaptación al cultivo y su éxito generativo. Es importante mencionar que la posición de los explantes en el medio también puede intervenir en los resultados (Kessel, 2008).

Los explantes son colocados en medios de cultivo donde obtienen los nutrientes y agua necesarios para su desarrollo, estos generalmente presentan los mismos macro y micronutrientes y fuente de carbono (sacarosa) sin embargo, varían en la concentración y tipo de reguladores de crecimiento siendo estos los que provocan mayores variaciones en los resultados. En la mayoría de medios de cultivo se usa un solidificador como el agar o gel rita los cuales dan soporte a la planta y están relacionados con la accesibilidad del agua. También algunos medios carecen de solidificantes, llamados medios líquidos, los cuales necesitan agitación continua para la oxigenación de los explantes. Debido a la necesidad de abaratar los costos de la propagación masiva, se han empleado diferentes protocolos con medios líquidos, los cuales brindan la posibilidad de automatizar algunas etapas del cultivo *in vitro*, permiten mayor facilidad de escalado y aumentan los índices de multiplicación, desarrollo y productividad del material propagado (Kessel, 2008).

El genotipo es el más importante de todos los factores, pues dependiendo la variedad o especie, ésta tendrá que adaptarse a los diferentes factores antes mencionados, provocando que para cada especie se necesite una estandarización del sistema de micropropagación o regeneración (Petri, 2005).

La regeneración y la micropropagación constan de cuatro etapas: el establecimiento del cultivo, desarrollo y multiplicación, enraizamiento y aclimatación de las plántulas. En el establecimiento del cultivo es muy importante la procedencia del explante, su selección, aislamiento y esterilización. La etapa de desarrollo y multiplicación tiene como objetivo mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación, cabe mencionar que la embriogénesis somática es la vía más rápida y conveniente pues salta las etapas de formación de yemas y enraizamiento,

regenerando plantas en una forma mucho más rápida y eficiente; también es importante resaltar que la cantidad de reguladores de crecimiento a agregarse para cualquier efecto son diferentes para cada especie, así como las condiciones de incubación tales como la luz y la humedad relativa, y que siempre se busca tener un ambiente de incubación donde la planta se encuentre en condiciones similares a las de su medio original. Otro punto que hay que tomar en cuenta es la contaminación dentro del medio debido a la producción de fenoles en los tejidos vegetales sometidos a estrés, estos fenoles pueden inhibir el crecimiento del explante o incluso matarlo. Para reducir los daños causados por los fenoles se utiliza el carbón activado, la polivinilpirrolidona (PVP), antioxidantes (como ácido ascórbico), la modificación del potencial redox con agentes reductores, la inactivación de las fenoloxidasas con agentes quelantes o la reducción de su actividad o afinidad por el sustrato utilizando un pH ácido o el cultivo *in vitro* en condiciones de oscuridad (Levitus *et al.*, 2010).

Para la etapa de enraizamiento, la cual puede ser llevada *in vitro* o *ex vitro*, se usan diferentes tipos de sustratos y/o reguladores de crecimiento. Los sustratos más utilizados son el medio solidificado con agar, perlita y/o vermiculita humedecidas con medio nutritivo o agua, así también el medio Murashige and Skoog (MS) reducido en el porcentaje de reactivos quedando al 25% y la sacarosa del 1-2 %. Otros medios como el WPM (Woody Plant Medium) han demostrado ser adecuados para la formación de raíces. También el uso de reguladores de crecimiento es muy utilizado para la formación de raíces *in vitro*, el uso de auxinas por periodos cortos de tres a siete días, con un cambio a un medio sin reguladores de crecimiento ha obtenido raíces necesarias para la etapa de aclimatación aproximadamente en 20 días (Levitus, *et al.*, 2010).

Los sistemas de micropropagación y regeneración han sido usados para diferentes especies de la familia Asteráceae como *Helianthus* sp. (Salazar, 2005), *Darwiniothamnus alternifolius*, *Scalesia affinis* (Izquierdo, 2006), *Stevia rebaudiana* B. (Rueda, 2006) y *Leontopodium nivale* (cuadro 3) (Pace, 2009).



**Cuadro 3.** Concentraciones de reguladores de crecimiento para micropropagación de asteráceas.

<b>Autor</b>	<b>Especie</b>	<b>A partir de</b>	<b>Conc. Citocininas</b>	<b>Conc. Auxinas</b>	<b>Brotos</b>
Yarra <i>et al.</i> , 2010	<i>Sphaeranthus indicus</i>	Hoja	4.4 µM de benciladenina	1.71 µM de ácido indolacético	12 por explante
Izquierdo, 2006	<i>Darwiniothamnus alternifolius</i>	Yemas	0.5 mg/L 6-bencilaminopurina	0.5 mg/L de ácido indolacético	70.8 % de explantes
Pace <i>et al.</i> , 2009	<i>Leontopodium nivale</i>	Callo	0.5 mg/L de 6-bencilaminopurina	0.25 mg/L de ácido nalftalenacético	30/callos
Rueda <i>et al.</i> , 2006	<i>Stevia rebaudiana</i> B.	Segmentos nodales	6.0 µM de kinetina	0.5 mg/L de ácido nalftalenacético	2.5 por explante
Salazar <i>et al.</i> , 2005	<i>Aster ericoides</i>	Segmentos nodales	1 mg/L de Kinetina	0.5 mg/L de ácido indolacético	4.6 por explante

## 2.5 Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento son compuestos de forma química sencilla que no cuentan con grupos proteicos y no generan un efecto específico en la planta, estos tienen diferente composición que las fitohormonas, pero pueden desarrollar efectos semejantes. Los fitorreguladores están relacionados con todas las respuestas morfogénicas en el desarrollo de la planta y aunque son escasos, están presentes en todas las plantas de la tierra. Cabe mencionar que en acción conjunta pueden inducir y fijar una expresión morfogénica determinada; por ejemplo, auxinas y citocininas, pueden propiciar la formación de brotes, de raíces y/o la proliferación de masas celulares sin mayor organización (Jordán y Casareto, 2006; Frank, 2000 y Ozyigit *et al.*, 2013).

Gracias a la totipotencia celular vegetal, los fitorreguladores han provocado cierta respuesta a concentraciones relacionadas entre sí, por ejemplo, cuando se agregan citocininas y auxinas en concentraciones altas, inducen la formación de callo, por otra parte, cuando se agrega una elevada cantidad de citocininas y una baja de auxinas, se obtiene la formación de nuevos brotes y por el contrario, cuando se adiciona una gran cantidad de auxinas y una pequeña cantidad de citocininas se puede notar la formación de raíces (Jordán y Casareto, 2006).

Las auxinas fueron las primeras hormonas vegetales descubiertas, se ha mencionado que el mismo Darwin fue el primero en notar su funcionamiento. El término auxina viene del griego "auxein" que significa crecer. La forma predominante de las auxinas en las plantas es el ácido indolacético (AIA) pero también hay otras formas naturales en las plantas como el ácido 4-cloro-indolacético (4-CI-IAA), el ácido fenilacético (PAA), el ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (IPA) (Jordán y Casareto, 2006).

Las auxinas están en todos los órganos de la planta, pero se concentran más en las regiones de crecimiento activo como en meristemos apicales, hojas jóvenes y frutos en desarrollo. Las plantas usan dos rutas biosintéticas para producir el AIA, dependiente e independiente de triptófano; de éstas, la dependiente de triptófano es la más estudiada y se deriva por cuatro vías: por descarboxilación para producir

triptamina (TAM), por oxigenación para originar indolacetamida (IAM) por transaminación para producir ácido indol-3-pirúvico (IPA) y por oxigenación para producir indol-3-acetaldoxima (IAOx) (Salisbury, 2000 y Ozyigit *et al.*, 2013).

Las auxinas están correlacionadas con los tropismos, los cuales provocan acumulación de auxinas en partes diferenciadas de órganos de las plantas, por ejemplo, en el fototropismo las auxinas se acumulan en el ápice provocando el crecimiento orientado hacia la luz; por otra parte, en el geotropismo, las auxinas de una planta acostada se concentran en la parte basal e inducen una elongación hacia arriba. Las auxinas son las responsables de la dominancia apical, la abscisión de órganos retardando la caída de hojas, flores y frutos jóvenes, el desarrollo normal de flores y frutos y la diferenciación celular, la cual es muy importante para diferenciar tejidos importantes de la planta como xilema y floema (Jordán y Casareto, 2006).

Las citocininas son hormonas derivadas de la adenina con modificaciones en su posición N6, estas están relacionadas con el crecimiento, el desarrollo de plantas y la expresión de varios genes. Las naturales provienen del DMAPP (pirofosfato de dimetilalilo) vía del ácido mevalónico, y 5'-AMP, su síntesis es principalmente en la raíz, pero también puede darse en el meristemo apical y en semillas inmaduras. La mayor parte de citocininas ya sean naturales o artificiales conservan la base adenina, sin embargo, en algunas sintéticas como la benciladenina (BA) o la furfurilaminopurina (kinetina) se les ha ligado otras moléculas; otras como el tidiazurón (TDZ) han sido sintetizadas con una estructura totalmente diferente. Las citocininas sintéticas suelen tener efectos más potentes que las naturales (zeatina, trans-zeatina o isopentiladenina), pues contienen moléculas específicas y son de difícil degradación para las plantas (Salisbury, 2000 y Ozyigit *et al.*, 2013).

Las citocininas se encuentran en xilema y floema, su presencia puede mostrar baja cantidad de nutrientes en el suelo y su inhibición puede ser mediada por O-glicosilación en el grupo hidroxilo terminal en citocinas tipo zeatina o por N-glicosidación en el N3 o N7 de la adenina (Ozyigit *et al.*, 2013).

Las citocininas promueven la división celular y junto con las auxinas aceleran los ciclos celulares en las fases G1 y M, provocan la iniciación de brotes, organogénesis y androgénesis pues inhiben la dominancia apical induciendo la formación de brotes adventicios y yemas laterales, logran inducir la formación de embriones somáticos, la formación de embriones haploides provenientes de polen y han sido capaces de retardar la senescencia de las hojas provocando que las hojas permanezcan más tiempo verdes con mayor contenido de clorofila y funcionales, pues permiten el desarrollo de cloroplastos (con formación de granas) en oscuridad, reemplazando parcialmente la demanda de luz (Jordán y Casareto, 2006).

## **2.6 Microsatélites ISSR**

Los microsatélites o ISSR (secuencias internas simples repetidas) son una técnica altamente reproducible que utiliza secuencias cortas repetidas de 16 a 25 pb de longitud como oligonucleótidos en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), generando marcadores loci de alto polimorfismo. Gracias a la heterogeneidad del ADN, los microsatélites amplifican segmentos de DNA entre dos regiones idénticas de secuencias simples repetidas orientadas en dirección opuesta. Los ISSRs pueden ser repeticiones de hasta 5 nucleótidos, sin embargo, los que contienen dos repeticiones como (AG), (GA), (CT), (TC), (AC), (CA) suelen tener mayor polimorfismo. Los microsatélites pueden o no presentar nucleótidos degenerados en los extremos 5' y 3'; los que no presentan nucleótidos degenerados tienen un anclaje aleatorio en las regiones simples repetidas del ADN templado, provocando amplicones con aspecto de manchas poco claras para los análisis. Para el caso de los que presentan nucleótidos degenerados en algún extremo se asegura el alineamiento solo en los extremos de la región simple repetida o en un menor número de sitios comparado con los que no contienen, lo que asegura amplicones claros con mayor polimorfismo (Reddy *et al.*, 2002). Los ISSR son usados para estudios de diversidad genética, filogenia, etiquetado de genes, mapeo genético, evolución biológica y análisis de variación somaclonal en los cultivos *in vitro* (Bello *et al.*, 2014).

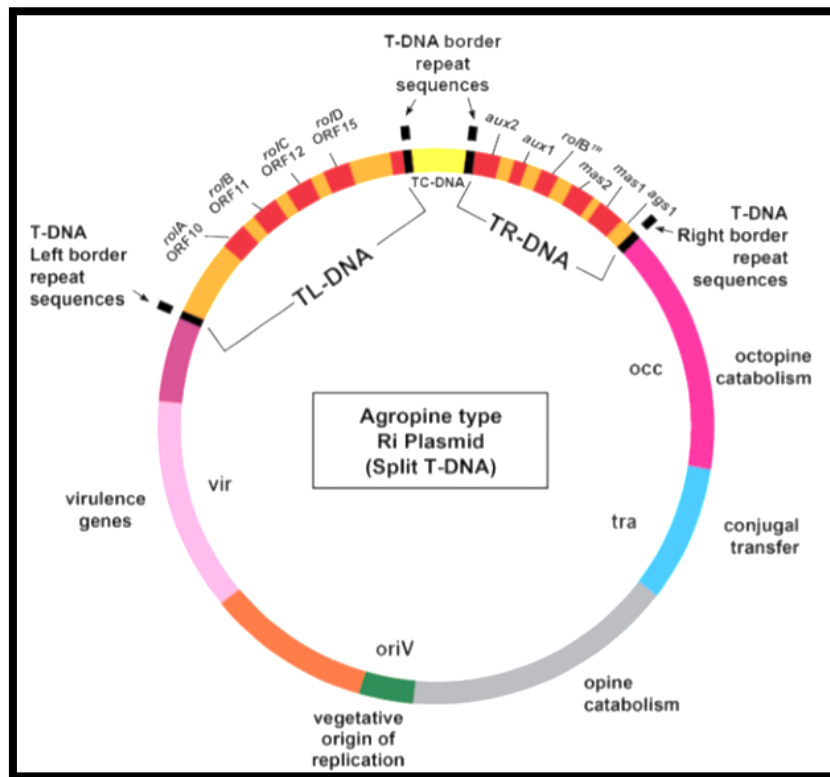
## 2.7 Transformación genética *in vitro*

La transformación genética se refiere a la inserción de material genético exógeno al ADN de un organismo; en plantas ha resultado útil para el conocimiento y síntesis de metabolitos. La transformación genética puede llevarse a cabo por metodologías diferentes: la directa y la indirecta. En la directa la transformación se lleva a cabo por medio de agentes químicos o físicos como la creación de poros por medio de rayos láser, la microinyección, la sonicación y biobalística. En el caso de la transformación indirecta, los genes son introducidos con ayuda de virus o bacterias como *A. rhizogenes* o *Agrobacterium tumefaciens* las cuales de manera natural insertan sus genes al genoma de las plantas. *A. rhizogenes* es una bacteria gram negativa que habita en las raíces, la cual infecta a las mismas cuando presentan una herida, poco después de la infección, la bacteria introduce una región de su plásmido Ri (inductor de raíz) el cual provoca la formación de raíces peludas (Ortiz, 2008; Gai, 2015; Kiani, 2014).

En *A. rhizogenes* el plásmido Ri permite degradar optalina y nopalina (opinas) permitiéndole a la bacteria crecer sobre uno de esos compuestos. Las opinas son fuente de carbono y de nitrógeno y pueden ser metabolizadas por *Agrobacterium* sp., sin embargo, la mayoría de las bacterias que habitan el suelo no pueden metabolizarlas, por lo tanto, el plásmido Ri es el responsable de crear un nicho apropiado para la bacteria.

El plásmido Ri está dividido en diferentes regiones: T-ADN, catabolismo de octopinas, transferencia conjugal, catabolismo de opinas, origen de replicación vegetativa y genes de virulencia (Ozyigit *et al.*, 2013) (Fig. 5). La región T-ADN contiene los genes *Rol* los cuales inician el desarrollo de raíces. A la izquierda y derecha del T-ADN existen dos secuencias que flanquean y definen el T-ADN. La secuencia del borde derecho es importante para la transferencia del ADN y el proceso tumorigeno, por otra parte, la secuencia izquierda no afecta la formación del tumor. La secuencia derecha 5'- TGNCAGGATATATNNNNNNGTNANN-3' y la secuencia izquierda 5'- TGGAGGATATATNNNNNTGTAAANN-3' funcionan durante la inserción del T-DNA al ADN cromosómico del hospedero y aunque esta es aleatoria

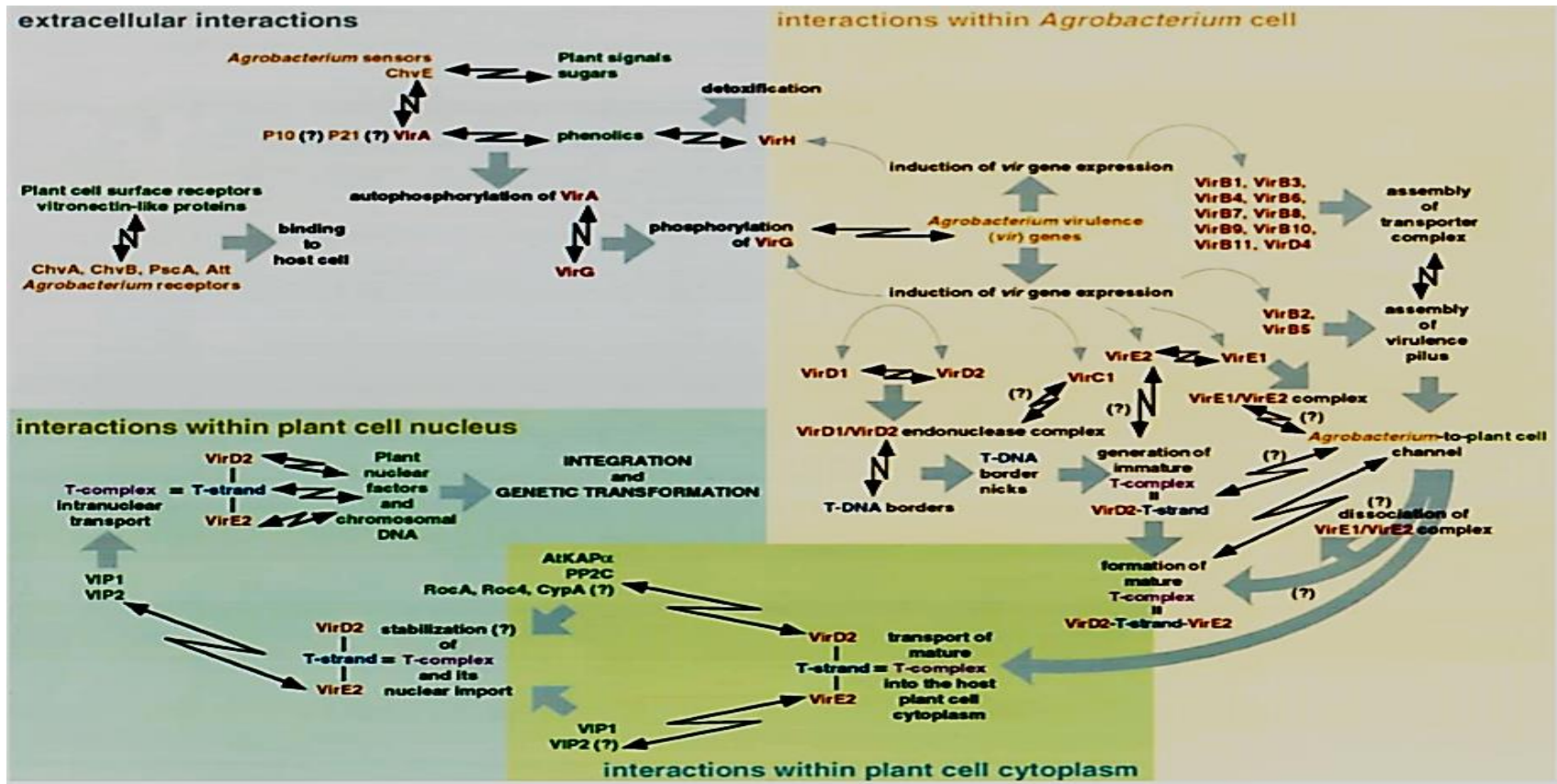
los bordes donde se inserta son homólogos a las secuencias de los bordes derecho e izquierdo. Así mismo el plásmido Ri contiene aproximadamente 25 genes de virulencia (*Vir*) los cuales, con ayuda de la secuencia de los bordes ayudan a transferir la secuencia del plásmido a la planta, cabe mencionar que es un tipo de herida en la planta la que activa los genes *Vir* pues libera aminoácidos, azúcares y compuestos derivados del metabolismo del fenil propanoico entre otros. El reconocimiento de los compuestos fenólicos de la planta herida es mediado por el producto de los genes *VirA* y *VirG*. La proteína *VirA* detecta el pH externo y *VirG* la presencia de inductores como acetosiringona,  $\alpha$ -hydroxyacetosiringona, coniferylalcohol y vainillina, y monosacáridos neutros o ácidos como la glucosa y el ácido glucorónicoglucosa (Ozyigit *et al.*, 2013; Gai, 2015; Kiani, 2014; Blanco, 2003).



**Figura 5.** Representación esquemática del plásmido Ri tipo agropina de *A. rhizogenes*, tomada de Ozyigit *et al.*, 2013.

La introducción de T-ADN y la unión de *Agrobacterium sp.* a la planta comienza con el reconocimiento de los receptores de la pared celular de las plantas por las

proteínas bacterianas ChvA, ChvB, PscA y Att, posteriormente ChvE reacciona con las señales de azúcares y manda la señal al gen *VirA* el cual también se induce en respuesta a fenoles lo que provoca una autofosforilación, este fosfato es transferido a la proteína *VirG* que se encarga de activar la expresión de todos los genes *Vir*. Una vez que son activados los genes *Vir*, el gen *VirH* se encarga de parar el exceso de señales de fenoles. Los genes *VirB1*, *VirB3*, *VirB4*, *VirB6*, *VirB7*, *VirB8*, *VirB9*, *VirB10*, *VirB11*, *VirD4*, *VirB2* y *VirB5* se encargan de formar un puente entre los organismos para asegurar el paso del T-ADN. Posteriormente, el complejo *VirD1* y *VirD2* con la ayuda de una endonucleasa se encargan de cortar el ADN antisentido en los bordes del T-ADN, mientras sucede el corte, *VirD2* se enlaza al T-ADN creando un T-ADN inmaduro o complejo T. El complejo T puede madurar por dos vías: 1) El complejo T unido a *VirE2* y *VirE1* son separados y es exportado por el canal antes mencionado. 2) *VirE2* se enlaza a la hebra de ADN preparada dentro de la bacteria previniendo así su realineamiento para reformar el plásmido *Ti* o *Ri*, después el complejo T es exportado. *VirD2* es mantenido unido al complejo T y gracias a la interacción con las ciclofilinas *RocA*, *Roc4* y *CypA* puede mantener su conformación con *AtKAP $\alpha$*  para poder pasar al núcleo de la planta, así *VirD2-AtKAP $\alpha$*  y *VirE2-VIP1* interactúan para que el complejo T logre pasar al núcleo y por último ya en el núcleo *Vip1* o *Vip2* y *VirD2* y *VirE2* se encargan de la integración del T-ADN al cromosoma (Fig. 6) (Tzfira y Citovsky, 2000).



**Figura 6.** Interacciones moleculares durante la transferencia del T-DNA de *Agrobacterium* sp. a la planta hospedera, tomada de Tzfira y Citovsky, 2000. Las proteínas y señales de la planta en verde, las proteínas bacterianas café, proteínas Vir rojo, ADN azul; flechas zigzag, interacción proteína-proteína, ADN-proteína o proteína-sígnal; flechas grises gruesas resultado funcional de la interacción y flechas grises delgadas indican el origen de las proteínas Vir.



La comprobación molecular de la transformación genética puede hacerse con base en la expresión de un gen reportero, la búsqueda de una secuencia conocida de algún gen, o por medio de un inmunoensayo. Un ejemplo de un gen reportero es el gen *β-gus* el cual genera la enzima β-glucoronidasa, la cual al reaccionar con X-GLUC genera una coloración azul que te indica que el gen ha sido transferido. El uso de la PCR es el más utilizado para la comprobación de la transformación, éste se basa en la búsqueda de una región específica del DNA foráneo en el caso del *A. rhizogenes* los genes *RoIA* y *RoIC* los cuales se amplifican y se puede visualizar por medio de electroforesis. Otro método que puede ser usado es el Sourthen blotting, en el cual se generan anticuerpos específicos para los genes *RoI* y se marcan con moléculas que emiten florescencia cuando se da la unión antígeno anticuerpo (Ortiz, 2008).

Diferentes autores han realizado trasformaciones genéticas en plantas de la familia Asteráceae con resultados de hasta 40% de éxito en la trasformación (cuadro 4).

**Cuadro 4.** Trasformación genética en algunas especies de la familia Asteráceae.

<b>Autor</b>	<b>Especie</b>	<b>Explante</b>	<b>Infección</b>	<b>Co-cultivo</b>	<b>Transformación (%)</b>
Shaneeja <i>et al.</i> , 2014	<i>Artemesia annua</i>	Hojas y vástagos	Directa	MS+ A*	40
Khalili <i>et al.</i> , 2014	<i>Echinacea angustifolia</i>	Hojas y vástagos	Inmersión	MS 0.5X	40
Kiani <i>et al.</i> , 2014	<i>Artemisia annua</i>	Hojas	Directa	MS 0.5X	40

La letra A\*, significa acetosiringona.

### **3 JUSTIFICACIÓN**

México es un país megadiverso, debido a su heterogeneidad en ecosistemas, los cuales brindan el desarrollo de organismos endémicos, estos organismos son muy codiciados por ser exóticos, o por brindar compuestos químicos benéficos para la sociedad, lo que promueve su sobreexplotación y en algunos casos su extinción.

Diversos factores han provocado que el chilcuague se encuentre cada vez menos disponible, entre los cuales destaca su recolección, debido a que provoca la destrucción de la planta, así como su desarrollo tardío (dos a tres años), factor por el cual no abastece la demanda actual. Por lo anterior, es necesario buscar alternativas que permitan impedir la pérdida de esta especie empleando metodologías para su propagación, con el fin de conservar la especie en su ambiente y satisfacer su demanda.

El chilcuague presenta una gran importancia socioeconómica por ser una planta con múltiples propiedades de distinta índole como se ha mencionado anteriormente, y es parte de la cultura en las zonas endémicas, pues esta planta ha servido de sustento para recolectores, productores e intermediarios que han encontrado en el chilcuague una fuente de trabajo tanto en la zona donde se desarrolla como en gran parte del territorio mexicano. Sin embargo, según la asociación de productores de chilcuague de Xichú, Guanajuato se requiere aumentar la producción de esta planta debido a la alta demanda que tiene su raíz, así como para mejorar su economía y aumentar la divulgación de la importancia de la planta a nivel mundial.

Es importante mencionar que todo el uso y conocimiento etnobotánico del chilcuague entre las diferentes personas que obtienen un bien del mismo, ha sido pasado de generación en generación, lo cual ha limitado su conocimiento por la demás población mexicana y el mundo, sin embargo, cada vez se investigan más las propiedades de la planta y su reproducción, ayudando a fortalecer la importancia económica de la misma.

Otro aspecto que hay que tomar en cuenta es que debe impulsarse la investigación para incrementar el contenido de alcaloides en la raíz del chilcuague, mediante la implementación de métodos biotecnológicos como el mejoramiento genético, la

transformación genética y la micropropagación *in vitro* como alternativas para la búsqueda de una producción de alcamidas para abastecer la demanda actual.

## **4 HIPÓTESIS**

La aplicación de la concentración adecuada de fitorreguladores en *H. longipes* provocará la proliferación de brotes, los cuales serán establecidos exitosamente *ex vitro*. Además, los explantes infectados con *A. rhizogenes* serán transformados y presentarán acumulación de afinina sin la necesidad de usar fitorreguladores.

## **5 OBJETIVOS**

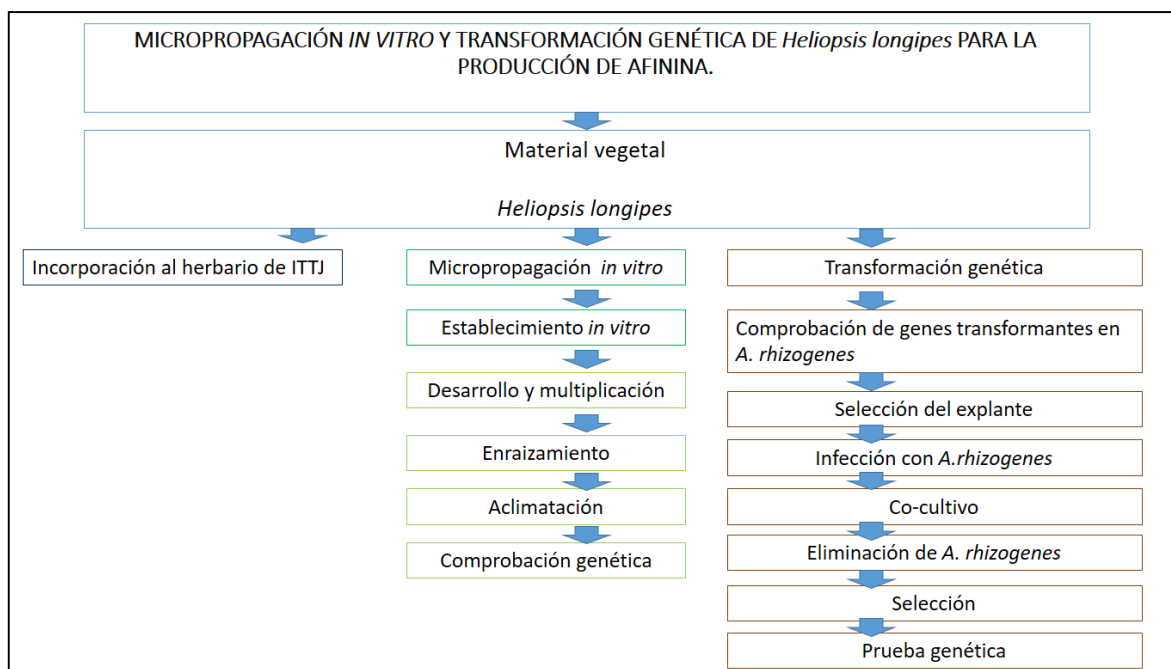
### **5.1 Objetivo general**

Establecer un método de micropropagación *in vitro* y transformación genética de *H. longipes* para la producción de afinina.

### **5.2 Objetivos específicos**

1. Establecer un sistema de micropropagación *in vitro* para la producción de plantas de *H. longipes*
2. Determinar las posibles variaciones somaclonales mediante marcadores ISSR
3. Transformar genéticamente *H. longipes* empleando *A. rhizogenes*
4. Evaluar las raíces transformadas mediante PCR

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 7.** Esquema general de trabajo

### 6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

El material vegetal fue recolectado en las comunidades Álamo y Béltran del municipio de Xichú, Guanajuato (cuadro 5). Posteriormente las tres plantas, los cuatro kg de raíz y los 20 g de aquenios de *H. longipes* fueron trasladados al Instituto Tecnológico de Tlajomulco (Fig. 8). El material vivo se mantuvo en condiciones de invernadero.

**Cuadro 5.** Sitios donde fue colectado el material vegetal en el municipio de Xichú, Guanajuato.

Sitio	Nombre	Latitud	Longitud	Altitud
1	Beltrán	21°17'37.7"	100°03'08.3"	1697
2	El Álamo	21°18'06.1"	100°05'47.5"	1715



**Figura 8.** Raíz, semilla y planta de *H. longipes*, **A**, **B** y **C** respectivamente.

## **6.2 Herborización de *H. longipes* en el herbario DEL ITT**

Un segmento nodal con flor de *H. longipes* fue cortado, colocado en periódico y prensado para su secado por 15 días, con un recambio de periódico diario. Después en una cartulina blanca 65x50 cm se colocó el segmento nodal con flor con ayuda de cinta adhesiva y una ficha que contenía el nombre de la familia, nombre vulgar, nombre científico, localidad, estado, fecha, hábitat, colector, observaciones y determinador. Se incorporó al herbario del Instituto Tecnológico de Tlajomulco.

## **6.3 Micropropagación *in vitro* de *H. longipes***

### **6.3.1 Germinación de semillas**

Para determinar el porcentaje de germinación de las semillas colectadas en Xichú Guanajuato, se colocaron treinta semillas de *H. longipes*, en cajas Petri con papel filtro estéril y fueron humedecidas diariamente con agua destilada por siete días y mantenidas a temperatura ambiente. Se evaluó el porcentaje de germinación después de 10 días.

### **6.3.2 Desinfección de segmentos nodales**

Para obtener explantes asépticos, se desinfectaron 30 segmentos nodales de *H. longipes* de aproximadamente 3 cm en una campana de flujo laminar con cuatro diferentes tratamientos que se muestran en el cuadro 6, después de su triple enjuague con agua destilada estéril, los explantes fueron colocados en medio sólido MS (pH 5.7 y 30 g/L de sacarosa) y mantenidos en un fotoperiodo de 16 h luz a  $2928 \pm 1$  luxes y 8 h de oscuridad, a una temperatura de  $26 \pm 2$  °C y 25% de humedad.

**Cuadro 6.** Tratamientos utilizados para la desinfección de segmentos nodales.

<b>REACTIVOS Y MÉTODOS</b>	<b>T 1</b>	<b>T 2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
Ridomil® 4 g/L por 30 min		X		
Captan® 4g/L por 30 min	X			
Extracto de <i>H. longipes</i>				X
Detergente kirkland® al 10% por 10 min	X	X	X	X
Alcohol al 70% por 1 min	X	X	X	X
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 5% por 3 min, sonicación continua			X	X
Plata coloidal al 0.0018% por 15 min		X	X	X
NaClO al 0.6% mas 3 gotas de Tween 20, sonicación continua	X	X	X	X
Medio MS adicionado con cefotaxima 300 mg/L		X		

Las X en T1, T2, T3 y T4 corresponden a los reactivos y métodos utilizados. Nótese el tiempo y complemento del tratamiento.

### **6.3.3 Evaluación de medios de cultivo y hormonas de crecimiento**

Treinta explantes establecidos con dos meristemas fueron tratados con medio sólido MS y MS 0.5X adicionados con 15 y 30 g/L de sacarosa respectivamente. Cada tratamiento tubo 15 repeticiones y fue evaluado por medio de una prueba t o Wilcoxon a un 95% de nivel de seguridad según la variable. Posteriormente segmentos nodales fueron tratados con medio sólido MS 0.5X con diferentes concentraciones de fitohormonas como se muestra en el cuadro 7.

**Cuadro 7.** Concentraciones de fitohormonas utilizadas en los diferentes tratamientos.

<b>Fitohormonas</b>	<b>Tipo de explante</b>	<b>Concentración mg/L</b>	
BAP	Segmento nodal	0.5	
		0.1	
		0.09	
		0.06	
		0.03	
ANA	Segmento nodal	0.1	
		0.5	
	Hojas	1	
BAP Y ANA	Segmento nodal	BAP	ANA
		0.03	0.03
		0.03	0.06
		0.03	0.09
AIA Y	Segmento nodal	60 g/L <b>SAC</b>	
SACAROSA		0.03	
		0.06	
		0.09	
		0.5	
		1	

La abreviación **SAC** significa Sacarosa.

Para ver la diferencia entre medios líquidos y sólidos de los mejores tratamientos, segmentos nodales con dos meristemas fueron colocados en medio líquido MS 0.5X adicionado con 0.03 mg/L de BAP y medio MS 0.5X con 0.03 mg/L de BAP y ANA.

El efecto de diferentes concentraciones de gelificantes fue evaluado de la siguiente manera, 32 explantes establecidos fueron tratados con medio MS 0.5X adicionado con 3 g/L de Gel rite y 8, 10 y 12 g/L de agar-agar.



Los medios sólidos MS evaluados contenían 3 g/L de Gel rite (SIGMA), pH 5.7 y 15 g/L de sacarosa y fueron mantenidos a  $26 \pm 2$  °C, 25% de humedad relativa y un fotoperiodo 16 h a  $2928 \pm 1$  luxes, se les evaluó fenolización, número de brotes, longitud promedio de brotes, número de raíces, longitud promedio de raíces, longitud de tallo y presencia de callo a los 30 días y se les analizó con el paquete estadístico Statgraphics® centurión XVI. Los medios líquidos, fueron mantenidos en agitación continua de 180 rpm, 28 °C, 25% de humedad relativa y un fotoperiodo 12 h de  $2928 \pm 1$  luxes por 10 días. Después los explantes se colocaron en medio sólido MS 0.5X con las mismas concentraciones de hormonas y se analizaron como se menciona anteriormente.

Para la evaluación de las variables fenolización y presencia de callo, se formuló una escala según el daño causado o la presencia de callo en el explante como se muestra en el cuadro 8.

**Cuadro 8.** Criterios utilizados para la evaluación de las variables fenolización y callo.

<b>Escala</b>	<b>Fenolización</b>	<b>Callo</b>
1	0%	Sin formación de callo
2	10-20%	Ligera formación de callo con brotes o raíces de tamaño normal
3	30%	Ligera formación de callo con brotes o raíces de tamaño medio
4	40%	
5	50%	Formación de callo con brotes y raíces pequeños
6	60%	Formación de callo sin brotes ni raíces, áreas pequeñas
7	70%	aun sin desorganizarse
8	80%	
9	90%	Formación y crecimiento de callo sin brotes ni raíces,
10	100%	explante totalmente desorganizado

#### **6.3.4 Aclimatación de plántulas**

Sesenta plantas *in vitro* que presentaban raíz abundante fueron establecidas en dos tipos de sustrato. El sustrato (A) compuesto de Peat moss (SUNCHINE 3 MIX) y Agrolita (2:1 p/p) y (B) compuesto de Peat moss y vermiculita (2:1 p/p). Las plantas fueron colocadas en charolas almacigo con los diferentes sustratos y tapadas con una bolsa transparente en condiciones de invernadero por una semana. Fueron regadas diariamente y la bolsa que cubría la charola fue gradualmente perforada a partir de la segunda semana, posteriormente fue retirada. Treinta días después se evaluó el porcentaje de supervivencia en ambos sustratos.

#### **6.3.5 Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN se utilizaron 150 mg de hoja de *H. longipes* proveniente de cuatro plantas madre y ocho plantas establecidas *in vitro*. La extracción de ADN fue llevada a cabo empleando el protocolo Doyle y Doyle, 1990; de la siguiente manera: se precalentó el buffer de extracción que contenía 2% CTAB p/v, 1.4 M NaCl, 0.2% 2  $\beta$ -mercaptoetanol v/v, 20 mM de EDTA, 100 mM de Tris-HCl y un pH de 8. Posteriormente el tejido fue colocado en un mortero esterilizado en el cual se agregó 1 mL del buffer de extracción, se molió y una vez que la mezcla estuvo homogénea, fueron tomados 500  $\mu$ L de la misma, se colocaron en un tubo Eppendorf y se incubó a 60° C por 1 h. Posteriormente, fueron agregados 500  $\mu$ L de cloroformo, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min y se recuperó la fase acuosa, la cual fue agregada a otro tubo que tenía un volumen igual de isopropanol y 50  $\mu$ L de acetato de sodio 3.5 M. Se mezcló y centrifugó como se había realizado anteriormente y fue decantado con precaución para no tirar la pastilla de ADN. Después se agregó 1 mL de etanol al 70 %, se centrifugo a 14000 rpm y fue decantado una vez más, este paso fue realizado dos veces. Luego se concentró en un concentrador de ADN a 40°C por 10 min. Por último, se agregaron 100  $\mu$ L de agua inyectable y se almacenó a 4°C.

#### **6.3.6 Análisis genético empleando marcadores ISSR**

Para verificar la similitud genética entre las plantas *in vitro* y la planta madre se realizó una prueba microsatélite. Se probaron diferentes oligonucleótidos los cuales se muestran en el cuadro nueve. El cuadro 10 indica los elementos empleados para

realizar las reacciones de amplificación, las cuales fueron desarrolladas empleando un termociclador Select cycler, de Select Bioproducts® en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, continuando con 35 ciclos de 94°C por un min de desnaturalización, 1 min de alineamiento con la temperatura adecuada según el oligonucleótido, 72°C por 2 min de extencion,72°C por 7 min de extensión final.

**Cuadro 9.** Oligonucleótidos probados para los microsátélites.

<b>Oligonucleótidos código</b>	<b>Tm en °C</b>	<b>Secuencia</b>
(CT)8AGA	48.1	(CT)8AGA
T(CT)7CC	48.1	T(CT)7CC
(CT)8RG	48.1	(CT)8RG
(GACA)3 YR	35	GACAGACAGACAYR
(GACA)4 RG	35	GACAGACAGACARG
(AG)8C	48.8	AGAGAGAGAGAGAGAGC
(AG)8YC	48.8	(AG)8YC
(GA)8YG	48.8	(GA)8YG
(GA)8YC	46.7	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
G(AG)7AC	46.8	G(AG)7AC
(GA)8C	52	GAGAGAGAGAGAGAGAC
GTGACGA(CT)6	52.5	GTGACGA(CT)6
A(CA)7CC	52.8	A(CA)7CC

La abreviación **Tm** significa temperatura de alineamiento.

**Cuadro 10.** Componentes utilizados en la PCR.

<b>Componentes</b>	<b>Cantidades para 1 reacción de 12 <math>\mu</math>L</b>
Agua	7.8 $\mu$ L
Buffer Taq 10X	1.25 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1 $\mu$ L
dNTP's Mix 10 mM	0.25 $\mu$ L
Oligonucleótidos 10 pmol/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Taq DNA polimerasa 5U/ $\mu$ L	0.2 $\mu$ L
ADN 27 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L

Para la corroboración de los productos PCR fue preparado un gel de agarosa al 1 % diluido en 30 mL de amortiguador SB 1X (de SB 20X preparado con 8 g/L de NaOH y 35 g/L de ácido bórico pH 8.5), la solución fue homogenizada, se dejó enfriar y se le adicionó 1.25  $\mu$ L de bromuro de etidio (10 mg/mL). La electroforesis fue desarrollada a 120 volts por 30 minutos, al finalizar la corrida, el gel se retiró y observó en un transluminador de rayos UV.

Se realizó una PCR para el ADN de las plantas *in vitro* y madre con el oligonucleótido T(CT)<sub>7</sub>CC con las condiciones mencionadas arriba y los componentes del cuadro 7. Posteriormente se corrió un gel de agarosa al 1% por 40 min para corroborar los productos del PCR, en el cual se cargó también ADN de *Tithonia tubiformis* y un marcador de 1Kb.

Con los patrones de bandeo mostrados en gel se realizó una matriz para ver la similitud entre las muestras y se analizó con el índice de similitud de Jaccard con el programa estadístico PAST (Hammer *et al.*, 2001).

## **6.4 Transformación genética**

### **6.4.1 Extracción de ADN bacteriano**

Las cepas silvestres ATCC15834, k599 y AR1500 de *A. rhizogenes* fueron inoculadas en placas Petri con 20 mL de medio LB (5g/L cloruro de sodio, 5 g/L de extracto de levadura, 50 mg/L rifampicina, 10 g/L de peptona de caseína y 15 g/L de agar-agar) por dos días a temperatura ambiente, posteriormente una colonia fue inoculada en 20 mL de medio LB líquido a 180 rpm y 28°C por un día. Después 3 mL de solución bacteriana fueron centrifugados a 6000 rpm por 5 min y resuspendidos en 200 µL de buffer TE 1X (Tris HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH 8), 300 µL de buffer TE 1X con SDS 1% p/v y 1.5 µL de proteinasa K 20 mg/mL, posteriormente se incubó por una hora a 65 °C. Después fueron adicionados 84 µL de NaCl 5 M más 60 µL de CTAB al 10% p/v disuelto en NaCl 0.7 M y se incubó a 65 °C por 20 min. Seguido de la incubación fue agregado un volumen igual de fenol, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min y se transfirió el sobrenadante a otro tubo; posteriormente un volumen igual de cloroformo fue agregado, se mezcló y centrifugó a 14000 rpm por 5 min, se tomó el sobrenadante, fue agregado a otro tubo un volumen igual de isopropanol frío y se incubó 15 min a -20 °C. Al paso de la incubación se centrifugó a 14000 rpm por 5 min, el sobrenadante fue eliminado, se agregó etanol frío al 70%, se centrifugó una vez más a 14000 rpm por dos minutos y se eliminó el sobrenadante; después la pastilla fue secada a temperatura ambiente y resuspendida en 100 µL de agua inyectable.

La corroboración de ADN fue realizada en un gel de agarosa al 1 % diluido en 15 mL de amortiguador SB 1X (de SB 20X preparado con 8 g/L de NaOH y 35 g/L de ácido bórico pH 8.5), la solución se homogenizó y se le adicionó 0.6 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL). La electroforesis fue realizada a 120 volts por 25 minutos, al finalizar la corrida el gel fue retirado y observado en un transluminador de rayos UV.

### **6.4.2 Amplificación por PCR de genes *VirD* y *RoIB***

Veinte nanogramos de ADN provenientes de las cepas silvestres K599, AR1500 y ATCC15834 fueron utilizados para una PCR de 12.5 µL que contenía 6.8 µL de H<sub>2</sub>O, 1.25 µL de Buffer Taq 10X con (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 1µL de MgCl<sub>2</sub> 25 Mm, 0.25 µL de

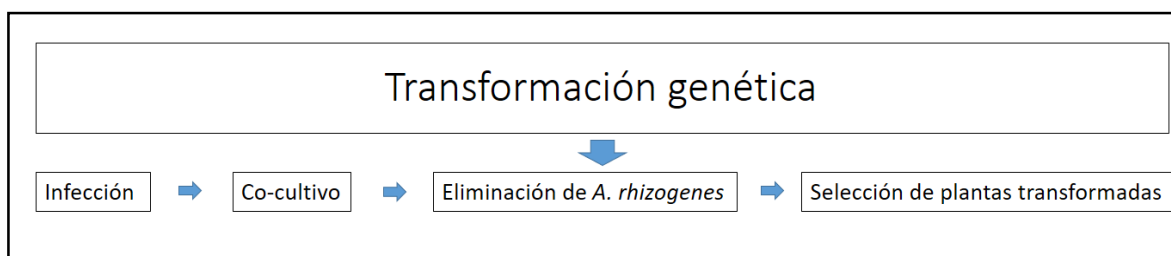
dNTP'sMix 10 mM, 0.2  $\mu$ L de Taq DNA polimerasa (Thermo scientific) y 0.5  $\mu$ L (10 pmol) de oligos *Rol B* 1 (5 ATG GAT CCC AAA TTG CTA TTC CTT CCA CGA), *Rol B* 2 (5 TTA GGC TTC TTT CTT CAG GTT TAC TGC AGC), *Vir D* 1 (5 ATG TCG CAA GGA CGT AAG CCCA) y *Vir D* 2 (5 GGA GTC TTT CAG CAT GGA GCA A). La PCR fue llevada a cabo en un termociclador Select cycler, de Select Bioproducts® a las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 94°C por 3 min, continuando con 30 ciclos de 94°C por un min de desnaturalización, 55°C por 1 min de alineamiento, 72°C por 1.5 min de extensión y 72°C por 7 min de extensión final. La corroboración de los productos PCR se llevó acabo con un gel de agarosa al 1% diluido en 30 mL de amortiguador SB 1X.

#### 6.4.3 Cultivo de *A. rhizogenes*

La cepa silvestre ATCC15834 de *A. rhizogenes* fue inoculada en placas Petri con 20 mL de medio sólido LB por dos días a temperatura ambiente, posteriormente una colonia fue resemebrada en las mismas condiciones y al paso de dos días una asada fue inoculada en 20 mL de medio LB líquido a 180 rpm y 28°C por dos días. Después la solución de bacterias fue centrifugada y el medio LB fue remplazado por medio MS 0.5X adicionado con 200  $\mu$ M de acetosiringona y se ajustó a una D.O. <sub>600nm</sub> de 0.7.

#### 6.4.4 Co-cultivo con *A. rhizogenes*

Para la infección, co-cultivo y eliminación *A. rhizogenes* se siguió el esquema mostrado en la figura 9, todas las variantes probadas en los tratamientos se muestran en el cuadro 11. Los resultados fueron evaluados a los 30 días.



**Figura 9.** Esquema de transformación genético.

**Cuadro 11.** Variables utilizadas en los diferentes experimentos realizados para la transformación genética de *H. longipes* (continua en la pág. siguiente).

<b>Explante</b>	<b>Tratamiento previo del explante</b>	<b>Infección y tiempo</b>	<b>Conc. Acetosiringona</b>	<b>D.O. 600 nm</b>	<b>Co-cultivo</b>	<b>pH co-cultivo</b>	<b>Antioxidante</b>	<b>Antibiótico y Conc.</b>
Hoja y tallo	MS	inmersión 20 min.	200 µM	0.7	2 días	5.7	ninguno	Cefotaxima 500 mg/L
Hoja y tallo	MS	inmersión 20 min.	200 µM	0.7	2 días	5.7	ninguno	PPM 1 mL/L PPM 2 mL/L
Hoja y tallo	MS	inmersión 20 min.	200 µM	0.7	2 días	5.7	ninguno	Ceftriaxona/estreptomicina 500 mg/L c/u
Hoja y tallo	MS	inmersión 20 min.	200 µM	0.7	2 días	5.7	ninguno	Gentamicina 500 mg/L
Hoja y tallo	MS	inmersión 20 min.	200 µM	0.7	2 días	5.7	PVP 4g/L	PPM 1 mL/L PPM 2 mL/L
Hoja y tallo	MS	inmersión 20 min.	200 µM	0.7	2 días	5.7	PVP 4 g/L	Ceftriaxona/estreptomicina 500 mg/L c/u
Nudos	MS	Inyección	200 µM	0.7	2 días	5.7	ninguno	Cefotaxima 500 mg/L

<b>Explante</b>	<b>Tratamiento previo del explante</b>	<b>Infección y tiempo</b>	<b>Conc. Acetosiringona</b>	<b>D.O. 600 nm</b>	<b>Co-cultivo</b>	<b>pH co-cultivo</b>	<b>Antioxidante</b>	<b>Antibiótico y Conc.</b>
Hoja y tallo	MS	inmersión 20 min	200 µM	0.7	2 días	4.8	ninguno	Cefotaxima 500 mg/L
Hoja y tallo	MS	inmersión 1 día en medio líquido	200 µM	0.7	1 día	4.8	ninguno	Cefotaxima 500 mg/L
Hoja y tallo	MS	inmersión 2 días en medio líquido	200 µM	0.7	2 días	4.8	ninguno	Cefotaxima 500 mg/L
Hoja y tallo	MS y BAP 0.03 mg/L	inmersión 1 día en medio líquido	200 µM	0.7	1 día	4.8	ninguno	Cefotaxima 500 mg/L
Hoja y tallo	MS y BAP 0.03 mg/L	inmersión 1 día en medio líquido	200 µM	0.7	1 día	5.4	ninguno	Cefotaxima 500 mg/L
Hoja y tallo	MS y BAP 0.03 mg/L	inmersión 2 días en medio líquido	200 µM	0.7	1 día	5.4	ninguno	Cefotaxima 500 mg/L



Para mostrar más detalladamente la metodología se presenta el siguiente ejemplo: Al menos 100 segmentos internodales u hojas de *H. longipes* establecidas *in vitro* fueron utilizados para la transformación. Los segmentos internodales y hojas fueron cortados en una caja Petri que contenía 40 mL de solución bacteriana de *A. rhizogenes* (D.O.<sub>600nm</sub> 0.7) y se mantuvieron en la misma por 20 min, posteriormente se utilizó papel estéril para retirar el exceso de bacteria y se colocaron los explantes en medio semisólido MS 0.5X para un co-cultivo (1 o 2 días) en ausencia de luz, 28 °C y 25% de humedad relativa. Después del co-cultivo los explantes fueron enjuagados con agua destilada estéril y secados en papel para retirar el exceso de bacteria, posteriormente los explantes fueron colocados en medio MS 0.5X adicionado con cefotaxima 500 mg/L. Al paso de 15 días, los explantes fueron colocados en medio MS/2 adicionado con 250 mg/L de cefotaxima siempre y cuando no presentaran bacteria. Pasados 30 días se cortaron todas las raíces encontradas en las heridas antes realizadas. Estas raíces se colocaron en medio líquido MS 0.5X y se mantuvieron a una agitación continua de 180 rpm, 28 °C, 25% de humedad relativa y un fotoperiodo 12 h de 2928 ±1 luxes.

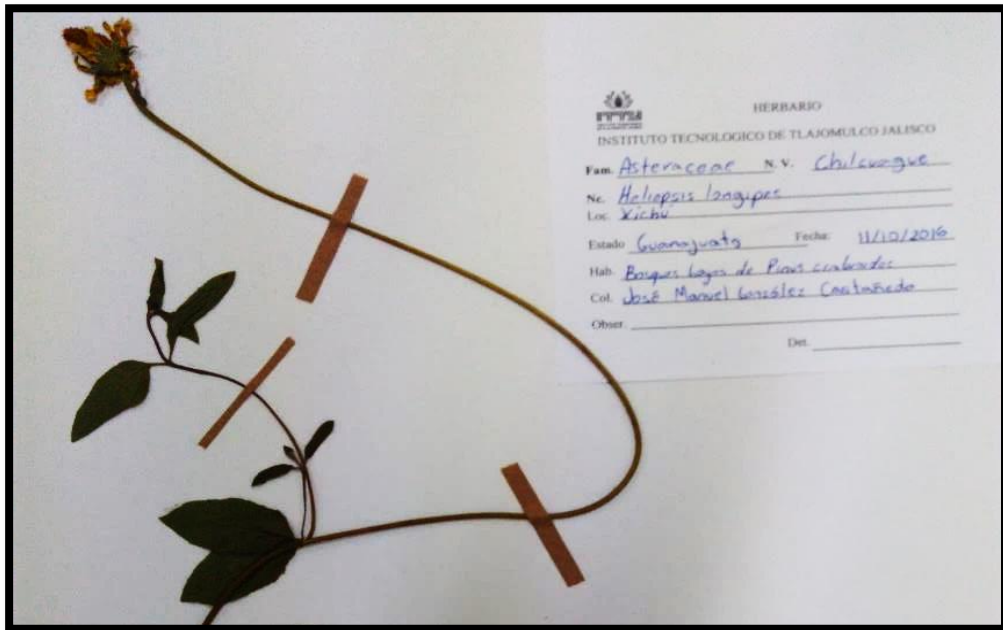
#### **6.4.5 Análisis molecular de plantas transformadas**

Ciento cincuenta mg de raíces aparentemente transformadas fueron utilizados para una extracción de ADN con el método Doyle y Doyle 1990, así mismo para la corroboración de la transformación genética se realizó una PCR para los genes *RoIB* y *VirD*.

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Herborización de *H. longipes*

Se incorporó al herbario del Instituto Tecnológico de Tlajomulco un segmento nodal con flor de *H. longipes* y se registró en una ficha los siguientes datos: el nombre de la familia, nombre vulgar, nombre científico, localidad, estado, fecha, hábitat, colector, observaciones y determinador (Fig. 10).



**Figura 10.** Segmento nodal de *H. longipes* herborizado incorporado al herbario del Instituto Tecnológico de Tlajomulco.

### 7.2 Germinación de semillas

El porcentaje de germinación obtenido fue casi nulo, al germinar sólo una semilla de 30 que se probaron. Lo anterior debido probablemente a la edad del akenio y la temperatura a la que habían sido expuestos; ya que de acuerdo con Cilia, 2007, estas dos características pueden afectar el porcentaje de germinación. Por lo anterior, se decidió usar segmentos nodales como explante para el establecimiento *in vitro* de *H. longipes*.

### 7.3 Desinfección de segmentos nodales

Con respecto a la desinfección de segmentos nodales, el tratamiento tres (Detergente kirkland® al 10% por 10 min, Alcohol al 70% por 1 min, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 5% por 3 min, con sonicación continua, Plata coloidal al 0.0018% por 15 min y NaClO al 0.6% mas 3 gotas de Tween 20 con sonicación continua) mostró ser el más eficiente debido a que aunque el 70% de los explantes se contaminaron y el 4.6% de los explantes murieron, el 25.4% restante fue suficiente para establecer el cultivo *in vitro*, al tener viabilidad y no estar contaminados. En el tratamiento uno se observó el 100% de explantes contaminados y en el tratamiento cuatro todos los explantes murieron. En el cuadro 12 se muestran los resultados obtenidos de los cuatro tratamientos probados para la desinfección de los segmentos nodales empleados para el establecimiento del cultivo *in vitro* de *H. longipes*.

Los explantes mostraban presencia de hongos fitopatógenos, por esta razón se utilizaron los fungicidas comerciales Ridomil® y Captan® en los tratamientos uno y dos, recomendados por las empresas Syngenta y Arysta LifeScience respectivamente. El peróxido de hidrogeno fue utilizado para la eliminación de hongos en el tratamiento tres y mostró los mejores resultados. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha mostrado ser eficaz para la reducción de hongos en la desinfección de semillas de *Pseudotsuga menziesii* var. *Glauca*, *Pinus ponderosa*, especies del género *Tillandsia* y arroz, pues se ha comprobado que tiene mayor grado de oxidación que el cloro; sus moléculas son degradables en el agua y es bactericida, virucida y fungicida, sin embargo, también se debe tener cuidado con su uso en el cultivo *in vitro*, pues concentraciones del 10-20% producen quemaduras a los explantes provocando su muerte (García *et al.*, 2008). Para el tratamiento cuatro se añadió además extracto de *H. longipes* pues se ha demostrado que es funcional para el control de diversos hongos (Molina *et al.*, 2004), sin embargo, todos los explantes resultaron muertos y no se tienen reportes de trabajos parecidos. La búsqueda de la concentración adecuada del extracto de *H. longipes* para la desinfección de explantes sería una opción para investigación futura.

**Cuadro 12.** Porcentajes obtenidos para la desinfección de segmentos nodales.

<b>PORCENTAJES</b>	<b>T 1</b>	<b>T 2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
Porcentaje de contaminación (%)	100a	96.6a	<b>70b</b>	0c
Porcentaje de explantes muertos (%)	0a	3.4ab	<b>4.6b</b>	100c

Los valores de las medias en las filas con diferentes letras son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ; Kruskal Wallis).

## **7.4 Evaluación de medios de cultivo y reguladores de crecimiento**

### **7.4.1 Comparación entre medio MS y MS 0.5X**

En el análisis de variables entre los medios MS y MS 0.5X solo la fenolización y el número de brotes tuvieron diferencia significativa con un nivel de significancia del 95%. Se eligió el medio MS 0.5X para el desarrollo de este trabajo pues mostró mayor número de brotes y raíces por explante, mayor porcentaje de explantes con raíz, mayor longitud de raíz promedio y tamaño de explante. Todas las variables sobresalientes para el medio MS 0.5X son importantes para las etapas de desarrollo, multiplicación y enraizamiento. El medio MS tuvo una menor fenolización y mayor tamaño de longitud de explantes, sin embargo, aunque la fenolización es mayor en el medio MS 0.5X ambas son bajas y por lo tanto no representativas (cuadro 13). La mejora en las variables mencionadas arriba, podría deberse a que *H. longipes* está adaptada a suelos someros (López, 2007), por lo tanto, cuando disminuyes la concentración de sales mejoras la adaptación del explante al medio nuevo. Resultados similares presentó Rueda, 2006 en *Stevia rebaudiana* B. donde reporta un aumento en el tamaño de explantes al bajar la concentración de sales del medio MS.

**Cuadro 13.** Comportamiento de los explantes en diferentes medios.

VARIABLE	MS	MS 0.5X
Fenolización (%)*	1.12 a	2 b
Brotos por explante (No)**	2.62 a	4 b
Longitud promedio de brotes (cm)**	3.18 a	1.93 a
Raíces por explante (No)*	0.75 a	1.75 a
Explantes con raíz (%)*	50	62.5
Longitud promedio de raíz (cm)*	1.3 a	2.5 a
Tamaño de explante (cm)**	4.43 a	4.5 a

Las letras iguales en las filas no son significativamente diferentes (LSD\*\* y kruskal Wallis\* P<0.05).

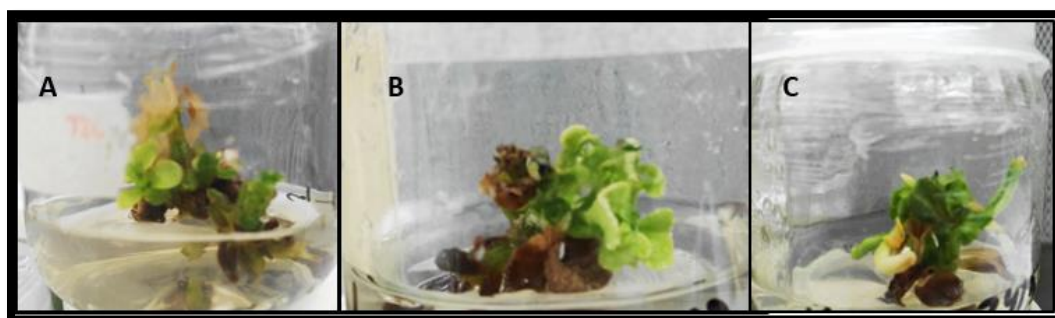
#### 7.4.2 Efecto de 6-bencilaminopurina (BAP)

El efecto de las concentraciones de 0.1 y 0.5 mg/L de BAP comparado con el medio MS y MS 0.5X mostró diferencias significativas en fenolización, número de brotes, longitud de brotes, número de raíces promedio por explante, longitud de raíz y tamaño de explante. Se observó que a partir de 0.1 mg/L de BAP la fenolización incrementa, y el número y longitud de brotes por explante disminuyen al igual que las raíces (cuadro 14). Las citocininas promueven la formación de brotes adventicios, e inhiben la dominancia apical y la formación de raíces generalmente, por lo tanto es normal la disminución de las raíces en los explantes de *H.longipes* cuando se emplea una concentración mayor de citocininas. También se observaron deformaciones en los explantes, ya que las citocininas están involucradas en la división, elongación y diferenciación celular y una concentración elevada de éstas puede alterar el sistema. Así mismo BAP en concentraciones elevadas llega a inducir muerte celular programada por la aceleración de la senescencia lo cual confirma que la fenolización y vitrificación de los explantes está correlacionada directamente con el aumento de las citocininas (Mahmoud, 2013) (Fig. 11).

**Cuadro 14.** Efecto de los medios MS, MS 0.5X y MS 0.5X más 0.1 y 0.5 mg/L de BAP.

VARIABLE	MS	MS 0.5X	MS 0.5X	MS 0.5X
			0.1 mg/L BAP	0.5 mg/L BAP
Fenolización (%)*	1 a	1.75 b	3.87 c	3.87 c
Brotos por explante (No)**	5.12 a	7 b	4.62 a	4.62 a
Longitud promedio de brotes (cm)**	2 a	1.75 a	0.63 b	0.87 b
Raíces por explante (No)*	1 a	0.87 a	0 b	0 b
Explantes con raíz (%)*	62.5	50	0	0
Longitud promedio de raíz (No)*	0.75 a	0.47 a	0 b	0 b
Tamaño de explante (cm)**	2.62 a	3 b	3.12 b	3 b
Callo (No)*	1 a	1 a	1 a	1 a

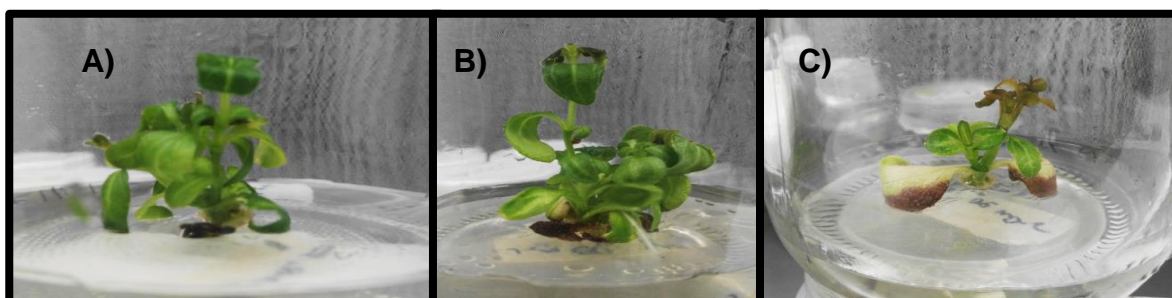
Las letras iguales en las filas no son significativamente diferentes (LSD\*\* y kruskal Wallis\* P<0.05).



**Figura 11.** Explantes de *H. longipes* con diferentes concentraciones de BAP. **A.** 0.1 mg/L, **B** 0.5 mg/L y **C** 1 mg/L respectivamente.

Al observar los resultados anteriores, se realizó un experimento con menores concentraciones, 0.03, 0.06 y 0.09 mg/L de BAP. En estas condiciones, la fenolización estuvo correlacionada directamente con el aumento de la concentración de BAP, en el tratamiento con 0.03 mg/L de BAP se observó el mayor

número de brotes (6.125 por explante), sin embargo, no tuvo diferencia con el de 0.06 mg/L de BAP para este caso (Fig. 12 y 13). Los tratamientos con BAP resultaron con menor longitud brotes que el control (MS 0.5X) (cuadro 15). En comparación con resultados de otras plantas de la familia Asteráceae, obtuvimos mayor número de brotes que Rueda *et al.*, 2006 y Salazar *et al.*, 2005 ya que ellos obtuvieron 2.5 y 4.68 brotes por explante para *Stevia rebaudiana* B, y *Aster ericoides* respectivamente, trabajando con un tipo de explante y condiciones similares.



**Figura 12.** Explantes de *H. longipes* en diferentes concentraciones de BAP, **A.** 0.03 mg/L, **B.** 0.06 mg/L y **C.** 0.09 mg/L respectivamente.

**Cuadro 15.** Efecto de los medios MS 0.5X y MS 0.5X más 0.03, 0.06 y 0.09 mg/L de BAP.

<b>VARIABLE</b>	<b>MS 0.5X</b>	<b>MS 0.5X, 0.03 mg/L BAP</b>	<b>MS 0.5X 0.06 mg/L BAP</b>	<b>MS 0.5X 0.09 mg/L BAP</b>
Fenolización (%)*	1.75 a	2 a	3.12 b	4 b
Brotes por explante (No)**	3.75 a	6.12 c	5.75 bc	4.75 ab
Longitud promedio de brotes (cm)**	1.07 a	0.95 b	0.85 c	0.87 bc
Explantes con raíz (%)*	25	12.5	25	0
Tamaño de explante (cm)**	2.87 a	2.62 ab	2.06 b	2.75 a
Callo (No)*	0.5 a	2.75 b	1.75 c	0.87 a

Las letras iguales en las filas no son significativamente diferentes (LSD\*\* y kruskal Wallis\* P<0.05).

#### **7.4.3 Efecto del ácido naftalenacético (ANA) en segmentos nodales y hojas**

De las variables evaluadas para ver el efecto sobre segmentos nodales de *H. longipes* de los tratamientos 0.1, 0.5 y 1 mg/L de ANA, longitud de raíces y el número de raíces promedio no tuvieron diferencia significativa. Para la variable callo se observó que el mejor tratamiento fue de 1 mg/L de ANA con una media de formación de callo de 6.5 y un 75% de explantes con callo mayor a 5 (Fig. 14). El tratamiento con una concentración de 0.1 mg/L mostró un valor promedio 5.25 de formación de callo y 37.5% de explantes con callo mayor a 5. El número de brotes en los explantes tratados fueron disminuyendo conforme fue aumentando la cantidad de ANA en los medios (cuadro 16).



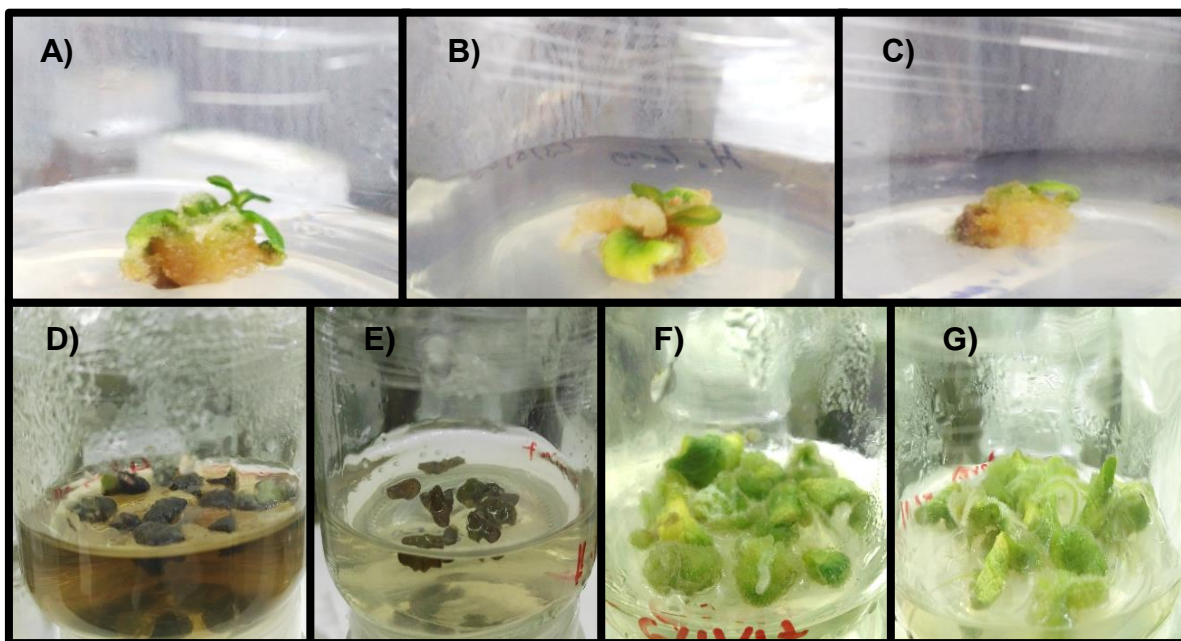
**Cuadro 16.** Comportamiento de los medios MS al 50%, y MS al 50% más 0.1,0.5 y 1 mg/L de ANA para hojas y segmentos nodales de *H. longipes*.

VARIABLE	EXPLANTE	MS 0.5X	MS 0.5X, 0.1 mg/L ANA	MS 0.5X, 0.5 mg/L ANA	MS 0.5X, 1 mg/L ANA
Fenolización (%)	Segmento nodal	1 a	1.5 ab	3.25 b	1.12 a
	Hoja	9.15 a	7.7 b	1.4 c	1.35 c
Brotes promedio (No)	Segmento nodal	3.12 a	1.5 b	0.62 c	0.25 c
Longitud promedio de brotes (cm)	Segmento nodal	1.37 a	0.95 a	0.66 b	0.31 b
Raíces por explante (No)	Segmento nodal	0 a	1 a	0.25 a	0.25 a
	Hoja	0 a	0 a	1.35 b	2.55 b
Explantes con raíz (%)	Segmento nodal	0	37.5	25	25
	Hoja	0	0	50	50
Longitud promedio de raíz (cm)	Segmento nodal	0 a	0.22 a	0.12 a	0.06 a
	Hoja	0 a	0 a	0.25 b	0.4 b
Tamaño de explante (cm)	Segmento nodal	2.18 a	1.68 a	1.2 b	1.1 b
Callo (No)	Segmento nodal	0.62 a	3.37 b	5.25 bc	6.25 c
	Hoja	0 a	0.15 a	4.2 b	4.5 b
Explantes con callo mayor a 5 (%)	Segmento nodal	0	37.5	75	75
	Hoja	0	0	50	50

Las letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ; Kruskal Wallis)

En el caso de las hojas de *H. longipes* tratadas con ANA a 0.1, 0.5 y 1 mg/L. La fenolización, número de raíces por explante, longitud de raíces y callo mostraron diferencia significativa al 95%. La fenolización tuvo una disminución conforme aumento la concentración de ANA (Fig.22). Así mismo los tratamientos con 0.5 y 1 mg/L de ANA mostraron una formación de raíces con 1.35 y 2.55 raíces por explante respectivamente y un 50% de explantes con presencia de raíz para ambos (Fig. 14). Para la formación de callo los mejores resultados fueron obtenidos con 0.5 y 1 mg/L ambos con 50% de explantes con formación de callo (cuadro 16).

Tisserat, 1985, reportó que la formación de callos esta correlacionada a la adición de auxinas al medio del cultivo, y que este efecto podría verse potencializado por la adición conjunta de auxinas y citocininas en el mismo medio de cultivo. En el caso de *H. longipes*, la formación de callo fue obtenida en segmentos nodales y hojas en un 75 y 50% de explantes respectivamente, con la adición de ANA a una concentración de 1 mg/L en el medio. La diferencia en formación de callo entre los dos tipos de explantes podría deberse a que la concentración de fitohormonas es diferente en hojas y tallos (Jordan y Casareto 2006, Salisbury, 2000). Las hojas tratadas con ANA a 0.5 y 1 mg/L mostraron rizogénesis a diferencia de los segmentos nodales, los cuales sólo presentaron formación de callo a estas concentraciones. Esto se debe a que la concentración de reguladores de crecimiento requeridos para la organogénesis puede variar de un tejido a otro dentro de la misma planta, o entre plantas de la misma especie, por lo tanto, un explante puede variar de la respuesta de otro explante bajo las mismas concentraciones de hormonas (Litz *et al.* 1983).



**Figura 13.** Formación de callo en segmentos nodales y hojas de *H. longipes* empleando diferentes concentraciones de ANA. **A, B** y **C** segmentos nodales tratados con 0.1, 0.5 y 1 mg/L respectivamente. **D, E, F** y **G** hojas tratadas con 0, 0.1, 0.5 y 1 mg/L respectivamente.

#### **7.4.4 Efecto de la combinación del medio MS 0.5X adicionado con 0.03 mg/L de BAP con diferentes concentraciones de ANA**

En las variables estudiadas para las combinaciones de BAP x ANA solo la longitud de raíz, no tuvo diferencia significativa con ningún tratamiento, las demás mostraron diferencia solo con el control, pero no entre los tratamientos. En el caso de la fenolización el medio MS 0.5X adicionado con 0.03 mg/L de BAP tuvo mayor fenolización con 3.37 y el medio MS 0.5X la menor con 1.25. El mejor tratamiento para número de brotes por explante fue el medio MS 0.5X adicionado con 0.03 mg/L de BAP sin embargo solo tuvo diferencia con el medio MS 0.5X. Para la longitud de brotes el medio MS 0.5X mostró los de mayor longitud (0.71 cm), en cambio el MS 0.5X con 0.03 mg/L de BAP los de menor longitud (0.51 cm). El número de raíces por explante se mostró mayor en el tratamiento MS 0.5X adicionado con BAP x ANA 0.03 mg/L c/u con 1.5 sin embargo no tuvo diferencia significativa con los tratamientos de BAP x ANA 0.03 y 0.09. Se realizó un experimento más con solo tres tratamientos: MS 0.5X, MS 0.5X con 0.03 mg/L de BAP y MS 0.5X adicionado con 0.03 mg/L de BAP y ANA en el cual el tratamiento con 0.03 mg/L de BAP mostró

significativamente menor fenolización 1.75, mayor número de brotes 6.75 y mayor longitud de brotes y explantes con 1.88 y 4.56 respectivamente (cuadro 17). Estos resultados nos confirman que el mejor tratamiento para desarrollo y multiplicación para *H. longipes* es el medio MS/2 adicionado con 0.03 mg/L.

**Cuadro 17.** Efecto de los medios MS 0.5X, MS 0.5X con 0.03 mg/L de BAP y MS 0.5X más 0.03 mg/L de ANA y BAP en explantes de *H. longipes*.

VARIABLE	MS 0.5X	MS 0.5X, 0.03 mg/L BAP	MS 0.5X BAPxANA 0.03 mg/L c/u
Fenolización (%)*	2.2 ab	1.7 a	2.7 b
Brotes por explante (No)**	3.5 a	6.7 b	3.7 a
Longitud promedio de brotes (cm)**	1.3 a	1.8 b	1.01 c
Tamaño de explante (cm)**	2.1 a	4.5 b	2 a
Callo (No)*	0 a	2 b	3 c

Las letras iguales en las filas no son significativamente diferentes (LSD\*\* y kruskal Wallis\* P<0.05).

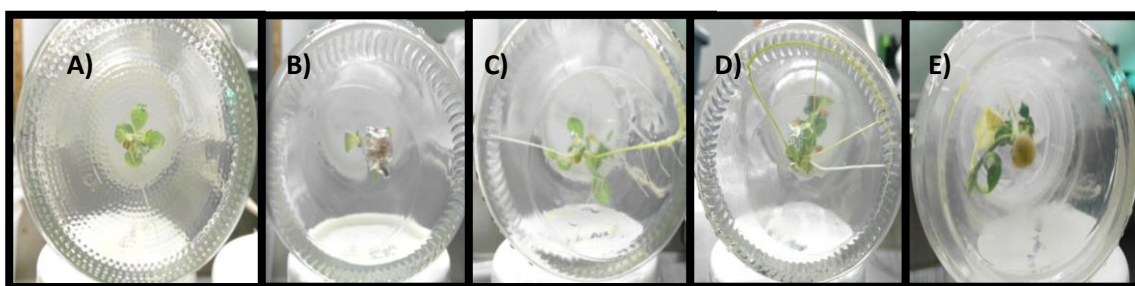
#### 7.4.5 Efecto del ácido indolacético (AIA) y concentración de sacarosa elevada

El tratamiento con 60 g sacarosa mostró la mayor fenolización en explantes *H. longipes* con 3.14, no tuvo diferencia significativa con los medios adicionados con 0.09, 0.06 y 1 mg/L de AIA y mostró engrosamiento de tallos. El control (MS 0.5X) tuvo menor fenolización que todos los tratamientos con 1.14. En el caso del número de brotes por explante el mejor tratamiento fue el control con 3.43 sin embargo no tuvo diferencia significativa con los tratamientos 0.03, 0.06 y 0.09 mg/L de AIA. Así mismo se observó que el aumento de la concentración de AIA fomenta la formación de callo en los explantes de *H. longipes* (cuadro 18). Para el caso de las raíces el tratamiento 0.06 mg/L de AIA tuvo los mejores resultados con 3 raíces promedio por explante y 100% de explantes con presencia de raíz, dicho tratamiento no tuvo diferencia con los tratamientos 0.03 y 0.09 mg/L de AIA en el caso de número de raíces, pero si en el porcentaje de explantes con raíz los cuales fueron 85 y 57%

respectivamente (cuadro 18). Para la longitud de las raíces, los tratamientos con 60 g/L de sacarosa, 0.5 y 1 mg/L de AIA mostraron tener las raíces más pequeñas con 1, 0.43 y 0.86 cm respectivamente. El control (MS 0.5X) tuvo la mayor longitud promedio de raíces sin embargo no tuvo diferencia significativa con los tratamientos 0.03 0.06 y 0.09 mg/L de AIA. Los explantes tratados con 1 mg/L AIA presentaron el 14% de explantes con callo (Fig. 15).

Es muy conocido el uso de AIA para fomentar la formación de raíces *in vitro*. Los resultados de este trabajo se compararon con el trabajo de Jabeen *et al.*, 2007 en el cual se trabajó con *Inula racemosa* con el mismo tipo de explante y a condiciones similares. En ambos trabajos el 100% de explantes tuvieron raíces, en el caso del número de raíces por explante obtuvimos tres y Jabeen *et al.*, 2007 3.6, así mismo para la longitud de raíces ellos tuvieron 5.1 y nosotros 3.92 con el mejor tratamiento para este caso.

En comparación de las auxinas usadas en este trabajo el AIA provocó menor formación de callo que ANA debido probablemente a que ANA es una molécula sintética, por lo cual reside por más tiempo en la planta ya que es más difícil su biodegradación (López, 2016). El mejor tratamiento para formación de raíces fue el de 0.06 mg/L de AIA pues, aunque no tuvo una de la mayor longitud de raíces promedio, fue mejor en número raíces promedio por explante y porcentaje de explantes con raíces. Es importante mencionar que los explantes no deben permanecer por largos periodos en tratamientos con auxinas pues estos comienzan a fenolizarse deteniendo su desarrollo.



**Figura 14.** Explantes de *H. longipes* en diferentes tratamientos. **A)** Explante en medio MS 0.5X. **B)** Explante en medio MS + 60 g/L sacarosa. **C), D)** y **E)** Explantes en medio MS 0.5X + 0.03, 0.06 y 1 mg/L de AIA respetivamente.

**Cuadro 18.** Resultados de los tratamientos MS 0.5X, MS 0.5X con 60 g/L de sacarosa y MS 0.5X más 0.03, 0.06, 0.09, 0.5 y 1 mg/L de AIA en explantes de *H. longipes*.

<b>VARIABLE</b>	<b>MS 0.5X</b>	<b>MS 0.5X 60 g Sac</b>	<b>MS 0.5X AIA 0.03 mg/L</b>	<b>MS 0.5X AIA 0.06 mg/L</b>	<b>MS 0.5X AIA 0.09 mg/L</b>	<b>MS 0.5X AIA 0.5 mg/L</b>	<b>MS 0.5X AIA 1 mg/L</b>
Fenolización (%)*	1.14 a	3.14 b	1.71 a	2 bc	2.57 bc	1.86 c	2.14 bc
Brotes por explante (No)**	3.4 a	2.3 b	2.4 ab	3 ab	2.8 ab	1.3 c	0.3 d
Longitud promedio de brotes (cm)**	0.9 a	0.4 b	0.8 a	1 a	0.7 ab	1 a	0.1 c
Número de raíces por explante*	1.29 a	0.43 b	2.29 c	3 c	1.29 ac	0.43 b	0.86 a
Explantes con raíz (%)*	85	42	85	100	57	42	85
Longitud promedio de raíz (cm)*	3.5 b	1 a	3.02 b	3.35 b	2.71 ab	0.26 a	0.43 a
Tamaño de explante (cm)**	3.57 a	1.3 b	3.9 a	3.71 a	3.79 a	3.3 a	3.5 a
Callo (No)*	0.28 a	0.42 a	0.57 a	1.14 a	0.57 a	3.86 b	4.29 b
Explantes con callo mayor a 5 (%)	0	0	0	0	0	0	14

Las letras iguales en las filas no son significativamente diferentes (LSD\*\* y kruskal Wallis\* P<0.05).

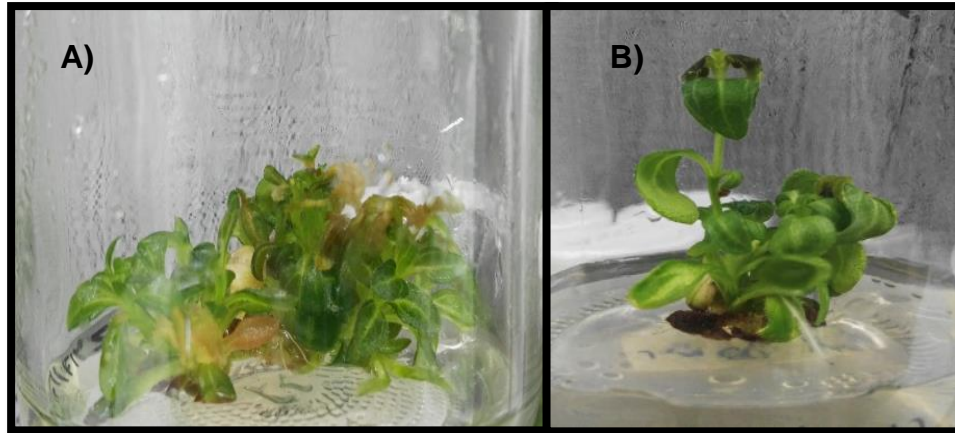
#### 7.4.6 Efecto de medios líquidos adicionados con 0.03 mg/L de BAP y 0.03 mg/L de BAP y ANA

El tratamiento adicionado con 0.03 mg/L de BAP mostró estadísticamente diferente mayor fenolización y número de brotes con 4.7 y 11.5 respectivamente (cuadro 19). Para el caso de longitud de brotes y tamaño de explante el control (MS 0.5X) tuvo el mejor resultado, sin embargo, no fue diferente al tratamiento con 0.03 mg/L de BAP. En el caso del número de raíces por explante y longitud de las mismas no hubo diferencia alguna. En comparación con los mejores resultados obtenidos con solo medios sólidos con el tratamiento 0.03 mg/L de BAP nos encontramos una diferencia de 4.75 brotes por explante (Fig. 16). Lo cual nos confirma que el mismo tratamiento con 10 días en medio líquido en agitación continua aumenta el número de brotes por explante de *H. longipes* (Argelys, 2008).

**Cuadro 19.** Efecto de los tratamientos en medio líquido MS 0.5X, MS 0.5X con 0.03 mg/L de BAP y MS 0.5X más 0.03 mg/L de ANA y BAP en explantes de *H. longipes*.

VARIABLE	MS 0.5X	MS 0.5X, BAP 0.03 mg/L	MS 0.5X, BAPxANA 0.03 mg/L c/u
Fenolización (%)*	1.8 a	4.7 b	1.8 a
Brotes por explante (No)**	4.3 a	11.5 b	5 a
Longitud promedio de brotes (cm)**	2.7 a	2.4 ab	1.6 b
Raíces por explante (No)*	3.7 a	2.5 a	2.2 a
Explantes con raíz (%)*	83	83	83
Longitud promedio de raíz (cm)*	3 a	2.5 a	2.5 a
Tamaño de explante (cm)**	5.8 ab	6.1 a	4.5 b
Callo (No)*	0 a	2 b	3 b

Las letras iguales en las filas no son significativamente diferentes (LSD\*\* y kruskal Wallis\* P<0.05).



**Figura 15.** Explantes de *H. longipes* tratados con 0.03 mg/L de BAP en diferentes tipos de medio. **A)** y **B)** medio líquido y sólido respectivamente.

#### 7.4.7 Gelificantes

El tratamiento con mayor fenolización fue el medio adicionado con 8 g/L de agar-agar, sin embargo, no tuvo diferencia significativa con el adicionado con 3 g/L de Gel rite. El tratamiento con 12 g/L de agar-agar mostró la menor fenolización, esto podría deberse a que el aumento en la concentración de agar-agar disminuye la fenolización y necrosis de explantes de diversas plantas, gracias a que reduce la vitrificación (Singha *et al.*, 1990 y Finch *et al.*, 1992). Así mismo el tipo de gelificante podría ser el motivo del cambio en la fenolización de explantes de *H. longipes*, pues otros estudios han obtenido disminución en la fenolización al probar diferentes tipos de gelificantes (Finch *et al.*, 1992).

El número de brotes resultó significativamente mayor con el tratamiento adicionado con 3 g/L de Gel rite y tuvo el 100% de explantes con brotes, los tratamientos restantes no tuvieron diferencia significativa entre si y mostraron 37.5, 37.5 y 75% de explantes con brotes para 8, 10 y 12 g/L de agar-agar respectivamente (cuadro 20). En el caso de longitud de brotes solo el tratamiento con 3 g/L de Gel rite tuvo diferencia significativa con el que contenía 8g/L de agar.

El tratamiento con 10 g/L de agar-agar mostró el mayor número de raíces con 3.5 y un 100% de explantes con raíces, sin embargo, no tuvo diferencia con los demás tratamientos que contenían agar-agar. Para el caso de la longitud de raíces el mejor



tratamiento fue le adicionado con 12 g/L de agar-agar sin embargo no tuvo diferencia con el 3 g/L de Gel rite. Los explantes de menor tamaño fueron los tratados con 3 g/L de Gel rite y resultaron estadísticamente diferentes a todos los tratados con agar-agar. EL mejor tratamiento para la cuestión de tamaño de explante fue 10 g/L de agar-agar con 6 cm.

Los resultados obtenidos en los diferentes gelificantes recomiendan usar 3 g/L de Gel rite en la etapa de desarrollo y multiplicación y 12 g/L de agar para el enraizamiento y aclimatación pues Gel rite mostró el 100% de explantes con brotes mientras el medio con 12 g/L de agar mostró el 100% de explantes con raíces, las raíces de mayor tamaño y una elongación de tallos (Fig. 17).

Diferentes tipos y concentraciones de gelificantes afectan el desarrollo y crecimiento de los cultivos *in vitro* debido a que están correlacionados con la cantidad de agua y nutrientes disponibles para los explantes (Stoltz, 1971). En el trabajo de Von y Eriksson 1984 se encontró que hay una disminución en la elongación de tallos y formación de raíces de *Picea abies* según el aumento de la concentración de agar. Así mismo en la investigación de Solusoglu, 2014 se demostró un incremento en el porcentaje de raíces por explante y número de raíces, según el aumento de la concentración de agar en porta injertos de peras Quince A, también en este estudio se observó una diferencia entre el agar-agar y el Gel rite ya que el Gel rite no mostró formación de raíces sino hasta después de 5 g/L siendo estas muy pequeñas y en porcentajes muy bajos. El aumento en la concentración de agar-agar aumenta el contenido de solutos y el potencial matricial del medio lo que conlleva a una retención mayor de agua, probablemente esto es lo que fomenta la formación de raíces en los explantes (Cárdenas y Villegas, 2002).

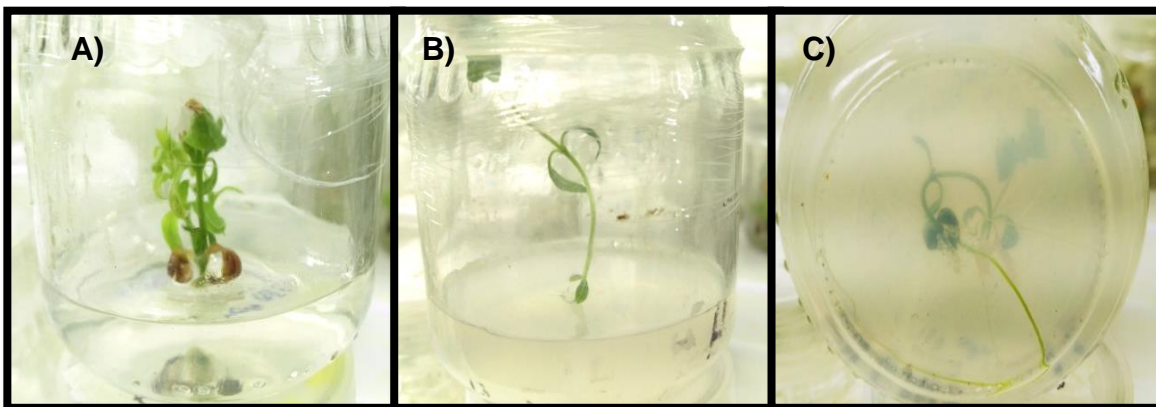
Los gelificantes varían en la concentración y estructura molecular de los elementos que los componen, por ejemplo, Gel rite tiene mayor cantidad de Ka, Na, S, P y Mg que el agar-agar, estas diferencias y la concentración utilizada en el medio de cultivo, pueden provocar variaciones en el potencial hídrico del medio, promoviendo cambios en el crecimiento y multiplicación de brotes *in vitro* (Buah *et al.*, 1999). Singha, 1982, demostró que la cantidad de brotes en Pera Seckel aumentaba

cambiando la concentración de agar-agar de 3 a 6 g/L. Nuestro trabajo mostró resultados similares a los antes mencionados para número de brotes, número de raíces y porcentaje de raíces por explante, sin embargo, no para tamaño de explante ya que para *H. longipes* se registró una diferencia significativa en la comparación de Gel rite y agar-agar para esta variable siendo mucho mayor el crecimiento en el agar.

**Cuadro 20.** Resultados de los tratamientos MS 0.5X con 3 g/L de Gelrite y MS 0.5X con 8, 10 y 12 g/L agar-agar en explantes de *H. longipes*.

<b>VARIABLE</b>	<b>MS 0.5X, 3 g/L Gelrite</b>	<b>MS 0.5X, 8 g/L agar- agar</b>	<b>MS 0.5X, 10 g/L agar-agar</b>	<b>MS 0.5X, 12 g/L agar-agar</b>
Fenolización (%)*	1.60 a	1.87 a	1.1 b	1 b
Brotes por explante (No)*	3.60 a	0.87 b	0.75 b	1.37 b
Explantes con brotes (%)	100	37.5	37.5	75
Longitud promedio de brotes (cm)*	1.20 a	0.5 b	1 ab	1.25 ab
Raíces por explante (No)*	1.5 a	1.75 ab	3.5 b	2.12 ab
Explantes con raíz (%)*	75.0	62.5	100	100
Longitud promedio de raíz (cm)*	1.46 a	1 b	0.96 b	2.47 <sup>a</sup>
Tamaño de explante (cm)**	3.43 a	5.75 b	6 b	5.75 b
Callo (No)*	0.75 a	0 b	0 b	0 b

Las letras iguales en las filas no son significativamente diferentes (LSD\*\* y kruskal Wallis\* P<0.05).



**Figura 16.** Explantes de *H. longipes* en medio sólidos con 3 g/L de Gelrite (A) y 12 g/L de agar (B y C).

#### 7.4.8 Aclimatación de plántulas

Las plantas aclimatadas en el sustrato Peat moss-Agrolita (2:1 p/p) obtuvieron el mayor porcentaje de supervivencia con 71.6% y el sustrato Peat moss-vermiculita (2:1 p/p) el menor con 61.5% (Fig. 18). Los resultados de aclimatación en otras plantas de la familia Asteraceae son muy variados, sin embargo, los trabajos de Yarra *et al.*, 2010 y Razak *et al.*, 2014 obtuvieron 70% de supervivencia para *Sphaeranthus indicus* y 83.3% *Stevia rebaudiana* (Bert.) respectivamente, estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo para *H. longipes*. La transferencia de los explantes *in vitro* a sustrato es complicada debido a que las condiciones ambientales, tales como temperatura, humedad, nutrientes y contacto con otros organismos cambian considerablemente.

Por lo anterior, es importante obtener un sustrato con propiedades físicas y químicas parecidas al suelo de origen de la planta en estudio y un protocolo que disminuya el cambio drástico de *in vitro* a sustrato para conseguir una eficiente aclimatación. Probablemente el sustrato Peat moss-Agrolita mostró mejores resultados debido a que la planta originalmente habita en suelos blancos someros y pedregosos (López, 2007) los cuales son más asemejados con la agrolita que la vermiculita, pues esta tiene menor retención de humedad y provee un sustrato con mayor capacidad de drenaje (Hernández, 2015).



**Figura 17.** Explantes aclimatados de *H. longipes*.

#### **7.4.9 Perfil genético empleando microsatélites**

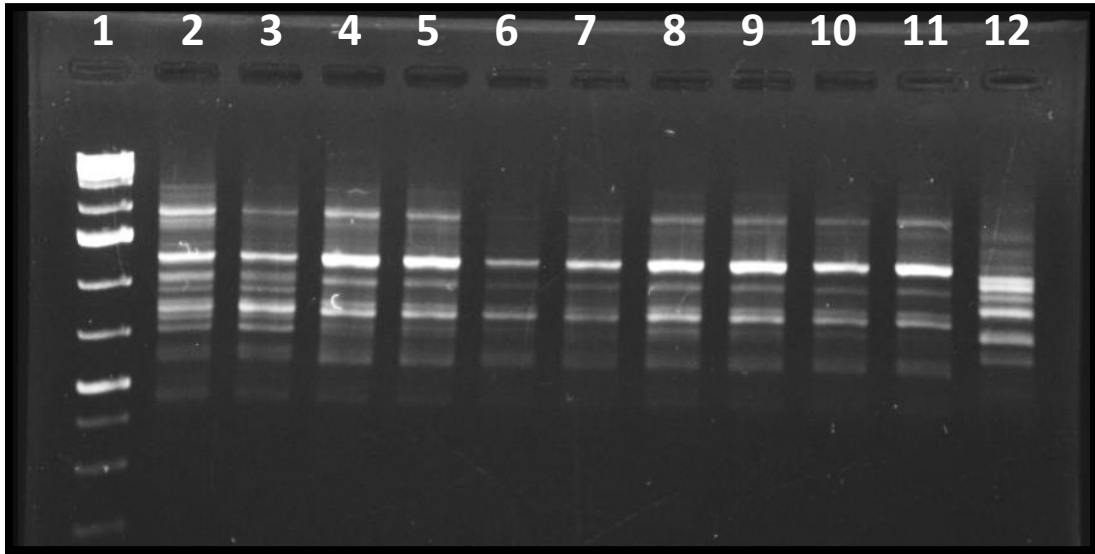
Se obtuvo el ADN de dos plantas madre y ocho plantas *in vitro* de *H. longipes*. Para su análisis molecular por microsatélites el ADN se ajustó a 27 ng/ $\mu$ L (cuadro 21). De los oligonucleótidos probados T(CT)<sub>7</sub>CC mostró el mejor patrón de bandeo, con este se obtuvieron productos de PCR de dos plantas madre y ocho plantas *in vitro* de *H. longipes* y una planta *Thitonia diversifolia* (Fig. 19). El análisis de similitud de

Jaccard mostró una similitud de 100% entre las plantas *in vitro* 1, 2, 3, 4, 6 y 7 y una similitud al 90% entre las plantas madre y las *in vitro* (Fig. 20).

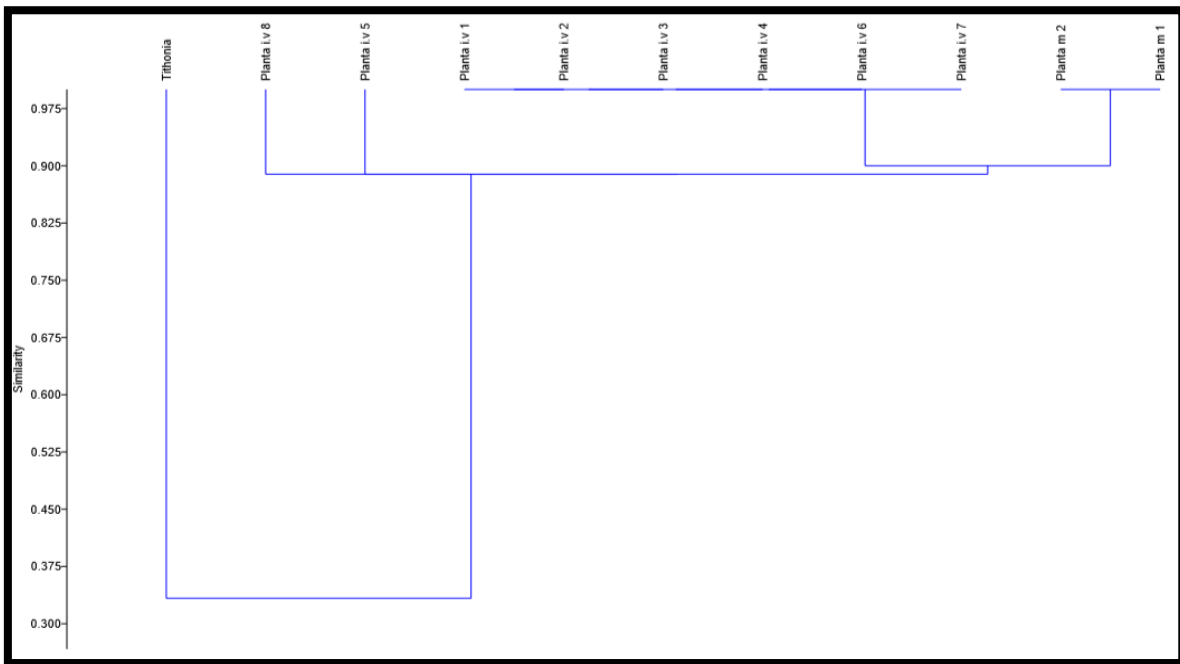
**Cuadro 21.** Absorbancias presentadas con el espectrofotómetro a 230 (A 230 nm), 260 (A 260 nm) y 280 nm (A 280 nm) para plantas *in vitro* (P I) y madre (PM) de *H. longipes* también se muestra la concentración de DNA por muestra y su pureza.

<b>Planta</b>	<b>Abs 230 nm</b>	<b>Abs 260 nm</b>	<b>Abs 280 nm</b>	<b>Pureza 260/280</b>	<b>Concentración ng/μL</b>
<b>P M 1</b>	0.021	0.024	0.015	1.6	72
<b>P M 2</b>	0.044	0.040	0.028	1.42	120
<b>P I 1</b>	0.044	0.090	0.049	1.83	270
<b>P I 2</b>	0.049	0.057	0.035	1.62	171
<b>P I 3</b>	0.005	0.038	0.019	2.0	114
<b>P I 4</b>	0.057	0.055	0.038	1.44	165
<b>P I 5</b>	0.060	0.084	0.050	1.68	252
<b>P I 6</b>	0.094	0.100	0.067	1.49	300
<b>P I 7</b>	0.047	0.051	0.035	1.45	201
<b>P I 8</b>	0.023	0.044	0.028	1.57	132





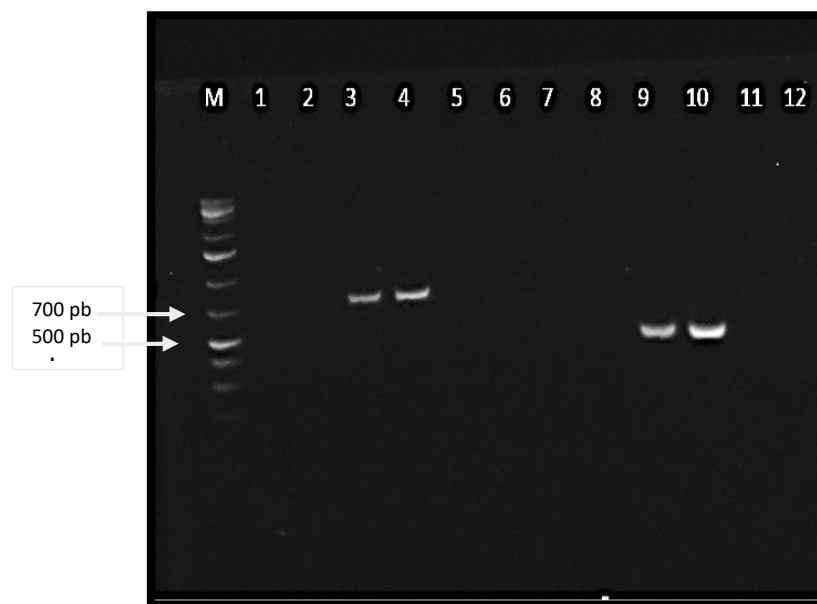
**Figura 18.** ISSR para visualizar la variabilidad genética entre las plantas madre e *in vitro* de *H. longipes*. 1. Marcador de 1Kb. 2 y 3 Plantas madre. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 plantas *in vitro*. 12 *Thitonia diversifolia*.



**Figura 19.** Análisis de similitud de Jaccard para los patrones de bandeo de las plantas madre (Planta M), *in vitro* (Planta I. V.) de *H. longipes* y *T. diversifolia*.

## 7.5 Extracción de ADN bacteriano y corroboración de genes *RolB* y *VirD*

Se obtuvo ADN de las bacterias silvestres ATCC15834, AR1500 y K599 de *A. rhizogenes*. Se verificó la existencia de los genes transformantes por medio de PCR, la cual mostró ampliaciones de genes a 780 y 450 pb para *RolB* y *VirD* respectivamente, solo en la cepa ATCC15834 (Fig. 21). Este resultado disminuyó el trabajo, tiempo y gasto de reactivos al eliminar dos cepas. Nosotros creemos que la pérdida de los genes fue por las constantes replications en medios sin rifampicina y/o los cambios de temperatura mayor a 27 °C.

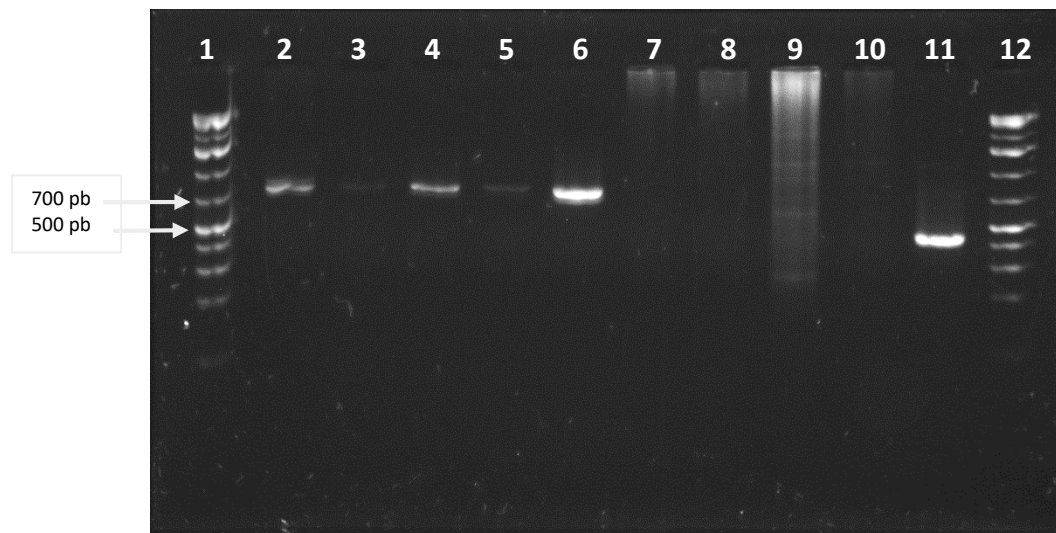


**Figura 20.** Amplificación por PCR de los genes *RolB* y *VirD* de las cepas AR1500 ATCC15834 y K599. M: GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder. Carriles del 1-6 gen *RolB* para K599 a 20 y 50 ng, 3 y 4 ATCC15834 20 y 50 ng y 5 y 6 AR1500 20 y 50 ng. Carriles del 7-10 gen *VirD* para K599 a 20 y 50 ng, ATCC15834 20 y 50 ng y AR1500

## 7.6 Transformación genética

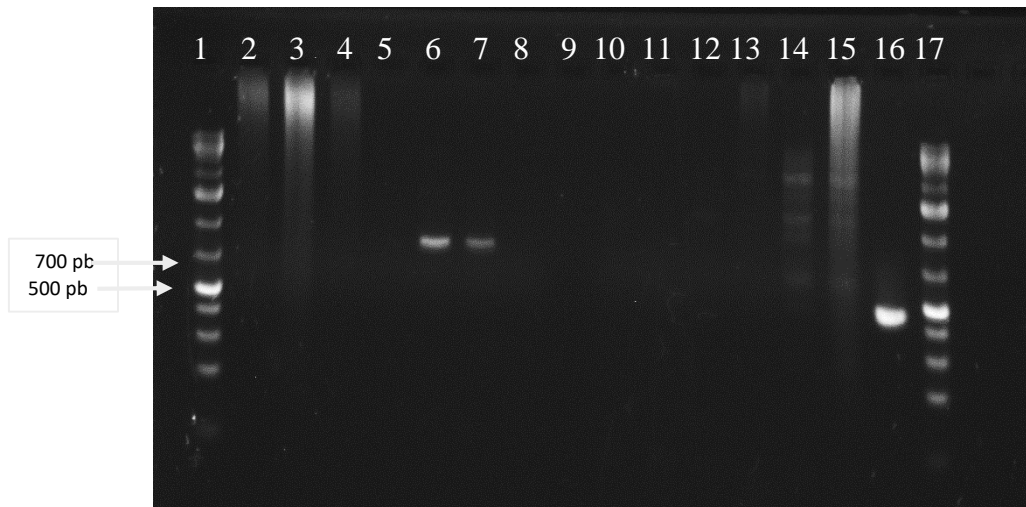
La transformación genética de *H. longipes* fue conseguida en este estudio sin embargo los resultados fueron muy deficientes. De todos los intentos de transformación genética solo uno tuvo éxito, en el cual se obtuvieron cuatro explantes de hoja con dos raíces cada uno a los 20 días, este resultado fue obtenido con hojas como explante, una infección por herida e inmersión en solución bacteriana D.O.<sub>600nm</sub> 0.7 por 20 min, un co-cultivo de 2 días y la eliminación de *A. rhizogenes* se llevó a cabo con medio MS adicionado con cefotaxima la cual fue gradualmente

reducida de 500 mg/L a 250 mg/L y hasta su respectiva eliminación del medio. Una vez que las raíces tuvieron un 1 cm de longitud fueron cortadas y colocadas en medio líquido MS 0.5X libre de reguladores de crecimiento, sin embargo, al paso de seis semanas y 12 recambios de medio, no se observó crecimiento alguno en las raíces. La verificación de la transformación genética se realizó por la amplificación de los genes *RolB* y *VirD* por medio de PCR la cual mostró que todas las raíces contenían el gen *Rol B*, el ADN de la cepa ATCC15834 fue usada como control positivo para dicha prueba, al igual que una raíz de *H. longipes* sin transformar (Fig. 22 y 23).



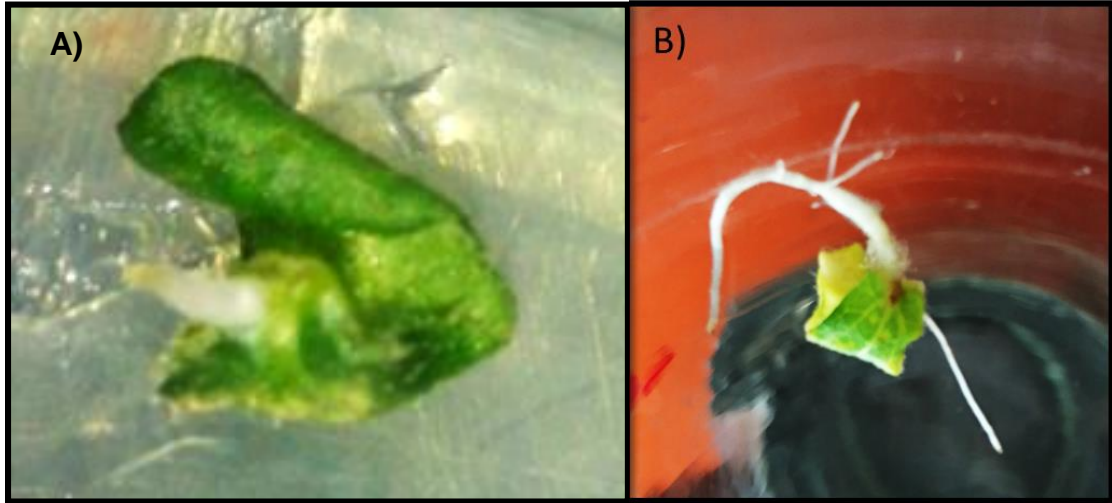
**Figura 21.** Amplificaciones por PCR de los genes *Rol B* y *Vir D*. Carriles 1 y 12 marcador de talla molecular GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder. Carriles del 2-6 Gen *Rol B* y 7-11 Gen *Vir D*. Las plantas transformadas en los carriles 2-5 y 7-10 y para la cepa ATCC15834 los carriles 6 y 11.





**Figura 22.** Amplificaciones PCR de los genes *RolB* y *VirD*. Carriles 1 y 17 GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder. Carriles del 2-5 y 10-13 corresponde a plantas de *H. longipes* sin transformar, los carriles 6, 7, 14 y 15 plantas transformadas y 16 cepa ATCC15835 de *A. rhizogenes*.

Aunque es sabido que el origen y tipo de tejido no es teóricamente requisito para la transformación genética, para la elección del tejido de este trabajo, se prefirieron explantes de *H. longipes in vitro*, debido a que tienen menor diferenciación celular que los de plantas de invernadero, no es necesario una desinfección previa y en comparación de porcentajes de transformación y regeneración, los cultivos de plantas tienen un 0.001% y los *in vitro* 1%. Así mismo fueron usados tallos y hojas pues resultan ser más convenientes para la transformación genética con *A. rhizogenes* (Birch, 1997). En este trabajo las hojas fueron los únicos explantes que se transformaron (Fig. 24), esto puede deberse al contenido hormonal diferente en los tipos tejido utilizados ya que según Wordagren y Dons, 1992 el contenido de citoquininas es muy importante para el éxito de transformación al igual que la edad del explante. También pudo deberse al área de contacto con la solución bacteriana en las hojas la cual es mayor.



**Figura 23.** Explantes transformados *H. longipes*. **A)** Raíz recién desarrollada, **B)** raíz después de 15 días.

El éxito de transformación de nuestro trabajo fue del 4% de explantes transformados este resultado es muy bajo comparado con los autores Kiani *et al.*, 2014 y Khalili *et al.*, 2014 los cuales obtuvieron 40% de éxito en *Artemisia annua* y *Echinacea angustifolia* respectivamente trabajando en plantas de la misma familia.

Para el caso del tratamiento previo de los explantes, el mejor resultado se consiguió con el medio MS sin adición de reguladores de crecimiento, sin embargo, Birch, 1997 y Wordragen y Dons 1992 mencionan que el tratamiento previo con citoquinas aumenta el éxito en la transformación, debido a que asemeja a algunas cepas de *A. rhizogenes* altamente virulentas que contienen genes que aportan la producción de citoquininas como la zeatina, lo cual hace más susceptible a la planta por la diferenciación y división celular que estas promueven (Binns y Tomashow, 1988). Lo anterior, podría explicar el aumento de formación de callo en los explantes provenientes de medio adicionados con 0.03 mg/L de BAP. Por esta razón en investigaciones futuras se pueden realizar diversos ensayos con explantes tratados con diferentes cantidades de zeatina para poder alcanzar un mayor porcentaje de éxito en la transformación.

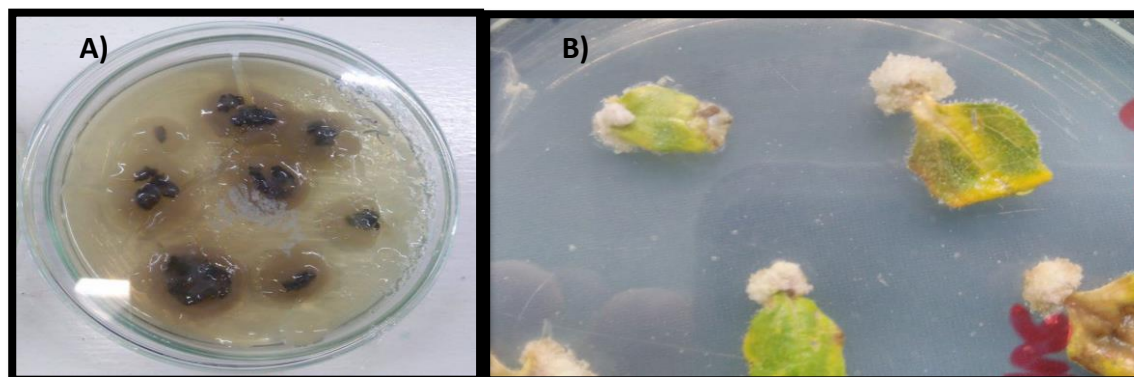
Para el caso de la herida e infección con *A. rhizogenes*, la concentración bacteriana es importante debido a que una densidad óptica (D.O.  $_{600nm}$ ) alta puede aumentar el

nivel de estrés del explante tratado, al igual que dificulta la eliminación de la bacteria (Swain *et al.*, 2010). Así mismo, en investigaciones con cítricos se han notado aumentos de éxito en la transformación con la disminución de la D.O. utilizada (Dutt y Grosser, 2009). Se utilizó una D.O.  $_{600nm}$  0.7, debido a que fue la densidad donde se obtuvieron los mejores resultados y además está dentro de los rangos utilizados (0.6-1 D.O.) en diferentes especies de la misma familia (Kiani *et al.*, 2014 y Khalili *et al.*, 2014). El análisis de diferentes D.O.  $_{600nm}$  podría mejorar el éxito de la transformación genética de *H.longipes*. Para el caso de la herida, nuestro mejor resultado fue el corte alrededor de la hoja, sin embargo, algunos estudios recomiendan heridas en diferentes zonas del explante, por ejemplo, en el trabajo de Etse *et al.*, 2013 en el cual se trabajó con hojas de *Zanthoxylum zanthoxyloides*, se obtuvo que la herida en la nervadura central aumentó el porcentaje de éxito en la transformación a comparación de alrededor de la hoja. Así mismo en otro trabajo, mencionan que la polaridad de la herida puede ser crucial para el éxito de transformación dependiendo de la cepa de *A. rhizogenes* que se esté utilizando (Meyer *et al.*, 2000). Probar diferentes tipos de heridas podría aumentar el éxito de transformación en *H.longipes*. El tiempo de co-cultivo planta-bacteria es también un factor importante en el éxito de la transformación, debido a que un periodo prolongado de co-cultivo puede tener consecuencias graves al estresar la planta y vuelve difícil la eliminación de la bacteria. Por lo anterior, reducimos el tiempo de co-cultivo en algunos experimentos para evitar la muerte de los explantes (Fig. 25), lográndose la conservación del explante pero no el éxito en transformación.

La acetosiringona en concentraciones bajas es considerada como el fenol más efectivo para inducir los genes *Vir*, necesarios para la transformación genética, aumentando la eficiencia de la transformación (Fortin *et al.*, 1992), sin embargo, algunos autores mencionan que si la herida provocada en el tejido libera los fenoles necesarios no tiene efecto alguno (Wordragen y Dons, 1992). En este trabajo fue utilizada una concentración de 200  $\mu$ M de acetosiringona y con esta se obtuvo el mejor resultado, además se encuentra dentro de los rangos empleados en otros trabajos similares (Kiani *et al.*, 2014).

En el trabajo de Godwin *et al.* (1991) mostraron que un cambio de 0.3 unidades de pH aumenta la eficiencia de transformación en varias especies, ya que un pH ácido induce la expresión de los genes *Vir*, por esta razón, en nuestros experimentos empleamos pH de 4.8 y 5.4 en los cuales se observó un aumento en la formación de callo, sin embargo, no se obtuvo éxito en la transformación. En investigaciones futuras podrían implementarse diferentes pH para el co-cultivo en la transformación de *H. longipes*.

La eliminación de *A. rhizogenes* del medio es complicada, ya que cuando la cantidad de bacterias es alta en los explantes, es muy difícil de erradicar, lo que provoca la pudrición del explante antes de que presente callo (Fig. 25). El método más eficaz para controlar el exceso de bacteria en los explantes no fue solo el uso de antibióticos, si no el secado con papel estéril y el triple enjuague con agua destilada estéril posterior al co-cultivo, observaciones similares notaron en el trabajo de Swain *et al.*, 2010.



**Figura 24. A)** explantes necrosados de *H. longipes* por exceso de *A. rhizogenes*. **B)** explantes con formación de callo después del proceso de transformación genética.

En el caso del uso de los antibióticos para la eliminación de *A. rhizogenes*, al igual que Shaneeja *et al.*, 2014 y Khalili *et al.*, 2014, se encontró que cefotaxima es uno de los más adecuados para la eliminación de la bacteria con resultados de hasta 3 y 8% de hojas y tallos con presencia de bacteria respectivamente, sin embargo, el antibiótico gentamicina mostró ser adecuado también para la eliminación de *A. rhizogenes*, obteniéndose resultados de solo 3% de explantes con bacteria. El uso de PPM (Plant Persevaration Mixture) mostró ser menos adecuado para la

eliminación de bacteria con 30% de hojas con bacteria para 1 mL/L y 28% de tallos con bacteria para 2mL/L. El uso de gentamicina se limitó porque mostró menor formación de callo y no se obtuvo éxito en la transformación, además tubo mayor cantidad de explantes muertos que la cefotaxima ya que es conocido los aminoglucosidos son más tóxicos (Seija y Vignoli, 2006).

La fenolización en los explantes causa la muerte de estos (Fig.44), en los tratamientos con PPM y estreptomina-ceftriaxona se usó polivinil pirrolidona (PVP) para tratar de reducir la muerte de explantes por fenolización como en el trabajo de Mohammad *et al.*, 2016. La mejor reducción de explantes muertos en PPM se obtuvo empleando una concentración de 1mL/L de 95% a 28% en hojas y para los medios adicionados con 500 mg/L de ceftriaxona y estreptomina la mayor reducción fue en hojas de 45 a 25%. Sin embargo, para estos tratamientos no hubo éxito en la transformación.

Pueden ser varios los motivos por los que la raíz transformada no tuvo crecimiento, entre ellos el silenciamiento genético, metilaciones y que la planta puede ser incapaz de reconocer secuencias de control de genes foráneos como secuencias promotoras de genes bacterianos (Birch, 1997). Las plantas se resisten a la infección de *Agrobacterium* ya que hasta después de tener los genes foráneos en su genoma puede no permitir su expresión empleando mecanismos de silenciamiento genético. Un ejemplo son los pequeños RNAs de interferencia dirigidos a los oncogenes del T-DNA encontrados en hojas de *Nicotiana benthamiana* después de 3 días de la agroinfección (Dunoyer *et al.*, 2006). Otros trabajos confirman que la metilación regula la transcripción del T-DNA, pues la formación de callo y la expresión del oncogén están correlacionados con el estado no metilado (Pitzschke, 2013).

Además, consideramos que la adición al azar de los genes transformantes pudo interrumpir algún gen necesario para el desarrollo, o bien que la adición de fitohormonas producidas por los genes transformantes a la concentración *in situ* de la planta, no es adecuada para su desarrollo ya sea dada por un exceso de inserciones de ADN foráneo o por genes hiperproductores, lo cual conlleva a una

síntesis muy alta de fitohormonas y por ende un desbalance hormonal. El conocimiento en la micropropagación *in vitro* de *H. longipes* mostró que la planta es muy sensible a los cambios hormonales, lo cual se relaciona con lo mencionado anteriormente.

## 8 CONCLUSIONES

- El tratamiento de desinfección superficial de segmentos nodales obtenido en este trabajo es factible para la micropropagación *in vitro* de *H. longipes* con una efectividad del 25.4%.
- El medio MS 0.5X fue elegido para la etapa de desarrollo debido a que presentó mayor número de brotes y raíces por explante, mayor porcentaje de explantes con raíz, longitud de raíz promedio y tamaño de explante.
- El mejor tratamiento para la etapa de multiplicación fue el medio MS 0.5X adicionado con 0.03 mg/L de BAP con hasta 6.12 y 11.5 brotes promedio por explante para medio sólido y líquido respectivamente.
- El mejor tratamiento para la formación de callo para segmentos nodales fue el medio MS 0.5X adicionado con 1 mg/L de ANA con hasta 75% de explantes con formación de células diferenciadas.
- Para la formación de raíces, las hojas tratadas con 1 mg/L de ANA mostraron 2.55 raíces por explante y un 50% de explantes con raíz. También los segmentos nodales tratados con 0.06 mg/L de AIA mostraron tres raíces promedio por explante con presencia de raíz del 100%, así mismo el tratamiento con 12 g/L de agar mostró 2.12 raíces promedio por explante y un 100% de segmentos nodales con presencia de raíz.
- La aclimatación descrita en este trabajo es factible hasta en 71.6% de supervivencia para explantes *H. longipes*.
- EL análisis de similitud por medio de ISSRs entre las plantas madre y plantas *in vitro* de *H. longipes* fue de 100 y 90%.

- De los eventos de transformación genética realizados solo uno tuvo éxito, en el cual se obtuvieron cuatro explantes de hoja con dos raíces cada uno a los 20 días, sin embargo, estas raíces no tuvieron crecimiento en ausencia de reguladores de crecimiento.
- El presente trabajo se muestra por primera vez un método de micropropagación y transformación genética de *H. longipes*



## 9 BIBLIOGRAFIA

- Belén-Hernández, N. 2012. Características de los principales sustratos para la producción protegida de alimentos. <http://www.hortalizas.com/horticultura-protegida/en-busca-del-sustrato-ideal/>. Revisado el 15/12/2016.
- Binns, A.N., Tomashow, M. F. 1988. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Ann. Rev. Microbiol.* 42:575-606
- Birch, R. G. 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu Rev Plant Biol.* 48:297–326.
- Blanco, M., Valverde, R., Gómez, L. 2003. Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía Costarricense.* 27(1): 19-28.
- Buah J. N., Kawamitsu Y., Sato S., Murayama S. 1999. Effects of different types and concentrations of gelling agents on the physical and chemical properties of media and growth of banana (*Musa spp.*) *in vitro*. *Plant Prod. Sci.* 2: 138–145.
- Cárdenas, M., Villegas, A. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana.* 25(2): 213-217.
- Castro-González, V. 2009. Monografía de la raíz de oro, chilcuague, *Heliopsis longipes* A. Gray. Tesis para diplomado. Tlahui. Ciudad de México. 15 p.
- Chandran, R., Potty, V. 2008. Induction of hairy roots through the mediation of four strains of *Agrobacterium rhizogenes* on five host plants. *Indian Journal of Biotechnology.* 7: 122-128.
- Cilia-Lopez, V.G. 2007. Biología y utilización del chilcuague (*Heliposis longipes* S.F. Blake) Tesis para Doctorado en ciencias ambientales. Universidad autónoma de San Luis Potosí. 122 p.
- Domínguez-Bernabe, L., Juárez-Hernández, E. 2011. Síntesis enzimática de alcaloides análogos de capsaicina. Trabajo práctico científico. Universidad Veracruzana. Orizaba, Ver. 51 p.

- Doyle, J.J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*.12: 13-15
- Dunoyer, P., Himber, C., Voinnet, O. 2006. Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent *Agrobacterium tumefaciens* infections. *Nat. Genet.* 38, 258–263.
- Dutt, M., Grosser J.W. 2009. Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 98:331–340.
- Etsè, K.D., Aïdam, A.V., Melin, C., Blanc, N., Oudin, A., Courdavault, V., Creche, J., Lanoue, A. 2014. Transformación genética optimizada de *Zanthoxylum zanthoxyloides* por *Agrobacterium rhizogenes* y la producción de queleritrina y skimmiamina en cultivos de raíz peluda. *Ing. Life Sci.*, 14: 95-99.
- Finch, R. P., Basset, A., Slamet, J.H., Cocking, E. C. 1992. In vitro shoot culture of wild *Oryzae* and other grass species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 30: 31-9.
- Fortin, C., Nester, E. W., Dion, P. 1992. Growth inhibition and loss of virulence in cultures of *Agrobacterium tumefaciens* treated with acetosyringone. *J Bacteriol* 174:5676–5685.
- Gai, Q.Y., Jiao, J., Luo, M., Wei, Z.F., Zu, Y.G., Ma, W., et al. 2015. Establishment of hairy root cultures by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Isatis tinctoria* L. for the efficient production of flavonoids and evaluation of antioxidant activities. *PLoS ONE* 10(3).1371-1385.
- García, F., Álvarez, A., Rodríguez, G., Corona, L. 2008. Germinación in vitro de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. *Foresta Veracruzana* 10(2): 23-27
- García-Chávez, A., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres, J. 2004. El género *Heliopsis* (heliantheae; asteraceae) en México y las alcalmidas presentes en sus raíces. *Acta Botánica Mexicana.* 69: 115-131

- Godwin, I., Todd, G., Ford-Lloyd, B., Newbury, H.J. 1991. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium* mediated transformation vary according to plant species. *Pl. Cell Rep.* 9: 671-5
- González-Morales, S., Flores-López, M. L., Benavides-Mendoza, A. Flores-Olivas, A. 2011. Actividad inhibitoria del extracto de sobre f. sp. *Heliopsis longipes* sobre *Fusarium oxysporum lycopersici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29:146-153.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)
- Hernández, A., Arvizu, J., Carranza, C., Carrillo, M., León A., Molina J. 2013. Actividad antiparasitaria de *Heliopsis longipes* A. Gray Blake contra *Plasmodium falciparum*. *Ciencias Naturales y Exactas, Handbook - ©ECORFAN.1:1-10.*
- Hernández-Cruz, M. 2009. Evaluación del efecto de la afinina presente en extractos de *Heliopsis longipes* en la recuperación de ápices de vainilla sometidos a tratamientos con crioprotectores. Tesis para Lic. en química industrial. Universidad Veracruzana, Orizaba Ver.64 p.
- Hernández-Morales, A., Arvizu-Gómez, J. L., Gómez-Luna, B. E., Ramírez-Chávez, E., Abraham-Juárez, M., Martínez-Soto, G., Molina-Torres, J. 2012. Determinación de la actividad insecticida de *Heliopsis longipes* A. Gray Blake, una planta endémica del estado de Guanajuato. *Ra Ximhai.* 8(3): 111-118.
- Izquierdo, P. 2006. Desarrollo de Protocolos de Micropropagación para dos Especies de Asteraceas endémicas de las Islas Galápagos, en peligro crítico de extinción. (Resultados Preliminares). *Lyonia.*9(2).57-62.
- Jabeen, N., Shawl, A.S., Dar, G.H., Jan, A., Sultan, P. 2007. Micropropagation of *Inula racemosa* Hook. f. a valuable medicinal plant. *Int. J. Bot.* 3(3): 296-301.

- Jordán, M., Casareto J. 2006. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citoquininas. En: Fisiología Vegetal (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds.) Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile pp.1-28.
- Kessel, A. 2008. Revisión bibliográfica. Aplicación de técnicas biotecnológicas en frutales, una vía valiosa para el rescate y la conservación de estas especies. *Cultivos Tropicales*. 29(3): 27-37.
- Khalili, S., Moieni, A., Abdoli, M. 2014. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes*, culture medium, age and type of explant on hairy root induction in *Echinacea angustifolia*. *Iranian journal of genetics and plant breeding*. 3(1):49-56
- Kiani, B., Suberu, J., Barker, G., Mirza, B. 2014. Development of efficient miniprep transformation methods for *Artemisia annua* using *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 50(5): 590-600.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Mroginski, L. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.650 p.
- Litz, R., O'Hair, S., Conover, R. 1983. In vitro growth of *Carica papaya* L. cotyledons. *Scientia Horticulturae* 19:287-293
- López-Bucio, J. 2007. Alcamidas: Hacia la nueva era agrícola". *Revista Ciencia y Desarrollo*.33(205): 60-67.
- López-Lauri, F. 2016 Plant Growth Regulators. 125-139 p. En: Siddiqui, M.W.; Zavala, A.; Hwang, J.F.; Andy, C.A. (Eds.), *Postharvest Management Approaches for Maintaining Quality of Fresh Produce*, Springer International Publishing. Switzerland, 222 p.
- López-Martínez, S., Aguilar-Guadarrama, A., Yolanda-Ríos, M. 2011. Minor alkalamides from *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) fresh roots. *Phytochemistry Letters*. 4:275–279

- Mahmoud, O., Zahra, K., Mohammad, A., Mojtaba, K., Kosar, M. 2013. Effect of growth regulators and explants on plant regeneration of *Solanum lycopersium* L. var cerasiforme. *Rus Agric Sci* 39:226–235
- Meyer, A., Tempe, J., Costantino, P. 2000. Hairy root: a molecular overview functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. In: Stacey G, Keen N (eds) *Plant-microbe interactions*. APS Press, St. Paul, Minnesota. 5:93–139.
- Windholz, M. ed.1983. *The Merck Index*, 10th Edit., 1043 Rahway, Nueva Jersey Merck & Co., Inc.
- Mohammad, M. R., Zhuo-Xiao, H., Da-Peng, S., Guo-Feng L., Da-Xiang, L., Xiao-Chun, W., Alagarsamy, K., Shu, W.2016. Effect of medium supplements on *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction from the callus tissues of *Camellia sinensis* var. sinensis. *Int. J. Mol. Sci.*17:1132.
- Molina-Torres, J., Salazar-Cabrera, C. J., Armenta-Salinas, C., Ramirez-Chavez, E. 2004. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affinin and reduced amides. *J. Agric. Food Chem.* 52:4700–4704.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*15:473–497.
- Ortiz-Caltempa, A. 2008. Establecimiento de un cultivo de células transformadas de *Galphimia glauca* en suspensión para la producción de triterpenos. Tesis de Doctorado. Instituto politécnico nacional. Yautepec Mor.107 p.
- Ozyigit, I. I., Dogan, I., Tarhan, E. A. 2013. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and its biotechnological applications in crops. En *Crop Improvement*. 1-48 p.
- Pace, L. G., Bruno, A. A., Spanó, L. 2009. "In vitro plant regeneration and clonal micropropagation of *Leontopodium nivale* (Ten.) Heut ex Hand-Mazz. (Asteraceae). *Plant Biosystems.*143:12-16.

- Petri-Serrano, C. 2005. Transformación genética del albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.), mediada por *Agrobacterium*, y regeneración de plantas transformadas. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. España. 194 p.
- Pitzschke, A. 2013. *Agrobacterium* Infection and Plant Defense—transformation Success Hangs by a Thread.” *Frontiers in Plant Science* 4(2013): 519.
- Ramírez-Chávez, E., Lucas-Valdez, L., Virgen-Calleros, G., Molina-Torres, J. 2000. Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia* 34: 207-215.
- Razak, U., Ong, C., Yu, T., Lau, L. 2014. In vitro micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Malaysia. *Brazilian Archives Biology and technology*. 57(1):23-28
- Ríos-Chávez, P., Ramírez-Chávez E., Armenta-Salinas C., Molina-Torres J. 2003. *Acmella radicans* var. *radicans*: *In vitro* culture establishment and alkalamide content. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*.41(39):37.
- Rueda, D., Delvalle, W., Cifuentes, E., Ramia, N. 2006. Propagación in Vitro de *Stevia rebaudiana* B. a partir de segmentos nodales. *Ceiba*.47(1-2):11-18.
- Salazar, R., Vargas, T., De García E., Oropeza M. 2005. Micropropagación y organogénesis de *Aster ericoides* cultivar "monte cassino. *INCI*. 30(5):1-12.
- Salisbury, F. B., Ross C. W. 2000. Fisiología de plantas 3. Desarrollo de plantas y fisiología ambiental. Editorial paraninfo Madrid.523 p.
- Shaneeja, V., Keshavachandran, R., James, P., Nazeem, P. 2014. Genetic transformation in *Artemisia annua* L. for hairy root induction and enhancement of secondary metabolites. *Journal of Tropical Agriculture* 52 (2): 149-153.
- Singha, S. 1982. Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* spp. 'Almey' and *Pyrus communis* 'Seckel'. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 107: 657-660.

- Singha, S., Townsend, E.C., Oberly, G.H. 1990. Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) shoots *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 23:135-142.
- Stoltz, L.P. 1971. Agar restriction of the growth of excised mature Iris embryos. *J Am Soc Hort Sci.* 96(5):618-684.
- Sulusoglu, M. 2014. Effects of agar types on rooting performance in tissue culture: Sample of Quince A rootstock cultures. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences Special Issue.*1:957-963.
- Swain, S. S., Sahu, L., Barik, D. P., Chand, P. K. 2010. Agrobacterium x plant factors influencing transformation of 'Joseph's coat' (*Amaranthus tricolor* L.). *Sci. Hortic.* 125:461-468.
- Tisserat, B. 1985. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. En: Ixon, R. (Ed). *Plant Cell Culture, A Practical Approach.* IRL Press, Oxford.79-105 p.
- Tzfira, T. y Citovsky, V. 2000. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the Agrobacterium–plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology.*1(4):201–212.
- Seija, V., R Vignoli. 2006. Principales grupos de antibióticos. *Temas de Bacteriología y Virología Médica.* 631-647 p.
- Van Wordragen, M.F., Dons, J.J.M. 1992. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of recalcitrant crops. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10:12–36.
- Von Arnold, S., Eriksson, T.1984 Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* (L) Karst, *Plant Cell Tissue Organ Culture* 3:257–264.
- Yarra, R., Aileni, M., Vemunoori, A.K., Kokkerala, V.R., Umate, P., Abbagani, S. 2010. Direct shoot regeneration from mature leaf explants of *Spheranthus indicus* L. a multipurpose medicinal plant. *J. Phytol.*, 2(5): 5-11.