



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Centro de Desarrollo de Productos Bióticos

**“Análisis de los cambios estructurales de células *in vitro* de
Tagetes erecta L. sometidas a biobalística”**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

P r e s e n t a :

Biól. Fernando Bonilla Badía

D i r e c t o r d e T e s i s :

Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio



Yautepec, Morelos. Enero del 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec siendo las 14 horas del día 30 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del CeProBi para examinar la tesis titulada:

"Análisis de los cambios estructurales de células in vitro de Tagetes erecta L. sometidas a biobalística".

Presentada por el alumno:

<u>Bonilla</u> <small>Apellido paterno</small>	<u>Badía</u> <small>Apellido materno</small>	<u>Fernando</u> <small>Nombre(s)</small>							
Con registro: <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">B</td> <td style="padding: 2px;">0</td> <td style="padding: 2px;">9</td> <td style="padding: 2px;">1</td> <td style="padding: 2px;">3</td> <td style="padding: 2px;">4</td> <td style="padding: 2px;">9</td> </tr> </table>			B	0	9	1	3	4	9
B	0	9	1	3	4	9			

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis



Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio



Dra. Martha Lucía Arenas Ocampo



Dr. Pablo Emilio Vanegas Espinoza



Dra. Alma Angélica del Villar Martínez



Dr. Adrián Guillermo Quintero Gutiérrez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio




DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Con base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis “**Análisis de los cambios estructurales de células *in vitro* de *Tagetes erecta* L. sometidas a biobalística**” es responsabilidad del C. Dr. Antonio R. Jiménez Aparicio y del Biól. Fernando Bonilla Badía, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

Yauhtepec, Morelos 7 de diciembre del 2011.

ATENTAMENTE


Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio
Director de tesis


Biól. Fernando Bonilla Badía
Alumno



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Yauatepec, Mor. siendo el día 7 del mes de diciembre del año 2011, el que suscribe C. Biól. Fernando Bonilla Badía, estudiante del Programa de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos, con número de registro B091349, adscrito al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio y cede los derechos del trabajo intitulado "Análisis de los cambios estructurales de células *in vitro* de *Tagetes erecta* L. sometidas a biobalística", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deberán reproducir el contenido textual, gráficas, o datos del trabajo, sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede obtenerse escribiendo a la siguiente dirección: Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Carretera Yauatepec-Jojutla, Km 6, calle CEPROBI No. 8, Col. San Isidro, Yauatepec, Morelos, México, C.P. 62731, Apartado Postal 24. Teléfonos: (735) 394 20 20, 3941896, (55) 57 29 60 00 Ext. 82500 / 82505. Fax 82512, 82521. E-mail: ceprobi@ipn.mx (<http://www.ceprobi.ipn.mx>). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

ATENTAMENTE

Biól. Fernando Bonilla Badía

Alumno

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio, en el Laboratorio de **Biología Molecular** y en el Laboratorio de **Microscopía e Imagenología**. Para la realización de los estudios se contó con el apoyo económico de la beca CONACYT (331694) y beca del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI). La investigación fue realizada con el financiamiento económico del proyecto multidisciplinario de la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN (SIP-1258).

AGRADECIMIENTOS

- Al Comité tutorial y revisor: Dr. Adrián Quintero Gutiérrez, Dra. Alma A. Del Villar Martínez, Dr. Antonio R. Jiménez Aparicio, Dra. Elsa Ventura Zapata, Dra. Martha L. Arenas Ocampo y al Dr. Pablo E. Vanegas Espinoza por el tiempo invertido, por sus apreciables comentarios y correcciones que permitieron enriquecer el trabajo.
- A la Dra. Alma Angélica Del Villar Martínez y al Dr. Pablo Emilio Vanegas Espinoza, por la oportunidad que me dieron de integrarme al grupo de trabajo del Laboratorio de Biología Molecular. Gracias, ha sido una experiencia enriquecedora y de crecimiento.
- A mi tutor, Dr. Antonio R. Jiménez Aparicio por su apoyo e interés para el desarrollo y revisión del trabajo.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el sustento económico recibido por medio de la beca (331694) para llevar a cabo mi formación académica.
- Al M. en C. Lino Segura Sánchez y a la Dra, Brenda H. Camacho Díaz por su valiosa asesoría en el tratamiento digital de imágenes y en las técnicas de microscopía. Su amistad ha sido también una grata sorpresa en los momentos difíciles, muchas gracias.
- Al Dr. Eduardo Terrés Rojas, por su apoyo en la operación del microscopio electrónico de barrido ambiental para la adquisición de las micrografías.
- Al Dr. Andrés Cruz Hernández, por sus enseñanzas en la técnica de la biobalística, así como por sus recomendaciones, gracias por el apoyo incondicional durante la elaboración de la primera etapa de la tesis.

DEDICATORIA

- A mi núcleo, la familia Bonilla Badía por compartir proyectos de vida, por su gran amor y por las facilidades prestadas para realizar mis estudios. Gracias, son una bendición en mi vida y saben que su amor es bien correspondido, los quiero mucho.
- A Edith G. por darme su amistad, apoyo y amor en todo momento, sobre todo en los momentos difíciles, sabes lo mucho que te quiero mi niña.
- A mis entrañables compañeros y amigos: Isra, Mario, Edith, Jorge L., Jann, Caro, Nadia, Selvita, Kris, Yadi, Ángeles, Viri, Sandra, Lino, Brenda, Marichú, Bet, Ed, Carlos, Gus, Maribel, Vicky, Luz, Uli, Ketz, Yes, Robert, Lupita y Vic por su confianza, amistad y estimada solidaridad durante las aventuras inesperadas y compartidas en el transcurso de la maestría. “Basta un poco de espíritu aventurero para estar siempre satisfechos, pues en esta vida, gracias a Dios, nada sucede como deseábamos, como suponíamos, ni como teníamos previsto”-Noel Clarasó-.
- Gracias a todos aquellos que me acompañaron con enseñanzas académicas y de vida durante mis estudios de posgrado, su semilla permanecerá conmigo siempre.

*“Sólo aquel que se consagra a una causa,
con toda su fuerza y alma, puede ser un verdadero maestro.
Por esta razón, ser maestro lo exige todo de una persona”.*

-Albert Einstein-

(1879-1955)

*El maestro que intenta enseñar sin inspirar
en el alumno el deseo de aprender,
está tratando de forjar un hierro frío.*

-Horace Mann-

(1796-1859)

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
1) INTRODUCCIÓN.....	1 -
2) REVISIÓN DE LITERATURA	3 -
2.1) Principios del cultivo células y tejidos vegetales.	3 -
2.2) Utilidad del cultivo de células y tejidos vegetales.	3 -
2.3) Cultivos de callo ¿una mezcla celular no homogénea?	4 -
2.3.1) Traqueidas como elementos diferenciados en cultivos de células vegetales.	5 -
2.4) Estudios con cultivo de células y tejidos de <i>T. erecta</i>	6 -
2.5) <i>Tagetes erecta</i> L. como modelo de estudio y su importancia.	6 -
2.5.1) estructuras celulares acumuladoras de carotenoides y biosíntesis.	9 -
2.6) La transformación genética en plantas.....	11 -
2.7) Métodos de transformación genética.....	13 -
2.8) Transformación por biobalística.....	14 -
2.8.1) Expresión transitoria y la reacción de GUS.....	17 -
2.8.2) Mecanismo de integración del DNA empleando biobalística.	18 -
2.9) Viabilidad celular.....	19 -
2.10) Técnicas de fluorescencia citoquímica.	19 -
2.11) Microscopía de fluorescencia.	20 -

2.12) Fluorocromos citoquímicos comúnmente usados para contraste de núcleo. -----	20 -
2.13) El núcleo celular, morfología y función. -----	21 -
2.13.1) ¿El núcleo alberga una cantidad constante de DNA? -----	22 -
2.13.2) Cambios morfológicos del núcleo. -----	23 -
2.13.3) Algunas estructuras especiales en el núcleo: cuerpos nucleares. -----	24 -
2.14) Tratamiento digital de imágenes como complemento morfométrico y de caracterización. -----	24 -
2.15) Microscopía electrónica de barrido ambiental -----	26 -
 3) JUSTIFICACIÓN -----	 27 -
 4) HIPÓTESIS -----	 28 -
 5) OBJETIVOS -----	 28 -
 6) MATERIALES Y MÉTODOS -----	 29 -
6.1) Material biológico. -----	30 -
6.2) Condiciones de cultivo. -----	32 -
6.3) Aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina. -----	32 -
6.4) Purificación de DNA plasmídico. -----	33 -
6.5) Preparación de gel de agarosa para electroforesis. -----	33 -
6.6) Análisis de restricción de los vectores de transformación. -----	33 -
6.7) Preparación y precipitación de partículas para la biobalística. -----	34 -
6.8) Tratamiento osmótico de los callos. -----	35 -
6.9) Bombardeo de partículas en cámara de baja presión. -----	35 -
6.10) Ensayos de expresión transitoria y localización histoquímica de foci por expresión de la enzima β -glucuronidasa. -----	36 -
6.11) Caracterización morfológica de los callos por TDI; evaluación del crecimiento en dos dimensiones de callos de <i>T. erecta</i> material “porte bajo” en cinco tratamientos de kanamicina. -----	37 -
6.12) Tinción con fluorocromos y determinación de viabilidad de células desdiferenciadas de <i>T. erecta</i> . -----	38 -

6.13) Tinción de núcleos de callo de <i>T. erecta</i> bombardeados y no bombardeados con yoduro de propidio. -----	- 39 -
6.14) Caracterización morfológica por TDI de los núcleos de callos bombardeados. -----	- 40 -
6.15) Microscopía electrónica de barrido ambiental. -----	- 40 -
7) RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	- 41 -
7.1) Análisis de restricción del vector pBI426. -----	- 41 -
7.2) Análisis de restricción del vector pC35S β . -----	- 42 -
7.3) Análisis de la respuesta al bombardeo de partículas en cámara de baja presión en callo de <i>T. erecta</i> material “porte bajo”. -----	- 44 -
7.4) Tolerancia a la kanamicina de callos de <i>T. erecta</i> material “porte bajo”. -----	- 46 -
7.5) Determinación de la viabilidad celular con 5 tratamientos de kanamicina en callos de <i>T. erecta</i> material “porte bajo”. -----	- 51 -
7.6) Caracterización celular de los callos bombardeados con pC35S β ; Descripción de las alteraciones en nucleares durante el crecimiento <i>in vitro</i> . -----	- 54 -
7.7) Morfometría por TDI de los núcleos de los callos bombardeados. -----	- 60 -
7.8) Microscopía electrónica de barrido ambiental. -----	- 62 -
8) CONCLUSIONES -----	- 64 -
9) PERSPECTIVA -----	- 65 -
10) LITRATURA CITADA -----	- 66 -
11) ANEXOS -----	- 75 -

ÍNDICE DE TABLAS

Número	Tabla	Página
Tabla 1.	Algunos antecedentes del grupo de investigación relacionados con estudios de <i>T. erecta</i> . -----	6
Tabla 2.	Algunos reactivos fluorescentes comunes de tinción para núcleo. -----	21
Tabla 3.	Listado y descripción del material biológico usado en este trabajo. -----	30
Tabla 4.	Fragmentos esperados del vector pBI426 por la digestión con enzimas de restricción. -----	42
Tabla 5.	Fragmentos esperados del vector pC35S β por la digestión con enzimas de restricción. -----	43
Tabla 6.	Determinación cuantitativa de foci. por localización histoquímica en células bombardeadas de <i>T. erecta</i> material “porte bajo” en 3 distancias con presión de 60 psi. -----	44
Tabla 7.	Determinación cuantitativa de foci. por localización histoquímica en células bombardeadas de <i>T. erecta</i> material “porte bajo” en 3 distancias con presión de 80 psi. -----	45
Tabla 8.	Determinación cuantitativa de foci. por localización histoquímica en células bombardeadas de <i>T. erecta</i> material “porte bajo” en 3 distancias con presión de 100 psi. -----	46
Tabla 9.	Viabilidad de callos bombardeados con pC35S β (Resiembra 10 en medio de selección MS Km300). -----	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Figura	Página
Figura 1.	Micrografías de cultivo de células de <i>Zinnia elegans</i> en autofluorescencia (450-490 nm) -----	5
Figura 2.	Flores representando las tres familias de pigmentos con sus correspondientes estructuras. -----	7
Figura 3.	Flores o cabezuelas de <i>Tagetes erecta</i> . Presentan diferentes pigmentaciones, dependientes de la combinación de carotenos. -----	8
Figura 4.	Ciclo de desarrollo de un plastidio y la interconversión de varios tipos de plastidios. -----	10
Figura 5.	Representación de la ruta biosintética de los carotenoides. -----	12
Figura 6.	Transformación de plantas por los métodos de <i>Agrobacterium</i> y biobalística. -----	15
Figura 7.	Diagrama de flujo de la metodología general del trabajo. -----	29
Figura 8.	Representación del mapa genético del plásmido pBI426, que tiene un tamaño de 6269 pares de bases. -----	31
Figura 9.	Representación del mapa genético del plásmido pC35S β , que tiene un tamaño de 11237 pares de bases. -----	31
Figura 10.	Descripción de las partes de la cámara de bombardeo de baja presión empleada en este trabajo. -----	36
Figura 11.	Ejemplo del resultado de la binarización y segmentación, realizada por tratamiento digital de las imágenes de los callos con Image J. -----	38
Figura 12.	Fotografía de gel de agarosa donde se muestran las bandas de DNA como resultado del análisis de restricción del vector pB1426. -----	41
Figura 13.	Fotografía de gel de agarosa donde se observan las digestiones del DNA plasmídico pC35S β . -----	43

Figura 14.	Reacción de GUS después de bombardear los callos de <i>T. erecta</i> con presión de 60 psi. -----	44
Figura 15.	Reacción de GUS después de bombardear los callos de <i>T. erecta</i> con presión de 80 psi. -----	45
Figura 16.	Reacción de GUS después de bombardear los callos de <i>T. erecta</i> con presión de 100 psi. -----	45
Figura 17.	Fotografía de callos de <i>T. erecta</i> material “porte bajo” en medio MS con cinco tratamientos de kanamicina, mostrando 3 momentos representativos en el transcurso de los 26 días del cultivo. Se observa cambio fenotípico de los callos en 3 días diferentes durante la cinética de tolerancia al antibiótico. -----	47
Figura 18.	Longitud máxima de los callos obtenida por análisis de tratamiento digital de imágenes, del registro fotográfico en 5 tiempos de la cinética de tolerancia a al antibiótico de selección (kanamicina). -----	49
Figura 19.	Relación de tiempo y área de los callos, obtenida por análisis de tratamiento digital de imágenes. Corresponden al registro fotográfico en 5 tiempos de la cinética de tolerancia al antibiótico de selección. -----	50
Figura 20.	Perímetro de los callos obtenido por análisis de tratamiento digital de imágenes. Corresponden al registro fotográfico en 5 tiempos de la cinética de tolerancia al antibiótico de selección. -----	50
Figura 21.	Circularidad de los callos obtenida por análisis de tratamiento digital de imágenes. Corresponden al registro fotográfico en 5 tiempos de la cinética de tolerancia al antibiótico de selección. -----	50
Figura 22.	Sensibilidad a kanamicina de callos de <i>T. erecta</i> material “porte bajo” en cinco tratamientos de kanamicina. -----	51
Figura 23.	Callos bombardeados con el vector pC35S β en la décima resiembra frente a un subcultivo de la misma línea celular no bombardeada. -----	52
Figura 24.	Viabilidad celular de callos de <i>T. erecta</i> bombardeados con pC35S β (resiembra 10). -----	53

Figura 25.	Micrografía de núcleos de células de callo de <i>T. erecta</i> material “porte bajo” a 1 día de crecimiento. -----	55
Figura 26.	Micrografía de núcleos de células de callo de <i>T. erecta</i> material “porte bajo” a 10 días de crecimiento. -----	56
Figura 27.	Micrografía de núcleos de células de callo de <i>T. erecta</i> material “porte bajo” a 16 días de crecimiento. -----	57
Figura 28.	Micrografía de núcleos de células de callo de <i>T. erecta</i> material “porte bajo” a 22 días de crecimiento. -----	57
Figura 29.	Micrografías de cultivo de callo de <i>T. erecta</i> , donde se observa una célula con la morfología de una traqueida. -----	58
Figura 30.	Micrografía de tejido de callo de <i>T. erecta</i> material “porte bajo” donde se observa la presencia de una sección celular que se identifica como un elemento de tráquea o traqueida. -----	58
Figura 31.	Micrografía de fluorescencia de callos de <i>T. erecta</i> material “porte bajo” donde se muestra la sección de una célula con patrones espirales o reticulares en la pared celular. -----	59
Figura 32.	Micrografía de fluorescencia de callos de <i>T. erecta</i> material “porte bajo” mostrando células con patrones espirales o reticulares en la pared celular, característicos de traqueidas. -----	59
Figura 33.	Área de los núcleos de células desdiferenciadas de <i>T. erecta</i> . ----- -----	60
Figura 34.	Perímetro de los núcleos de células desdiferenciadas de <i>T. erecta</i> . ----- -----	61
Figura 35.	Circularidad de núcleos de células desdiferenciadas de <i>T. erecta</i> . -----	61
Figura 36.	Micrografías de microscopía electrónica de barrido ambiental mostrando la presencia de partículas de oro en los callos bombardeados.	62
Figura 37.	Análisis de elementos realizada durante la Microscopía de barrido ambiental. -----	62

Figura 38	Micrografía de barrido ambiental mostrando estructuras celulares con morfología de traqueidas (TEs) en cultivos de callo de <i>T. erecta</i> material “porte bajo” a los 15 días de cultivo. -----	63
Figura 39	Micrografía de una estructura de traqueida en las células de callo de <i>T. erecta</i> bombardeadas con pC35SB (resiembra 10), donde se muestra el grosor o diámetro de los patrones fibrilares de una traqueida. -----	63

LISTA DE ABREVIATURAS

BA:	Benciladenina.
col.	colaboradores.
CCTV:	Cultivo de células y tejidos vegetales.
DAF:	Diacetato de fluoresceína.
DNA:	Ácido desoxiribonucleico.
<i>E. coli:</i>	<i>Escherichia Coli.</i>
EDTA:	sal disódica del ácido etil diamino tetracético.
EtBr:	bromuro de etidio.
g:	gramos.
g/L:	gramos por litro.
h:	horas.
kb:	kilobases.
Km:	kanamicina.
<i>lcy- β:</i>	gen que codifica para la enzima licopeno β ciclasa.
L:	litro
M :	Molar.
MEB:	Microscopía Electrónica de Barrido.
MET :	Microscopía Electrónica de Transmisión.
μg:	microgramos.

mmHg:	milímetros de mercurio
min:	minutos.
mL :	mililitros.
μl :	microlitros.
μm :	micras.
MS:	Murashige y Skoog
nm	nanómetros
pb:	pares de bases.
pH:	potencial de hidrógeno.
PI:	Ioduro de propidio.
psi:	libras por pulgada cuadrada.
rpm:	revoluciones por minuto.
RNA:	Ácido ribonucleico.
SDS:	Dodecil sulfato sódico.
seg:	segundos.
TAE:	Tris Acetato y EDTA.
<i>T. erecta:</i>	<i>Tagetes erecta.</i>
TDI:	Tratamiento digital de imágenes
TES:	TRIS EDTA SDS.
TEs:	Traqueidas.
TRIS:	Trishidroximetilaminometano
° C:	Grados Centígrados.
2,4 -D :	Ácido 2.4- dicloro fenoxiacético.

RESUMEN

Se usaron células de callo de *Tagetes erecta* L. (material porte “bajo”) como modelo para introducir por biobalística el gen *lcy-β* (de la ruta de carotenoides), para valorar la probable transformación estable y analizar los cambios morfológicos celulares provocados por la biobalística. Se extrajeron los plásmidos pBI426 y pC35Sβ de *E. coli* y se analizaron por restricción. Se hicieron ensayos de expresión transitoria bombardeando partículas de oro con pBI426, valorando tres presiones y tres distancias para determinar las condiciones de bombardeo en cámara de baja presión. Las condiciones 60psi/14.5 cm mostraron los valores más altos de expresión transitoria, las cuales se usaron para bombardear callo con la construcción pC35Sβ. Los callos bombardeados, a pesar de mostrar valores positivos de viabilidad celular (67%), no pudieron ser subcultivados. Esta característica se evaluó por tinción diferencial con los fluorocromos DAF y PI. Se ha reportado que la viabilidad celular no asegura que las células conserven la capacidad de desarrollar masa celular en subcultivos. Se analizaron micrografías de fluorescencia con tinción de IP para investigar los cambios en los núcleos de las células bombardeadas y no bombardeadas. Mediante Tratamiento Digital de Imágenes, se analizó la morfología de los núcleos, encontrando que la tendencia en los tamaños de área y perímetro del núcleo de las células bombardeadas fueron menores respecto a las no bombardeadas. Los núcleos presentaron diferencias morfológicas en la disposición y forma de la cromatina, en el transcurso de 22 días de cultivo. Las células bombardeadas mostraron cuerpos nucleares muy condensados en el nucleoplasma; no así en las células no bombardeadas; sin embargo no se pudo asegurar que los cambios morfológicos fueran resultado de callos transformados. Por otro lado, durante la captura de imágenes en fluorescencia, se observaron traqueidas en ambas líneas celulares (células de callo bombardeadas y no bombardeadas). Por MEB ambiental también se observó la presencia de células diferenciadas en los cultivos de callo de *T. erecta*, estas células diferenciadas en el callo se identificaron como traqueidas, en las cuales se ha reportado el engrosamiento de la pared celular y la síntesis de lignina. En la literatura no se encuentran reportes de estas estructuras para cultivos *in vitro* de *T. erecta*. Este modelo podría usarse para abundar en el estudio de la síntesis del xilema y de lignina, a nivel molecular y celular. Los elementos de tráquea se observaron tanto en callos bombardeados como en no bombardeados.

ABSTRACT

Tagetes erecta L callus cells ("porte bajo" material) were used as a plant model in order to delivery *lcy-β* gene (from carotenoids route) by means of biobalistic transformation. The aim was to evaluate the probable transformation and analyze the cellular morphological changes caused by the bombardment of callus. The pC35S β and pBI426 plasmids were extracted from *E. coli* and analyzed by restriction assays. Transient expression assays were carried out, using gold particles bombardment coated with pBI426 construction. Three pressures and three distances were assessed to determine the conditions of bombardment in low-pressure chamber. The condition evaluated 60psi/14.5 cm showed the highest values of transient expression, so these conditions were used to bombard the callus with pC35S β construction. The bombarded callus could not be subcultured, despite of showed positive values of cell viability (67%). This feature was evaluated by differential staining with DAF and PI fluorochromes. It has been reported that cell viability does not confirm that the cells are able to develop cell mass on subcultures. Fluorescent micrographs were analyzed with IP staining to investigate in cell nuclei changes from bombarded and not bombarded callus cells. Digital Image Analysis were carried out to analyze nuclei morphology of the bombarded cells, it was found a tendency to smaller area and perimeter sizes than non-bombarded nuclei cells. The nuclei cells showed morphological differences in the arrangement and shape of the chromatin in the course of 22 days of culture. Bombarded cells displayed repeatedly, highly condensed nuclear bodies in the nucleoplasm, but not in the non-bombarded cells. Nevertheless, transformation callus could not be assured. On the other hand, during the capture of fluorescent micrographs, tracheids were observed in both cell lines (bombarded and non-bombarded callus cells). Environmental Scanning Electronic Microscopy also revealed the presence of differentiated cells in the callus cultures of *T. erecta* these differentiated cells in the callus were identified as tracheids, in which it has been reported thickening of the cell wall and lignin synthesis. There are no reports of these structures on *in vitro* cultures of *T. erecta*. This model could be used to abound in the study of xylem and lignin synthesis, at molecular and cellular level. Trachea elements were observed in both bombarded and non-bombarded callus.

1) INTRODUCCIÓN

El cultivo de células y tejidos vegetales (CCTV) constituye una herramienta biotecnológica. Permite la generación y mantenimiento de callos, la multiplicación y regeneración de materiales manipulados genéticamente. El CCTV también puede ser empleado para producir metabolitos naturales de interés. Un ejemplo de estos metabolitos son los carotenoides, que comprenden una familia de pigmentos, a los cuales se les ha vinculado con la prevención de algunas enfermedades como: la degeneración macular y algunos tipos de cáncer. [Nishino y col., 2008 y Krinsky, y Jhonson. 2005]. En este sentido, destaca *Tagetes erecta*, una planta asterácea que acumula grandes cantidades de luteína en sus inflorescencias. Lo cual hace de esta planta un modelo para el estudio de la carotenogénesis, con la perspectiva de incrementar la biosíntesis de compuestos de interés en un sistema controlado *in vitro*.

Uno de los métodos comunes para lograr introducir cambios o mejoras en las características de un organismo vegetal, es el método de transformación genética por biobalística. La biobalística, generalmente, está dirigida a integrar genes en el núcleo. Dicho método fue usado inicialmente en plantas de tabaco. En gramíneas, como arroz y maíz se han obtenido transformantes estables a partir de callos transgénicos. Es importante mencionar que existen limitaciones y diferencias en las metodologías de transformación para plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (como *T. erecta*) [Richards y col., 2001; Vain y col., 1993; Vallejos y col., 1992]. Para emplear la biobalística, es necesario establecer parámetros específicos para cada modelo de estudio.

En *T. erecta* se han realizado estudios sobre factores ambientales que inducen la diferenciación plastídica. Igualmente, existe información sobre la forma del callo durante su crecimiento. Sin embargo, para lograr la multiplicación y regeneración de materiales mejorados, resulta importante abundar en el conocimiento de las características y respuestas celulares (como cambios morfológicos) en respuesta al bombardeo y la posible integración de genes. En el estudio y caracterización morfológica de células, la microscopía es una herramienta de observación poderosa ya que permite obtener imágenes bidimensionales o tridimensionales, con las cuales se pueden lograr mediciones morfológicas. Las imágenes

obtenidas por microscopía (micrograffías) tienen como fin la cuantificación de parámetros (como circularidad, perímetro o área) de los objetos presentes en éstas, a través de los elementos que las componen, su origen y su naturaleza [Lira, 2002]. La precisión que se tenga para controlar y predecir la respuesta de un sistema, dependerá en gran medida de la caracterización que se tenga de dicho modelo o sistema de estudio. Es por ello que resulta importante ampliar el conocimiento de la morfología y de la respuesta celular del tejido desdiferenciado de *T. erecta*. El CCTV hace posible el análisis de estructuras celulares así como el estudio de eventos fisiológicos, bioquímicos y genéticos en un sistema *in vitro*.

2) REVISIÓN DE LITERATURA

2.1) PRINCIPIOS DEL CULTIVO CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES

La biotecnología vegetal tiene como una de sus bases el cultivo de células y tejidos [Miranda, 1999]. Ésta se apoya en principios básicos como la teoría celular de Schleiden y Shwan (1838-1839), donde se expone que todo ser vivo está formado por células y que a su vez siempre originarán otras células [Curtis y Barnes, 2000]. Sin embargo, las bases en que se fundamentan los métodos actuales del cultivo de células vegetales, comenzaron a desarrollarse entre 1942 y 1963. Miller y Skoog fueron los primeros que pudieron manipular la formación *in vitro* de raíces, brotes y tejidos callosos en 1957, este logro tuvo lugar por la combinación de dos fitohormonas: la auxina ácido indolacético (AIA) y la citocinina cinetina (CIN), descubiertas en 1928 y 1955, respectivamente. En 1962 acontece otro hito cuando Murashige y Skoog desarrollan un medio de cultivo con las características adecuadas para emplearse en el cultivo de gran variedad de tejidos de diferentes especies vegetales. Hacia finales de los años 70 e inicios de los 80, el CCTV se afianza en el ámbito de la investigación en biología e inicia su aplicación directa en micropropagación, conservación de germoplasma y generación de plantas libres de patógenos [Miranda, 1999].

2.2) UTILIDAD DEL CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES.

En la actualidad, el CCTV comprende un conjunto de técnicas para establecer, mantener y permitir el desarrollo de cualquier célula u órgano vegetal bajo condiciones *in vitro*, controladas y asépticas [Radice, 2004]. La síntesis de fitoquímicos por cultivos celulares *in vitro*, en contraste con aquellos sintetizados en plantas *ex vitro*, están sujetos a variables abióticas controladas así como los componentes del medio de cultivo [Smetanska, 2008]. Como aplicaciones de estas técnicas *in vitro*, se puede mencionar la micropropagación

(multiplicación) o clonación de cultivos, producción de compuestos naturales y obtención de materiales mejorados mediante selección artificial [Miranda, 1999].

En condiciones adecuadas, el cultivo de segmentos o explantes de órganos vegetales, puede promover que las células *in vitro* formen una masa de células amorfa y aparentemente desorganizada, denominado callo [Radice, 2004; Miranda, 1999]. Los cultivos de callos tienen aplicaciones en estudios fisiológicos, bioquímicos, genéticos, en producción y obtención de metabolitos y para la generación de variación genética en los cultivos. De tal forma que la ingeniería genética y el establecimiento de cultivos de tejidos vegetales (como los callos), resultan ser herramientas útiles para el desarrollo de los procesos biotecnológicos [Smetanska, 2008; Miranda, 1999].

2.3) CULTIVOS DE CALLO ¿UNA MEZCLA CELULAR NO HOMOGÉNEA?

El callo es un tipo de tejido vegetal conformado por células desdiferenciadas, asíncronas (en diferentes estadios del ciclo celular) y aparentemente desorganizadas. Se puede definir como tejido a dos o más tipos celulares que tienen una función en común y que generalmente comparten una historia de desarrollo [Simpson, 2006]. En los cultivos de callo, las células normalmente crecen como una masa desdiferenciada pero también existen algunas células diferenciadas, haciendo del callo una mezcla de células no homogénea. Lo cual ha resultado provechoso en recientes estudios, donde los cultivos de tejido con diferenciación de elementos traqueales y con formación de pared celular o de lignina extracelular, han provisto información útil relacionada con la formación de la lignina y del xilema. Uno de los sistemas más conocidos para estudiar la secuencia de eventos durante la larga diferenciación del xilema, es la planta asterácea *Zinnia elegans*. Así, todo el proceso puede ser monitoreado en células individuales. El análisis sistemático de la expresión de genes y el uso de marcadores moleculares, han revelado que muchos procesos son comunes entre la formación de traqueidas (TEs) *in vitro* e *in situ*. Estudios realizados con este sistema, han clarificado un número de eventos fisiológicos, bioquímicos y moleculares subyacentes en la diferenciación de TEs [Kärkönen y col., 2011].

2.3.1) TRAQUEIDAS COMO ELEMENTOS DIFERENCIADOS EN CULTIVOS DE CÉLULAS VEGETALES

Los elementos traqueales son células especializadas con función conductora de agua y minerales. Generalmente son células alargadas y muertas en su etapa madura, tienen pared secundaria lignificada. Los elementos traqueales se clasifican en: 1) traqueidas y 2) elementos de vaso [Simpson, 2006]. Durante la formación de elementos de tráquea, la estructura de la pared celular es sometida a cambios dinámicos, tales como los engrosamientos localizados así como la lignificación de la pared celular secundaria y degradación parcial de la pared primaria [Kärkönen y col., 2011].

Las traqueidas son un tipo celular más primitivo en la evolución respecto a los elementos de vaso. Las traqueidas no tienen las perforaciones características de los elementos de vaso. Se piensa que los elementos de vaso evolucionaron a partir de traqueidas preexistentes en diferentes grupos, incluyendo casi todas las angiospermas (plantas con flores). Algunas angiospermas solo tienen traqueidas, las cuales tienen canales o surcos escaliformes (Figura 1), especialmente en la pared mas externa donde se pueden unir otras traqueidas [Simpson, 2006]. En el 2010 Lacayo y col. emplean por primera vez la microscopía de fluorescencia combinado con microscopía de fuerza atómica para investigar los elementos traqueales y la pared celular de cultivos celulares *in vitro* de *Zinnia elegans*.

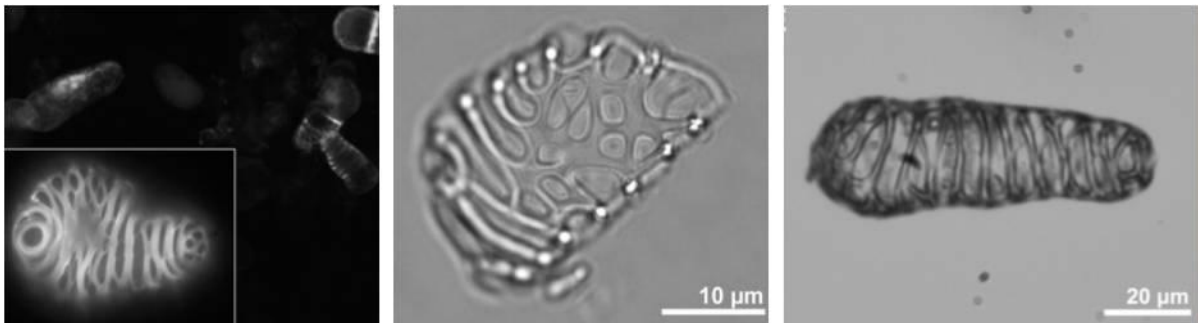


Figura 1. Micrografías de cultivo de células de *Zinnia elegans* en autofluorescencia (450-490 nm) (Lacayo y col. 2010).

2.4) ESTUDIOS CON CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS DE *T. erecta*

En nuestro grupo de trabajo se han realizado y publicado estudios referentes al cultivo *in vitro* de *T. erecta*: desde el establecimiento del cultivo hasta estudios del proceso de desdiferenciación de los explantes; se ha descrito el cambio ultraestructural que sufren los plastidios durante el crecimiento del cultivo; así mismo se han realizado experimentos de bombardeo y se han establecido condiciones de transformación por biobalística de alta presión (Tabla 1). Sin embargo no se han publicado estudios de caracterización celular donde se identifiquen estructuras celulares como las traqueidas o análisis citológicos a nivel nuclear en callos sometidos a biobalística.

Tabla 1. Algunos antecedentes del grupo de investigación relacionados con estudios de *T. erecta*.

AUTOR	AÑO	ESTUDIO
Vanegas P.	2003	Establecimiento de cultivo de callo de <i>T. erecta</i> .
Del Villar-Martínez y col.	2005	Ultraestructura de cromoplastos por MET. comparación entre lígulas de <i>T. erecta</i> (albino) versus <i>T. erecta</i> (pigmentada)
Vanegas- Espinoza y col.	2006	Condiciones de transformación por biobalística de alta presión para <i>T. erecta</i>
Sánchez, L.	2008	TDI y MET para analizar cambios ultraestructurales en el desarrollo de plastidios de <i>T. erecta</i>
Vanegas- Espinoza y col.	2011	Transformación de callos de <i>T. erecta</i> por biobalística para modificar contenido de carotenoides.
Del Villar-Martínez y col.	2011	TDI para observar cambios morfológicos en el proceso de diferenciación y desdiferenciación de explantes de <i>T. erecta</i> .

2.5) *Tagetes erecta* L. COMO MODELO DE ESTUDIO Y SU IMPORTANCIA

Las inflorescencias de *Tagetes erecta* tienen características interesantes y para ubicar sus particularidades, resulta útil señalar el contexto de las tres familias principales de pigmentos naturales, que son responsables del atractivo color de las flores. Dichos grupos comprenden a las antocianinas, betalainas y los carotenoides (Figura 2). Las antocianinas están ampliamente

distribuidas entre las plantas fanerógamas y tanto su biosíntesis como su regulación están mejor comprendidas. Por otro lado, en los últimos años se ha logrado un progreso significativo en la elucidación de la biosíntesis y participación de las betalainas y de los carotenoides en la pigmentación de las flores. Respecto a los carotenoides, representan una amplia clase de pigmentos naturales, se conocen más de 600, dentro de los cuales los carotenos y las xantofilas (hidrocarburos y derivados oxigenados respectivamente) son las más asociadas con la pigmentación de las flores. Son los responsables de la mayoría de los colores amarillos y anaranjados de las flores ornamentales, incluyendo al género de *Tagetes* [Groteworld, 2006].

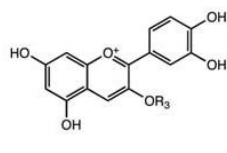
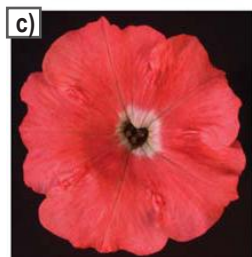
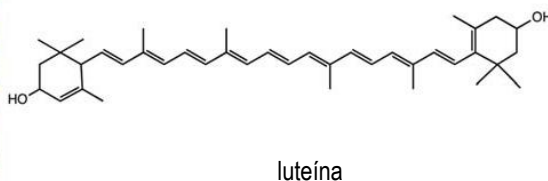
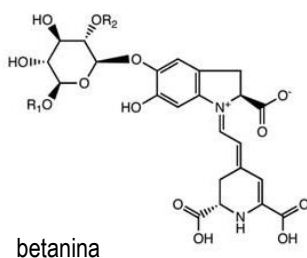


Figura 2. Flores representando las tres familias de pigmentos con sus correspondientes estructuras. (Modificado de Groteworld, 2006).

a) Inflorescencias de *Portulaca grandiflora*, presentando acumulación de betanina, pigmento que pertenece a la familia de las betalainas.

b) Inflorescencias de *Tagetes patula*, acumulando el pigmento luteína, concerniente a los carotenoides.

c) Flor de *Petunia hybrida* acumulando antocianidina, perteneciente a la familia de las antocianinas.

Tagetes erecta L. pertenece a la familia de las Asteráceas, exhibe inflorescencias muy vistosas organizadas en capítulos, con colores que van desde el blanco hasta una gama de amarillos y anaranjados (Figura 3) [Del Villar-Martínez y col., 2005; Serrato, 1994]. *T. erecta* es una planta nativa de México, herbácea y anual con crecimiento erecto que alcanza una

altura promedio de 1 a 1.5 metros. Posee valía en la medicina tradicional [Waizel, 2008] y ha formado parte de la cultura de muchos pueblos de origen prehispánico. *Tagetes erecta* se encuentra desde el nivel del mar hasta los 2 800 metros de altitud, en variados climas y sitios de México. Existen registros de diversos vocablos indígenas utilizados para referirse a este mismo vegetal: *cempoalxóchitl* (náhuatl), *expujuj* (maya), *caxyhuitz* (huasteco), *apátsicua* (purépecha), *chant* (tepehua), *guie' bigua'* (zapoteco), *ita-cuaan* (mixteco) y *kalhpu'xa'm* (totonaco) entre otros [Serrato, 1994]. También es conocida como cempasúchil, cempazúchitl, cempaxúchil o flor de muerto, en lengua inglesa se conoce como marigold.



Figura 3. Flores o cabezuelas de *Tagetes erecta*. Presentan diferentes pigmentaciones, dependientes de la combinación de carotenos (Tomado de Del Villar-Martinez y col., 2007).

La luteína es el principal pigmento responsable del color en las flores de *T. erecta*, también es un carotenoide liposoluble. Y dado que la luteína comprende alrededor del 70-88% de los pigmentos de las flores del cempaxúchil, se vuelve una fuente importante de carotenoides naturales [Sreekala y Raghava, 2003]. Los carotenoides se encuentran entre los pigmentos naturales más importantes y con mayor distribución, que junto con las clorofilas tienen presencia ubicua en los organismos fotosintéticos, desde bacterias y microalgas hasta plantas superiores. Además sirven como precursores para la biosíntesis de la fitohormona ABA (ácido abscísico) [Groteworld, 2006; Buchanan y col., 2002 y Gross, 1987]. Por otro lado, también son esenciales en organismos heterótrofos como los peces, invertebrados marinos y las aves, que frecuentemente se valen de los carotenoides presentes en sus dietas para fines de pigmentación. Los animales carecen de la capacidad metabólica de sintetizar carotenoides *de*

novo, aunque estudios recientes indican que las plantas y los animales comparten enzimas modificadoras de carotenoides. [Groteworld, 2006].

Así mismo se emplean como componentes nutraceuticos, sirviendo como antioxidantes (capturando radicales libres que pueden tener un efecto tóxico). En nuestros días existe una tendencia social de optar por los productos naturales sobre los productos sintéticos, ya que los pigmentos sintéticos han recibido críticas desfavorables y se les ha relacionado con la aparición de enfermedades en los consumidores de productos elaborados con dichos productos de síntesis artificial [Pszczola, 1998 y Delgado-Vargas, 1997]. Respecto al uso biomédico de los carotenoides, está fundamentalmente dirigido a la producción de metabolitos como la vitamina A, y actualmente se indaga el potencial del licopeno, la luteína y la zeaxantina, en investigación preventiva de enfermedades coronarias y algunos tipos de cáncer [Martínez, 2003].

2.5.1) ESTRUCTURAS CELULARES ACUMULADORAS DE CAROTENOIDES Y BIOSÍNTESIS

Los carotenoides se almacenan en los cromoplastos, que son un tipo de plastidios. Éstos son organelos semiautónomos, que sólo aparecen en células vegetales y que cumplen diferentes funciones bioquímicas: fotosíntesis, almacenamiento de productos y síntesis de moléculas para la arquitectura básica y funcionalidad celular. Su nombre viene de la etimología grecolatina “moldeado”, por su plasticidad morfológica. Varían en tamaño forma, contenido y función. Además son estructuras autoreplicantes, que poseen gran capacidad para diferenciarse, desdiferenciarse y rediferenciarse (Figura 4). Estos organelos se reproducen solo por división, independientemente de la división celular. Pueden ser incoloros en algunos tipos celulares y pigmentados en otros. La cantidad de un tipo de plastidio en particular en una célula dada, puede variar conforme a los tipos celulares y la etapa en la que se encuentre la célula misma [Buchanan y col., 2002].

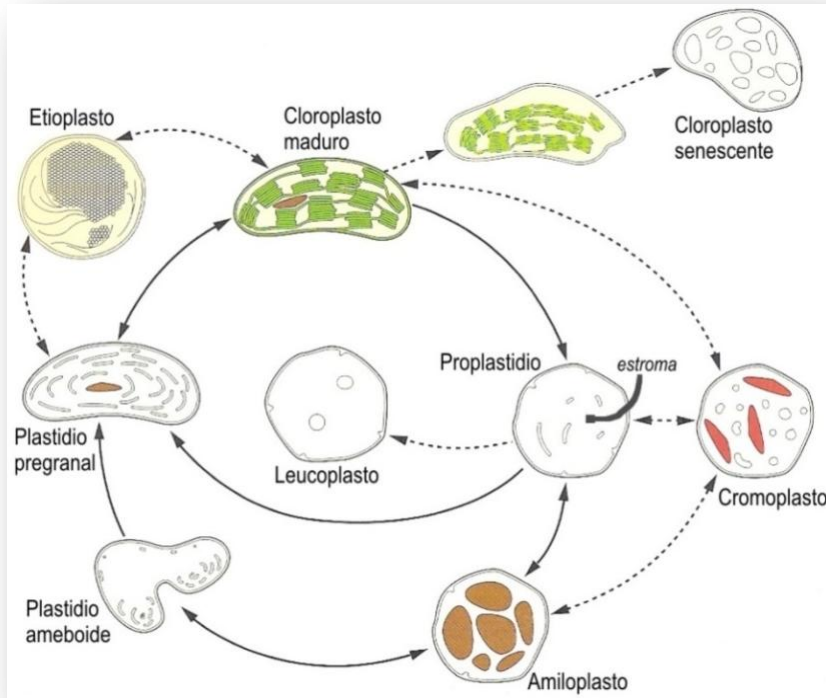


Figura 4: Ciclo de desarrollo de un plastidio y la interconversión de varios tipos de plastidios.

Las flechas continuas describen pasos normales del desarrollo de un cloroplasto; las flechas discontinuas muestran interconversiones que ocurren en ciertas condiciones del ambiente (modificado de Buchanan y col., 2002).

Los pigmentos son valorados por sus propiedades biológicas, las cuales residen en su estructura química. La familia de los carotenoides ha sido dividida en dos grupos: xantófilas y carotenos [Martínez, 2003]. Son moléculas tetraterpenoides con cuarenta átomos de carbono (C_{40}), que se sintetizan a partir del isopreno (C_5). Los carotenos, en su mayoría, son solubles en solventes apolares [Martínez, 2003; Buchanan y col., 2002 y Ladygin, 2000]. Estos tetraterpenos liposolubles tienen un esqueleto central con dobles enlaces conjugados llamados cromóforos, y en los extremos pueden presentar anillos de seis átomos de carbono. [Sánchez-Millán y col., 2007; Ladygin, 2000].

Dado que los carotenoides tienen importantes funciones en los organismos animales y vegetales, se han identificado la mayoría de las enzimas que participan en la biosíntesis de dichos compuestos [Grotewold, 2006]. La extensa variedad de aplicaciones para *T. erecta* y su alto contenido de luteína, ha hecho de *T. erecta* un modelo ideal para estudiar la carotenogénesis.

En plantas superiores, todos los pasos o etapas en la biosíntesis de carotenoides tienen lugar en los plastidios, no obstante las enzimas responsables están codificadas por genes nucleares

[Aluru y col., 2008]. Los carotenoides se sintetizan a partir del isopreno (C5), se van uniendo y se van obteniendo moléculas distintas con propiedades ópticas diferentes [Buchanan y col. 2002].

La enzimología de la ruta biosintéticas de carotenoides es conocida lo suficiente en eubacterias y en plantas, no obstante la comprensión de los mecanismos regulatorios que intervienen en dichas rutas aún es pobremente entendido [Apel y Block., 2009].

Algunos de los genes clave que participan en la ruta biosintética de carotenoides son: fitoeno sintasa (*Psy*), fitoeno desaturasa (*Psd*), licopeno β -ciclase (*Lcy- β*) y licopeno ϵ -ciclase (*Lcy- ϵ*) (Figura 5). En la primera reacción, la enzima fitoeno sintasa es la responsable de la condensación de dos moléculas de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) para producir fitoeno (el primer carotenoide de la ruta desprovisto de color); La segunda enzima (*Pds*) realiza desaturaciones en el fitoeno, lo cual permite la formación del licopeno; Las enzimas licopeno ϵ -ciclase y licopeno β -ciclase y pueden redireccionar la ruta hacia la biosíntesis de luteína o de β -caroteno respectivamente [Ladygin, 2000].

El interés de este trabajo fue enfocado al gen *lcy- β* que codifica para la enzima licopeno β -ciclase, con la perspectiva de caracterizar la respuesta celular en una posible sobreexpresión de este gen mediante manipulación genética.

2.6) LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN PLANTAS

Durante la “Revolución Verde”, usando técnicas tradicionales de autopolinización y polinización cruzada, fue posible seleccionar especies vegetales de alta productividad: con mejor crecimiento, valor nutricional, producción de semillas y frutos de mejor calidad que las variedades silvestres, con las cuales se revertió la deficiencia de alimentos que se presentó antes de los años sesenta del siglo pasado. No obstante, la biotecnología vegetal es una alternativa viable para seguir incrementando la productividad de las variedades vegetales que están cerca de sus límites biológicos y físicos de productividad, dados por su genética [Calva, 2005].

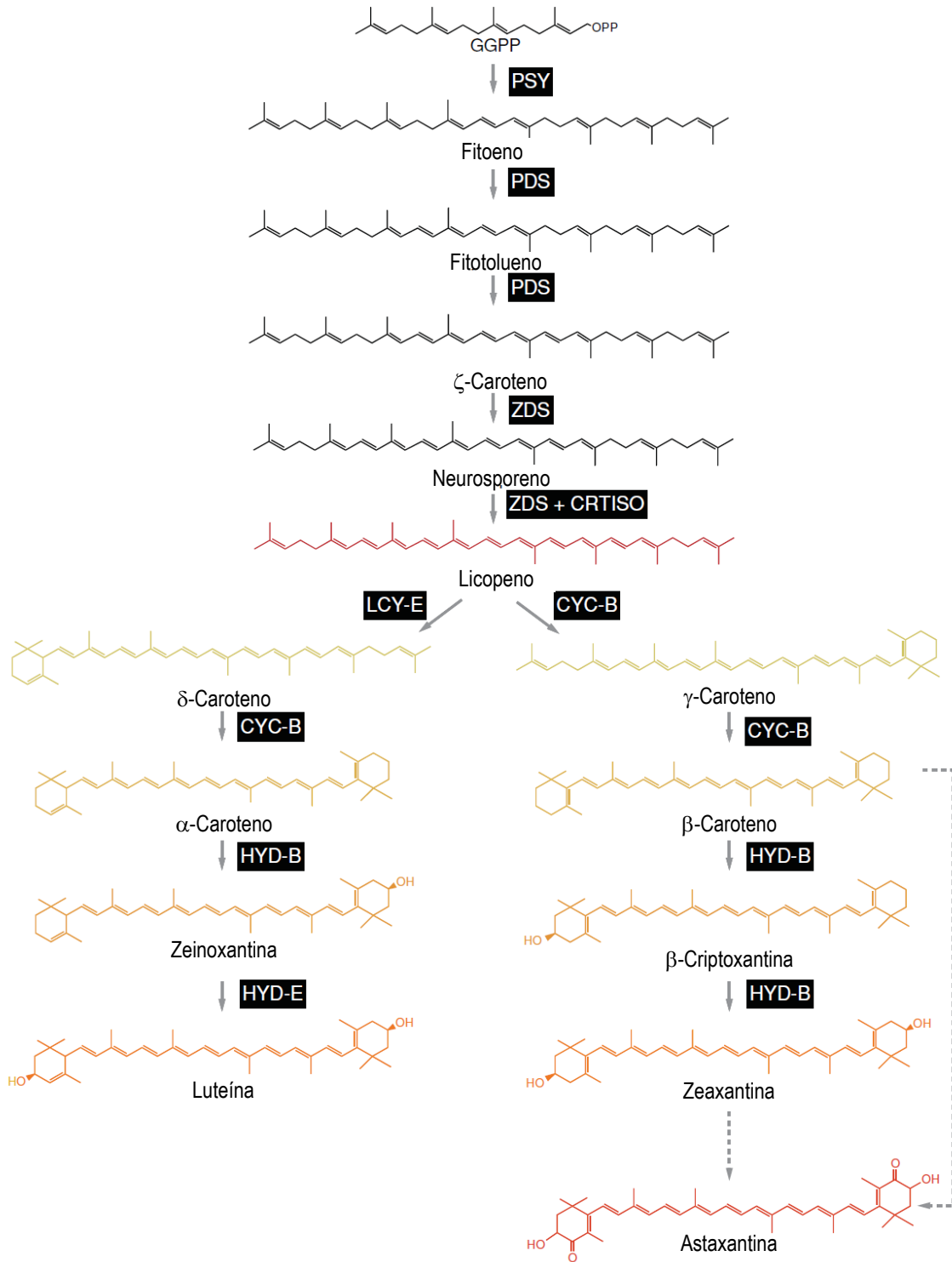


Figura 5. Representación de la ruta biosintética de los carotenoides. Se muestran en los recuadros negros las enzimas que catalizan cada reacción, mientras que los colores asemejan el color de cada pigmento. Las enzimas en los recuadros negros son: PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; ZDS, ζ-caroteno desaturasa; CYC-B, licopeno β-ciclasa; LCY-E, licopeno ε-ciclasa; HYDB-B y HYD-E son hidroxilasas de anillos β y ε respectivamente. (Modificado de Groteworld, 2006).

Actualmente, el cultivo de tejidos es empleado en casi todos los sistemas prácticos de transformación, para alcanzar una eficiencia viable de transferencia de genes, de selección y de regeneración de transformantes [Birch, 1997]. Las plantas transgénicas se han generado a partir de células vegetales a las que se les ha introducido genes nativos de especies de microorganismos, animales, u otras especies vegetales completamente diferentes y genéticamente incompatibles. La introducción de estos transgenes, no sería posible usando los métodos de hibridación tradicional. Estos transgenes pueden proporcionar a la planta características y capacidades nuevas, por ejemplo mayor crecimiento, rendimiento y productividad, mejores frutos y semillas, resistencia a factores bióticos (plagas y enfermedades) y tolerancia a factores abióticos (calor, frío, sequía y salinidad) [Calva, 2005].

La recuperación u obtención de plantas transformadas genéticamente, depende de la eficiencia o frecuencia de introducción de los transgenes a las células vegetales, y de la capacidad de estas para regenerarse en los sistemas de cultivo *in vitro* [Miranda, 1999].

2.7) MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Existen varios métodos de transformación, los métodos biológicos (como *Agrobacterium*) y los métodos físicos o directos (como la electroporación en bacterias, la microinyección para células animales y la biobalística que se emplea para células vegetales y animales) [Sharma y col., 2005].

El primer reporte de transformación genética de plantas data de 1984, donde se expresó un gen bacteriano en *N. tabacum* por medio de *A. tumefasceins* [Birch, 1997]. Eventualmente, se desarrollaron métodos alternativos para introducir genes foráneos en diferentes especies vegetales. Una característica común en estos métodos, es que el DNA foráneo debe atravesar diferentes barreras: tiene que entrar a la célula vegetal atravesando la pared celular y la membrana plasmática, posteriormente debe llegar al núcleo para integrarse con los cromosomas residentes. Los métodos más comunes para la transformación de plantas son: 1)

el uso de bacterias del suelo y 2) la biobalística con partículas cubiertas de DNA foráneo (figura 6). El primer inciso se refiere al método biológico, en el cual se emplean bacterias *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* [Calva, 2005]. En el segundo caso, se emplea un método directo o físico en el cual se emplean micropartículas o microproyectiles para integrar DNA foráneo a las células blanco.

2.8) TRANSFORMACIÓN POR BIOBALÍSTICA

La biobalística es una técnica que permite la transferencia de genes foráneos a células vegetales [Martínez, 2004; Chávez y col., 2002; Finer y col., 1992] tanto para expresión genética transitoria como para la transformación estable [Martínez, 2004; Finer y col., 1992].

La pistola de genes, fue desarrollada por Sanford y colaboradores en 1993 como una necesidad para transformar especies de plantas originalmente recalcitrantes a la transformación por *Agrobacterium*, incluyendo los cereales de impacto económico [Martínez y col., 2004].

La transformación genética por biobalística emplea partículas microscópicas denominadas microproyectiles o micro-acarreadores, que pueden ser de metales como platino, oro o tungsteno (0.4 a 2.0 μm de diámetro) y que se recubren con el material genético o transgenes de interés. Las partículas se aceleran a altas velocidades y se impulsan al interior de las células blanco, en un sistema llamado “pistola de genes” [Martínez, 2004; Chávez y col., 2002 y Finer y col., 1992]. En detalle, estos microproyectiles son acelerados mediante macro-acarreadores de polietileno o de nylon (cilíndricos o de disco), que a su vez son impulsadas por una onda de choque causada por una explosión o expansión de gas (helio el más común) a alta presión. Así, en una cámara con vacío parcial se evita la desaceleración de los micro-acarreadores como consecuencia de la fricción con el aire.

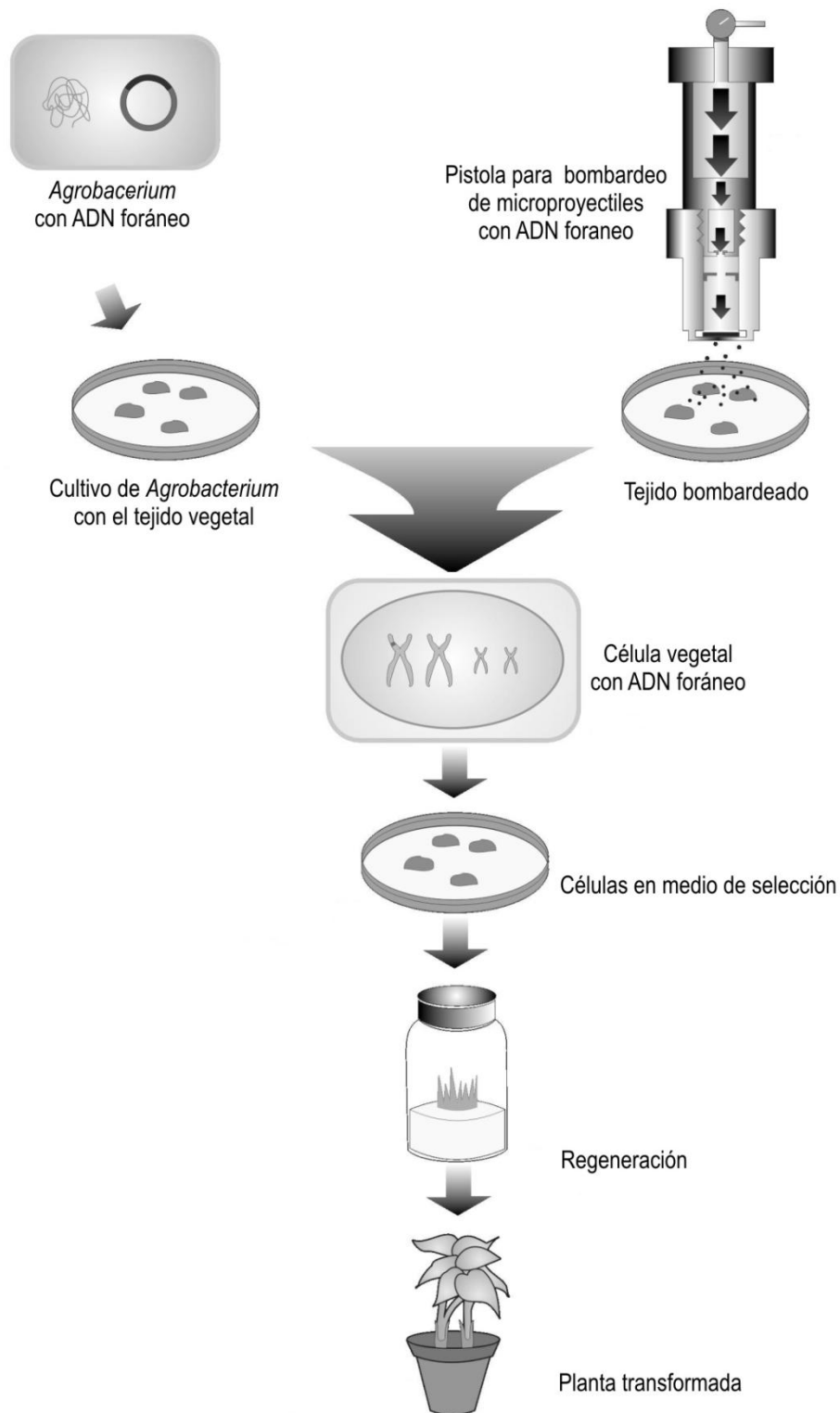


Figura 6. Transformación de plantas por los métodos de *Agrobacterium* y biobalística. La principal diferencia entre ambos métodos radica en la forma de introducir los genes foráneos al interior de las células vegetales. *Agrobacterium* requiere una herida en el tejido vegetal para poder transferir el DNA foráneo durante la incubación del cultivo. El método por biobalística precisa un dispositivo especial que sirve para disparar partículas recubiertas con DNA foráneo (transgenes). La selección de las células transformadas y la regeneración hasta plantas completas usan esencialmente las mismas técnicas en ambos casos (Modificado de Martínez y col., 2004).

Finalmente estos micro-acarreadores de transgenes son colocados los tejidos blanco. En el momento del bombardeo (disparo de “la pistola de genes”), el gas se deja pasar a una presión dada por una membrana o filtro que impulsa las partículas cubiertas con el DNA hacia los tejidos blanco. El impacto de las partículas sobre el tejido presenta un patrón circular de uno a varios centímetros dependiendo de la distancia a la que se coloca el tejido blanco [Taylor y Fauquet, 2002; Finer y col., 1992].

Aunque en la mayoría de reportes sobre bombardeo emplean un mismo concepto básico para la aceleración de los microproyectiles, existen variantes donde estas micropartículas son impulsados mediante nitrógeno, CO₂, aire comprimido o descarga eléctrica [McCabe y Christov, 1993; Chávez y col., 2002].

Cabe mencionar que la transformación genética por bombardeo de micropartículas tiene ventajas sobre la transformación mediante *Agrobacterium*: en la biobalística pueden ser utilizados una amplia variedad de tipos de explantes, ofrece la posibilidad de transformar células de plantas monocotiledóneas como el arroz (*Oryza Sativa*) así como células de plantas dicotiledóneas como el cempaxúchil (*Tagetes erecta*). Los hospederos de *Agrobacterium* se limitan a células de plantas monocotiledóneas [Birch, 1997].

La transformación por biobalística fue usado inicialmente en plantas de *Nicotiana tabacum* para introducir un plásmido con el gen 16s ribosomal como marcador de selección y la proteína ribosomal RPS [Svab y col., 1990]. En la literatura se reporta un gran número de diversas especies de plantas han sido transformadas por el método de bombardeo, incluyendo al maíz y la caña de azúcar. Esta técnica se considera la más eficiente después de *A. tumefaciens* [Gordon-Kamm y col., 1990]. En gramíneas como arroz, avena, caña de azúcar, cebada, maíz, trigo y sorgo, se han obtenido transformantes estables a partir de callos, que expresan los genes de selección *nptII* (gen de resistencia a kanamicina) y *bar* (gen de resistencia al herbicida fosfinotricina) y los genes reporteros *gusA* o *uidA* (gen que codifica para la enzima β-glucuronidasa) y *gfp* (gen que codifica una proteína verde fluorescente), utilizando promotores específicos para monocotiledóneas, comprobándose la integración y expresión de los genes a través de PCR, Southern blot, Western blot y RT-PCR [Richards y col., 2001; Vain y col., 1993; Vallejos y col., 1992].

La tecnología de la biobalística precisa de condiciones definidas para la transformación de cada especie vegetal, dichas variables se refieren a la presión y a la distancia de bombardeo de las células blanco. Para definir estas condiciones se hacen ensayos de expresión transitoria con el gen *uidA* [Ramos, 2009; Orbe, 2009; Vanegas, 2003; Chávez y col., 2002].

2.8.1) EXPRESIÓN TRANSITORIA Y LA REACCIÓN DE GUS

En la transformación genética de células vegetales, es habitual incluir genes reporteros y de selección. Los genes de selección codifican para enzimas que inactivan un antibiótico específico, que se adiciona al medio de cultivo. Por lo común se recurre al gen *cat* (cloranfenicol acetiltransferasa), o bien al gen *nptII* (neomicín fofotransferasa) que aporta resistencia a kanamicina, que confiere resistencia a cloranfenicol. Uno de los genes marcadores más comúnmente usados es el gen *nptII*, que confiere resistencia a los antibióticos aminoglicósidos como la kanamicina, neomicina, paramomicina y geneticina, codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II (NPT II), ésta fosforila al antibiótico y lo inactiva. Otro ejemplo es el gen *hpt* que confiere resistencia a higromicina, codifica para la enzima higromicina fosfotransferasa (HPT), la cual cataliza la fosforilación del antibiótico y lo inactiva [Brasileiro y Aragão, 2001].

Respecto a los genes reporteros, estos dan evidencia temprana de las células transformadas. Para tal fin, el gen reportero *gusA* o *uidA* (aislado de *Escherichia coli*) es ampliamente usado en la transformación de plantas y codifica para la enzima β -glucuronidasa (β -D-glucorónido glucunohidrolasa). Esta enzima se caracteriza por la facilidad con que se detecta su expresión en el tejido (reacción de GUS), cataliza la hidrólisis de una amplia variedad de glucurónidos. Sus substratos consisten de D-ácido glucurónico conjugado a través de un enlace β -O-glucosídico [Jefferson, 1989]. En este sistema la enzima cataliza el rompimiento de una amplia variedad de glucurónidos. En presencia del sustrato X-gluc (5-bromo-4 cloro-3 indolil glucuronido) produce un precipitado azul, lo que permite la localización espacial del gen [Brasileiro y Aragão, 2001].

La célula transformada se hace evidente por adquirir un color azul típico, debido a la hidrólisis de los sustratos colorigénicos: p-nitrofenil-glucuronido (PNPG, X-Gluc), el 5-bromo -4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronido (X-Gluc); o fluorogénicos como el 4 metil-umbelliferil-glucuronido (MUG), entre otros. Además, la enzima β -glucuronidasa se mantiene estable en temperaturas altas y resiste fijaciones histoquímicas. La importancia de emplear el gen *uidA* como reportero radica en que la mayoría de los eucariontes, pero especialmente las plantas, tienen actividad endógena despreciable o nula de dicha enzima. Además, su expresión transitoria se hace evidente a las pocas horas de haber transformado las células, lo cual implica que la información genética ha sido introducida al núcleo y que está siendo traducida, sin embargo no es sinónimo de una integración estable en el genoma [Chávez y col., 2002].

2.8.2) MECANISMO DE INTEGRACIÓN DEL DNA EMPLEANDO BIOBALÍSTICA

Durante el bombardeo de partículas, la integración del DNA foráneo en el genoma de la planta ocurre vía recombinación ilegítima. Para explicar este proceso de inserción, existen varios modelos. De manera general se cree que ocurre en dos pasos; primero el DNA foráneo puede experimentar recombinaciones homólogas y ligaciones previas a la inserción al genoma de la planta para crear arreglos del DNA (entre el material genético residente y el introducido), que puede incluir fragmentos de plásmido y copias rotas del cassette de expresión. En la segunda fase los arreglos de DNA son insertados en el genoma de la planta. La integración involucra mecanismos de reparación del DNA nativo y recombinación no homóloga en los sitios de ruptura de la doble cadena en el cromosoma de la planta [Somers y Makarevitch, 2004; Tzfira y col., 2003].

Por otro lado, aún no es claro el proceso de cómo el impacto de las partículas, que pueden no afectar notablemente la morfología celular, si pueden influenciar la viabilidad a largo plazo. Tampoco se sabe con seguridad si los microproyectiles individuales, que llegan hasta la célula y que se detienen en el núcleo provoquen daños celulares. Aún no se ha probado si estos microproyectiles causan fragmentación del DNA genómico al impactar el núcleo [Bridgman y col., 2003].

2.9) VIABILIDAD CELULAR

El término viabilidad es ampliamente usado en el cultivo de células y tejidos vegetales, así como en otros campos de estudio como la microbiología, y en el cultivo de hongos. La viabilidad se puede definir como el porcentaje de células que mantienen las funciones fisiológicas necesarias para vivir o para adaptarse a ciertas condiciones de estrés. Para evaluar la viabilidad en células vegetales, es importante contar con una técnica confiable. Una técnica podría resultar confiable si pudiera aplicarse en muestras pequeñas y que su determinación resulte ágil y cuantitativa (Hassan y col., 2002). La viabilidad en cultivos de células vegetales, generalmente puede ser estimada por citoquímica, mediante tinciones diferenciales que consideran diferencias estructurales y/o metabólicas entre las células vivas y las células muertas. Las técnicas de tinción incluyen el uso de sustancias fluorescentes y no fluorescentes [Evans y Bravo, 1983].

2.10) TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA CITOQUÍMICA

Para una determinación citoquímica, de cualquier sustancia deben cumplirse las siguientes condiciones: 1) la sustancia debe ser inmovilizada en su localización original, 2) la sustancia debe ser identificada por un procedimiento que sea específico para ella o para el grupo químico al cual pertenece [Ruzin, 1999].

El propósito inmediato de la citoquímica es la localización de los diferentes compuestos químicos dentro de la célula. (Bensley R: *“la finalidad de la citoquímica es la de descubrir dentro de los contiguos confines la célula, esa organización tan misteriosa y fugaz que es el secreto de la vida”*). La citoquímica es una técnica aplicada a microscopio, tanto cuantitativa como cualitativa, donde los resultados involucran el estudio y el análisis de los cambios dinámicos en la organización estructural durante los distintos estadios funcionales de la célula. En este sentido es posible establecer el papel que desempeñan los diferentes componentes celulares en los procesos metabólicos de la célula. [De Robertis y De Robertis, 1981].

2.11) MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

En este método, los cortes de un tejido o las células son examinados con luz ultravioleta, cerca del espectro visible y los componentes de interés se reconocen por la fluorescencia que emiten en el espectro visible. Se estudian dos tipos de fluorescencia: 1) Fluorescencia natural o autofluorescencia, que resulta de sustancias halladas normalmente en los tejidos o células. 2) Fluorescencia secundaria, inducida por unión de las sustancias propias de la célula con colorantes fluorescentes, denominados fluorocromos. La fluorescencia proporciona a menudo una información citoquímica específica, ya que algunos componentes del tejido poseen una emisión fluorescente característica. De esta forma se ha elucidado la presencia de sustancias como la vitamina A, entre otras [Ruzin, 1999].

2.12) FLUOROCROMOS CITOQUÍMICOS COMÚNMENTE USADOS PARA CONTRASTE DE NÚCLEO

Existen diferentes tinciones fluorescentes, que han sido exitosamente usadas para localizar organelos tanto en plantas como en animales. Esto depende de la estructura química del fluorocromo así como su naturaleza (hidrofóbica, hidrofílica o planar) y de las propiedades fluorescentes (sensibilidad por pH, fluorescencia dependiente de concentración de calcio y susceptibilidad a la esterasa). Estas características han conducido a su amplio uso en la biología celular [Ruzin, 1999; Duncan y Wilhom, 1990]. En la tabla 2 se describen los principales fluorocromos utilizados en la biología celular para la tinción del núcleo.

El desarrollo de pruebas específicas de fluorescencia aunado a una alta resolución que ha alcanzado la microscopía fotónica, así como mejores equipos para la captura de imágenes (cámaras de alta resolución policromáticas) ha hecho que este campo de estudio de la microscopía adquiera un punto equivalente y competitivo frente a otras microscopias de alta resolución, como la electrónica de transmisión. El rápido desarrollo de nuevas técnicas y fluorocromos, así como mejoras químicas a los existentes, no permite recomendar y utilizar una sola técnica para un solo fin, sino que debe adaptarse a las condiciones particulares de cada sistema que se desea evaluar [Ruzin, 1999; Haugland, 1996; Rost, 1995].

Tabla 2. Algunos reactivos fluorescentes comunes de tinción para núcleo. La dilución es con agua o buffer, la excitación y emisión está dada en nanómetros (Modificado de Ruzin, 1999).

Blanco	Fluorocromo	Dilución	Longitud de onda de Excitación	Longitud de onda de Emisión
DNA de cadena doble	Ioduro de Propidio	1:1000	493 nm verde	630 nm rojo
DNA, RNA de cadena sencilla	Naranja de acridina	1:10	487 nm azul	520 nm rojo
DNA (Adenina / Timina)	DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride)	1:100	358 nm ultravioleta	461nm Azul / blanco

2.13) EL NÚCLEO CELULAR, MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN

El núcleo es un compartimento celular limitado por una cisterna interrumpida por poros, contiene la información genética constituido por el DNA y por los componentes necesarios para la transcripción genética y procesamiento del ARN, y posteriormente para la duplicación del DNA [Vázquez-Nin y col., 2003; Alberts y col., 2004].

Las observaciones del núcleo mediante microscopía óptica dan evidencia de algunas estructuras:

- Envoltura nuclear, la cual es un límite del compartimento celular.
- El nucleolo, se considera la única “fábrica” de ribosomas.
- Grumos de cromatina.
- Un espacio no ocupado por el nucléolo ni por la cromatina, compactada en cuerpos visibles (región intercromatiniana y pericromatiniana).

El compartimiento nuclear no existe en todas la células, sin que esto implique la pérdida de función durante la transcripción y traducción. La ausencia o presencia de núcleo entendido como compartimento es la característica principal que se toma en cuenta para definir grandes grupos de seres vivos pero además permite la especialización metabólica a partir del confinamiento donde se halla el material genético. [Vázquez-Nin y col., 2003; Weiguo, 1994].

Los tipos de estructuras nucleares en los seres vivos eucariontes y su distribución espacial presentan importantes similitudes (plantas animales y hongos). Sin embargo las estructuras nucleares conservadas en la mayoría de los grupos eucariontes son las cisternas que rodean al núcleo (envoltura nuclear), la presencia del nucléolo que contiene diferentes tipos de RNA y la conformación de la cromatina en dos estados: eucromatina y heterocromatina [Vázquez-Nin y col., 2003].

2.13.1) ¿EL NÚCLEO ALBERGA UNA CANTIDAD CONSTANTE DE DNA?

El DNA es el principal componente del núcleo, este lleva la información codificada de una célula a otra y a su vez a otros organismos. El DNA no se encuentra libre en el núcleo sino formando un complejo llamado cromatina. Todos los núcleos de un individuo tienen una cantidad constante de DNA. Esto sugiere que durante la diferenciación de los distintos tejidos somáticos no hay pérdida de información tanto en plantas como animales. Los métodos citofotométricos acoplados a la tinción con el reactivo de Felugen, en núcleos teñidos permite calcular la cantidad de DNA y esto ha demostrado que este es prácticamente constante en los diferentes tejidos. Por ejemplo, en células de hígado el término medio de DNA-Felugen es de 3.16 picogramos. Considerando que un picogramo de DNA equivale a 31 cm de éste y que el contenido total por célula es una sola molécula, pueden calcularse incluso, sobre una base teórica, longitudes en cm de DNA por célula [De Robertis y De Robertis 1981].

Sin embargo, se han modificado diferentes métodos de tinción para observar DNA. Cavalho y col. 2008, utilizó el fluorocromo yoduro de propidio para observar el tamaño del genoma de *Jatropha curcas* variedades “Gonçalo”. En núcleos Go/G1 encontraron que el genoma de *J. curcas* es relativamente pequeño en una proporción similar que en el de arroz.

La técnica de yoduro de propidio permitió establecer en picogramos el tamaño del genoma nuclear de *Jatropha curcas* J var. “Gonçalo”, relativamente más grande respecto a variedades comerciales no tóxicas (dada por la síntesis de compuestos tóxicos como esteres de forbol y curcina). Además, el análisis morfométrico mostró el tamaño de su cariotipo [Cavalho y col., 2008; Menezes y col., 2006; Joubert y col., 1984].

2.13.2) CAMBIOS MORFOLÓGICOS DEL NÚCLEO

La interfase es una etapa del núcleo asociada al metabolismo del DNA, la cual se caracteriza porque los cromosomas no son distinguibles, por consiguiente es un periodo de activa transcripción y duplicación del DNA. Morfológicamente se pueden visualizar cúmulos de cromatina de disposición y tamaño diferencial, dependiendo del estado de compactación del material cromosómico, dicha conformación varía dependiendo el estado de diferenciación celular y el estado citofisiológico. La cromatina que se ve en forma de gránulos o cúmulos, es la cromatina compacta (heterocromatina), mientras que el material no compactado (eucromatina) está compuesta de delgados filamentos que se encuentran por debajo de la resolución del microscopio óptico, por lo tanto son zonas no visibles en el núcleo [Vázquez-Nin y col., 2003].

Fakan y Bernhard, (1971; 1973) demostraron que la zona de síntesis de RNA, es decir, la transcripción de los genes en su RNA se realiza en la eucromatina (la zona del núcleo no visible en el microscopio óptico). Los genes situados en la heterocromatina (zonas visibles en el núcleo) no se expresan, al menos en ese estado citofisiológico [Vázquez-Nin y col., 2003].

Por otro lado, los genes situados en la eucromatina, son potencialmente expresables aunque su transcripción dependerá de reguladores de transcripción, que realizan su función sin promover cambios en la compactación de DNA. En la mayor parte de los núcleos interfásicos de hongos y plantas, la cromatina compacta se distribuye en grupos adosados a la membrana nuclear, rodeando al nucléolo y distribuidos en el nucleoplasma. Esta disposición es la causante de que la región que rodea a los núcleos heterocromáticos sea donde radica exclusivamente la transcripción más activa [Fakan y Bernhard, 1971].

En las plantas, la cromatina compacta se distribuye y adopta dos formas diferentes, la cromocéntrica y la reticulada. La primera es la más frecuente en dicotiledóneas (como el caso de *T. erecta*) mientras que la reticulada es característica de las monocotiledóneas, denotando un aspecto evolutivo en la morfología del núcleo en plantas. La comprobación por microscopía electrónica ha indicado que la arquitectura del núcleo, en especial la disposición de la cromatina compacta no es al azar y está íntimamente asociada a los estados citofisiológicos como la interfase [Vázquez-Nin y col., 2003].

2.13.3) ALGUNAS ESTRUCTURAS ESPECIALES EN EL NÚCLEO: CUERPOS NUCLEARES.

Los cuerpos nucleares son estructuras esferoides de 0.5 micras de diámetro compuestas por fibrillas, gránulos o glóbulos, se han observado en células normales y patológicamente alteradas, siendo mucho más frecuentes en estas últimas, generalmente asociado a enfermedades humanas como las neoplásicas o virales (diferentes tipos de cáncer) donde se ha podido sistematizar varios tipos de cuerpos nucleares tomando en cuenta su tamaño y características morfológicas [Poppof y Stewart, 1968; Krishan y col., 1967]. Estas estructuras están formadas por fibrillas dispuestas en forma circular concéntrica, por fibrillas en remolinos o por fibrillas periféricas y gránulos o glóbulos densos centrales, siendo esto la morfología asociada a los núcleos de las plantas [Vázquez-Nin y col., 2003]. Es probable que las fibrillas y gránulos contengan RNA, ya que existe un contraste positivo con el procedimiento del EDTA [González-Oliver y col., 1997].

En algunas plantas se han descrito cuerpos nucleares compuestos por fibrillas inmersas en sustancias amorfas. Tratamientos con ribonucleasas y proteasas demostraron su naturaleza ribonucleoprotéica [Luck y Lafontaine, 1982]. En las plantas, el papel funcional de estos cuerpos es desconocido. Mientras que en mamíferos se sugiere una posible relación con estados de hiperactividad celular, que concuerda con el aumento del número de los cuerpos nucleares durante la inducción hormonal en animales [Boutdill y col., 1967], sin embargo esto podría suceder también en plantas. En muy pocos tipos celulares normales pueden ser abundantes estas estructuras como en las células parenquimatosas de la planta monocotiledónea *Lacandonia schismatica* en donde se demostró su importancia como un carácter conservado a lo largo de la evolución de esta planta [Jiménez-García, 1992].

2.14) TRATAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES COMO COMPLEMENTO MORFOMÉTRICO Y DE CARACTERIZACIÓN

El tratamiento de imágenes digitales se ha usado para describir y cuantificar los cambios morfométricos en cultivos celulares vegetales *in vitro*.

Para realizar la descripción de cambios en la célula, la microscopía fotónica y electrónica son herramientas de observación que permiten obtener imágenes de estructuras celulares con las cuales se pueden lograr mediciones morfológicas. La microscopía es la principal herramienta de caracterización de materiales biológicos. Las micrografías obtenidas tienen como fin la descripción y cuantificación de las propiedades de los objetos presentes en éstas, a través de los elementos que las componen, su origen y su naturaleza. Es por estas razones que se considera una herramienta útil para determinar características morfológicas de organelos, así como de la célula completa [Sánchez, 2008; Lira, 2002].

El tratamiento digital de imágenes (TDI) también es una herramienta que puede utilizarse para describir y cuantificar los cambios en la morfoestructura en cultivos celulares y sus elementos subcelulares, lo cual contribuye a una mejor comprensión de los organelos en células vegetales *in vitro* [Sánchez, 2008]. El TDI se refiere a un grupo de procedimientos mediante los cuales la información contenida en una imagen digital puede ser manipulada para: recuperarla, optimizarla, mejorar su aspecto visual o resaltar las características estructurales y luego proceder a la cuantificación de los parámetros de interés [Lira, 2002]. El TDI se lleva a cabo por medio de tres etapas fundamentales:

- Adquisición de la imagen: en ésta se obtiene la imagen como objeto de estudio, mediante cámaras, videocámaras o scanner, y frecuentemente se utiliza la ayuda de un interface para lograr la captura de la imagen digital.
- Procesamiento de la imagen: en esta etapa se manipula la imagen, la idea es dejarla en las condiciones que permitan resaltar y abstraer la parte de interés. Aquí se llevan a cabo los procesos de binarización y segmentación de las imágenes, que consisten básicamente en cambiar la imagen primeramente a 8 bits (escala de grises) y posteriormente a una imagen blanco y negro para asignar a cada pixel un valor y así segmentar la porción de interés de la imagen.
- Análisis de la imagen: En esta etapa se hace uso de algún software específico que analice los datos dependientes de las características y límites del objeto, tales como tamaño, forma, regularidad y textura por mencionar algunas.

En CCTV se han empleado herramientas como el tratamiento digital de imágenes con el fin de dar seguimiento a la morfometría de los cultivos de células vegetales, o bien, para estudiar *in vivo* procesos biológicos y posteriormente, caracterizar y cuantificar a través del tiempo dichos fenómenos [Sánchez, 2008]. Esta herramienta complementaria a la microscopía proporciona información cuantitativa de la imagen además de que su implementación no es destructiva y suele ser económica.

2.15) MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO AMBIENTAL

La observación por microscopía permite el reconocimiento de tipos celulares en los tejidos, en este sentido puede emplearse una variante de la microscopía electrónica de barrido (MEB), para el estudio de morfologías y estructuras superficiales. El microscopio electrónico de barrido ambiental (MEB ambiental), es un tipo único de microscopía que empezó a comercializarse en 1989. El MEB ambiental retiene las especificaciones básicas del MEB convencional, tales como la resolución y la profundidad de enfoque. Sin embargo, el MEB ambiental se puede operar a niveles relativamente bajos de vacío (en contraste con el MEB convencional) y no requiere fijación o procesamiento de las muestras, lo cual ha permitido la observación de células y especímenes vivos e hidratados [Danilatos, 2008; Bozzola y col., 1992]. Este tipo de microscopía produce un haz de electrones finamente enfocado, que escanea el aspecto topográfico de la muestra, y las señales que emergen de la interacción del haz-muestra puede ser monitoreado en forma de imágenes, gráficos o grabaciones digitales. [Danilatos, 2008].

3) JUSTIFICACIÓN

El bombardeo de células desdiferenciadas de *T. erecta* con genes carotenogénicos, tiene el potencial de incrementar la biosíntesis de compuestos carotenoides en un sistema de cultivo *in vitro*. Sin embargo el uso de técnicas de transformación directa por biobalística, resulta una herramienta molecular cuyos mecanismos de inserción de genes aún no está totalmente descrito para todos los modelos vegetales donde se desea aplicar. Su aplicación puede producir resultados variables en la eficiencia de transformación, es decir desde una transformación exitosa, probables cambios en el tamaño y forma de la célula, hasta alteraciones celulares en los diferentes organelos. La precisión que se tenga para controlar y predecir la respuesta de un sistema, dependerá en gran medida de la caracterización del sistema. Por lo anterior, caracterizar el material celular de *T. erecta* sometido a bombardeo, mediante herramientas como la microscopía de fluorescencia y MEB tiene la posibilidad de proporcionar conocimiento de la morfología y de la respuesta celular del tejido desdiferenciado de *T. erecta* material “porte bajo”.

4) HIPÓTESIS

El uso de biobalística de baja presión provoca cambios morfológicos en células desdiferenciadas de *T. erecta* material “porte bajo”.

5) OBJETIVOS

General

Analizar cambios estructurales en las células cultivadas *in vitro* de *T. erecta* material “porte bajo”, bombardeados con la construcción pC35S β , mediante biobalística de baja presión.

Particulares

1. Analizar el mapa de restricción de los vectores para el bombardeo.
2. Establecer condiciones de bombardeo para callos de *T. erecta* en cámara baja presión.
3. Evaluar la tolerancia de los callos de *T. erecta* material “porte bajo” al antibiótico kanamicina.
4. Evaluar la viabilidad celular con microscopía de fluorescencia mediante tinciones diferenciales con los fluorocromos PI y DAF.
5. Analizar cambios estructurales en las células de callos bombardeados de *T. erecta* material “porte bajo” a través microscopía de fluorescencia y MEB ambiental.

6) MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 7 se muestra un esquema del desarrollo general del presente trabajo.

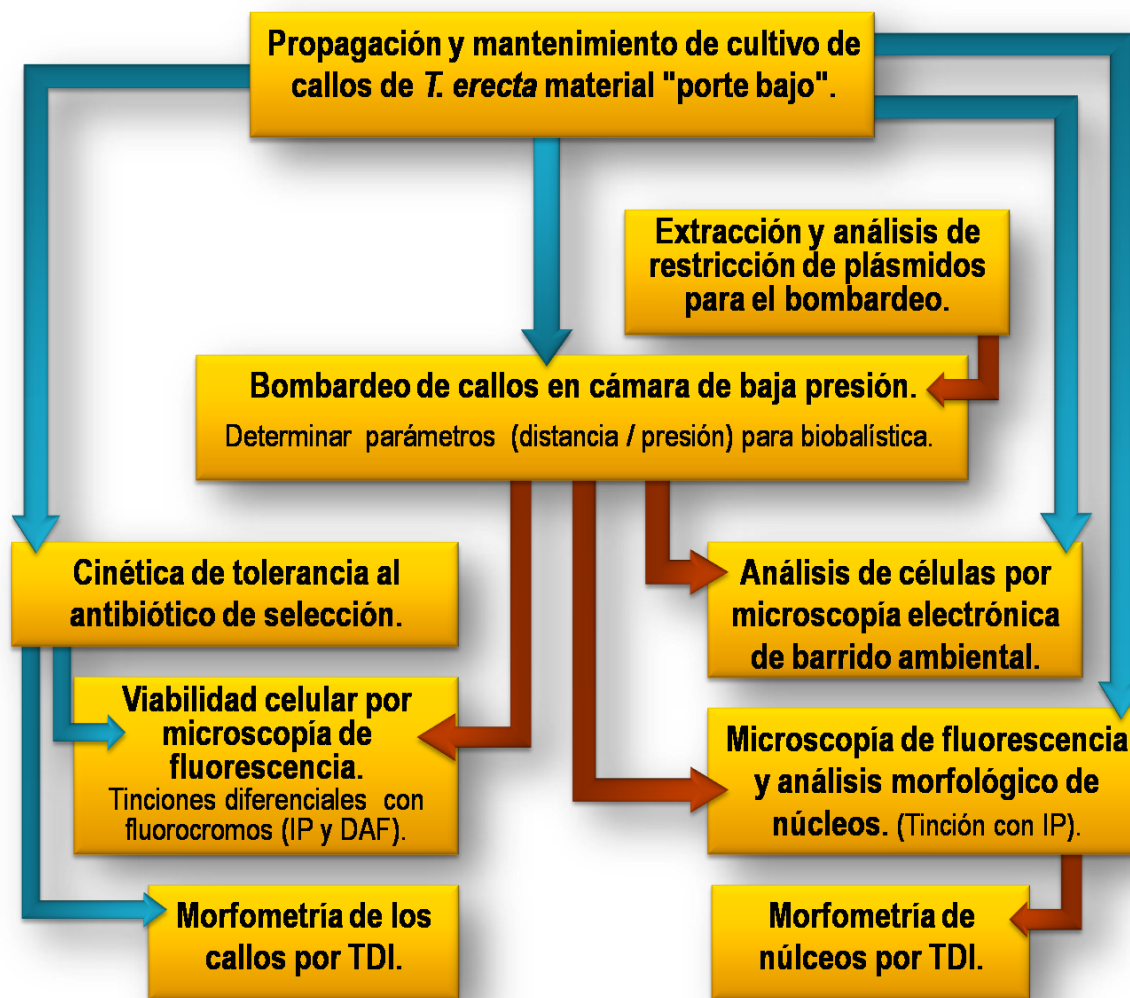


Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología general del trabajo.

6.1) MATERIAL BIOLÓGICO

En el presente trabajo se empleó una línea celular de callos de *T. erecta* y dos plásmidos para introducir DNA en las células desdiferenciadas. En la tabla 3 se muestran las características de estos materiales biológicos.

Tabla 3. Listado y descripción del material biológico usado en este trabajo.

MATERIAL VEGETAL	CARACTERÍSTICAS FENOTIPO/GENOTIPO	REFERENCIA
Callo de <i>Tagetes erecta</i> L. material "porte bajo"	Callo friable, obtenido de plantas y semillas del genotipo experimental de "porte bajo" cosecha 1999, donadas por el Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz de la Universidad Autónoma Chapingo.	Colección del laboratorio.
PLÁSMIDOS		
pBI426	Vector derivado del pUC9. Porta la fusión de los genes <i>uidA::nptII</i> (codificante de la enzima β -glucuronidasa y de la neomicina fosfotransferasa II que otorga resistencia a kanamicina); ambos bajo el control de un promotor doble 35S del virus del mosaico de la coliflor (<i>CaMV</i>) y por el terminador de la nopalino sintasa (<i>Nos</i>) (Figura 8).	Dalta y col., 1991
pC35S β	Plásmido de la serie pCAMBIA 1301. Contiene: <i>nptII</i> (gen de la neomicina fosfotransferasa II) que otorga resistencia a kanamicina, <i>lcy-β</i> (gen codificante de β -Lycopeno ciclasa) regulado por <i>CaMV</i> (promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor) y por <i>Nos</i> (gen terminador de la nopalino sintasa) (Figura 9).	Camacho-Beltrán, 2008.

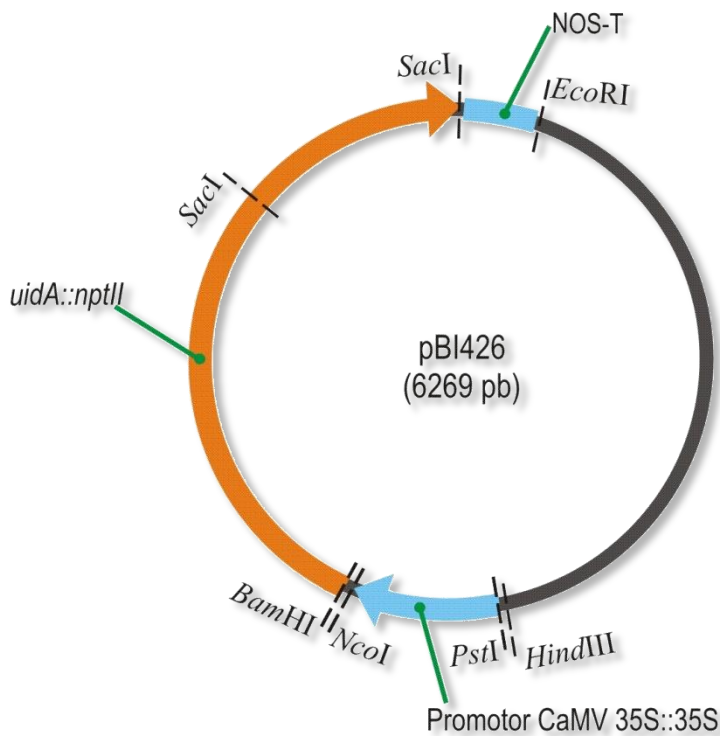


Figura 8. Representación del mapa genético del plásmido pBI426, que tiene un tamaño de 6269 pares de bases.

En este esquema se muestran algunos de sus sitios de restricción (*SacI*, *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *NcoI* y *BamHI*). En la construcción se observa el promotor doble 35S::35S del virus mosaico de la coliflor (CaMV); la fusión de los genes *uidA::nptII* que codifican para β -glucoronidasa (GUS) y neomicina fosfotransferasa respectivamente (NPTII), que confiere resistencia a la kanamicina; y el terminador NOS-T de la nopalino sintasa (Nos ter) (Basado en Ibrahim, 2008).

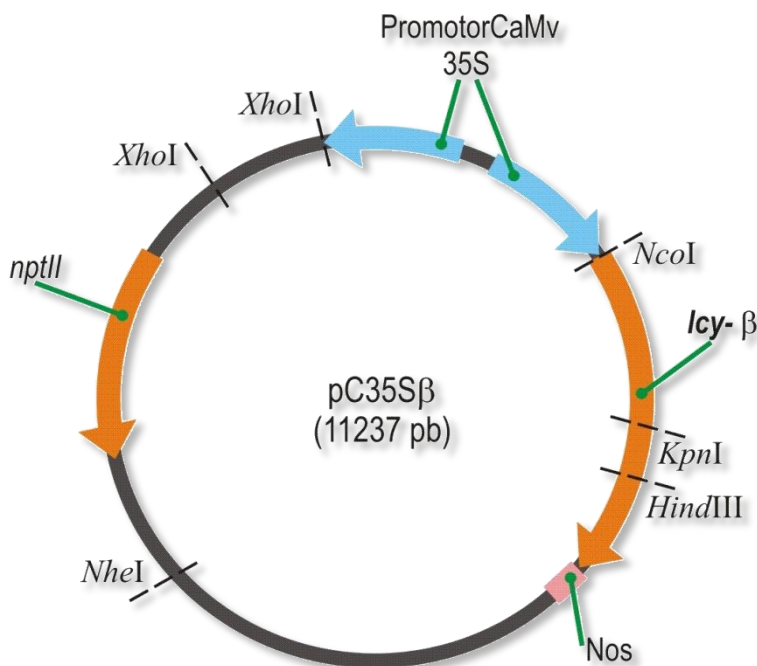


Figura 9. Representación del mapa genético del plásmido pC35S β , que tiene un tamaño de 11237 pares de bases.

Este plásmido contiene el gen *lcy- β* de la ruta de carotenoides, que codifica para la β -Licopeno ciclasa. En la construcción se muestran algunos de sus sitios de restricción (*XhoI*, *NcoI*, *KpnI*, *HindIII*, y *NheI*) y se observan los genes: *nptII* (gen de la neomicina fosfotransferasa II), el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y el terminador Nos (Sinagawa-García y Paredes-López, 2006. comunicación personal).

6.2) CONDICIONES DE CULTIVO

Se empleó una línea celular de callo de *T. erecta* (material “porte bajo”) y para continuar su propagación se realizaron subcultivos cada 15 días. Los callos se mantuvieron en medio semisólido Murashige y Skoog (MS), con reguladores de crecimiento BA (2 mg/L) y 2,4-D (2 mg/L), incubados a 24-26 °C en fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.

Las dos cepas bacterianas de *Escherichia coli*, que contenían el plásmido pBI426 y pC35Sβ, fueron cultivadas en placas de medio Luria Bertani (LB) durante 24 h a 37°C.

6.3) AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO POR LISIS ALCALINA

Se inocularon tubos de ensayo con medio LB líquido, mediante una asada de colonias de la cepa de *E. coli* conteniendo el plásmido pBI426, incubando a 37°C / 200 rpm durante 24 h. Lo mismo se realizó para la cepa de *E. coli* conteniendo el plásmido pC35Sβ. Se centrifugaron los cultivos bacterianos en tubos tipo Eppendorf a 12,000 rpm / 5 min, luego se descartó el sobrenadante, recuperando la pastilla con un residuo de 50 µl de medio LB. La pastilla se resuspendió agitando en vórtex; después se adicionaron 150 µl de la solución Birnboim 1 (Tris 1 M y EDTA 0.5 M) para hinchar las células, se agitó nuevamente en vórtex, añadiendo posteriormente 300 µl de la solución de Birnboim 2 (SDS 0.1% y NaOH 0.2 N) para provocar lisis celular. Se mezcló invirtiendo suavemente, se dejó 5 min en temperatura ambiente y consecutivamente el DNA se precipitó con 225 µl de solución Birnboim 3 (acetato de potasio 3 M) incubando a 4°C / 25 minutos [Sambrock y Rusell 2001; Birnboim y Doly, 1979.].

Ulteriormente se centrifugó 5-10 min/12000 rpm, recuperando y remudando a un tubo nuevo 600-750 µl del sobrenadante (sin incluir la pastilla ni la fase o película superficial). Se añadieron 700 µl de isopropanol al sobrenadante recuperado y se enfrió 15 min / 4°C. Nuevamente se centrifugó 5-10 minutos y se decantó el sobrenadante, la pastilla se lavó con etanol al 70%. Se centrifugó 12000 rpm / 10 min y se decantó el sobrenadante. Finalmente se resuspendió en H₂O destilada estéril [Sambrock y Rusell 2001].

6.4) PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO

EL DNA obtenido de *E. coli* se purificó eliminando el RNA, agregando 2 µl (10 mg/mL) de RNA'sa (Fermentas) a cada tubo con el DNA circular, se incubó a 37°C / 60 min. A continuación se realizó la extracción con un volumen de cloroformo alcohol isoamílico; se centrifugó 10 min / 12 000 rpm y se recuperó la fase acuosa. Después se dejó precipitando 12 h con un décimo de volumen de acetato de potasio 5 M a 4°C. Luego se agregó un volumen de etanol absoluto, mezclando por inversión del tubo, incubando 20°C / 30 min. Ulteriormente se centrifugó 20 min / 7500 rpm y se lavó la pastilla con 100 µl de etanol al 70%. Se retiró el exceso de etanol y dejó secar la pastilla durante 30 min. Finalmente se resuspendió en H₂O destilada estéril. [Sambrock y Russell 2001].

6.5) PREPARACIÓN DE GEL DE AGAROSA PARA ELECTROFORESIS

El DNA aislado y purificado de *E. coli* se observó mediante un análisis electroforético. Se hizo una mezcla homogénea con 0.45 g de agarosa y 30 mL de TAE 1X en un vaso de precipitado, agitando y aplicando calor en microondas. Se vertió la mezcla en un tubo tipo Falcon y se agregó 1.5 µl de bromuro de etidio (1 mg / mL). El contenido del tubo Falcon se vació en el molde para gel de electroforesis y se colocó un peine para formar los pozos de carga [Sambrock y Russell 2001]. Con micropipeta se cargaron 5 µl del DNA aislado, junto con 2 µl de buffer de carga de Fermentas (0.1 µg / µl). Las electroforesis se corrieron entre 70 y 80 voltios durante 45 minutos, el gel se llevó a un transiluminador UV (G-BOX de Syngene) a 300 nm de longitud de onda, para visualizar el DNA plasmídico.

6.6) ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE LOS VECTORES DE TRANSFORMACIÓN

Se realizó la extracción y purificación de DNA plasmídico de pB1426 y pC35Sβ por el método de lisis alcalina (inciso 6.3 y 6.4). Posteriormente se llevó a cabo la caracterización

molecular de estos plásmidos mediante digestiones con enzimas de restricción. Para comprobar la estructura de la construcción pB1426, se realizó un análisis de restricción con las enzimas, *SacI* (Fermentas), *BamHI*, *EcoRI* y *HindIII* (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA). Mientras que, para la construcción pC35S β se realizó el análisis de restricción con las enzimas *NcoI*, *HindIII*, *KpnI*, *NheI* y *XhoI* (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA). Las digestiones se dejaron incubar en termomixer a 37°C / 2 horas. Las digestiones fueron cargadas en gel de agarosa y separadas mediante electroforesis, los patrones de restricción se observaron en transiluminador UV (G-box de Syngene).

6.7) PREPARACIÓN Y PRECIPITACIÓN DE PARTÍCULAS PARA LA BIOBALÍSTICA

Para aplicar el método de transformación por biobalística en callos de *T. erecta*, se prepararon usaron partículas de oro de 1 μm de diámetro (Bio-Rad). Se pesaron 20 mg de partículas de oro y se lavaron en tubo eppendorf con 200 μl de etanol. Se agitaron por vórtex 10 min, para luego sonicarse durante 1 min. Posteriormente se centrifugaron durante 2 min / 12000 rpm, enseguida se desechó el sobrenadante y se lavaron con 200 μL de agua destilada estéril, nuevamente se agitó en vórtex 1 min y se centrifugó por 2 min / 12000 rpm. Finalmente el sobrenadante fue desechado. Este procedimiento se llevó a cabo tres veces consecutivas, por cada 20 mg de partículas de oro. Las partículas se resuspendieron durante 1 min por vórtex en 200 μL de agua destilada estéril. Las partículas estériles se mantuvieron almacenadas en refrigeración. En campana de flujo laminar, se precedió a la precipitación del DNA en las partículas de oro. En tubo tipo Eppendorf se agregaron: 50 μl de las partículas resuspendidas, 20 μl de DNA a una concentración menor a 1 mg/ μl (pBI426 y pC35S β), y de manera simultánea se mezcló con 50 μl de CaCl_2 (2 M) y 20 μl de espermidina (5 M). Una vez mezclado por vórtex durante 1 min, se dejó precipitar 10 min. Se retiró y se desechó 80-110 μl del sobrenadante. Finalmente se tomó una alícuota de 5 mL del precipitado y se colocaron en el filtro para el bombardeo inmediato [Finer y col., 1992].

6.8) TRATAMIENTO OSMÓTICO DE LOS CALLOS

Antes de iniciar los ensayos de biobalística, se colocó un disco de papel filtro estéril (4 cm de diámetro) por caja petri con medio osmótico. Se empleó D-Manitol (0.2 M) como agente osmótico en el medio MS (ver anexo 1). Los callos de *T. erecta* material “porte bajo” fueron dispersados homogéneamente en los discos de papel filtro y se incubaron en el cuarto de cultivo durante 4 h antes del bombardeo. Se ha observado que el medio osmótico incrementa la expresión después de llevar a cabo la biobalística (Van Boxtel y col., 1995).

6.9) BOMBARDEO DE PARTÍCULAS EN CÁMARA DE BAJA PRESIÓN

Para la transformación de callos de *T. erecta* por el método de biobalística se utilizó una cámara de bombardeo con aceleración de partículas de baja presión. Las partículas fueron aceleradas mediante gas helio [Sanford y col., 1993]. Los bombardeos de partículas se llevaron a cabo en campana de flujo laminar. Los filtros (macro-acarreadores) donde se coloca el precipitado de partículas (micro-acarreadores), fueron lavados con etanol absoluto y esterilizado en autoclave a una presión de 1.2 kg/cm^2 durante 15 minutos. Ulteriormente se colocaron los callos de *T. erecta* dispersados en el disco de papel filtro dentro de la cámara de bombardeo. Se cerró la puerta de esta y se encendió la bomba de vacío. La válvula de control se cerró hasta que el indicador alcanzó en los 24 mm de mercurio (figura 10). Finalmente se accionó el interruptor de disparo. Se eliminó el vacío de la cámara apagando la bomba y abriendo la válvula de entrada de aire. Se retiraron los callos de la cámara.

Se evaluó la respuesta del callo con PBI426 usando 3 distancias (8.5cm, 11.5cm y 14.5 cm) y tres presiones (60 psi, 80 psi y 100 psi) mediante expresión transitoria de la β -glucuronidasa (foci o puntos azules).

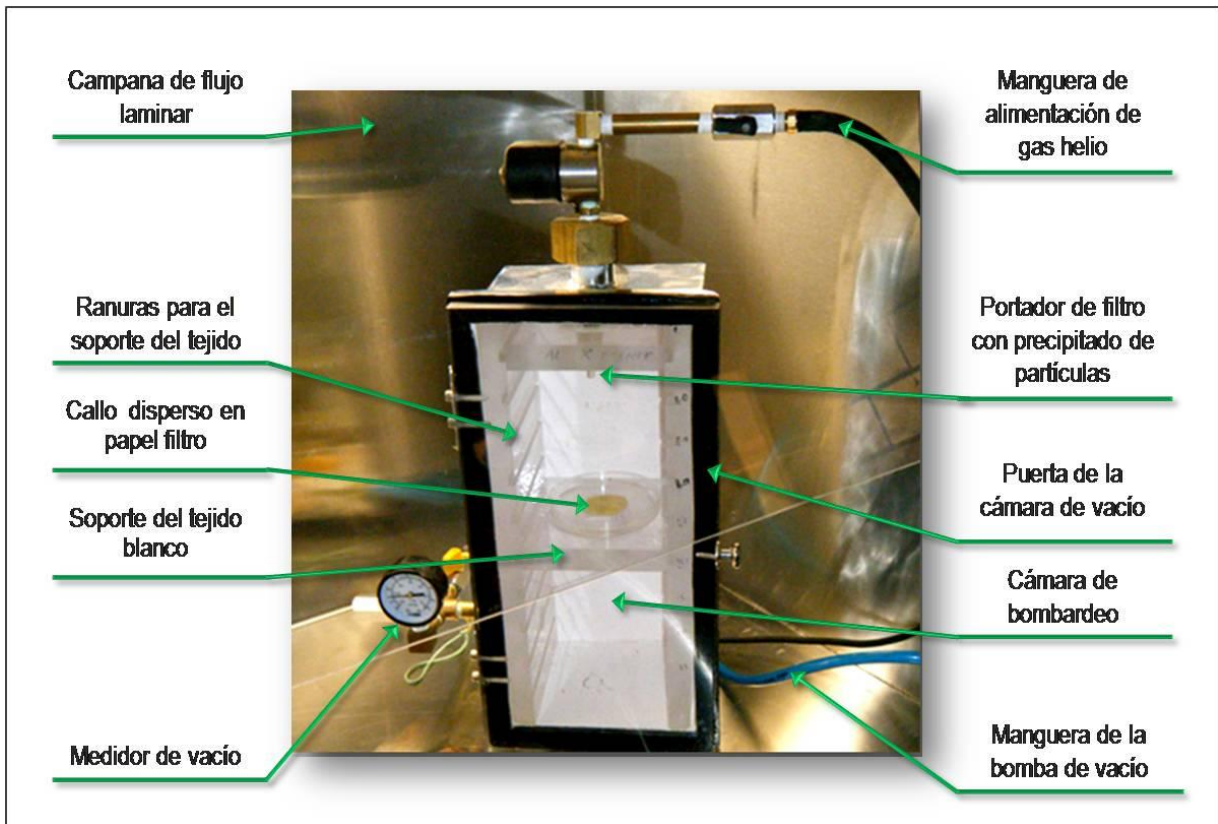


Figura 10. Descripción de las partes de la cámara de bombardeo de baja presión empleada en este trabajo. Las ranuras para el soporte del tejido permiten cambiar las distancias del bombardeo. El interruptor de disparo (no mostrado) se encuentra fuera de la campana de flujo laminar.

6.10) ENSAYOS DE EXPRESIÓN TRANSITORIA Y LOCALIZACIÓN HISTOQUÍMICA DE FOCI POR EXPRESIÓN DE LA ENZIMA β -glucuronidasa

La expresión del gen *uidA* (que codifica para la enzima β -glucuronidasa) se analizó mediante localización histoquímica [Jefferson, 1987]. Las células que expresan *uidA* evidencian un fenotipo azul, a causa de la precipitación del compuesto 2-cloro dibromoíndigo. Lo cual permitió distinguir las células posiblemente transformadas. La presencia de dichos puntos azules o foci, se consideraron como respuesta positiva a las condiciones de bombardeo empleadas. En cajas petri, se colocaron los callos bombardeados con pBI426 y se adicionaron 5 mL de buffer de reacción que contenía el sustrato X-Gluc (10 mM) (ver anexo 3). Los

callos se dejaron incubar a 37°C / 24 h en oscuridad. [Jefferson, 1987]. La solución de revelado se retiró posteriormente. Los callos se disgregaron en una caja petri para cuantificar foci, se hicieron observaciones de 80 cuadrantes en microscopio óptico con aumento de 20 X. El conteo por cada muestra se repitió 3 veces y se obtuvo el promedio. Los ensayos se hicieron con la combinación de tres presiones: (60, 80 y 100 psi) con tres distancias (8.5, 11.5 y 14.5 cm). Cada ensayo de bombardeo se realizó tres veces.

6.11) CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS CALLOS POR TDI; EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO EN DOS DIMENSIONES DE CALLOS DE *T. erecta* MATERIAL “PORTE BAJO” EN CINCO TRATAMIENTOS DE KANAMICINA

Se evaluó la tolerancia del callo al antibiótico, en relación a su crecimiento en el transcurso de 26 días para determinar la concentración de selección en los callos bombardeados. La cinética se inició con callos de tamaño similar y del mismo peso (0.2 g) distribuidos en un área uniforme de 1 cm². Mediante TDI se caracterizó el crecimiento de los callos en 5 tratamientos con el antibiótico kanamicina. (100, 200, 300, 600 y 1000 µg de kanamicina / litro de medio MS). Se tomaron registros fotográficos en 5 tiempos a lo largo de 26 días de incubación; al inicio del cultivo, al término del mismo y tres puntos intermedios entre el inicio y terminación del cultivo (días 8, 12, 18, 21 y 26). De estos ensayos se capturaron imágenes digitales de tamaño 4000 X 3000 Pixeles en formato “bmp” (Bitmap Image File) de la masa del callo en desarrollo mediante una cámara digital SONY DSC-W210 (12.1 MPx, USA).

La segmentación de las imágenes digitales de los callos se realizó con el software ImageJ (versión 4.440). Las imágenes fueron binarizadas mediante la herramienta “Threshold Color” con los valores de “*HUE*” (de 6-255 hasta 60-255); con “*saturation*” (de 55-255 hasta 0-255) y “*Brigthness*” (de 50-255 hasta 180-255) (figura 11). Posteriormente se utilizó la herramienta “*Analyze particles*” para segmentar los callos del fondo de la imagen. Finalmente, el valor de área, perímetro, longitud máxima y circularidad de las áreas proyectadas de cada uno de los callos se obtuvo seleccionando con la herramienta “*Wand tracing tool*” las secciones binarizadas y la herramienta “*Measure*”. De los datos registrados, se obtuvieron matrices para

los parámetros área, perímetro, longitud máxima y circularidad de los 5 tiempos: del cultivo (día inicial, tiempo intermedio y día final del cultivo).

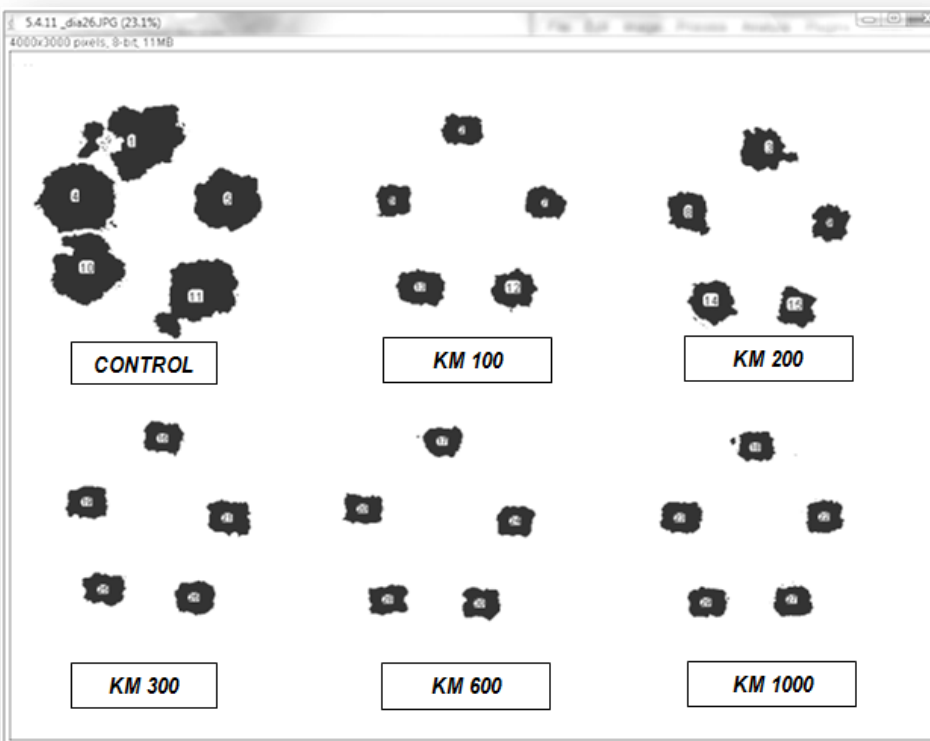


Figura 11. Ejemplo del resultado de la binarización y segmentación, realizada por tratamiento digital de las imágenes de los callos con Image J.

Esta corresponde al día 26 después de la resiembra mostrando el testigo o control frente a los cinco tratamientos de kanamicina.

6.12) TINCIÓN CON FLUOROCROMOS Y DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD DE CÉLULAS DESDIFERENCIADAS DE *T. erecta*

Para la evaluación de la viabilidad celular se utilizó la técnica de tinción por fluorescencia, con los fluorocromos diacetato de fluoresceína (DAF) y yoduro de propidio (IP) de Sigma. Para la elaboración de estos se pesaron 5 mg de DAF disueltos en 1 mL de acetona; mientras que 1 mg de PI fue disuelto en 25 mL de buffer salino de Dulbeco (DPBS) [Dulbeco y Vogt, 1953]. Dichas soluciones se almacenaron en obscuridad y en refrigeración a 4°C. El fluorocromo IP se almaceno en alícuotas de 1.5 mL, en tubos tipo Eppendorf. Después se elaboró una mezcla con 500 µl de MS líquido, 100µL del stock de IP y 25 µl del stock de DAF.

A partir de la cinética de sensibilidad al antibiótico kanamicina, se eligieron 3 momentos del cultivo para evaluar la viabilidad celular. Los días elegidos fueron 12, 21 y 26 (al inicio, un punto intermedio y al final del cultivo). Para determinar el porcentaje de viabilidad celular se utilizó la fórmula: células vivas / células Vivas + células muertas X 100. Se hicieron 3 repeticiones de viabilidad celular por día, con 30-50 células totales observadas por repetición para todos los tratamientos (100, 200, 300, 600 y 1000 µg de Kanamicina / litro de medio MS).

Se prepararon muestras con 150 µL de células en suspensión colocadas en portaobjetos para ser mezcladas con 25 µL de la solución preparada de MS con los fluorocromos. Estos se dejaron incubar en una cámara oscura por 6 minutos. Para finalmente observar la muestra bajo el microscopio óptico con luz fluorescente en el rango de excitación de los 510 a 560 nm para identificar el fluorocromo IP (color rojo) y de 420 a 490 nm el fluorocromo DAF (color verde). El IP se utilizó para la identificación del núcleo en las células muertas, mientras que el DAF se utilizó para diferenciar a las células vivas dado que las células muertas no poseen actividad esterasa, enzima necesaria para la activación fluorescente del fluorocromo DAF. Las observaciones se realizaron en microscopio óptico (Nikon Eclipse 80i) acoplado a una cámara (MTI 3CCD).

6.13) TINCIÓN DE NÚCLEOS DE CALLO DE *T. erecta* BOMBARDEADOS Y NO BOMBARDEADOS CON IODURO DE PROPIDIO

Se utilizó y se modificó el protocolo de tinción de núcleos reportada por Jones y Kniss, 1987, para potenciar la fluorescencia y para disgregar las células observadas en microscopio. Se diseñaron pequeñas bolsas de orzaga (tela de nylon fino) de 0.7 cm de diámetro y 3 cm de largo, las cuales se usaron para filtrar células de callo. En un tubo tipo Eppendorf de 2 mL se introdujo una capsula o bolsa de orgaza, se colocó una cantidad moderada de callo (aproximadamente ¼ de la capacidad del volumen del tubo). Se lavaron las células dos veces con 600 µl de DPBS [Dulbeco y Vogt, 1953], después de 1 minuto se tomaron 400 µl de las células que están en suspensión fuera de la bolsa de orgaza, y se colocaron en un tubo nuevo con orgaza. Se agregaron 150 µl de ioduro de propidio (1mg/50 mL DPBS) y se incubó en

obscuridad durante 5 min. Se introdujo una micropipeta para tomar y desechar 100 µl de la parte superior de la solución y se agregó 500 µl de DPBS para lavar el exceso de IP. Se observaron las células en fluorescencia, mediante un microscopio óptico de Nikon (Eclipse 80i) acoplado a una cámara (MTI 3CCD) y usando el software “MetaMorph” (versión 6.1r0).

6.14) CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA POR TDI DE LOS NÚCLEOS DE CALLOS BOMBARDEADOS

Las micrografías de núcleos observadas en microscopía de fluorescencia, adquiridas con el software “MetaMorph” (versión 6.1r0), con una resolución de 640 X 480 pixeles, fueron tratadas digitalmente con el software ImageJ (versión 4.440). Se capturaron de 30 a 40 imágenes de núcleos en 4 tiempos (días 1, 10, 16 y 22) durante el desarrollo del cultivo de los callos bombardeados y sin bombardear de *T. erecta* material “porte bajo”. Éstas micrografías fueron transformadas a escala de grises con la función “8 bit”, después se segmentaron manualmente las imágenes de los núcleos con la herramienta “Threshold” en un intervalo de 20/255 hasta 70/255. Ulteriormente, se eliminaron los artefactos de las imágenes binarizadas aplicando el filtro “Median”. Para obtener los parámetros morfológicos de área, perímetro, longitud máxima y circularidad de los núcleos binarizados, se empleó la herramienta “Wand tracing tool” y “Measure”.

6.15) MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO AMBIENTAL

La MEB ambiental se realizó con un microscopio electrónico de barrido ambiental de Philips, modelo XL30 (del Instituto Mexicano del Petróleo). El equipo se empleó con las siguientes características o condiciones: formación de imágenes por electrones secundarios o retrodispersados, resolución en modo ambiental (3.5 nm), filamento de tungsteno, presión de trabajo en modo ambiental (0.9 mmHg) y análisis químico elemental por EDS. La micrografías se tomaron de callos de *T. erecta* material “porte bajo” bombardeados y no bombardeados, con aumentos de 150X, 300X, 500X y 100X.

7) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1) ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DEL VECTOR pBI426

El vector pBI426 que se utilizó para evaluar la respuesta del callo a los parámetros de distancia y presión en el sistema de transformación, tiene un tamaño de 6269 pb (figura 8). Para comprobar su tamaño y estructura antes del bombardeo para la expresión transitoria, se realizó un análisis de restricción. Se corrió una electroforesis en gel de las digestiones para separar las bandas de DNA. En los resultados del análisis de restricción de la figura 12 se muestra la presencia de las bandas características del DNA. Las digestiones dobles *Bam*HI / *Eco*RI y *Eco*RI / *Hind*III de los carriles 3 y 4 respectivamente liberaron los fragmentos esperados de 3273+2996 pb y 3634 pb + 2,635 (Tabla 4), según el mapa de restricción.

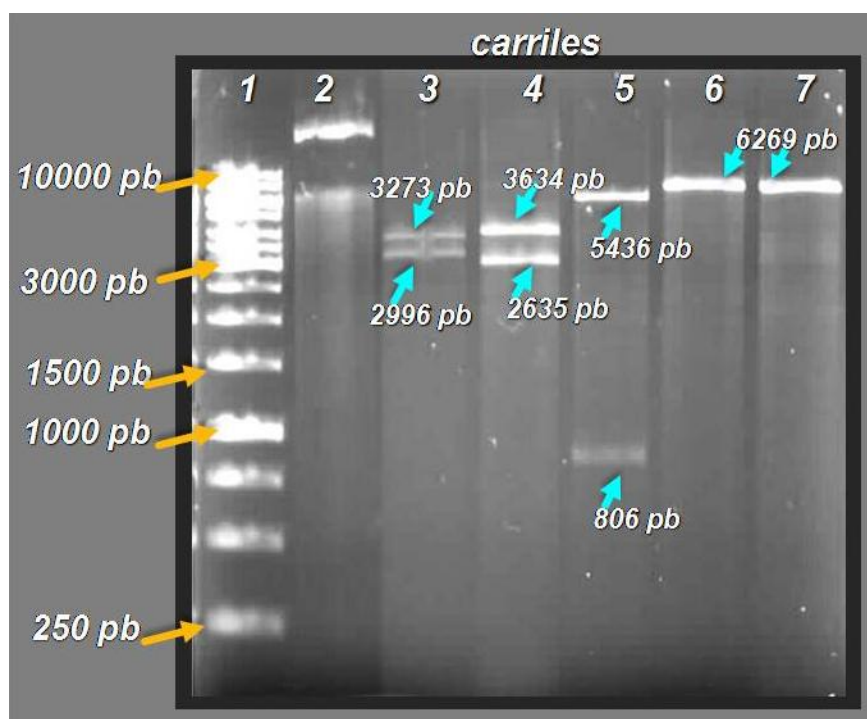


Figura 12: Fotografía de gel de agarosa donde se observan las bandas de DNA como resultado del análisis de restricción del vector pBI426. Las enzimas de restricción que se usaron fueron *Bam*HI, *Sac*I, *Eco*RI y *Hind*III.

En el carril 5 se observó la liberación de dos fragmentos: 5436 pb y 806 pb que corresponden a los dos sitios de digestión de la enzima *SacI*, lo cual confirma la estructura genética. La suma de estos dos fragmentos (5436 pb y 806 pb) coincide con el tamaño de vector (6269 pb). En los carriles 6 y 7 se indican las digestiones de sitio único con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* respectivamente, las bandas corresponden con la linearización esperada por corte de sitio único (figura 12).

Tabla 4. Fragmentos esperados del vector pBI426 por la digestión con enzimas de restricción.

# carril	DIGESTIÓN CON ENZIMAS	FRAGMENTOS (pares de bases)
1	Marcador de peso molecular (1 kb)	
2	DNA Control	
3	<i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>	3,273 + 2,996 pb
4	<i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i>	2,635 + 3,634 pb
5	<i>SacI</i>	5,463 + 806 pb
6	<i>BamHI</i>	6,269 pb
7	<i>EcoRI</i>	6,269 pb

7.2) ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DEL VECTOR PC35S β

Una vez que se comprobó la estructura del vector pBI426, este se utilizó para establecer las condiciones de distancia/presión para la biobalística, las cuales se emplearon para bombardear posteriormente con el vector pC35S β que lleva el gen *lcy- β* . Para introducir el gen que codifica para la enzima licopeno- β ciclasa en callos de *T. erecta* material “porte bajo”, se procedió a la comprobación de su estructura por análisis de restricción. El plásmido pC35S β tiene un tamaño de 11237 pb (figura 9) y de acuerdo a su mapa de restricción, se eligieron las enzimas de *NcoI*, *Hind III*, *KpnI*, *Nhe* y *XhoI*.

Se corrió una electroforesis del gel con las digestiones: *XhoI*, *NcoI* / *Hind III*, *KpnI* / *Nhe*, y *XhoI* / *NcoI* (Figura 13). Como representación de lo dicho, la digestión doble *XhoI* / *NcoI* mostró la presencia de 3 bandas de DNA con el tamaño de los fragmentos esperados 8358 pb, 1094 pb y 1842 pb (Tabla 5, carril 6 y Figura 11, carril 6), que en sumatoria verifican el tamaño del plásmido que tiene 11237 pb.

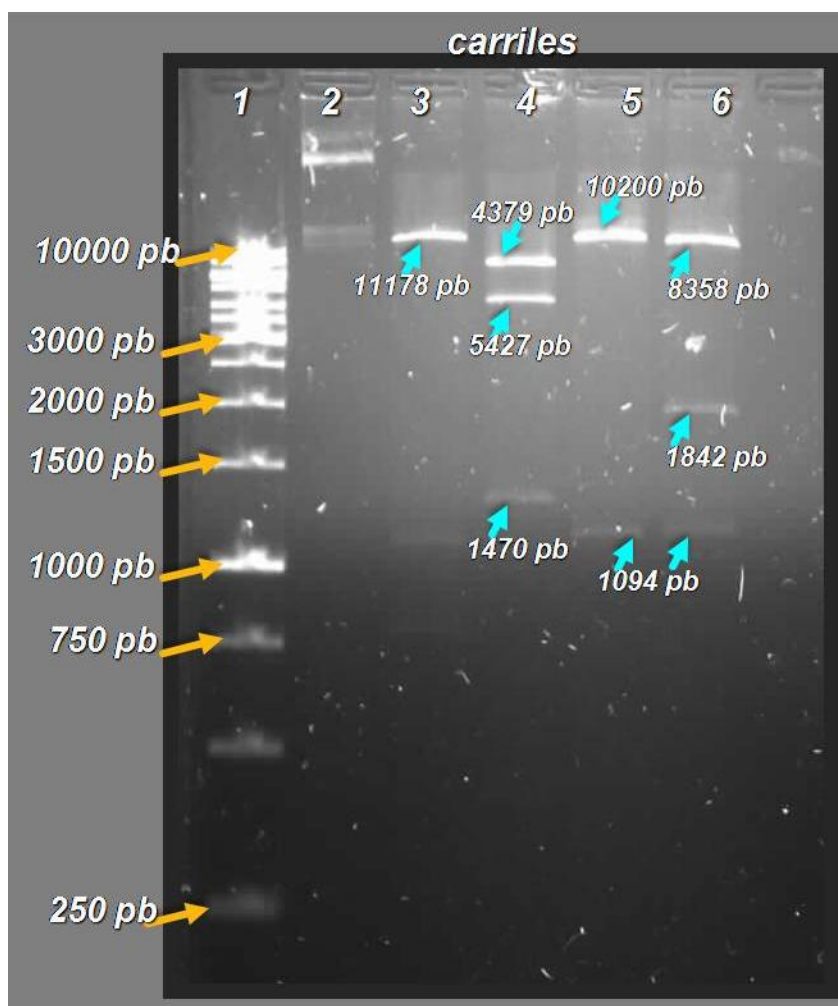


Figura 13: Fotografía de gel de agarosa donde se observan las digestiones del DNA plasmídico pC35S β . Las enzimas de restricción empleadas fueron *NcoI*, *Hind III*, *KpnI*, *Nhe* y *XhoI*

Tabla 5. Fragmentos esperados del vector pC35S β por la digestión con enzimas de restricción.

# carril	DIGESTIÓN CON ENZIMAS	FRAGMENTOS (pares de bases)
1	Marcador de peso molecular (1 kb)	
2	DNA Control	
3	<i>NcoI</i> / <i>Hind III</i>	11,178 + 116 pb
4	<i>KpnI</i> / <i>Nhe</i>	5,427 + 4,397 + 1,470
5	<i>XhoI</i>	10,200 + 1,094
6	<i>XhoI</i> / <i>NcoI</i>	8,358 + 1,842 + 1,094

7.3) ANÁLISIS DE LA RESPUESTA AL BOMBARDEO DE PARTÍCULAS EN CÁMARA DE BAJA PRESIÓN EN CALLO DE *T. erecta* material “porte bajo”

En las tablas 6-8 se muestra el promedio de tres ensayos de expresión transitoria de la β -glucuronidasa (precipitados azules o foci). El mayor número de foci se observó en B) con 60 psi con 11.5 cm de distancia de bombardeo (Figura 14), inciso B). Con las condiciones 60 psi/14.5 cm y 60 psi/8.5 cm se observaron valores intermedios de foci respecto a lo observado en 60psi/11.5 cm (Figura 14, inciso A y C).

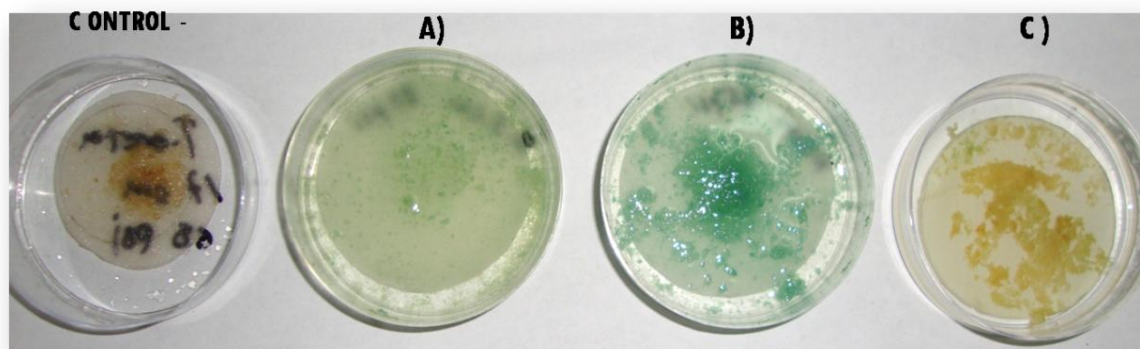


Figura 14. Reacción de GUS después de bombardear los callos de *T. erecta* con presión de 60 psi. El control se hizo con partículas sin DNA. A) bombardeo a 8.5 cm de distancia y 60 psi de presión; B) bombardeo a 11.5 cm de distancia y 60 psi de presión.; C) bombardeo a 14.5 cm de distancia y 60 psi de presión.

Tabla 6. Determinación cuantitativa de foci. por localización histoquímica en células bombardeadas de *T. erecta* material “porte bajo” en 3 distancias con presión de 60psi.

	CONTROL	A)	B)	C)
DISTANCIA (cm)	14.5	8.5	11.5	14.5
PRESIÓN (psi)	60	60	60	60
FOCI	0	124	418	93

Respecto a los callos bombardeados a una presión de 80 psi (Figura 15), se observa que a 14.5 cm de distancia de bombardeo se obtiene una eficiencia de expresión transitoria mas alta

respecto a las distancias 8.5, 11.5 y 14.5 cm de bombardeo. No obstante, la expresión transitoria con presión de 60 psi a 11.5 cm de bombardeo muestra mayor número de foci.

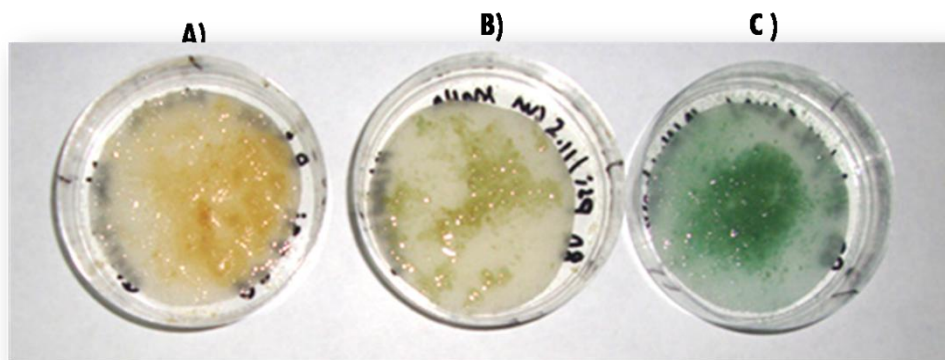


Figura 15. Reacción de GUS después de bombardear los callos de *T. erecta* con presión de 80 psi. A) bombardeo a 8,5 cm de distancia y 80 psi de presión; B) bombardeo a 11,5 cm de distancia y 80 psi de presión.; C) bombardeo a 11,5 cm de distancia y 80 psi de presión.

Tabla 7. Determinación cuantitativa de foci por localización histoquímica en células bombardeadas de *T. erecta* material "porte bajo" en 3 distancias con presión de 80 psi.

	A)	B)	C)
DISTANCIA (cm)	8.5	11.5	14.5
PRESIÓN (psi)	80	80	80
FOCI	29	80	319

Donde se empleó presión de 100 psi (Figura 16 y Tabla 8), la eficiencia de transformación o de expresión transitoria disminuyó notablemente en el sistema de bombardeo utilizado para estos ensayos.

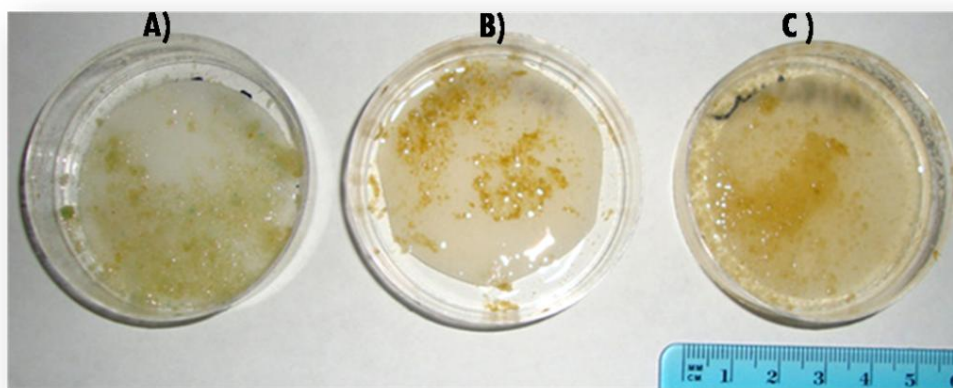


Figura 16. Reacción de GUS después de bombardear los callos de *T. erecta* con presión de 100 psi. A) bombardeo a 8,5 cm de distancia y 100 psi de presión; B) bombardeo a 11,5 cm de distancia y 100 psi de presión.; C) bombardeo a 11,5 cm de distancia y 100 psi de presión.

Tabla 8. Determinación cuantitativa de foci por localización histoquímica en células bombardeadas de *T. erecta* material “porte bajo” en 3 distancias con presión de 100 psi.

	A)	B)	C)
DISTANCIA (cm)	8.5 cm	11.5 cm	14.5 cm
PRESIÓN (psi)	100 psi	100 psi	100 psi
FOCI	23	5	4

De acuerdo con lo analizado en estos ensayos de expresión transitoria, se usaron las condiciones de 60 psi y 11.5 cm para el bombardeo de células desdiferenciadas de *T. erecta* con la construcción pC35S β . La biobalística requiere de un paso posterior denominado selección, donde se utilizan antibióticos. Para ello se hizo una cinética de tolerancia a la kanamicina de los callos.

7.4) TOLERANCIA A LA KANAMICINA DE CALLOS DE *T. erecta* MATERIAL “PORTE BAJO”

En la figura 17 se muestran las fotos más representativas de la cinética de tolerancia al antibiótico. Cada una de las placas Petri abarcó 5 callos por tratamiento, teniendo en total 5 tratamientos de kanamicina (100, 200, 300, 600 y 1000 $\mu\text{g/L}$), identificados con la siguiente nomenclatura: MS Km₁₀₀, MS Km₂₀₀, MS Km₃₀₀, MS Km₆₀₀, MS Km₁₀₀₀.

Los 5 tratamientos mostraron un crecimiento igualmente disminuido frente al testigo. Se observó que los callos en los tratamientos 4 y 5 (Km₆₀₀ y Km₁₀₀₀) presentaron un fenotipo franco de color marón oscuro frente al fenotipo amarillo claro brillante del testigo (Km₀).

Por otro lado, los callos de los tratamientos 1 y 2 (Km₁₀₀ y Km₂₀₀) presentaron un fenotipo de color y de crecimiento similar entre sí, mientras que los callos del tratamiento 3 (Km₃₀₀) presentaron un fenotipo de color similar a los tratamientos 1 y 2 pero similar en crecimiento al tratamiento 4.

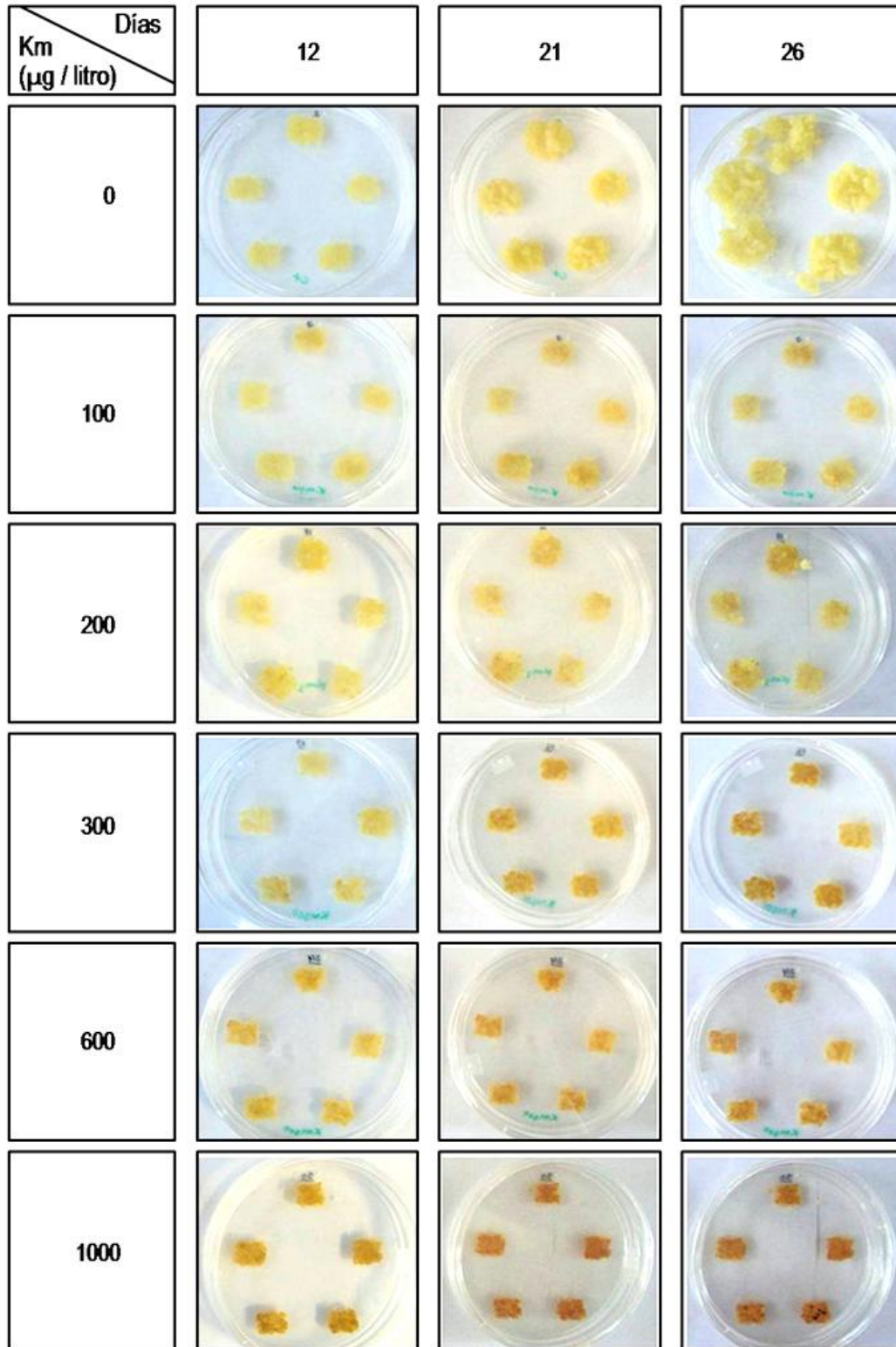


Figura 17. Fotografía de callos de *T. erecta* material “porte bajo” en medio MS con cinco tratamientos de kanamicina, mostrando 3 momentos representativos en el transcurso de los 26 días del cultivo. Se observa cambio fenotípico de los callos en 3 días diferentes durante la cinética de tolerancia al antibiótico.

En las figuras 18, 19, 20 y 21 se muestran las variaciones en los parámetros morfométricos (longitud máxima, área, perímetro y circularidad) obtenidos por Tratamiento Digital de Imágenes para los 5 tratamientos de kanamicina. Particularmente, en la figura 18 se muestra la longitud máxima del área proyectada de los callos, la cual indica la distancia más larga entre los dos puntos más alejados en el límite de la imagen; se observó que el control tuvo el valor más alto con 3.023 cm al final del desarrollo (día 26), frente a los tratamientos con kanamicina que mostraron valores no mayores a 1.8 cm, mostrando así que la presencia del antibiótico en el medio de desarrollo inhibió el crecimiento expansivo del callo.

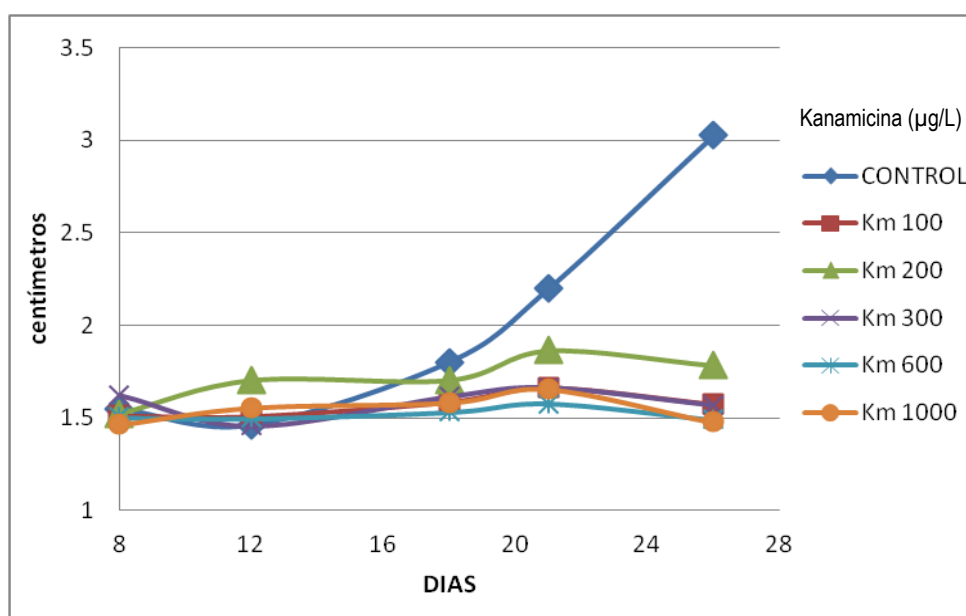


Figura 18. Longitud máxima de los callos obtenida por análisis de tratamiento digital de imágenes, del registro fotográfico en 5 tiempos de la cinética de tolerancia a al antibiótico de selección (kanamicina).

Mediante las variaciones en el área proyectada se observó que el crecimiento de los callos control (sin kanamicina) aumentó de forma acelerada del día 12 al 26, en contraste con los callos tratados que mostraron un área constante no mayor a 1.6 cm^2 , ya que en el control hubo un incremento evidente en la densidad celular, probablemente porque era un tejido en constante división celular (Figura 19). Sin embargo en la figura 20, fueron evidenciadas oscilaciones en los cambios de perímetro del callo, tanto como para los que fueron sometidos a la presencia de kanamicina como para el control siguiendo patrones de cambios periódicos muy similares hasta los 24 días de desarrollo en todos los casos. Este patrón de crecimiento

oscilatorio en medio semisólido también se ha reportado para otros sistemas *in vitro* [Camacho y col., 2010]. El comportamiento observado mediante los valores morfométricos, pueden interpretarse como un indicativo de la tolerancia a los tratamientos bajo estrés con kanamicina y como respuesta a la disponibilidad de nutrientes del medio; donde el callo exhibe una tendencia de ramificarse o extenderse por expansión celular.

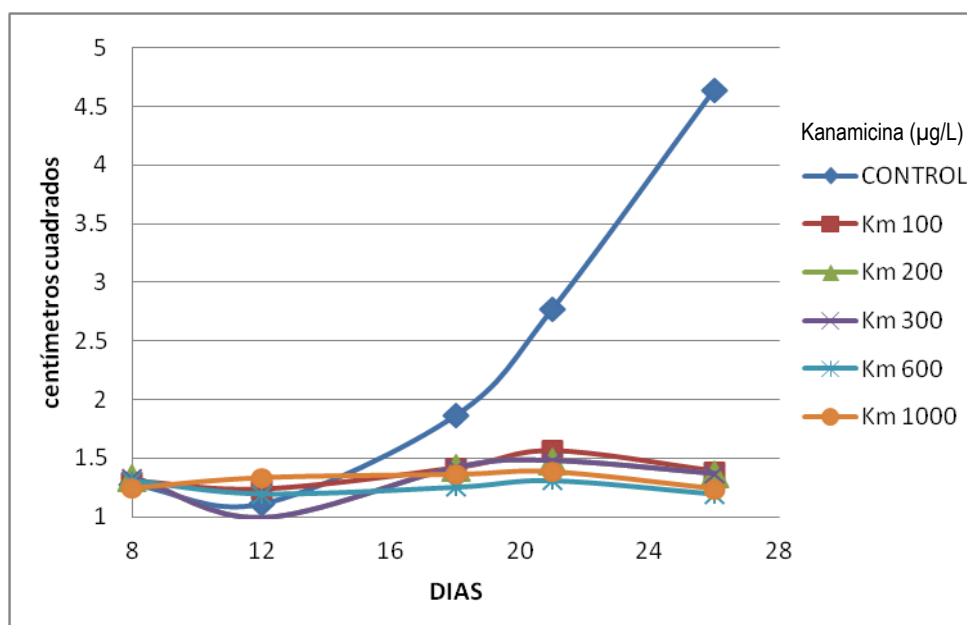


Figura 19. Relación de tiempo y área de los callos, obtenida por análisis de tratamiento digital de imágenes. Corresponden al registro fotográfico en 5 tiempos de la cinética de tolerancia al antibiótico de selección.

Los cambios de tamaño en relación a los días del cultivo (longitud máxima, perímetro y área), en el callo control presentaron un comportamiento diferente con respecto a los tratamientos con kanamicina. Sin embargo a través de la circularidad (parámetro de forma) se observó el mismo comportamiento y aproximadamente valores numéricos similares; en tendencias periódicas (Figura 21). Muy probablemente como respuesta de las células a los estímulos por el estrés causado en presencia del antibiótico, ya que si los cambios morfométricos no hubiesen sido significativos y constantes, se tratarían de sistemas en fase de muerte o que carecen de irritabilidad [Bennici y Corrado, 2009].

El análisis de los cambios morfométricos obtenidos por TDI dio evidencia de la respuesta y tolerancia del callo a los estímulos por estrés, lo cual corrobora la viabilidad celular observada

posteriormente con las tinciones diferenciales con fluorocromos. Adicionalmente, para discernir diferencias entre las diferentes concentraciones de kanamicina evaluadas, se realizó la determinación de la viabilidad celular de los callos descritos en la figura 22.

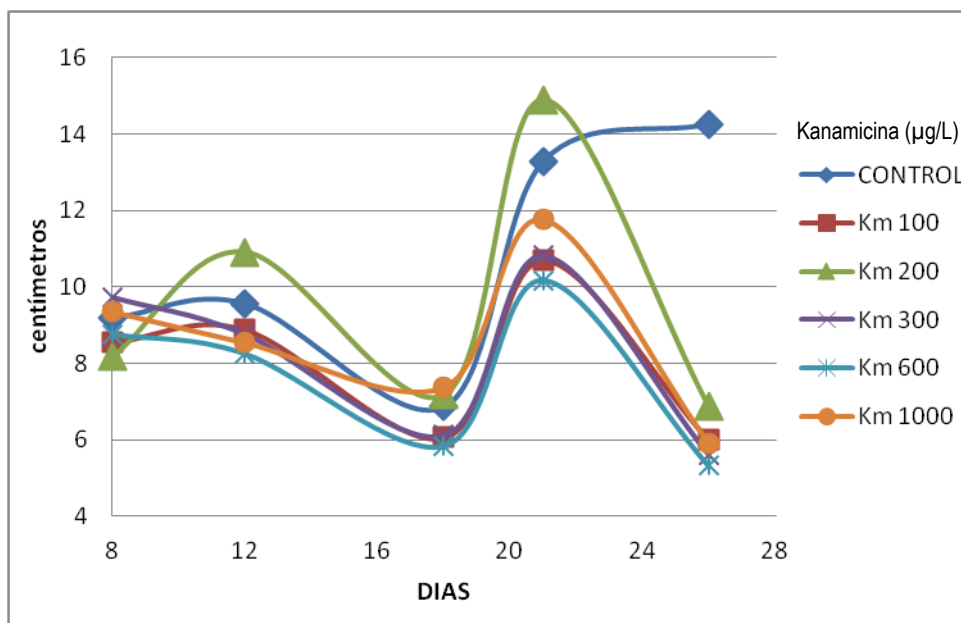


Figura 20. Perímetro de los callos obtenido por análisis de tratamiento digital de imágenes. Corresponden al registro fotográfico en 5 tiempos de la cinética de tolerancia al antibiótico de selección.

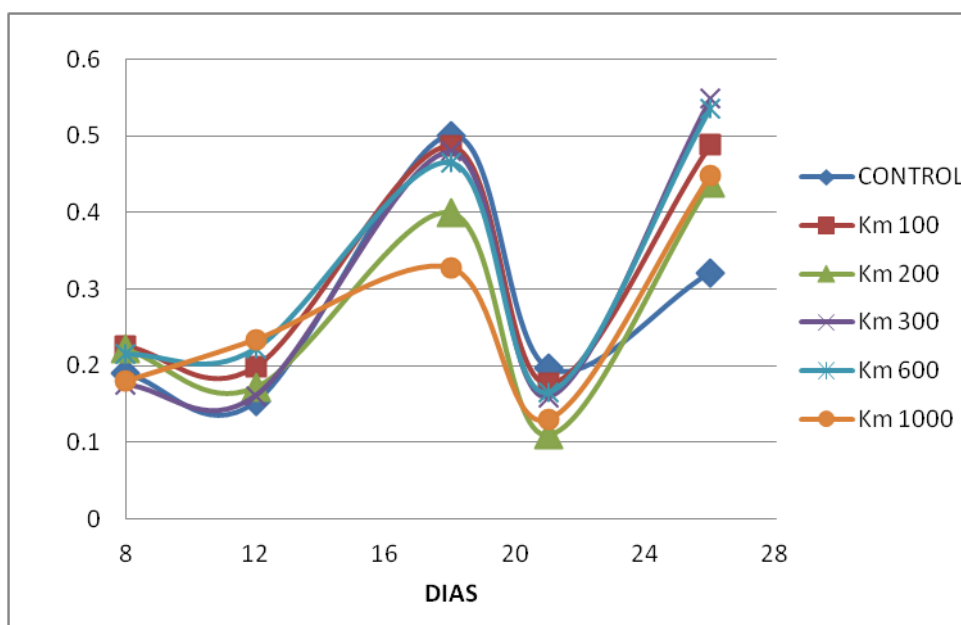


Figura 21. Circularidad de los callos obtenida por análisis de tratamiento digital de imágenes. Corresponden al registro fotográfico en 5 tiempos de la cinética de tolerancia al antibiótico de selección.

7.5) DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR CON 5 TRATAMIENTOS DE KANAMICINA EN CALLOS DE *T. erecta* MATERIAL “PORTE BAJO”.

Las células de callo no bombardeado de *T. erecta* se emplearon para evaluar la tolerancia al antibiótico de selección. En esta cinética de sensibilidad o tolerancia al antibiótico (Figura 22) se observó una disminución en el porcentaje de viabilidad celular directamente relacionado con el aumento de la concentración de antibiótico kanamicina. Al inicio del cultivo, el porcentaje de viabilidad más bajo fue de 15 y 25%, observado en los tratamientos 600 y 1000 $\mu\text{g/L}$ respectivamente, sin embargo no se encontró una viabilidad celular nula o dosis letal de este antibiótico de selección para callos de *T. erecta* material “porte bajo”.

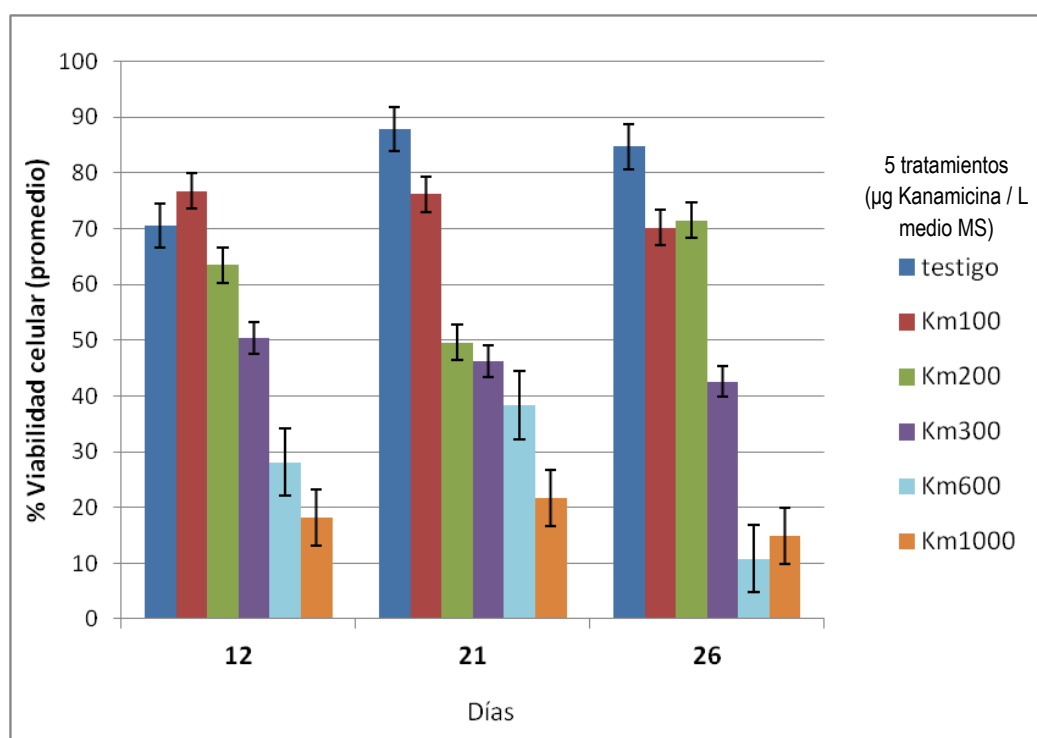


Figura 22. Sensibilidad a kanamicina de callos de *T. erecta* material “porte bajo” en cinco tratamientos de kanamicina.

Se determinó que la concentración de 300 $\mu\text{g/L}$ fue adecuada, para la selección de posibles transformantes, debido a que los callos detuvieron su crecimiento en 50%. Este dato coincide

con lo reportado por García (2007) donde se observó un crecimiento de 40% por análisis digital de imágenes, a una concentración de 250 μg de kanamicina/L, no obstante no reporta la viabilidad celular. Finalmente los callos bombardeados se mantuvieron en MS con kanamicina, a una concentración de 300 μg /L.

Para la viabilidad celular de los callos pC35S β , se tomaron 3 muestras de callo y con cada muestra se hicieron 3 repeticiones de viabilidad celular (Tabla 12). El fenotipo del testigo se observó como una masa celular abundante y friable, con una pigmentación amarilla clara brillante. En contraste, el fenotipo de los callos bombardeados se observaron como agregados celulares poco friables, considerablemente disminuidos y exhibían una pigmentación marrón oscura (Figura 23). Todos los callos bombardeados fueron resembrados en medio fresco de selección (300 μg kanamicina / L medio MS) cada 15 días, lo cual reiteró la posibilidad que el fenotipo de los callos bombardeados con pC35S β no se debió a la falta de nutrientes o de fitohormonas en el medio de cultivo.

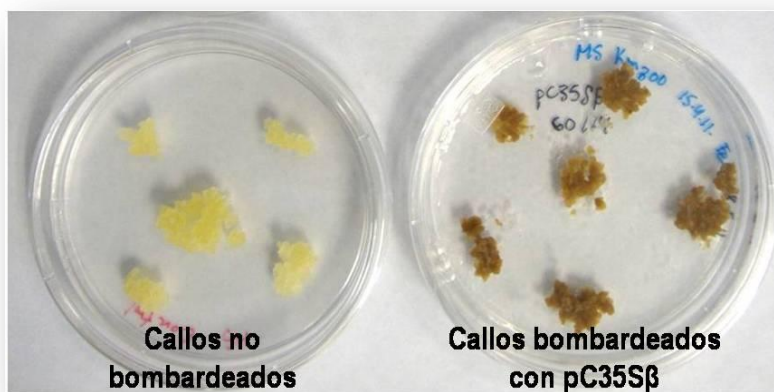


Figura 23. Callos bombardeados con el vector pC35S β en la décima resiembra frente a un subcultivo de la misma línea celular no bombardeada. Los callos bombardeados, incubados en medio de selección, presentaron una clara diferencia fenotípica en color y crecimiento.

Por otro lado, en el ensayo de viabilidad que se le realizó a los callos bombardeados se observó una viabilidad celular muy similar entre estos y el no bombardeado: 67% y 70% (Figura 24 y Tabla 9) respectivamente, esto sugiere que los callos bombardeados sufrieron una

disminución de crecimiento o de división celular. El pobre crecimiento de las células bombardeadas puede deberse al efecto inhibitorio de la kanamicina [Tok y Bi, 2003] o a la acumulación de etileno por el estrés que induce el bombardeo [Quintana, 2009]. Una viabilidad celular positiva no asegura la capacidad de reproducción o de crecimiento, es decir que el empleo de DAF como prueba de viabilidad no es suficiente para asegurar que las células vegetales conserven su capacidad de crecimiento, lo cual coincide con lo reportado por Miranda (2003) en la viabilidad de cultivos celulares de *Beta vulgaris* y de *Chinchona robusta*.

Tabla 9. Viabilidad de callos bombardeados con pC35S β (Resiembra 10 en medio de selección MS Km300)

	Células observadas			
	CONTROL	Muestra 1 de Callo pC35SB	Muestra 2 de Callo pC35SB	Muestra 3 de Callo pC35SB
Células totales observadas	88	75	89	81
Promedio. %Viabilidad celular	70.05 %	79.719%	52.69%	69.00%

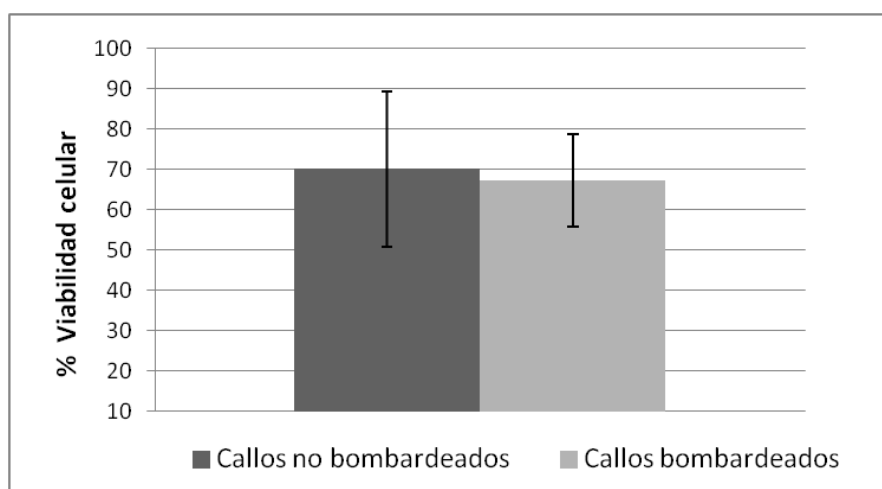


Figura 24. Viabilidad celular de callos de *T. erecta* bombardeados con pC35S β (resiembra 10).

Azofeifa (2009) reporta que la célula vegetal sometida a un estrés, como el tratamiento osmótico, bombardeo, selección (y un posible daño en el metabolismo por acción de la recombinación ilegítima de la transformación) reacciona produciendo mayores niveles de ROS y, o RNS; los cuales generan una reacción en cascada, cuando el electrón libre se transfiere de una molécula a otra. Una de las consecuencias que trae consigo es la acción de enzimas oxidadas, tales como polifenol oxidadas (PPOs), fenolasas y tirosinasas, así como de las peroxidadas (POX), las cuales pueden estar presentes en condiciones oxidativas cuando los tejidos son lesionados o se encuentran senescentes. Por otro lado, el fenotipo observado en los callos bombardeados con pC35S β puede ser el producto de la sensibilidad a la kanamicina aunado a que el gen de resistencia no se logró integrar.

7.6) CARACTERIZACIÓN CELULAR DE LOS CALLOS BOMBARDEADOS CON PC35S β ;

DESCRIPCIÓN DE LAS ALTERACIONES EN NUCLEARES DURANTE EL CRECIMIENTO *in vitro*

De manera general las imágenes de microscopía de epifluorescencia evidenciaron algunas características estructurales de los núcleos de las células de *T. erecta* material “porte bajo” tanto en las bombardeadas como en el testigo (no bombardeadas) durante las diferentes etapas de crecimiento. En ambos tipos celulares se observó la presencia de núcleos, se caracterizaron por presentar un límite del compartimiento definido, el cual corresponde a la envoltura nuclear. La cromatina compacta (heterocromatina) se distribuyó de forma cromocéntrica al núcleo, originando la formación de otra estructura reconocible en las células no bombardeadas: el nucléolo, el cual se evidenció como un objeto altamente fluorescente al interior del núcleo y con una disposición espacial variable durante el crecimiento, mientras que en células bombardeadas con pc35S β , esta estructura no se observó definida o se encontraba fragmentada en las primeras etapas de crecimiento y posteriormente condensado en cuerpos nucleares quizás de naturaleza ribonucleoprotéica (RNP); lo cual se sugiere por la demostración de Luck y Lafontaine (1982) mediante tratamientos con proteasas y ribonucleasas de estos cuerpos nucleares en plantas. El papel de estos cuerpos nucleares,

inmersos en una sustancia amorfa, es desconocido [Vázquez-Nin y col., 2003; Bouteille y col., 1967].

En la figura 25 se presentan las imágenes capturadas, con el objetivo 100X, de las células teñidas con IP, provenientes de la resiembra de un callo de 15 días de resiembra. Esta etapa del crecimiento se denominó Tiempo 0 (24 horas después de colocar los callos en medio fresco). Estas células se constituían de microagregados celulares irregulares conformados por células viables y no viables. Esta característica nunca afectó la tinción debido a la afinidad química del IP por el DNA, independientemente de la viabilidad.

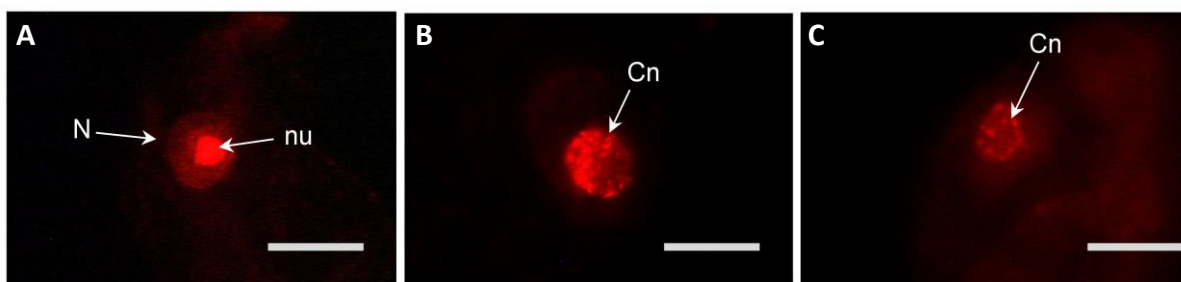


Figura 25. Micrografía de núcleos de células de callo de *T. erecta* material “porte bajo” a 24 horas de crecimiento. A) núcleos celulares de callo no bombardeadas, B y C) núcleos celulares de callo bombardeado con pc35Sβ. Cuerpo nuclear (Cn) y núcleo (N). Tinción con IP. Aumento 100 X. Barra, 10 μm.

En el T0, el núcleo de las células testigo tuvieron un tamaño aproximado de 10 micras y presentaba un nucléolo pequeño altamente condensado y que probablemente se encuentra en un estado citofisiológico de tipo interfásico, esto se caracteriza por ser una etapa activa de síntesis proteica en el ciclo celular (Figura 25A) [Alberts y col., 2004]. Mientras que los núcleos de pc35Sβ mostraron una alta fragmentación de lo que probablemente fue el nucléolo en forma de cuerpos aislados. Este tipo de cuerpos nucleares eran de tipo esferoide o globular, de entre 0.5-2 micras (Figura 25 B) como lo descrito por Vázquez-Nin y colaboradores (2003) para las plantas dicotiledóneas. Estos se han descrito en células vegetales y animales neoplásicas o expuestos a un agente viral [Häsler y col., 2003; Vázquez-Nin y col., 2003]. En algunos casos, estos cuerpos se encontraron inmersos en una sustancia amorfa de tipo nucleoplásmica y dispuestos en la región de la envoltura nuclear (Figura 25 C)

Las células de 10 días de resiembra (T1) del grupo testigo se caracterizó por una heterocromatina cromocéntrica con zonas de síntesis ubicadas en la periferia de la envoltura nuclear (Figura 26A) esta particularidad puede deberse a que la eucromatina se caracteriza por ser zonas donde el DNA forma asas en la periferia de los cúmulos heterocromáticos. Según lo descrito por Vázquez-Nin y col., (2003), esta disposición causa que la región que rodea los grupos heterocromáticos sea donde radica la transcripción de ARN mensajero más activa. Por lo que se trata de células que han comenzado con la biosíntesis de compuestos necesarios para el crecimiento por lo que este tipo celular, en su mayor parte se encuentra en un estado celular G0/G1, más no es una generalidad de todo el callo.

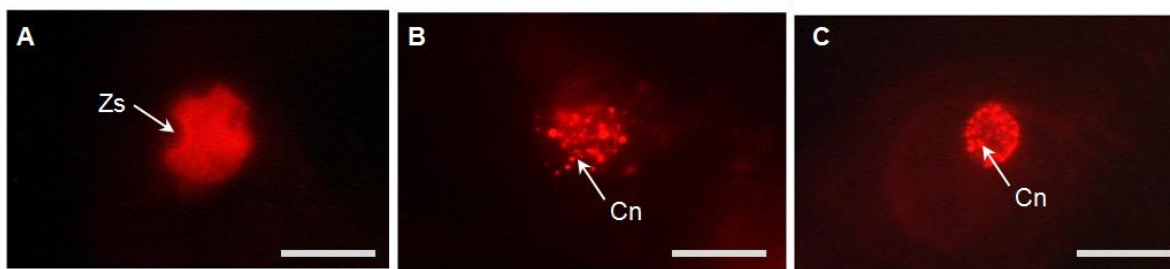


Figura 26. Micrografía de núcleos de células de callo de *T. erecta* material “porte bajo” a 10 días de crecimiento. A) núcleos celulares de callo no bombardeadas. B y C) núcleos celulares de callo bombardeado con pC35Sβ. Cuerpo nuclear (Cn) y zona de síntesis (Zs). Tinción con IP. Aumento 100 X. Barra, 10 μm.

Por otra parte, las células de callo pC35SB presentaron un núcleo fragmentado en cuerpos nucleares de tipo globular [Vázquez-Nin y col., 2003]. En algunas células se disponían de forma dispersa en el nucleoplasma y el tamaño era visiblemente mayor (Figura 26B) respecto a la otra conformación observada en donde este núcleo presentaba los mismos cuerpos nucleares pero dispuestos de forma concéntrica (Figura 26C). El tamaño de los núcleos en las células no bombardeadas, así como en las que fueron bombardeadas es similar. Sin embargo el principal cambio en esta etapa de crecimiento es en la disposición espacial de los cuerpos nucleares.

A 16 días de crecimiento (T2), las células de callo no bombardeado presentaron un núcleo de mayor tamaño respecto a los núcleos de las células de callo bombardeadas con pC35Sβ. En la figura 27A se observa la heterocromatina interrumpida por al menos una zona de síntesis la cual se presenta como un área más clara ubicada en la parte central del núcleo, como lo descrito por Vázquez-Nin y colaboradores en el 2003. Los núcleos de las células

bombardeadas se observaron de tamaño pequeño respecto al tamaño de los núcleos en células testigo.

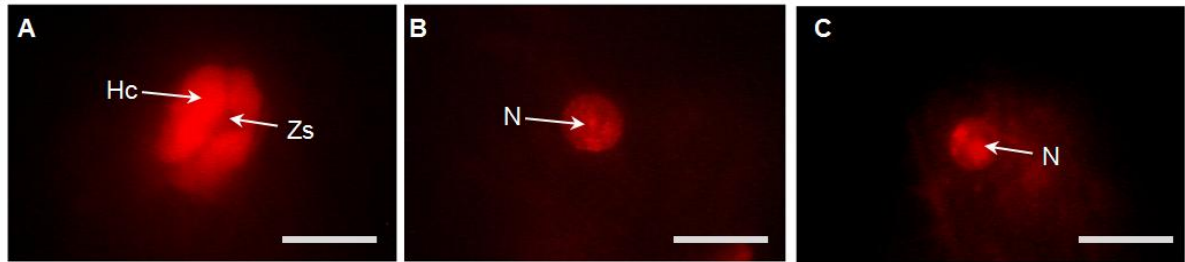


Figura 27. Micrografía de núcleos de células de callo de *T. erecta* material “porte bajo” a 16 días de crecimiento. A) núcleos celulares de callo no bombardeadas. B y C) núcleos celulares de callo bombardeado con pC35Sβ. Heterocromatina (Hc) y núcleo (N). Tinción con IP. Aumento 100 X. Barra, 10 μm.

A 22 días de crecimiento (T3), los núcleos de las células testigo evidenciaron un incremento en tamaño respecto a los núcleos de las células bombardeadas con pC35SB. En la Figura 28B y 28C se observan cuerpos nucleares de tipo circular concéntrico, constituido en remolinos y fibrillas periféricas supercondensadas y granulares densos ubicados al interior del núcleo, quizás el principal componente de estas estructuras son partículas de RNA, RNP's y DNA. Esta característica es observada en células neoplásicas o de crecimiento anormal y su función es citofisiológicamente desconocida [Vázquez-Nin y col., 2003].

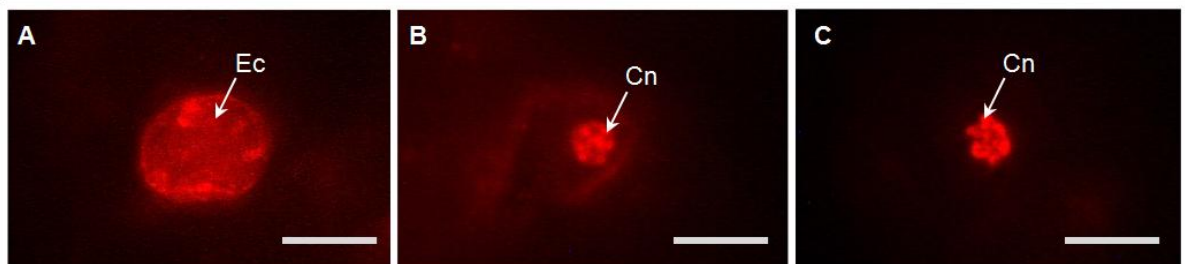


Figura 28. Micrografía de núcleos de células de callo de *T. erecta* material “porte bajo” a 22 días de crecimiento. A) núcleos celulares de callo no bombardeadas. B y C) núcleos celulares de callo bombardeado con pC35Sβ. Euterocromatina (Ec) y cuerpo nuclear (Cn). Tinción con IP. Aumento 100 X. Barra, 10 μm.

En contraste con los núcleos de células bombardeadas, los tamaños de los núcleos observados en las células no bombardeadas (Testigo) indican un incremento en tamaño, que puede deberse a que su dinámica celular se enfoca a la biosíntesis de compuestos destinados al

crecimiento (incremento en tamaño y estructura celular). Por lo que el incremento observado en tamaño fue dado por una conversión de la heterocromatina a eucromatina. En los núcleos de células transformadas, éstas presentaron anomalías en disposición conformacional de la cromatina, probablemente como resultado de una mayor condensación del DNA, lo cual pudiera dar la inhabilitación de la transcripción de RNA's mensajeros, generando inactividad general del metabolismo celular. Esto en conjunto con los cambios morfométricos evaluados en los callos, podría fundamentar la falta de crecimiento en los callos bombardeados. En el anexo 4 se muestra la galería representativa de imágenes de los núcleos.

Por otro lado, durante la exploración de los núcleos en fluorescencia, tanto en los callos bombardeados como en los no bombardeados, se observó la presencia de elementos celulares diferenciados, identificados como traqueidas (TEs) (Figura 29-32). En el 2010 Lacayo y col. emplean por primera vez la microscopía de fluorescencia combinada con microscopía de fuerza atómica para investigar los elementos traqueales y la pared celular de cultivos celulares *in vitro* de *Zinnia elegans*.

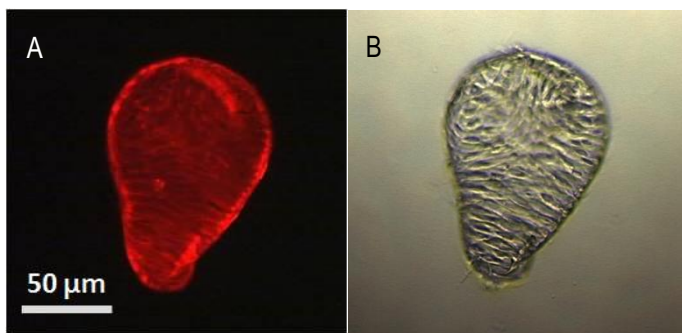


Figura 29. Micrografías callo de *T. erecta* a las 24 h de cultivo, donde se observa una célula con la morfología de una traqueida.

A) Micrografía de fluorescencia por tinción con IP. B) Micrografía con luz visible. Aumento 20X.

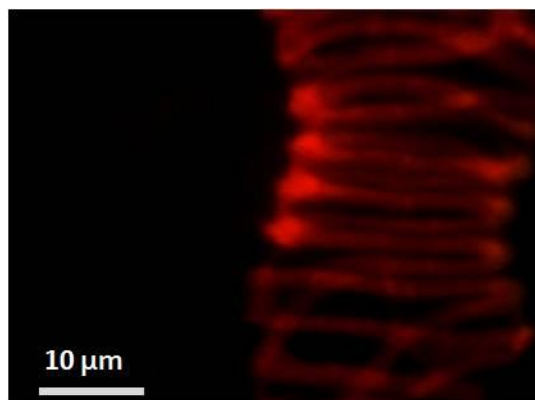


Figura 30. Micrografía de una célula de callo de *T. erecta* material “porte bajo” donde se observa la presencia de una sección celular que se identifica como un elemento de tráquea o traqueida. La célula de callo presenta un patrón en forma de espiral en la pared celular. Cultivo de 10 días de callo bombardeado. Microscopía de fluorescencia, tinción con IP. Aumento 100X.

En el caso de los cultivos de tejido de *Z. elegans*, se ha observado diferenciación de elementos traqueales (TEs), con formación de pared celular o de lignina extracelular. Esto ha provisto información útil relacionada con la formación de la lignina y del xilema. Así todo el proceso puede ser monitoreado en células individuales. El análisis sistemático de la expresión de genes y el uso de marcadores moleculares, han revelado que muchos procesos son comunes entre la formación de traqueidas *in vitro* y también *in situ*. Estudios usando este sistema, han clarificado un número de eventos fisiológicos, bioquímicos y moleculares subyacentes en la diferenciación de traqueidas (TEs) [Kärkönen y col., 2011]. La presencia de estas estructuras celulares en callo de *T. erecta* (Figuras 29-32) pudiera ofrecer la posibilidad de usar este sistema para extender el estudio de tales procesos en la formación de lignina y de xilema.

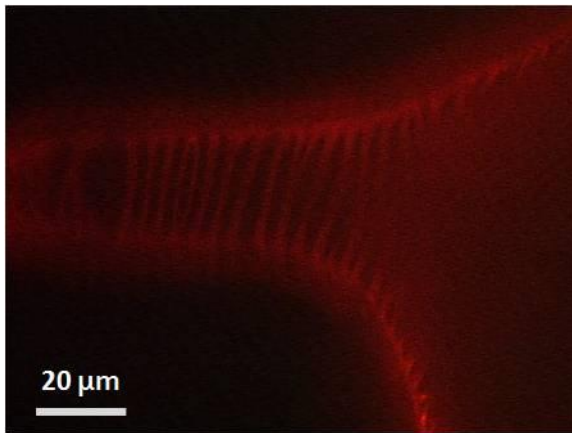


Figura 31. Micrografía de fluorescencia de callos de *T. erecta* material "porte bajo" donde se muestra la sección de una célula con patrones espirales o reticulares en la pared celular. Callo de *T. erecta* sin bombardear a los 22 días de cultivo. Tinción con Ioduro de propidio, aumento 40X.

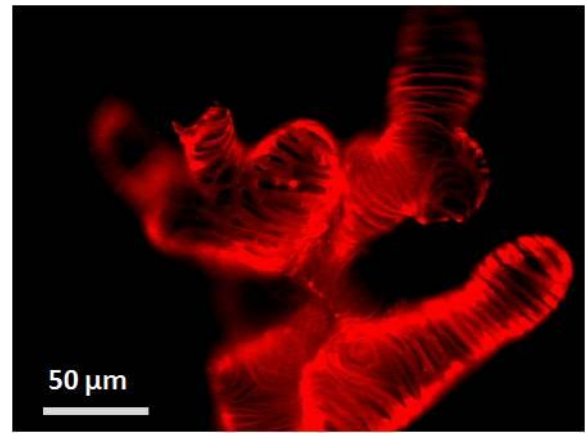


Figura 32. Micrografía de fluorescencia de callos de *T. erecta* material "porte bajo" mostrando células con patrones espirales o reticulares en la pared celular, característicos de traqueidas. Callo de *T. erecta* sin bombardear a las 24 hrs de cultivo. Tinción con Ioduro de propidio, aumento 20X.

Los TEs acumulan lignina en sus paredes secundarias y desarrollan una apoptosis que resulta en la remoción de todos los contenidos celulares, dejando como resultado un cuerpo funcional [Fukuda, 2004; Roberts y McCann, 2000]. Tal descripción correlaciona con la ausencia de contenido celular observado en las micrografías de traqueidas de las muestras de callo. Las células bombardeadas pudieran tener mayor presencia de TEs favoreciendo así el decremento en el crecimiento de masa celular. No obstante, en callos no bombardeados de *T.*

erecta (control o testigo), también se observó la presencia de estas estructuras celulares con forma de traqueidas, lo cual sugiere que el bombardeo no induce la formación de estas estructuras celulares.

7.7) MORFOMETRÍA POR TDI DE LOS NÚCLEOS DE LOS CALLOS BOMBARDEADOS

En los días 0 y 10 (tiempos T0 y T1) se observa similitud en el comportamiento del área de los núcleos en las dos líneas celulares (células bombardeadas frente a células no bombardeadas), interceptando tamaño en el día 16 (tiempo T3). En el día 22 se aprecia una divergencia en los valores del área (Figura 33). Hay una excepción de correlación del perímetro con el área muy evidente en el día 10 y 22 (Figura 34). Lo cual indica que los núcleos de células no bombardeadas tienden a un aumento. En el 2000, Doerner reporta que las células vegetales *in vitro* que están en división celular pueden distinguirse de otras células por la presencia de un núcleo mas grande. En contraste, los núcleos de las células bombardeadas con pC35S β tienden a mantener su tamaño o incluso a disminuir durante los días de cultivo, esto correlaciona con las observaciones de tamaño nuclear en micrografías de fluorescencia.

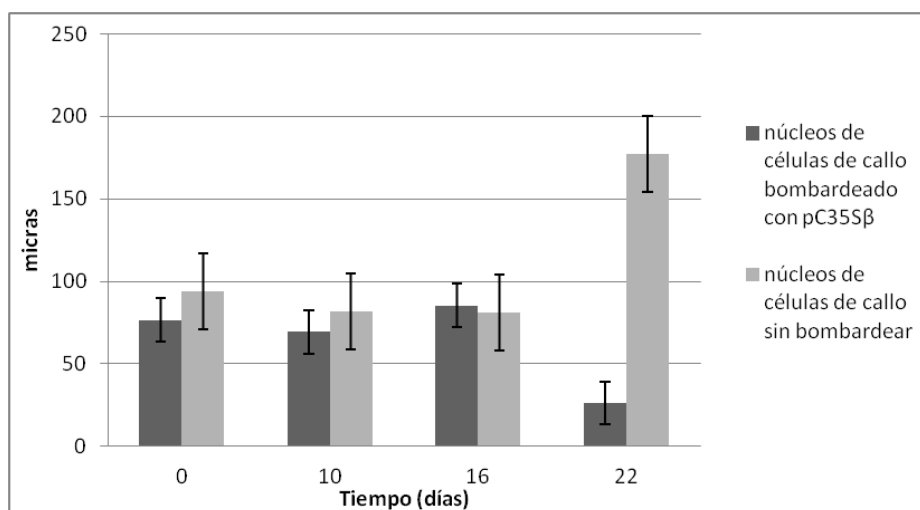


Figura 33. Área de los núcleos de células desdiferenciadas de *T. erecta*.

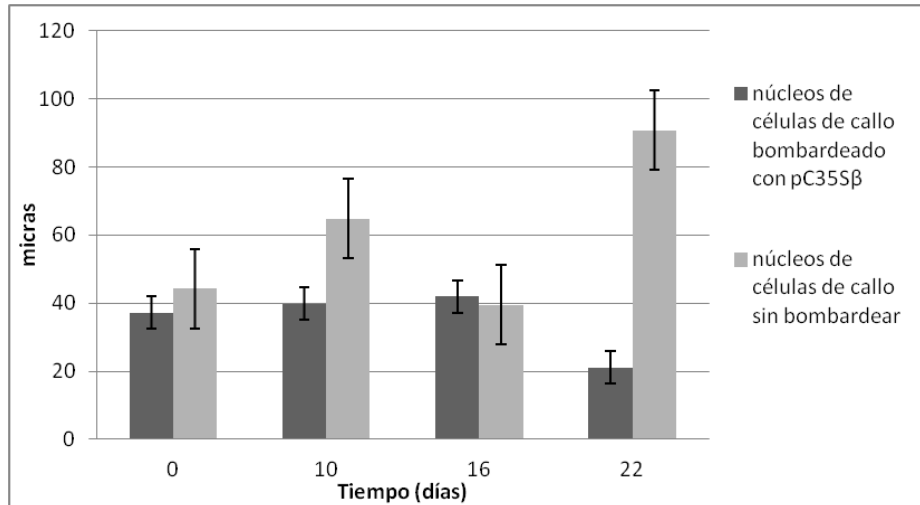


Figura 34. Perímetro de los núcleos de células desdiferenciadas de *T. erecta*.

Respecto a la circularidad, se observa que el testigo sigue una tendencia de semejanza a la circunferencia, donde el valor de 1 indica un círculo perfecto mientras que la cercanía al valor 0 indica incremento en la elongación. De manera que los núcleos de células tratadas mostraron un patrón oscilante, perdiendo circularidad en el día 10 y 22 y aumentando en día 16. Dicho de otro modo, los núcleos de las células bombardeadas presentaron un aumento en la elongación en los días 10 y 22 (Figura 35).

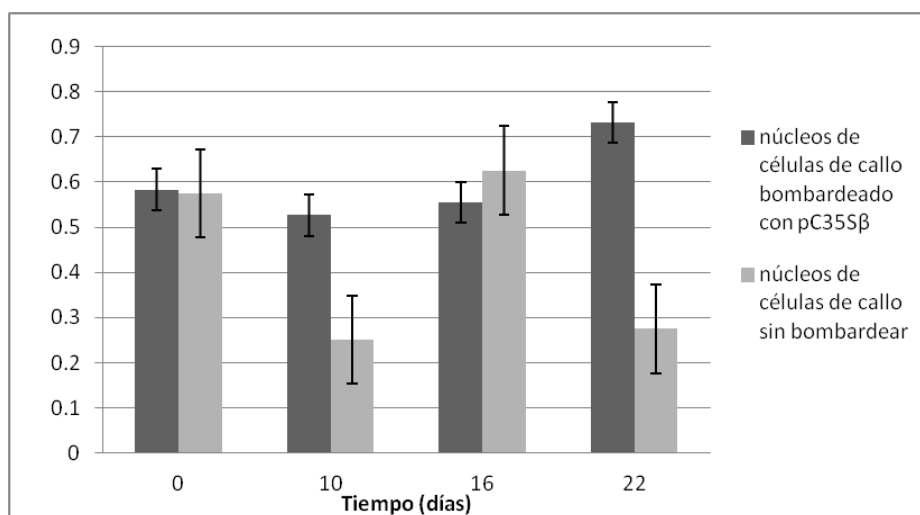


Figura 35. Circularidad de núcleos de células desdiferenciadas de *T. erecta*.

7.8) MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO AMBIENTAL

En los callos bombardeados (resiembra 11) de pBI426 y pC35S β , se observó la persistencia de las partículas de oro (Figuras 36-37), corroborando el evento del bombardeo de los microproyectiles en los callos, que fueron sometidos a biobalística con las construcciones pBI426 y pC35S β , lo cual asevera que el bombardeo si se logró. Los foci observados en la expresión transitoria descartan que la metodología y los parámetros distancia/presión empleados en la biobalística fueran un motivo para que los callos no logaran transformarse y crecer en el medio de selección.

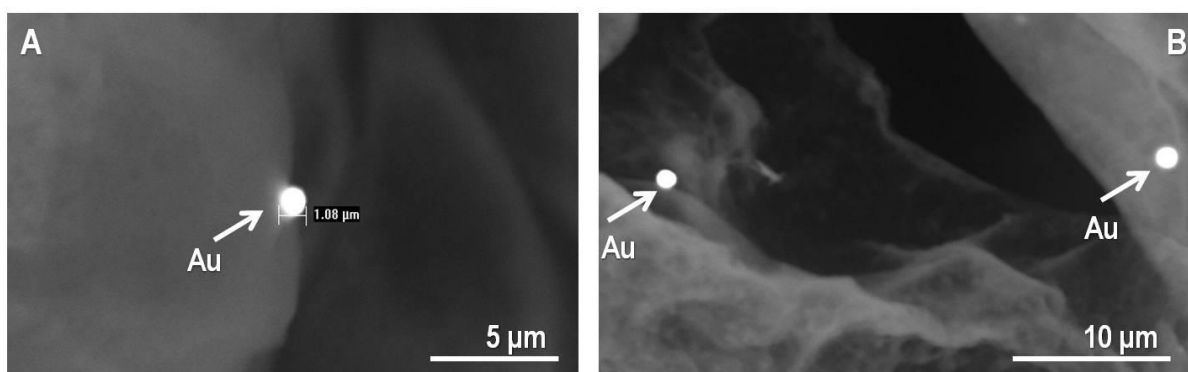


Figura 36. Micrografías de microscopía electrónica de barrido ambiental mostrando la presencia de partículas de oro en los callos bombardeados. A) Callo de *T. erecta* bombardeado con pBI426 en la resiembra 10, se observa en detalle las partículas de oro (Au) empleadas durante la biobalística, el microproyectil exhibe un diámetro de 1.08 micras. Aumento 5000 X. B) Callo de *T. erecta* bombardeado con pC35S β en la resiembra 10, también se observa la presencia de las partículas de oro usadas durante el bombardeo. Aumento 3000 X.

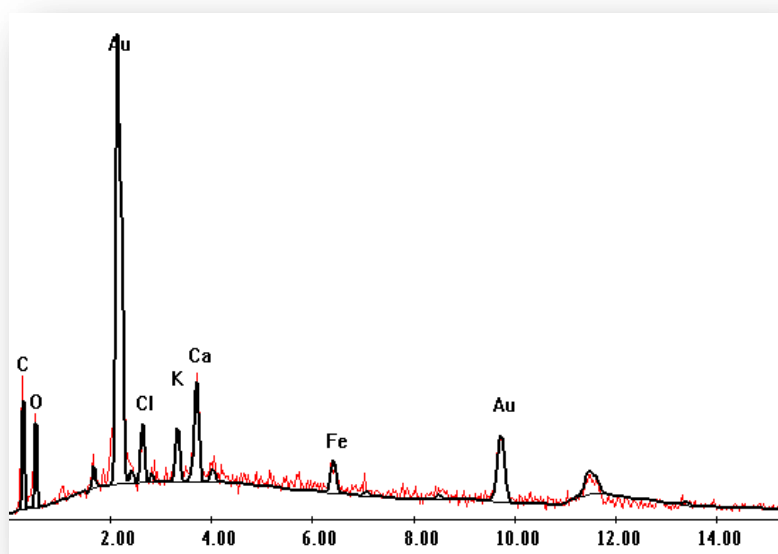


Figura 37. Análisis de elementos realizada durante la Microscopía de barrido ambiental. Destaca la presencia de oro (Au) en las células bombardeadas.

El análisis de MEB ambiental realizado de los callos bombardeados y no bombardeados, reveló la presencia de traqueidas, estructuras celulares con patrones espirales y anulares (Figura 38) [Lacayo y col., 2010]. No existen estudios de dichas estructuras para *cultivos in vitro* de *T. erecta*. Además estas estructuras celulares presentaron aparente engrosamiento de la pared celular. Esto indica que puede existir rediferenciación celular en los callos de *T. erecta* analizados. Los elementos traqueales (TEs), desarrollan gradualmente engrosamientos de pared secundaria, formando patrones o dibujos en forma espiral, reticular, anular o de fosos (Figuras 38-39) [Roberts y Haigher, 1994; Falconer y Seagull, 1988].

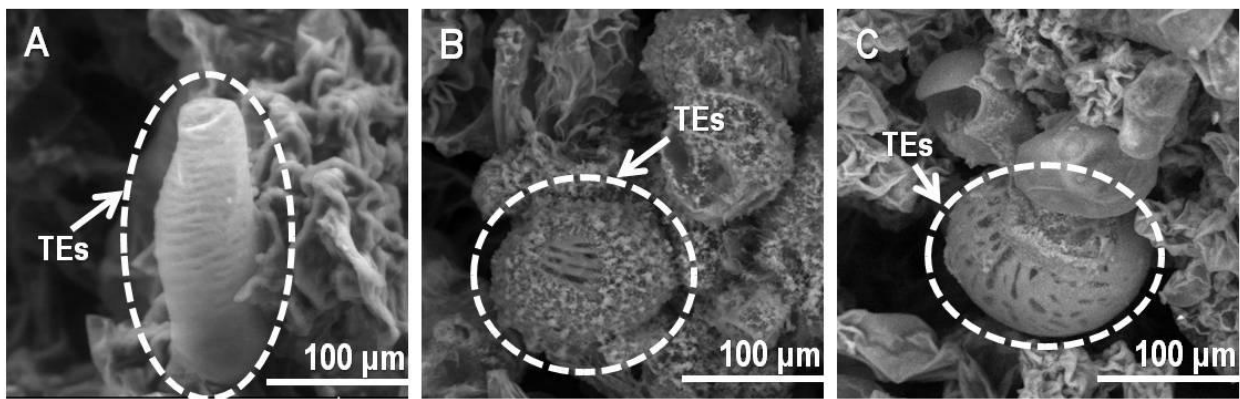


Figura 38. Micrografía de barrido ambiental mostrando estructuras celulares con morfología de traqueidas (TEs) en cultivos de callo de *T. erecta* material “porte bajo” a los 15 días de cultivo. A) células testigo, B) células bombardeadas con pC35SB (resiembra 10) y C) células bombardeadas con pBI426 (resiembra 10). Microscopía electrónica de barrido ambiental. Aumento 300X.

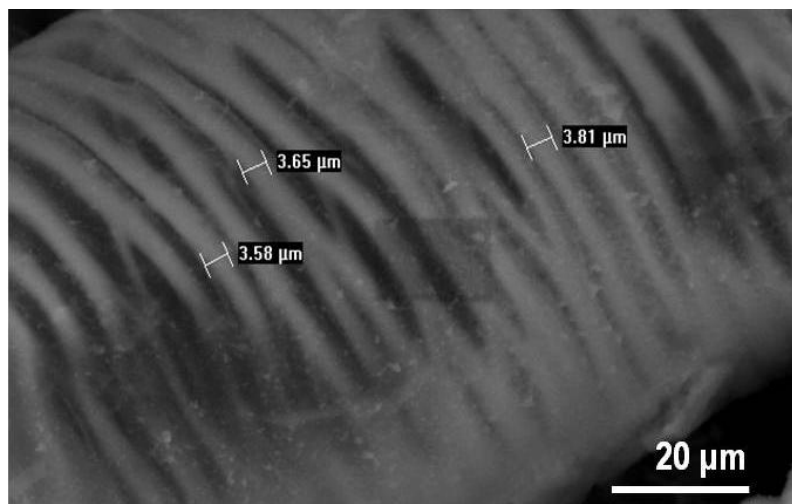


Figura 39. Micrografía de una estructura de traqueida en las células de callo de *T. erecta* bombardeadas con pC35SB (resiembra 10), donde se muestra el grosor o diámetro de los patrones fibrilares de una traqueida. Microscopía electrónica de barrido ambiental. Aumento 1000X. Barra, 20 µm.

8) CONCLUSIONES

1. Se comprobó la estructura genética de los plásmidos empleados en el bombardeo de células desdiferenciadas de *T. erecta* material “porte bajo”.
2. Se realizaron los ensayos de expresión transitoria en callos de cempaxúchil con el bombardeo del vector pB1426 y se encontraron condiciones de 60 psi y 11.5 cm de distancia como las adecuadas para el bombardeo en cámara de baja presión.
3. El análisis de los cambios morfométricos, en patrones periódicos obtenidos por TDI dio evidencia de la respuesta y tolerancia del callo a los estímulos por estrés, lo cual corroboró la viabilidad celular observada posteriormente con las tinciones diferenciales con fluorocromos.
4. En base a la viabilidad celular usando tinciones diferenciales de núcleo con PI y DAF, se eligió la concentración de antibiótico kanamicina 300 µg/litro para la selección de los callos bombardeados de *T. erecta* material “porte bajo”. Por otro lado, no se encontró la dosis o concentración letal de este antibiótico.
5. Los callos bombardeados mostraron una viabilidad celular positiva pero no un aumento en el crecimiento (división celular).
6. Los resultados obtenidos plantean que existe cambio en la morfología nuclear cuando los callos fueron sometidos a bombardeo y sembrados en medio de selección. Se observó una clara diferencia fenotípica a nivel celular y de morfología nuclear en los callos bombardeados respecto a los callos no bombardeados. Se encontraron cuerpos nucleares muy condensados en las células bombardeadas desde días tempranos.
7. En los callos no bombardeados, se observaron núcleos de mayor tamaño, fenómeno característico de células de callo en división.
8. Por fluorescencia y MEB ambiental se observaron estructuras celulares diferenciadas (Traqueidas), tanto en la línea celular la bombardeada como en la no bombardeada.

9) PERSPECTIVA

Los resultados observados de este trabajo plantean la posibilidad de probar otra línea celular para lograr células transformadas viables; dado que no fue posible probar que el decremento en el crecimiento fue causado por daño metabólico a causa del bombardeo, o que pudiera existir un efecto negativo por la inserción de *lcy-β* en los callos de “porte bajo”, que acumulan carotenoides en cantidades apreciables antes del bombardeo. Si se utiliza un material de *T. erecta* con fondo genético diferente, por ejemplo una línea celular albina como “french vanilla”, para integrar genes de la ruta biosintética de carotenoides y/o genes que intervienen en la formación estructuras de almacenamiento (como el gen *or*), sería probable obtener y estudiar células viables sobreproductoras de pigmentos.

La presencia de traqueidas, observadas en callos de *T. erecta* material “porte bajo”, plantea que hay aspectos celulares que faltan por caracterizarse en esta línea celular. Por otro lado, es posible que dicha presencia de traqueidas, haga de esta línea celular un sistema útil en posteriores estudios para abundar o complementar el estudio de síntesis del xilema y de lignina, a nivel molecular y celular, que recientemente se está investigando en cultivos *in vitro* de *Z. elegans*.

10) LITRATURA CITADA

1. Alberts, B.; Dennis, B.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J. 2004. Molecular biology of the cell. Garland Publishing. pp. 696–699.
2. Aluru, M.; Xu, Y.; Guo, R.; Wang, Z.; Li, S.; White, W.; Wang, K. y Rodermel, S. 2008. Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *Journal of Experimental Botany* 59: 3551–3562.
3. Apel, W. y Block, R. 2009. Enhancement of carotenoid biosynthesis in transplatic tomatoes by induced lycopene-to-Provitamin A conversion. *Plant Physiology* 151: 59–66.
4. Azofeifa, Á. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20: 153–175.
5. Bennici, A. y Corrado, T. 2009. Ultrastructural effects of salinity in *Nicotiana bigelovii* var. *bigelovii* callus cells and *Allium cepa* roots. *Caryologia* 62:124-133.
6. Birnboim, H. y Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513–1523.
7. Birch, R. 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:297–326.
8. Bouteille, M.; Kalifat, S. y Delarue, J. 1967. Ultrastructural variations of nuclearbodiesin human diseases. *Journal of Ultrastructure Research* 19: 474–486
9. Bozzola, J. y Russell, L. 1992. *Electron Microscopy Principles and Techniques for Biologists*. Jones and Bartlett Publishers. Estados Unidos de América. pp. 232–233.
10. Brasileiro, A. y Aragão, F. 2001. Marker genes for *in vitro* selection of transgenic plants. *Journal of Plant Biotechnology* 3: 113–121.
11. Bridgman, P.; Brown, M. y Balan, I. 2003. Biolistic Transfection. *Methods in Cell Biology* 71: 353–368.

-
-
12. Buchanan, B.; Gruissem, W. y Jones, R. 2002. Biochemistry & molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland. pp. 37–45
 13. Calva, G. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria. 6 (11): 2-16. <<http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a.htm>. consultado el 22.2.2010>.
 14. Camacho, B.; Jiménez, A.; Chanona-Pérez, J.; Calderón-Domínguez, G.; Alamilla-Beltrán, L.; Hernández-Sánchez, H. y Gutiérrez-López, G. 2010. Morphological characterization of the growing front of *Rhizopus oligosporus* in solid media. Journal of Food Engineering 101: 309–317.
 15. Camacho-Beltrán, E. 2008. Manipulación de los contenidos de carotenoides mediante la expresión del gen β -licopeno ciclasa (*lcy-b*) en cloroplastos de plantas de tabaco y tomate. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro.
 16. Carvalho, C.; Clarindo, W.; Praça, M.; Araújo, F. y Carels, N. 2008. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. Plant Science 174: 613–617.
 17. Chávez-Camacho, M.; Valadez-Moctezuma, E.; Carrillo-Castañeda, G. y Lozoya-Gloria, E. 2002. Expresión transitoria del gen de la β -glucoronidasa y efecto del bombardeo en tejido de crisantemo (*Dendrathera grandiflorum*). Revista Chapingo Serie Horticultura 8: 107–121.
 18. Curtis, H. y Barnes, S. 2000. Biología. Sexta edición en español. Editorial Médica Panamericana. México. pp. 14–16.
 19. Dalta, R.; Hammerlind, J.; Pelcher, L.; Crosby, W. y Selvaraj, G. 1991. A bifunctional fusion between β glucoronide and neomicyn phosphotransferase: a broad-spectrum marker enzyme for plants. Gene 101:239–246.
 20. Danilatos, G. 1988. Foundations of environmental scanning electron microscopy. Advances in Electronics and Electron Physics 71: 109–250.
 21. Delgado-Vargas, F.; Jiménez, A. R. y Paredes-López, O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains – characteristics, biosynthesis. Processing and stability. Critical reviews in food science and nutrition 40: 173–289.

-
-
22. Delgado-Vargas, F. y Paredes-López, O. 1996. Correlation of HPLC and AOAC methods to assess the all-trans-lutein content in marigold flowers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72: 283–290.
 23. Delgado-Vargas, F. 1997. Pigmentos de flor de cempaxúchil (*Tagetes erecta*) caracterización fisicoquímica, procesamiento y eficiencia pigmentante. Tesis doctoral. CINVESTAV-IPN. Unidad Irapuato, México.
 24. Del Villar-Martínez, A.; García-Sucedo, P.; Cárabez-Trejo, A.; Cruz-Hernández, A. y Paredes-López, O. 2005. Carotenogenic gene expression and ultrastructural changes during development in marigold. *Journal of Plant Physiology* 162: 1046–1056.
 25. Del Villar-Martínez, A.; Serrato-Cruz, M.; Solano-Navarro, A.; Arenas-Ocampo, M.; Quintero Gutiérrez, A.; Sánchez-Millán, J.; Evangelista-Lozano, S.; Jiménez-Aparicio, A.; García-Jiménez, F. y Vanegas-Espinoza, P. 2007. Carotenoides en *Tagetes erecta* L. la modificación genética como alternativa. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30:109–118.
 26. De Robertis, E. y De Robertis, E (h). 1981. *Biología celular y molecular*. El Ateneo. España. pp. 343–359.
 27. Doerner, P. 2000. Cell division regulation. En: Buchanan B.; Gruissem W. y Jones R. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 528-567.
 28. Dulbecco, R. y Vogt, M. 1953. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *The Journal of Experimental Medicine* 99: 167–182.
 29. Duncan, D. y Widholm, J. 1990. Measurements of viability suitable for plant tissue cultures. *Methods in Molecular Biology* 6: 29–37.
 30. Evans, D. y Bravo, J. 1983. Protoplast isolation and culture. In: *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 1. Evans, D., Sharp, W., Ammirato, P., Yamada, Y. (Eds). McMillan, New York.
 31. Falconer, M. y Seagull, R. 1988. Xylogenesis in tissue culture III. Continuing wall deposition during tracheary element development. *Protoplasma* 144: 10–16.
 32. Fakan, S. y Bernhard, W. 1971. Localisation of rapidly and slowly labelled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography. *Experimental Cell Research* 67: 129–141.

-
-
33. Finer, J.; Vain, P.; Jones, M. y McMullen, M. 1992. Development of particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cells Reports* 11: 323–328.
 34. Fukuda, H. 2004. Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 379–391.
 35. González-Oliver, A.; Echeverría, O.; Hernández-Pando, R. y Vázquez-Nin, G. 1997. Ultrastructural study of the nucleus of normal, dysplastic and carcinomatous epithelial cells of human cervix uteri. *Ultrastructural Phatology* 21:379–392.
 36. Gordon-Kamm, W.; Spencer, T.; Mangano, M.; Adams, T.; Daines, R.; Start, W.; O'Brien, J.; Chambers, S.; Adams, W.; Willetts, N.; Rice, T.; Mackey, C.; Krueger, R.; Kausch, A. y Lemaux, P. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile Transgenic plants. *Plant Cell* 2:603–618.
 37. García, M. 2007. Expresión transitoria del gen *uidA* en células de *Tagetes erecta*. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec, Morelos.
 38. Gross, J. 1987. Pigments on Fruits. Academic Press Inc. pp. 87-85, 110–117.
 39. Grotewold, E. 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *The Annual Review of Plant Biology* 57: 761–780.
 40. Häslér, J.; Wüest, J.; Gaspar, T. y Crèvecoeur, M. 2003. Long term in vitro-cultured plant cells show typical neoplastic features at the cytological level. *Biology of the Cell* 95: 357–364.
 41. Hassan, M.; Corkidi, G.; Galindo, E.; Flores, C. y Serrano, L. 2002. Accurate and rapid viability assesment of *Trichoderma harzianum* using fluorescence based digital image analisis. *Biotechnology and Bioengineering* 80: 677–684.
 42. Ibrahim, A.; Heredia, F.; Pinheiro, C.; Aragao, F. y Campos, F. 2008. Optimization of somatic embryogenesis and selection regimes for particle bombardment of friable embryogenic callus and somatic cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *African Journal of Biotechnology* 7: 2790–2797.
 43. Jefferson, R. 1989. The GUS reporter gene system. *Nature* 342: 837–838.
 44. Jiménez-García, L.; Aredano-Moreno, L.; Segura-Valdez, L.; Echeverría, O.; Martínez, E.; Ramos, C. y Vázquez-Nin, G. 1992. The ultrastructural study of the interphase

-
-
- nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: Triuridales) reveals a non-typical extranuclear particle. *Biology of the cell* 75: 101–110.
45. Jones, K. y Kniss, D. 1987. Propidium Iodide as a nuclear counterstain for immuno fluorescence studies on cells in culture. *The Journal of Histochemical and citochemistry*. 35: 123–125.
 46. Joubert, P.; Brown, J.; Hay, I. y Sebata, P. 1984. Acute poisoning with *Jatropha curcas* (purging nut tree) in children, *Medical Association of South Africa* 65: 729–730.
 47. Kärkönen, A.; Santanen, A.; Iwamoto, K y Fukuda, H. 2011. The Plant Cell Wall: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* 715: 1–20.
 48. Krinsky, N. y Johnson, E. 2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 26: 459–516.
 49. Krishan, A.; Uzman, B. y Hedley-Whyte, E. 1967. Nuclear bodies: a component of cell nuclei in hamster tissues and human tumors, *Journal of Ultrastructure Research* 19: 563–572.
 50. Lacayo, C.; Malkin, A.; Holman, H.; Chen, L.; Ding, S.; Hwang, M. y Thelen, M. 2010. Imaging cell wall architecture in single *Zinnia elegans* tracheary elements. *Plant Physiology* 154: 121–133.
 51. Ladygin, V. 2000. Biosynthesis of carotenoids in the chloroplasts of algae and higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 47: 796–814.
 52. Lira, J. 2002. Introducción al Tratamiento Digital de Imágenes. IPN–UNAM–FCE, México. pp.13–44.
 53. Luck, B. y Lafontaine, J. 1982. An ultracytochemical study of nuclear bodies in meristematic plant cells (*Cicer arietinum*). *Canadian Journal of Botany* 60: 611–619.
 54. Lutz, K. 2007. A guide to choosing vectors for transformation of the plastid genome of higher plants. *Plant Physiology* 145: 1201–1210.
 55. Maliga, P. 2003. Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends in Biotechnology* 21: 20–88.
 56. Martínez, A. 2003. Carotenoides. Universidad de Antioquía. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín, Colombia. pp. 2,4, 7, 9.

-
-
57. Martínez, M.; Cabrera, P. y Herrera, L. 2004. Las plantas transgénicas: una visión integral. e-Gnosis Revista Digital Científica y Tecnológica 2: 1–28.
 58. McCabe, D. y Christou, P. 1993. Direct DNA transfer using electric discharge particle acceleration (ACCELL TM technology). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33: 227–236.
 59. Menezes, R.; Rao, N.; Karanth, S.; Kamath, A.; Manipady, S. y Pillay, V. 2006. *Jatropha curcas* poisoning. Indian Journal of Pediatrics. 73: 634.
 60. Miranda, G. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Procesos Gráficos de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Ags. pp. 9–14.
 61. Nishino, H.; Murakoshi, M.; Tokuda, H. y Satomi, Y. 2008. Cancer prevention by carotenoides. Archives of Biochemistry and Biophysics 483: 159–163.
 62. Orbe, J. 2009. Evaluación cuantitativa de la expresión transitoria del gen *uidA* en callos de cempaxúchil (*Tagetes erecta*) por biobalística. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Zacatepec. Zacatepec, Morelos.
 63. Pérez, G.; Márquez, S. y Peña, A. 1997. Mejoramiento Genético de Hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp. 379.
 64. Poppof, N y Stewart, S. 1968. The fine structure of nuclear inclusions in the brain of experimental golden hamsters. Journal of Ultrastructure Research 23: 347–361.
 65. Pszczola, D.E. 1998. Natural colour: pigments of imagination. Food Technology 52: 72–82.
 66. Quintana, M. 2009. Transformación genética de cebolla (*Allium cepa* L.) mediante biobalística. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado México.
 67. Radice, S. 2004. Morfogenesis *in vitro*. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Echenique, V.; Rubistein, C. y Mroginsky, L., Eds. Ediciones INTA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. pp. 25–33.
 68. Ramos, V. 2009. Manipulación genética de células desdiferenciadas de cempaxúchil (*Tagetes erecta*) para modificar su contenido de carotenoides. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec, Morelos.

-
-
69. Richards, H.; Rudas, V.; Sun, H.; McDaniel, J.; Tomaszewski, Z. y Conger, B. 2001. Construction of GFP-BAR plasmid and its use for switchgrass transformation. *Plant Cell Reports* 20: 48–54.
 70. Roberts, A. y Haigler, C. 1994. Cell expansion and tracheary element differentiation are regulated by extracellular pH in mesophyll cultures of *Zinnia elegans* L. *Plant Physiol* 105: 699–706.
 71. Roberts, K. y McCann, MC. 2000. Xylogenesis: the birth of a corpse. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 517–522.
 72. Ruzin, S. 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press. New York. pp. 158–167.
 73. Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
 74. Sánchez, L. 2008. estudio de los plastídios en células *in vitro* de *Tagetes erecta* L., mediante microscopía óptica, electrónica y tratamiento digital de imágenes. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos.
 75. Sánchez-Millán, L.; Serrato-Cruz, M.; Del Villar-Martínez, A.; Vanegas-Espinoza, P.; Evangelista-Lozano, S.; Jiménez-Aparicio, A.; Quintero-Gutiérrez, A. y García-Jiménez, F. 2007. RAMAN Spectroscopy: A rapid, non-invasive tool for determining carotenoides in inflorescences of *Tagetes erecta* L. *Agrociencia* 41: 863–871.
 76. Sanford, J.; Smith, F. y Russell, J. 1993. Optimizing the biolistic, process for different biological applications. *Methods in Enzymology* 217: 483–509.
 77. Serrato-Cruz, M. 1994. Cempoalxóchitl y días de muertos. *Arqueología Mexicana* XII. pp. 68–71.
 78. Serrato, M.; Sánchez, J.; Barajas, J.; García, F.; Del Villar, A.; Arenas, M.; Aguirre, A.; Santiago, R.; Moreno, P.; Barradas, M. y Gómez, H. 2008. Carotenoides y características morfológicas en cabezuelas de muestras mexicanas de *Tagetes erecta* L. *Revista Fitotecnia Mexicana* 3: 67–72.

-
-
79. Sharma, K.; Bhatnagar-Mathur, P. y Thorpe, T. 2005. Genetic transformation technology: status and problems. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant* 41: 102–112.
 80. Simpson, M. 2006. *Plant Systematics*, Elsevier Academic Press. pp. 71–73.
 81. Smetanska I. 2008. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 111:187–228.
 82. Somers, D. y Makarevitch, I. 2004. Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes? *Current Opinion in Biotechnology* 15: 126–131.
 83. Sreekala, C. y Raghava, S. 2003. Exploitation of heterosis for carotenoid content in African marigold (*Tagetes erecta* L.) and its correlation with esterase polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 771–776.
 84. Svab, Z.; Haroper, E.; Jones, J. y Maliga, P. 1990. Aminoglycoside-3' adenyltransferase confers resistance to spectinomycin and streptomycin in *Nicotiana tabaccum*. *Plant Molecular Biology* 14: 197–205.
 85. Taylor, N. y Fauquet, C. 2002. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biology* 2: 963–977.
 86. Tok, J. y Bi, L. 2003. Aminoglycoside and its Derivatives as Ligands to Target the Ribosome. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3: 1001–1019.
 87. Tzfira, T.; Frankman, L.; Vaidya, M. y V. Citovsky, V. 2003. Site-specific integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-ADN via double-stranded intermediates. *Plant Physiology* 133: 1011–1023.
 88. Vain, P.; Keen, N.; Murillo, J.; Rathus, C.; Nemes, C. y Finer, J. 1993. Development of particle inflown gun. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 33: 237–246.
 89. Vallejos R.; Permingeat, H.; Ortiz, J.; Cervigni, G.; Orsaria L.; Regiardo, M. y Arana, J. 1992. Transformation of cereals: transgenic maize and wheat plants obtained by particle bombardment. *BIOCILA. Abstract CRT* 40
 90. Vanegas, P. 2003. Establecimiento de un sistema de regeneración y transformación genética de plantas de cempaxúchil. Tesis de Doctorado en Ciencias en Biotecnología de Plantas. CINVESTAV-IPN. Unidad Irapuato, México.

-
-
91. Vanegas, P.; Valdez-Morales, M.; Valverde, M.; Cruz-Hernández, A. y Paredes-López, O. 2006. Particle bombardment, a method for gene transfer in marigold. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 84: 359–363.
 92. Vázquez-Nin, G.; Echeverría, O. y Jiménez García, L. 2003. El núcleo interfásico morfología y función. En: Jiménez, F. y Merchant, H. 2003. *Biología Celular y Molecular*. Pearson Education. México. Pp. 341–394.
 93. Van Boxtel, J.; Berthouly, M.; Carasco, C.; Dufour, M. y Eskes, A. 1995. Transient expression of β -glucoronidase following biolistic of foreign DNA into coffee tissues. *Plant Cell Reports* 14: 748–752.
 94. Waizel, J. 2008. *Las Plantas Medicinales y las Ciencias, Una Visión Interdisciplinaria*. Instituto Politécnico Nacional. México. pp. 192–194.
 95. Weiguo, S. 1994. Early multicelular fossils. En: *Early Life on Earth*, Bengston, S. Columbia University Press. pp. 358–369.

11) ANEXOS

ANEXO 1) PREPARACIÓN DE MEDIO MS

Para la preparación de medio Murashige y Skoog semisólido (MS) (1962), se mezcla la sacarosa, las sales MS y las fitohormonas BA y 2,4-D, luego se ajusta el pH a 5.8. Acto seguido, se añade el Fitigel (Sigma) para después aforar al volumen requerido. Después, se vierte el medio en los frascos designados y finalmente se esterilizan en autoclave a una temperatura de 120°C y a una presión de 1.2 kg/cm² durante 15 minutos.

Para preparar MS líquido se sigue el mismo procedimiento exceptuando la adición de Fitigel. En la preparación de medio MS osmótico se añade D-Manitol 0.2 M (3.64 g por 100 mL de medio MS).

Reactivos para preparar un litro de medio semisólido MS.

REACTIVO	Concentración
Sacarosa	30 g / L
Sales MS	4.4 g / L
Fitohormona citocinina: BA	2 mg/ L
Fitohormona auxina: 2,4-D	2 mg / L
Ajustar pH a 5.8	
Fitigel	3 g / L

ANEXO 2) ANTIBIÓTICOS

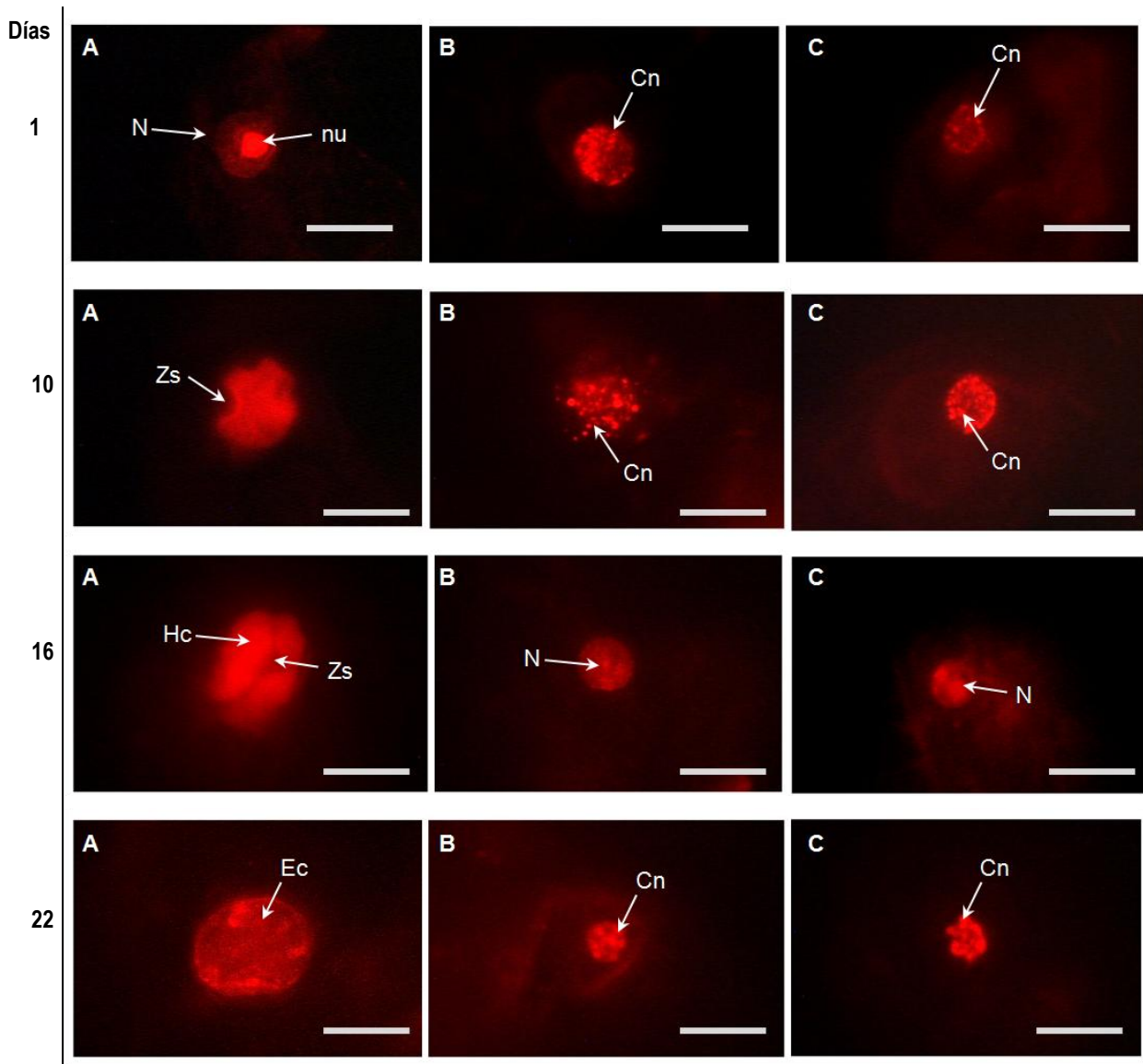
Kanamicina 100 mg / mL:

Disolver 1 g de sulfato de kanamicina en 10 mL de agua destilada estéril.

ANEXO 3) REACTIVOS PARA PREPARAR LA SOLUCIÓN DE REVELADO DE GUS.

Fórmula del Reactivo	Nombre del Reactivo	Concentración Stock
5 bromo-4-cloro-3-indolil-β-ácido glucurónico	Monociclohexil sal de amonio (X - GLUC)	1 mg/mL
Na₂HPO₄	Fosfato de sodio monobásico	0.2 M
NaH₂PO₄	Fosfato de sodio dibásico	50 mM
K₂Fe(CN)₆	Ferricianuro de potasio	0.5 mM
K₄Fe(CN)₆	Ferrocianuro de potasio	0.5 mM
Na₂C₁₀H₁₄N₂O*H₂O	EDTA	10 mM
T-octylphenoxyethoxyetanol	Tritón	0.1%

ANEXO 4) GALERÍA DE IMÁGENES DE LA MORFOLOGÍA DE NÚCLEOS



Micrografías de núcleos de células de callo de *T. erecta* material “porte bajo” a 1, 10, 16 y 22 días de cultivo.

A) núcleos celulares de callo no bombardeadas, B y C) núcleos celulares de callo bombardeado con pC35S β . Eurocromatina (**Ec**); cuerpo nuclear (**Cn**); heterocromatina (**Hc**); núcleo (**N**); nucléolo (**nu**) y zona de síntesis (**Zs**). En los 4 días se observa aumento del tamaño del núcleo en las células de callo no bombardeadas, en contraste con los núcleos de las células de callo bombardeado que además presentan cuerpos nucleares. Tinción con IP. Aumento 100 X. Barra, 10 μ m.