



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“REGENERACIÓN IN VITRO DE SORGO Y
ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE
BOMBARDEO PARA SU TRANSFORMACIÓN GENÉTICA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

INNAN GODÍNEZ GARCÍA



DIRECTORA DE TESIS:
ING. AGR. MARÍA TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES

- 2008 -



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno.

Godínez
García
Innan
54-29-82-95
Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de ciencias.
Biología
098218976

2. Datos de tutor

Ing. Agr.
María Teresa de Jesús
Olivera
Flores

3. Datos del sinodal 1.

Dra.
Josefina
Herrera
Santoyo

4. Datos del sinodal 2.

Dr.
Elpidio
García
Ramírez

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Patricia
Guevara
Fefer

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Víctor Manuel
Chávez
Ávila

7. Datos de la tesis

“Regeneración in vitro de sorgo y establecimiento de las condiciones de bombardeo para su transformación genética”.
154 p.
2008

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo es fruto no solo de una persona; sino de decenas y tal vez, porque no decirlo cientos de personas. Que a lo largo de mi vida han ido forjando en mí un carácter, una mentalidad, un ideal de superación, de lucha continua y de autodesarrollo en todos los aspectos de esta H. H. Vida. A quién por cierto aún no comprendo lo complejo de ésta.

Agradeciendo a mis padres: Julieta García R. y Efrén Godínez R. o Efrén Godínez R. y Julieta García R.; siendo que el orden de los nombres no altera el de cariño y amor recibido y brindado, ni de los jalones de orejas necesarios para mi formación. Quienes han soportado y apoyado mis "Buenas ideas". Solo me resta decirles: GRACIAS POR TODO!!!. Ah. por si se lo preguntaban: las buenas ideas siguen y seguirán; pero siempre con un poco más de prudencia al tonarlas y en caso dado que de todo falle; será culpa de los genes!!!.

A ese par de escuinclas locas Nahyeli y Mitzi; que día a día crecen más y más: Y poco a poco se van convirtiendo en un par de mujercitas, que espero me sepan escuchar, no para decirles lo que deben o no hacer, sino para aconsejarles y sigamos apoyandonos en cualquier situación; que a decir verdad esto se va a poner sabroso. "La vida no te pide más de lo que puedes dar; así que debes de continuar"

A todos los profesores que a lo largo de mi vida me ha sabido guiar; desde el kinder hasta universidad, me han dejado en mi parte de su existencia y un trozo de cariño con sus consejos; en especial Ariel Ovalles Toledo; Heriberto Vicente López.

A todos los integrantes del laboratorio 116 a Sr. Jorge, Fanny, Sr. Erick, Lore, María, Ivón, Cristal, Tecui, Mauricio, Rosa, Rocio, Mónica, Araceli, Deyanira, Francisco, Javier, Daniela, Elsa, Edith, Luís, Brenda, Roberto, Graciela, Priscila, Laura, Javier, Karina y por supuesto al Dr. Tavo y al Dr. Miguel Ángel Gómez Lim.

A la respetadísima M. en C. Aida Soto H. por siempre estar destruyendo los textos de los demás y por todas sus enseñanzas que trato de inculcarme, por su ayuda incondicional y siempre oportunos consejos.

A Mayte por soportar mis arrebatos y locuras, que en ocasiones le pusieron en aprietos. Por todas las oportunidades brindadas, esperando no haberte quedado mal. Gracias; por tus enseñanzas, no solo en el ámbito escolar sino también de la H.H. Vida.

A Fernandina a quién agradezco por los pasteles y las invitaciones a sus fiestas de cumpleaños deseandote lo mejor del mundo y todos tus seres queridos, pequeña.

A todos los compañeros de carrera: Ariana, Rodrigo, Eber, Roberto Sánchez, Cristián, Jorge, Ariadna, Carolina, Raúl, etc.

A todos los agremiados de la recarga de cartuchos (Simón, Lety) y de invitroorquid, sin ustedes esto largo caminar hubiera sido fatal. Así como a los amigos de la AMO.

A CONACyT por su apoyo económico en la finalización exitosa de ésta tesis a través del proyecto SAGARPA -2004-CO1-24 a cargo de la Dra. Elizabeth Loza Rubio.

CLAVE DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

Reguladores del crecimiento vegetal (RCV):

BA:	Benciladenina
Dicamba:	Ácido 3,6-Dicloro-o-anisico
AIB:	Acido indolbutírico
ANA:	Ácido naftalenacético
2,4-D:	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
BAP:	6-Bencilaminopurina
TDZ:	Feniltiazolurea (Thidiazurón)
KIN:	Cinetina

Medios de cultivo:

MS:	Medio nutritivo creado por Murashige y Skoog (1962).
N ₆ :	Medio nutritivo creado por Chu <i>et al.</i> (1975).

Peso:

µg:	microgramos
mg:	miligramos
g:	gramos

Longitud:

mm:	milímetros
cm:	centímetros

Otras:

H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno
dH ₂ O:	Agua desionizada
pH:	Potencial de hidrógeno
NaOH:	Hidróxido de sodio
HCl:	Ácido clorhídrico

ÍNDICE

Resumen.....	2
CAPÍTULO I	
Introducción.....	4
Revisión de literatura.....	5
Origen, domesticación y dispersión del sorgo.....	5
Clasificación taxonómica.....	7
Morfología y fisiología del sorgo.....	8
Cultivo del sorgo.....	12
Importancia económica y uso.....	14
Valor nutricional.....	16
La biotecnología y el cultivo de tejidos vegetales.....	18
Embriogénesis somática o asexual.....	20
Factores que influyen en la embriogénesis somática...	24
Organogénesis.....	26
Factores que influyen en la organogénesis.....	28
Oxidación en el cultivo <i>in vitro</i>	30
Cultivo <i>in vitro</i> de cereales.....	33
Cultivo <i>in vitro</i> de sorgo.....	35

El sorgo y la oxidación.....	38
Justificación.....	41
Objetivos e hipótesis.....	42
Materiales y métodos.....	43
Material biológico.....	44
Preparación del medio de cultivo.....	44
Condiciones de incubación.....	45
Métodos de esterilización de semillas.....	45
Selección de explante y medio de cultivo.....	47
Selección de antioxidante.....	51
Etapas de regeneración.....	52
Etapas de enraizamiento.....	53
Etapas de aclimatización.....	53
Resultados y discusión.....	55
Métodos de esterilización de semillas.....	55
Selección de variedad o híbrido a usar.....	59
Selección de explante.....	60
Influencia de la longitud de los coleóptilos sobre la respuesta <i>in vitro</i>	62
Selección de las sales inorgánicas para el medio de	

cultivo.....	63
Evaluación de medios de inducción para embriogénesis somática	65
Evaluación de medios de inducción para organogénesis.....	72
Selección de antioxidantes.....	76
Enraizamiento de las plántulas.....	78
Etapas de aclimatización.....	80
Conclusiones del capítulo I.....	84
Bibliografía.....	87
CAPÍTULO II	
Introducción.....	99
Revisión de literatura.....	101
Transformación genética de plantas.....	102
Transformación mediante <i>Agrobacterium</i>	104
Bombardeo con micropartículas.....	105
Parámetros involucrados con la transferencia genética..	106
Parámetros que afectan la introducción del DNA en el bombardeo.....	109
Los cultivos transgénicos.....	111
Transformación genética de los cereales.....	113

Transformación genética de sorgo.....	115
Vacunas comestibles.....	119
Virus de la rabia.....	123
Virus del oeste del Nilo.....	124
Justificación.....	126
Objetivos e hipótesis.....	127
Materiales y métodos.....	128
Material biológico.....	129
Plásmidos o cassetts.....	129
Selección y concentración del herbicida Basta.....	130
Establecimiento de parámetros para el bombardeo de sorgo Super Swett II [®] , realizando pruebas de tipo de explante, tamaño de bala y distancia entre el explante y el filtro.	131
Preparación de las partículas con el DNA para el bombardeo.....	132
Prueba de expresión transitoria de la enzima <i>gus</i> mediante el ensayo histoquímico en los explantes bombardeados.....	133
Pruebas de expresión transitoria de la enzima <i>gus</i> mediante el ensayo histoquímico en las plántulas regeneradas resistentes al agente de selección Basta [®]	134

Resultados y discusión	135
Tolerancia al Basta.....	135
Establecimiento de parámetros para el bombardeo de sorgo Super Swett II [®] , realizando pruebas de tamaño de bala y de distancia entre el explante y el filtro.....	139
Establecimiento del mejor explante a usar para lograr la transformación genética.....	134
Prueba de expresión transitoria del gen <i>gus</i> mediante el ensayo histoquímico en los explantes bombardeados.....	142
Selección y regeneración de plántulas de sorgo resistentes al Basta [®]	145
Pruebas de expresión transitoria del gen <i>gus</i> mediante el ensayo histoquímico en las plántulas regeneradas resistentes al agente de selección Basta [®]	147
Conclusiones	149
Bibliografía	150
Anexos.....	156

RESUMEN

El trabajo presentado a continuación se divide en dos capítulos: en el primero se abordan los pasos cruciales para la obtención de la regeneración y proliferación *in vitro* de sorgo; los cuales se inician con la obtención de un protocolo óptimo para desinfección de los explantes (evaluando 3 explantes: coleoptilo, embrión maduro y embrión inmaduro a partir de semillas maduras e inmaduras), para la cual se probaron seis tratamientos de desinfección en semillas maduras y cuatro métodos para las semillas inmaduras, evaluando diferentes soluciones químicas y agentes desinfectantes en distintos tiempos y concentraciones. Resultando los mejores para semillas maduras el método VI y para las semillas inmaduras el método D, en donde el H_2O_2 fue un factor crucial. Así mismo se realizaron pruebas para la selección del mejor medio de cultivo, iniciando con la selección de sales inorgánicas y orgánicas.

Para las rutas de regeneración se evaluaron dos auxinas (2,4-D y Dicamba) para inducir la embriogénesis somática y para la organogénesis se evaluó la combinación de BAP y ANA. Así mismo se procedió a evaluar distintos tipos de antioxidantes o adsorbentes para evitar una oxidación alta.

La evaluación de las distintas respuestas se basó en el porcentaje de inducción de callo o brotes según fuese el caso, apariencia, oxidación y capacidad regenerativa.

Los resultados obtenidos mostraron que las sales inorgánicas del medio MS en combinación con las vit-R2 fueron las más adecuadas para establecer las rutas regenerativas tanto para la embriogénesis como la organogénesis. En cuanto a la embriogénesis somática el medio de cultivo uno fue el más exitoso para el desarrollo de callo, mostrando que el 2,4-D a una concentración de 2 mg l^{-1} es suficiente para lograr la desdiferenciación del explante. Para la regeneración de plántulas, en pocos casos bastó la disminución de la auxina; siendo en la mayoría de éstos, necesario adicionar una citocinina débil para la regeneración, siendo necesario la realización de técnicas de histología para asegurar que se trata de embriones somáticos.

La ruta de la organogénesis se vió más favorecida con el medio nueve el cual contiene una combinación de ANA y BAP de 0.5 mg l^{-1} y 4 mg l^{-1} respectivamente; obteniéndose hasta 30 plántulas a partir de un coleoptilo, logrando una alta regeneración de estas plántulas.

Para ambas vías regenerativas se probaron distintos medios cuyo fin fue lograr un óptimo enraizamiento de las plántulas asiendo uso de distintas auxinas, resultó el mejor el medio Ra5 que contenía 2 mg l^{-1} ANA. Para la fase de aclimatización, se utilizó papel filtro como tapa de los frascos, para reducir la humedad relativa en el interior del mismo; posteriormente se realizaron pruebas con distintas combinaciones de sustratos para obtener un mejor desarrollo de las raíces y por los tanto de una buena adaptación de la planta; en un modelo de mini invernadero.

En el segundo capítulo se abordó la transformación genética de coleoptilos de sorgo mediante la técnica de biobalística. Partiendo desde la realización de las pruebas para saber la tolerancia de sorgo silvestre al herbicida Basta, para que éste fungiera como agente de selección y sólo lo resistan las plantas transformadas, la concentración seleccionada fue de 2 mg l^{-1} . Se probaron varios parámetros de importancia como lo son la distancia entre el explante y el filtro así como el tamaño de bala de tungsteno haciendo uso de una cámara de baja presión. La combinación de los parámetros antes mencionados que dieron mejor resultado fue a 13 cm de distancia y usando el tamaño de bala M5. Con miras para el desarrollo de vacunas comestibles los dos cassettes usados para los bombardeos de los explantes, correspondieron a construcciones que codifican para dos proteínas: uno es para la proteína G del virus de la rabia y el otro para la proteína E del virus del oeste del Nilo.

Abriendo así la posibilidad de un sin fin de usos económicos y de investigación, ya sea que la transformación genética del sorgo, sea con el fin de conferir tolerancia a herbicidas, insectos y plagas, aumentar las propiedades nutricionales o lograr la producción de anticuerpos, para que funja como vacunas orales para usos agrícolas y ganaderos o como modelo para la investigación básica.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) o cultivo *in vitro* juega un papel muy importante para realizar estudios que serían imposibles obtener *in vivo* (Pérez 1999; Robert y Dennis, 2000), dando resultados de enorme importancia para la agricultura, horticultura y silvicultura (Pierik, 1990); entre los más importantes se encuentran aquellos que permiten cruzar las barreras biológicas; mediante la transformación genética (Sánchez, 1986). Para lo cual es necesario contar con un sistema de cultivo de tejidos eficiente; iniciando con la obtención de métodos de desinfección del los explantes, seguidos por la búsqueda de métodos de regeneración y un sistema de transferencia genética sencilla, económico y reproducible (Birch, 1997; Vidales, 2002).

Un sistema de regeneración *in vitro*, ya sea a través de la organogénesis o embriogénesis somática, requiere la definición de los componentes del medio de cultivo (compuesto orgánicos e inorgánicos, antioxidantes, etc) para sus diferentes etapas, la definición de los RCV a usar y las concentraciones de los mismos; que son determinantes en el crecimiento y desarrollo celular, ya que estimulan o reprimen la elongación y la división celular, según sea el tipo, la combinación y la concentración (Salisbury y Ross, 1994; Klee y Estelle 1991).

El sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) es una planta originaria de África Central (House, 1982), ocupa el quinto lugar como grano cultivado en el mundo y en México, es el segundo cultivo cíclico más importante, después del maíz (SAGARPA, 2002). Es usado para la alimentación de más de 300 millones de personas en el mundo y en la elaboración de alimentos balanceados para consumo animal, debido a su tolerancia a la sequía, suelos alcalinos y salinos y temperaturas extremas, en comparación con otros cereales (Able, 2001). Sin embargo es catalogado como el más recalcitrante de todos los cereales y por ende una de las plantas más difíciles de trabajar en CTV y transformar (Zhao, 2000). Por ello surge el interés de establecer un protocolo óptimo para su proliferación y regeneración *in vitro*, posibilitando con ello una gran gama de beneficios y aplicaciones entre las más importantes se encuentra la posibilidad para su mejoramiento genético a través del uso de la ingeniería genética.

REVISIÓN DE LITERATURA

ORIGEN, DOMESTICACIÓN Y DISPERSIÓN DEL SORGO

El sorgo se originó en África Central (Etiopía o Sudán), y por ello es donde se encuentra la mayor diversidad de tipos. Esta diversidad disminuye hacia el norte de África y Asia.

Es difícil determinar dónde o cuándo se llevó a cabo su domesticación. Murdock en 1959 sugirió que la domesticación se dio por los habitantes de Mande, alrededor del Río Níger. Doggett en 1965 indicó que las evidencias arqueológicas sugieren que la práctica de la domesticación del cereal se produjo cuando se introdujo de Egipto a Etiopía alrededor del año 3000 a.C. (House, 1982; Yohannes *et al.*, 2003) (Figura 1).



Fig.1. Centro de origen del sorgo

Sobre su origen existen dos hipótesis:

La primera defendida por Wet y colaboradores (1970), indica que el sorgo se originó del *Sorghum verticilliflorum* el cual se encuentra distribuido en áreas en donde se cultiva sorgo; y dicha especie al igual que otras especies silvestres se cruzan fácilmente con el sorgo cultivado.

La segunda es defendida por Snowden (1936) y Porteres (1951) quienes sugieren que las razas *Durra*, *Guinea* y *Caffra* están estrechamente relacionadas y pudieron haberse originado de *S. aethiopicum*, *arundinaceum* y *verticilliflorum* respectivamente. Sin embargo es difícil demostrarlo experimentalmente (House, 1982).

Las razas silvestres encontradas en África Central y del Este no son aconsejables para usar en la agricultura actual, pero los fitogenetistas continúan buscándolos para crear nuevos germoplasmas, con el objeto de incorporar características deseables dentro de las líneas genéticas actuales.

La dispersión del sorgo sigue siendo motivo de conjeturas. Probablemente la raza *Durra* fue introducida a Arabia desde el imperio Sabeo (1000 a 800 a.C.) y se dispersaron después hacia el cercano oriente a lo largo de las rutas comerciales. A la India llegó de igual manera. No es un cultivo muy antiguo en la India, siguió a la introducción de la cebada, que data del siglo I d.C. (House ,1982).

La distribución sugiere que el *Sorghum bicolor* se introdujo a China desde la India, alrededor del tercer siglo d. C.

El sorgo como cultivo doméstico llegó a Europa aproximadamente hacia el año 60-70 d.C. pero nunca se extendió mucho en este continente.

En cuanto a América, el conocimiento del sorgo es relativamente nuevo. Se introdujo por primera vez a los Estados Unidos de Norteamérica en 1857. En donde los primeros colonos lo cultivaron debido a su tolerancia a la sequía, suelos alcalinos, salinos y temperaturas extremas, en comparación con otros cereales. Utilizándose extensamente a principios de los años 1900 para la producción de jarabe.

Respecto a centro y sur de América el cultivo adquirió rasgos de importancia hacia los años cincuenta del siglo pasado. La producción de sorgo en México data de la década de los 1960's (House ,1982).

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

El sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) se conoce con varios nombres: mijo grande y maíz de Guinea en África occidental, kafir en África austral, duro en el Sudán, mtama en África oriental, iowar en la India y kaoliang en China (House,1982).

Actualmente el sorgo presenta la siguiente clasificación taxonómica (Tabla 1).

Tabla1. Clasificación taxonómica.	
Reino:	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Plantas vasculares</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Liliopsida</i>
Subclase:	<i>Liliidae</i>
Orden:	<i>Poales / ciperales</i>
Familia:	<i>Poaceae (gramíneas)</i>
Subfamilia:	<i>Panicoideae</i>
Género:	<i>Sorghum (L.) Moench</i>

Especies

S. alnum, *S. amplum* , *S. angustum*, *S. arundinaceum*, *S. bicolor*, *S. brachypodium*, *S. bulbosum*, *S. burmahicum*, *S. controversum*, *S. drummondii*, *S. ecarinatum*, *S. exstans*, *S. grande*, *S. halepense*, *S. interjectum*, *S. intrans*, *S. laxiflorum*, *S. leiocladum*, *S. macrospermum*, *S. matarankense*, *S. miliaceum*, *S. nitidum*, *S. plumosum*, *S. propinquum*, *S. purpureosericeum*, *S. stipoides*, *S. timorense*, *S. trichocladum*, *S. versicolor* y *S. virgatum*, *S. bicolor*.

Modificado de: (Smith y Frederiksen, 2001).

Las subespecies se pueden dividir en cuatro grupos:

- Sorgos del grano.
- Sorgos forrajeros (para el pasto y el heno)
- Sorgos dulces (jarabes del sorgo)
- Sorgo tipo escoba (para las escobas y los cepillos).

MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DEL SORGO

El sorgo es un cereal mayor, con características típicas de las gramíneas. Presenta anatomía Kranz y es una planta con metabolismo C4. Es uno de los cereales más resistentes a periodos largos sin agua; en condiciones de sequedad y calor extremos, la planta entra en fase de letargo o latencia y cuando la situación mejora recupera la actividad metabólica (Sánchez y Ramoa 2005).

Es una planta originalmente de día corto, sin embargo, los híbridos que actualmente se manejan son de día largo por lo que se cultivan en el ciclo primavera – verano.

Tallo: El sorgo es generalmente una planta con un solo tallo. Pero varía mucho en su capacidad de ahijamiento dependiendo de la variedad, la población de plantas y el ambiente. Muchos tipos son perennes. La altura varía de 45 cm a más de 4 m y depende del número de nudos que es igual al número de hojas producidas. La altura depende también del entrenudo, el pedúnculo y la panícula y todos estos factores están bajo control genético independiente. (Sánchez y Ramoa, 2005).

Los tallos tienen 7 a 24 nudos y son erectos, sólidos con una corteza dura y una médula suave. El diámetro del tallo varía de 5 a 30 mm en la base. Las yemas son alternas y las inferiores pueden formar hijos axilares poco después del desarrollo de raíces coronarias; mientras que las superiores pueden desarrollarse como ramas laterales especialmente si se daña el ápice de crecimiento.

Pedúnculo: Es el entrenudo más alto que lleva la inflorescencia y es siempre el más largo. Una buena ejerción permite que los granos queden fuera de la vaina de la hoja bandera y entonces se reduce el daño por plagas y enfermedades en la parte inferior de la panícula. La longitud del pedúnculo o ejerción está controlada genéticamente, pero los factores ambientales como deficiencia de agua pueden ejercer efectos pronunciados (Figura 2).

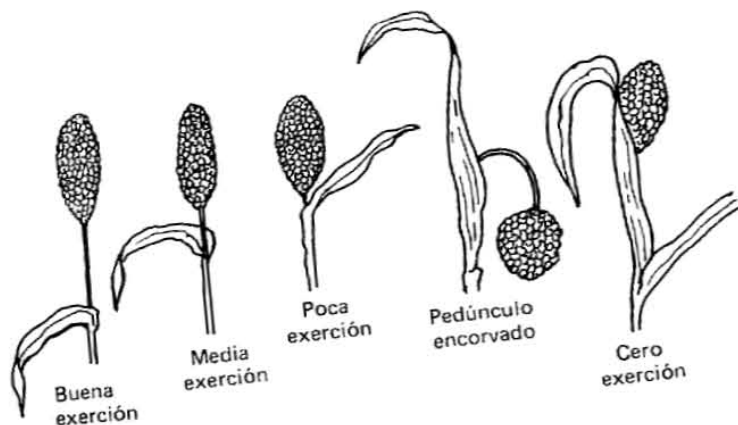


Fig. 2. Varios tipos de pedúnculo.

Fuente: <http://www.qro.itesm.mx/agronomia2/extensivos/CSorgoIndice.htm>, 2005

Hojas: el número de hojas varía de 7-24 según la variedad y la longitud del periodo de crecimiento. Las hojas maduras son de 30 a 135 cm de largo y 1.5 a 15 cm de ancho. Son alternas y lanceoladas o linear-lanceoladas con una superficie superior lisa y cerosa. Los estomas están en fila sencilla o doble en ambas superficies de la lámina. La última hoja producida es la hoja bandera y su vaina protege la inflorescencia que está emergiendo.

Raíz: la radícula sencilla, es responsable del establecimiento de la plántula y es temporal. El sistema radical adventicio fibroso se desarrolla de los nudos más bajos del tallo. La profundidad del enraizado es de 1 a 2 m con el 80% de las raíces en los primeros 30 cm. Los depósitos de sílice en la endodermis de la raíz probablemente la fortalecen y la hacen soportar presiones altas durante las épocas de sequía.

Los pelos absorbentes pueden ser el doble en número que los del maíz (<http://www.infoagro.com/herbaceos/forrajes/sorgo.asp>) (Figura 3).

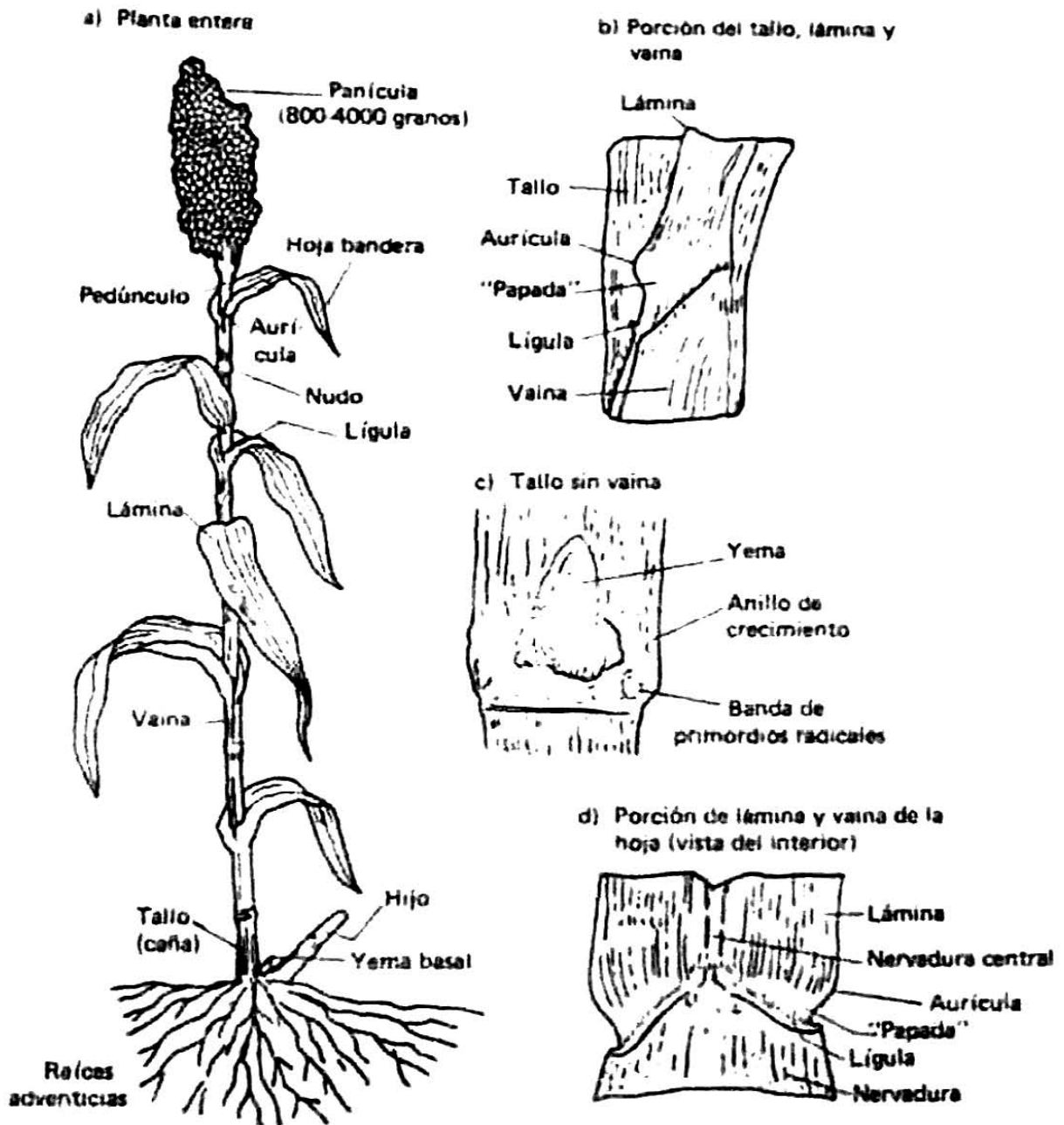


Fig. 3. Esquema de planta de Sorgo

Tomado de: <http://www.qro.itesm.mx/agronomia2/extensivos/CSorgoIndice.htm>, 2005

Las flores son generalmente hermafroditas; perianto nulo o en todo caso representado por 2 ó en ocasiones 3 pequeñas piezas escamosas llamadas lodículas; androceo de 3 estambres; gineceo de ovario unilocular y con 2 estigmas plumosos. Encerrando la flor, hay 2 brácteas llamadas glumelas; la glumela inferior o lema está bien desarrollada y a menudo presenta una arista; la gluma superior o pálea que es membranosa y a veces muy reducida. Una o comúnmente varias flores constituyen la inflorescencia elemental de las gramíneas: la espícula o espiguilla, la cual presenta basalmente 2 brácteas, denominadas glumas. Las espículas a su vez se reúnen en panículas, racimos o espigas. Frutos en cariósido (House, 1982).

Inflorescencia: es una panícula de racimos con un raquis central completamente escondido por la densidad de las ramas de la panícula o totalmente expuesto. La exarición de la panícula es importante para la cosecha mecanizada y para la tolerancia a plagas y enfermedades. La panícula es corta o larga, suelta y abierta, compacta o semi-compacta; puede tener de 4 a 25 cm de largo, de 2 a 20 cm de ancho y llevar de 400 a 8000 granos (Figura 4).

Las semillas de 3-5 mm esféricas y oblongas, de color negro, rojizo y amarillento.



Fig. 4. Panoja de Sorgo.

Tomado de: <http://es.wikipedia.org/wiki/Sorgo> (2007).

CULTIVO DEL SORGO.

El cultivo se adapta desde el nivel del mar hasta altitudes de 3,000 metros sobre el nivel del mar y en un intervalo que va desde los 40° de latitud Sur hasta los 45° de latitud Norte (Figura 5) (<http://www.infoagro.com/herbaceos/forrajes/sorgo.asp>).

Para lograr una buena germinación, las semillas se deben sembrar a 5 cm de profundidad, debe tener una temperatura no inferior a los 15 °C. El crecimiento de la planta no es verdaderamente activo hasta que se sobrepasan los 18 °C, situándose el óptimo hacia los 32 °C. Los descensos de temperatura en el momento de la floración pueden reducir el rendimiento del grano; al producir esterilidad de las espiguillas y afectar la viabilidad del grano de polen. La siembra debe coincidir con el inicio de las lluvias de primavera para que el sistema radicular se desarrolle y se establezca bien antes de que se inicien los períodos secos estacionales (House, 1982; Álvarez 2000).

Por otra parte, necesita menos cantidad de agua que el maíz para formar un kilogramo de materia seca. El sorgo resiste la sequía más que el maíz. Es capaz de sufrir sequía durante un periodo de tiempo bastante largo, y reanudar su crecimiento más adelante cuando cesa la sequía.

Responde favorablemente a la irrigación, lográndose excelentes resultados bajo riego. Requiere un mínimo de 250 mm durante su ciclo para llegar a producir grano y pueden obtenerse buenos rendimientos con 350 mm pero, para lograr altas producciones, el requerimiento de agua varía entre 450 y 600 mm, dependiendo del ciclo del híbrido elegido y las condiciones ambientales.

Las mayores exigencias en agua comienzan unos 30 días después de la emergencia y continúan hasta el llenado de los granos, siendo las etapas más críticas las de panojamiento y floración, puesto que deficiencias hídricas en estos momentos producen importantes mermas en los rendimientos (Sánchez y Ramoa, 2005).

Este cultivo se adapta a los climas más áridos debido a su:

- Sistema radicular.
- Dormancia.
- Enrollamiento de las hojas.
- Baja relación de transpiración.
- Cubierta cerosa.

Además de su tendencia de permanecer latente (reanudar el crecimiento cuando sale del estrés hídrico), la planta de sorgo produce también nuevas cañas cuando se rompe la humedad si la sequía no fue prolongada (<http://www.monografias.com>). El sorgo tolera mejor la sequía y el exceso de humedad en el suelo que la mayoría de los cereales. Sobrepasa al maíz en rendimiento en lugares con elevada precipitación, ya que puede tolerar mejor las condiciones de extrema humedad (Sánchez y Ramoa, 2005; Álvarez, 2000).

Se desarrolla bien en terrenos alcalinos, sobre todo las variedades azucaradas que exigen la presencia en el suelo de carbonato cálcico, lo que aumenta el contenido en sacarosa de tallos y hojas. Prefiere suelos sanos, profundos, no demasiado pesados. Soporta algo la salinidad. Algunas zonas de cultivo son: sur y suroeste de África, norte de Europa, Oeste de la India, oeste de Estados Unidos y norte y centro de México, figura 5 (<http://www.infoagro.com/herbaceos/forrajes/sorgo>).



Fig. 5. Zonas del mundo donde se cultiva el sorgo (Sánchez y Ramoa, 2005).

IMPORTANCIA ECONÓMICA Y USO

El sorgo es el quinto grano cultivado más importante en el mundo después de trigo, maíz, arroz y cebada, y el segundo cereal más importante después del maíz según la FAO (Cuadro 1).

Tabla 1. Producción de los principales cereales en el mundo. Año agrícola 2002.

Cultivo	Superficie Cultivada (ha)	%	Rendimiento (Ton/ha)	Producción (Ton)	%
Trigo	210,785,147	31.77	2.70	568,108,477	27.96
Arroz	146,029,456	22.01	3.97	579,476,722	28.52
Maíz	138,896,695	20.93	4.34	606,026,822	29.83
Cebada	54,013,738	8.14	2.44	131,558,348	6.48
Sorgo	42,103,351	5.56	1.31	55,340,825	2.72
Mijo	36,885,951	6.35	6.98	25,762,606	1.27
Centeno	9,564,291	1.44	2.17	20,747,085	1.02
Avena	13,493,832	2.03	2.05	27,711,619	1.36
Triticale	2,980,773	0.45	3.47	10,356,389	0.51
Otros cereales	8,786,801	1.32	-	6,659,767	0.33
T o t a l	663,540,035	100.00	3.06	2,031,748,660	100.00

Fuente: Base de Datos FAO. Página de Internet: www.fao.org.

El sorgo se emplea básicamente para dos distintas finalidades: alimentación humana y elaboración de alimentos balanceados para consumo animal.

Forma parte de la dieta básica de 300 millones de personas en China, India y África. En La India y en el oeste de África, algunas variedades se pueden usar como sustituto del arroz así como para elaborar pan «rotti » en la India.

En los países industrializados se cultiva sobre todo como planta forrajera en la alimentación de los animales, utilizándolo como fuente de energía para satisfacer las necesidades pecuarias, se incluye hasta en un 60% dentro de la dieta de los no rumiantes, principalmente aves y cerdos. Tal es el caso en América y Oceanía, la mayor parte del sorgo producido se emplea para consumo animal (Caamal y Ávila 2004; Álvarez 2000).

La utilización de sorgo para consumo animal se ha duplicado, pasando del 30 al 60% de principios de los años sesenta a la actualidad, mientras que para consumo humano ha disminuido ligeramente.

En México el sorgo se utiliza principalmente para la elaboración de alimentos balanceados para consumo en monogástricos y rumiantes. Se aprovecha muy bien en la alimentación de bovinos, cerdos y aves, se pueden lograr, valores nutricionales similares al maíz, aunque en el caso de monogástricos fundamentalmente debe tenerse en cuenta que el empleo de sorgos marrones de alto porcentaje de taninos, en elevadas proporciones en las dietas, trae inconvenientes en la eficiencia alimenticia, reduciendo la eficiencia hasta en un 30%; por lo cual se requiere que los taninos sean previamente desactivados (Sánchez y Ramoa 2005).

La introducción del cultivo al país es relativamente reciente, para el año de 1961 se cultivaron 116,993 hectáreas, mientras que en 1999 ya se cosechaban alrededor de 2 millones de hectáreas. Lo anterior se explica, porque las empresas de alimentos balanceados, así como las grandes explotaciones ganaderas que existen en México, han venido demandando la producción de sorgo para la formulación de varias dietas para el ganado, utilizando como insumo principal el sorgo (Arcos, 2002).

México es uno de los países con mayor producción de sorgo en el mundo, ocupa el quinto lugar en superficie cultivada con 1.8 millones de hectáreas y el cuarto lugar en producción con 5.5 millones de toneladas. El rendimiento promedio del sorgo en México es de 2.97 ton/ha y está por arriba del promedio mundial, que es de 2.09 ton/ha (Sagarpa, 2002; Arcos, 2002).

Los principales estados productores de sorgo en México son: Tamaulipas, Guanajuato, Michoacán y Sinaloa; representaron el 32.4, 24.6, 13.0 y 7.4% de la producción total, respectivamente; estos cuatro estados produjeron el 77.3% del volumen de la producción en el 2002. El sorgo en México, es el segundo cultivo cíclico más importante, después del maíz (Sagarpa, 2002; Arcos, 2002).

VALOR NUTRICIONAL.

El valor energético del grano de sorgo es un poco inferior al del maíz. La energía metabolizable verdadera corregida para balance de nitrógeno cero (EMVN) oscilan entre 3181 Kcal/Kg y 3676 Kcal/Kg enmarcado un intervalo de variación en donde quizás el grado de reactividad de la molécula de taninos constituya un factor importante a considerar (Jaramillo *et al.*, 1993).

Comparándolo con el grano de maíz, el de sorgo es generalmente un poco más rico en proteínas, pero más pobre en materia grasa que presentan un valor biológico bastante débil. En las pruebas realizadas se ve que el sorgo es deficiente en aminoácidos esenciales como es el caso de lisina, cisterna, glicina, serina y triptófano (Cuadros 1 y 2).

Cuadro 1. Composición química del grano de seis cultivares de sorgo.

Cultivares	Proteína	Grasa	Fibra	Cenizas	Taninos
-	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
SV-V5I	11.23	4.92	1.55	1.60	0.16
DEKALB-55	11.52	4.93	1.49	1.67	0.37
DEKALB-64	11.56	4.29	1.35	1.58	0.05
WAC-5005	11.74	4.65	1.18	1.55	0.09
PIONEER-815B	8.70	5.23	2.28	1.84	0.62
SAVANNA-5	13.09	4.60	2.27	1.91	2.19
PROMEDIO	11.47	4.77	1.69	1.69	0.58

Fuente: Arteaga y Ortiz, 1989.

Cuadro 2. Composición de aminoácidos de la proteína de los cultivares CH-3, NKSAV-5 y P816-B procedentes de la cosecha 2 (g/100g de proteína).

Aminoácido	CH-3	NKSAV-5	P816-B
Lisina	2,27	1,88	2,20
Metionina	2,10	2,03	2,03
Cisteina	2,01	2,03	1,94
Triptófano	cnc	0,38	cnc
Treonina	3,27	3,16	3,21
Arginina	3,94	3,61	3,80
Histidina	2,35	2,25	2,28
Leucina	12,84	12,70	13,43
Isoleucina	3,78	3,38	3,89
Valina	4,87	4,28	5,07
Fenilalanina	4,87	4,96	5,24
Tirosina	3,36	3,38	3,46
Alanina	8,89	8,87	9,21
Ac. Aspártico	6,88	6,76	7,09
Ac. Glutámico	19,38	19,08	19,93
Prolina	8,22	8,11	8,26
Glicina	3,61	3,08	3,13
Serina	3,94	4,13	4,05
cnc=concentración no cuantificable			

Fuente: Jaramillo *et al.*, 1993

LA BIOTECNOLOGÍA Y EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El hombre y la biotecnología han estado en contacto desde los comienzos de la historia en actividades como la preparación del pan y de bebidas alcohólicas o el mejoramiento de cultivos y de animales domésticos.

La biotecnología se puede definir como la utilización de organismos vivos o partes de los mismos, para obtener o modificar productos, mejorar plantas o animales o desarrollar microorganismos para objetivos específicos. Abarca desde la biotecnología tradicional (conocida y establecida) por ejemplo la fermentación de alimentos, hasta la biotecnología moderna, basada en la utilización de las nuevas técnicas de ADN recombinante (ingeniería genética), los anticuerpos monoclonales y los nuevos métodos de cultivo de células y tejidos; derivados de la investigación en biología celular y molecular (Pérez,1998). Es una ciencia multidisciplinaria que engloba entre otras a la genética molecular, la ingeniería química y de proceso, la anatomía animal y vegetal, la bioquímica, la microbiología, la inmunología, la biología celular, la agricultura y la electrónica entre otras muchas ciencias (Pieik *et al.*,1990; Vasil *et al.*,1994; Buetow *et al.*, 2000). Actualmente la biotecnología presenta la siguiente clasificación (Pérez, 1998):

- * Biotecnología animal
- * Biotecnología humana
- * Biotecnología industrial
- * Biotecnología vegetal y ambiental

Dentro de la biotecnología vegetal se encuentra el cultivo de tejidos vegetales (CTV) o cultivo *in vitro* como una rama de ésta. Definido como el cultivo de todo tipo de células, tejidos, órganos, embriones y protoplastos bajo condiciones asépticas (Smith y Drew, 1990), artificiales y controladas (temperatura, composición química del medio de cultivo, luz y humedad, atmósfera, pH, reguladores de crecimiento, etc. (Pierik, 1990).

A partir de estos avances dentro CTV se fueron desarrollando varias técnicas que permiten hoy en día lograr la clonación a partir de plantas élites, el cultivo de plantas haploides, la formación de embriones somáticos, la obtención de plantas libres de virus, etc. En estos momentos el CTV juega un papel muy importante para realizar estudios que serían imposibles obtener *in vivo* (Pérez *et al.*, 1999; Robert y Dennis, 2000), dando resultados de enorme importancia para la agricultura, horticultura y silvicultura (Pierik, 1990).

Una de las aplicaciones más importantes actualmente que tiene el CTV es para lograr el mejoramiento de las plantas con la utilización de los avances en la biología molecular y la ingeniería genética al abrir un gran número de posibilidades experimentales en la investigación genética de plantas.

(www.inicia.cl/biotecnologia/c_tejidos.htm).

Para lograr la transformación genética eficiente de una planta es necesario primero contar con un sistema de cultivo de tejido eficiente; es decir con métodos de regeneración exitosos y un sistema de transferencia genética sencilla, económico y reproducible (Birch, 1997; Vidales, 2002).

Un sistema de regeneración *in vitro*, ya sea a través de la organogénesis o embriogénesis somática, requiere la definición de los componentes del medio de cultivo para sus diferentes etapas, por ser determinantes en el crecimiento y desarrollo celular; los reguladores de crecimiento vegetal (RCV); (auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico) son los más importantes en el proceso de crecimiento o diferenciación ya que estimulan la elongación y la división celular, según sea el tipo, la combinación y la concentración (Salisbury y Ross, 1994) y en todos los aspectos de desarrollo (Klee y Estelle 1991; Davis 1995/ cit. por Muñoz, 2003; Vidales, 2002).

Mediante el manejo de los tipos, concentraciones y combinaciones de estos compuestos en un medio de cultivo se pueden manipular los patrones de desarrollo de los tejidos y obtener las respuestas deseadas como la formación del tejido calloso, brotes, embriones y raíces.

Cada tejido responde de manera diferente a una misma concentración de RCV a causa de las diferencias en el contenido de reguladores endógenos. Lo que significa que los tejidos tienen diferentes sensibilidades, esto es que la capacidad de respuesta a éstos está dada por la cantidad de receptores específicos para los reguladores del crecimiento presentes en el tejido.

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA O ASEXUAL.

Se define como la formación de un embrión a partir de una célula diferente a un gameto o al producto de la unión de gametos, siendo conocida en la naturaleza como una forma de apomixis, la cual recibe el nombre de embrionía adventicia (Merkle *et al.*, 1995).

En cultivo de tejidos las estructuras pseudoembrionarias se obtienen a partir de células somáticas, las cuales se desarrollan para formar embriones completamente análogos a los embriones cigóticos (con todas sus etapas: globular, acorazonado y torpedo). Un embrión somático es una estructura bipolar independiente es decir, no está físicamente unida a su tejido de origen, contiene dos meristemas, el de brote y el de raíz; semejantes a los embriones zigóticos (Arnold, 2002). Normalmente las células de las plantas son totipotenciales, razón por la cual las células somáticas pueden convertirse en embriones ver figura 6 (Eudes *et al.*, 2003; Ajay y Suresh, 2003; Ikeda-Iwai *et al.*, 2003).

La producción de dichos embriones a partir de cultivos de células, tejidos u órganos puede tener lugar por dos vías, por la embriogénesis directa (sin una fase intermedia de callo) y por la embriogénesis indirecta tras la formación de callo. Para la embriogénesis somática directa, el embrión cigótico inmaduro, es muchas veces usado como explante y la respuesta del embrión depende en gran parte del estado de desarrollo en el que se encuentra el explante, ésta suele tener lugar a partir de un explante mantenido en un medio de cultivo sólido y puede utilizarse para la micropropagación de una serie ilimitada de especies.

La vía de la embriogénesis somática indirecta, por la cual los embriones somáticos son inducidos y desarrollados por la proliferación de callo y células en suspensión es generalmente más común (Arnold, 2002).

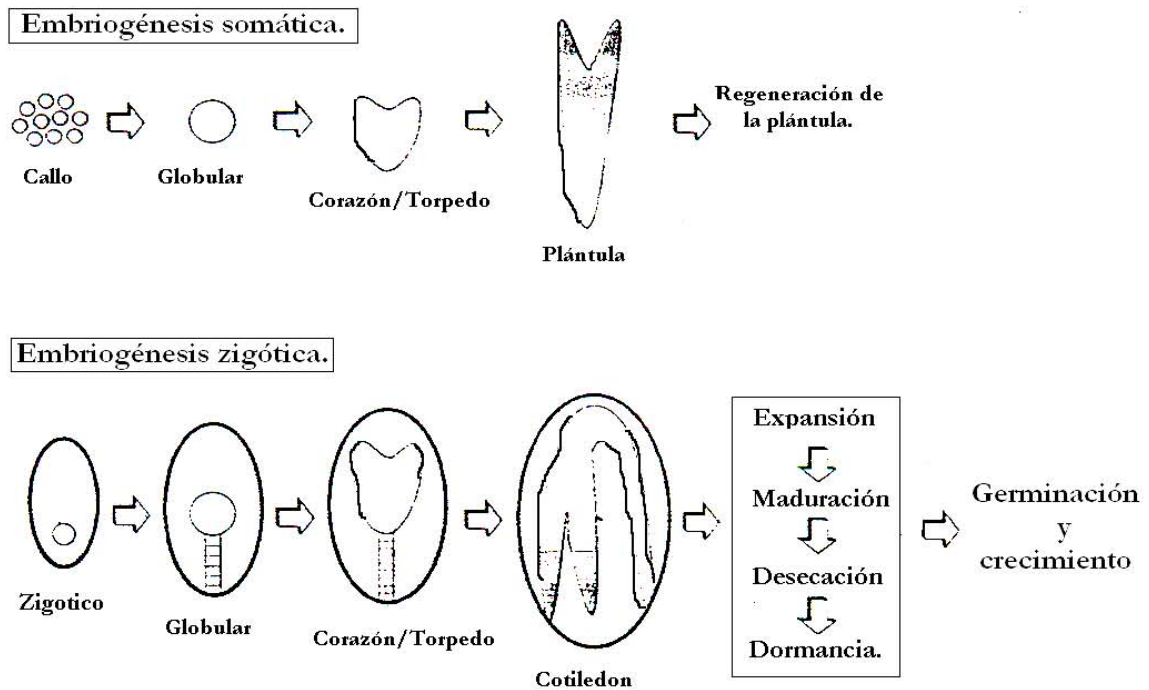


Fig. 6. Comparación de la embriogénesis somática y la zigótica (Tomado de: Arnold *et al.*, 2002).

Las células embriogénicas parecen ser muy similares a las células meristemáticas en las que hay un pequeño y denso citoplasma, un gran núcleo y nucleolo prominente y contiene muchas vacuolas pequeñas, gotitas de lípidos y granos de almidón. Las células no embriogénicas usualmente tienen vacuolas grandes y granos variables. Los cultivos embriogénicos son altamente heterogéneos; pueden contener una mezcla de estructuras organogénicas y embriogénicas (Su, 2002; Lindsey y Jones, 1989; George y Sherington, 1984; Arnold, 2002).

Los embriones somáticos pueden desarrollarse y germinar para formar plantas, de modo análogo a la germinación de los embriones cigóticos. Para activar la embriogénesis en células somáticas se necesita de estrés, esto ocurre en algunos casos al realizar cultivo de tejidos y exponerlos a condiciones distintas en un medio con minerales, vitaminas, RCV, hormonas, altas concentraciones de azúcar y/o alta temperatura, durante la etapa de la adaptación se encienden genes que conllevan a cambios fisiológicos y metabólicos (Feher *et al.*, 2003).

El empleo de auxinas fuertes es la mejor manera de inducir la formación de células embriogénicas desde células somáticas. En raras ocasiones se han logrado la embriogénesis somática sin RCV (Feher *et al.*, 2003; Popelka *et al.*, 2003; Popelka y Altpeter, 2003). La inducción de la división celular en el explante como una respuesta a esta auxina puede resultar en un callo con crecimiento desorganizado o bien en un crecimiento polarizado coordinado para la formación de un embrión (Gómez, 1998).

La embriogénesis somática se puede dividir en cuatro estadios (Muñoz, 2003):

- Desarrollo

El estadio temprano o pre globular de los embriones somáticos pueden ser reconocidos generalmente por el contenido de citoplasma denso y la ausencia general de vacuolización (Krikorian, 1995; Halperin, 1995/ cit. por Muñoz, 2003).

- Proliferación

En esta etapa por lo regular se emplean auxinas y citocininas juntas para proliferar o multiplicar los embriones (Merkle *et al.*, 1995).

- Maduración

La maduración es el período en el que el embrión somático sufre expansión de sus células y la acumulación de sustancias de reserva (Bewley y Black, 1985/cit. por Gómez, 1998). En esta etapa juega un papel fundamental la presencia de nitrógeno en el medio de cultivo, siendo necesario el suplemento con nitratos, amonio,

aminoácidos y caseína hidrolizada. Los carbohidratos son esenciales, junto a bajas concentraciones de oxígeno en el medio, lo cual permite una maduración total y evita la germinación precoz figura 7 (Merkle *et al.*, 1995).



Fig. 7. Estadios dentro de la embriogénesis somática del mijo.
(Tomado de: Alvarez, 2005).

- Germinación: Durante este estadio los embriones somáticos maduros son transferido a medios con una baja concentración de auxinas o sin éstas, promoviendo el desarrollo meristemáticos normal de los brotes y las raíces; el cual se encontraban inhibido por las auxinas (Merkle *et al.*, 1995).

Gordon-Kamm *et al.*, (1990) han resaltado la importancia de utilizar los cultivos embriogénicos para la transformación genética, ya que en estos tejidos la regeneración vegetal se lleva a cabo por la vía de embriogénesis somática, en donde la regeneración de plantas parte de una sola célula o de un pequeño grupo de células aumentando la posibilidad de obtener plantas totalmente transformadas por esta vía (Mere y Vázquez, 2003).

Factores que influyen en la embriogénesis somática.

Medios de cultivo.

La composición del medio de cultivo es de gran importancia para el surgimiento de embriones somáticos.

La presencia de nitrógeno es un factor importante en la composición del medio, ya que se ha reportado que la adición de nitrato en altas concentraciones al medio de cultivo junto con compuestos nitrogenados reducidos tales como sales de amonio; que es esencial para el adecuado crecimiento y diferenciación de embriones inmaduros (Hu, 1986). Los medios más usados son el MS (Murashige y Skoog, 1962) y N₆ (Chu *et al.*, 1975) en donde cada uno contiene distinta cantidad de nitrógeno: 20.6 mM de NH₄, 39.4 mM de NO₃, 7 mM de NH₄ y 28 mM de NO₃ respectivamente (Jiménez, 2006).

Así mismo, se sabe que el potasio estimula la embriogénesis, especialmente si existe la falta de nitrógeno (Pierik, 1990; Razdan, 2003). Mientras que el AgNO₃ estimula la producción de callo tipo II y la regeneración al competir con el etileno por los sitios de unión (Vain *et al.*, 1989; Songstad *et al.*, 1992/ cit. por Jiménez 2006).

Otros elementos cruciales para la formación del callo embriogénico son reguladores de crecimiento, fuente de carbono, así como sales y vitaminas (Robert y Lozoya, 1985) entre las cuales se encuentran: tiamina, ácido nicotínico y piridoxina (Evans *et al.*, 2003). Siendo las mezclas de vitaminas MS, N₆ y B₅ los más mencionados en la literatura.

Ciertos aminoácidos, especialmente L-prolina, alanina y glutamina estimulan fuertemente la respuesta embriogénica (Reinert *et al.*, 1967; Reinert y Tazawa 1969; Halperin y Wetherell 1965; Kamada y Harada 1979; Walker y Sato 1981/ cit. por Mere y Vázquez 2003).

Los reguladores de crecimiento que contiene el medio juegan un papel sumamente importante siendo las auxinas fuertes como el 2,4-D o Dicamba, las que inducen la embriogénesis somática. Por la iniciación de la activación diferencial de genes, promoviendo el incremento de la población de células embriogénicas mediante una división celular repetitiva. Simultáneamente existe la supresión de la diferenciación celular (Razdan, 2003). La auxina más reportada en artículos para las gramíneas es el 2,4-D.

La remoción de estos reguladores de crecimiento provocan que las masas de células no diferenciadas sigan un patrón de organización que resulte en la formación de embriones somáticos (Ribnicky, 1996).

Dos factores que también son importantes son: la luz y la temperatura en donde los requerimientos de cada uno de éstos varía acorde a la especie vegetal trabajada (Robert y Lozoya, 1985; Razdan, 2003).

Material biológico utilizado.

La elección del genotipo y el explante es crucial en la obtención de respuesta embriogénica (Gray, 2000; Gray y Meredith 1992). Se sabe que la carga genética que tienen los explantes influye marcadamente en la dificultad o facilidad con la que se pueden obtener los callos embriogénicos y su regeneración.

La edad fisiológica, ontogénica del órgano y la longevidad de los tejidos influye en gran medida debido a que éstos pierden su potencial respuesta con el tiempo, posiblemente a causa de cambios cariotípicos y de ploidía en respuestas a la presencia de auxinas, además de probables cambios epigenéticos (Pierik, 1990). Otros factores importantes son la etapa de desarrollo del explante, así como el aprovechamiento de nitrógeno (Tomes 1985) y la presión osmótica del medio de cultivo (Gray, 2000).

ORGANOGENESIS.

La organogénesis es la habilidad de los tejidos vegetales para la formación de varios órganos *de novo* (Robert y Dennis, 2000); en la cual brotes o raíces han sido inducidos por diferenciación de una célula o un grupo de células. La nueva estructura formada es unipolar (con un polo apical o uno radical, de modo que se genera un tallo o una raíz) y su tejido vascular está físicamente conectado al tejido de origen (Chávez, 1993; Segura, 1994/cit. Muñoz, 2003).

En la organogénesis se pueden distinguir las siguientes etapas: desdiferenciación de células diferenciadas (que conducen probablemente a una redefinición y rejuvenecimiento de las células); división celular, generalmente seguida por formación de callo, cuando se dirige a la división celular, se puede comenzar la iniciación de órganos, su formación y por último el desarrollo de éstos (Pierik, 1990; Schwarz y Beaty, 2000).

La regeneración de plantas completas por medio de organogénesis *in vitro* se da normalmente en dos fases, la primera es la producción y crecimiento de tallos a partir de callo, hojas, cotiledones, hipocótilos, etc. y como segunda, su posterior enraizamiento. El desarrollo de esta metodología ha dado un mayor impulso y eficiencia a algunas estrategias ya utilizadas en campo, ahorrando tiempo, espacio y dinero. Pueden utilizarse para: inducir variabilidad genética, operación que se puede efectuar a nivel de célula, tejido u órgano; recuperar embriones inmaduros, obtener plantas libres de patógenos, mediante el cultivo de meristemos libres de virus, bacterias, hongos, etc., crear híbridos somáticos entre especies sexualmente incompatibles mediante la fusión de protoplastos, micropropagación a partir de yemas preformadas, producir líneas homocigas de haploides duplicados, mediante el cultivo de anteras, etc., eliminando factores ambientales adversos del cultivo *ex vitro* (Sairam *et al.*, 2003; Somers *et al.*, 2003).

En 1980 Hicks se dio cuenta de que existen 2 vías de desarrollo de la organogénesis. Si el brote o raíz es inducido y desarrollado directamente del explante sin haber sufrido una fase de callo, es llamado organogénesis directa u organogénesis adventicia. En contraste la organogénesis indirecta implica una fase inicial de proliferación de tejido de callo que contiene células competentes de las cuales se originarán brotes en gran cantidad, los cuales tendrán que ser individualizados y transferidos a un nuevo medio para su desarrollo y establecimiento (Su, 2002; George y Sherington, 1984). Esta última vía puede incrementar las posibilidades de incrementar las variaciones en la constitución cromosómica de los órganos resultantes, ver ejemplo de organogénesis en figura 8 (Somers *et al.*, 2003).

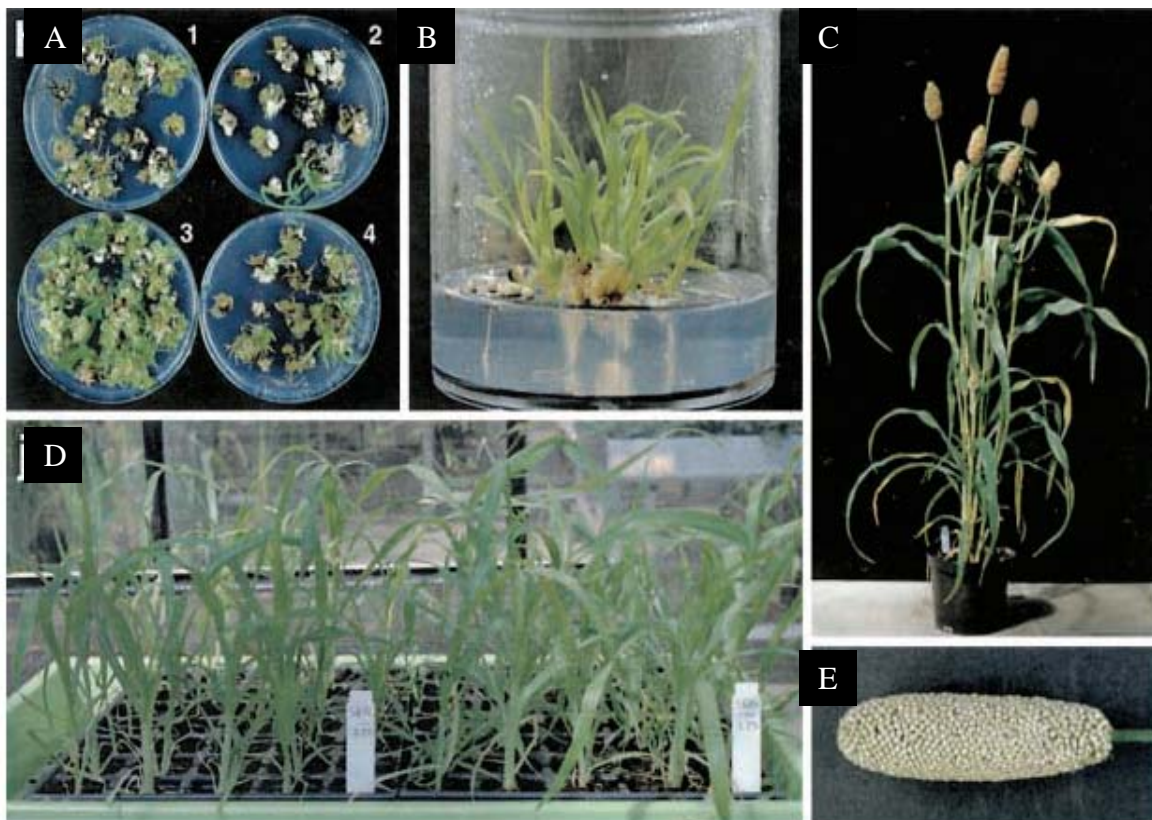


Fig.8. Regeneración organogénica de Mijo A) Organogénesis indirecta B) Crecimiento de brotaciones C-D) Aclimatización en invernadero E) Semillas.
Tomado de: Oldach *et al.*, 2001.

Factores que influyen en la organogénesis.

Medios de cultivo.

Al igual que en la embriogénesis el medio de cultivo es sumamente importante para una óptima respuesta organogénica ya que los requerimientos de las distintas especies manejadas varían, esos factores pueden ser: reguladores de crecimiento, fuente de carbono, así como sales y vitaminas (Robert y Lozoya, 1985). La presencia de nitrógeno es también un factor importante en la composición del medio; dado que la deficiencia de éste, es un factor limitante para la formación las estructuras *de novo*.

Respecto a los reguladores de crecimiento; la inducción de raíces generalmente tiene lugar en medios con concentraciones de auxinas débiles (ANA y AIA), relativamente altas, pero concentraciones de citocininas bajas. La iniciación de primordios radicales generalmente requiere una concentración de auxinas más alta que la que se necesita para el posterior crecimiento de los mismos primordios. Las raíces y los vástagos se forman por lo general de forma completamente independiente unos con respecto a los otros, no existe conexión entre ellos, aunque se originen a partir de un callo al mismo tiempo (Su, 2002; Pierik, 1990; Rodríguez, 2006).

La formación de vástagos puede producirse, si existe una baja concentración de auxinas y una alta concentración de citocininas. En algunas ocasiones se producen raíces adventicias en la base de los vástagos adventicios (Rodríguez, 2006).

Luz.

La luz juega un papel importante en la inducción de organogénesis (Murashige, 1974), los efectos del fotoperiodo son muy diversos y varían entre los taxas, siendo influenciados por los niveles endógenos de reguladores de crecimiento.

El fotoperiodo más usado es de un ciclo lumínico de 16 h y 8 h de oscuridad. Esto dado que el requerimiento de luz para la inducción de brotes es elevado la cual estimula su desarrollo en la mayoría de los casos, aunque existen especies que en condiciones de oscuridad se favorece la formación de vástagos (Pierik, 1990).

En la inducción de raíces la presencia de luz puede disminuir su aparición ya que las condiciones de oscuridad podrían semejar a las condiciones de suelo en las que se desarrollaría la planta en forma natural (Razdan, 2003; Rodríguez, 2006).

Temperatura.

Al igual que la luz, las temperaturas elevadas estimulan la formación de brotes (Pierik, 1990), sin elevarla demasiado; es conveniente proporcionar la misma que recibe la planta en su hábitat natural, tal es el caso de aplicar $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Herman, 1995).

Material biológico utilizado.

En la mayor parte de los casos, la formación de órganos vía organogénesis se induce mucho más fácilmente en plantas juveniles que en plantas adultas (Su, 2002; Pierik, 1990; Lindsey y Jones, 1989; George y Sherington, 1984). Las plantas en estado vegetativo responden mejor que la plantas en floración (George y Sherington, 1984; Pierik, 1990).

En algunas plantas cualquier segmento de un órgano tiene aproximadamente la misma capacidad regenerativa (hojas, tallos, raíz, yemas, capítulo florales, anteras, etc.). Si existen diferencias, pueden ser explicadas generalmente por el hecho de que en la hoja o tallo, hay tejidos de diferentes edades. Por otro lado, también se han encontrado grandes diferencias, según las zonas, en capacidad de regeneración de algunos órganos (Pierik, 1990). Otros factores importantes son el tamaño de los explantes y las lesiones que estos presentan (Schwarz y Beaty, 2000/ cit. por Rodríguez, 2006).

OXIDACIÓN EN EL CULTIVO IN VITRO.

La oxidación fenólica llega a convertirse en un serio problema dentro del cultivo *in vitro*; esto debido a que el medio de cultivo actúa como receptáculo de los productos de excreción de las células que crecen en él. Existen varias especies vegetales que son ricas en compuestos polifenólicos o especies con un alto contenido de taninos u otros hidroxifenoles (ej. ácido clorogénico) tales como las leñosas, sin embargo estos taninos se encuentran en un amplio número de vegetales, ocasionando dificultad para el establecimiento *in vitro* de éstas. Así mismo otro factor que influye en la oxidación es la edad del explante (Schwarz y Beaty, 2000; Pérez 1999, Carvalho, 2004).

Según Preece y Compton (1991) y Hu y Wang (1983) citados por Jiménez (1998), cuando los tejidos son dañados o sufren una herida (escisión) se liberan compuestos fenólicos (que están acumulados en grandes cantidades en las vacuolas) y al mezclarse con el contenido de los plastidios y otros organelos donde están confinadas las polifenoloxidasas se produce un proceso de oxidación y como consecuencia de ello aparece una coloración negra o marrón (ennegrecimiento del medio de cultivo alrededor del explante y que se puede extender a todo el medio, provocar daños al crecimiento y hasta la muerte del explante; esto debido a que los productos de la oxidación son altamente reactivos e inhiben la actividad enzimática propiciando un oscurecimiento letal de los explantes (Schwarz y Beaty, 2000).

Los fenoles son productos extremadamente lábiles que se oxidan con gran facilidad así compuestos de quinona altamente activos con la ciclasa, polimerasa y oxidasa para ir formando cada vez más compuestos melánicos. Estos productos pueden ser fitotóxicos y a la vez incrementan los procesos de oxidación, ya que al oxidarse se convierten en agentes oxidantes. Dando como consecuencia una irreparable inhibición del crecimiento del explante.

Una de las prácticas más comunes para contrarrestar el efecto de la oxidación fenólica, es agregar antioxidantes al medio de cultivo, los que son inhibidores de la polifenoloxidasas o adsorbentes.

Para contrarrestar el efecto de la oxidación se recurre a:

- Realizar enjuagues con soluciones antioxidantes previo y posterior a la disección de los explantes.
- Adición de antioxidantes al medio de cultivo (inhibidores de la polifenoloxidasas o adsorbentes).
- Cambios frecuentes de medio de cultivo. Cada vez que se observe la fenolización.
- Disminución de la intensidad luminosa o cultivo en la oscuridad.
- Empleo de medios líquidos en sustitución de medios gelificados.
- Modificación del pH y del potencial redox del medio.
- Cambio en el nivel de sacarosa.

Entre los antioxidantes más empleados se encuentran: ácido cítrico, ácido ascórbico, Polivinilpirrolidona (PVP[®]), pirogalol L-cisteína, Ditiotreitól, Tiourea y carbón activado (adsorbente). Entre las sustancias orgánicas usadas se encuentran el agua de coco y la albúmina de suero bovino. Una práctica interesante llevada en el cultivo de caña para evitar la oxidación es sembrar el explante de forma invertida con el fin de que la zona de corte no esté en contacto con el medio (Pérez 1998, Pérez 1999, Carvalho, 2004).

El ácido cítrico es un ácido tricarboxílico ampliamente distribuidos en tejidos animales y vegetales cuyos grupos ácido e hidroxilo le permiten tener propiedades antioxidantes, además de ser un agente secuestrador de metales traza (Uribe 1998).

La cisteína es un aminoácido polar que contiene un grupo sulfhidrilo, el cual es muy reactivo y extremadamente susceptible a la oxidación a disulfuro por el oxígeno atmosférico en presencia de sales de hierro u otro oxidante suave.

El pirogalol ($C_6H_6O_3$) 1,2,3 trihidroxibenceno, es un compuesto perteneciente a la familia de las proantocianidinas, de origen fenólico proveniente de algunas plantas; proviene del galato y generalmente son productos provenientes de flavonoides, taninos y lignina. Estos compuestos tienen la capacidad de formar complejos con proteínas ricas en prolina y mucopolisacáridos. Soluble en agua, alcohol y éter. Insoluble en benceno, cloroformo y disulfuro de carbono. Se caracteriza por ser un buen reductor y se ha utilizado para absorción de oxígeno en análisis de agua (Uribe, 1998).

El carbón activado es un buen adsorbente, atrapa compuestos fenólicos; pero también auxinas y citocininas, de ahí que se tenga cautela para su uso dado que puede disminuir la eficiencia morfogénica; al adsorber estos reguladores, la concentración disponible en el medio se reduce considerablemente.

CULTIVO IN VITRO DE CEREALES:

Previo a los 80's del siglo pasado los cereales eran famosos por su recalcitrancia que obstaculizaba su regeneración bajo condiciones de cultivo *in vitro* y la transformación genética; pese a este desafío los investigadores como: Nakano y Maeda, 1979; Shimada y Yamada, 1979, reportaron la regeneración de plantas a partir del desarrollo de meristemas adventicios provenientes de callos. Por otro lado Dunstan *et al.*, 1979 mediante la ruptura de la dominancia apical logró la formación de brotes múltiples.

Entre los años de 1979 y 1981 se realizaron 4 descubrimientos considerados como la base para todos los trabajos modernos en la regeneración y la transformación genética de los cereales.

- A) La utilización de embriones inmaduros, segmentos de inflorescencias jóvenes o bases de hojas jóvenes prestando atención y precisando los estadios de desarrollo.
- B) Utilización de medios de cultivo con altas concentraciones del herbicida 2,4-D el cual actúa como una auxina.
- C) Se logró mantener cultivos por más tiempo dando paso a la regeneración de plantas predominantemente por medio de embriogénesis somática.
- D) Usando cultivos en suspensión de callos embriogénicos se había logrado la obtención de protoplastos totipotentes.

Convirtiéndose de este modo la embriogénesis somática en una alternativa para trabajar con cereales recalcitrantes al igual que lo había sido con otras especies de interés comercial como algodón, papaya, papa y muchas especies de árboles maderables (Thorpe, 1995/ cit. por Vasil, 2005).

Vasil en 1980 fue el primero en obtener el cultivo embriogénico en cereales quien describió la embriogénesis somática en *Pennisetum americanum*. Siendo pionero en este campo, desarrolló cultivos embriogénicos en todos los cereales y en algunas especies de pastos.

Uno de los primeros en realizar experimentos con protoplastos fue Georg Melchers que realizó investigaciones para inducir la división celular a partir protoplastos de mesófilo aislado de las hojas de trigo, maíz, cebada y centeno; realizando 120,000 variaciones de medios de cultivo, condiciones, nutrientes, uso de enzimas, etc. Por su parte Arthur Galston (1978) intentó la obtención de protoplastos de la avena usando 20,000 condiciones distintas. Ambos proyectos titánicos fueron fallidos.

Las explicaciones para dichos fracasos fueron: la falta de división celular que pudiera deberse a un bloqueo mitótico en la división nuclear (Jiménez ,1998), esto debido a la incapacidad del los protoplastos para sintetizar ADN, también a la intervención de factores genéticos o lesiones causadas durante el aislamiento de protoplastos responsable de una división celular sostenida, la carga genética y las especificidades epigenéticas del explante pueden ser responsables para el fracaso de protoplastos del cereal y células para desarrollar el cultivo, una posible pérdida irreversible del potencial para la división celular (Vasil, 2005) y finalmente, que los protoplastos de cereal son constitutivamente incapaces de una división sostenida (Hurtado y Merino 1994).

En los experimentos subsecuentes se trabajaron con protoplastos provenientes de otros tejidos que fueran totipotentes y tratando de establecer líneas celulares regenerables; dado que las existentes en esos momentos eran efímeras y rápidamente perdían su habilidad de regenerar las plantas. Vasil fue el primero en lograrlo partiendo de callos embriogénicos de *Pennisetum glaucum*. Mostrando que los protoplastos obtenidos poseían divisiones celulares sostenidas dando lugar a embriones somáticos y a plantas (Vasil y Vasil, 1981/ cit. por Vasil, 2005). Lu *et al.*, 1981 obtuvieron resultados similares en pasto de Guinea (Vasil y Vasil *et al.*, 1983) en pasto de Napier la eficiencia de regeneración fue baja (1–2%).

Actualmente ya se cuenta con líneas embriogénicas de arroz, maíz y varias especies de céspedes; mediante el cultivo en suspensión de protoplastos se lograron regenerar plantas (Vasil, 2005).

CULTIVOS *IN VITRO* DE SORGO.

Los primeros experimentos sobre el cultivo de sorgo *in vitro* datan de los años 70's del siglo pasado extendiéndose hasta el presente siglo; en donde varios científicos iniciaron la búsqueda de protocolos exitosos de regeneración; a partir de diferentes tipos de explantes tales como embriones inmaduros, inflorescencias inmaduras, cariósides inmaduras, raquis y brotes o segmentos de éstos (Masteller y Holden, 1970; Brar *et al.*, 1979; Kaeppler y Pedersen, 1997; Boyes y Vasil, 1984; Elkonin *et al.*, 2000; Ma y Liang, 1987; Cai *et al.*, 1987; Bhaskaran *et al.*, 1988; Bhaskaran y Smith, 1988, 1989, 1990; Eapen y George, 1988, 1990; Cai y Butler, 1990; Lusardi y Lupotto, 1990; Nahdi y De Wet, 1995; Sairam *et al.*, 2000; Bhaskaran *et al.*, 2006 y Seetharama *et al.*, 2000).

La mayoría de experimentos tienen en común la búsqueda de la embriogénesis somática (usando auxinas fuertes como: 2,4-D, picloram) y el uso del medio MS.

Pese a algunos logros obtenidos mostrados en la tabla 2; la frecuencia de reportes de regeneración de sorgo era muy baja siendo éste uno de los principales inconvenientes para su transformación genética.

Zhu *et al.*, 1998; categorizan al sorgo como una de las plantas más difíciles de trabajar en cultivo de tejidos vegetales y transformar. Mientras que Able *et al.*, 2001; mencionan que el sorgo es el más recalcitrante de todos los cereales.

Sin embargo las altas concentraciones de NH_4^+ y bajas concentraciones de NO_3^- dan como resultado la formación de un callo compacto; mientras que el incremento de NO_3^- (39.9–82.4 mM) resultan en la proliferación de callo friable en algunos genotipos. Por su parte el aumento de PO_4^{3-} (de 8.8 a 14.2 mM) mostró el incremento en la embriogénesis somática (Elkonin y Pakhomova, 2000).

Tabla 2: Regeneración de sorgo *in vitro*.

AUTOR	OBJETIVO	EXPLANTE	ASEPSIA DEL EXPLANTE	MEDIO INDUCTOR	MEDIO REGENERACIÓN - ENRAIZAMIENTO
Casas <i>et al.</i> , 1993.	callo embriogénico	Embriones cigóticos inmaduros (12-15 días después de la polinización)	N.R	MS + Vitaminas B ₅ + asparagina 150 mg l ⁻¹ + 10% agua de coco + 2,4-D 2 mg l ⁻¹	Regen.: MS + Vitaminas B ₅ + AIA 1 mg l ⁻¹ + Kin 0.5 mg l ⁻¹ + azúcar 20 g l ⁻¹ Enraiz.: MS al 50%, + ANA 0.5 mg l ⁻¹ + AIA 0.5 1 mg l ⁻¹
Mythili <i>et al.</i> , 1999.	callo embriogénico	Meristemos apicales (0.5–0.8 mm)	N.R	Medio liquido MS + 2.5 mg l ⁻¹ de 2,4-D. Agitación de 100 rpm	Regen.: medio liquido MS+ 0.25 mg l ⁻¹ kinetina + 0.25 mg l ⁻¹ BAP Enraiz.: MS sin RCV.
Elkonin y Pakhomova; 2000.	Influencia del nitrógeno y el fósforo en el callo de sorgo	Embriones cigóticos inmaduros o fragmentos de panículas	Etanol al 70%, Cloramina al 5%	MS o N6 + azúcar 87.6 mM +, mioinositol 0.6 mM + B ₁ 3.0 μM, B ₆ 4.9 μM + 2,4-D (4.5 μM) + agar 7 g l ⁻¹ pH 5.8–6.0	Regen.: MS, 5.7 μM IAA, 0.5 μM kinetin.
Able J. <i>et al.</i> , 2001.	Callo embriogénico.	Embriones inmaduros (11-16 días después de la antésis)	Etanol al 70%	MS + vitaminas B ₅ + 2g l ⁻¹ hidrolizado de caseína + 2mg l ⁻¹ 2,4-D pH 5.8 Madur.: MS + vitaminas B ₅ + 2% sacarosa + 1g l ⁻¹ hidrolizado de caseína + 0.025 mg l ⁻¹ ABA	Regen.: MS + vitaminas Gamborg + 2% azúcar + 2g l ⁻¹ hidrolizado de caseína + 1mg l ⁻¹ AIA + 0.5mg l ⁻¹ Kinetina. Enraiz.: MS + vitaminas Gamborg + 1.5% sacarosa + 2mg l ⁻¹ ANA
Oldach <i>et al.</i> , 2001.	Callo	Embriones inmaduros con 10 a 20 días después de la polinización	70% etanol + hipoclorito de sodio 2% + 0.5 % Mucasol por 30 min	MS + 2.5mg l ⁻¹ 2,4-D + 0.1mg l ⁻¹ BAP	Regen.: MS + 1mg l ⁻¹ BAP
Harshavardhan <i>et al.</i> , 2002.	Embriogénesis somática directa	Meristemos apicales	Etanol al 70% por 30 seg blanqueador comercial 40% + Tween-20 por 30 m	MS + 5.0 μM de TDZ + 1 7.72 μM BAP + 1.074 μM ANA	Regen.: MS+ 17.72 μM y 2.69 μM ANA. Enraiz.: MS al 50% + 8.28 μM AIB + 1.14 μM AIA.

Nirwan y Kothari, 2002	Callo embriogénico	Embriones maduros	Etanol al 70% por 1 min + 1% HgCl ₂ por 3 min.	Probando distintas concentraciones de cobre. MS + 2,4-D 9µM + Kin 2.3 µM.	Regen. fue MS + Kinetina 9.2 µM + AIA 2.85 µM Enraiz.:MS al 50% + ANA 10.7 µM
Girijashankar <i>et al.</i> , 2005.	Embriogénesis somática	Meristemos apicales 7 días de germinación extrayéndolos de hipocótilos	N.R	MS suplementado con 4 mg l ⁻¹ BAP y 0.5 mg l ⁻¹ 2,4-D	Germ.: MS +4 mg l ⁻¹ BAP y 0.1 mg l ⁻¹ NAA. Regen.:MS +1 mg l ⁻¹ BAP and 0.5 mg l ⁻¹ IBA
Kishore y Visarada, 2006.	Induciendo callo	Meristemos apicales 6 mm	Teepol (Glaxo, India) al 0.1% (v/v) por 10 min y cloruro de mercurio 0.1% por 4 min.	MS+ 2.5 mg l ⁻¹ 2,4-D Brotos: MS + 2 mg l ⁻¹ BAP + 0.5 mg l ⁻¹ 2,4-D.	Regen.: MS + 0.5 mg l ⁻¹ BAP + 0.25 mg l ⁻¹ IBA Enraiz.: MS + ANA 0.1 %.
Tadesse <i>et al.</i> , 2003	Embriogénesis somática	Embriones inmaduros 12-15 días posteriores a la antésis y meristemo apical 3-5 mm.	Etanol al 70% por 10 min. y 0.1% HgCl ₂ 20 min	MS + tiamina HCl 1mg l ⁻¹ + Glicina 7.5mg l ⁻¹ + DL-asparagina 100mg l ⁻¹ + myoinositol 100mg l ⁻¹ + Kinetina 0.2 mg l ⁻¹ + 2.5 mg l ⁻¹ 2,4-D	MS + tiamina HCl 1mg l ⁻¹ + Glicina 7.5mg l ⁻¹ DL-asparagina 100mg l ⁻¹ + myoinositol 100mg l ⁻¹ + Kinetina 0.5 mg l ⁻¹
Boyes , 1984	E.S	Segmentos de retoño Raquis—2-4 mm Inflorescencia 10 mm	Etanol 95% +cloro 20 % 15'	MS + sacarosa 3 % leche de coco 5% tiamina- HCl 0.4mg l ⁻¹ y 2,4-D 0.01- 5.0 mg l ⁻¹	Raíces:MS + sacarosa 2% ANA 0.5 mg l ⁻¹ Callo: 1mg l ⁻¹ 2,4-D y organización a 0.1-0.5 mg l ⁻¹
Bhaskaran y Smith, 1988, 1989.	Callo	Segmento de brotes de meristemos.	Antifúngicos	MS + 2,4-D 2.5 mg l ⁻¹ 0.5-2.5 BA	BA 2.5 mg l ⁻¹
Vasil; 1984	Callo embriogénico	Cariopsides inmaduro 10-15 días después de la polinización. (long. 1-2 mm) inflorescencia joven	Etanol 70% 30 seg + cloro 20% 20 min. y cloruro de mercurio al 0.01-0.10%	Callo: MS + 0.5- 2.5 mg l ⁻¹ 2,4-D y sacarosa de 2 a 6 % + (ocas. citosina 0.1 – 2.5 mg l ⁻¹) + leche de coco 5- 10% e hidrolizado de caseína 500 mg l ⁻¹	N. R

Eapen George (1990)	Callo embriogénico	Inflorescencia Inmadura de 4-8 cm. (2-4 mm)	Etanol 70%	MS + 2mg l ⁻¹ de picloram + 1mg l ⁻¹ zeatina	Planta: MS + 0.1mg/l BA, (germ 18 %) 2iP, KN ó Z (germ 33 %) Enraiz.: MS + 1mg l ⁻¹ NAA
Eapen George Maydica (1988)	Callo embriogénico	Inflorescencia Inmadura (2-3 mm)	Etanol 70% después del corte.	Callo: MS + 2mg l ⁻¹ de 2,4-D + 0.1mg l ⁻¹ zeatina	Brotos: Callo nodular transferido a MS+ KN 0.1-0.5 mg l ⁻¹ Enraiz.: MS + ANA 0.1mg l ⁻¹
Lusardi Lupotto 1990	Callo embriogénico	Embriones inmaduros inflorescencias inmaduras y meristemos apicales.	Etanol absoluto 20 seg. con cloro a 13% y Tween 80 con 5 enjuagues de agua E.	MS+ sacarosa 2% 100mg l ⁻¹ de minositol 2.5mg l ⁻¹ 2,4-D y 0.05 mg l ⁻¹ de kinetina y leche de coco.	Propagación : MS+ sacarosa 2% 100mg l ⁻¹ de minositol 1mg l ⁻¹ 2,4-D y 0.05 mg l ⁻¹ de cinetina y leche de coco. Enraiz.: MS
Bhaskaran <i>et al.</i> , 2006.	Callo embriogénico	Segmentos de raíces de 0.3-0.5mm de 7 días	2% (v/v) Teepol por 3 min 70% (v/v) por 1 min. y 0.2% (w/v) cloruro de mercurio por 10 min.	MS+ 4.5- 18.1 µM 2,4-D + 5.4- 21.5 µM NAA + 5.7-22.8 µM IAA y 4.9-19.7 µM IBA	Regen.: MS + 17.8 µM BAP y 2.3 µM 2,4-D. Enraiz.: MS al 50% + IAA 2.9- 28.5 µM
Sato <i>et al.</i> , 2004.	Callo embriogénico	Paniculas inmaduras 12-16 días después de la polinización.	Etanol 70% por 1 min. blanqueador comercial 10% por 15 min.	MS medio básico (Casas <i>et al.</i> , 1997) o N6 + 9.0 µM 2,4-D + 2.3µM cinetina	MS + 0.5 µM Kin + 5.7 µM AIA.
Grootboom y Kennedy 2006.	Callo embriogénico	Embriones inmaduros	Alcohol 70 % por 5min. + blanqueador comercial 70%+ 0.1% Tween 20 por 15 min.	MS + Vitaminas B5 + asparagina 1g l ⁻¹ + 3.3g l ⁻¹ nitrato de amonio + 2g l ⁻¹ L-prolina + 2,4-D 2 mg l ⁻¹ + 100 ml l ⁻¹ agua de coco.	MS + Vitaminas B5 + esparagina 1g l ⁻¹ + 2g l ⁻¹ L-prolina + 2,4-D 1 mg l ⁻¹ + 0.5mg l ⁻¹ Kin. +100 ml l ⁻¹ agua de coco.

Regen.: Regenerar Enraiz.: Enraizamiento Madur.: Maduración Germin.: Germinación. N.R.: No reportado.

Respecto al cultivo de protoplastos de sorgo existen pocos reportes: Karunaratne y Scout, (1981) fueron los primeros en aislarlos a partir de semillas que tenían una semana de siembra. Brar *et al.*, 1980 y Chourey y Sharpe, (1985) estudiaron el crecimiento de protoplastos que derivaron de células en suspensión, sin embargo estos no lograron regenerar plantas completas. Murthy y Cocking, 1988 estudio los factores que afectan las divisiones de los protoplastos provenientes de mesófilo observando de 3 a 4 divisiones en cultivos a los 12 días de vida. Wei y Xu (1990) fueron los primeros en reportar una regeneración exitosa de plantas a partir de protoplastos aislados de callos provenientes de inflorescencias de sorgo.

Sairam *et al.*, 1999. Regeneraron sorgo a partir de protoplastos provenientes del mesófilo; el tejido de la hoja es la fuente más conveniente de protoplastos, permite el aislamiento de un gran número de protoplastos relativamente uniformes, aumentó así rendimiento de los protoplastos y la regeneración de plantas al investigar los efectos de la composición del medio, la diferencias genotípicas y las condiciones de la planta madre como la edad, temperatura y las posición de la hoja en el rendimiento y regeneración. Usaron en el cultivo de los protoplastos el medio KM8 Kao y Michyaluk, (1975) solidificado con 1.20% agarosa +2 mg l⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg l⁻¹ ANA y para la regeneración y generación de brotes, las colonias derivadas de los protoplastos se cultivaron en MS + 0.2 mg l⁻¹ kinetina + 2 mg l⁻¹ BAP solidificado con 1% agarosa e incubados a 23 °C con un fotoperiodo de 16 h luz 8h oscuridad. Una vez regeneradas las plantas, se transfirieron a medio MS con sales y vitaminas a la mitad + carbón (0.3%) + 0.5 mg l⁻¹ AIA. Después de 15 días fueron transferidas al invernadero en macetas con una proporción de 1:1 de vermiculita y suelos.

Las ventajas de trabajar y desarrollar protocolos exitosos para la regeneración de protoplastos esta dada en las oportunidades que poseen para transformación genética a través de la captación directa del ADN o mediante la electroporación (Potrykus 1990). Además facilita la fusión de protoplastos para producir híbridos somáticos entre especies incompatibles.

EL SORGO Y LA OXIDACIÓN.

Varias investigaciones en gramíneas apuntan hacia la existencia de respuestas específicas *in vitro* dependiendo de los genotipos utilizados. El sorgo no es la excepción. Kaepler y Pedersen en 1997 evaluaron 41 genotipos de sorgo usando inflorescencias inmaduras y líneas germinales. Sai Kishore *et al.*, 2006 evaluaron 24 diferentes genotipos incluyendo líneas germinales. Casas *et al.*, 1993; realizaron la evaluación de 8 distintas variedades de sorgo entre las cuales se encontraban algunas con un elevado y bajo nivel de taninos.

Durante la realización de los experimentos se detectó que las células de sorgo liberan fenoles al medio de cultivo, acompañados de productos oxidativos que inhiben la morfogénesis y por ende el crecimiento; que se ve reflejado en una regeneración poco satisfactoria del sorgo. Dicho fenómeno se observó con mayor intensidad en variedades de sorgo con elevado nivel de taninos (Cai *et al.*, 1987 cit. por Casas; 1993). Carvalho, (2004) realizó pruebas de sustancias como el PVP o polivinilpolipirrolidona (PVPP) o el uso de agua de coco en búsqueda de disminuir la oxidación en 10 genotipos distintos de sorgo.

Es bien sabido que todos los sorgos contienen fenoles que pueden afectar el color, apariencia y calidad nutritiva del grano. Los componentes de los fenoles se dividen en tres grupos: ácidos fenólicos (derivados del ácido cinámico o benzoico; encontrados en todos los sorgos y ayudan a inhibir el crecimiento de microorganismos y dan resistencia al moho antes y después de la maduración), flavonoídicos y taninos. Los ácidos fenólicos son ácidos libres, ésteres solubles e insolubles y están concentrados en las capas exteriores de la semilla (pericarpio, testa y aleurona). En el endospermo los fenoles están estrechamente ligados. La principal unión de ácido fenólico del sorgo es el ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico) el cual se piensa está asociado con las células de las paredes de los granos (López, 2000). Sato *et al.*, 2004 se dieron a la tarea de evaluar 4 variedades de sorgo en busca de aquella que tuviera el mejor rendimiento *in vitro*.

JUSTIFICACIÓN:

El sorgo ocupa el quinto lugar como grano cultivado en el mundo, en México es el segundo cultivo cíclico más importante; tiene una tolerancia mayor a la sequía, suelos alcalinos y salinos, temperaturas extremas a comparación con otros cereales y su centro de origen se ubica en África. Lo cual lo hace una planta única, que mediante el uso de las modernas técnicas biotecnología como el CTV y ingeniería genética (la cual permite romper las barreras genéticas del fitomejoramiento tradicional) se pueden generar plantas transgénicas. Lo que posibilita un sin fin de usos económicos y de investigación, ya sea que la transformación genética del sorgo, sea para usos agrícolas o ganaderos; al conferir tolerancia a herbicidas, insectos y plagas, aumentar las propiedades nutricionales o lograr la producción de anticuerpos, para que funja como vacunas comestible (que es el caso del presente trabajo) o solo como modelo para la investigación básica.

Sin embargo el sorgo es catalogado como el más recalcitrante de todos los cereales y por ende una de las plantas más difíciles de trabajar en CTV y transformar (Zhao, 2000). Por lo cual surge el interés de establecer protocolos óptimos para la proliferación y regeneración *in vitro* de híbridos o variedades de sorgo, para lo cual de deben considerar factores relevantes como (formulación de los medios de cultivo, RCV, tipos y edad de explantes, etc.); para lograr un buen porcentaje de regeneración y su posterior conjunción con la ingeniería genética.

Y dado que el sorgo no es originario de México puede ser manipulado genéticamente sin comprometer la variabilidad genética nativa como ocurre en el caso del maíz, cuyo centro de origen se encuentra en nuestro país.

OBJETIVO GENERAL

Establecer los protocolos para la regeneración *in vitro* de sorgo.

OBJETIVOS PARTICULARES

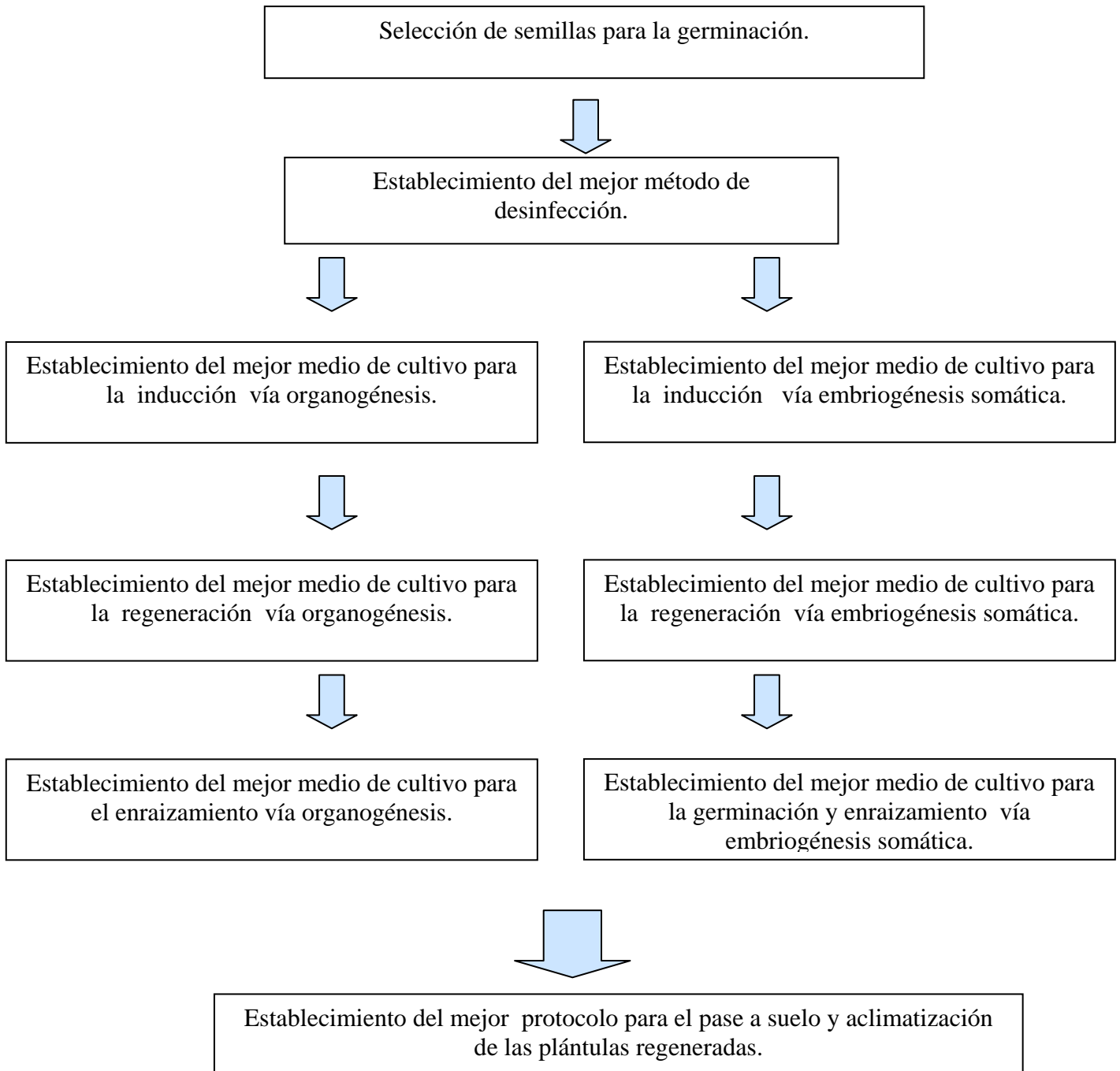
- Determinar un método de desinfección de las semillas de sorgo para el establecimiento de cultivos *in vitro* asépticos.
- Determinar los mejores medios de cultivo en cuanto a componentes orgánicos e inorgánicos y reguladores de crecimiento para una óptima inducción, proliferación y regeneración de sorgo.
- Seleccionar el mejor explante para lograr la regeneración *in vitro* de sorgo.
- Determinar los antioxidantes y la concentración de éstos para evitar la oxidación de los explantes usados.

HIPÓTESIS: Si la regeneración del sorgo está modulada por reguladores de crecimiento, por el explante y su edad fisiológica, por lo tanto es factible la obtención de plantas regeneradas mediante las dos vías conocida (embriogénesis y organogénesis). Esperando que la organogénesis sea más estable que la embriogénesis; logrando con ello superar la alta recalcitrancia del sorgo reportada por distintos autores.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM.

Ruta crítica:



ASPECTOS GENERALES

Material biológico.

Como material biológico se utilizaron coleoptilos de varios tamaños, de 4 distintas variedades o híbridos de sorgo:

- * Variedad denominada Quetzalcoatl “sorgo de grano”.
- * Híbrido DoMor (Cruza sorgo x zacate sudán) “sorgo forrajero”.
- * Silo Master “sorgo forrajero”.
- * Híbrido Super Sweet II (híbrido trilineal sorgo x sorgo dulce x zacate sudán) producido por la empresa Genek® “sorgo forrajero”.

Las semillas usadas durante el presente trabajo fueron seleccionadas con base en el tamaño, usando solamente las más grandes y las que no presentaran ningún daño físico (picadura de insectos, rotas, etc.) con el fin de garantizar su germinación.

A la par se realizaron experimentos con embriones cigóticos inmaduros (obtenidos de semillas inmaduras de una línea de grano; cultivada en el INIFAP; Zacatepec, Morelos); y con embriones cigóticos maduros (de Super Sweet II y Quetzalcoatl). Los embriones tienen una longitud que va de los 0.7-1.0 mm y se encuentran dentro del escutelo la cual varía de longitud de la mitad a dos tercios del grano y es de forma elíptica, oblonga a concava plana.

Preparación de medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas 100 X (ver anexo I). Las sales minerales utilizadas fueron de los medios: MS y N₆. A todos los medios probados se les adicionó 3 % de sacarosa, reguladores de crecimiento (según cada ensayo), vitaminas y aminoácidos, el pH se ajustó a 5.7 con NaOH 1N o HCl 1N según fuera necesario. Los medios se solidificaron con 0.3 % de Gellan Gum. Los medios se esterilizaron en autoclave vertical a una temperatura de 121 ° C y a una presión de 1.2 Kg/cm² (17 p.s.i.) durante 18 minutos.

En algunos casos se tuvo que adicionar antibiótico a los medios, éste se les agregó después de que el medio fuera esterilizado y cuando tuviera una temperatura aproximada de 40 °C, realizándolo dentro de la campana de flujo laminar, manteniendo el medio en agitación con ayuda de un agitador magnético. Para posteriormente repartirlo en los frascos o cajas de cultivo.

Condiciones de incubación

Los cultivos se mantuvieron en un cuarto de incubación bajo dos condiciones ambientales controladas:

Oscura: Se llevó a cabo en el cuarto oscuro de incubación en donde permanecieron a una temperatura de 26 ± 2 °C.

Luminosa: Con un fotoperíodo de 16 h luz / 8 h de oscuridad y una intensidad de $29 \mu\text{em/s}^2$ y bajo la misma temperatura.

Métodos de esterilización de semillas.

Las semillas seleccionadas previamente (2.6 g equivalentes a 100 semillas); fueron lavadas con agua desionizada y detergente (1L de agua desionizada + 1g detergente comercial) con el fin de eliminar el fungicida con el que estaban tratadas las semillas y la tierra de su superficie. El lavado se realizó por 20 minutos aproximadamente, haciendo cambios constantemente del agua. Durante esta fase estuvieron en agitación con ayuda de un agitador magnético en vasos de precipitados con una capacidad de 500 ml.

Se probaron varios protocolos de esterilización y se buscó el más adecuado para lograr el cultivo *in vitro* aséptico de las semillas (Tabla 3 y 4).

Previamente a la utilización del peróxido de hidrógeno al 30 % como desinfectante, se realizó la prueba del grado de efectividad vs. tiempo de exposición de semillas maduras; tomándose muestras cada cierto tiempo y sembrándose en medio MS con antibiótico para su evaluación.

Tabla 3: Métodos de esterilización desinfección utilizados para la germinación de semillas maduras de sorgo.

Sustancias, concentración y tiempos	MÉTODOS					
	I	II	III	IV	V	VI
Lavado superficial	√	√	√	√	√	√
Etanol 70% (v/v)	por 1 min	por 2 min	por 5 min	por 2 min	por 4 min	por 4 min
2 enjuagues dH ₂ O estéril	√	√	√	√	√	√
NaClO ₂ ^A + Microdyn ^B + Tween 20 ^C	60% (v/v) por 30 min	60% (v/v) por 30 min	100% (v/v) por 10 min	√ 100% (v/v) por 30 min	50% (v/v) por 10 min	50% (v/v) por 10 min
Enjuagues dH ₂ O estéril	√	√	√	√	√	√
Bactericida Agri-mycin 500 (sulfato de estreptomycin, clorhidrato de oxitetraciclina, sulfato tribásico de cobre)	1g l ⁻¹ por 20 min	1g l ⁻¹ por 70 min	2g l ⁻¹ por 20 min	2g l ⁻¹ por 20 min	X	X
2 Enjuagues dH ₂ O estéril	√	√	√	√	X	X
Fungicida (Benlate. Benomyl)	1g l ⁻¹ por 25 min	3g l ⁻¹ por 60 min	3g l ⁻¹ por 20 min	3g l ⁻¹ por 20 min	X	X
H ₂ O ₂ al 30% Recambios cada 8- 12 h.	X	X	X	X	Por 16 h	Por 32h
dH ₂ O estéril + cefotaxima 150 mg l ⁻¹	√	√	√	√	√	√
Enjuagues dH ₂ O estéril	√	√	√	√	√	√
Siembra en medio con cefotaxima 150 mg l ⁻¹	√	√	√	√	√	√

A: El porcentaje correspondiente v/v, tomando a la presentación comercial como el 100%.

B: Usando 1ml por cada litro de solución.

C: Usando 10 gotas por cada litro de solución.

Tabla 4. Métodos probados para la esterilización desinfección de semillas inmaduras de sorgo, cortadas de panoja con 18 días pos-polinización.

MÉTODOS				
Sustancias, concentración y tiempos	A	B	C	D
Lavado superficial	√	√	√	√
Etanol 70% (v/v)	por 2 min	por 2 min	por 2 min	por 2 min
Enjuagues dH ₂ O estéril	√	√	√	√
NaClO ₂ ^A + Microdyn ^B + Tween 20 ^C	8 % (v/v) por 10 min	10% (v/v) por 20 min	20% (v/v) por 10 min	50% (v/v) por 15 min
Enjuagues dH ₂ O estéril	√	√	√	√
Bactericida Agri-mycin 500 (sulfato de estreptomycina, clorhidrato de oxitetraciclina y sulfato tribásico de cobre)	1g l ⁻¹ por 20 min	1g l ⁻¹ por 40 min	2g l ⁻¹ por 20 min	X
Enjuagues dH ₂ O estéril	√	√	√	X
Fungicida (Benlate, Benomyl)	1g l ⁻¹ por 25 min	3g l ⁻¹ por 50 min	3g l ⁻¹ por 20 min	X
H ₂ O ₂ al 30% Recambios cada 8 h.	x	x	x	Por 16 h
dH ₂ O estéril + con cefotaxima 150 mg l ⁻¹	√	√	√	√
Enjuagues dH ₂ O estéril	√	√	√	√

A: El porcentaje correspondiente v/v, tomando a la presentación comercial como el 100%.

B: Usando 1ml por cada litro de solución.

C: Usando 10 gotas por cada litro de solución.

Selección del explante.

Las semillas maduras de los 4 híbridos ya desinfectadas fueron sembradas en frascos gerber de 50 ml de capacidad con 30 ml de medio, colocando 30-40 semillas por frasco, el medio empleado fue el MS sin RCV adicionado con 150 mg l⁻¹ de Cefotaxima[®] como antibiótico. Para su germinación y/o crecimiento del coleoptilo; se incubaron en el cuarto oscuro por un periodo de 45 h – 48 h a una temperatura de 28°C (Figura 9).

A la par se realizarón pruebas en donde los embriones cigóticos maduros (obtenidos de semillas secas) o inmaduros (obtenidos de semillas inmaduras de una panoja con 18 días pos-polinización) fuerón disectados y sembrados en medios de inducción para embriogénesis somática.

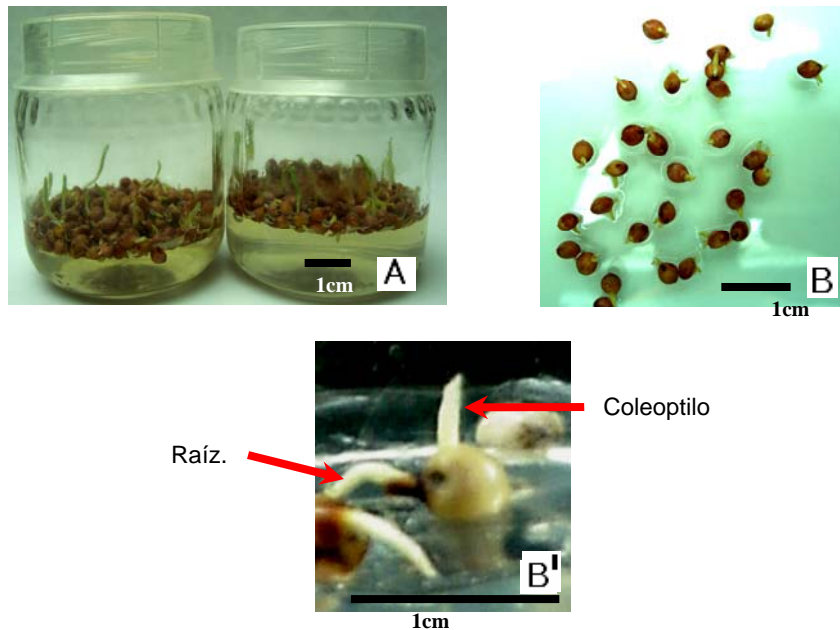


Fig. 9. A) Forma de siembra de las semillas para su germinación. B) Semillas germinadas y seleccionadas a las 48 h. C) Acercamiento del crecimiento del coleoptilo.

Selección de los medios de cultivo.

Ya germinadas las semillas, se realizó la disección de los coleoptilos; los cuales fueron sembrados de manera horizontal sobre el medio de cultivo con el fin de que el área de contacto fuera lo más amplia posible para mayor efectividad en la respuesta. De igual manera los embriones cigóticos maduros o inmaduros fueron sembrados (figura 10).

Se probaron diferentes medios de cultivo para la inducción de la morfogénesis (organogénesis o embriogénesis); los medios probados se describen en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Medios de inducción probados para embriogénesis somática.

	Sales Inorgánicas	Orgánicos	RCV	pH	Gellan Gum g l⁻¹	Sacarosa g l⁻¹	Ac. cítrico + Ac. ascórbico [] mg l⁻¹
1	MS	Vit MS + Glicina 2mg l ⁻¹	2,4-D 2 mg l ⁻¹	5.7	3	30	150 c/u
2	MS	Vit MS + Glicina 2mg l ⁻¹	Dicamba 2 mg l ⁻¹	√	√	√	√
3	MS	Cock 20* + Adenina 10 mg l ⁻¹ + L prolina 2g l ⁻¹	2,4-D 2mg l ⁻¹	√	√	√	√
4	MS	Cock 20+ Adenina 10 mg l ⁻¹ + L prolina 2g l ⁻¹	Dicamba 2 mg l ⁻¹	√	√	√	√
5	N ₆	Vit MS + Glicina 2mg l ⁻¹	2,4-D 2.0 mg l ⁻¹	√	√	√	√
6	N ₆	Vit MS + Glicina 2mg l ⁻¹	Dicamba 2 mg l ⁻¹	√	√	√	√
7	N ₆	Cock 20+ Adenina 10 mg l ⁻¹ + L prolina 2g l ⁻¹	2,4-D 2 mg l ⁻¹	√	√	√	√
8	N ₆	Cock 20+ Adenina 10 mg l ⁻¹ + L prolina 2g l ⁻¹	Dicamba 2 mg l ⁻¹	√	√	√	√

* Cock 20: Mezcla de aminoácidos y vitaminas (patente en trámite).

Tabla 6. Medios de inducción probados para organogénesis.

	Sales Inorgánicas	Orgánicos	RCV	pH	Gellan Gum g l⁻¹	Sacarosa g l⁻¹	Ac. cítrico + Ac. ascórbico [] mg l⁻¹
9	MS	Vit MS + Glicina 2mg l ⁻¹	ANA 0.5 mg l ⁻¹ BAP 4 mg l ⁻¹	5.7	3	30	150 c/u
10	MS	Cock 20+ Adenina 10 mg l ⁻¹ + L prolina 2g l ⁻¹	√	√	√	√	√
11	N ₆	Vit MS + Glicina 2mg l ⁻¹	√	√	√	√	√
12	N ₆	Cock 20+ Adenina 10 mg l ⁻¹ + L prolina 2g l ⁻¹	√	√	√	√	√

* Cock 20: Mezcla de aminoácidos y vitaminas (patente en trámite).

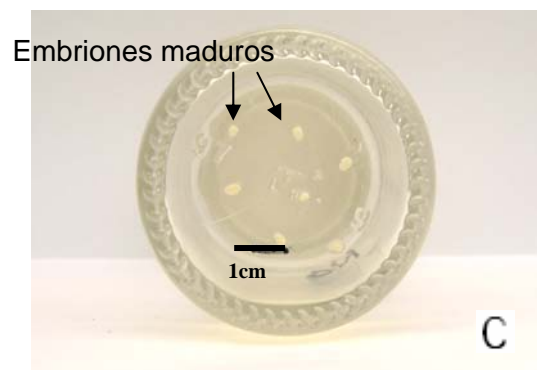
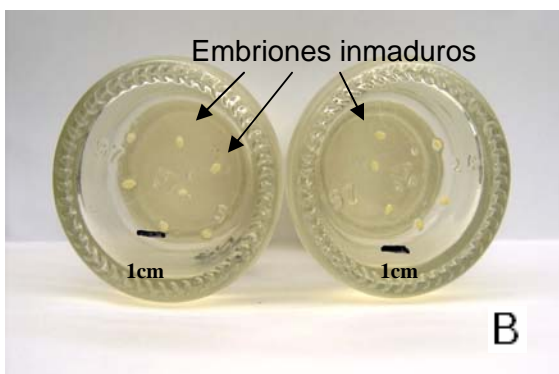
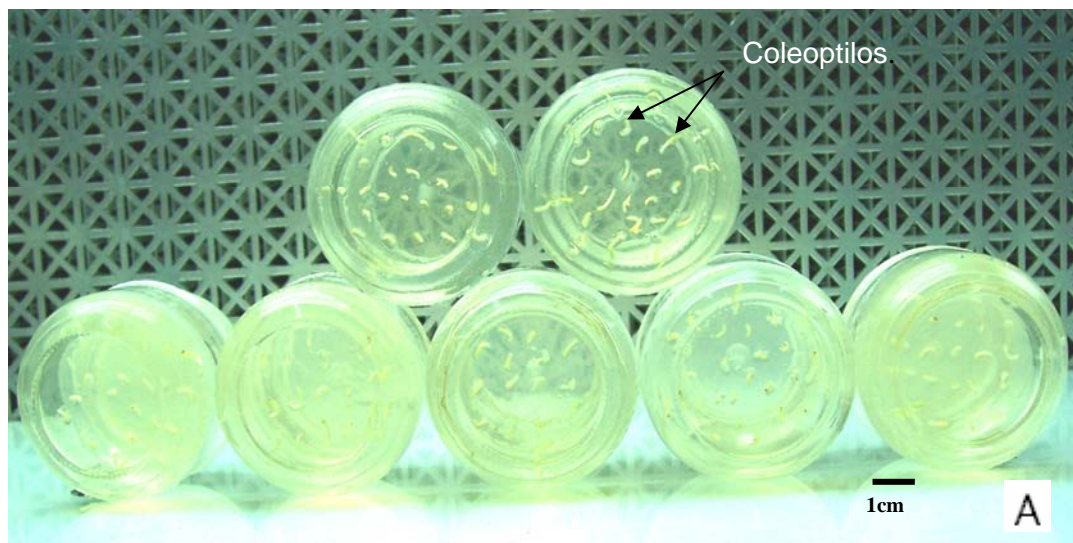


Fig. 10. A) Coleoptilos sembrados en medios de inducción. B) Embriones inmaduros y C) Embriones maduros.

La incubación de estos frascos se dividió en partes iguales; la mitad se mantuvo en oscuridad y la otra mitad en el cuarto luminoso. Se mantuvieron bajo dichas condiciones por 5 meses, realizando subcultivos al mismo medio cada 25-30 días. Durante el subcultivo se eliminaron las partes oxidadas de los explantes o en proceso de oxidación.

Selección de antioxidantes.

A la par se probaron distintos tipos de agentes antioxidantes o absorbentes. Debido a las evidencias presentes en la literatura que refieren al sorgo como una especie con alto contenido de taninos y por ende propenso a la oxidación, cuando se están realizando trabajos *in vitro*. En la tabla 7 se muestran las concentraciones y tipos de agentes antioxidantes probados.

Tabla 7. Concentraciones y tipos de agentes antioxidantes probados.

	Sales Inorgánicas	Orgánicas	RCV	pH	Gellan Gum g l ⁻¹	Sacarosa g l ⁻¹	Antioxidante
A	MS	Vit MS + Glicina 2mg l ⁻¹	2,4-D 2.0mg l ⁻¹	5.7	3	30	Pirogalol 40mg l ⁻¹
B	√	√	√	√	√	√	Carbón activado 1 g l ⁻¹
C	√	√	√	√	√	√	PVP 0.5% (5g/l)
D	√	√	√	√	√	√	Ac. cítrico Ac. ascórbico (c/u) 150mg l ⁻¹
E	√	√	√	√	√	√	Cisteína 50 mg l ⁻¹
F	√	√	√	√	√	√	Ac. cítrico Ac. ascórbico (c/u) 100mg l ⁻¹ + Cisteína 50 mg l ⁻¹
G	√	√	√	√	√	√	Sin antioxidante.

* Cock 20: Mezcla de aminoácidos y vitaminas (patente en trámite).

Una vez realizada la selección del agente antioxidante se iniciaron los experimentos para conjuntar los resultados obtenidos, con la reducción al 50% de las sales inorgánicas y el uso de sustancias orgánicas, las cuales pudieran ser factores que conllevaran a una pronta oxidación del explante y por ende a la muerte del explante, ver tabla 8.

Tabla 8. Concentraciones de sales inorgánicas y uso de compuestos orgánicos como reductores de oxidación en medios de inducción.

	Sales Inorgánicas	Orgánicas	RCV	pH	Gellan Gum g l ⁻¹	Sacarosa g l ⁻¹	Ac. cítrico y Ac. ascórbico (c/u) []mg l ⁻¹
I	MS	Vit MS + Glicina 2mg l ⁻¹	2,4-D 2.0mg l ⁻¹	5.7	3	30	100
J	MS	√	√	√	√	√	150
K	½ MS	√	√	√	√	√	100
L	½ MS	√	√	√	√	√	150
M	N ₆	√	√	√	√	√	100
N	N ₆	√	√	√	√	√	150
O	½ N ₆	√	√	√	√	√	100
P	½ N ₆	√	√	√	√	√	150
Q	N ₆	Cock 20 *+ Adenina 10 mg l ⁻¹ + L prolina 2 g l ⁻¹	√	√	√	√	100
R	N ₆	√	√	√	√	√	150
S	½N ₆	√	√	√	√	√	100
T	½N ₆	√	√	√	√	√	150

Etapa de regeneración:

Una vez realizados los experimentos anteriormente presentados, se procedió a la etapa de la regeneración haciendo la distinción entre:

* La vía embriogénica, en la cual se fue reduciendo la concentración de auxinas (cada subcultivo se fue reduciendo al 50% de la concentración anterior); adicionando 2 mg l⁻¹ de kinetina durante esta etapa así como se cambiaron las condiciones de incubación, de oscuridad a fotoperiodo.

* La vía organogénica; la concentración de citocininas y auxinas se redujo al 50% de la concentración anterior en cada subcultivo hasta llegar a 0 mg l⁻¹ en el caso de las auxinas, y a 1mg l⁻¹ en citocininas. Conservando durante todas las etapas la condición de fotoperiodo.

Etapa de enraizamiento:

Una vez regeneradas las plántulas por cualquiera de los métodos usados, las plantas entre 2 y 4 cm de altura se transfirieron a medios promotores de raíces en frascos de 250 ml, con 6 cm de diámetro, 10 cm de altura y con boca (ancha) 5.5 cm de diámetro. Dentro del cual se mantuvieron en incubación con luz por 2 meses; los medios probados aparecen detallados en la tabla 9.

Tabla 9. Medios probados para la fase de enraizamiento.

	Sales Inorgánicas	Orgánicas	RCV	pH	Gellan Gum g l⁻¹	Sacarosa g l⁻¹	Ac. Cítrico y Ac. Ascórbico (c/u) [mg l⁻¹
Ra1	MS	Vit MS + Glicina 2 mg l ⁻¹	AIA 0.2 mg l ⁻¹ + AIB1.5 mg l ⁻¹	5.7	3	30	150
Ra2	½ MS	Vit MS + Glicina 1 mg l ⁻¹	√	√	√	15	√
Ra3	MS	Vit MS + Glicina 2 mg l ⁻¹	2,4-D 1 mg l ⁻¹	√	√	30	√
Ra4	½ MS	Vit MS + Glicina 1 mg l ⁻¹	X	√	√	30	√
Ra5	½ MS	Vit MS + Glicina 2 mg l ⁻¹	ANA 2 mg l ⁻¹	√	√	15	√

Etapa de aclimatación:

Transcurridos los 2 meses de enraizamiento se pasó a esta etapa. Se realizaron pruebas de mezclas de sustratos (mostrados en la tabla 10) para maximizar la cantidad de plantas aclimatizadas.

Dichas mezclas se esterilizaron a una temperatura de 121 ° C y a una presión de 1.2 Kg/cm² (17 p.s.i.) por 45 min previo a su utilización en bolsas de polipapel dobles.

Tabla 10. Mezclas de sustratos probados para la fase de aclimatización.

	Componentes
M1	Tierra negra 100%
M2	Arena 40% + Agrolita 60%
M3	Tierra negra 40% + Arena 20% + Agrolita 40%

Una vez que las plántulas presentaron más de 10 raíces se tomaron medidas para disminución de la humedad relativa de manera paulatina, como fue el caso de la sustitución de la tapa de plástico del frasco por una tapa de papel filtro de 45µm de diámetro.

Así como la implementación de un dispositivo (mini-invernadero) para asegurar una buena aclimatización, dicho dispositivo consistió de una estructura hecha con dos vasos desechables de plástico translúcido unidos por su boca y en su interior una maceta con el sorgo en proceso de aclimatización (figura 11).



Fig. 11. Mini invernaderos de aclimatización

En donde se mantuvieron las plántulas durante dos meses; a la semana de haber sembrado éstas, se inició la perforación de 0.5cm de diámetro en el vaso superior. Se realizaron 3 perforaciones cada ocho días.

El sistema de mini invernadero se mantuvo bajo observación constante con el fin de evitar cualquier posible factor que evitara la buena adaptación de las plántulas. La incubación de los mini invernadero fue a una temperatura de 28 - 30°C. Una vez a la semana se abría el sistema. Ya perforado el vaso superior se procedió a sacar la maceta del mini invernadero para pasarla al invernadero. Pasados 30 días se trasplantaron a bolsas negras para que continuaran con su crecimiento dentro del invernadero.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Métodos de esterilización de semillas:

Una vez probados varios métodos de esterilización para semillas maduras e inmaduras (ver tabla 3 y 4), algunos de los cuales fueron tomados de la literatura o tomando elementos básicos como son el uso de alcohol, el cual desnaturaliza las proteínas y disuelve lípidos, dañando las membranas celulares bacterianas, pero no afecta a las esporas; para lo cual se emplearon soluciones de hipoclorito de sodio (NaClO_2) (blanqueador doméstico “cloralex[®]” con un porcentaje del 6% de cloro activo), utilizado como agente oxidativo y desinfectante, actuó sobre proteínas y ácidos nucleicos, oxidando grupos $-\text{SH}$, además de atacar grupos amino, indoles y al hidroxifenol de la tirosina eliminando hongos, bacterias y esporas (www.microbiologia.com.ar); el Tween 20 agente surfactante o hidratante, el cual actuó en la disminución de la tensión superficial, permitió la penetración de las otras sustancias desinfectantes, eliminando las ceras de las plantas y las membranas celulares, permitiendo un mejor contacto de los químicos con la superficie (George y Sherrington 1984, Pierik 1990 y Uribe, 1998; [www. wordbiolene.com/espanol/boletin/-bolet06](http://www.wordbiolene.com/espanol/boletin/-bolet06)). El Microdyn[®] cuyo ingrediente activo es plata coloidal al 0.82% que son partículas ultra finas que no se disuelven sino que permanecen suspendidas, que al reaccionar con los grupos SH de las proteínas funcionales y estructurales de las células bacterianas, inhiben su respiración, misma que ocurre a través de las membranas celulares, logrando así matar a las bacterias (www.microdyn.htm; www.mantra.com.ar y www.healthfraud.org).

La eficiencia de esterilización de cada método fue evaluada según la siguiente formula:

$$C = \frac{S.C}{N.T.S} \quad E.E = 1 - C \times 100$$

C: Contaminación presentada.

S.C.: Semillas contaminadas.

N.T.S.: Número total de semillas sembradas.

E.E.: Porcentaje de eficiencia de esterilización del tratamiento.

Para las semillas maduras los métodos arrojaron los resultados; presentados en la tabla 11.

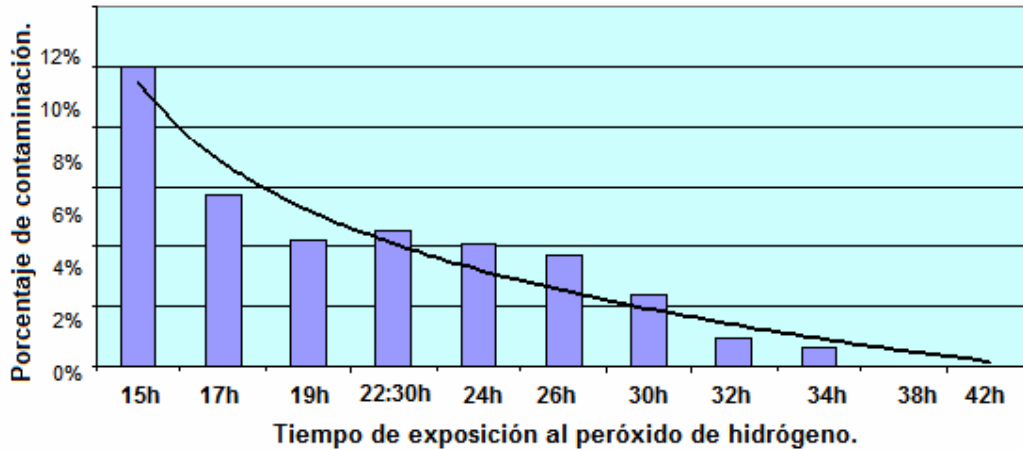
Tabla 11. Porcentaje de eficiencia en cada uno de los métodos probados.

Método de esterilización	I	II	III	IV	V	VI
Eficiencia de esterilización.	63%	70%	76%	50%	85%	100%

Como se puede observar para las semillas maduras el método VI fue el que presento la mejor eficiencia, seguido por el método V para detalles de componentes de cada método ver tabla 3.

Cabe mencionar que pese al uso de métodos (I y II) citados en trabajos previos la eficiencia en algunos casos fue baja, esto pudiera deberse a factores no controlables dentro de la fase experimental, como lo pudiera ser el uso de semillas cultivadas en campo en lugar de cultivadas en invernadero así como el proceso de cosecha y almacenamiento, propiciando que el grado de contaminación fuera mayor, lo que conllevó a que los métodos de esterilización fuera mucho más severos para lograr resultados positivos. Siendo el caso de los métodos V y VI en los cuales incluyeron el uso de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante periodos prolongados de tiempo (tabla 3). Resultando un excelente agente desinfectante, al eliminar con gran éxito tanto hongos como bacterias. Lo cual se comprobó al mantener semillas en contacto con peróxido durante un periodo prolongado, realizando cambios cada 12 h los resultados son presentados en la gráfica 1.

Como se puede observar entre mayor fue el tiempo de exposición de la semilla al peróxido la eficiencia de esterilización aumentó; es decir son inversamente proporcionales, el tiempo de exposición y la contaminación. En los casos en donde la exposición fué superior a 45 h el H_2O_2 hubo daño irreversible provocando en el coleoptilo un estrés oxidativo superior a su tolerancia; propiciando su muerte.



Gráfica 1. Tiempo de exposición a peróxido de hidrógeno al 30% vs porcentaje de contaminación de semillas maduras de sorgo Super Sweet II.

Lo anterior se puede explicar ya que el H_2O_2 es una molécula tóxica debido a que es un reactivo altamente oxidativo; ha sido usado como agente con actividad antimicrobiana directa reportado por varios autores entre éstos, se encuentran Lu y Higgins, 1999 quienes demostraron que el H_2O_2 puede inhibir el crecimiento de *Cladosporium fulvum* (un hongo patógeno) y que la concentración efectiva para matar los hongos es considerablemente menor a la que ocasionaría la muerte celular de tejidos vegetales. Así mismo se ha demostrado que estas concentraciones bajas pueden inducir la expresión de genes relacionados con la defensa e incluyendo los genes que codifican para las catalasas, las cuales protegen a las células en contra de exceso de H_2O_2 y así se reduce de manera considerable la degradación de la membrana causada, por el estrés oxidativo (Ukuku, 2004; Morkunas *et al.*, 2004; Neill *et al.*, 2002). El mismo efecto se ha tenido con bacterias tal es el caso con *Salmonella sp.* la cual es inactivada en 5 min a una concentración de 5% de peróxido de hidrógeno.

Por otro lado durante las pruebas se notó que la germinación fué favorecida en dichos métodos; en algunos casos la germinación se llevó a cabo hasta con 18 h de anticipación con respecto a las semillas que se sometieron al resto de los métodos de esterilización. Lo que brinda evidencia que el H_2O_2 también sirvió como promotor de la germinación; estudios realizados por Naredo *et al.*, 2000 con semillas de cereales y de Kenínchi *et al.*, 2002 con *Zinnia elegans*

proponen que el H_2O_2 promueve la germinación al ocasionar la descomposición u oxidación de los inhibidores de la germinación (compuestos fenólicos y alcaloides) por ejemplo como lo son los ácidos fumáricos y cumáricos, inhibidores de la respiración; siendo posible que el H_2O_2 promueva la germinación más que el O_2 rompiendo la dormancia.

De igual manera sirvió como elemento sincronizante de la germinación, permitió la obtención de coleóptilos de tallas muy similares al momento de realizar la disección tuvieron tamaño homogéneo como se puede apreciar en las figuras 12 y 13.



Fig.12. Semillas de sorgo en presencia de H_2O_2 a las 33 h

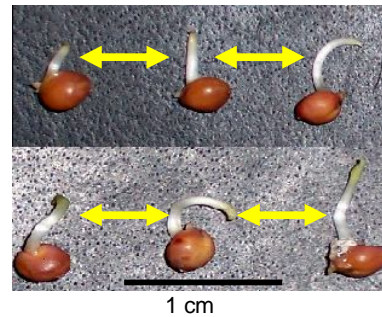


Fig.13. Diferentes crecimientos del coleóptilo de sorgo.

En lo concerniente a los métodos de desinfección probados para las semillas inmaduras, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12, que presenta el porcentaje de eficiencia de desinfección.

Tabla 12. Métodos probados para la desinfección de semillas inmadura.

Método de esterilización	A	B	C	D
Eficiencia de esterilización.	85%	90%	95%	100%

Resultó el método D con la mejor eficiencia de esterilización seguido por el método C; el cual también presentó una eficiencia alta; ambos incluyeron la utilización de H_2O_2 (tabla 4).

Selección de la variedad a usar.

En cuanto a los cuatro híbridos o variedades manejadas se encontraron diferencias entre éstas, que en algunos casos son notables y de interés para lograr el objetivo del presente trabajo; como lo fueron respuesta *in vitro*, oxidación, germinación y color de semilla los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13.

La respuesta *in vitro* se calculó tomando en cuenta aquellos coleoptilos que después de 1 mes en medio de inducción para callo, respondieron favorablemente a la desdiferenciación celular.

Tabla 13. Características de los 4 tipos de semillas evaluadas al primer subcultivo.

Híbrido	% respuesta <i>in vitro</i>	% oxidación <i>in vitro</i>	% germinación <i>in vitro</i>	Color de cariópside
Quetzalcoatl	73	23	60	Ligeramente rojizas
DoMor	71	16	20	Blancas
Silo Master	39	31	70	Semi rojizas
Super Sweet II	65	37	90	Semi rojizas

Como se puede apreciar, el híbrido DoMor presenta cualidades favorables como lo fueron una respuesta *in vitro* alta y una oxidación más baja que el resto de los híbridos; sin embargo el bajo porcentaje de germinación no permitió que fuese la variedad con la que continuarón los estudios.

Debido estos resultados se eligió el híbrido Super Sweet II para el resto de los trabajos experimentales y de transformación. Ya que presentó una germinación alta (90%) lo que aseguró que se contara con una cantidad mayor de coleoptilos, a pesar de la oxidación alta respecto al resto de los híbridos y variedades probadas, la cual se manifestó como un oscurecimiento (negro) del explante y del medio que lo rodeaba (figura 14).

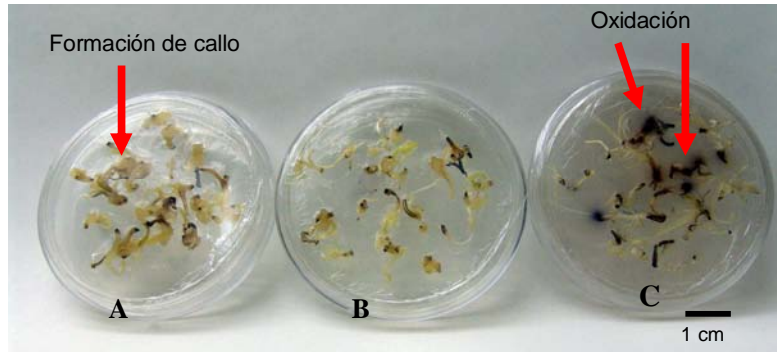


Fig. 14. Producción de callo y oxidación en:
 A) Var. Quetzalcoatl B) Hibrido DoMor C) Super Sweet II.

Con la comparación realizada se confirmó que la coloración de la cariósida de la semilla es un buen indicador del contenido de fenoles que afecta el color, y apariencia del grano siendo la principal unión de ácido fenólico del sorgo el ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico) el cual se piensa está asociado con las células de las paredes de los granos (López, 2000). Esto después de ver que las semillas con cariósida de tonalidades más oscuro-rojizas tendieron a presentar mayor porcentaje de oxidación en comparación a las que presentaban apariencia más clara. Siendo similar a lo reportado por otros autores quienes también realizaron experimentos comparativos y detectaron que las células de sorgo liberan fenoles al medio de cultivo, acompañados de productos oxidativos aumentando considerablemente en aquellas variedades que presentaban cariósidas oscuras, cuyo contenido de taninos - fenoles era alto (Sato *et al.*, 2004; Kaepler y Pedersen 1997; Casas *et al.*, 1993; Cai *et al.*, 1987 cit. por Casas; 1993).

Selección de explantes.

En la mayoría de los trabajos publicados en los cuales se ha realizado cultivo *in vitro* de sorgo (tabla 2), se usaron embriones maduros o inmaduros que sirvieron de explante inicial entre los que se encuentran los realizaron por Elkonin y Pakhomova; 2000; Able J. *et al.*, 2001; Oldach *et.al.*, 2001; Sato *et al.*, 2004; Grootboom y Kennedy 2006 los cuales en algunos casos lograron obtener callo.

Por su parte Tadesse *et al.*, 2003, utilizaron panojas jóvenes de 12-15 días posteriores a la polinización (embriones inmaduros), embriones de semillas maduras y brotes. Después de su esterilización, los embriones inmaduros y los brotes disectados (3-5 mm) se incubaron en medio inductor : MS, tiamina HCl 1mg l⁻¹, Glicina 7.5mg l⁻¹, D-asparagina 100mg l⁻¹, mioinositol 100mg l⁻¹, Kinetina 0.2 mg l⁻¹, 2.5 mg l⁻¹ 2,4-D y 30g l⁻¹ de sacarosa se incubaron durante 4 semanas en oscuridad a 25± 1°C y se seleccionó el callo friable y fácil de separar. Para posteriormente llevarlo a regeneración de plantas.

Al tratar de reproducir el uso de embriones maduros o inmaduros (cuyas longitud osciló entre 0.7-1.0 mm) para generar callo durante el presente trabajo, los resultados fueron poco favorables al objetivo planteado; dado que los callos obtenidos durante los experimentos tenían una consistencia mucilaginosa, y algunos eran demasiado friables o esponjosos, se iban oxidando paulatinamente pese a la realización de los subcultivos en tiempo y forma lo cual impidió lograr su regeneración., por lo que el uso de los embriones se desechó, debido a su respuesta *in vitro* tan desfavorable y a su difícil y complejo manejo a la hora de realizar la disección de los mismos.

Por lo que el resto de las pruebas experimentales se realizaron con los coleoptilos (meristemos apicales). El uso de los meristemos se ha citado en varios trabajos previos entre los que destacan los realizados por: Mythili *et al.*, 1999; Harshavardhan *et al.*, 2002; Tadesse *et al.*, 2003.

En el 2005, Girijashankar *et al.*, usó meristemos apicales de plántulas con 7 días de germinación extrayéndolos de hipocótilos usando para estimular una respuesta embriogénica, el medio MS, 5 µM de TDZ, 4.0 mg l⁻¹ BAP, 0.1 mg l⁻¹ ANA. Usó un medio de cultivo para la inducción de embriogénesis somática MS suplementado con 4 mg l⁻¹ BAP y 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D. Para la germinación de los embriones se usó MS, 4 mg l⁻¹ BAP y 0.1 mg l⁻¹ ANA; para el crecimiento se usó MS, 1 mg l⁻¹ BAP y 0.5 mg l⁻¹ AIB con subcultivos cada dos semanas en todos los casos.

Sai Kishore *et al.*, 2006 usaron meristemas apicales con 3 días de haber surgido, con una longitud de 6 mm para la inducción a callo en MS, 2.5 mg l⁻¹ 2,4-D y con MS, 2.5 mg l⁻¹ 2,4-D, 1 mg l⁻¹ BAP, 1 mg l⁻¹ Kin realizando la incubación en oscuridad a una temperatura 25 ± 2°C. Para la regeneración usó el medio MS, 0.5 mg l⁻¹ BAP, 0.25 mg l⁻¹ AIB incubó con un fotoperiodo de 16 h luz 8 h oscuridad. Se usó el medio MS, 2.0 mg l⁻¹ BAP, 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D y 0.5 mg l⁻¹ TDZ e incubación en luz a 25 ± 2 °C. El medio de proliferación consistió en MS, 2 mg l⁻¹ BAP y 0.5 mg l⁻¹ 2, 4-D; para el enraizamiento se usó MS, ANA 0.1 %. Al mismo tiempo se realizaron experimentos para la inducción directa de brotes, se utilizó MS, 2 mg l⁻¹ BAP, 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D.

Influencia de la longitud del coleoptilo sobre la respuesta *in vitro*.

A lo largo de los experimentos se observó que la longitud de los coleoptilos tenían influencias positivas o negativas para el fin del trabajo; de tal modo se encontró que entre mayor longitud tuvieran los coleptilos, la oxidación presentada era mayor, comparada con los de menor longitud; todos bajo las mismas condiciones (figura 15).

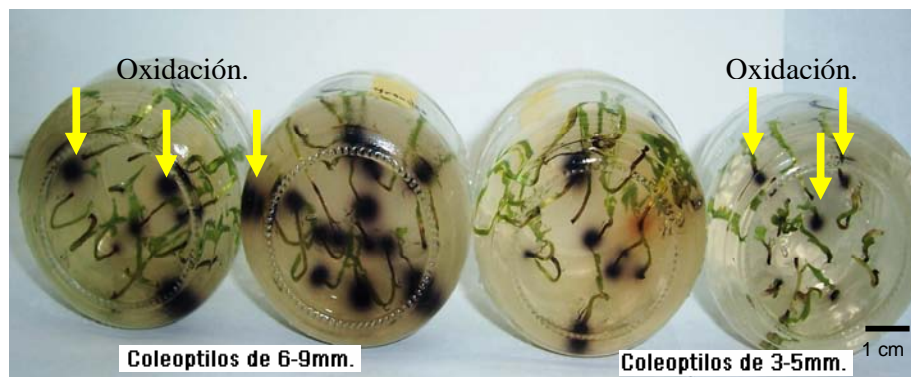


Fig. 15. Comparación entre la oxidación producida por los coleótilos dependiendo de la longitud del mismo.

Los coleoptilos con longitudes entre los 3-5 mm resultaron los mejores, al presentar una oxidación menor y una respuesta al medio de inducción mayor y más uniforme tanto a los medios de inducción de callo o de brotes. Este explante también ha sido usado en otros estudios previos tal es el caso de Mythili *et al.*, 1999 quienes usaron ápices (0.5–0.8 mm) de sorgo (*Sorghum*

dimidiatum) lograron la regeneración de plantas a través del cultivo en suspensión; para la generación de callo embriogénico usaron el medio líquido MS, 2.5 mg l⁻¹ de 2,4-D. Mantuvieron dichos cultivos a una agitación de 100 rpm bajo condiciones de oscuridad a 23 ± 2°C realizaron cambio del medio cada 3 - 4 días. El medio líquido de regeneración contenía MS, 0.25 mg l⁻¹ kinetina y 0.25 mg l⁻¹ BAP en donde se observaron varios estadios de desarrollo; lograron una germinación entre el 50 – 60 % y se desarrollaron plantas con fenotipos normales. Para la posterior transferencia a medio de crecimiento sin hormonas. Mientras que Harshavardhan *et al.*, 2002; usaron meristemos apicales provenientes de hipocótilo para lograr una regeneración óptima vía embriogénesis somática directa; mediante el MS suplementado con 5.0 µM de TDZ, 17.72 µM BAP 1.074 µM ANA obteniendo una producción de 35 a 40 brotes por meristemo. Lograron obtener un 80% de inducción. Otra vía de regeneración que se ha probado es la inducción de brotes múltiples y embriones somáticos usando MS, 17.72 µM y 2.69 µM ANA ambas vías de regeneración obtuvieron brotes que llevaron al enraizamiento con MS a la mitad suplementado con 8.28 µM AIB y 1.14 µM AIA.

Selección de sales inorgánicas para el medio de cultivo.

En cuanto a la influencia de los distintos medios probados, se evaluó primero el contenido de las sales inorgánicas en el medio sobre el explante madre (coleoptilo), al momento de inducir éstos; ya sea vía organogénesis o embriogénesis (para ver composición de los distintos medios ver tabla 5 y 6). Los resultados obtenidos mostraron que el medio N₆ aceleró la oxidación del explante, propició con ello que el poco callo formado como respuesta a los RCV se oxidará y se limitó su posterior proliferación y regeneración *in vitro* como se muestra en la figura 16. Zhao *et al.*, 2000 también observó que los callos de las líneas P898012 y PHI391 cultivados en medio N₆, produjeron mayor cantidad de pigmentos fenólicos y se redujeron las respuestas embriogénicas del callo.

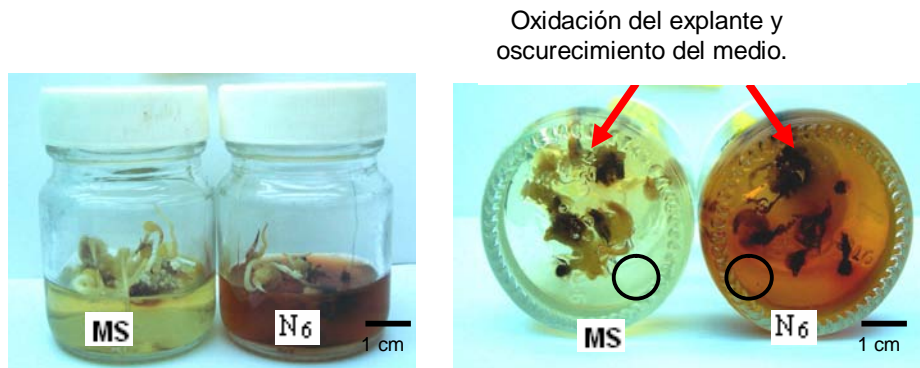


Fig. 16. Comparación de la oxidación de los coleoptilos a los 25 días de siembra en los medios MS y N₆.

La aceleración en la oxidación del explante se puede deber a la alta concentración de nitrógeno, dado que el medio N₆ posee 28 mM de KNO₃ en comparación al MS que solo posee 19.3 mM. Lo cual coincide con el trabajo realizado por Elkonin y Pakhomova, 2000; quienes realizaron un estudio sobre la influencia que tiene el nitrógeno y el fósforo en la inducción de callo de sorgo y en la regeneración del mismo; utilizando para dicho fin fragmentos de panículas jóvenes y embriones inmaduros, los cuales fueron cultivados en medios MS y N₆ suplementados con L-asparagina (6.7 mM), L-prolina (17.4 mM) y diferentes concentraciones de NO₃⁻, NH₄⁺ y PO₄³⁻. Altas concentraciones de NH₄⁺ son útiles para la formación de proteínas y ácidos nucleicos, estrechamente relacionados con la formación de tejidos (Jacques, 1988). Bajas concentraciones de NO₃⁻ dieron como resultado la formación de un callo compacto; mientras que el incremento de NO₃⁻ (39.9 – 82.4 mM) resultó en la proliferación de callo friable en algunos genotipos. Por su parte el aumento de PO₄³⁻ (de 8.8 a 14.2 mM) incrementó la embriogénesis somática (Pierik, 1990; Razdan, 2003). Se obtuvo el mejor resultado con el medio MS al cual le redujo KNO₃ a 9.9 mM y aumentó el NH₄NO₃ a 62.5 mM. Así mismo se sabe que el potasio estimula la embriogénesis, especialmente si existe la falta de nitrógeno.

Elkonin *et al.*, 2000 realizaron pruebas con las sales inorgánicas del medio MS y N₆. Respecto a la fuente de nitrógeno, encontraron que existe una mayor respuesta a la embriogénesis somática al usar el medio MS coincidiendo con los resultados reportados por Zhao *et al.*, 2000 y con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Evaluación de medios de inducción y regeneración para embriogénesis somática.

Los explantes recién cultivados son muy sensibles, para que se logre un proceso exitoso ya sea para la formación de callo embriogénico o de organogénesis. Existe una dependencia a su adaptación *in vitro* ante los cambios anatómicos y fisiológicos durante esa adaptación y nueva dependencia a los componentes de los medios de cultivo.

De los medios probados (ver tabla 5) los cuales contenían distintos tipos de sales inorgánicas, RCV y de compuestos orgánicos para la formación de callo y la subsecuente vía de regeneración, los mejores resultados se observaron en los medios que contuvieran sales inorgánicas del medio MS acompañado de una auxina fuerte, tal es el caso de la 2,4-D y con respecto a los compuestos orgánicos las vitaminas R2 y el cock 20 el efecto que tuvieron fueron muy similares y no se presentó una diferencia significativa. Correspondiendo lo antes mencionado a los medio denotados con el número 1 seguido con el medio de cultivo 3 (ver tabla 5), los cuales presentaron el porcentaje de inducción a callo más alto; el cual se calculó realizando el conteo de los explante que formaron callo y dividiendolo entre el número total de explantes usados para el método en cuestión. El número resultante se restó a 1; por último se multiplicó por 100 para sacar el porcentaje de eficiencia. La evaluación se llevó a cabo en tres tiempos (a 8,15 y 30 días) mostrándose el promedio en la gráfica 2.

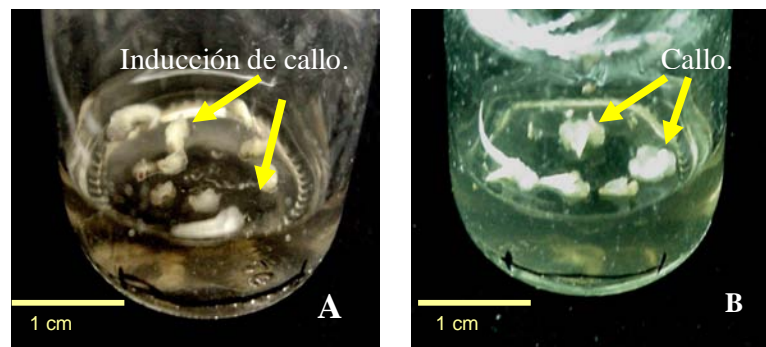
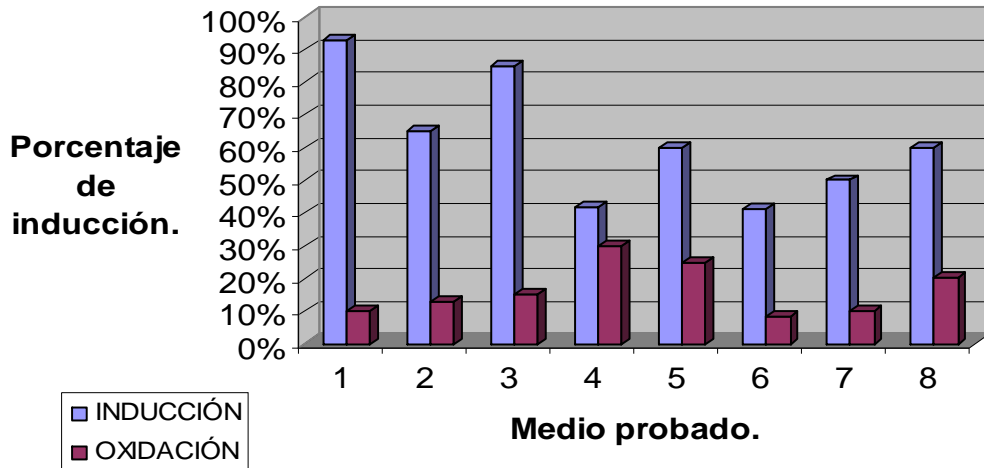


Fig.17. Coleoptilos en medio de inducción a callo embriogénico de variedad Quetzalcoatl. A) a los 8 días de siembra y B) a los 15 días.

Del mismo modo se puede constatar nuevamente la influencia de la composición del medio sobre la oxidación del explante y la disminución paulatina de la inducción ya que la formación de callo se vió limitada, llegando a una progresiva oxidación que en algunos casos provocó la muerte celular y con ello del explante (ver figura 18).



Gráfica 2. Comparación entre los distintos medios de inducción a embriogénesis (tabla 5) a partir de coleoptilos y el porcentaje de oxidación presentada en primer subcultivo.

En cada subcultivo se fueron eliminando las áreas oxidadas del explante, sin embargo se notó que el exceso de manipulación resultó perjudicial, pues aumentó el grado de oxidación del mismo. Por lo que a la hora de realizar dicho procedimiento se abocó exclusivamente a quitar las partes más dañadas o sólo los restos del explante, ver figura 19.

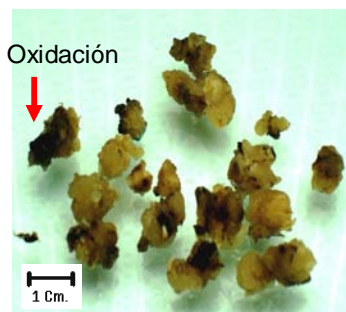


Fig. 18. Callo embriogénico con áreas oxidadas de Super Sweet II a los 3 meses.



Fig. 19. Producción de callo embriogénico los 2 mes de cultivo en inducción, variedad Quetzalcoatl.

Es bien sabido que la formación de callo depende de la concentración de las hormonas endógenas y de la concentración de los RCV del grupo de las auxinas en los medios de cultivo.

De manera natural las auxinas, como el AIA se encuentran en el citoplasma de las células en forma de anión, actúan de modo diverso en el crecimiento por alargamiento celular, incrementando el contenido osmótico de la célula y la permeabilidad al agua que es transportada a las vacuolas, vesículas del retículo endoplásmico o al aparato de Golgi, así como a organelos como los cloroplastos por medio de proteínas transportadoras (Hurtado y Merino 1994), aumentan la síntesis de ARN, originando proteínas específicas que provocan el aumento de la plasticidad de la pared celular, lo que trae como consecuencia su extensión y con ello un incremento por alargamiento (Álvarez, 2005; George y Sherrington, 1984).

La generación de callo se debe principalmente a la acción de las auxinas fuertes exógenas como 2,4-D, en altas concentraciones se usa para la iniciación de la formación de callo, debido a que suprimen la morfogénesis y da por resultado la rápida proliferación de callo, por la actividad del sistema de cascada de señales, el exceso de auxinas puede suprimir esta división y el crecimiento celular (Álvarez, 2005; George y Sherrington, 1984), actuando como ligando para activar genes que inducen la citocinesis. Aparentemente, el 2,4-D involucra un incremento sustancial en la transcripción que puede alterar la estructura de la cromatina, es responsable de los incrementos en la metilación de las citosinas del ADN. Las citosinas metiladas son consideradas puntos calientes de mutación, ya que la desaminación de una 5-metil citosina resulta en un cambio de la base de citosina a timina. Las concentraciones auxinas naturales y sintéticas tienen una elevada correlación con el porcentaje de 5- metil citosina existente, las citocininas no tienen efecto en este sentido (Hurtado y Merino 1994). La metilación de la replicación tardía de la heterocromatina, resulta en eventos de ruptura cromosómica (www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte3_cap1).

Es por ello que los medios que contenían 2,4-D tuvieron una exitosa inducción de callo comparado con el Dicamba que también es una auxina pero con menor potencia. En la mayoría de trabajos previos se ha hecho uso de esta auxina a concentraciones relativamente parecidas. Oldach *et al.*, 2001 usaron MS acompañado con 2,4-D a una concentración de 2.5 mg l^{-1} , 0.1 mg l^{-1} BAP; Tadesse *et al.*, 2003, también usaron MS acompañado con tiamina HCl 1 mg l^{-1} Glicina 7.5 mg l^{-1} , L-asparagina 100 mg l^{-1} , myoinositol 100 mg l^{-1} , Kinetina 0.2 mg l^{-1} , 2.5 mg l^{-1} 2,4-D mientras que Casas *et al.*, 1993; usaron MS, vitaminas B₅, asparagina $150 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, 10 % agua de coco, 2,4-D $2 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.

Con el paso de 5 subcultivos (cada 3 semanas) el callo comenzó a presentar apariencia de callo embriogénico con características dependientes del híbrido o variedad probada; como aparece en la figura 20. En alguno de éstos se presentaban pequeñas bolitas individuales parecidas a embriones en fase globular, teniendo un cambio de intensidad que pudo ser del amarillo claro a uno pálido, ver figura 20.

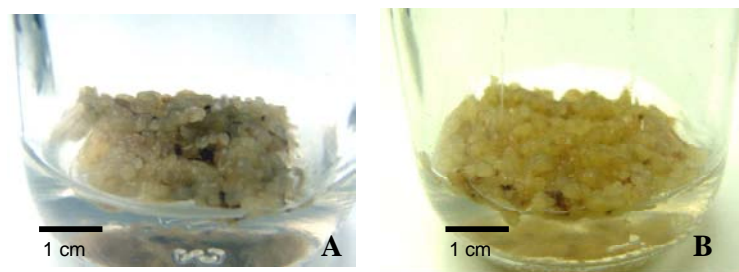


Fig. 20. Callo embriogénico a los 6 meses
A) Super Sweet II B) Variedad Quetzalcoatl.

Hipotetizando que una vez que llegaba el callo embriogénico a la fase globular (se recomienda comprobar por medio de cortes histológicos) y se disminuyó a la mitad la concentración de las auxinas con cada subcultivo; esperando con esto que se originará el cambio de estadio de los posibles embriones globulares y pasaran a torpedo o corazón; sin embargo tras varias repeticiones la eficiencia de regeneración no fue satisfactoria, se logró solo una eficiencia regenerativa del 3 %; en la figura 21 se puede observar la exitosa regeneración de una plántula mediante la técnica antes descrita. Reiterando la necesidad de estudios más detallados (a través de técnicas histológicas), para confirmar si se trata de callo embriogénico o no.

En algunos otros casos (medios 2 y 4 de la tabla 5) los callos tuvieron una consistencia esponjosa o mucilaginosa los cuales al disminuir la concentración del RCV dieron origen a raíces; lo que sugiere la generación de callos rizogénicos como es apreciado en la figura 22.

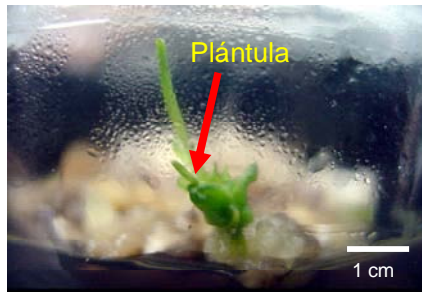


Fig. 21. Germinación de embrión somático de sorgo al reducir la concentración de 2,4-D a los 5 meses.

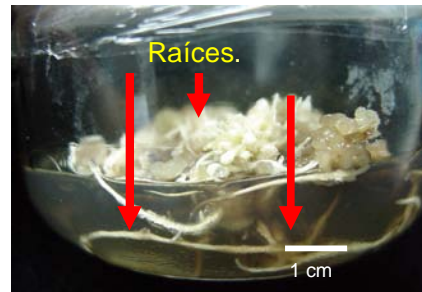


Fig. 22. Callo rizogénico de sorgo a los 5 meses.

También se dio el caso en donde la oxidación del explante fue total como los callos que aparecen en la figura 23 así como el surgimiento de callos rizogénicos, ver la figura 24.



Fig. 23. Oxidación total de callos Super Sweet II a los 5 meses.

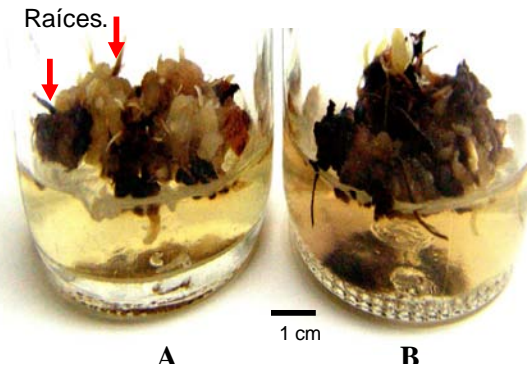


Fig. 24. Producción de callo rizogénico y oxidación en: A) Var. Quetzalcoatl B) Híbrido Super Sweet II a los 5 meses.

Algunos de los protocolos de regeneración de sorgo, después de la inducción y proliferación de callo utilizaron, para inducir la regeneración de plantas, algún tipo de citocininas tales como la BAP o la kinetina. Como lo realizaron Casas *et al.*, 1993 que usaron una combinación de 2,4-D $2 \mu\text{g l}^{-1}$ más Kinetina $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ logrando la regeneración de plántulas. Able *et al.*, 2001 utilizaron 2 mg l^{-1} 2,4-D para promover callo y regeneraron con 1 mg l^{-1} AIA más 0.5 mg l^{-1} Kinetina; mientras que Oldach *et al.*, 2001, usaron para la generación de callo, la combinación de 2.5 mg l^{-1} 2,4-D + 0.1 mg l^{-1} BAP.

Otros autores, como Nirwan y Kothari, en el 2002 probaron un medio de cultivo que consistió en las sales inorgánicas del MS suplementado con Kinetina $9.2 \mu\text{M}$, AIA $2.85 \mu\text{M}$ y usaron niveles variados de CuSO_4 (sulfato cúprico) obtuvieron un incremento considerable cuando usaron una concentración de $2 \mu\text{M}$.

Able *et al.*, 2001 usaron para la regeneración medio MS con vitaminas del medio B₅ (Gamborg *et al.*, 1968), 2 % azúcar, 0.2% hidrolizado de caseína adicionado con 1 mg l^{-1} AIA y 0.5 mg l^{-1} Kinetina, logrado una significativa regeneración de plántulas.

Los resultados obtenidos durante el presente trabajo demostraron que se puede lograr una respuesta estable a partir de callo, con la adición de citocininas como kinetina o BAP a concentraciones de 2 mg l^{-1} y 1 mg l^{-1} respectivamente; como se puede observar en la figura 25.

Harshavardhan *et al.*, 2002 realizaron las pruebas en las líneas BTX 623 y 296B y la línea popular M35-1 promovieron la formación de embriogénesis somática en el medio MS adicionado con $17.72 \mu\text{M}$ BAP y $2.69 \mu\text{M}$ ANA; para la germinación y diferenciación de los embriones somáticos usaron GA_3 $0.26 \mu\text{M}$.

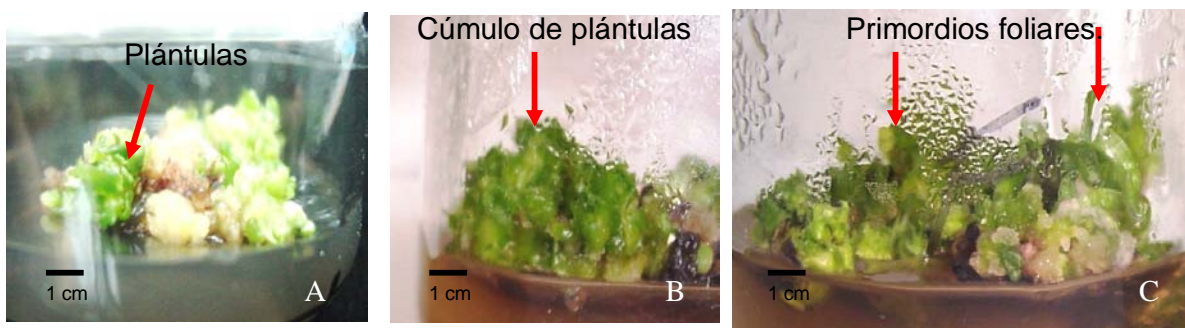


Fig. 25. Secuencia en la regeneración de callo al inducir con 1 mg l^{-1} de BAP. A) a los 10 días B) a los 20 días y C) a los 30 días de inducción a regeneración.

De los resultados obtenidos se observó que hay tres posibilidades de regeneración (ver figura 26).



Inducción de coleoptilos a callo embriogénico a los 20 días de ser sembrados.



Adicionando Kinetina 2 mg l⁻¹



Regeneración de plántulas a los 4 meses de cultivo.



Regeneración de plántulas a los 4 meses de cultivo.



Adicionando BAP 1 mg l⁻¹



Cúmulo de plántulas a los 4 meses de cultivo.



Regeneración de plántulas a los 7 meses de cultivo.



Diversidad de callos formados a los 3 meses de cultivo.

Disminuyendo en cada subcultivo el 2,4-D



Callo rizogénico oxidado a los 6 meses de cultivo.



Germinación de embrión somático a los 5 meses de cultivo.



Callo oxidado a los 6 meses de cultivo.

Fig. 26. Vías de regeneración para los callos embriogénicos.

Evaluación de medios de inducción y regeneración para organogénesis.

Para valorar los medios probados (ver tabla 6) para esta etapa se calculó el porcentaje de inducción tomando como base la respuesta de los explantes al medio, que consistió en el engrosamiento de la base del coleoptilo acompañado del surgimiento de los primeros brotes al realizar el primer subcultivo (figura 27); en algunos casos la respuesta del explante se dio hasta el segundo subcultivo.

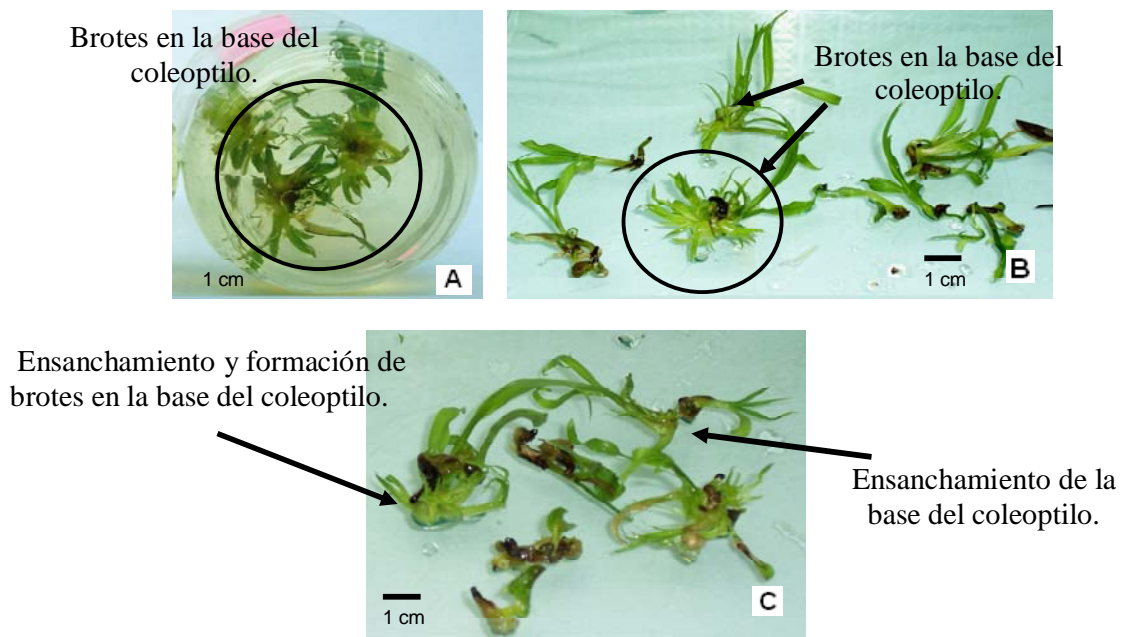
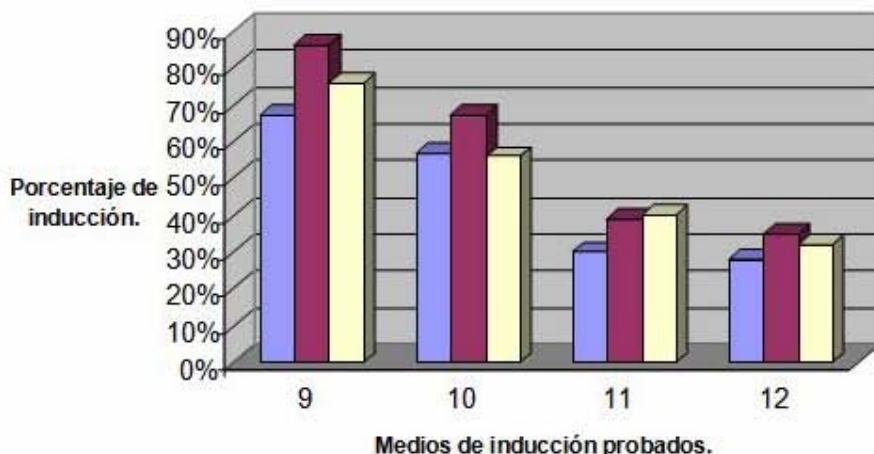


Fig. 27. Organogénesis generada al primer subcultivo (25 días) en el híbrido Super Sweet II en el medio 10.

Los porcentajes de inducción en los distintos medios probados arrojaron los resultados que se pueden observar en la gráfica 3. Para los 3 híbridos probados el medio 9 fue el que mejor resultado presentó al registrar hasta un 86% de inducción seguido por el medio 10 que registró una inducción máxima de 67%; la diferencia entre ambos medios sólo fue de los compuestos orgánicos. Los tratamientos con menor respuesta organogénica fueron con los medios 11 con un porcentaje de inducción promedio del 36% y el medio 12 con una inducción promedio de sólo 31%.

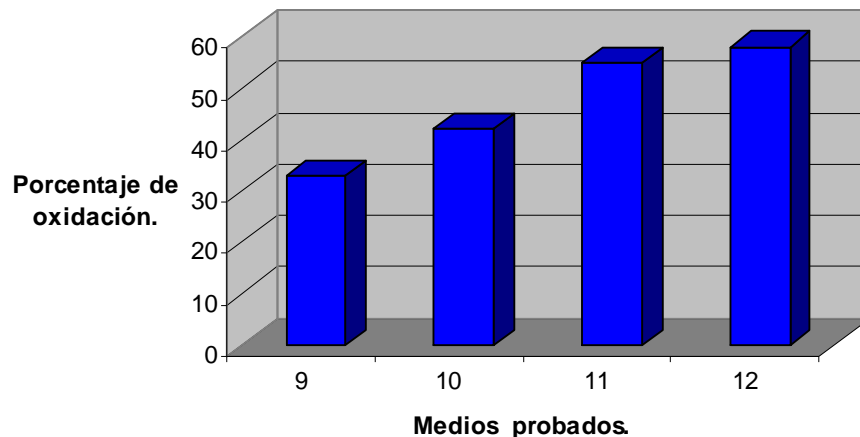


■ Híbrido Super Sweet II. ■ Híbrido DoMore. □ Variedad Quetzalcoatl.

Gráfica 3. Comparación entre la respuesta organogénica entre los híbridos usados y los medios de inducción (tabla 6) a los 4 meses de cultivo.

La composición de los medios de cultivo (tabla 6) para la formación de brotes, variaron en las concentraciones de sales minerales, especialmente en la de nitrógeno, se sabe que las concentraciones de los minerales afectan la capacidad morfogénica del explante, el aprovechamiento de otros componentes y la morfología de las estructuras. Además se tomaron en cuenta factores como: vitaminas y reguladores de crecimiento ejemplo de ello son los trabajos de Dirks y Van Buggenum, 1989; Tabei *et al.*, 1991; Shetty *et al.*, 1992; Kathal *et al.*, 1994; Leshem *et al.*, 1994; Leshem *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1996; Ezura *et al.*, 1997; Liborio *et al.*, 2001; Papadopoulou y Grumet, 2002 y Rhimi *et al.*, 2006.

Los resultados de la interacción entre sustancias orgánicas, oxidación y la inducción, mostraron que la composición del cock 20 aumentó la oxidación hasta en un 10% de los explantes, respecto al medio que contenían vitaminas R2, reduciendo su respuesta organogénica. Del mismo modo se pudo constatar un fenómeno parecido, al aumentar la oxidación con el uso del medio N₆ que a la par conllevó a una baja respuesta organogénica del explante, ver gráfica 4; que dependiendo del medio probado el promedio de oxidación fue calculado en un 50%.



Gráfica 4. Respuesta de oxidación promedio de los tres genotipos de sorgos en los medios de inducción probados (tabla 6) a los 60 días de haberse iniciado el cultivo.

El surgimiento de brotes se dió en presencia de una alta concentración de citocininas las cuales suplementadas con una mínima concentración de auxinas permitieron el origen de los brotes. Las citocininas promueven la división y expansión celular y tienen un papel fundamental en la organogénesis, ya que pueden inducir la morfogénesis, así como el crecimiento de yemas, tejidos *in vitro* de callo, hojas, cotiledones y tallo, además de inhibir el crecimiento de las raíces (Segura, 2000; Álvarez, 2005 y George y Sherrington, 1984). Dichos procesos morfogenéticos pueden estar controlados por mecanismos más complejos, estos mecanismos se pueden ver favorecidos por otros componentes del medio tales como: los azúcares, fosfatos, compuestos fenólicos, efectos físicos como la luz, temperatura, consistencia del medio, etc (Álvarez, 2005).

En la figura 28 se presentan las distintas etapas de organogénesis obtenidas en el presente trabajo; para lo cual se usó medio MS con vitaminas R2 más 2 mg l⁻¹ glicina, 4 mg l⁻¹ BAP y 0.5 mg l⁻¹ ANA (ver tabla 6); en el transcurso de 4 subcultivos progresivos equivalentes a 13 semanas. Se obtuvo una cantidad máxima de 30 plántulas a partir de un coleoptilo; con un promedio de 18 plántulas por coleoptilo, así por ejemplo en la figura 29 se muestra la formación organogénica de plántulas a partir de un coleoptilo.

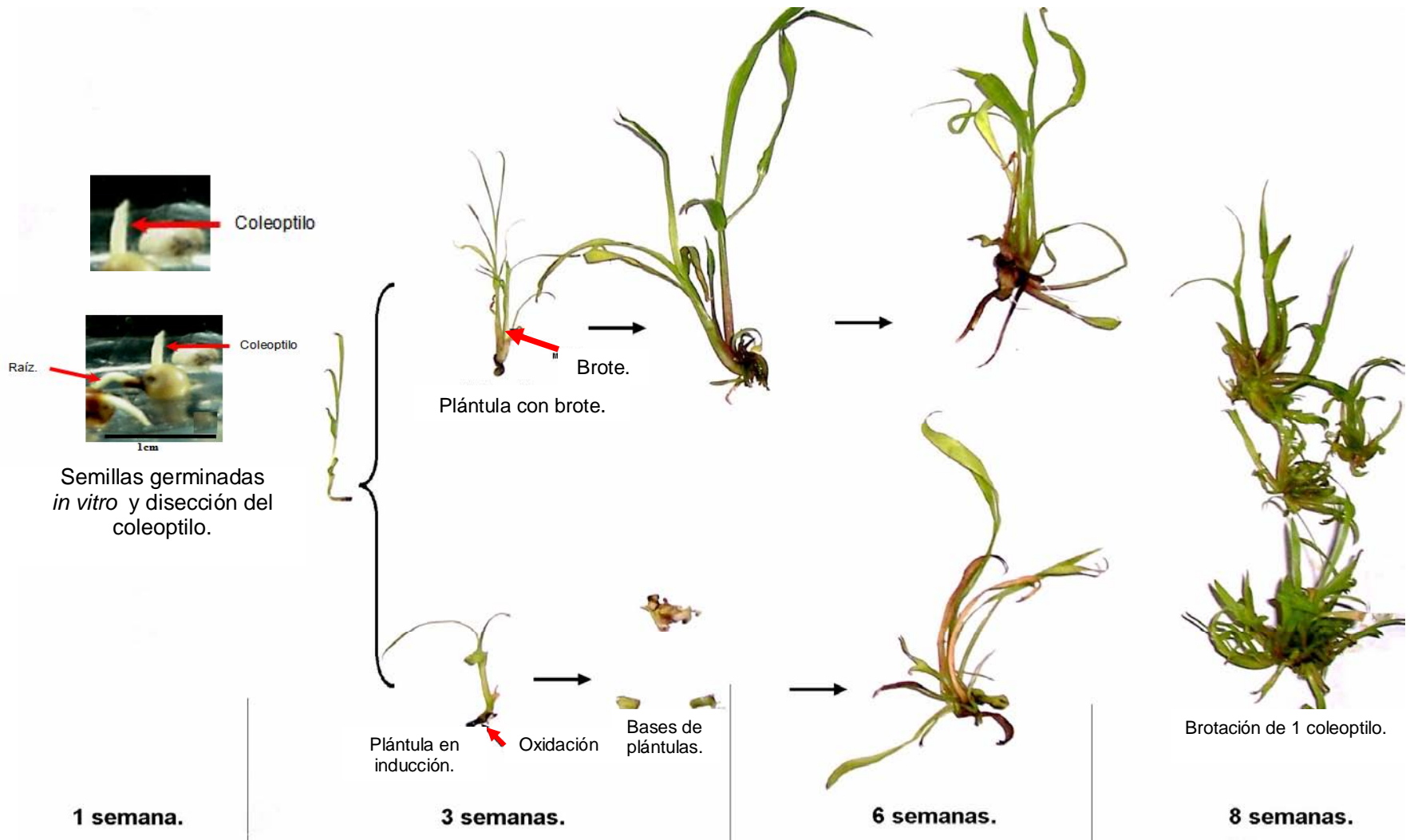


Fig. 28. Vía de regeneración organogénica de sorgo Super Sweet II.



Fig. 29. Plántulas *de novo* formadas a partir de un coleoptilo después de 13 semanas de subcultivos con el medio 9.

En la literatura existen trabajos como los de Harshavardhan *et al.*, 2002; quienes usaron meristemas apicales provenientes de hipocótilo como explantes para lograr dos vías de regeneración: la organogénesis y la “embriogénesis somática”; ambas compartieron el medio de inducción que consistió en sales MS suplementadas con 5.0 μM de TDZ más 17.72 μM BAP y 1.074 μM ANA durante 2 semanas. Posteriormente la concentración de TDZ y BAP se redujeron a 3 μM y a 13.29 μM respectivamente manteniendo la concentración de ANA. Para la semana 3 la concentración de TDZ y BAP se redujeron nuevamente a 2 μM y a 8.86 μM respectivamente, el ANA mantuvo su concentración. Para la vía organogénica se subcultivaron en medio MS suplementado con 8.86 μM BAP más 1 μM TDZ y 1.07 μM de ANA durante el subcultivo número 3; para los dos subcultivos subsecuentes el TDZ se eliminó. Para la ruta regenerativa de embriogénesis somática se siguieron subcultivando en medio con 17.72 μM BAP y 2.68 μM ANA y para la germinación de los embriones se usó el medio MS con 17.72 μM BAP y 1.074 μM ANA, obteniendo una producción de 35 a 40 brotes por meristemo durante un periodo de 6 semanas de inducción, logrando obtener un 80% de inducción.

El alto número de plantas regeneradas por meristemo logrado por Harshavardhan *et al.*, 2002 comparado con el presente trabajo pudo deberse a las citocininas usadas: TDZ, 1.1 mg l^{-1} combinada con BAP 4 mg l^{-1} , siendo el TDZ la que tiene mayor fuerza que combinada con BAP, la fuerza de inducción se incrementó; sin embargo esta sobre-estimulación puede ocasionar vitrificación del explante y anomalías en las plantas obtenidas (Herman, 1995/ cit. por Rodríguez, 2006).

Girijashankar *et al.*, 2005; emplearon meristemos apicales de plantas con 7 días de germinación, que disectaron de hipocótilos y usaron para inducir “embriogénesis somática”, el medio MS + $5 \mu\text{M}$ de TDZ, 4.0 mg l^{-1} BAP + 0.1 mg l^{-1} ANA; las citocininas que utilizaron son las mismas que usaron Harshavardhan *et al.*, 2002 incluyendo su concentración. Los subcultivos se realizaron cada dos semanas, que es un periodo más corto al utilizado durante el presente trabajo; esto lo realizaron con el fin de evitar una oxidación excesiva, dado que al usar concentraciones tan altas de los RCV antes mencionados la oxidación de los explantes tiende a aumentar considerablemente (Hurtado y Merino 1994).

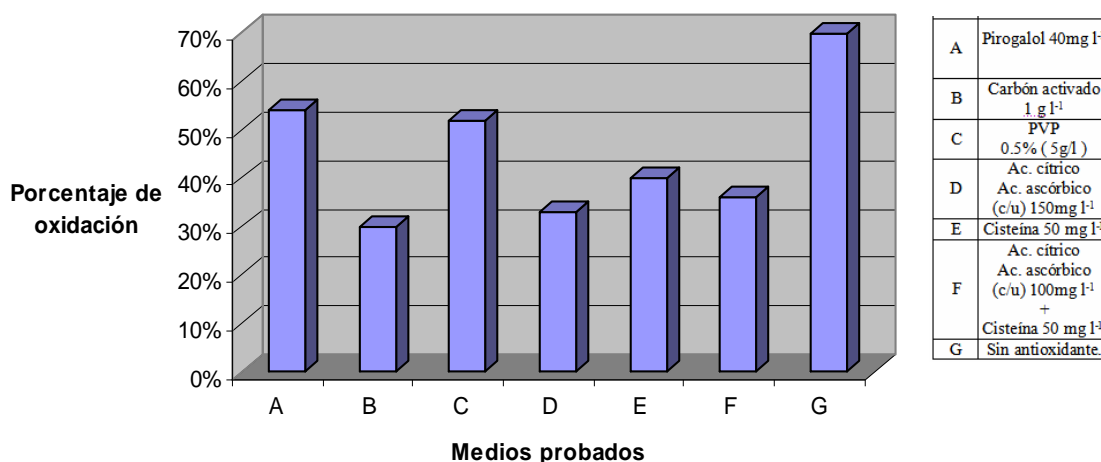
Cabe destacar que ambos trabajos utilizaron la mezcla de una alta concentración de citocininas de acción fuerte (TDZ y BAP) junto con una auxina de acción mediana (ANA). El BAP y ANA son los RCV que fueron usados para el desarrollo de la vía organogénica en el presente trabajo. En el caso del BAP la concentración fue igual; y cambió solo ligeramente la concentración del ANA; estos RCV y la concentración usadas no propiciaron características morfológicas de vitrificación como se observan en las fotos de los artículos publicados por los autores antes mencionados.

Selección de antioxidantes.

Como se mencionó en la metodología, simultáneamente se realizaron pruebas de antioxidantes o adsorbentes (tabla7). Dado que la oxidación fue uno de los principales problemas que se enfrentaron en el presente trabajo, debido a que los coleoptilos cuando sufren una herida se liberan compuestos fenólicos; que están acumulados en grandes cantidades en las vacuolas (Preece y Compton; 1991 y Hu y Wang ;1983 citados por Jiménez González; 1998) y al mezclarse con el contenido de los plastidios y otros organelos donde están confinadas las polifenoloxidasas se produce un proceso de oxidación y como aparece una coloración negra o marrón, tanto en el explante como en el medio de cultivo alrededor del explante y provoca la muerte del explante. Los productos de la oxidación son altamente reactivos e inhiben la actividad enzimática de los explantes Jiménez 2006; Wang, (1983), esto ocasionado por los fenoles que son productos extremadamente lábiles que se oxidan con gran facilidad. Estos productos pueden ser fitotóxicos y a la vez incrementan los procesos de oxidación, ya que al oxidarse se convierten en agentes oxidantes, que inhiben la morfogénesis y por ende el crecimiento y posterior regeneración del sorgo.

Varias investigaciones apuntan hacia la existencia de respuestas específicas *in vitro* dependiendo de los genotipos de sorgo utilizados, así lo demostraron Kaepler y Pedersen (1997) quienes evaluaron 41 genotipos de sorgo; mientras Kishore *et al.*, 2006 evaluaron 24 diferentes genotipos incluyendo líneas germinales; Casas *et al.*, 1993; realizaron la evaluación de 8 distintas variedades de sorgo y Sato *et al.*, 2004 realizaron la pruebas con 4 variedades; todos ellos en búsqueda de líneas elite cuya oxidación fuese mínima. Durante la realización de los experimentos se detectó que las células de sorgo liberan fenoles al medio de cultivo, acompañados de productos oxidativos que inhiben la morfogénesis y por ende el crecimiento; que se ve reflejado en una regeneración poco satisfactoria del sorgo. Dicho fenómeno se observó con mayor intensidad en variedades de sorgo con elevado nivel de taninos (Cai *et al.*, 1987 cit. por Casas; 1993).

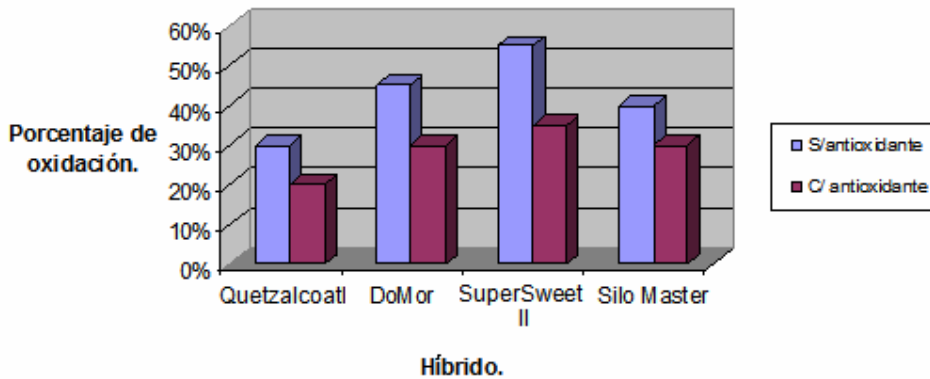
De los antioxidantes o adsorbentes (tabla 7) agregados al medio para probarlos como inhibidores de la polifenoloxidasa o adsorber los agentes oxidativos respectivamente, se obtuvieron los resultados mostrados en la gráfica 5; en donde se muestra el porcentaje de oxidación promedio de los explante a los 2 meses del inicio del su inducción por vía embriogénica en cada uno de los agentes antioxidantes probados.



Gráfica 5. Resultados del porcentaje de oxidación en los distintos medios con antioxidantes o adsorbente a los 2 meses de iniciado los cultivos.

Al comparar el tratamiento control (G) con el tratamiento del medio B, se observó que el porcentaje más bajo de oxidación lo tenía este último, seguido por el medio D (tabla 7). Cuando se comparo la respuesta morfológica (formación de callo) entre los distintos tratamientos, se observó que en el tratamiento con el medio B se presentó una inducción a callo nula o baja. Dado que el medio B contenía carbón activado, el cual es un adsorbente y posiblemente éste fue la causa, pues pudo disminuir el efecto de las auxinas sobre el explante.

Al analizar la influencia de las sales inorgánicas se observó que era necesario una concentración del 100% del MS para lograr una buena respuesta organogénica principalmente, dado que cuando la concentración de sales se redujeron al 50%, la cantidad de plantas generadas se veía disminuida; demostrandolo al probar los medios mencionados en la tabla 8, resultado mejor el medio J.



Gráfica 6. Porcentaje de oxidación en cada una de las variedades evaluadas usando el medio antioxidante “D” (tabla 7) a 2 meses de su siembra.

Enraizamiento de las plántulas.

Los resultados de los distintos medios probados (tabla 9) durante esta etapa se muestran en la tabla 14. En cada uno de los medios las raíces formadas presentaron distintas características morfológicas como consecuencia directa de los tipos de RCV y de la concentración de los mismos. El medio que mejores resultados dió fue el denominado Ra5 que consistió en sales inorgánicas MS y la fuente de carbono al 50% y una concentración de 2 mg l^{-1} de ANA que promovió el desarrollo de un buen sistema radicular de las plántulas, en el cual se observó abundancia y vigor de las raíces. En la figura 30 se muestran las evidencias de lo antes descrito.

Tabla 14. Apariencia de las raíces y porcentaje de inducción en los distintos medios de cultivo evaluados a los 40 días de iniciados los cultivos.

MEDIO	APARIENCIA DEL SISTEMA RADICULAR	PORCENTAJE DE INDUCCIÓN RIZOGENICA
Ra1	Delgadas y abundantes	85 %
Ra2	Delgadas, abundantes y más largas	87%
Ra3	Deformes esponjosas y cortas en la base de las plántulas se formaba un callo	95%
Ra4	Delgadas y abundantes	87%
Ra5	Robustas y largas con raíces secundarias	100%

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Able *et al.*, 2001 respecto a la utilización de la auxina ANA como promotor de la rizogénesis y a la reducción de la concentración de la fuente de carbono al 50%; sin embargo ellos hicieron uso de sales inorgánicas MS al 100%.

Por otra parte los resultados obtenidos coinciden con los de Nirwan y Kothari 2003 y Harshavardhan *et al.*, 2002 conjuntaron el uso de ANA a 2 mg l^{-1} y el medio MS a la mitad de su concentración; obtuvieron un sistema radical bueno, pese a que la concentración de la fuente de carbono fue al 100%

Bhaskaran *et al.*, 2006 probó las sales MS a la mitad, adicionó AIA ($2.9 - 28.5 \mu\text{M}$) sin encontrar diferencia significativa entre dichas concentraciones observando la emergencia de raíces a los 15 días del cultivo; en el presente estudio la utilización de AIA junto con AIB presentaron un porcentaje de inducción muy parecido tanto con las sales inorgánicas al 50% como al 100%. Tal es el caso de los medios Ra1 y Ra2. Además de que dichos porcentajes de inducción son también muy similares a los del medio Ra4 que era solamente medio con las sales inorgánicas al 50%. Dado que en la mayoría de los casos la reducción de la concentración de las sales MS es suficiente para la aparición de raíces (Constantine, 1978; Skirvin *et al.*, 1980 cit. por Bhaskaran *et al.*, 2006).

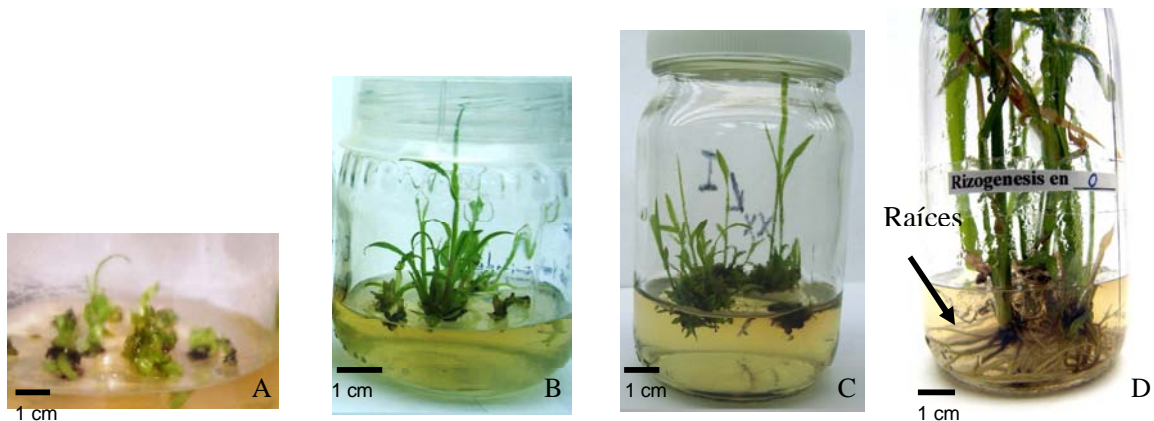


Fig. 30. Regeneración de sorgo y su posterior enraizamiento. A) Callo organogénico a los 3 meses de cultivo. B y C) Crecimiento de plántula a los 5 meses de cultivo. D) Enraizamiento de las plántulas a los 6 meses en el medio Ra5.

Los resultados demostraron que es importante agregar al medio de enraizamiento antioxidantes, para evitar que la oxidación (Figura 31-A) afecte el correcto crecimiento y desarrollo de las raíces; la decisión de agregar también antioxidantes en esta etapa se tomó después de evaluar un medio control parecido al Ra4 pero sin antioxidantes. Es por ello que todos los medios evaluados tuvieron 150 mg l^{-1} de ácido cítrico y de ascórbico, lo que ayudó a la formación de un buen sistema radicular figura 31-B;

También al probar otros materiales como sustrato tal es el caso de la agrolita esterilizada y bañada de medio Ra5, resultó ser una excelente alternativa para lograr una rizogénesis de calidad como se muestra en la figura 31-C.

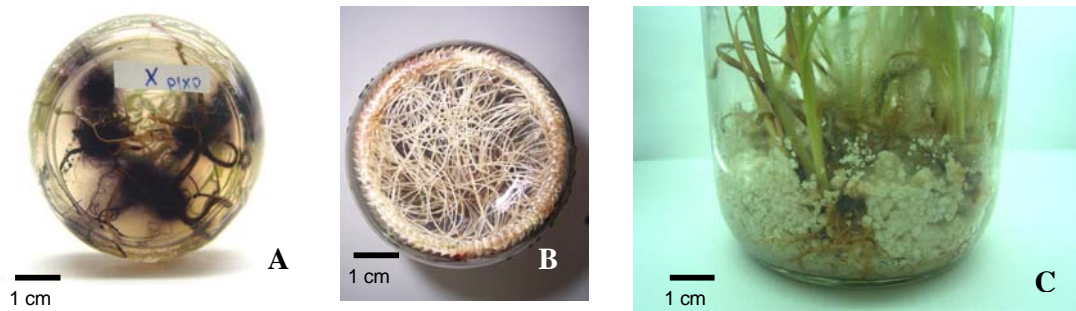


Fig.31. Etapas de enraizamiento de plántulas de sorgo Super Sweet II A) Oxidación presentada durante la etapa de enraizamiento sin antioxidantes a los 20 días de cultivo. B) Sistema radicular logrado con el medio Ra5 a los 30 días de cultivo C) Uso de la agrolita bañada con medio Ra5 a los 10 días de cultivo.

Etapas de aclimatización.

Se sabe que las condiciones controladas en las que se realiza el cultivo *in vitro* dan por resultado la formación de plantas con anomalías morfológicas, anatómicas o fisiológicas; entre las principales causas de estas anomalías se encuentra la humedad relativa alta que se encuentra en el cultivo *in vitro*. Es necesario la realización de la etapa de aclimatización para que se realicen paulatinamente los cambios morfológicos y anatómicos (por ejemplo características epidermales, grosor de las hojas y diferenciación en el mesófilo

así como en la cantidad y la estructura de los cloroplastos) necesarios para que la planta generada *in vitro* sobreviva a las condiciones *ex-vitro* (Pospíšilová *et al.*, 1999)

Por ellos se adoptaron metodologías como el uso del papel filtro 45 μm de diámetro de poro, para disminuir la humedad relativa en el interior de los frascos que contenían las plantas ya enraizadas, como se observa en la figura 32.



Fig.32. Método de disminución de humedad relativa alta con papel filtro como tapa del envase y enraizamiento generado a los 40 días.

Para el buen establecimiento de las plántulas también es importante un buen sustrato de aclimatización (Pospíšilová *et al.*, 1999). De las mezclas probadas (tabla 10) la más adecuada fue la M3 al tener propiedades de buen drenaje y porosidad evitando con ello un exceso de humedad que pudiera pudrir las plantas.

El sistema de mini invernadero (figura 33) resultó útil para reducir paulatinamente la humedad relativa y que las plántulas se adaptaran a la humedad ambiental, de este modo se aumentó el porcentaje de sobrevivencia

ex vitro. Para este sistema se debe tener precaución respecto a la cantidad y tiempo de humedad relativa alta que se requiere, dado que un exceso en cualquiera de las dos puede tener consecuencias contraproducentes que con llevarían a la pudrición de las plántulas.

Para evitar lo antes mencionado se realizaron perforaciones más frecuentes y de mayor diámetro a lo planeado, se hicieron 4 perforaciones cada ocho días y el diámetro de la perforación fue entre 4-5 mm. La incubación de los mini invernadero fue a una temperatura de 28 - 30°C

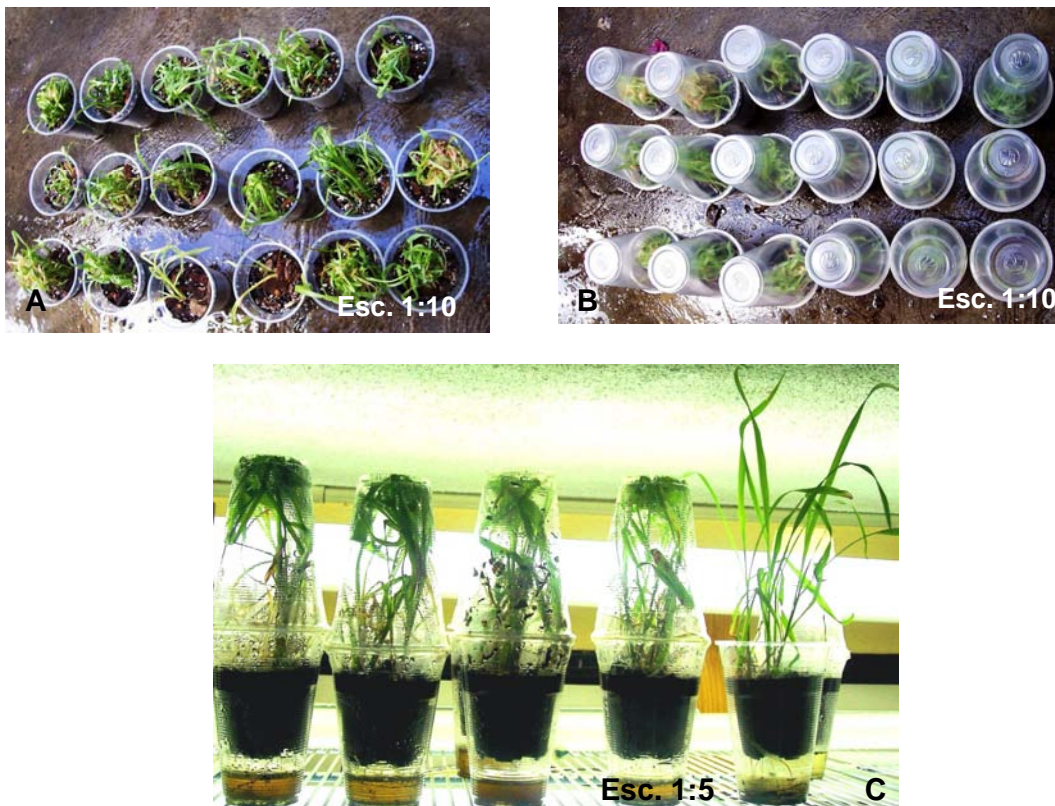


Fig. 33. Plántulas de sorgo cultivadas en mini-invernaderos
A y B) Trasplante al mini-invernadero de sorgo regenerado.
C) Incubación de mini-invernaderos a los 20 días.

La mortandad mediante este sistema fue de hasta un 30%. Una vez que el vaso superior estuvo completamente perforado se pasó a macetas más grandes y al invernadero para su crecimiento final como se muestra en la figura 34



Fig. 34. Crecimiento de plantas *ex vitro* procedentes del tratamiento con el medio 9:
A) Plantas de sorgo adaptada a los 2 meses *de ex vitro* B) Plantas de sorgo adaptada a los 3 meses de *ex vitro* crecimiento dentro del invernadero C) Plantas de sorgo adaptada a los 5 meses de *ex vitro* crecimiento dentro del invernadero en una maceta más amplia.

CONCLUSIONES CAPÍTULO I:

Métodos de esterilización superficial de las semillas:

- 1.- El mejor método de desinfección para las semillas maduras (ver tabla 3) de sorgo fue el método VI (ver tabla 11).
- 2.- Para la esterilización de las semillas inmaduras (ver tabla 4) el mejor método fue el D (ver tabla 12).
- 3.- Se comprobó que el peróxido de hidrógeno es un agente desinfectante eficiente contra hongos; además de ser promotor de la germinación del sorgo (ver gráfica 1).

Selección de híbridos de sorgo y de explantes:

- 4.- La respuesta *in vitro* del sorgo depende en gran parte de su genotipo (ver tabla 13), dado que la existencia de líneas con alto contenido polifenólico y de taninos impide el óptimo desarrollo *in vitro* en las etapas posteriores a su siembra al ser más propensos a la oxidación (ver gráfica 6).
- 5.- De los tres explante probados (ver figura 10), los coleoptilos con tamaños entre los 3-5 mm presentaron una oxidación menor y una respuesta al medio de inducción mayor y más uniforme tanto a los medio de inducción de embriogénesis somática y organogénesis (ver figura 15).

Selección de las sales inorgánicas y sustancias orgánicas de los medios de cultivo:

- 6.- El uso de las sales MS combinadas con las vit MS fueron las adecuadas para la inducción, desarrollo y regeneración de las plántulas de sorgo (ver gráfica 2 y 3).

7.- El uso de las sales N₆ combinadas con el Cock 20 propiciaron (ver figura 16) una mayor oxidación del coleoptilo, lo que afectó considerablemente la inducción, desarrollo y regeneración de las plántulas *in vitro* de sorgo (ver figura 23).

Selección de antioxidantes y concentración de sales inorgánicas:

8.- Es posible atenuar la oxidación del sorgo mediante antioxidantes (ver tabla 7) como lo son el ácido cítrico y ácido ascórbico a la concentración de 150 mg l⁻¹ de cada uno; de este modo fue posible el trabajo *in vitro* del sorgo (ver gráfica 5).

9.- La reducción de las sales inorgánicas MS a la mitad es un factor que ayudó a reducir la oxidación del explante sin embargo afectó la generación óptima de brotes adventicios.

Selección de medios de inducción y regeneración embriónica:

10.- La mejor respuesta para la formación de callo se logró en el tratamiento con el medio 1 (ver gráfica 2) que consistió de las sales MS adicionado con 2 mg l⁻¹ de 2,4-D y 150 mg l⁻¹ (ver tabla 3).

11.- Para la regeneración “germinación de embrión” se dió una mejor respuesta al disminuir el 2,4-D a 0.5 mg l⁻¹ y adicionar Kinetina 2 mg l⁻¹ ó bien con 2,4-D a 0.5 mg l⁻¹ más BAP 1mg l⁻¹ (ver figura 25).

Selección de medios de inducción y regeneración organogénica:

12.- A través de la organogénesis se logró obtener una cantidad máxima de 30 plántulas a partir de cada coleoptilo inducido; el promedio fue de 18 plántulas por coleoptilo. Esto se logró con el medio 9 (ver gráfica 3) que consistió de sales del medio MS adicionado con ANA 0.5 mg l⁻¹ y BAP 4 mg l⁻¹ (ver tabla 6).

Selección de medios de enraizamiento:

11.- La etapa de enraizamiento se logró en el medio Ra5 que consistió en medio MS al 50% de su concentración adicionado con Vit MS, Glicina 2 mg l⁻¹, ANA 2 mg l⁻¹, 150 mg l⁻¹ de ácido cítrico y ascórbico, 15 g l⁻¹ de sacarosa, gellan gum 3.0 g l⁻¹ y un pH de 5.7 (ver tabla 14).

Etapa de Aclimatización:

12.- En la etapa de aclimatización la mezcla de sustrato con mayor éxito fue la denominada M3, cuyos componentes fueron: Tierra negra 40% +Arena 20% y Agrolita 40%.

13.- La utilización del mini-invernadero es una opción para la reducción paulatina de la humedad relativa y lograr la aclimatización de las plántulas de sorgo regeneradas *in vitro* (ver figura 33).

BIBLIOGRAFÍA.

Able Jason A; Rathus Carl; Godwin Ian D. 2001. The investigation of optimal bombardment parameters for transient and stable transgene expression in sorghum. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*; May/Jun; 37, 3; agricola® pag. 341.

Ajay Kumar Singh y Suresh Chand. 2003 Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explants of a timber-yielding leguminous tree, *Dalbergia sissoo* Roxb. *J. Plant Physiol.* 160: 415–421.

Álvarez Chavarría Benjamín Centros de diversidad 2000. La riqueza biológica de los cultivos tradicionales, herencia mundial amenazada por la contaminación genética. Edit. Kinética p.p 35-45

Álvarez María Alejandra 2005. Presentación de: Cultivo *in vitro* de vegetales clase Biotecnología I.

Arcos Roa, Lázaro. 2002. Distribución, comportamiento, tecnologías y rentabilidad del cultivo de sorgo en el estado de Veracruz. Tesis profesional. Chapingo, México.

Arnold, S; Sabala, I; Bozhkov, P; Dyachok, J; Filonova, L. 2002. Developmental Pathways of Somatic Embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 69:233-249.

Arteaga Jesús y Ortiz Ligia de Bertorelli 1989. Evaluación nutricional de la proteína del grano de seis cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) *Rev. Fac. Agron. (Maracay)*, 15: 213-224.

Bhaskaran P. Raja Rajeswari B., N. Jayabalan 2006. Development of an *In Vitro* regeneration system in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] using root transverse thin cell layers. Plant Biotechnology unit, Department of plant science, school of life science Bharathidasan University. Tiruchirappalli Tamil Nadu, India.

Bhaskaran, S. and Smith, R.H. 1988. Enhanced somatic embryogenesis in *Sorghum bicolor* from shoot tip culture. *In Vitro Cellular Development Biology* 21:65-70.

Bhaskaran, S. and Smith, R.H. 1989. Control of morphogenesis in sorghum by 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and cytokinins. *Annual Botany* 64:217-2214.

Bhaskaran, S., Neumann, A.J. and Smith, R.H. 1988. Origin of somatic embryos from cultured shoot tips of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *In Vitro Cellular Development Biology* 24:947- 950.

Birch, R. G. 1997. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 48:297-236.

Boyes, C.J. and Vasil, I.K. 1984. Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured young inflorescences of *Sorghum arundinaceum* (Desv.) Stapf. var. Sudanese (Sudan grass). *Plant Science Letters* 35:153-57.

Brar, D.S., Rambold, S., Gamborg, O. and Constabel, F. 1979. Tissue culture of corn and sorghum. *Z. pflanzenphysiology* 95:377-88.

Buetow, D. E., Korban S. S. 2000. Transgenic plants producing viral and bacterial antigens AgBiotechNet (Web).

Caamal Cauich I. Ávila Dorantes J. A. 2004. Situación y perspectivas del sorgo en el contexto del TLCAN, Universidad Autónoma Chapingo, México

Cai, T. and Butler, L. 1990. Plant regeneration from embryogenic callus initiated from immature inflorescences of several hightannin sorghums. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 20: 101–110.

Cai, T., Daly, B. and Butler, L. 1987. Callus induction and plant regeneration from shoot portions of mature embryos of high tannin sorghum. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 9: 245–252.

Carman, J. 1990. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26:746- 753.

Carvalho Carlos Henrique S., Usha B. Zehr, Nilupa Gunaratna, Joseph Anderson, Halina H. Kononowicz, Thomas K. Hodges and John D. Axtell 2004. Agrobacterium-mediated transformation of sorghum: factors that affect transformation efficiency. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 2, 259-269

Casas A M, Kononowicz AK, Zehr UB, Tomes DT, Axtell JD, Butler LG, Bressan RA, Hasegawa PM 1993. Transgenic sorghum plants via micro projectile bombardment. *PNAS, USA* 90:212–216

Casas, A.M., Kononowicz, A.K., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. 1995. Cereal transformation through particle bombardment. *Plant Breeding Review* 13:231-260.

Chávez V. 1993. Embriogénesis somática a partir de folíolos jóvenes de plantas maduras de *Ceratozamia Mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Zamiaceae) especie en peligro de extinción. Tesis de Doctorado en Ciencias, Facultad de Ciencias. UNAM. Pp. 18-21.

Chourey, P. S. & D. Z. Sharpe 1985 Callus formation from Protoplasts of Sorghum cell suspension cultures. *Plant Sci.* 39 , 171-175.

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

Davies P. J. (ed). 2da edición. Kluwer Academic Publisher. Netherlands.. pp 774-796.

Dike O. Ukuku 2004. Effect of hydrogen peroxide treatment on microbial quality and appearance of whole and fresh-cut melons contaminated with *Salmonella* spp. *International Journal of Food Microbiology* 95 pp. 137– 146

Dunstan, D.I.; Turner, K.E.; Lazaroff, W.R. 1985. Propagation *in vitro* of apple rootstock M.4: effects of phytohormones on shoot quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.4, p.55-60.

Elkonin Lev A. and Pakhomova N. V 2000. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61: 115–123.

Estadístico de la Producción Agrícola. México. 2005 Programa Estratégico de Necesidades de Investigación y Transferencia de Tecnología en el Estado de Querétaro Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Querétaro.

Eudes F., S. Acharya, A. Laroche, L.B. Selinger and K. J. Cheng 2003. A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. *Plant Cell , Tissue and Organ Culture* 73: 147–157. Netherlands.

Evans, D. J.; Coleman, O. D. and Keans, A. *Plant cell culture*. 2003. Bios Scientific Publishers. 2a Editions. E.U

FAO. 1980-2001. Estadísticas de la Producción Agrícola.

Feher Attila, Taras P. Pasternak and Denes Dudits 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 74: 201–228.

Gamborg , OL, Muller, RA, Ojima, K 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Research*, 50: 151-158.

George, E.F.; Sherrington, P.D. 1984. Factors affecting growth and morphogenesis. In: George, E.F.; SHerrington, P.D. (Ed.) *Plant propagation by tissue culture*. London: Exegetics. cap.5, p.125-171.

Giddings G.; Allison, G.; Brooks, D.; Carter, A. 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnol* 18:1151-1155.

Girijashankar V. · H. C. Sharma · K. K. Sharma · V. Swathisree · L. Sivarama Prasad · B. V. Bhat · M. Royer · B. San Secundo · M. Lakshmi Narasu · I. Altosaar and N. Seetharama 2005. Development of transgenic sorghum for insect resistance against the spotted stem borer (*Chilo partellus*) genetic transformation and hybridization *Plant Cell Rep* 24: 513–522

Gomez, R 1998. Generalidades sobre la embryogenesis somática. Resúmenes del curso internacional de Propagación Masiva in Vitro de Especies vegetales Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara- Cuba.134p.

Gordon-Kamm W.J., Spencer T.M., Mangano M.L., Adams T.R., Daines R.J., Start W.G., O' Brien J.V., Chambers S.A., Adams W.R. Jr., Willetts N.G., Rice T.B., Mackey C.J., Krueger R.W., Kausch A.P. y Lemaux P.G. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *The Plant Cell*, 2: 603-618.

Gray, D. 2000. Nonzygotic embryogenesis. *In* Trigiano, R; Gray, D. eds. *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. USA, CRC Press. p.175 – 190.

Gray, S.J.Meredith, C. P. Hammerschlag, F. A.Litz, R. E 1992. *Grape, Biotechnology of perennial fruits crops*. Wallingford (United Kingdom). CAB International. P. 229-262. 669

Grootboom A. and M. M. O'Kennedy 2006. Genetic enhancement of nutritional quality of grain sorghum CSIR Bio/Chemtek, P.O Box 395, Pretoria 0001, South Africa 20-60.

Harshavardhan D, Rani TS, Ugalanathan K and Seetharama N. 2002. An improved protocol for regeneration of *Sorghum bicolor* from isolated shoot apices. *Plant Biotechnology* 19(3):163–171.

Heidi F. Kaeppler¹ and Jeffrey F. Pedersen 1997. Evaluation of 41 elite and exotic inbred *Sorghum* genotypes for high quality callus production. *Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands*. Dept. of Agronomy, University of Wisconsin, 1575 Linden Drive, Madison, WI 53706, USA.

House, Leland R. 1982. El sorgo guía para su mejoramiento genético. Universidad Autonoma chapingo 25-77 y 345-357.

Hu, C. y Wang, P.J. 1983. Meristem, Shoot Tip and Bud Culture *In* Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V., Yamada, Y. (Eds) *Handbook of Plant Cell Culture*, Macmillan Publishing Co, New York pp.177-227.

Hu, CY; Sussex, IM 1986. *In vitro* development of embryoids on cotyledons. factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. 57:443-462.

Hurtado M. Daniel V. y Merino M. María Eugenia 1994. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas. Tercera Edición. México. Pp.49-65 y 133-145.

Ikeda-Iwai Miho, Mikiyama Umehara, Shinobu Satoh and Hiroshi Kamada 2003. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *The plant Journal* 34, 107-114.

Iwona Morkunas, Waldemar Bednarski and Monika Kozłowska 2004. Response of embryo axes of germinating seeds of yellow lupine to *Fusarium oxysporum* Plant Physiology and Biochemistry 42 493–499

Jacques Margara 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la organogénesis. Ediciones MUNDI-PRENSA p.p 40- 70 y 80-120.

Jaramillo M., A. León, I. Angulo y M. Peña 1994. Valor nutricional de cultivares de sorgo granífero (*sorghum bicolor* (L) moench.) altos en taninos producidos en Venezuela II. Energía metabolizable Zootecnia Tropical, 12(1):23-53.

Jaramillo Marta, Máximo Peña, Iván Angulo, Alicia León y Néstor Obispo 1993. Valor nutricional de cultivares de sorgo granifero [*sorghum bicolor* (L) moench] altos en taninos producidos en Venezuela. composición química Zootecnia Tropical, 11(2):129-150.

Jiménez, Maria de Jesús Villalobos 2006. Transformación genética de callos embriogénicos de Maíz (*Zea mays* L.) con el gen de la Glicoproteína G del virus de la rabia. Tesis de licenciatura UNAM

Kaepler H.F. and Pedersen J.F. 1997. Evaluation of 41 elite and exotic inbred *Sorghum* genotypes for high quality callus production. Plant Cell Tissue Organ Culture 48: 71–75.

Kaepler HF and Pedersen JF. 1997. Evaluation of 41 elite and exotic inbred *Sorghum* genotypes for high quality callus production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 48:71–75.

Karunaratne, S., C Gamage and A Kovoov .1991. Leaf maturity, a critical factor in embryogenesis. J. Plant Physiol. 139:27-31.

Klee H, Estelle M. 1991. Molecular genetic approaches to plant hormone biology. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42, 529–551

Krikorian, A. 1995. Hormones in Tissue Culture and micropropagation In: Plant Hormones. Physiology , Biochemistry and Molecular Biology.

Lindsey, K. y M. Jones. 1989. Biotecnología vegetal agrícola. Ed. ACRIBIA. España. 273 p.p 53-90

López, Carlos Coello 2000. Los taninos en la alimentación de las aves comerciales Departamento de Producción Animal: Aves, FMVZ, UNAM Ciência Animal Brasileira 1(1): 5-22.

Lu C, Vasil IK 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Panicum maximum* Jacq. (*Guinea grass*). *Am J. Bot* 72: 1908–1913

- Lu C, Vasil V, Vasil IK 1981. Isolation and culture of protoplasts of *Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass): Somatic embryogenesis and plantlet formation. *Z Pflanzenphysiol* 104: 311–318
- Lu C., Vasil V. y Vasil I.K. 1983. Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue culture of maize (*Zea mays* L.). *Theoretical Applied Genetics*, 66: 285-289
- Lu H., V.J. Higgins, 1999. The effect of hydrogen peroxide on the viability of tomato cells and of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 54 pp. 131–143.
- Lusardi MC and Lupotto E. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sorghum* species. *Maydica* 35:59–66.
- Ma, H. and Liang G. H. 1987. Plant regeneration from cultured immature embryos of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theor. Appl. Genet.* 73: 389–394.
- Masteller, V.J. and Holden, D.J. 1970. The growth of and organ formation from callus tissue of sorghum. *Plant Physiol.* 45: 362–364.
- Mere Villanueva Gabriela y Vázquez Alejandro Violeta 2003. “ Bombardeo de callos embriogénicos de zanahoria (*Daucus carota* L.) y su regeneración con la proteína G del virus de la rabia” Tesis de licenciatura Facultad de Química, UNAM.
- Merkle S.A; Parrott W.A. and Flinn B.S. 1995 Morphogenic aspects of somatic embryogenesis in: *in vitro* embryogenesis in plants T.A. Edit. Thorpe Kluwer Academic Publisher Netherlands. p.p. 155-203
- Muñoz T. S. Isabel. 2003. Embriogénesis somática en Cedro (*Cedrela odorata Linnaeus*) a partir de Cotiledones Tesis de licenciatura.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473–497.
- Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25: 1 35-66
- Mythili P. K. · N. Seetharama and V. D. Reddy 1999. Plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures of wild sorghum (*Sorghum dimidiatum* Stapf.) *Plant Cell Reports* 18: 424–428
- Nahdi S, de Wet J M J 1995. *In Vitro* regeneration of *Sorghum Bicolor* lines from shoot apices. *Int. Sorghum & Millets Newsletter*, 36:88-90
- Nakano, H, and MAEDA, E , 1979 Shoot differentiation in callus of *Oryza sativa* L *Zeitschrift fur. Pflanzenphysiologie* 93, 449-58

Neill S. J., Radhika D., Andrew C., Roger D. Hurst and J. T. Hancock 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of experimental botany* Vol.53 N° 372 Antioxidants and reactive oxygen species in plants special issue pp.1237-1247.

Nirwan R S; Kothari S L 2003. High copper levels improve callus induction and plant regeneration in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*; Mar/Apr; 39, 2; AGRICOLA p.p. 161

OJ Schwarz, RM Beaty - Plant Tissue Culture Concept and Laboratories Exercises. CRC. 2000

Oldach K. H. · Morgenstern A. · Rother S. · Girgi M. Kennedy M. O' · Lörz H. 2001. Efficient *in vitro* plant regeneration from immature zygotic embryos of pearl millet *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. and *Sorghum bicolor* (L.) Moench *Plant Cell Rep.* 20:416–421

Pérez M.B., Ramírez M.R y Núñez P.H. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México p.p 30-60.

Pérez Ponce J.N., Alvarado Capó Yelenys., Gomez Kisky Rafael; Jiménez González Elio A., Orellana Pérez Pedro A. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de plantas.

Pérez, J. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología: Introducción a la Mejora de Plantas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba.

Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. pp.324

Popelka J. C. and Altpeter F. 2003. Evaluation of rye (*Secale cereale* L.) inbred lines and their crosses for tissue culture response and stable genetic transformation of homozygous rye inbred line L22 by biolistic gene transfer. *Theor. Appl. Genet.* 107: 583–590.

Popelka Juan Carlos, Jianping Xu and Fredy Altpeter 2003. Generation of rye (*Secale cereale* L.) plants with low transgene copy number after biolistic gene transfer and production of instantly marker-free transgenic rye. *Transgenic Research* 12: 587–596.

Pospíšilová J., I. Tichá, P. Kadleček, D. Haisel and Š. Plzánková, 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, *Biologia plantarum* 42 (4): 481-497.

Potrykus I. 1990. Gene transfer to cereals: an assessment. *Bio/Technology* 8: 535–542.

Preil W & Beck A .1991 Somatic embryogenesis in birreactor culture. Acta Hort. 289: 179–192

Rao S. V. Seetharama N. 2006. In vitro culture methods in sorghum with shoot tip as the explant material. Plant Cell Rep 25: 174–182

Razdan, M. 2003. Introduction to plant tissue culture. Science Publishers, Inc. USA. pp.375.

Ribnicky DM (1996) The role of auxin in carrot embryogenesis. Ph.D. dissertation. University of Maryland, College Park.

Robert Manuel L. y Loyola Victor M. 1985. El cultivo de tejidos en México CONACyT / CICY 81-85.

Robert N Trigiano and Dennis J G. 2000. Plant Tissue Culture Concepts and laboratory exercises. CRC press. Pag. 11- 15.

SAGARPA 2002. Sistema Nacional de Consulta SIACÓN. Anuario

SAGARPA. 2003. Tercer informe de labores. México.

Sairam, R.V M. Parani, G. Franklin, Z. Lifeng, B. Smith, J. MacDougall, C. Wilber, H. Sheikhi, N. Kashikar, K. Meeker, D. Al-Abed, K. Berry, R. Vierling, and S.L. Goldman 2003 Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. Transformation. Genome 46: 323–329.

Salisbury, F.B. y Ross, C.W. 1994. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamericana pp. 293- 317, 395-451.

Sánchez Miguel Angel y Ramoa Hernán Abel 2005 *Cultivo de Sorgo Granífero* (Trabajo Práctico sobre SORGO). Producción Agraria I Argentina. p.p 20-70

Sato S; T Clemente and I Dweikat 2004. Identification of an elite sorghum genotype with high *in vitro* performance capacity. In Vitro Cellular and Developmental Biology; enero –febrero 40: 57-60.

Seetharama N, Sairam RV and Rani TS. 2000. Regeneration of sorghum from shoot tip cultures and field performance of the progeny. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 61(2):169–173.

Segura, J. 2000. Citoquininas. En: Azcón-Bieto, J. y M. Talón (Eds.). Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill. España. p.p 343–360.

Smith Wayne C. Richard A. Frederiksen 2001. Sorghum Origin, History, Technology and Production. Wiley series in crop science. Series editor. p.p.3-191

Smith, M.K.; Drew, R.A. 1990. Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.17, p.267-289.

Somers David A., Deborah A. Samac, and Paula M. Olhoft 2003 *Recent Advances in Legume Transformation Plant Physiol*, March, Vol. 131, pp. 892-899

Songstad D. D., W. L. Petersen, C. L. Armstrong 1992. Establishment of Friable Embryogenic (Type II) Callus from Immature Tassels of *Zea mays* (Poaceae) *American Journal of Botany*, Vol. 79, No. 7 (Jul.), pp. 761-764

Songstad, D.D., Somers, D.A. and Griesbach, R.J. 1995. Advances in alternative DNA delivery techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40: 1-15.

Su, W. 2002. Chapter 10: Cell culture and regeneration of plant tissues. En: G. Khachatourians, A. McHughen, R. Scorza, W. Nip, Y. Hui (Eds.). *Transgenic Plants and Corps*. Ed. Marcel Dekker Inc. Nueva York. Pp. 151–167.

Tadesse Yohannes, Sági Lászo, Swennen Rony and Jacobs Michel. 2003. Optimisation of transformation conditions and production of transgenic sorghum (*S. Bicolor*) via microparticle bombardment *Plant Cell Tissue and organ culture* 75:1-18.

Takiko Shimada and Yasuyuki Yamada 1979. Wheat plants regenerated from embryo cell cultures *The Japanese journal of genetics* Vol.54 , No.5 pp.379-385

Thorpe, T. 1991. Introducción al Cultivo de Tejidos y Biotecnología Vegetal. In : *Resúmenes del curso Técnicas y Aplicaciones de Biotecnología en especies Forestales*. (ed) Villegas Leopoldo. Corporación Andina de Fomento. Caracas. Venezuela. pp 91 – 107

Tomes, D.T. 1985. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets. In: Bright, S.W.; Jones, M.G.K. (Ed.) *Advances in agricultural biotechnology, cereal tissue and cell culture*. Boston: Nijhoff/Junk,. 1985 p.175-203

Uribe, L. 1998. Influencia de distintos antioxidantes sobre brotación y crecimiento in vitro de Ceiba (*Ceiba pentandra*). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencia. UNAM. pp. 37

Vain P., V. A. James, B. Worland, J. W. Snape 2002. Transgene behaviour across two generations in a large random population of transgenic rice plants produced by particle bombardment. *Theor. Appl. Genet.* 105:878–889.

Vasil IK . 1994. Automation of plant propagation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39: 105–108.

Vasil IK 1987. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. *J Plant Physiol* 128: 193–197

Vasil IK 1994. Molecular improvement of cereals. *Plant Mol Biol* 25: 925–937

Vasil IK, Vasil V 1992 Advances in cereal protoplast research. *Physiol Plant* 85: 279–283

Vasil Indra K, Vasil IK 1980. Isolation and culture of cereal protoplasts II. Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. *Theor Appl Genet* 56: 97–99

Vasil V, Vasil IK 1981 Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum* P. *purpureum* hybrid. *Amer J Bot* 68: 864–872

Vasil V, Vasil IK 1981 Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of Pearl millet (*Pennisetum americanum*) *Ann Bot* 47: 669–678

Vasil V.M Clancy, RJ Ferl, IK Vasil 1989 and Peggy Ozias-Akins 1981 Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat): Evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma*. Volume 110, Number 2 / junio de 1982

Vasil Indra K 2005 .The story of transgenic cereals: the challenge, the debate and the solution a historical perspective In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41:577–583.

Vidales F. Ignacio 2002. Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill.) Tesis de doctorado en ciencias: Área ciencias agrícolas y forestales. Universidad de Colima.

Wei ZH, Xu ZH 1990 Regeneration of fertile plants from suspension culture protoplasts of *Sorghum vulgare*. *Plant Cell Rep.* 9:51–53

Zuo-yu Zhao, Tishu Cai, Laura Tagliani, Mike Miller, Ning Wang, Hong Pang, Marjorie Rudert, Sheryl Schroeder, Dave Hondred, Jon Seltzer and Dortie Pierce 2000. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation *Plant Molecular Biology* 44: 789–798.

Páginas web:

<http://es.wikipedia.org/wiki/Sorgo> 2007.
<http://www.argenbio.org/h/biblioteca/index.php> 2006
http://www.argenbio.org/h/biblioteca/libropre.php?link=25_VIII_1.pdf, 2005
<http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/ztzoo/zt1102/texto/sorgogramifero.htm>,2004
<http://www.fao.org>, 2002
<http://www.healthfraud.org>, 2007
<http://www.infoagro.com/herbaceos/forrajes/sorgo> 2006.
http://www.inicia.cl/biotecnologia/c_tejidos.htm, 2007
http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte3_cap1,2006
<http://www.mantra.com.ar>, 2007
<http://www.microbiologia.com.ar>,2007
<http://www.microdyn.htm>,2007
http://www.monografias.com/trabajos10/01_biot/01_biot.shtm, 2007
<http://www.monografias.com/trabajos12/pubenint/pubenint.shtml>, 2005
<http://www.portaley.com/biotecnologia>, 2006
<http://www.portaley.com/biotecnologia/>, 2006
<http://www.qro.itesm.mx/agronomia2/extensivos/CSorgoIndice.htm>, 2005
<http://www.sebiot.es>, 2005
<http://www.wordbiolene.com/espanol/boletin/-bolet06>, 2007

CAPÍTULO II

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA.

INTRODUCCIÓN:

Hoy gracias a las distintas áreas de la Biotecnología, como lo es el cultivo de tejidos vegetales y a las modernas técnicas de biología celular y molecular que al ser combinadas, se convierten en poderosas herramientas para complementar el fitomejoramiento tradicional y superar las barreras del mismo, permitiendo el acceso a un banco genético amplio a través de la transferencia de genes con características deseables entre dos especies sin importar su relación taxonómica ni filogenética, es posible introducir genes nuevos a las especies vegetales (Alberts *et al.*, 2002; Voet, 2004; Vasil, 2005).

Las principales áreas de aplicación para la mejora de las plantas son la resistencia a los herbicidas, a los insectos y a las enfermedades microbianas, así como la mejora de la calidad de productos (aumento en la cantidad de vitaminas, nutrientes, etc). Además, las plantas transgénicas son un sistema de expresión viable y muchas veces preferible para la obtención de productos farmacéuticos, ya que se ha demostrado, que tienen una gran capacidad para expresar genes provenientes de fuentes diversas como virus, hongos, bacterias, insectos u otras especies vegetales; así mismo son capaces de llevar a cabo modificaciones postraduccionales complejas (ej. glucosilación) y producir concentraciones altas de la proteína de interés (Guerrero, 2000). Por otra parte la producción de proteínas recombinantes en plantas tiene ventajas potenciales para la generación de biofármacos relevantes, entre las cuales se encuentran, la disponibilidad de tecnología para la cosecha y procesamiento de plantas a gran escala, además representan una vía más económica que la utilización de sistemas industriales como los bioreactores y la fermentación, asimismo se elimina la necesidad de purificar la proteína recombinante cuando el tejido de la planta es utilizado como alimento (vacunas comestibles) (Bartolomé, 2001; Guerrero-Andrade *et al.*, 2006, Guerrero-Andrade *et al.*, 2000; John, 1997; Peña Ramírez *et al.*, 2007).

El concepto de producción de vacunas en plantas fue introducido por Mason *et al.*, 1992, cuando expresaron el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en plantas de tabaco. Las proteínas involucradas en la respuesta inmune pueden ser producidas a bajo costo y purificadas fácilmente de los extractos vegetales para ser inoculadas de forma parental o mejor aún, en forma oral mediante el consumo de las partes comestibles de las plantas transformadas. Esto último puede estimular respuestas inmunes en los sitios de entrada de muchos patógenos, facilitando el diseño de programas de vacunación a gran escala (Voet, 2004; Vasil, 2005).

Se ha demostrado que la presencia de antígenos específicos en plantas que van a ser utilizados como inmunógeno oral puede provocar reacciones inmunológicas comparables con las provocadas por vacunas convencionales (Haq, *et al.*, 1995 Guerrero-Andrade *et al.*, 2006, Peña Ramírez *et al.*, 2007).

Uno de los principales métodos de control y erradicación de la rabia y del virus del oeste del Nilo es la inmunización. Existen vacunas del virus modificados y tenuados, sin embargo aunque en general las vacunas antirrábicas son de buena calidad, al salir de los laboratorios productores su conservación es difícil, especialmente por la pérdida de la cadena fría en los diferentes territorios de nuestro país (Landridge, 2000; Ginddings *et al.*, 2000).

Es por esto la relevancia de elaborar una planta transgénica basada en el modelo de zanahoria que pueda ser utilizada como inmunógeno contra virus ya sea de la rabia o del virus del oeste del Nilo. Dado que la estabilidad que ofrecen respecto a los esquemas de vacunación son mayores principalmente al no requerir una cadena fría para su transportación y almacenamiento (Mere y Vázquez, 2003).

REVISIÓN DE LITERATURA.

El mejoramiento genético inició hace más de 10,000 años; en el momento en que el hombre comenzó la domesticación de las plantas para satisfacer necesidades de consumo. Para el siglo XX, con el avance en los conocimientos de la biología floral, genética, estadística y los cruzamientos sexuales se inició la generación de híbridos para obtener individuos con mejores características (mayor rendimiento, calidad nutricional, resistencia a agentes bióticos y abióticos). Basados solamente en la existencia de la variabilidad genética, para los caracteres que se desean mejorar y la reproducción sexual para la incorporación de factores discretos heredables (genes) todo lo anterior se basó en los experimentos realizados por Gregor Mendel en el siglo XIX. Sin embargo este método (fitomejoramiento) es lento y azaroso además de presentar las llamadas barreras de cruzamiento, es decir una incompatibilidad genética; que es sin lugar a dudas el factor más limitante para el aprovechamiento de la variabilidad genética (Vasil, 2005).

Con la finalidad de superar esta barrera se inició la búsqueda de otros métodos entre los cuales surgió uno para la fusión de protoplastos publicado por el grupo de Edward Cocking abriendo con ello la posibilidad de la generación de nuevos híbridos sin importar su relación taxonómica; rompiendo la dificultad de incompatibilidad sexual (Power *et al.*, 1970; citado por Vasil, 2005).

Con la llegada en la década de 1970 de la Ingeniería Genética o técnica de ADN recombinante (permite el acceso y manipulación directa de la información contenida en el ADN) y las técnicas de la biología celular y molecular, dan un salto gigantesco para la superación de las barreras del cruzamiento, haciendo posible la introducción a las plantas de genes provenientes no sólo de otras especies vegetales muy alejadas desde el punto de vista evolutivo, sino incluso de hongos, virus, bacterias y animales. Dando como resultado una plantas transgénicas o genéticamente modificada (Alberts *et al.*, 2002; Voet, 2004).

En esa misma década los trabajos (formación de tumores por *Agrobacterium tumefaciens*) de Armin Braun (1958) se retoman en la Universidad de Rockefeller (E.U) y en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias en Francia; resultando en el descubrimiento del plásmido Ti el cual fue utilizado como vector para transferir genes y lograr las primeras plantas transgénicas.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN PLANTAS.

En 1983 se informaron los primeros experimentos de expresión de un transgen (gen introducido) en células vegetales y al año siguiente se obtuvieron las primeras plantas transgénicas, tales fueron los casos de tabaco y petunia.

En 1985, Stephen Howell de la Universidad de California, San Diego y sus colaboradores Don Helinski y Marlene DeLuca obtuvieron el gen de la luciferasa de luciérnagas; posteriormente se realizaron protoplastos de zanahoria. Para posteriormente desarrollar una planta de tabaco fluorescente (Ow *et al.*, 1986. 2000).

Desde entonces se ha extendido la aplicación de esta tecnología a unas 120 especies; haciendo uso de diversas técnicas de transformación; tales como electroporación, microinyección, bombardeo con partículas y *Agrobacterium tumefaciens* (Kaufman, 1995). Siendo las dos últimas técnicas las más usadas actualmente. (Lindsay, 2002), dividiéndose en dos: directa e indirecta.

Tabla II. 1: Características primordiales de los métodos de transformación directa e indirecta Díaz *et al.*, 1998.

MÉTODOS	COMENTARIOS
<i>Agrobacterium</i>	Método excelente y alta eficiencia indicada para dicotiledoneas.
Biobalística	Usado con un amplio rango de plantas y tejidos. Sencillo y barato pero ineficiente en obtener integraciones estables.
Vectores víricos	Actualmente no es un método efectivo de introducir ADN en plantas.
Electroporación, fusión con liposomas	Sólo es posible usarlo con aquellas plantas que se puedan regenerar a partir de protoplastos.
Microinyección	Tiene una utilidad limitada ya que sólo se puede inyectar a una célula en cada experimento. Requiere la intervención de personal altamente especializado.

Los elementos básicos que se requieren para la transformación genética de plantas son:

1. Un sistema de cultivo de tejidos que permita regenerar plantas completas y fértiles, sustentado en la naturaleza totipotente de las células somáticas vegetales.
2. Vectores apropiados, que permitan la clonación del gen de interés y su transferencia al tejido blanco de transformación.
3. Un protocolo de transformación (sistema de transferencia de genes y de selección del material transformado).
4. Herramientas de análisis para detectar la presencia del transgen y los productos del mismo en la planta (Mejia, 2002; Svetleva *et al.*, 2003 ; Robles, 1983; Somers *et al.*, 2003).

Transformación mediante *Agrobacterium*

Las especies del género *Agrobacterium* son bacterias Gram-negativas aeróbicas obligadas que viven en el suelo. Es capaz de infectar una amplia variedad de especies de dicotiledóneas. *A. tumefaciens* es la más utilizada para la transformación genética de plantas, ya que produce de manera natural los tumores o "agallas" en heridas que se originan en las plantas. Se sabe que durante la patogénesis un fragmento de estos plásmidos llamado **T-ADN**, es transferido a la célula vegetal, donde se integra al ADN cromosómico de la planta y cuya expresión causa proliferación de células de la planta a través de la síntesis y alteración de la respuesta a hormonas vegetales (Carmine y Monticelli, 1998; Somers *et al.*, 2003; Jiménez, 2005). Se utilizan para la infección principalmente explantes de hoja y tallos (Somers, *et al.*, 2003).

El T-ADN está delimitado por dos repeticiones directas imperfectas de 25 pares de bases (bp) que lo flanquean, llamadas bordes derecho e izquierdo (Fig.II-1). Estos bordes son los únicos elementos en *cis* necesarios para dirigir el procesamiento del T-ADN. Cualquier fragmento de ADN ubicado entre estos bordes puede ser transferido a la célula vegetal.

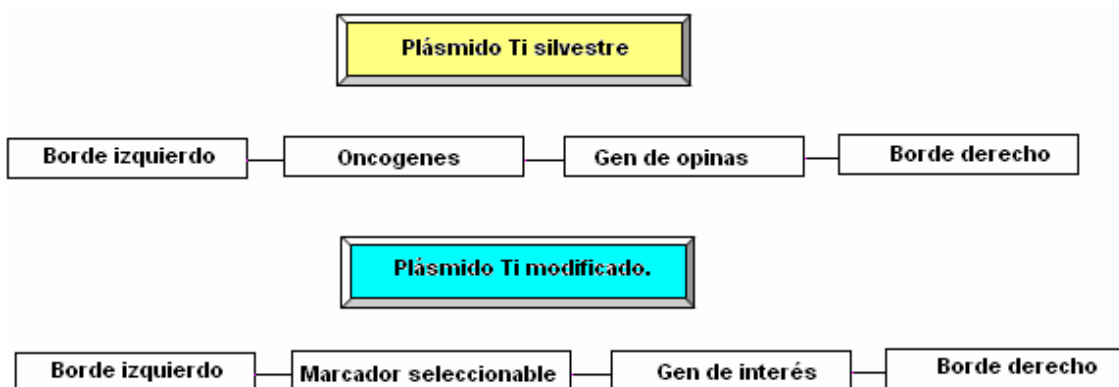


Fig. II-1. Comparación entre T-DNA silvestre y el modificado

En general, el método con *Agrobacterium* es considerado mejor que la biobalística ya que es mayor la frecuencia de inserciones en un solo sitio (locus) del ADN de la planta, sin embargo hay muchas especies de plantas en que *Agrobacterium* no funciona tal es el caso de las monocotiledóneas (Somers, *et al.*, 2003; Mejia, *et al.*, 2002; Liu, *et al.*, 2003).

Bombardeo con micropartículas.

Entre las técnicas para la transformación de células y tejidos vegetales intactos destaca el bombardeo de partículas, que emplea microproyectiles metálicos impulsados a altas velocidades para introducir ADN o ARN en las células vegetales (Sanford *et al.*, 1987; Christou *et al.*, 1988). El método de bombardeo fue desarrollado por el grupo del Dr. John Sanford, el cual permite introducir ADN a cualquier tipo de célula. El primer reporte en el que se utilizó un dispositivo de bombardeo fue hecho en 1987, por el equipo del Dr. Sanford, quienes introdujeron partículas de tungsteno, cubiertas con RNA del Virus de Mosaico del Tabaco en células epidérmicas de cebolla (*Allium cepa*).

Este método se caracteriza por lograr la penetración física de la pared celular de la planta permitiendo la transferencia del ADN independiente a una amplia gama de tejidos “blanco”, generando una gran ventaja sobre otros métodos de transformación genética. La pistola de microinyección (figura II-2) fue diseñada para bombardear células de plantas con microproyectiles metálicos de densidad y peso variable cubiertos de ADN (oro, tungsteno, platino). Estas partículas son cubiertas con ADN y son bombardeadas a alta velocidad a las células intactas penetrando la pared celular y depositando el ADN a las células vegetales por medio de descargas eléctricas o gases a alta presión (Morrish, 1991). Los tejidos blanco bombardeados, hasta la fecha incluyen polen (Twell, 1989), callos embriogénicos (Fromm, Gordon-Kamm, Finer, Fitch, 1990), meristemos (Tomes, 1990), embriones (Taylor, 1991), hojas y células en suspensión; en todos los casos se ha empleado la expresión transitoria de un gen para demostrar que el ADN ha sido integrado a las células y a organelos. La integración del ADN al genoma de la planta y su transferencia a células hijas ha sido reportada para tabaco (Tomes, 1990), soya (Christou, 1989) y maíz (Fromm, Gordon, 1990, Armstrong, 1991) entre otras; por lo que se han hecho grandes esfuerzos para la optimización de este método.

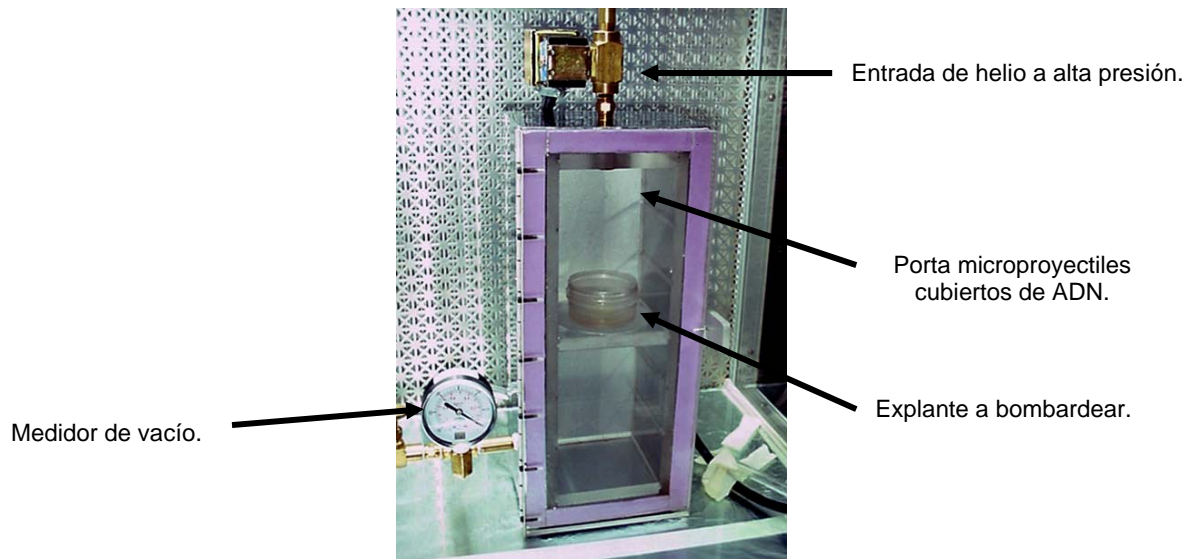


Fig. II-2 Cámara de bombardeo

1. Parámetros involucrados en la transferencia genética.

i. Construcción del vector

Para lograr la obtención de células transformadas se requiere de un vector que asegure la producción eficiente de un gen funcional producido en las células vegetales blanco. Los vectores vegetales consisten en un cassette de expresión que contiene una región del promotor, un sitio de iniciación transcripcional, y una porción de la cadena 5' no traducida del promotor de interés junto a un multilinker sintético, seguido de una señal de poliadenilación. El multilinker con sitios de restricción únicos permite la inserción de secuencias codificadas de genes eucarióticos o procarióticos. Esta estructura permite la construcción de una variedad de vectores con combinaciones sencillas o múltiples de genes reporteros, los cuales permiten la detección rápida del ADN transferido, y de genes marcadores selectivos los cuales pueden ser empleados para distinguir por selección a las células transformadas. (Wisniewski *et al.*, 2002; Tadesse *et.al.*, 2003).

ii. Genes Reporteros

La presencia del ADN en las células vegetales puede ser demostrada 24 h después de la transformación genética por medio de ensayos transitorios. Estos ensayos están basados en la expresión de genes llamados “genes reporteros” los cuales son expresados en las células, siendo usados para demostrar la transferencia del ADN a las células. La expresión transitoria requiere de un producto que pueda ser rápida y fácilmente monitoreado. El sistema del gen reportero GUS descubierto por Jefferson *et al.*, 1987 consiste en el gen *gus* que codifica para la enzima β -glucoronidasa y reacciona con el sustrato X-Gluc el cual se oxida formando una coloración índigo, así las células transformadas pueden ser reconocidas por esta coloración; siendo este sistema ampliamente utilizado en la optimización de los parámetros del bombardeo con microproyectiles (Klein, 1988; Perl 1992; Charest 1993; Aragao 1993).

iii. Promotores

Existe una gran cantidad de promotores, los hay derivados de virus, bacterias y plantas, los cuales han sido empleados para la construcción de vectores ADN de plantas. Múltiples estudios han demostrado que el promotor 35s proporciona niveles constitutivos y elevados de expresión de genes de células de plantas, por lo tanto, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor se ha convertido en el promotor más ampliamente utilizado en estudios de transformación de plantas. El promotor CaMV 35S ha sido utilizado para orientar la transcripción en monocotiledóneas y ha permitido la selección exitosa de callos transformados en trigo (Vasil, 1991), maíz (Rhodes, 1988) y cebada (Fromm, 1986), así como de plantas transgénicas de maíz y arroz. La caracterización y el análisis funcional de promotores específicos de algunos tejidos, son también importantes para el desarrollo de cassettes genéticos, ya que proporcionarán información específica de tejidos de los genes introducidos debido a que éstos permiten señalar la expresión genética a los sitios en los cuales son requeridos, tales como el embrión para la expresión de proteínas almacenadas en semillas, hojas o estomas para la protección contra virus o insectos (Ver tabla II-2).

Tabla II-2: Promotores usados en transformación genética de plantas.

Modificado de Diaz *et al.*, 1998.

TIPOS DE PROMOTORES:	EJEMPLOS
Constitutivos	nos (nopalina sintetasa de <i>Agrobacterium</i>) 35 S (virus del mosaico de coliflor) Ubi (ubiquitina de maíz) Act 1 (actina de arroz)
Específicos de tejido	TA 29 (tapete de la antera de tabaco) faseolina (cotiledones de poroto) TobRB 7(raíz de tabaco) patatina (tubérculo de papa) glutenina (endospermo de trigo)
Inducibles	Subunidad pequeña de Rubisco inducible por luz Alcohol deshidrogenasa-1 inducible por anaerobiosis. Proteína de shock térmico inducible por calor.

iv. Marcadores selectivos

En la construcción de vectores para la expresión genética, ha sido empleada la introducción de marcadores selectivos a las células vegetales para recopilar aquellas líneas de células que han sido transformadas. Debido a la baja frecuencia de transformación estable, comúnmente obtenida con el bombardeo de microprojectiles, son requeridas estrategias metabólicas o visuales de selección para la recopilación de las transformantes. El criterio importante para elegir un buen marcador selectivo incluye que no presente efectos adversos en la regeneración y fertilidad de la planta, dentro de los muchos marcadores empleados se encuentra el gen bacterial neomicina fosofotransferasa II (Armstrong, 1991) que permite la selección de células transformadas por medio de kanamicina y ha sido utilizado ampliamente en la selección de plantas de dicotiledóneas transformadas, así como de callos transformados aunque se presentan muchos escapes (Vasil, 2005; Armstrong, 1991), los cuales limitan la eficiencia de este marcador. De igual manera se utiliza el “Basta” (glufosinato de amonio) que es una herbicida de amplio espectro; un ácido fosfínico derivado del glutamato, es una sustancia natural que se encuentra en bacterias el cual actúa inhibiendo la actividad de la sintetasa glutamica provocando que se inhiba por completo el metabolismo del amonio (Nakaki *et al.*, 2000; Matsumura *et al.*,2001).

2. *Parámetros que afectan la introducción del ADN en el bombardeo*

El éxito del bombardeo con microproyectiles depende de la penetración al tejido vegetal y de la transferencia del ADN con un daño mínimo a las células blanco, existen muchos parámetros que pueden ser modificados para optimizar ambos factores de riesgo dentro de los cuales se encuentran el tamaño de partícula y su densidad, cantidad de ADN, distancia del tejido al plato de disparo, apertura del plato de disparo, método de precipitación del ADN y vacío (Mere y Vázquez, 2003; Tadesse, 2003).

- a. **Tamaño de partícula:** estudios previos revelan que los bombardeos con partículas de tungsteno de diámetros de 0.4, 0.6, 0.7, 1.2 y 2.4 μm influyen el depósito del ADN encontrando que resultan más eficientes aquellos de tamaño de 1.2 μm (Klein, 1988), mientras que Southgate (1995) propone realizar el bombardeo con una mezcla de microproyectiles de varios tamaños (0.4 – 1.2 μm) para establecer una expresión transitoria eficiente aplicado a un amplio rango de especies vegetales y tipos de explante. La forma de la partícula puede afectar también la transformación celular, aunque teóricamente las de forma esférica causan un menor daño en las células (Southgate, 1995). Hay varios estudios que muestran preferencia hacia las partículas de oro o de tungsteno, que son inertes biológicamente. El tungsteno puede reaccionar con algunos tipos de células pero muestra ventajas en cuanto a la disponibilidad de tamaños y bajo costo (Sanford, 1993; Tadesse, 2003).
- b. **Densidad de la partícula:** la eficiencia de la transformación se ve afectada por la concentración de partículas en la mezcla de ADN a bombardear, ya que una baja concentración provoca el esparcimiento de las partículas sobre el área del blanco, mientras que altas concentraciones de microproyectiles pueden ocasionar aglomeración al cubrir las partículas con ADN (Southgate, 1995). Debido a su alta densidad, las partículas de oro penetran en las capas celulares más

profundas, mientras que las de tungsteno no pasan a través de la capa epidérmica del tejido de hojas, a pesar de ello su utilización varía dependiendo del tipo de tejido a bombardear, tomando en cuenta la favorable respuesta de partículas de tungsteno en estudios realizados en maíz (Southgate, 1995).

- c. Concentración del ADN: la cantidad de ADN en los microproyectiles puede afectar significativamente el nivel de agregación de las partículas, ya que una gran agregación de partículas no parece ser efectiva al momento de ser depositadas, aumentando la concentración de ADN por encima de 2 μg de ADN por miligramo de tungsteno tiene un efecto menor en la expresión genética (Klein, 1988).
- d. Procedimiento de precipitación: la absorción de ADN directamente a la superficie del microproyectil es esencial para la integración eficiente del ADN, para ello son necesarios tanto espermidina como CaCl_2 para conseguir una buena precipitación del ADN en las partículas. Las concentraciones de CaCl_2 y espermidina son críticas, se ha observado que las concentraciones óptimas son 0.24 -1.9 M para CaCl_2 y 100 mM para la espermidina (Klein, 1988). La suspensión de micropartículas debe ser sonicada para interrumpir la formación de partículas agregadas (Southgate, 1995).
- e. Volumen de la partícula: el volumen del microproyectil cargado en el plato principal del macroproyectil de polietileno influencia el impacto en las células. Se ha observado que esto se relaciona debido a que el impacto de grandes volúmenes han causado severas pérdidas de la zona central del tejido blanco (Klein, 1988).
- f. Vacío y Distancia: los parámetros que influyen la velocidad de los microproyectiles afectan su capacidad para integrarse al ADN. Se ha observado que la cantidad de vacío suministrado a la cámara de bombardeo durante el proceso, afecta la velocidad de la partícula, ya que aumentando el vacío desde 10 a 28 mm Hg, aumenta el ingreso del

ADN considerablemente (Klein, 1988). La velocidad final de los microproyectiles está relacionada a la resistencia del aire, por lo tanto la distancia recorrida afectará directamente a la penetración de la célula.

- g. Número de bombardeos: se observó que dos o tres bombardeos de una muestra, aumenta la cantidad de células que presentan la expresión transitoria; por lo que resulta de gran importancia determinar el balance adecuado para lograr una buena expresión genética evitando cuanto sea posible el daño al tejido.

LOS CULTIVOS TRANSGÉNICOS.

Los cultivos transgénicos se pueden dividir en generaciones:

La primera: cuyo objetivo es el aumento de la productividad de los cultivos, la reducción en el uso de agroquímicos, la conservación de la tierra arable, el agua y la energía, la reducción de la contaminación del ambiente y los beneficios para la salud humana derivados de estos aspectos.

La segunda comprende el mejoramiento de la calidad nutricional, la eliminación de alérgenos, la fitoremediación y la utilización de plantas como biorreactores para la expresión de proteínas recombinantes con fines tales como la producción de vacunas comestibles, anticuerpos y otras proteínas de uso terapéutico o industrial. Esta aplicación se conoce como «*molecular farming*» (producción de moléculas en la granja) (Shah *et al.*, 1995; John, 1997).

Sin embargo aún quedan algunos aspectos que limitan su potencial como biorreactores tales como la calidad y homogeneidad del producto final. En los últimos 10 años, se han desarrollado varios sistemas de expresión basados en plantas y en la actualidad se producen más de 100 proteínas recombinantes en diferentes especies vegetales, generándose un estrecho vínculo entre la agricultura y muchas ramas de la industria. Un ejemplo destacable es el 'arroz dorado', llamado así por la pigmentación amarilla que tienen sus granos debido a que acumula altos niveles de vitamina A en el endospermo ver tabla II-3.

La tercera generación tiene por objeto aspectos tales como la modificación de la arquitectura de la planta, la manipulación de la floración, el mejoramiento de la eficiencia fotosintética, la manipulación de la heterosis y la apomixis, etc. (Diaz *et al.*, 1998; Bartolomé, 2001).

Tabla II-3. Caracteres interesantes modificados por ingeniería genética en las plantas de uso agrícola. Modificado de: Bartolomé, 2001

OBJETIVOS	MÉTODOS	Ejemplos
Mejora en lucha contra las plagas y malas hierbas.	Resistencia a virus, bacterias, hongos, nemátodos e insectos. Tolerancia a herbicidas.	soya, maíz, algodón, canola, girasol, arroz, jitomate, alfalfa, apio, caña de azúcar, zanahoria, lechuga, manzana, sorgo
Mejora en propiedades agronómicas	Mejora en la tolerancia al estrés hídrico y a la salinidad del terreno. Tolerancia a las bajas temperaturas.	soya, maíz, algodón, uvas, arroz, tomate, espárrago, frambuesa, zanahoria, lechuga, sorgo
Mejora de las cualidades post-cosecha	Retraso en la maduración de frutos, en senescencia de flores. Vegetales más dulces, con tejidos más resistentes o con mayor contenido de almidón.	jitomate, papas, Kiwi
Mejoras en la calidad nutritiva	Semillas con mayor contenido de proteínas como lisina y metionina. Forrajes con alto contenido en aminoácidos con azufre.	arroz dorado, tomate,
Otras finalidades	Vacunas comestibles. Alimentos “vitaminados” e hipoalergénicos.	maíz, zanahoria, tabaco, papa, jitomate,

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE LOS CEREALES.

Siendo los cereales el sustento alimenticio y nutricional de más de la mitad del consumo humano y al proveer aproximadamente la mitad de las calorías consumidas (Anderson y Blechl en Brien y Henry, 2000), surge la necesidad de implementar las nuevas tecnologías de transformación genética para superar las dificultades que el fitomejoramiento presentaba así como los factores que hacen insostenible esta situación, tal como el aumento de la población mundial que disminuye la disponibilidad de la tierra cultivable y agota las ya disponibles. (Vasil, 1995). Adicionalmente a esto se calcula que en el 2010 la población mundial será de 8 billones de personas (Sharma, 2005).

El éxito para obtener protoplastos de cereales abrió las puertas para su transformación. Los primeros cereales transgénicos se obtuvieron por transferencia directa del ADN por medio de la electroporación y tratamiento de protoplastos con polietilenglicol. Estos experimentos fueron llevados a cabo en maíz (Rhodes *et al.*, 1988), arroz (Zhang y Wu, 1988; Shimamoto *et al.*, 1989) y un pasto forrajero (Horn *et al.*, 1988). Sin embargo el uso de protoplastos lleva asociado consigo problemas como la necesidad de contar con personal capacitado en varias técnicas para lograr mantener los cultivos embriogénicos en suspensión, los tiempos para lograr obtener plantas transgénicas oscilaban entre los 12 a 18 meses, entre otras haciendo de ésta una técnica de transformación complicada. Hasta 1990 esta estrategia permaneció como la vía principal para transformar monocotiledóneas (Vasil, 2005).

Se intentaron transformar los cereales mediante métodos que no requirieran cultivo de tejidos por su recalcitrancia. Entre éstos se encontraba la imbibición de semillas para su germinación en ADN o *Agrobacterium*, uso de irradiación o mezcla de polen e inyección de ADN en las bases de floración. Llamando la atención su simpleza (Ledoux and Huart, 1969; Pandey, 1978; De la Peña *et al.*, 1985; Graves and Goldman, 1986; Ohta, 1986; Luo and Wu, 1988; Hess *et al.*, 1990; Zilberstein *et al.*, 1994 cit. Vasil, 2005).

Desafortunadamente dichas metodologías de transformación fueron desechadas dado que al realizar las pruebas moleculares y genéticas se observó que no existía una integración estable de los transgenes en el genoma de las plantas y con ello no se transmitía a la progenie (Vasil, 2005).

En años recientes, la transformación por medio de biobalística y *Agrobacterium*, se convirtieron en las técnicas más utilizadas para transformar cereales. Del mismo modo es el uso de cultivos embriogénicos de cereales.

Komari y Kubo, 1999 lograron obtener arroz transgénico usando *Agrobacterium* al descubrir que era factible inducir una mayor virulencia del mismo cuando en los co-cultivos se encuentra presente la acetosiringona; lo cual posibilita la transformación genética de monocotiledóneas (Vasil, 2005).

Entre los cereales transformados se encuentran el trigo (Vasil *et al.*, 1993; He *et al.*, 1994; Xia *et al.*, 1999), el arroz (Christou *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1993; Hiei *et al.*, 1994), la cebada (Ritala *et al.*, 1994; Wan y Lemaux *et al.*, 1994), el maíz (Gordon - Kamm *et al.*, 1990; Hill *et al.*, 1995; Ishida *et al.*, 1996 Caimi *et al.*, 1996; Zhong *et al.*, 1996; cit. en Brien y Henry, 2000; Jiménez, 2006; Guerrero, 1998; Guerrero 2006) y el sorgo entre otros.

Las monocotiledóneas siempre presentan problemas para su transformación debido a que son recalcitrantes para ese proceso, lo mismo sucede con la inducción de embriogénesis somática y la regeneración, aun así, se han logrado buenos resultados con algunos genotipos específicos (Somers *et al.*, 2003).

Por los resultados obtenidos se ha propuesto que la biobalística es una mejor opción para la transformación en plantas recalcitrantes principalmente las monocotiledóneas (Tadesse *et al.*, 2003; Popelka *et al.*, 2003) (Tabla II-4).

Tabla II-4. Comparación entre métodos de transformación del genoma nuclear. Díaz *et al.*, 1998

Características	Agrobacterium	Biobalística
Especie a transformar.	Dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas	Sin limitaciones
Eficiencia de transformación	Alta	Baja
Tipo de integración en el genoma vegetal.	Aleatoria en regiones con transcripción. Bajo número de copias independientes. Precisa	Aleatoria. Multicopia en tandem Imprecisa.
Construcción de vectores	Compleja	Simple
Dependencia del genotipo vegetal.	Mayor	Menor

Las células transformadas por cualquiera de las dos vías de transformación antes mencionadas se incuban en un medio que contiene un agente selector; que pueden ser un herbicida o antibiótico, de este modo se parte del hecho que las células vegetales que poseen los transgenes con los genes de resistencia al agente selectivo proliferan, mientras que las células que no lo contienen mueren (Somers *et al.*, 2003; Romano *et al.*, 2003).

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE SORGO.

El sorgo es de los cereales, el menos trabajado respecto a las metodologías para su transformación genética; hasta la fecha se han obtenido limitados trabajos publicados (Casas *et al.*, 1993, 1997; Kononowicz *et al.*, 1995; Rathus *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1998; Able *et al.*, 2001; Rathus y Godwin, 2000). Esto debido principalmente a las limitaciones que surgen en la etapa del cultivo de tejidos, entre las que se encuentran la baja frecuencia de regeneración y la acumulación de pigmentos fenólicos y al alto grado de dependencia genotípica. Convirtiéndose de este modo la regeneración de sorgo en algo extremadamente complicado; pese a que las investigaciones de la regeneración *in vitro* datan desde la década de los 70's del siglo pasado (Brien y Henry, 2000).

El primer reporte exitoso de transformación de sorgo apareció a principios de los 90's. En los últimos años se han publicado un gran número de artículos en donde se han usado diversos explantes entre los que se encuentran inflorescencias inmaduras, embriones inmaduros y meristemos, logrando obtener plantas transgénicas usando principalmente embriones inmaduros, después de 10 a 12 meses de intenso trabajo, ver tabla II-4.

Tabla II-4: Métodos y explantes usados en la transformación genética de sorgo (Sticklen y Oraby, 2005.)

Explante	Método	Referencia	Resultado
Embrión inmaduro y Brote	Biobalística	Tadesse <i>et al.</i> , 2003	Transformación exitosa
Embrión inmaduro.	<i>Agrobacterium</i>	Zhao <i>et al.</i> , 2000	Transformación exitosa
Embrión inmaduro	Biobalística	Zhu <i>et al.</i> , 1998	Baja eficiencia de transformación
Embrión inmaduro	Biobalística, <i>Agrobacterium</i>	Jeoung <i>et al.</i> , 2002	Baja eficiencia de transformación
Callo embriogénico / escutelo	Biobalística	Emani <i>et al.</i> , 2002	Eficiencia de transformación dudosa
Callo embriogénico / escutelo	Biobalística	Krishnaveni <i>et al.</i> , 2001	Baja eficiencia de transformación
Células en suspensión	Biobalística	Hagio <i>et al.</i> , 1991	No regeneran
Protoplastos	Electroporación	Battraw and Hall, 1991	Transformación exitosa pero no regeneran
Brotos de 7 días de edad.	<i>Agrobacterium</i>	Godwin <i>et al.</i> , 1993	Transformación exitosa con GUS
Hojas y callo	Biobalística	Able <i>et al.</i> , 2001	Transformación y regeneración exitosa
Coleoptilos	<i>Agrobacterium</i>	Godwin y Chikwambag, 1994	Transformación y regeneración exitosa

De los dos métodos más usados (*Agrobacterium* y biobalística) a la fecha el que ha tenido la mejor eficiencia ha sido el *Agrobacterium* reportándose una tasa del 2.1% – 4.5% (Howe *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2000).

Godwin y Chikwambag en 1994 lograron transformar sorgo con resistencia a Kanamicina (500mg/L) de 250 semillas en germinación 23 resultaron positivas a la prueba de expresión transitoria con GUS a los 20 días.

En el 2000 Zhao *et al.*, reportaron por primera vez la transformación usando embriones inmaduros estudiando varios parámetros entre los que se incluyen: concentración del cultivo bacterial y duración del co-cultivo para la inserción del t-ADN en los embriones inmaduros. Usó de la cepa *Agrobacterium* de LBA4404 “vector superbinario” con el gen de selección *bar* empleando embriones zigóticos inmaduros de la línea de sorgo P898012 lograron una eficiencia de transformación del 2.1%.

Hagio *et al.* (1991) lograron transformar células en suspensión de sorgo empleando biobalística, sin embargo no regeneraron plantas.

Casas *et al.*, 1993 cit. en Casas *et al.*, 1997 lograron las primeras plantas transgénicas de sorgo mediante el bombardeo de embriones inmaduros (12- 15 días después de la polinización) usando el sistema biobalístico PDS 1000/ Helio (Bio-Rad); haciendo uso de partículas de Tungsteno de 1.7 μm ó de oro de 1.5 a 3.0 μm , mostrando una eficiencia de transformación del 0.3 %; posteriormente lograron nuevamente resultados favorables pero ahora haciendo uso de inflorescencias inmaduras.

Zhu *et al.* (1998) también reportó éxito en la transformación de sorgo; usando callos procedentes de embriones zigóticos inmaduros del híbrido Tx430, los cuales fueron bombardeados con balas de tungsteno con ADN (gen G11 del arroz) utilizando como gen de resistencia el *bar*. Después de la transformación 6 plántulas de sorgo fueron obtenidas de un total de 1100 bombardeos.

Tadesse *et al.*, 2003; optimizó las condiciones de transformación del sorgo mediante la biobalística, un gen promotor para monocotiledóneas y partículas de oro y tungsteno con un diámetro de 1.6 o 1.7 μm , 50 μl micropartículas, 5 μg ADN plasmídico (1 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$), 20 μl 0.1 M de espermidina y 50 μl de 2.5M de CaCl_2 . Dispositivo biobalístico PDS-1000 / He (Bio-Rad) usando Helio. Probaron varios explantes (callos embriogénicos, embriones maduros e inmaduros y brotes) y dos distancias diferentes (6 y 12 cm) y 3 presiones (1100, 1300 y 1550 psi). Estando el embrión inmaduro a 6 cm de distancia y a 1300 psi

fueron los parámetros que dieron los mejores resultados respecto a la expresión transitoria. El Ubi1 resultó ser el mejor promotor, con una eficiencia de transformación en meristemas apicales del 0.5% y en embriones inmaduros de 1.3%.

Girijashankar *et al.* (2005) reportaron exitosamente la recuperación de plantas transgénicas de sorgo, al realizar el bombardeo de meristemas lo cual les ayudó a reducir el tiempo de regeneración de las plántulas transgénicas; logrando una eficiencia de transformación del 1.5 %. Sin embargo el uso de meristemas está asociado a factores limitantes para la eficiente producción sustentable de transgénicos entre los cuales se encuentran a) Personal capacitado para el aislamiento del meristemo, b) la realización de frecuentes subcultivos y c) la posibilidad de generar plantas quiméricas.

El sorgo presenta una dependencia de su capacidad regenerativa *in vitro* con el tipo de genotipo usado, estas limitaciones han sido demostradas por varios autores, ver cuadro II-1.

Cuadro II-1: Genotipos usados por algunos autores.

GENOTIPO USADO	CAPACIDAD REGENERATIVA	AUTORES
P898012	Alta	Casas <i>et al.</i> , 1993 Kononowicz <i>et al.</i> , 1995 Rathus <i>et al.</i> , 1999
SA281	Alta-Mediana	Rathus <i>et al.</i> , 1999
SRN39	Alta	Casas <i>et al.</i> , 1997 Kononowicz <i>et al.</i> , 1995
Tx430	Alta-Mediana	Zhu <i>et al.</i> , 1998

Se ha visto que el sorgo al crecer bajo condiciones poco favorables para otros cereales y al ser utilizado como alimento es considerado como una opción viable para lograr plantas resistentes a estrés tanto biótico como abiótico así como la incorporación de cierto valor nutricional. Siguiendo esta idea Girijashankar *et al.*, (2005) produjeron plantas transgénicas que sintetizaron el gen Bt cry1Ac. Logrando obtener 1 – 8 ng por gramo de hoja fresca de la proteína Bt que los protege contra la larva de *Chilo partellus*.

Dado que el sorgo es un grano relativamente pobre en proteínas, Tadesse y Jacob (2003) introdujeron el gen mutado *dhdps-raec1*, que regula la enzima para la síntesis de lisina; para aumentar su producción.

VACUNAS COMESTIBLES

Las vacunas funcionan preparando al sistema inmunológico rápidamente a los agentes específicos causantes de una enfermedad antes de que puedan multiplicarse en cantidad suficiente como para provocar síntomas, esto se logra enfrentando al sistema inmunitario al virus o bacteria que han sido atenuado o debilitado. El sistema inmunológico responde a la vacuna como si fuera atacado por el antagonista, movilizándose para destruir al agente extraño, de esta manera las células registran esta información en su memoria quedando alertas para defenderse en el momento en que se presente el patógeno causante de la enfermedad al introducirse en el organismo.

En años recientes, gracias a la ingeniería genética varios grupos de investigación se encuentran desarrollando plantas transgénicas las cuales son usadas como biofábricas con la capacidad de expresar varios compuestos Biofarmacológicos; entre los cuales se encuentran plantas que expresan genes específicos de virus y bacterias que codifican para ciertos antígenos; las llamadas vacunas comestibles. (Landridge, 2000; Buetow y Sorban, 2000; Ginddings *et al.*, 2000; Daniell *et al.*, 2001 cit. por Schuyler, 2003).

La idea de usar plantas comestibles para la expresión e inoculación de vacunas fue sugerida por Charles Arntzen y Hugh S. Mason en 1991 con miras a solucionar las problemáticas que se presentan en los sistemas de vacunación cotidiana como son el alto costos de producción y traslado (cadenas de refrigeración) y la necesidad de jeringas; principalmente en campañas de vacunación infantil en países en desarrollo o en vacunaciones masivas en poblaciones animales o humanas. Sustentado en el hecho de que las plantas producen abundante biomasa, las cuales contendrían vacunas (proteínas recombinantes) que se producirían económicamente en plantas transgénicas;

para posteriormente suministrar oralmente este material vegetal para estimular la respuesta inmuno específica en los individuos. Curtiss y Cadineau en 1990 patentaron ampliamente las aplicaciones en plantas transgénicas como vacunas y proporcionaron la primera evidencia de que las plantas pueden producir proteínas antigénicas candidatas para ser vacunas (Mason Hugh, 2002, Larrick, 2001, Mason *et al.*, 2002, Yusibov *et al.*, 2002)

El grupo de Mason expresó el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en plantas de tabaco con la esperanza de encontrar posteriormente un sistema que les permitiera el desarrollo de la vacuna oral. Reportes posteriores dan cuenta de la expresión de un antígeno de la rabia en jitomate (Mac Garvey *et al.*, 1995), de la obtención de plantas transgénicas de tabaco y papa que expresan los antígenos de la enterotoxina sensible al calor de *Escherichia coli* (Haq *et al.*, 1995) de la proteína de la cápside del virus Norwalk a cargo de Mary Estes (Colegio de medicina Baylor, 1992) descubrió en experimentos previos que partículas virales eran resistentes a ácidos, lo cual sugiere que éstos podrían sobrevivir la digestión en el estómago y llegar a la asociación intestino- tejido linfático desencadenando la respuesta inmunológica (Hugh, 2002), de la expresión del antígeno de la subunidad B de la toxina del cólera en papa (Arakawa *et al.*, 1998), de la expresión de la glicoproteína S del virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo en *Arabidopsis thaliana* y de la producción de plantas transgénicas de alfalfa con el antígeno de la proteína estructural VP1 del virus de la fiebre aftosa (Wigdorovitz *et al.*, 1999). Los antígenos obtenidos de esta manera han demostrado su inmunogenicidad en animales ya sea mediante el suministro de los extractos vegetales (tabaco) o de los tejidos comestibles cuando el caso lo permite (papa y alfalfa) (Guerrero, 2000).

En cuanto a la estimulación inmunológica de las vacunas comestibles han demostrado la producción de anticuerpos tanto a nivel de mucosas como a nivel sistémico detectándose principalmente la producción de anticuerpos IgA e IgG (Haq *et al.* 1995, Fiedler *et al.*, 1997, Modelska *et al.*, 1998, Ryan *et al.*, 2001, Yusibov *et al.* 2002).

Actualmente se cuenta con vacunas contenidas en alimentos como el plátano, el maíz, trigo, soya, arroz, lechuga, manzana, tabaco, tomate, *Arabidopsis* así como en alfalfa para vacunas de animales de granja. Sin embargo la cantidad de proteína acumulada en algunos casos es pequeña (0.001- 0.3% Yu *et al.*, 2000 cit. por Schuyler, 2003). Sugiriendo que la dosis oral deberían ser de 10 a 100 veces mayores que la dosis inyectable para lograr una respuesta inmunitaria comparable (Landridge, 2000; Guerrero-Andrade *et al.*, 2006; Arango *et al.*, 2006; Peña Ramírez *et al.*, 2007) ver tabla II-5.

Tabla II- 5 Ejemplos de vacunas comestibles (Tregoning *et al.*, 2004).

ORIGEN DE LA PROTEÍNA.	PROTEÍNA / PÉPTIDO	PLANTA	INMUNOLOGIA	REFERENCIA
Enterotoxina <i>E. coli</i>	LT-B	Cloroplasto del tabaco	No evaluado	Kang <i>et al.</i> , 2003
Enterotoxina <i>E. coli</i>	LT-B	Maíz	No evaluado	Chikwamba <i>et al.</i> , 2003
<i>Vibrio cholerae</i>	Toxina del colera sub-unidad B (CT-B)	Papa	Desarrollo de anticuerpos locales y sistémicos.	Arakawa <i>et al.</i> , 1998
<i>Vibrio cholerae</i>	CT-B	Cloroplasto del tabaco	No evaluado	Daniell <i>et al.</i> , 2001
Virus de la hepatitis B	Antígeno de superficie hepatitis B	Tabaco	No evaluado	Mason <i>et al.</i> , 1992
Virus de la hepatitis B	Antígeno de superficie hepatitis B	Papa	Producción de anticuerpos después la ingestión (ratas)	Richter <i>et al.</i> , 2000
Virus Norwalk	Proteína de capsida (NVCP)	Tabaco	Modesto incremento en IgG.	Mason <i>et al.</i> , 1996
Virus Norwalk	NVCP	Papa	Modesto incremento anticuerpos	Tacket <i>et al.</i> , 2000
<i>Clostridium tetani</i>	Tet C	Cloroplasto de tabaco	Producción de anticuerpos después Inmunización nasal	Tregoning <i>et al.</i> , 2003
Newcastle	Glucoproteína "F"	Maíz	Producción de anticuerpos	Guerrero-Andrade <i>et al.</i> , 2006
Virus de la rabia	Proteína N y G	Tomate	Producción de anticuerpos	Arango <i>et al.</i> , 2006
VIH	VIH-1 Tat	Tomate	Respuesta sistémica	Peña Ramírez <i>et al.</i> , 2007

Se ha visualizado el uso de cereales con el fin de desarrollo de vacunas comestibles presentando las cualidades mencionadas en la tabla II-6: (Mason, 2002).

De ahí la necesidad de contar con protocolos de transformación exitosas de cereales con altos contenidos proteicos como es el caso del sorgo.

Tabla II-6. Beneficios sociales y técnicos de las vacunas comestibles.
(Sala *et.al* 2003.)

BENEFICIOS	CARACTERISTICAS
Subministro oral.	La pared celular de plantas, constituido esencialmente por celulosa y azúcar, proporcionando protección en el estómago y libera gradualmente el antígeno al intestino.
Uso como comida cruda, seca o pulverizada.	Los tejidos vegetales vacinogénicos pueden ser usados como comida cruda o alternativamente se pueden purificar las proteínas parcial o totalmente para ser pulverizadas y encapsuladas.
No requiere cadena de refrigeración.	Las partes de plantas vacinogénicas o extractos de plantas pueden ser almacenados y vendidos a temperatura ambiente.
Respuesta mucosal y suero inmune.	Las vacunas derivadas de plantas son principalmente diseñadas para disparar la respuesta del sistema inmune mucosal (IgA); de este modo evitar que el patógeno entre a la superficie mucosal; esto también provoca sueros y posibilita la respuesta citotóxica.
Eficiencia de costos.	El costo de producción puede bajar de 100 a 1000 veces comparado con las vacunas tradicionales.
Optimización del sistema de expresión.	Las plantas pueden ser diseñadas para acumular el antígeno en compartimentos intracelulares (ej. Retículo endoplásmico o cloroplastos).
Fácil manipulación genética.	Los procedimientos están basados en la estabilidad genética y molecular de los protocolos; ya disponibles en países en desarrollo.
Fácil producción a gran escala.	Se pueden vender semillas que pueden producir una cantidad ilimitada en un tiempo limitado; producción y administración en países en desarrollo.
Más seguro que las vacunas tradicionales.	Careciendo de agentes patógenos que pueden contaminar a mamíferos.
Ideal para el uso veterinario	Costos de producción y listos para administrarse como comida.

Virus de la Rabia

La rabia es una zoonosis que se presenta como una encefalomiелitis de curso agudo que afecta a los mamíferos. En los animales, existe una forma paralítica de los roedores y una forma furiosa en los carnívoros. Los síntomas en el hombre pueden expresarse en las dos formas (Loza-Rubio *et al.*, 1999).

El virus se encuentra usualmente presente en la saliva de los animales infectados y generalmente es transmitida por la mordedura de éstos aunque no necesariamente, ya que basta que exista una solución de continuidad en la piel que entre en contacto con la saliva del animal rabioso para la inoculación (Smith *et al.*, 1991 cit. Mere y Vázquez, 2003).

El perro es el principal reservorio y transmisor del virus en el ciclo urbano en México y en el resto de América Latina, el reservorio silvestre principal en Latinoamérica es el murciélago hematófago *Desmodus rotundus*, quien transmite la rabia bovina ocasionando grandes pérdidas económicas para la ganadería (Mere y Vázquez, 2003).

La velocidad con la que se manifiestan los signos y síntomas de la rabia depende de las características biológicas de la cepa del virus que infecta, de la concentración de receptores para el virus en las células nerviosas del músculo esquelético, de la magnitud del inóculo, de la inervación en el sitio de entrada y de la proximidad de la lesión al Sistema Nervioso Central (SNC).

Al ser inoculado el virus por vía subcutánea o intramuscular, en este caso la mordedura, se propaga del lugar de inoculación al (SNC) por el axoplasma de los nervios periféricos. Una vez producida la infección del sistema nervioso central, el virus se difunde en forma centrífuga a las glándulas salivales y otros órganos y tejidos por medio de los nervios periféricos de la misma manera en que se produce la progresión centrípeta. La distribución del virus no es uniforme y la frecuencia de la infección de diferentes órganos es variable, aunque siempre que se aísla el virus de las glándulas salivales, se le encontrará en el sistema nervioso central.

El periodo de incubación es muy variable y depende de la naturaleza del virus, de la cantidad de virus que se inoculó y del sitio anatómico donde ocurrió la

agresión, entre otras cosas. Las primeras manifestaciones generalmente ocurren de uno a tres meses después de la agresión. Aproximadamente en el 15% de los casos puede ser más de 3 meses y en el 1% más de 1 año o sólo algunos días. Los períodos de incubación tienden a ser más cortos si el punto de contacto ha sido la cabeza, el cuello o los miembros superiores, porque el virus alcanzará la región predilecta con mayor rapidez (llega al sistema nervioso central principalmente a través de los troncos nerviosos, propagándose a lo largo de los nervios) por lo que llega al sistema nervioso central con mayor rapidez, para que de ahí el virus emigre hacia los tejidos, pero sobre todo hacia las glándulas salivales, de donde es excretado a través de la saliva (Wagner, 1999; Smith *et al.*, 1991).

VIRUS DEL OESTE DEL NILO.

El virus del Oeste del Nilo (VON) fue nombrado por el distrito del Nilo Oeste de Uganda donde el virus fue aislado por primera vez en 1937. Pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus* y es miembro del serogrupo de virus de encefalitis japoneses.

Los brotes de la enfermedad del Nilo Oeste han ocurrido en Egipto, Asia, Israel, Sudáfrica y partes de Europa y Australia. Antes de 1999, el virus del Oeste del Nilo no se había encontrado en los Estados Unidos. El virus puede haberse traído a los Estados Unidos por un pájaro infectado que fue importado o emigró desde un país donde el virus es común.

Se encuentra en especies múltiples de mosquitos, caballos y pájaros silvestres incluyendo cuervos.

Se extiende a los seres humanos por medio del piquete de mosquitos infectados (principalmente de la especie *Culex*). Un mosquito se infecta al picar a un pájaro que lleva el virus. Cuando una persona es picada por un mosquito infectado y el virus entra en la sangre de la persona, se multiplica y se extiende a otras partes del cuerpo. Generalmente, el sistema de inmunidad del cuerpo puede combatir el virus y prevenir que cause una enfermedad.

La mayoría de las personas que se infectan con el virus del Oeste del Nilo no tienen ningún síntoma o pueden experimentar una enfermedad leve tal como una fiebre y dolor de cabeza antes de recuperarse totalmente. En algunos individuos, particularmente en las personas mayores de 50 años, el virus del Oeste del Nilo puede causar una enfermedad seria, incluyendo encefalitis (inflamación del cerebro) o meningitis (inflamación de las membranas que cubren el cerebro y la médula espinal). Los síntomas varían desde una fiebre leve, dolor de cabeza, salpullido, hinchazón de los ganglios linfáticos y conjuntivitis (inflamación de la membrana que reviste la superficie interna del párpado y la superficie expuesta del ojo) hasta el comienzo rápido de una jaqueca severa, fiebre alta, rigidez del cuello, desorientación, debilidad en los músculos, y coma. La infección del virus del Oeste del Nilo puede resultar en la muerte de un 3 al 15 por ciento de las personas con las formas severas de la enfermedad.

En años reciente se han realizado estudios con anticuerpos para el VON en toda la republica mexicana y los resultados se pueden apreciar en la figura II-3.

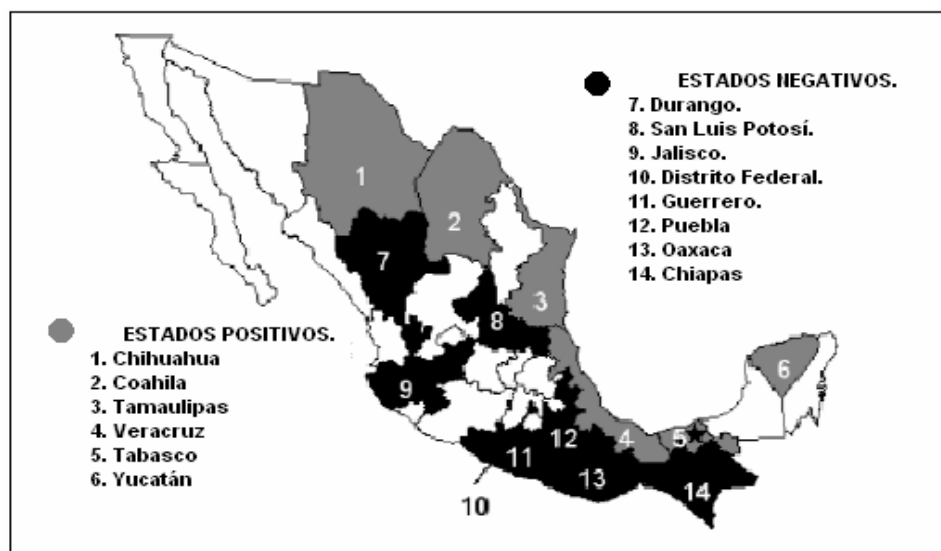


Fig. II.3. El mapa muestra los resultados del muestreo con anticuerpos para el virus VON llevado a cabo en equinos en el 2002.

JUSTIFICACIÓN:

El sorgo una planta única, que mediante el uso de las modernas técnicas biotecnología como el CTV y ingeniería posibilita un sin fin de usos económicos y de investigación, ya sea que la transformación genética del sorgo, sea para usos agrícolas o ganaderos; al conferir tolerancia a herbicidas, insectos y plagas, aumentar las propiedades nutricionales o lograr la producción de anticuerpos, para que funja como vacunas comestible; que es el caso del presente trabajo en este caso usando la proteína G del virus de la rabia y la glicoproteína E del VON.

Por lo cual surge el interés de establecer protocolos óptimos para su transformación vía biobalística; especialmente usando cámara de baja presión, dado que los trabajos publicados hasta en momento utilizan cámaras de alta presión lo que ocasiona que el costo por bombardeo se eleve.

Para la obtención de estos protocolos es necesario estandarización de parámetros tanto físicos como biológicos al momento de realizar la transformación.

HIPOTESIS.

Si las condiciones de distancia, tamaño de bala y tipo de explante son adecuados para la integración del ADN foráneo en el ADN cromosómico de la planta, se pueden obtener plantas transgénicas de sorgo mediante el uso del método de biobalística.

OBJETIVO GENERAL.

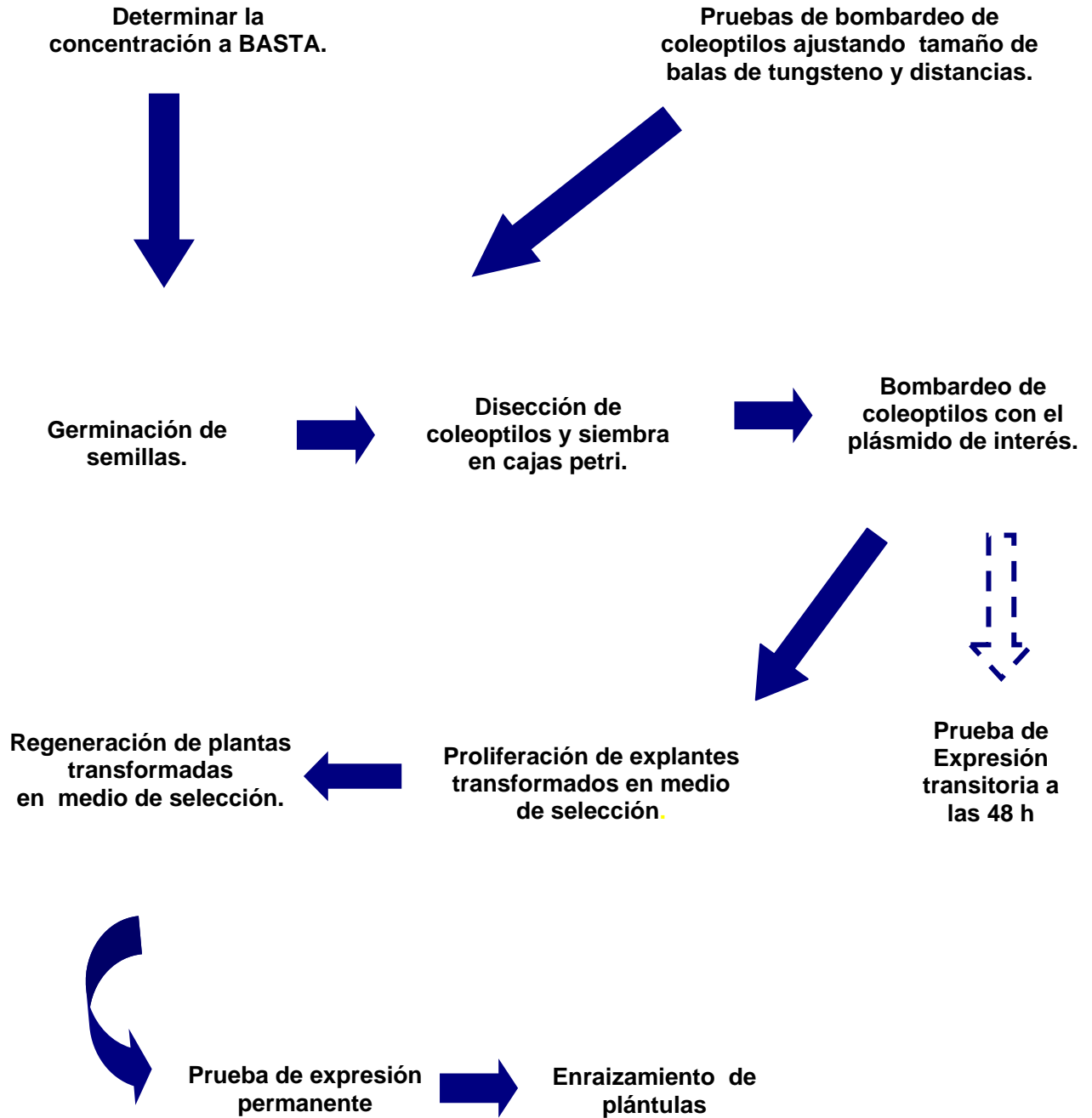
Establecer las condiciones de bombardeo de explantes, óptimas para la obtención de plantas de sorgo transgénico.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Establecer las concentraciones de tolerancia del sorgo Super Sweet II[®] al herbicida Basta[®] para que éste funja como agente de selección después del bombardeo.
- 2.- Establecer los parámetros óptimos del bombardeo de sorgo Super Sweet II[®], realizando pruebas de tamaño de bala y de distancia entre el explante y el filtro.
- 3.- Determinar el mejor explante para llevar a cabo la transformación genética.
- 4.- Realizar pruebas de expresión transitoria del *gus* mediante el ensayo histoquímico en los explantes bombardeados.
- 5.- Realizar la selección y regeneración de plántulas de sorgo resistentes al Basta[®].
- 6.- Realizar pruebas de expresión transitoria del *gus* mediante el ensayo histoquímico en las plántulas regeneradas resistentes al agente de selección Basta[®].

MATERIALES Y METODOS.

RUTA CRÍTICA.



MATERIAL BIOLÓGICO.

Semillas de híbrido Super Sweet II®.

PLÁSMIDOS O CASSETTES.

* Para la proteína G del virus de la rabia el plásmido pCAMBIA 2301 con el gen de selección *bar* y el gen para expresión transitoria.

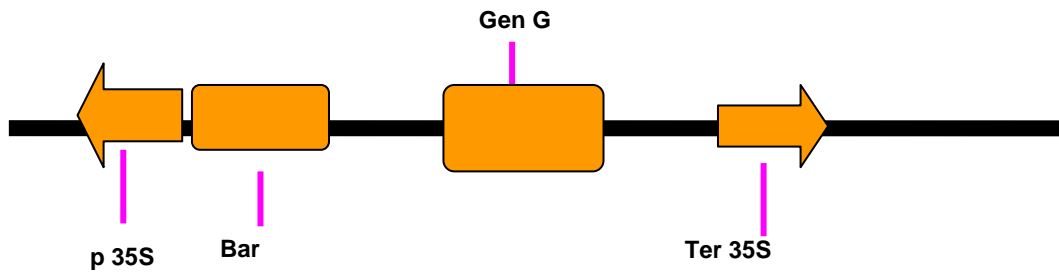


Diagrama 1: Cassett de la proteína G del virus de la rabia.

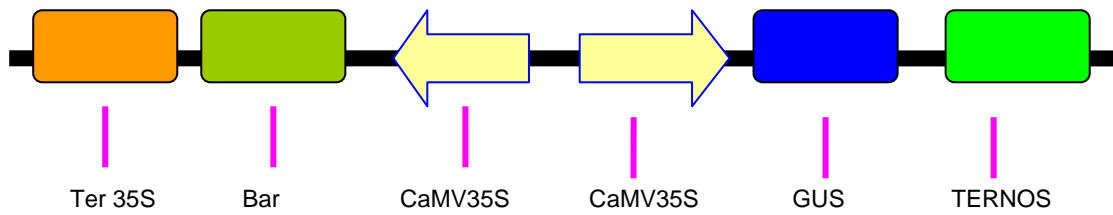


Diagrama 2: Cassett de pCambia 2301.

* Para la glicoproteína E del virus del oeste del nilo.

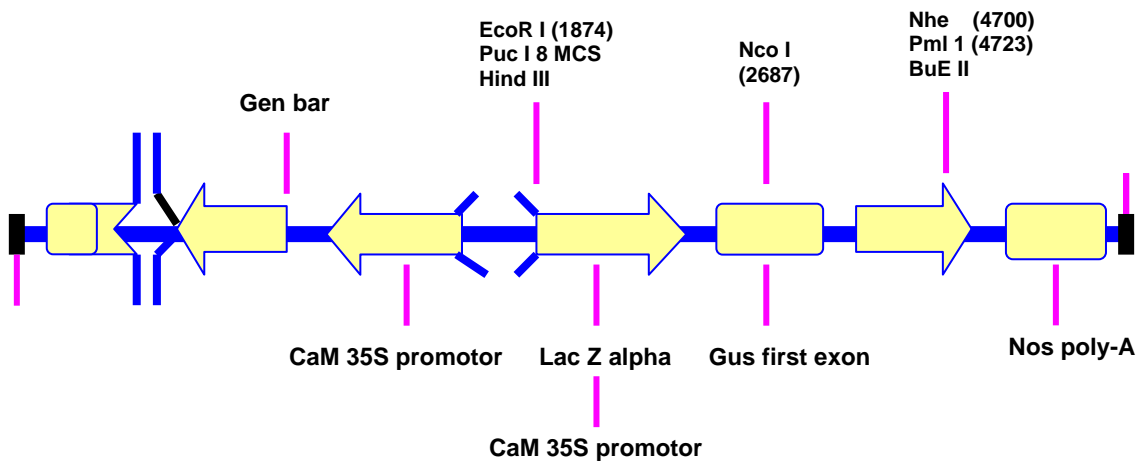


Diagrama 3: Cassett de VON.

Las construcción de los cassetes se realizó en el Laboratorio de Plantas Tropicales y Salud Humana del Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato y proporcionados por el Dr. Miguel Ángel Gómez Lim.

La proteína G del virus de la rabia es la responsable de la inducción de los anticuerpos neutralizantes y de la estimulación de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos en el hospedero.

SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL HERBICIDA BASTA[®]

Una vez esterilizadas las semillas de sorgo Super Sweet II[®] mediante el método IV (ver tabla 3, capítulo I) fueron sembradas para su germinación 48 h previamente para proceder con la disección de los coleoptilos (3-5mm), los cuales fueron sembrados en el medio N^o 9 (ver tabla 6, capítulo I) modificado (9M) el cual contenía distintas concentraciones de Basta[®] (0, 0.5 ,1, 2, 3 mg l⁻¹); las cuales fueron adicionadas a dicho medio después de ser esterilizados en la campana de flujo laminar; las diferentes concentraciones se adicionaron al medio de cultivo (en agitación) cuando éste tuvo una temperatura de 40°C y se procedió a servirse en frascos previamente esterilizados.

Una vez sembrados los coleoptilos en los medios con las diferentes concentraciones de Basta[®], se procedió a su incubación en fotoperiodo a una temperatura de 25 ± 2°C. Los subcultivos se realizaron cada 3 semanas en los mismos medios.

Esta prueba se realizó por duplicado. Con una diferencia de un mes entre cada experimento.

ESTABLECIMIENTO DE PARÁMETROS PARA EL BOMBARDEO DE SORGO SUPER SWEET II[®], REALIZANDO PRUEBAS DE TIPO DE EXPLANTE, TAMAÑO DE BALA Y DISTANCIA ENTRE EL EXPLANTE Y EL FILTRO.

A cajas Petri de plástico estériles (60 X 15 mm) se agregaron 20 ml del medio n° 9; aumentando la concentración de Gellan[®] a 3.5 g L⁻¹.

Ocho horas antes del bombardeo, en cada caja se sembraron de 15 a 20 coleoptilos colocados paralelamente entre ellos, en el caso de callos se usaron los inducidos 2 meses previamente. En ambos casos se colocaron los explantes en el centro de la caja ocupando un área aproximada de 1 cm².

La preparación de las partículas de tungsteno para el bombardeo se realizó según Guerrero, (1998); Jiménez, (2006).

- Se pesaron 60 mg de partículas de tungsteno de 0.4 µm de diámetro (M5) colocándose en un tubo de centrifuga de 15 ml. También se preparó de misma forma partículas de tungsteno de 0.7 µm de diámetro (M10). A ambos tamaños se les añadió 2 ml de ácido nítrico (HNO₃) 0.1 M y se sonicó en hielo durante 20 minutos para cada uno.
- Posteriormente se eliminó el ácido nítrico agregándose 1ml de agua desionizada estéril; la muestra se transfirió a un tubo de 2ml de capacidad y se sonicó brevemente en ambas soluciones.
- Las micropartículas se centrifugaron de 10-30 segundos a una velocidad de 10,000 rpm para cada solución.
- El agua se eliminó, se agregó 1 ml de etanol absoluto y se sonicó brevemente.
- Se centrifugaron las micropartículas de 10 a 30 segundos a una velocidad de 10,000 rpm.
- El etanol se eliminó, se agregó 1 ml de agua desionizada estéril y se sonicó brevemente.
- Se colocaron 200 µl de la suspensión en tubos eppendorf.
- Después, se añadieron 750 µl de agua desionizada estéril a cada tubo.
- Los tubos se almacenaron a – 20 ° C.

PREPARACIÓN DE LAS PARTÍCULAS CON EL ADN PARA EL BOMBARDEO (Klein *et al.*, 1988)

En un tubo eppendorff se depositaron 50 μl de partículas (M5 ó M10 según fuese el caso) las cuales se mantuvieron en agitación constante. Posteriormente se les agregó 5 μl ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de ADN; constituido por: 4.5 μl de plásmido de interés más 0.5 μl de Pcambia 2301 (vector) colocándolo en la pared del tubo.

Al igual que el ADN, se colocó la gota de 50 μl de cloruro de calcio (CaCl_2) 2.5 M en la pared del tubo al lado de la gota del ADN.

Se colocó junto a las dos gotas anteriores la gota correspondiente a 20 μl de espermidina (0.1 M) y se procedió a juntar con ayuda de la micropipeta las 3 gotas y juntarlas con las partículas; con ayuda del vortex se agitaron 5 seg. Por último se centrifugó por 5 seg. y se tomaron 100 μl del sobrenadante y se desecharon; Los 25 μl restantes se resuspendieron. Se utilizó para 5 disparos, disponiéndolo para cada uno 5 μl . La mezclas tuvieron equimolares (9:1) de los plásmidos.

Para la transformación mediante biobalística se utilizó una cámara de baja presión con una presión de helio de 120 psi y un vacío de -20 a -22 in de Hg.

(Figura II-4)



Fig. II-4. Cámara de bombardeo de baja presión.

Las pruebas se realizaron con los dos tamaños de las partículas de tungsteno (5M y 10 M) y a 2 distancia (7.5 cm y 13 cm) entre filtro y el explante.

Después de haber realizado el bombardeo de 60 cajas petri éstas fueron selladas con vitafilm. Se realizaron 10 repeticiones de controles positivos (+) los cuales fueron bombardeados con partículas sin material genético y 10 repeticiones de controles negativos (-) los cuales no fueron bombardeados, las 40 cajas restantes se bombardearon con los genes de interés. Se mantuvieron en incubación a temperatura de 25 ± 2 °C a 16 h luz/8 h oscuridad.

PRUEBA DE EXPRESIÓN TRANSITORIA DEL *GUS* MEDIANTE EL ENSAYO HISTOQUÍMICO EN LOS EXPLANTES BOMBARDEADOS.

A las 48 h se procedió a realizar la expresión transitoria, para lo cual se seleccionaron al azar 4 explantes bombardeados así como los explantes que sirvieron de controles.

La prueba de expresión transitoria se realizó de la siguiente manera (Jefferson, *et al.*, 1987 cit. Por Jiménez 2006):

- Los explantes se colocaron en una caja de muestra de ELISA desechable (10 X 10 mm), a cada pozo se le agregó 5 ml de solución de X-gluc (ver anexo 2) y se incubaron a 25 ± 2 ° C por un periodo de 48 h.
- Se desechó esta solución y se lavaron los callos 2 veces con Buffer “Z” pH 7.4 (ver anexo 2).
- Después, se lavaron con etanol al 70% 4 veces.
- La clorofila se eliminó con una mezcla de acetona-metanol (1:3) lavándose con esta solución los callos el tiempo necesario, haciendo varios cambios de la mezcla.
- Después de que se observó el color azul, producto de la reacción, los callos se lavaron 4 veces con Buffer “Z”.
- Finalmente, los callos se conservaron en glicerol al 50%,
- Las cajas Petri fueron sellados con vitafilm y se almacenaron a 4 °C.

Después del bombardeo a las 72 h el resto de los explantes fueron colocados en medio de selección (M9).; la concentración de Basta se determinó en ensayos anteriores. De este modo solo seguirán vivas las células transformadas. Dicho periodo duró 10 meses. Con los subcultivos respectivos a medios nuevos con las concentraciones de Basta cada 3 semanas.

La selección se realizó partiendo de la concentración más alta por un periodo de 3 meses de selección estricta y bajándola a la mitad después este periodo y manteniéndola hasta que se cumpliesen 10 meses tiempo que duró la etapa de proliferación. Una vez concluida esta etapa se pasaron a las etapas sucesivas correspondientes a la de crecimiento, enraizamiento y aclimatización.

PRUEBAS DE EXPRESIÓN TRANSITORIA DEL GEN *GUS* MEDIANTE EL ENSAYO HISTOQUÍMICO EN LAS PLÁNTULAS REGENERADAS RESISTENTES AL AGENTE DE SELECCIÓN BASTA®.

Los explantes que resistieron los 10 meses de selección se llevaron a la etapa de crecimiento; así mismo se seleccionaron algunos para realizar la prueba de expresión permanente, que consistió en exponer plántulas (5cm) al X-gluc; las cuales se incubaron a 25 ± 2 °C por un periodo de 48 h a la par se realizó la prueba en una plántula silvestre; en ambos casos las plántulas fueron partidas en partes pequeñas. Una vez transcurrido el periodo se realizó la metodología para eliminar la clorofila y fijar las preparaciones como ya se indicó anteriormente. Finalmente las muestras fueron guardadas en el refrigerador a 8 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

TOLERANCIA AL BASTA®.

La concentración de Basta® se determinó exponiendo los coleoptilos a diferentes concentraciones de glufosinato de amonio, evaluándose su desarrollo, muerte y oxidación.

En la literatura el agente de selección más usado es el Basta®, (fosfotricina [PPT] o Bialafos) [todos sinónimos] tal es el caso de autores como Casas *et al.*, 1993; quienes usan una concentración de 1 a 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de igual forma Able *et al.*, 2001 a una concentración de 2 mg l^{-1} ; Tadesse *et al.*, 2003. usaron una concentración de 1 mg l^{-1} . Los periodos de selección fueron durante 1 o 2 meses según el autor.

Para la etapa de selección Girijashankar *et al.*, 2005 reportaron haber realizado tres pasos de selección comenzando con 1 mg l^{-1} de Basta® por un mes aumentando a 2 y 2.5 mg l^{-1} de Basta® en los subcultivos sucesivos con un periodo por un periodo de 1 mes para cada concentración.

Las concentraciones de Basta® probadas en el presente trabajo se basaron en antes mencionado realizando el barrido desde (0, 0.5 ,1, 2, 3 mg l^{-1}); comenzándose a notar diferencias apreciables a los 15 días de haber sido iniciada la etapa de selección, en donde los coleoptilos usados en los medios con baja concentración de Basta® el crecimiento se vio retrasado respecto a los controles y en los medios con las concentraciones más altas el crecimiento fue nulo, cambiando la coloración del explante pasando de verde a un color oscuro iniciándose en los medios con concentraciones de 3 mg l^{-1} de Basta® como se muestra en la figura II-5.

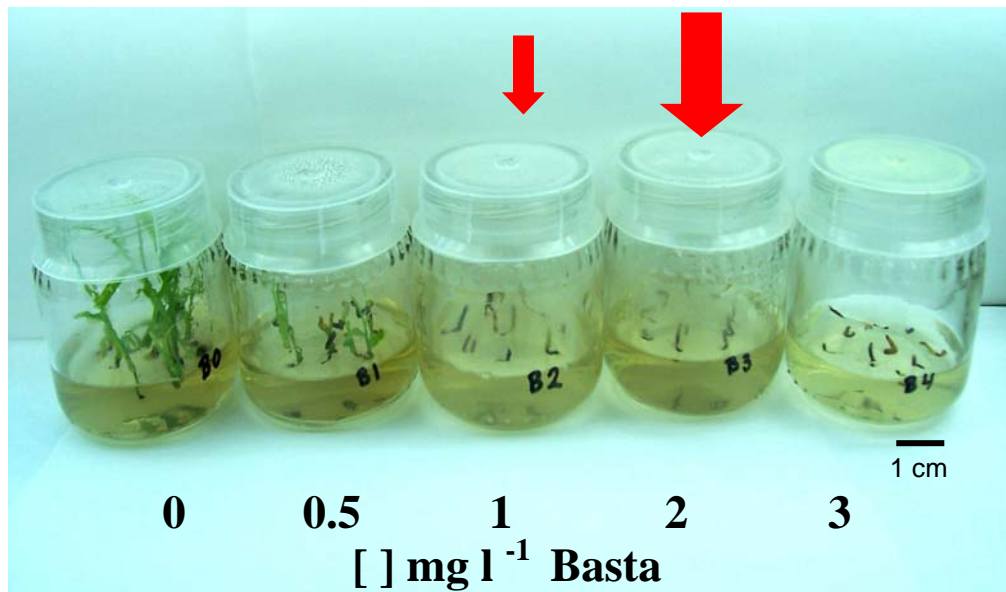


Fig. II-5: Prueba de tolerancia de sorgo Super Sweet II ® al Basta a los 15 días de haber iniciado la prueba.

A los 30 días la diferencia era notable; en los medios con la concentración más baja de Basta® (0.5 mg l^{-1}) el coleoptilo solo creció sin presentar ninguna respuesta organogénica a pesar de estar sembrados en medio para este fin, al comparar la respuesta del testigo (0 mg l^{-1} de Basta®) en donde la respuesta organogénica y de crecimiento fue normal, se puede notar la diferencia ver figura II-6.

Al realizar el subcultivo de los coleoptilos que se encontraban en los medios con (0.5 mg l^{-1}) de Basta® se murieron a los 45 días aproximadamente.

Los coleoptilos sembrados en el medio con concentraciones de Basta® 1 mg l^{-1} se desarrollaron, siendo este alargamiento superior a los coleoptilos sometidos a 2 mg l^{-1} de Basta® los cuales presentaron un crecimiento mínimo.

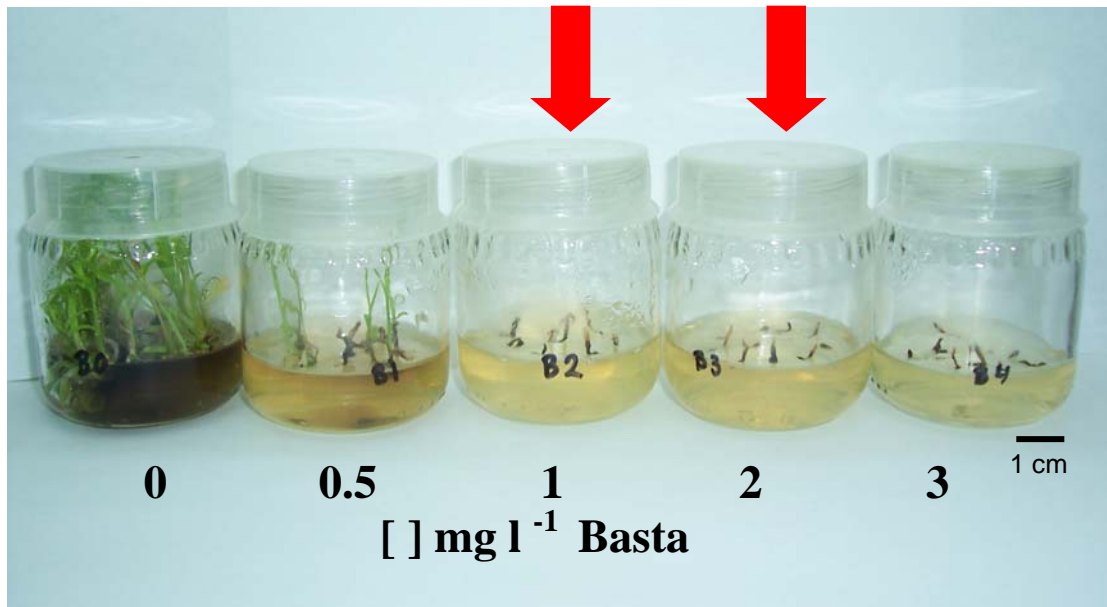


Fig. II-6: Prueba de tolerancia de sorgo Super Sweet II[®] al Basta a los 30 días de haber iniciado la prueba.

Los coleoptilos sembrados en el medio con concentración de 3 mg l⁻¹ murieron a los 15 días; durante este periodo se observó un cambio en la coloración que fue del verde pasando por el café claro hasta llegar a un color negro. Durante el periodo de la prueba se midió el crecimiento de los coleoptilos los cuales se muestran en la gráfica II-1; así como la apariencia del explante (ver tabla II-8).

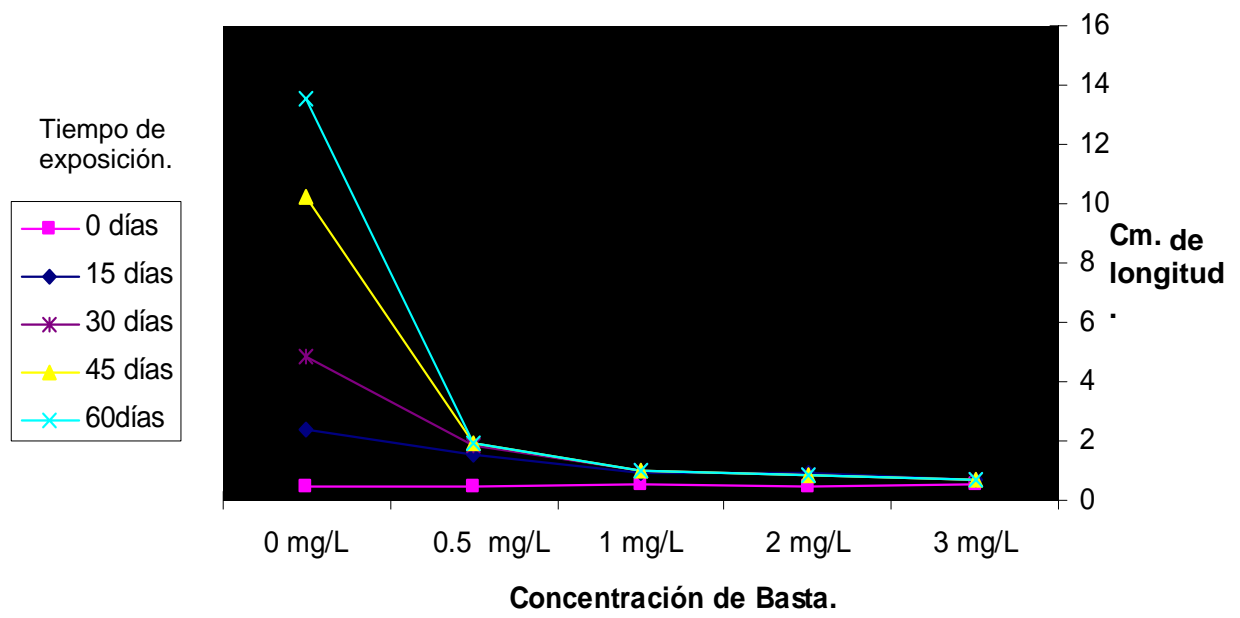
Tabla II-8. Apariencia del explante durante el periodo del experimento bajo distintas concentraciones de Basta[®]

CONCENTRACIÓN	Apariencia del explante .				
	0 días	15 días	30 días	45 días	60 días
0 mg/L	verdoso	verdoso	verdoso	verdoso	verdoso
0.5 mg/L	verdoso	verdoso	cafesoso	negros	negros
1 mg/L	verdoso	Pardo	negros	negros	negros
2 mg/L	verdoso	Café	negros	negros	negros
3 mg/L	verdoso	Café	negros	negros	negros

De esta forma las concentraciones de 1 y 2 mg l⁻¹ de Basta[®] se eligieron para realizar la selección. Estos datos concuerdan con los reportados por Girijashankar *et al.*, 2005 quienes registraron la muerte de los explantes silvestres a estas concentraciones.

La fosfotricina (PPT) comercialmente conocido como glufosinato de amonio, es un tripéptido conformado por un análogo de ácido L-glutámico y dos residuos de alanina. Es un potente inhibidor de la glutamina sintasa, la cual es importante dado que es la enzima encargada de la asimilación de amonio y regulación del metabolismo del nitrógeno en las plantas y es la única enzima encargada de asimilar el amonio liberado producido por la reducción al nitrato, degradación de amonio y fotorespiración (De Block *et al.*, 1987 / cit. por Jiménez 2006). Por ello a una determinada concentración de Basta en el medio de cultivo, las plantas que se encuentran en contacto con éste mueren, dado que se intoxican como resultado de la inhibición de la glutamina sintasa llevando a la plantas primero a un crecimiento nulo y posteriormente a la muerte.

Crecimiento del coleoptilo a lo largo del periodo sometido a Basta.



Gráfica II-1: Comparación del crecimiento de coleoptilos en las distintas concentraciones de Basta® y los días de exposición al herbicida.

ESTABLECIMIENTO DE PARÁMETROS PARA EL BOMBARDEO DE SORGO SUPER SWEET II®, REALIZANDO PRUEBAS DE TAMAÑO DE BALA Y DE DISTANCIA ENTRE EL EXPLANTE Y EL FILTRO.

En los trabajos publicados hasta la fecha el bombardeo es realizado usando cámaras de alta presión lo que da por resultado que no se cuenten con parámetros estandarizados para la utilización de cámara de baja presión.

Es por esto que se probaron dos tamaños de las partículas de tungsteno (5M y 10 M) así como pruebas a 2 distancias (7.5 cm y 13 cm) entre el filtro portador de las partículas -ADN y el explante.

El análisis de los parámetros óptimos para la transformación usando la cámara de baja presión se basó en el porcentaje de explantes (coleoptilos) que lograron resistir al bombardeo y a la primera etapa de selección, correspondiente a los 2 primeros subcultivos post-bombardeo respecto a los coleoptilos bombardeados inicialmente.

Como se muestra en la tabla II-9, no existe un diferencia contundente entre los parámetros probados a los dos meses del bombardeo sin embargo durante este periodo la mejor respuesta se presentó en la combinación entre distancia y tamaño de bala de: 13 cm + M5 seguida por la de 7.5 cm + M5.

Tabla II-9: Datos originados al comparar el efecto de la distancias del filtro al explante y de tamaño de bala a los 2 meses del bombardeo.

Distancia entre filtro y explante	Tamaño de bala probado	Número de coleoptilos bombardeados	Porcentaje de sobrevivencia.
13 cm	M5	254	12.6%
13 cm	M10	263	9.5%
7.5 cm	M10	245	9.3%
7.5 cm	M5	356	10.6%

Sin embargo parece existir una mejor eficiencia respecto al tamaño de bala que sobre los efectos que tuvieron ambas distancias de bombardeo, esto basado en que los resultados más altos se encuentran en los tratamientos con las partículas M5.

Durante el transcurso de los subcultivos se logró notar que la diferencia entre las condiciones de bombardeo iban aumentando dando por resultado un efecto favorable a la combinación de 13 cm+ M5; Así mismo siguió apareciendo en segundo lugar la combinación entre 7.5 cm + M5.

Sin embargo no fue posible obtener un porcentaje confiable de rendimiento, debido a que durante este tiempo los explantes se mantuvieron en proliferación haciéndose difícil la cuantificación exacta de brotes.

ESTABLECIMIENTO DEL MEJOR EXPLANTE A USAR PARA LOGRAR LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA.

Entre los explantes usados para la transformación genética del sorgo se encuentra; los embrión inmaduro, meristemo apical, brotes con 7 días de edad callo embriogénico y hojas (Tadesse *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 1998; Jeoung *et al.*, 2002; Emani *et al.*, 2002; Krishnaveni *et al.*, 2001; Able *et al.*, 2001; Battraw and Hall, 1991;Hagio *et al.*, 1991).

De los dos explantes usados (coleoptilo de 3-5 mm y callo con 2 meses de generación) el que mejor respuesta presentó fue el coleoptilo al resistir mejor el estrés generado por el bombardeo y el prolongado periodo de proliferación; a diferencia del callo el cual sufrió mayor oxidación a la registrada (ver figura II-7). Tadesse *et al.*, 2003 demostraron que el aumento en la oxidación puede deberse a las heridas provocadas por las balas después del bombardeo; se llegan a dar casos en los que la oxidación da por resultado una necrosis total y por ende a su no regeneración; lo cual se pudo comprobar durante el presente trabajo ver figura II-8.

El uso de coleoptilo o de ápice de brote fue un explante con buena respuesta para lograr la obtención de plantas transgénicas en el caso del sorgo, los trabajos realizados por: Tadesse *et al.*, 2003; Girijashankar, *et al.*, 2005 utilizaron brotes con una edad de 7 días reportando una transformación exitosa; Tadesse *et al.*, 2003 reportaron 0.5% en ápices y en embriones inmaduros tuvieron un porcentaje de eficiencia de 1.3%; Girijashankar, *et al.*, 2005 reportaron un eficiencia de 1.5%. De esta forma es factible dejar de depender de la generación de callo embriogénico haciendo uso de otras vías de regeneración (Sticklen 2005).

Así mismo, Girijashankar *et al.*, 2005 mencionan que el uso de los ápices ayuda a reducir el tiempo de regeneración de las plántulas transgénicas. Sin embargo el uso de ápices esta asociada a factores limitantes para la eficiente producción sustentable de transgénicos, siendo la más adversa la posibilidad de generar plantas quiméricas.

Coleoptilos en empalizada.

Inicio de la oxidación.

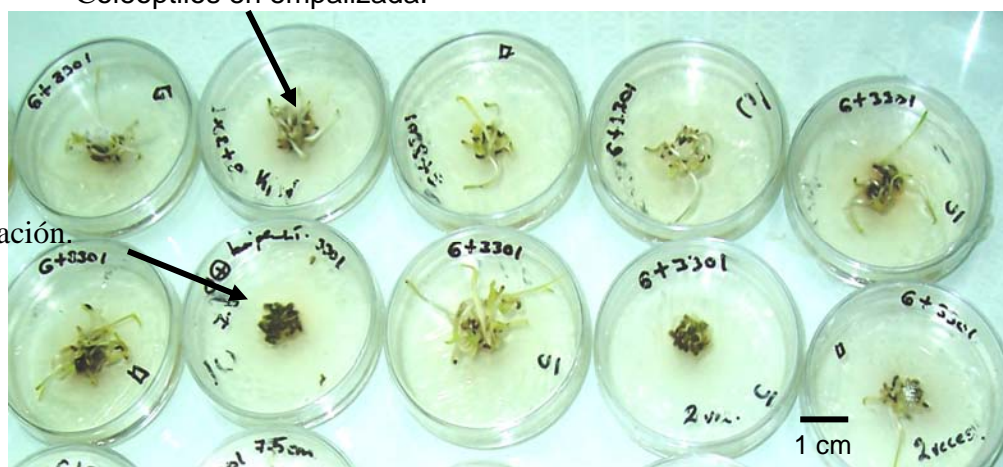


Fig. II-7: Coleoptilos Super Sweet II en cajas Petri pos-bombardeo a las 48h.

Es importante destacar que la necrosis y muerte de los explantes fue resultado de factores como: la oxidación dependiente de la variedad usada para los experimentos, el daño ocasionado por las balas y el efecto de selección del herbicida Basta® como se muestra en la figura II-8.



Fig. II-8: Oxidación y selección de callos Super Sweet II® bombardeados a las 5 semanas.

Cabe mencionar que la concentración en equimolares (9:1) de los plásmidos de interés es mayor a lo reportado por Girijashankar *et al.*, 2005 (1:1). Teniendo una mayor proporción de los genes de interés respecto a los genes reporteros.

PRUEBA DE EXPRESIÓN TRANSITORIA DEL GEN *GUS* MEDIANTE EL ENSAYO HISTOQUÍMICO EN LOS EXPLANTES BOMBARDEADOS.

Como es bien sabido la finalidad de la expresión transitoria es obtener una evidencia visible de la transferencia y expresión del ADN introducido. Para ello se utiliza el ensayo de el gen *uidA* bacteriano de la *E.coli* que codifica para la β -glucuronidasa (GUS), el cual es considerado como el gen reportero de mayor elección para monitorear la transferencia de ADN, a través de la formación de un precipitado azul, al reaccionar la enzima β - glucuronidasa con el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil - β -D-glucoronido (X-Gluc) evidenciando la incorporación del gen al material genético nuclear (Jefferson,1988).

Entre los autores que realizaron pruebas de expresión transitoria usando el gen GUS al transformar sorgo se encuentran Casas *et al.*, 1993 quienes al bombardear embriones reportaron menos de 20 puntos de expresión por

embrión; del mismo modo lo realizó Able *et al.*, 2001 quienes lograron contabilizar 50 puntos de expresión por explante de hoja hasta 100 puntos de expresión en callos; aparte optaron por la utilización de la proteína verde fluorescente la cual es aislada de la medusa (*Aequorea victoria*) debido a que la prueba del GUS es destructiva. Por su parte Girijashankar *et al.*, 2005 realizaron la prueba transitoria a las 24 h, lograron encontrar como máximo 27 puntos de expresión por meristemo entre otros autores que hacen uso del *uidA* se encuentra Tadesse *et al.*,2003, que lograron obtener hasta 100 puntos de expresión por embrión.

Una vez colocados los explantes bombardeados 48 h previas (tanto coleoptilos como callos) en la caja de muestra de ELISA y de haberlos expuesto a la solución de X-gluc se incubaron a 25 ± 2 ° C por un periodo de 48 horas en un cuarto oscuro y cubriendo la caja con aluminio, para evitar cualquier contacto con la luz lo que ocasionaría que se degradará el precipitado.

Después de transcurrido el periodo antes mencionado los explantes presentaron una apariencia como la que se muestra en la figura II-9. Se eliminó la clorofila y se realizó la fijación de los explantes.

Una vez concluida la técnica para la fijación, la apariencia de los explantes quedó de la forma en la que es mostrada en la figura II-10, en donde se puede apreciar de manera clara que los explantes bombardeados (izquierda de la imagen) dieron una respuesta positiva a la actividad de la enzima β -glucoronidasa, la cual fue de un nivel de expresión regular (azul claro) a bueno (azul oscuro).

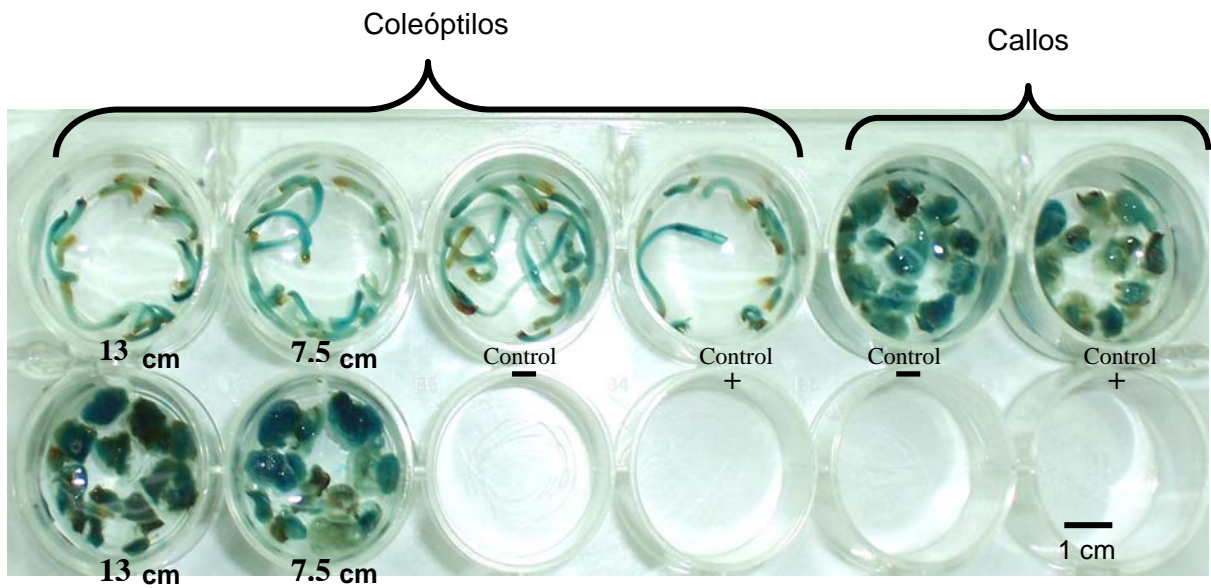


Fig. II-9: Prueba de expresión transitoria en los distintos explantes de sorgo a los 4 días de ser bombardeados con el tamaño de bala M5 y antes de ser eliminada la clorofila.

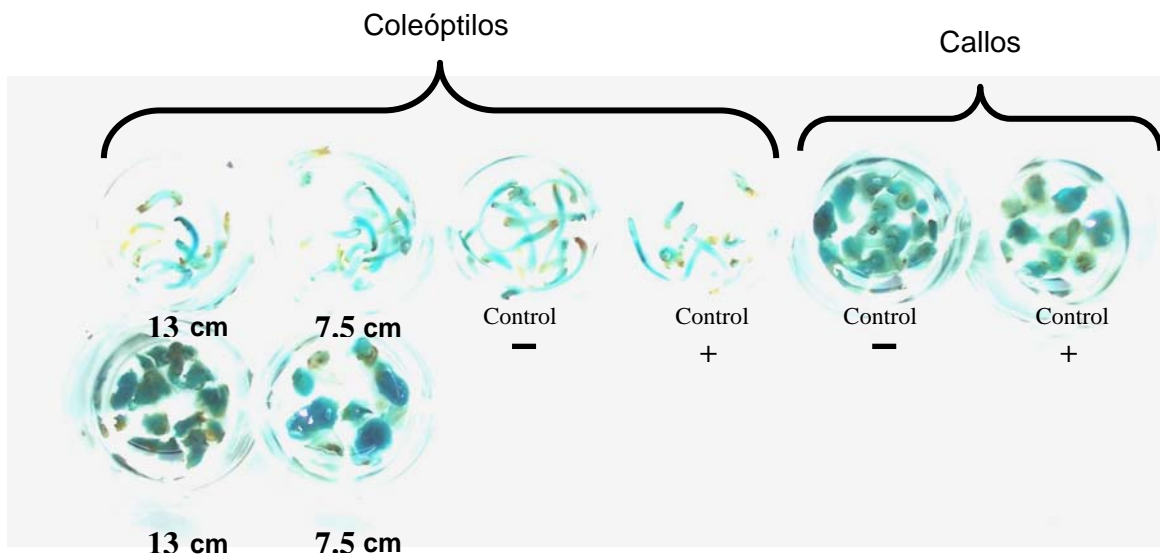


Fig. II-10: Prueba de expresión transitoria en los distintos explantes de sorgo a los 4 días de ser bombardeados con el tamaño de bala M5 y después de eliminar la clorofila y contrastar la imagen.

13 y 7.5 cm: Distancia entre el explante y el porta partículas.

Control (-): Coleoptilos no bombardeados.

Control (+): Coleoptilos bombardeados solamente con partículas y gen reportero.

La expresión que se dio tanto en coleoptilos como callos es una expresión uniforme, en muy pocos caso se logran apreciar puntos aislados de expresión.

Con respecto a los controles negativos y los positivos en ambos casos dieron positivo a la prueba como se aprecia en la figura II-11, que es resultado de una respuesta endógena; dificultando con ello que se de una evidencia visible de la transferencia y expresión del ADN introducido a etapas tempranas del proceso de transformación.

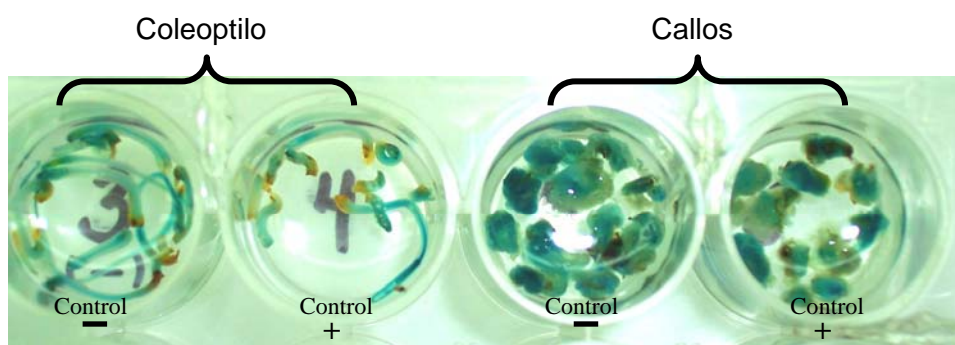


Fig. II-11 Resultados de la expresión transitoria en los explantes que sirvieron de control a los 4 días en donde se puede observar la expresión endógena de ambos explantes.

SELECCIÓN Y REGENERACIÓN DE PLÁNTULAS DE SORGO RESISTENTES AL BASTA®.

Durante esta etapa los explantes fueron sometidos al herbicida Basta® comenzando con la concentración baja de 1 mg l⁻¹ durante los primeros dos subcultivos e iniciando la selección a las 48 h después de ser bombardeados los explantes; a diferencia de Girijashankar *et al.*, 2005 quienes realizan la primera fase de selección a las cuatro semanas del bombardeo.

Durante la primera fase (las primeras 6 semanas) de selección se dio un índice alto de mortandad como se muestra en la figura II-12, en donde aparecen encerrados en círculos azules los explantes que se encuentra aún verdes y resistieron; los explantes que aparecen de color negro son explantes que debido al estrés a causa del Basta® perecieron; esto se explica por la no integración de los genes de resistencia y por ende de los genes de interés; siendo mayor en los callos.

Para la segunda etapa se realizaron ensayos a mayor concentración de Basta® (2 mg l^{-1}) durante un periodo de 3 meses esto con el fin de aumentar el grado de selección y evitar con ello las quimeras como los enfatiza Girijashankar *et al.*, 2005.

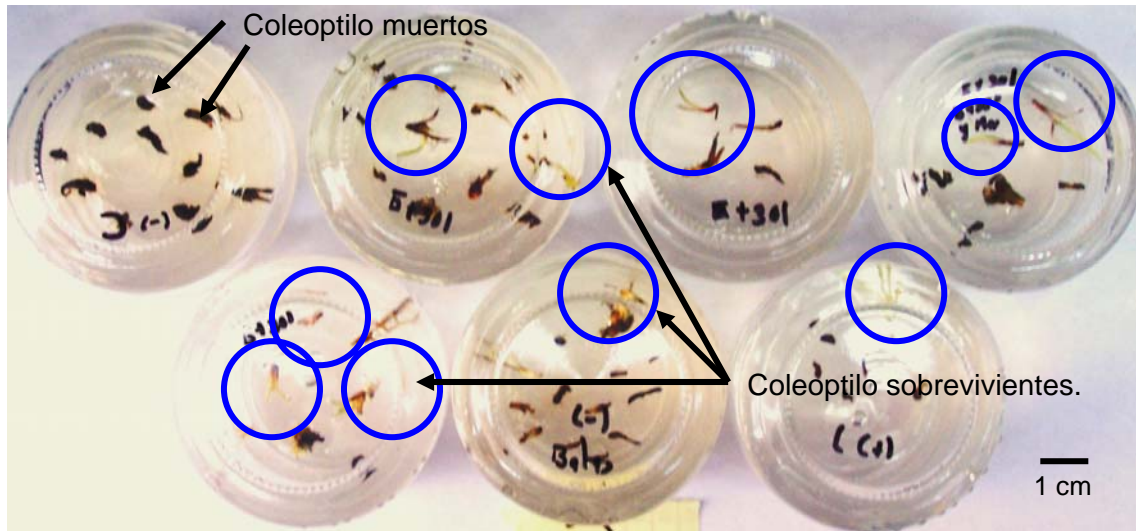


Fig. II-12: Coleoptilos en etapa proliferación- selectiva a los 2 meses de ser bombardeados; encerrados en círculo se muestran los explantes que resistieron.

Posteriormente se disminuyó de nuevo a 1 mg l^{-1} durante otros 4 meses, durante todos estos periodos se mantuvieron los explantes en medio de proliferación figura II-13.

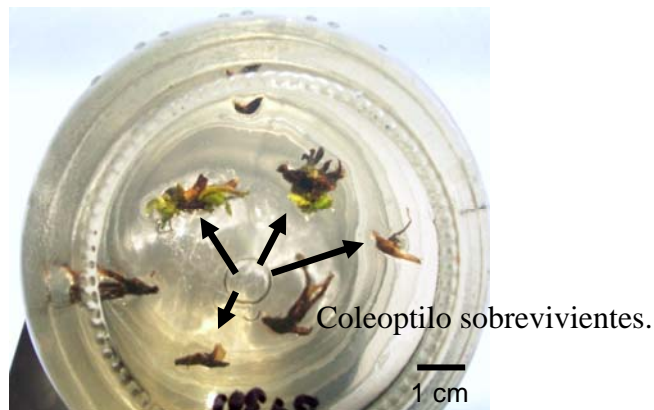


Fig. II-13: Coleoptilos en etapa de proliferación selectiva a los 4 meses de ser bombardeados.

A los 9 meses se dejó el medio de proliferación para iniciar la fase de regeneración en la cual se mantuvo una concentración a 0.5 mg l^{-1} durante 2 meses más para eliminar completamente el Basta® y se lograra una óptima regeneración como se muestra en la figura II-14.

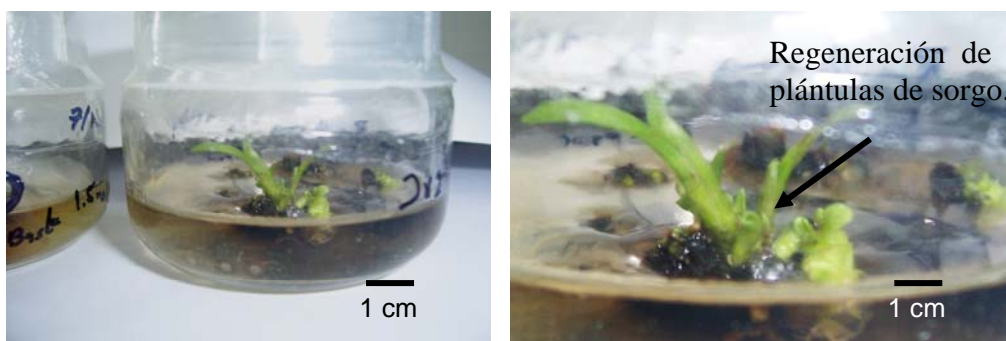


Fig. II-14: Regeneración de coleoptilos bombardeados 8 meses después de su bombardeo y .

La regeneración de las plantas transformada por los largos periodos transcurridos *in vitro* hace que la calidad de las plántulas sea inferior, teniendo como ejemplo que el desarrollo del sistema radicular sea de menor calidad. El crecimiento y enraizamiento de las plántulas se realiza en los medios mencionados en la tabla 9 el capítulo 1, para cada caso, los cuales ya no contenían agente de selección.

PRUEBAS DE EXPRESIÓN TRANSITORIA DEL GEN *GUS* MEDIANTE EL ENSAYO HISTOQUÍMICO EN LAS PLÁNTULAS REGENERADAS RESISTENTES AL AGENTE DE SELECCIÓN BASTA®.

A los 14 meses del bombardeo se realizó la prueba en plántulas ya grandes, las cuales se disectaron en porciones pequeñas (hojas y tallo) y se les realizó la prueba de expresión transitoria. Dado que las plántulas silvestres como se esperaba presentan una respuesta endógena la cual fue de regular a buena; a comparación de las plántulas bombardeadas con la proteína E y proteína G en donde no fue tangible, teniendo una expresión que va de baja a regular como se puede apreciar en la figura II- 15, al contrastar la imagen se puede observar con mayor detalle la expresión, la cual en algunas regiones de las plántulas transformadas no presentó coloración alguna que indican la presencia del gen reportero, por lo que se puede hablar de plantas quiméricas originadas por el sistema transformación como los enfatiza Girijashankar *et al.*, 2005.

Por lo que para corroborar la presencia de las proteínas de interés se necesitan realizar pruebas moleculares acordes como lo sería el PCR.

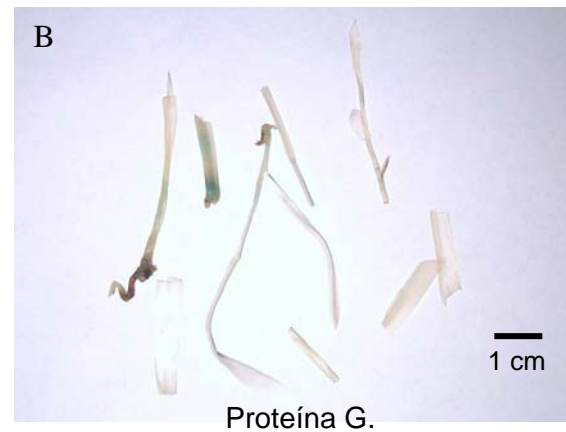
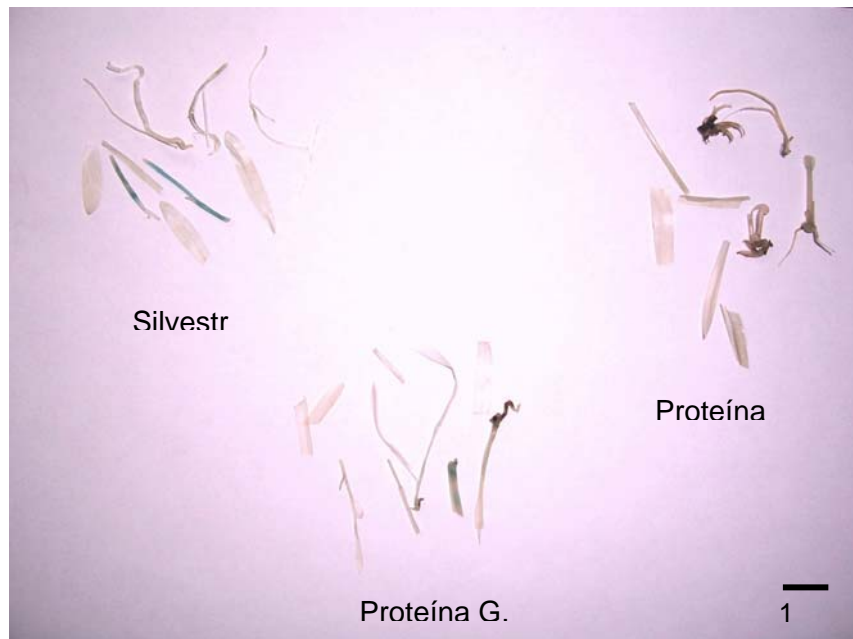


Figura II-15: Resultado de la prueba de expresión transitoria a plántulas bombardeadas y resistentes al Basta®. A) Plántulas silvestre B) Plántulas regeneradas a partir de coleoptilo bombardeado con proteína G C) Plántulas regeneradas a partir de coleoptilo bombardeado con proteína E.

CONCLUSIONES

- * Las concentraciones de Basta[®] las cuales fungieron como agentes de selección en coleoptilos silvestres de sorgo Super Sweet II[®] fueron de 1 y 2 mg l⁻¹.
- * Los mejores parámetros para el bombardeo de coleoptilos de sorgo Super Sweet II[®] entre distancia y tamaño de bala fueron los de: 13 cm+ M5 seguida por la de 7.5cm +M5.
- * Los coleoptilos de sorgo Super Sweet II[®] resultaron ser mejores explantes que los callos para la regeneración de plántulas resistentes a Basta[®].
- * Los genotipos utilizados de sorgo (Super Sweet II[®]) presentan una respuesta endógena a la expresión transitoria lo que complica la evaluación.
- * La eficiencia de transformación basado solamente en la cantidad de explantes resistentes al Basta[®] se calcula someramente en un 2%.
- * Para la aceptación o rechazo de la hipótesis es necesario la realización de pruebas moleculares.

PERSPECTIVAS FUTURAS.

Para evitar la interferencia por la expresión endógena durante la expresión transitoria, se requiere de la implementación de un nuevo gen reportero que sirva para comprobar la expresión de los genes foráneos o utilizar fenotipos que no presenten ese efecto endógeno. Del mismo modo se deben realizar pruebas con protocolos reportados para reducir la expresión endógena en otros cereales.

Se requieren de análisis más confiables para comprobar estos resultados como serían una prueba de PCR , Southern o Western Blot.

BIBLIOGRAFIA:

Able JR, Rathus C and Godwin ID, (2001). The investigation of optimal bombardment parameters for transient and stable transgene expression in sorghum. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37: 341–348.

Alberts B.; Bray D.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K. y Watson J.D. 2002 *Biología molecular de la célula*. Reimpresión. Ediciones Omega S.A. España

Alcorcón. Madrid *Alergol Inmunol Clin*;16 (Extraordinario Núm. 2):137-157

Aragao, F.J.L., M.F. Grossi de Sa, M. R. Davey, A. C. M. Brassileiro, J. C. Faria & E. L. Rech (1993). Factors influencing transient gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an electrical particle acceleration device, *Plant Cell Rep.*, 12: 483-490.

Arakawa T, Chong DKX, Langridge WHR (1998) Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat Biotechnol* 16:292–297

Arakawa T, Chong DKX, Merritt JL, Langridge WHR 1997. Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res* 6:403–413

Armstrong, C., A. Barnason, S. Brown, D. Dean, R. Deaton, B. Dennehey, S. Elmer, M. Fromm, B. Hairston, B. La Vallee, G. Maher, G. Meek, F. Morrish, M. Pajeau, W. Peterson, M. Reedy, P. Samders, C. Santino, S. Sims & D. Songstad 1991 Symposium of the European Association for Research on Plant Breeding, Reus, Spain (EUCARPIA, Wageningen, The Netherlands). Abstract I.L3.

Bartolomé B., 2001. Alimentos transgénicos y su implicación en alergia *Alimentos transgénicos: por qué y cómo se desarrollan* Fundación Hospital

Baskaran, P. B. Raja Rajeswari, N. Jayabalan 2006 .Development of an In Vitro Regeneration System in Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] Using Root Transverse Thin Cell Layers (tTCLs) *Turk J Bot* 30 1-9

Battraw, M. and Hall, T.C. 1991. Stable transformation of *Sorghum bicolor* protoplasts with chimeric neomycin phosphotransferase II and β -glucuronidase genes. *Theor. Appl. Genet.* 82: 161–168.

Brien L.O` and R.J. Henry 2000. *Transgenic cereals* edited by:. American Association of Cereal Chemists, Inc.

Buetow, D. E., Korban S. S. 2000. Transgenic plants producing viral and bacterial antigens *AgBiotechNet* .

Carmine Damiano y Simona Monticelli 1998. *In vitro* fruit trees rooting by *Agrobacterium rhizogenes* wild type infection *EJB Electronic Journal of Biotechnology* Vol.1 No.2.

Carvalho Carlos Henrique S., Usha B. Zehr, Nilupa Gunaratna, Joseph Anderson, Halina H. Kononowicz, Thomas K. Hodges and John D. Axtell 2004. Agrobacterium-mediated transformation of sorghum: factors that affect transformation efficiency. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 2, 259-269

Casas, A.M., Kononowicz, A.K., Haan, T.G., Zhang, L., Tomes, D.T., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. 1997. Transgenic sorghum plants obtained after microprojectile bombardment of immature inflorescences. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 33: 92–100.

Casas, A.M., Kononowicz, A.K., Zehr, U.B., Tomes, D.T., Axtell, J.D., Butter, L.G., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. 1993. Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11212–11216.

Charest, P. J., N. Calero, D. Lachance, D. S. S. Datla, L. C. Duchense & E. W. T. Tsang (1993). Microprojectile-DNA delivery in conifer species, factors affecting assessment of transient gene expression using the β -glucuronidase reporter gene, *Plant Cell Rep.*, 12: 189-193.

Christou, P., D.E. McCabe & W.F. Swain 1988. Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles, *Plant Physiol.*, 87:671-674.

Daniell H, Lee S, Panchal T, Wiebe PO (2001) Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol* 311:1001–1009

David W. Ow1 AAES Special Report Proceedings of the 2000 Transgenic plants, then and now: a personal perspective *Cotton Research Meeting*

Díaz, Marina L.; Zappacosta, Diego C.; Franzone, Pascual M.; Ríos, Raúl D. Transformación genética *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal* Capítulo 3

Fromm, M.E., F.M. Morrish, C. Armstrong, R. Williams, J. Thomas & T.M. Klein 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants, *Biotechnology*, 8: 833-839.

Giddings G.; Allison, G.; Brooks, D.; Carter, A. 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnol* 18:1151-1155.

Girijashankar V. · H. C. Sharma · K. K. Sharma · V. Swathisree · L. Sivarama Prasad · B. V. Bhat · M. Royer · B. San Secundo · M. Lakshmi Narasu · I. Altosaar and N. Seetharama 2005. Development of transgenic sorghum for insect resistance against the spotted stem borer (*Chilo partellus*) genetic transformation and hybridization *Plant Cell Rep* 24: 513–522

Godwin, I. and Chikwamba, R. 1994. Transgenic grain sorghum (*Sorghum bicolor*) plants via *Agrobacterium*. In: R.J. Henry and J.A. Ronalds (Ed.), *Improvement of Cereal Quality by Genetic Engineering*, Plenum Press, New York, pp. 47–53.

Gordon-Kamm, W. W., T. M. Spencer, M. L. Mangano, T.R. Adams, R.J. Daines, W. G. Start, J.V. O'Brien, S.A. Chambers, W.R. Jr. Adams, N. G. Willets, T. B.

Rice, C. V. Mackey, R. W. Krueger, A. P. Kaush & P.G. Lemaux 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants, *Plant Cell*, 2 : 603- 618.

Gressel Jonathan 2002. Transgenic herbicide- resistant crops- advantages, drawbacks & failsafes 597p. En: Plant Biotechnology and transgenic plants Edit by: Kirsi-Marja Oksman –Caldentey & Wolfgang H. Barz Marcel Dekker ,Inc. E.U.A. 2002

Guerrero Octavio Andrade 1998. Transformación de células de Maíz (*Zea mays* raza tuxpeña) por medio de bombardeo de partículas. Tesis de licenciatura UNAM

Guerrero-Andrade Octavio 2000. Tesis de maestría: Construcción de vectores para la transformación con los genes de glicoproteínas de fusión y de la hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad aviar del Newcastle y optimización de las condiciones para su bombardeo. C.I.N.V.E.S.T.A.V., I.P.N. Irapuato, México.

Guerrero-Andrade Octavio; Elizabeth Loza-Rubio; Teresa Olivera-Flores; Tamás Fehérvári-Bone; Miguel Angel Gómez-Lim 2006. Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies. *Transgenic Res* 15:455–463

Haq T. A., H.S. Mason, J.D. Clemens and Ch. J. Arntzen 1995. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268: 714-716.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A & Bevan, M.W 1987. *EMBO J.* 6, 39010-3907

Jiménez, Maria de Jesús Villalobos 2006. Transformación genética de callos embriogénicos de Maíz (*Zea mays* L.) con el gen de la Glicoproteína G del virus de la rabia. Tesis de licenciatura UNAM

John M..E.. 1997. Cotton crop improvement through genetic engineering. *Critical Reviews in Biotechnology* 17, pp 185-208.

Kaufman, P.B. Wu, W. 1995 Gene transfer and expression in plants. In: Kaufman, P.B. Wu, W. *Molecular and cellular methods in biology and medicine.* CRC Press Inc. Florida, U.S.A. p 367- 393.

Khachatourian George. s, Alan McHughen, Ralph Scorza, Wai-Kit Nip, Y. H. Hui Marcel Dekker 2002. *Transgenic plants and crops* Inc. New York

Komari, T.; Kubo, T 1999. Methods of genetic transformation: *Agrobacterium tumefaciens*. In: Vasil, I. K., ed. Molecular improvement of cereal crops. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers;:43–82.

Landridge, W 2000. Edible Vaccines. Scientific American online

Larrick James W., Lloyd Yu, Sudhir Jaiswal & Keith Wycoff 2002. Transgenic plant for production of immunotherapeutic agents 405 p. En: Plant Biotechnology and transgenic plants Edit by: Kirsi-Marja Oksman –Caldentey & Wolfgang H. Barz Marcel Dekker ,Inc. E.U.A.

Larrick, J.W., Thomas D.W. 2001 Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr Opin Biotech*12:411-418

Lindsay D.G. 2002 The potencial contribution of plant biotechnology to improving food quality 201p. En: Plant Biotechnology and transgenic plants Edit by: Kirsi-Marja Oksman –Caldentey & Wolfgang H. Barz Marcel Dekker ,Inc. E.U.A.

Liu Dawen, Svetlana V. Oard y James H. Oard 2003. High transgene expression levels in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) driven by the rice ubiquitin promoter RUBQ2. *Plant Science* 165: 743-750.

Loza-Rubio E., Setien, A.A., Bahloul, C., Brochier, B., *et al.*, 1999. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in México. *Arch Med.Res.* 30:144-149.

Mariam B Sticklen; Hesham F Oraby 2005. Invited review: shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 41, 3; AGRICOLA® pg. 187 -200

Mason Hugh S., Heribert Warzecha, Tsafir Mor and Charles J. Arntzen 2002. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *TRENDS in Molecular Medicine* Vol.8 No.7

Mason, J.D., DM-K Lam and Ch. J. Arntzen 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proceeding of National Academy of science USA* 89: 1145- 11749.

Matsumura Nobuko, Chizuko Takeuchi, Keiichi Hishikawa, Tomoko Fujii Nakaki Toshio Glufosinate ammonium induces convulsion through N-methyl D-aspartate receptors in mice. *Neuroscience letters* 304 123-125.

McGarvey. P.B., J. Hammond, M.M. Dienelt D.C. Hooper, Z.F.Fu, B. Dietzschold, H. Koprowski y F.H. Michaels 1995. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes *Bio/ Technology* 13:1484-1487.

Mejia A., L.F. Galindo, W.M. Roca, H.J. Jacobsen y J. Tohme 2002. Transformación genética del frijol tepary (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* y transferencia de los transgenes al frijol común a través de cruzamientos sexuales. CIAT.

Mere Villanueva Gabriela y Vázquez Alejandro Violeta 2003. “ Bombardeo de callos embriogénicos de zanahoria (*Daucus carota* L.) y su regeneración con la proteína G del virus de la rabia” Tesis de licenciatura Facultad de Química, UNAM.

Morrish, F., D.D. Songstad, C.L. Armstrong & M. Fromm (1993). Microprojectile Bombardment: A Method for the Production of Transgenic Cereals Crop Plants and the Functional Analysis of Genes. In: Transgenic Plants. A. Hiatt (ed.). Marcel Dekker Inc., New York; USA. pp. 255-281.

Nakaki Toshio, Akira Mishima, Eiji Suzuki, Futoshi Shintani, Tomoko Fujii 2000. Glufosinate ammonium stimulates nitric oxide production through N-methyl D-aspartate receptor in rat cerebellum. *Neuroscience letters* 290 209-212.

Ow, D.W., K.V. Wood, M. DeLuca, J.R. de Wet, D.R. Helinski, and S.H. Howell 1986. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234:856-859.

Peña Ramírez Yuri Jorge, Ennio Tasciotti, Abel Gutierrez-Ortega, Alberto J. Donayre Torres, María Teresa Olivera Flores, Mauro Giacca, and Miguel Ángel Gómez Lim 2007. Fruit-specific expression of human immunodeficiency virus 1-*Tat* gene in tomato plants and its immunogenic potential in mice *Clin. Vaccine Immunol*, 00028-07.

Perl, A., H. Kless, A. Blumenthal, G. Galili & E. Gallun 1992. Improvement of plant regeneration and GUS expression in scutellar wheat calli by optimization of culture conditions and DNA-microprojectile delivery procedures, *Mol. Gen. Genet.*, 235: 279-284.

Popelka Juan Carlos, Jianping Xu y Fredy Altpeter.2003. Generation of rye (*Secale cereale* L.) plants with low transgene copy number after biolistic gene transfer and production of instantly marker-free transgenic rye. *Transgenic Research* 12: 587–596.

Rhodes, C. A., D. A. Pierce, I. J. Mettler, D. Mascarenhas & J.J. Detmer (1988). Genetically transformed maize plants from protoplasts, *Science*, 240 : 204-207.

Robles Sánchez Raúl. Producción de granos y forrajes 4ª edición. 1983. Edit Limusa.

Romano Andrea, Krit Raemakers, Jamila Bernardi 1, Richard Visser y Hans Mooibroek. Transgene organisation in potato after particle bombardment-mediated (co-)transformation using plasmids and gene cassettes. 2003. *Transgenic Research* 12: 461–473.

Sala Francesco, M. Manuela Rigano, Alessandra Barbante, Barbara Basso, Amanda M. Walmsley , Stefano Castiglione 2003. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives *Vaccine* 21 803–808

Sanford, J.C., T. M. Klein, E. D. Wolf & N. Allen (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process, *J. Particle Sci. Technol.*, 5: 27-37

Sanford, J.V., F.D. Smith & J.A. Russell (1993). Optimising the Biolistic Process for Different Biological Applications. *Methods Enzymol.* 217:483-509.

Shah,, D..M..;; Rommens,, C..M..T..;; Beachy,, R..N.. 1995. Resistance to diseases and insects in transgenic plants: progress and applications to agriculture. *Trends in Biotechnology* 13, pp 362-368.

Sharma Kiran K; Pooja Bhatnagar-Mathur; Trevor A Thorpe 2005. Genetic transformation technology: status and problems *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 41:102-112 March- April 2005 Society for In Vitro Biology

Somers A. David; Deborah A Samac; Paula M Olhoft. 2003Recent advances in legume transformation. *Plant Physiology* ; 131, 3; AGRICOLA. pg. 892.

Southgate, E.M., M.R. Davey, J.B. Power & R. Marchant (1995). Factors Affecting the Genetic Engineering of Plants by Microprojectile Bombardment. *Biotech. Advanc.* 13:631-651

Svetleva D., M. Velcheva y G. Bhowmik. Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) improvement. 2003. *Euphyta* 131: 189-200.

Tadesse Yohannes , Laszlo Sagi , Rony Swennen & Michel Jacobs 2003. Optimisation of transformation conditions and production of transgenic sorghum (*Sorghum bicolor*) via microparticle bombardment *Plant Cell , Tissue and Organ Culture* 75: 1–18,

Tomes, D.T. Transformation in maize: nonsexual gene transfer, *Annual Meeting Proceedings of 26th Annual Maize Breeders School* (J.Dudley,ed.) University of Illinois, Urbana,1990, pp. 7-9.

Twell, D., T.M. Klein, M.E. Fromm & S. McCormick (1989). Transient expression of chimeric genes delivered into pollen by microprojectile bombardment, *Plant Physiol.*, 91: 1270- 1274.

Vasil Indra K 2005 .The story of transgenic cereals: the challenge, the debate and the solution a historical perspective *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 41:577–583.

Voet, Donald and Judit G. 2004. *Biochemistry* 3rd Edition. Publisher: Wiley 1616 pages.

Wigdorovitz , A., C. Carrillo, M.J. Dus Santos K. Trono, A. Peralta M.C. Gómez, R.C. Ríos, P.M. Franzon, A.M. SAdir, J.M Escribano y M.V. Borca. 1999. Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parental immunization with alfalfa transgenic plants expressing the virul structural protein VPI *Virology* 255:347-353.

Wisniewski Jean-Pierre, Nathalie Frangne, Agnès Massonneau, Christian Dumas. Between myth and reality: genetically modified maize, an example of a sizeable scientific controversy. 2002. *Biochimie* 84: 1095–1103.

Yusibov, V., A. Modelska, Steplewski, M. Agadjanyan, D. Weiner, D. C. Hooper and H. Koprowski 1997. Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proceeding of the National Academy of Science U.S.A.*94:5784-5788.

Zhao Zuo-yu __, Tishu Cai¹, Laura Tagliani, Mike Miller, Ning Wang, Hong Pang, Marjorie Rudert, Sheryl Schroeder, Dave Hondred, Jon Seltzer and Dortie Pierce 2000. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation *Plant Molecular Biology* 44: 789–798, *Trait and Technology Development, Pioneer Hi-Bred International Inc*

Zhu, H., Muthukrishana, S., Krishnaveni, S., Wilde, G., Jeoung, J.M. and Liang, G.H. 1998. Biolistic transformation of sorghum using a rice chitinase gene. *J. Genet. Breed.* 52: 243–252.

ANEXO I

SALES DEL MEDIO DE CULTIVO CONOCIDO COMO MS (Murashigue & Skoog 1962) SOLUCIONES DE MACRO Y MICROELEMENTOS, CONCENTRADAS 100X

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	l l (g)	P.M (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO EN	
				MASA (mg)	MOLES (mM)
SOLUCIÓN : NITRATOS					
Nitrato de Potasio	KNO ₃	190	101.108	1900	18.792
Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	165	80.04	1650	20.615
SOLUCIÓN II: SULFATOS					
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	37	246.498	370	1.501
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .H ₂ O	1.69	169.01	16.9	0.0999
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.860	287.54	8.6	0.0299
Sulfato de cobre*	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0025	249.68	25 X10 ⁻³	0.1 X10 ⁻³
SOLUCIÓN III: HALÓGENOS					
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	44.0	147.02	440	2.993
Yoduro de potasio	KI	0.083	166.01	0.83	4.999
Cloruro de cobalto*	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0025	237.93	25 X10 ⁻³	0.105 X10 ⁻³
SOLUCIÓN IV: FOSFATO, AC. BÓRICO, MOLIBDATO					
Fosfato de Potasio monobásico	KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	17.0	136.09	170	1.249
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0.620	61.86	6.2	0.1002
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.025	241.95	250 X10 ⁻³	1.03 X10 ⁻³
SOLUCIÓN V: QUELANTES					
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	2.784	278.028	27.8	0.0999
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₁₀ Na ₂ .2H ₂ O	3.724	372.30	37.3	0.1002

MEDIO DE CULTIVO CONOCIDO COMO N₆
 Chu et al (1972)

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO EN	
			MASA (mg)	MOLES (mM)
COMPUESTOS INORGÁNICOS				
Macronutrientes				
Nitrato de potasio	KNO ₃	101.108	2830	27.99
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	132.146	463	3.50
Cloruro de calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	147.03	166	1.13
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	246.48	185	0.75
Fosfato de potasio	KH ₂ PO ₄	136.09	400	2.94
Micronutrientes				
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ .H ₂ O	169.01	3.34	19.70μM
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.54	1.5	5.23μM
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	61.86	1.6	25.86μM
Yoduro de potasio	KI	166.01	0.83	4.999X10 ⁻³
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	278.028	27.8	0.0999
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₁₀ Na ₂ .2H ₂ O	372.30	37.3	0.1002
COMPUESTOS ORGÁNICOS				
Aminoácidos				
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	NO	
Vitaminas				
Tiamina-HCl	C ₁₂ H ₁₇ Cl N ₄ S . HCl	337.3	1.0	2.965X10 ⁻³
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	123.1	0.5	4.062X10 ⁻³
Piridoxina-HCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl	205.6	0.5	2.432X10 ⁻³

VITAMINAS MS

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK $\mu\text{M.l}^{-1}$
		mg.l^{-1}	$\mu\text{M.l}^{-1}$	
Inositol	180.160	100.0	555.00	5.5×10^{-4}
Ácido nicotínico	123.110	1.0	8.12	812
Tiamina	337.270	2.0	5.93	593
Piridoxina	205.640	1.0	4.90	490

Para preparar 1 L de medio se toman 10 ml de cada una de las soluciones arriba mencionadas.

COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA DE AMINOÁCIDOS Y VITAMINAS DENOMINADA COCKTEL 20.

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK 100X mM.l^{-1}
		mg.l^{-1}	$\mu\text{M.l}^{-1}$	
L-asparagina	150.10	10.0	66.62	6.66
L-arginina	174.20	10.0	57.40	5.74
L-ác. aspártico	133.10	7.5	56.35	5.63
Glicina	75.07	23.0	306.38	30.64
Glutamina	146.10	60.0	410.67	41.06
Ac. glutámico*	147.10	7.5	51.00	5.10
Biotina (Vit. B ₈)*	244.30	1.0	4.10	0.41
Ac. fólico (B ₉)*	441.40	1.0	2.26	0.23
Ac. nicotínico(B ₃)	123.10	1.5	12.18	1.22
Piridoxina (B ₆)	205.60	1.5	7.30	0.73
Riboflavina (B ₂)	376.40	0.1	0.26	0.03
Tiamina (B ₁)	337.30	3.0	8.90	0.89
Myo-inositol	180.16	145.0	804.84	80.48
Urea	60.06	45.0	749.25	74.92

Para preparar 1 l de medio se toman 10 ml del cocktel.

**Disolver con 3 gotas de NaOH 1 N.*

ANEXO II

SOLUCIONES PARA PREPARAR X-GLUC (10X) Y MEDIR LA EXPRESIÓN TRANSITORIA DE *GUS* (JEFFERSON *et al.*, 1987).

1) Amortiguador de fosfato de sodio* (1 M)

	Pesar	Volumen	Concentración	Stock
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1.38 g	50 ml dH ₂ O	200 mM	39 ml
Na ₂ HPO ₄	2.84 g	100 ml dH ₂ O	200 mM	+ <u>61.00</u> 100 ml

2) Ferrocianuro de potasio**

	Pesar	Volumen	Stock
K ₄ Fe(CN) ₆ .3H ₂ O	0.211 g	100 ml dH ₂ O	5 mM

3) Ferricianuro de potasio**

	Pesar	Volumen	Stock
K ₃ Fe(CN) ₆	0.164 g	100 ml dH ₂ O	5 mM

4) EDTA*

	Pesar	Volumen	Stock
C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₁₀ Na ₂ .2H ₂ O	3.72 g	100 ml dH ₂ O	100 mM

5) Tritón X-100*

	Stock
1 ml de Tritón X-100 en 99 de H ₂ O desionizada	1%

*Esterilizar en autoclave durante 18 minutos a 1.3 kg.cm⁻² ó 18 lb.pulg⁻².

** Esterilizar por filtración en membrana millipore™ de 0.22 μm de diámetro.

Preparar solución de X-Gluc de la siguiente manera en condiciones de esterilidad:

	Concentración (mM)	Stock 10X	Para 25 ml (ml)
Amortiguador de Fosfato de sodio pH 7.0	100.0	1 M	2.5
EDTA	10.0	100 mM	2.5
Ferricianuro de K	0.5	5 mM	2.5
Ferrocianuro de K	0.5	5 mM	2.5
Tritón X-100	0.5	5 mM	2.5
X-Gluc en DMSO	1.0 mg.ml ⁻¹		25 mg/150 µl de DMSO

Aforar a 25 ml con agua desionizada estéril.

Una vez preparada esta solución se almacena a -20°C y se descongela lentamente al momento de utilizarla.

SOLUCIONES PARA MEDIR EXPRESIÓN TRANSITORIA DE GUS.

a) Buffer "Z" pH 7.4*

	CONCENTRACION (mM)	Pesar/500 ml (g)
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	40	2.76
Na ₂ HPO ₄	60	4.26
KCl	10	0.37
MgSO ₄ .7H ₂ O	1	0.12

b) Etanol al 70%

350 ml de etanol absoluto + 150 ml de agua desionizada estéril.

c) Acetona-Metanol (1:3)

166 ml de acetona + 333 ml de metanol.

d) Glicerol al 50%*

250 ml de glicerol absoluto + 250 ml de agua desionizada

**Esterilizar en autoclave 18 minutos a 1.3 kg.cm⁻² ó 18 lb.pulg⁻².*