



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“INDUCCIÓN DE LA RIZOGÉNESIS EN *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd) M. C. Johnston. CON *Agrobacterium rhizogenes*”

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:
JAIME HERNÁNDEZ RESÉNDIZ

DIRECTOR: M. en C. JOSEFINA VÁZQUEZ MEDRANO



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICADO A:

Mi madre **Alicia**. Gracias por toda la ayuda y comprensión, todo el amor y todos los cuidados que siempre nos has brindado. Todos esos regaños y llamadas de atención que me has dado son los que me han hecho aprender y entender que siempre debo seguir adelante. ¡Simplemente no pude existir una mejor mamá!

Mi padre **Florencio**. A pesar de que las cosas no fueron fáciles lograste grandes cosas, eres admirable y me siento muy orgulloso de que seas mi padre. Bien lo dijo Sonia...eres la persona que nos ha demostrado que todo lo que deseas es posible a base de esfuerzo y trabajo. Gracias por todo el apoyo y cariño!

Mis hermanos **Sonia** y **Manuel**. Con ustedes sigo creciendo y me sigo formando, sigo aprendiendo de ambos, con ustedes me divierto y me sigo peleando. Hermanos, mejores amigos y cómplices ¿Qué mejor combinación?. Los dos con ideas tan diferentes pero siempre saben cómo ayudarme, darme ánimos, saben escucharme, me conocen. Quiero compartir con ustedes todos los éxitos que vengan a lo largo de este camino que vamos recorriendo.

Familia, durante mi vida he aprendido de todos ustedes, me han dado todo el apoyo y ayuda incondicional ¡a ustedes les debo todo lo que tengo y quien soy!. LOS AMO.

A mis amigos.

Definitivamente mis años de estudiante no hubieran sido los mismos sin ustedes **Fernanda** y **Helena**, con quienes cada clase y cada práctica fue una aventura. Fue todo un privilegio y un honor convertirme no solo en su colega, sino fuera del aula en su amigo. Espero cosechar muchos éxitos junto a ustedes. Pocos tenemos la fortuna de contar con grandes amigos de toda la vida y crecer con ellos. Gracias **Coyi, Alfonso, Lalo, Nash, Toño** por formar esta pandilla. También gracias a ustedes hoy soy la persona que soy.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, la máxima casa de estudios que me brindo tantas oportunidades. A la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala**, donde se imparte lo que para mí es la mejor carrera en la cual me forme.

Al laboratorio de **Fisiología Vegetal** de la unidad de Biotecnología y Prototipos por abrirme sus puertas y brindarme todo el apoyo durante mi estancia desde el inicio hasta hoy. A todos los integrantes gracias por todo el grato tiempo que me hicieron pasar.

A la M. en C. **Josefina Vázquez** que me dio toda la confianza y ayuda durante todo este largo tiempo. ¡Gracias por ser tan paciente y atenta!. Además de ser una excelente maestra e investigadora, es una excelente persona que se preocupa y ayuda a cada persona del laboratorio.

Al M. en C. **Rafael Quintanar** y el Dr. **Elías Piedra**, quienes además de las asesorías y compartir su conocimiento, regalan buenos momentos en el laboratorio y hacen más amenos los largos periodos de trabajo para todos.

Al Dr. **Gerardo Ortiz** y la M. en C. **Socorro Sánchez** por toda la ayuda y observaciones en la realización de este trabajo.

A la Biol. **Martha Santiago**, por toda la ayuda que me presto desde el primer día.

Al **Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT)**, por la beca de licenciatura otorgada.

A la Dra. **Georgina Hernández** del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM por donar la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* K599 usada en este estudio.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
Generalidades del Mezquite	7
Importancia	8
Propagación	9
Transformación de raíces mediada por <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	11
ANTECEDENTES	17
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Material Vegetal	22
Cultivo de <i>A. rhizogenes</i>	22
Transformación de raíces	23
Área foliar, longitud de raíces, primordios y biomasa	24
Extracción y amplificación del ADN	24
Edición, comparación y alineamiento de las secuencias	26
Análisis estadístico	26
RESULTADOS.....	27
Análisis morfológico, porcentaje de enraizamiento	27
Biomasa	29
Longitud de raíces	30
Número de primordios	31
Área foliar	32
Verificación de la transformación por pruebas de biología molecular	33
DISCUSIÓN.....	42
AIB	42
<i>A. rhizogenes</i>	44
<i>A. rhizogenes</i> + AIB	45
Factores que influyen en el enraizamiento	45
Análisis moleculares	46
CONCLUSIONES.....	50

PERSPECTIVAS	51
LITERATURA CITADA	52
APÉNDICES	59
ANEXOS	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Raíces de zanahoria transformadas con <i>A. rhizogenes</i>	11
Figura 2. Mecanismo de acción de <i>A. rhizogenes</i>	14
Figura 3. Mezquites tras 2 meses posteriores a tratamiento.....	27
Figura 4. Formación de pelos radicales	28
Figura 5. Productos de la amplificación para <i>rolB</i>	33
Figura 6. Productos de la amplificación para <i>virD</i>	33
Figura 7. Amplificación del gen <i>virD</i> en raíces	34
Figura 8. Amplificación del gen <i>rolB</i> en raíces	35
Figura 9. Secuencia consenso obtenidas de las raíces del lote A	36
Figura 10 Secuencia consenso obtenidas de las raíces del lote B	36
Figura 11. Alineamiento múltiple de secuencias con ClustalW	37
Figura 12. Traducción a proteínas	39
Figura 13. Amplificación del gen <i>rolB</i> en raíces de mezquite y frijol	41

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos para <i>rolB</i> y <i>virD</i>	24
Tabla 2. Resultados del análisis BLAST: Raíces con <i>A. rhizogenes</i>	38
Tabla 3. Resultados del análisis BLAST: raíces Control	39
Tabla 4. Resultados del análisis BLAST para proteínas	40
Grafico 1. Porcentaje de biomasa peso húmedo	29
Grafico 2. Longitud	30
Grafico 3. Número de brotes	31
Grafico 4. Área foliar	32

RESUMEN

El mezquite (*Prosopis laevigata*) es un recurso natural importante para poblaciones de zonas áridas del país ya que todas las partes que lo constituyen (madera, semillas, raíces), lo convierten en un recurso natural importante como alimento humano y del ganado, tiene un uso medicinal, agropecuario, artesanal y combustible. Por esto, en muchas áreas del país su densidad poblacional se ha visto reducida severamente y la sobre explotación de este recurso es causante de la deforestación y una irreversible pérdida de diversidad genética por lo que es necesario realizar un uso adecuado, manejo y propagación para la conservación del mezquite. Debido las dificultades y prolongado tiempo que se requiere para la propagación *in vitro* y el enraizamiento del mezquite, en este trabajo se evaluó la transformación de sus raíces con *Agrobacterium rhizogenes* K599 en adición de AIB en dosis mínimas de 3 PPM para así inducir y mejorar la formación *in vitro* de sus raíces. Cien plántulas de mezquite de 2 semanas de edad a las que se les corto la raíz se dividieron en 4 lotes: A) Control, B) *A. rhizogenes*, C) AIB 3 ppm, D) *A. rhizogenes* + AIB 3 ppm. Tras 2 meses posteriores al inicio del tratamiento se registraron los parámetros morfológicos, biomasa, longitud de raíces, área foliar y se corroboró la transformación de las raíces mediante la amplificación y secuenciación del gen *rolB*. El tratamiento que mejores resultados mostro respecto al control, para los parámetros enraizamiento, biomasa, longitud y número de primordios fue el correspondiente al lote D, donde la combinación de la bacteria y AIB 3PPM mostró un 100% de enraizamiento y obtuvo 427% más biomasa, desarrollo 287% más longitud y 475% más primordios. Seguido por los tratamientos del lote B y C, en donde a pesar de las altas tasas de enraizamiento, biomasa y longitud obtenidas, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos que utilizaron en forma separada la inducción mediada por *A. rhizogenes* o por auxina exógena. Mediante una extracción de ADN en las raíces tratadas con la bacteria se encontró una secuencia con un 100% de identidad al gen *rolB* de *A. rhizogenes*. Sin embargo a pesar de descartar la contaminación residual en el Control, se obtuvo una secuencia con solo dos cambios de bases a lo largo ésta con una identidad del 99% con una región del plásmido Ri de *A. rhizogenes*.

INTRODUCCIÓN

Generalidades del Mezquite

Las especies del género *Prosopis* son conocidas comúnmente con el nombre de mezquites y tienen una distribución amplia que va desde Asia y África y se extiende por América desde Estados Unidos hasta Argentina. En nuestro continente es un género característico de zonas xerofítico-secas (Antezana, *et al.*, 2000). En México, el mezquite (*Prosopis laevigata*) es un árbol endémico que forma parte de la flora en zonas áridas y se clasifica dentro del tipo de vegetación de “matorral mediano espinoso o bosque caducifolio espinoso” y sus comunidades son frecuentemente llamadas mezquiales (Rzedowski, 2001).

Este árbol pertenece a la familia de las leguminosas y puede alcanzar hasta los 12 metros de altura, su corteza es gruesa y de color café, sus ramas son glabras con espinas, las hojas son bipinnadas, cada una con 10 a 20 pares. Sus flores son de color amarillo y su fruto es una vaina dura de color café amarillento (Rojas, 2007).

Éste se encuentra principalmente en la vertiente del pacífico desde Michoacán hasta Oaxaca y en la del Golfo de México en Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz y en las regiones centrales de altura del país hasta los 2,300 m. Preponderantemente en San Luis Potosí, Guanajuato, Zacatecas, Durango, Coahuila e Hidalgo (Gómez *et al.*, 1970). Pero *P. laevigata* también es muy abundante en el valle de Tehuacán-Cuicatlán Puebla (Arias *et al.*, 2000).

El nombre mezquite proviene de la palabra azteca de origen náhuatl para nombrar árbol “misquiti”. Quizá el primer español que hablara del uso del mezquite por los indios fue el explorador Alvar Núñez Cabeza de Vaca, al reseñar la exploración que hiciera Pánfilo de Narváez a Florida en 1528 a 1536 junto con tres compañeros que viajaron cautivos a través de Texas y a lo largo del Golfo por la parte de Texas con las tribus de indios del suroeste (Villa y Bórquez, 2006).

Importancia

Las comunidades de mezquite juegan un papel importante en el mantenimiento del balance ecológico en ecosistemas áridos, proveyendo refugio y comida a una amplia variedad de animales (Mares *et al.*, 1977). Además este árbol funge como nodriza de algunas especies de cactáceas como *Neobuxbaumia tetetzo*. La relación entre estas dos plantas es considerada esencial para el desarrollo de la cactácea, ya que gracias al nodrizaje la supervivencia de plántulas de *N. tetetzo* es mayor dado que *P. laevigata* confiere condiciones ambientales ventajosas como menor radiación solar, temperatura, evaporación del suelo y mayor disponibilidad de nitrógeno (Santiago, 2003). Además, el mezquite forma islas de recursos y actúa como indicador de profundidad del manto freático (Cervantes, 2002), forma parte del equilibrio ecológico de los desiertos mexicanos ya que cuenta con un sistema de raíces profundas, que participan en la conservación del suelo y del agua. Además por ser una leguminosa, contribuye a la adición de nitrógeno al suelo (Orozco, 1996).

El mezquite es considerado como un recurso natural importante para algunas poblaciones de las zonas áridas y semiáridas, ya que sus hojas y vainas sirven de alimento para el ganado y la alimentación humana. De la corteza se extraen curtientes, la madera es utilizada para duela, madera aserrada, mangos de herramientas, hormas para zapatos, extracción de gomas y taninos. En la medicina tradicional se utiliza como vomitivo y purgante, la resina se ha empleado como tratamiento de disentería y algunas afecciones de los ojos (Gómez, 1970; Pennington *et al.*, 1998). En el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, la leña representa una fuente importante de energía doméstica, ya que 36% de la población la utiliza como único combustible, 44% utiliza leña y gas y sólo 20% utiliza gas únicamente (Arias *et al.*, 2000; García y Tapia, 2007).

Debido a esto, en muchas áreas del país la densidad poblacional del mezquite se ha visto reducida severamente, la sobre explotación de este recurso es causante de la deforestación y una irreversible pérdida de diversidad genética (Buendía *et*

al., 2005). Además a este árbol se le considera como una especie indeseable ya que compete con especies forrajeras que crecen en las regiones áridas. A principios de los años cuarenta, bajo el concepto de pastizal puro, los ganaderos empezaron a ver en el mezquite una plaga que debía ser eliminada de los pastizales en los que criaban a su ganado y junto con la expansión urbana provocó la destrucción de muchos mezquiales (Zepeda *et al.*, 1999). Debido a estas razones es necesario realizar un uso adecuado, manejo y propagación para la conservación del mezquite. En planes de un uso sustentable, es importante seleccionar individuos elite, propagarlos y establecer plantaciones de estos individuos para así evitar la disminución del recurso (Buendía *et al.*, 2005).

En 1964, la Food and Agriculture Organization (FAO) sugirió el uso del mezquite para la reforestación de zonas áridas y semiáridas (Goor, 1964). En 1979, esta organización inició el proyecto de exploración, colección, evaluación, conservación y utilización de varias especies de árboles para usos múltiples, dando prioridad al género *Prosopis* (Ffolliot *et al.*, 1983). Sin embargo, el cultivo de una gran variedad de especies arbóreas de importancia económica requiere de tiempos prolongados debido a que por lo general el ciclo de vida de éstos es muy largo (Jones, 1983), y la propagación sexual es la vía más común de obtener nuevos ejemplares de algunas especies del genero *Prosopis* en viveros, pero lamentablemente muchas características forestales deseadas se pierden de esta manera (Caro *et al.*, 2000).

Propagación

La propagación vegetativa de material juvenil es fácil en la mayoría de las especies arbóreas, pero el enraizamiento se vuelve más difícil con el incremento de la edad como lo es el caso del mezquite, pero dentro de un mismo árbol existen zonas que mantienen más tiempo la juvenilidad y pueden ser estimulados a para la producción de material vegetativo fisiológicamente juvenil (White *et al.*, 2007). Dentro de las hormonas reguladoras de crecimiento, se encuentran las auxinas que son las que presentan mayores efectos en la formación de raíces adventicias, siendo las hojas jóvenes y yemas activas, la principal fuente de auxinas

endógenas, que permiten la rizogénesis en ausencia de auxina exógena resultando más efectivas en la inducción rizogénica que la auxina natural (Hartmann *et al.*, 1997).

Se presenta entonces la alternativa de micropropagación como técnica capaz de conservar las características deseables de individuos seleccionados por sus características fenotípicas. La micropropagación de los individuos seleccionados posibilitaría entonces una propagación vegetativa con rápida ganancia de caracteres génicos deseables en programas de mejoramiento forestal (Caro *et al.*, 2002).

Empleando técnicas de cultivo de tejidos, propias de plantas herbáceas para la propagación vegetativa se han logrado obtener buenos resultados para este mismo fin con especies maderables (Jones, 1983). Las técnicas de propagación masiva de diferentes especies con interés comercial, biotecnológico y ecológico ofrecen ventajas con respecto a las convencionales.

El cultivo de tejidos vegetales ofrece alternativas importantes en cuanto a la propagación de materiales seleccionados, pudiendo obtenerse características genéticas homogéneas, evitar la diseminación de patógenos presentes en el suelo y producir masivamente las plantas requeridas. Comparando la micropropagación con las técnicas de propagación tradicional, se tiene la ventaja de que se puede obtener un mayor número de plantas en menor tiempo y espacio a manera de un proceso continuo que no se ve afectado por las variaciones ambientales y estacionales (Bergmann *et al.*, 1994). Dentro de este contexto, estas técnicas ofrecen una alternativa real de micropropagación para una planta como *P. laevigata* (Orozco, 1996), la cual tiene prácticamente un uso generalizado de todas las partes que lo constituyen (madera, semillas, raíces, etc.), lo que la convierte en un recurso natural muy importante como combustible, medicinal, alimenticio, artesanal, agropecuario, etc. (García *et al.*, 1986).

Transformación de raíces mediada por *Agrobacterium rhizogenes*

La transformación genética de especies vegetales es un mecanismo que hoy día es ampliamente utilizado dentro del campo del fitomejoramiento ya que este sistema permite insertar genes foráneos dentro de un tejido vegetal para la creación de plantas genéticamente modificadas, conocidas también como plantas transgénicas (Potrykus *et al.*, 1998). Una alternativa, para tratar de resolver el lento crecimiento y reproducción masiva de algunas especies es la transformación genética mediada por la bacteria de *Agrobacterium rhizogenes* (Rodríguez, 2002), que confiere a las plantas transformadas ventajas tales como crecimiento acelerado e indefinido, no requieren la aplicación exógena de auxinas, son más sensibles a los reguladores del crecimiento, crecen más rápido y se pueden mantener creciendo indefinidamente, incluso en especies que normalmente no lo hacían (Tiwari y Adholeya, 2002).

A. rhizogenes es una bacteria que se encuentra en el suelo es Gram negativa, fitopatógena causante de la enfermedad en raíces de plantas dicotiledóneas, llamada “hairy roots” (Figura 1) o raíces en cabellera (Zupan *et al.*, 1995; Nilsson *et al.*, 1997). Esta enfermedad da lugar a la proliferación anormal de las raíces en plantas infectadas y un incremento notable en la producción de pelos radicales (Dandekar, 1992).

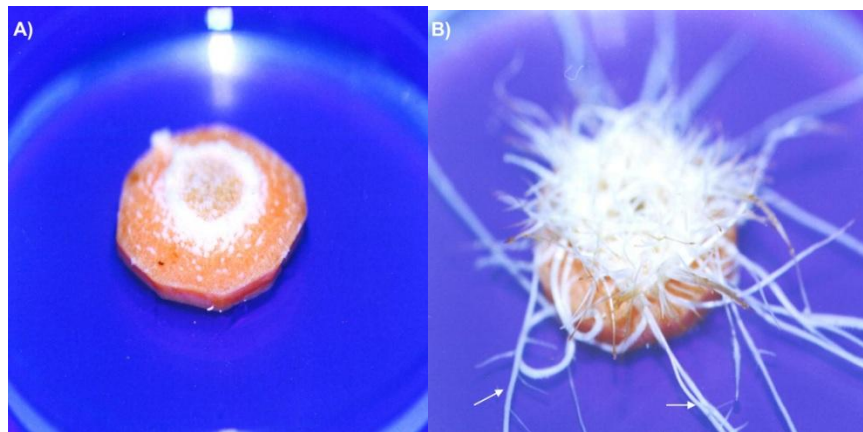


Figura 1. Raíces de zanahoria transformadas con *A. rhizogenes*. A) Formación de callos después de dos semanas del co-cultivo. B) Producción de raíces tras cuatro semanas de co-cultivo (Gómez, 2010).

Este desarrollo anormal de las raíces en las plantas infectadas se debe a la transferencia, integración y expresión de un segmento del ADN bacteriano (T-ADN), el plásmido Ri (Root inducing) (Christey, 2001). El plásmido Ri contiene entre otros genes, los implicados en la síntesis de auxinas (Rodríguez, 2002), y otros 4 tipos de compuestos de carbono de bajo peso molecular llamadas opinas (agropina, manopina, cucumopina y mikimopina) (Savka *et al.*, 1990). Como consecuencia de ese desbalance hormonal, las células transformadas proliferan desordenadamente y la expresión de los genes conducen a la producción de raíces en cabellera en la región donde se produjo infección (Rivas, 2007).

El plásmido Ri de *A. rhizogenes* contiene dos regiones (en cepas del tipo agropina): la región T-ADN_L (izquierda) la cual contiene 18 marcos de lectura abierta, de los cuales el 10, 11, 12 y 15 corresponden a los llamados genes *rolA*, B, C y D. Estos genes son los responsables de la enfermedad conocida como raíz en cabellera, además de incrementar la respuesta a reguladores de crecimiento por parte de los tejidos transformados, y la región T-ADN_R (derecha) la cual porta los genes para la biosíntesis y catabolismo de la agropina, y dos genes en los loci Tms para la sobreproducción de auxinas (Van der Salm *et al.*, 1996).

El gen *rolB* aumenta la "sensibilidad" a las auxinas en las plantas transformadas, por lo que es este gen es el responsable de la formación de la raíz pilosa. El producto del gen *rolB* tiene la capacidad de liberar auxinas por medio de la hidrólisis de: complejos auxinas-proteínas (se libera triptófano), conjugados auxinas-aminoácidos (aspártico y glutámico) y glucósidos auxinas-azúcares (Inositol, d- glucanasa y arabinasa) con actividad de indoxil-β-glucosidasa (Stomp, 1992). La expresión del gen *rolB* bajo el control de su propio promotor se da de manera preferencial, en los ápices y regiones de mayor división celular de la raíz. En órganos maduros la expresión del gen *rolB* se da en el tejido vascular (Tempé, 1989).

Para que el proceso de transferencia del T-ADN a la célula vegetal tenga lugar (Figura 2) es necesario que la planta hospedera tenga una herida y las células vegetales dañadas (las cuales son consideradas como inductoras de la respuesta de virulencia) sintetizen una serie de compuestos que inducen la expresión de los genes *vir* (Bolton *et al.*, 1986). Se trata de derivados de aminoácidos, azúcares y una serie de compuestos derivados del metabolismo del fenilpropanóico y una serie de metabolitos secundarios que producen las células dañadas (Aird *et al.*, 1988). La región *vir* contiene aproximadamente 25 genes, que codifican proteínas que promueven la transferencia de otra región del plásmido *Ri* de la bacteria hacia la célula infectada y se integra en forma estable al genoma vegetal (Rivas, 2007). La inducción de los genes *vir* de *Agrobacterium* implica que el sistema de reconocimiento de la bacteria detecte los compuestos fenólicos producidos por la planta y transmita la información al interior de la célula bacteriana. El sistema de dos componentes (*virA* - *virG*) de *Agrobacterium*, percibe señales específicas, donde *virG* es activado e induce la transcripción de la región *vir* del plásmido, generándose una copia móvil del T-ADN y la formación del complejo transportado por *virB* - *virD4* y la transferencia de la cadena T hacia la célula hospedera, formándose la cadena T madura. Posteriormente, el complejo T es importado hacia el núcleo, facilitado por proteínas del mismo hospedero, para su posterior integración en el genoma de la célula hospedera, mediada por *virD2* o *virE2* y otros factores de la célula hospedera (Tzfira, 2002).

Las células transformadas de la raíz biosintetizan su propio ácido indolacético (AIA), lo cual permite a las raíces tener una tasa de crecimiento mayor respecto a las raíces normales, debido principalmente a su gran capacidad de ramificación, demás tienen la cualidad de crecer *in vitro* en ausencia de reguladores de crecimiento exógenos. A partir de las raíces transformadas es posible obtener plantas transgénicas completas que son al igual de las raíces que derivan, genéticamente estables (Benítez, 2005), debido a que las raíces transformadas serían usadas como explantes para la regeneración de brotes transgénicos por la vía de la organogénesis (Christey, 2001).

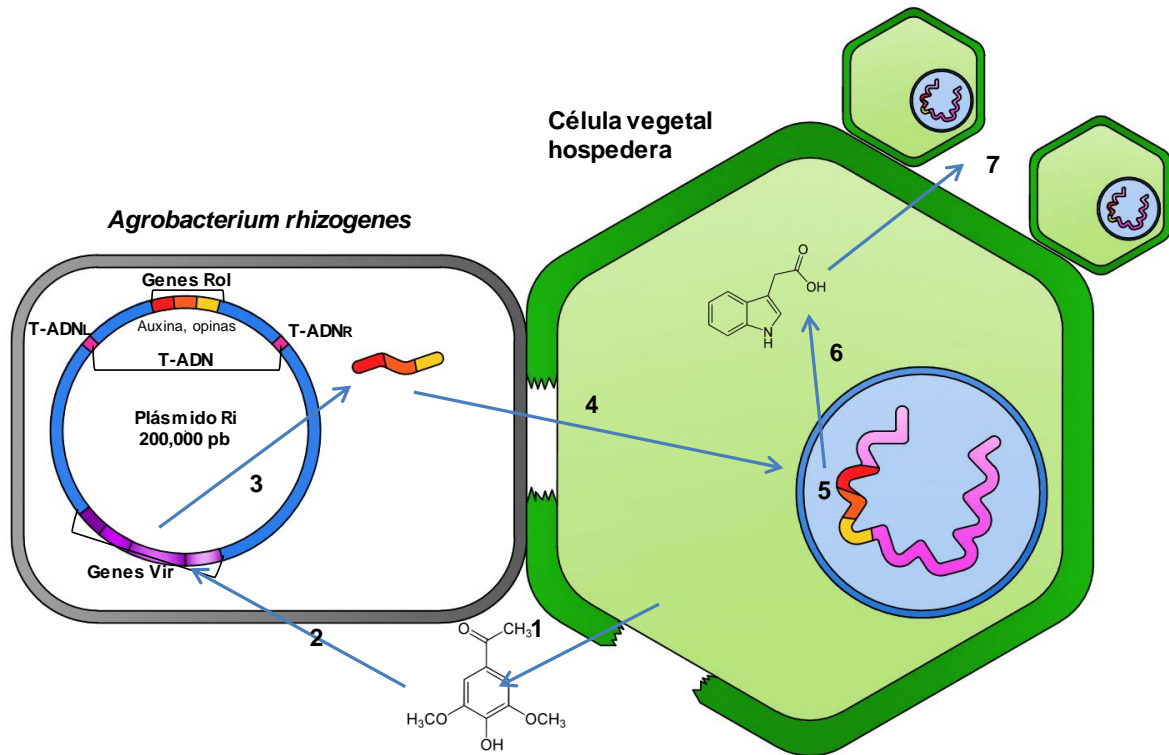


Figura 2. Mecanismo de acción de *A. rhizogenes*: 1-Las heridas en la célula vegetal liberan azúcares y metabolitos; 2-Los azúcares y compuestos fenólicos como acetosiringona activan los genes *vir*; 3-Genes *vir* sintetizan una cadena sencilla de T-ADN con los genes *rol*; 4-Transferencia de T-ADN; 5-El complejo de T-ADN se importa e integra al ADN de la célula hospedera; 6-Síntesis de Auxinas y Opinas; 7-Auxinas y Opinas promueven la síntesis de "hairy roots" en células infectadas con *A. rhizogenes*. (Modificado de Stanton, 2003).

La transformación mediada por *A. rhizogenes* se ha convertido en una importante herramienta en la industria biotecnológica de plantas, puesto ha permitido acelerar la velocidad de transferencia de nuevos caracteres a especies en las que, como ocurría con las arbóreas, los programas de mejora tradicional se veían entorpecidos debido al prolongado periodo de tiempo necesario para la regeneración de plantas adultas aptas para la reproducción (Benítez, 2005).

La alta tasa de transformación de raíces de ésta bacteria ha permitido que la producción de plantas compuestas (plantas en las que las células de la raíz están transformadas por el gen de interés pero no así la parte aérea) tanto de manera *in vitro* y *ex vitro* sea una herramienta útil para investigar funciones de algunos genes en la raíz (Crane *et al.*, 2006).

Las raíces transformadas han tenido un papel muy importante durante muchos años en la agricultura, el comercio y el ámbito científico. Por ejemplo, cultivos de raíces han sido extensamente usados en la nodulación de raíces (Quandt *et al.*, 1993), producción artificial de semillas (Uozumi *et al.*, 1997), como sistemas para estudiar rutas bioquímicas (Braun *et al.*, 2002), las respuestas a diferentes productos químicos (Downs *et al.*, 1994), estudiar interacciones con otros organismos como nematodos (Mugnier *et al.*, 1997), han proporcionado beneficios en la producción de metabolitos secundarios que incluyen terpenos, alcaloides, antocianinas y polifenoles (Xie *et al.*, 2000) y sobre todo en la asociación simbiótica e interacción con hongos micorrizicos arbusculares (HMA) (Estrada *et al.*, 2006). Al modelo de colonización *in vitro* en medios gelificados, en donde se encuentran creciendo en forma dual una raíz y un HMA, es a lo que se le conoce como Cultivos monoxénicos (Hildebrandt *et al.*, 2002).

La transformación de raíces mediada por *A. rhizogenes* ha sido descrita para un gran número de leguminosas tales como *Lotus corniculatus* (Petit *et al.*, 1987), *Trifolium repens*, (Díaz *et al.*, 1989), *Trifolium pratense* (Díaz *et al.*, 2000), *Vigna aconitifolia* (Lee *et al.*, 1993), *Glycine max* (Cheon *et al.*, 1993), *Vicia hirsuta* (Quandt *et al.*, 1993), *Lotus japonicus* (Stiller *et al.*, 1997), *Medicago truncatula* (Boisson-Dernier *et al.*, 2001), *Sesbania rostrata* (Van de Velde *et al.*, 2003) y varias especies de *Phaseolus* (Estrada *et al.*, 2006). Algunas de estas han sido el centro primario para el mejoramiento de la información y los recursos genéticos iniciando estudios genómicos debido a que a nivel mundial tienen una importancia económica. Además, la infección con *A. rhizogenes* puede mejorar el enraizamiento de especies leñosas recalcitrantes (Damiano *et al.*, 1998). Usando diferentes cepas de *Agrobacterium*, diversos autores han logrado enraizamientos exitosos en especies tales como *Pinus*, *Larix*, *Eucalyptus* (McAfee *et al.*, 1993).

La propagación asexual de especies leguminosas leñosas, en particular la de género *Prosopis* ha llegado a ser difícil y errática debido a factores tales como la variabilidad en intensidad de luz, temperatura, las diferencias entre juveniles o

adultos, adición de hormonas exógenas y enfermedades (Felker *et al.*, 2005). Sin embargo la propagación vegetativa es factible en diversas especies de mezquite (Felker, 1998). Mediante esquejes, acodo y distintos tipos de injerto son tratadas con hormonas promotoras del enraizamiento como el ácido 3-indolbutírico (AIB) obteniendo buenos resultados a 100 ppm (Olvera, 2006), 6000 mg/l y el ácido naftalenacético (ANA) 9000 mg/l que han dado resultados satisfactorios en condiciones de ambiente controlado (Osuna *et al.*, 2003).

Debido a que en la propagación vegetativa con hormonas usan grandes cantidades de éstas, el efecto de enraizamiento podría verse disminuido o inhibido por la propia maquinaria enzimática de la planta, la enzima ácido Indolacético - oxidasa (AIA- ox), que degrada parte de estas hormonas tal como Riov y Epstein (1998) demostraron que las velocidades de degradación para AIA y AIB son similares *en Phaseolus mungo*. Esto debido a un posible proceso de conversión de AIB a AIA (Woodward *et al.*, 2005).

ANTECEDENTES

Con el fin de optimizar la transformación de raíces, Blanco y colaboradores (2003) inocularon con *A. rhizogenes* A4TC secciones de zanahoria co-cultivadas con acetosiringona y floroglucinol y una combinación de ambos, mostrando una mayor eficiencia en la transformación (75%) con el tratamiento de acetosiringona 100 mM en combinación con floroglucinol 25 mg/L a los 6 días de co-cultivo.

Mugnier y Mosse (1987) aprovecharon las características de *A. rhizogenes*, para formar raíces pilosas de *Daucus carota* L. Las raíces de las plantas infectadas presentaron un desarrollo indefinido, además del incremento a la sensibilidad de los tejidos transformados a los reguladores del crecimiento. Las raíces transformadas de zanahoria fueron utilizadas como hospedero de *Glomus mosseae* y *Gigaspora*.

Chávez y colaboradores (2003), regeneraron plantas transgénicas de *Citrus aurantium* L. a partir de raíces transformadas con *A. rhizogenes* cepa A4 con el plásmido ESC4, el cual lleva el gen marcador de selección *nptII* bajo el control del promotor y terminador *nos* y el gen reportero de *gus* bajo el control del promotor *cab* y el terminador *ocs*. Para obtener las raíces transformadas se co-cultivaron, por 96 h, segmentos internodales de tallo de plántulas germinadas *in vitro*, así el 91% de los explantes produjeron raíces transformadas. Para la regeneración de brotes se cultivaron segmentos de raíz transformada en medio con 5.0 mg/l de benciladenina y 1.0 mg/l de ácido naftalenacético (ANA) donde el 18% de los segmentos de raíz transformada produjeron brotes adventicios.

Mora y López (2010) inocularon plántulas de *Phaseolus vulgaris* con la cepa *A. rhizogenes* K599. Estas plántulas inoculadas desarrollaron raíces aéreas transformadas en el sitio de la inoculación con la bacteria. Las plantas con las raíces transformadas fueron trasplantadas para ser usadas como modelos de propagación de *Glomus intraradices*.

McAfee y colaboradores (1993) indujeron el enraizamiento *in vitro* de *Pinus monticola* Dougl. usando *A. rhizogenes*, con lo cual obtuvieron vástagos maduros con 85% de enraizamiento después de ocho semanas de co-cultivo con *A. rhizogenes* cepa A4 mas dosis de ANA 0.3 μM + AIA 1mg/ml

Rodríguez (2002), inoculando el tallo de *Agave salmiana* Otto., con *A. rhizogenes* a una concentración de $1 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ y 200 μM de acetosiringona, obtuvo un 63 % de raíces transformadas a los 25 días posteriores a la inoculación. Esta raíces fueron colonizadas en un 70% por HMA de *Glomus intraradices* con lo cual se logró la recuperación de esporas hijas.

Estada y colaboradores (2006), emplearon *A. rhizogenes* cepa K599 para transformar raíces de *P. vulgaris* L., *P. coccineus*, *P. lunatus*, y *P. acutifolius*, con el fin de establecer programas genómicos funcionales en la fisiología de raíces, metabolismo e interacciones microbianas en las mismas. A las tres semanas de post infección con *A. rhizogenes* se formaron raíces robustas y de crecimiento rápido con una tasa de transformación de 75 y 90% ya que todas las especies formaron raíces transformadas. Estas raíces fueron inoculadas con *Rhizobium tropici* las cuales formaron nódulos de manera normal para fijar nitrógeno eficientemente.

Felker y colaboradores (2005), realizaron un estudio para mejorar el enraizamiento de *Prosopis alba* de 1 a 21 años de edad y clones de 4 años, usaron a *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas aurantiaca* y *A. rhizogenes* cepa Tiger 232 como promotores del enraizamiento en esta especie, siendo *A. rhizogenes* Tiger 232 quien mostró los resultados más consistentes. En adicción con AIB 9000 mg/l, ANA 800 mg/l y tiamina HCl a temperaturas de 33°C se obtuvo un porcentaje de enraizamiento del 80% en *P. alba* de 21 años de edad. En contraste, solo se obtuvo 50% de enraizamiento en los clones de 4 años de edad.

Caro y colaboradores (2000), evaluaron la efectividad de la cepa LBA 9402 de *A. rhizogenes* en presencia o ausencia de AIB 3 ppm para mejorar el enraizamiento en segmentos unicodales de *Prosopis chilensis* de un mes de edad. Sus resultados muestran que el porcentaje de enraizamiento y el número de raíces primarias por explante fue superior en el tratamiento *A. rhizogenes* + AIB 3ppm, llegando al 100%. El tratamiento de segmentos inoculados produjo un número de raíces por explante significativamente mayor y con un peso seco significativamente también mayor en comparación a los segmentos no inoculados con lo que concluyen que los tratamientos con *A. rhizogenes* resultaron en una mejor respuesta al enraizamiento.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de los amplios estudios sobre transformación de raíces con *A. rhizogenes* en varias especies de interés comercial como tabaco y zanahoria, poco se sabe de estudios en especies forestales y silvestres como el mezquite. Las leguminosas recalcitrantes son notoriamente difíciles para regenerar y transformar por lo que aún no se ha establecido un protocolo eficiente que permita la transformación genética del mezquite. Dada la importancia económica, ecológica así como la problemática ante las dificultades y prolongado tiempo que se requiere para la propagación *in vitro* de *P. laevigata*, se plantea entonces la opción de transformación de sus raíces usando como vector el plásmido Ri de *A. rhizogenes*, las cuales servirán posteriormente para el establecimiento de cultivos *in vitro* de raíces como una alternativa para llevar a cabo diferentes estudios como los implicados en el proceso de rizogénesis, estudios relacionados con diferentes tipos de estrés abiótico, producción de metabolitos secundarios, cultivos monoxénicos con HMA y nodulación con *Rhizobium*, los cuales proporcionen información para el mantenimiento y fitomejoramiento de esta especie.

Dada esta problemática se plantean la siguiente hipótesis:

Debido a la patogenicidad de *A. rhizogenes*, la inoculación en la zona de infección de la raíz en *P. laevigata* promoverá la incorporación del plásmido Ri de *A. rhizogenes* al genoma del mezquite lo cual incrementará la producción de auxinas, opinas y citocininas expresando el fenotipo de la enfermedad raíces en cabellera las cuales estarán transformadas y contendrán el gen *rolB*.

Para realizar esta investigación se plantearon los siguientes objetivos:

General:

- Estandarizar un método para la transformación de las raíces en mezquite (*Prosopis laevigata*) mediante *Agrobacterium rhizogenes* K599.

Particulares:

- Transformar raíces de mezquite mediante *A. rhizogenes* K599.
- Inducir la rizogénesis del mezquite mediante dosis mínimas de ácido 3-indolbutírico.
- Comparar la rizogénesis de ambos tratamientos.
- Identificar el gen *rolB* en las raíces transformadas.
- Establecer un cultivo *in vitro* de las raíces transformadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Las semillas de *P. laevigata* utilizadas fueron colectadas en el poblado de San Martín, en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla el mes de julio del año 2008. 100 semillas se desinfectaron colocándolas en benomilo al 50% durante dos días, posteriormente se eliminó el fungicida con agua destilada estéril para después sumergirlas en alcohol a 96° durante dos minutos. Hecho esto, las 100 semillas se escarificaron con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) durante 15 minutos, transcurrido este periodo se neutralizó el ácido con bicarbonato de sodio. Para eliminar los residuos se lavaron con agua destilada estéril por una hora y se colocaron en imbibición durante 1 día. Pasado este tiempo, las semillas se colocaron en cajas Petri con papel filtro estéril y 4 ml de agua para su germinación durante 2 semanas en una cámara de crecimiento con fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad a una temperatura de 25°C.

Cultivo de *A. rhizogenes*

Para llevar a cabo la transformación de las raíces se utilizó *A. rhizogenes* cepa K599 donada por la Dra. Georgina Hernández del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM. Esta cepa silvestre del tipo cucumopina solo tiene un fragmento del T-ADN en el plásmido Ri (Combard *et al.*, 1987), es resistente a estreptomycin y cloranfenicol pero es susceptible a kanamicina y estreptomycin (Taylor *et al.*, 2006). Debido a su capacidad para inducir eficientemente raíces en cabellera en una amplia variedad de especies, esta sepa se ha convertido en la elección de muchos laboratorios para establecer protocolos eficientes de transformación.

Para mantener la bacteria activa se resembró en medio YEB sólido suplementado con rifampicina 50 mg L⁻¹ a 27°C (Anexo 1). Una vez activa la bacteria se resembró en medio YEB líquido suplementado con rifampicina 50 mg L⁻¹ a 27°C (Anexo 1) manteniéndose en agitación constante durante 2 días hasta obtener una lectura de densidad óptica a 600 nm.

Transformación de raíces

Transcurridas las 2 semanas de germinación del mezquite, las 100 plántulas se dividieron en 4 lotes con 25 individuos cada uno. Cada lote fue sometido a un tratamiento con *A. rhizogenes* con o sin la adición de AIB 3 ppm quedando de la siguiente manera: lote A) Control, lote B) *A. rhizogenes*, lote C) AIB 3 ppm, lote D) *A. rhizogenes* + AIB 3 ppm. Bajo condiciones de esterilidad, a todas las plántulas de cada lote se les corto la raíz lo más cercano posible al tallo. La adición exógena del AIB 3ppm para los lotes C y D fue mediante inmersión de la parte de la herida (corte de la raíz) en esta solución durante 1 minuto. La inoculación de los lotes B y D con *A. rhizogenes* se realizó mediante agroinfiltración, la cual consistió en tomar con una jeringa de 1 ml medio líquido YEB con la bacteria crecida durante 2 días para posteriormente infectar en el área donde se produjo la herida en la plántula de mezquite. Una vez aplicado el tratamiento a cada lote, las plántulas se transfirieron a cajas Petri que contenían medio Mínimo "M" (Bécard y Fortín, 1988) (Anexo 2) colocando un máximo de 5 plántulas por caja. Las cajas se mantuvieron dentro de bolsas negras de plástico para protegerlas de la luz y trasladarlas al cuarto de crecimiento a una temperatura de 27°C durante 2 días.

Transcurridos los 2 días de co-cultivo en medio M, las plántulas fueron desinfectadas para eliminar por completo a la bacteria y evitar otro tipo de contaminación enjuagándolas con agua destilada estéril y una solución de Tween 80 al 0.1% por 1 minuto, cloro 3% durante 1 minuto y una solución de rifampicina 50 mg L⁻¹ hasta que estas fueron trasplantadas a vasos de plástico transparentes que contenían 10g de agrolita estéril suplementada con 30ml de solución Hoagland (Anexo 3). Cada vaso contenía 2 plántulas de mezquite al ser trasladadas a la cámara crecimiento con fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad a 27°C durante 2 meses. Durante este tiempo los mezquites fueron regados cada semana con solución nutritiva Hoagland adicionada con Benomilo a 50% (7 g L⁻¹).

Área foliar, longitud de raíces, primordios y biomasa

Al finalizar los 2 meses se seleccionaron aleatoriamente 10 mezquites de cada tratamiento a los cuales se fotografió en un campo estéril la raíz extendida sobre una escala ajustada a 0.5 cm así como el área foliar para posteriormente realizar una medición de la longitud de cada raíz y un conteo de primordios totales de cada raíz y el área foliar con el software informático ImageJ 1.46 (Anexo 4). Una vez fotografiadas las raíces de cada tratamiento, éstas fueron cortadas en el sitio donde se produjo la herida para la inoculación y se pesaron para obtener la biomasa en peso húmedo e inmediatamente se trasladaron a un ultracongelador a -70°C para su conservación y así evitar la desnaturalización de ADN para la verificación de la transformación por pruebas de biología molecular.

Extracción y amplificación del ADN

En base en las secuencias de *A. rhizogenes* del National Center of Biotechnology Information (NCBI) se diseñaron los oligonucleótidos para los genes *rolB* (Referencia NCBI: EF433766.1) (Apéndice 1) y *vir D4* (Referencia NCBI: NC_010841.1) (Apéndice 2), ya que los genes *virD* de *Agrobacterium* no se transfieren al genoma de la planta, este utiliza para descartar la presencia residual de la bacteria en la raíz (Tabla 1).

Nombre		Secuencia	Fragmento esperado
<i>rolB</i>	F	5'GAACTGTGTGATGCCGCAAG 3'	601 pb
	R	3'CACGAGATCTCACAAAAGCCTG 5'	
<i>virD</i>	F	5'CAAAGAGCCTTGGAAACCGTTTTG 3'	486 pb
	R	3'CAAATTCGAATGGTTCAGGGAAAC 5'	

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos para *rolB* y *virD* indicando el fragmento esperando en pares de bases. Marca Invitrogen Custom Primers

Antes de usar los oligonucleótidos directamente en las muestras de las raíces, se realizó una extracción de ADN de *A. rhizogenes* crecido en medio YEB líquido durante 2 días (Anexo 5) para comprobar que los cebadores amplificaran las

regiones específicas esperadas. La temperatura de alineamiento óptima para ambos oligonucleótidos fue determinada mediante una amplificación con un gradiente de temperatura de 55° a 67°C para *rolB* y 57° a 68°C para *virD*.

Para comprobar la transformación de las raíces de los lotes B y D fueron necesarios análisis de biología molecular con los cuales se buscó un fragmento del gen *rolB* en el ADN de la raíz. A partir de 150 mg de raíz macerados en nitrógeno líquido de los lotes A, B y D, se llevó a cabo la extracción del ADN con el kit ZR Plant/Seed ADN Kit TM siguiendo el protocolo establecido por el proveedor (Anexo 6). Las muestras de ADN obtenidas fueron mantenidas en un refrigerador a -20°C para su posterior amplificación mediante PCR.

Para cada muestra de ADN obtenida de los lotes A, B y D se realizaron reacciones de PCR para *rolB* y *virD4* en un volumen final de 50µl (25µl de Buffer 2x KAPA plant + dNTPs 1.5 mM Mg 1x, 1.5µl oligo F, 1.5µl oligo R, 16.6µl de agua bidestilada desionizada estéril, Taq polimerasa KAPA 3G 0.4µl, muestra de ADN 5µl).

El programa de amplificación constó de 40 ciclos de 95°C por 10 minutos de precalentamiento, 94°C por 40 segundos de desnaturalización, 67°C (*rolB*) - 68°C (*virD*) por 50 segundos de alineamiento, 72°C por 1:15 minutos de extensión, 72°C por 5 min de extensión final y 4°C ∞ en un termociclador SelectCycler. Thermal Cycler . Los productos de PCR fueron separados por electroforesis a 80 volts en gel de agarosa al 1% (Anexo 7), teñido con bromuro de etidio (1mg/ml) y visualizados en un transiluminador marca Ultra Violet Products White/UV para posteriormente ser fotografiado en un transiluminador con cámara. Todos los productos de PCR fueron secuenciados en un equipo ABI Prism 3100 de 16 capilares en el laboratorio de Bioquímica Molecular de la UBIPRO en la FES-Iztacala. UNAM.

Edición, comparación y alineamiento de las secuencias

Con el software Mega v. 5 se obtuvo la secuencia consenso a partir de las obtenidas por cada muestra, se compararon en el banco de datos del NCBI con la herramienta online BLAST: Basic Local Alignment Search Tool para un análisis de similitud con el cual se obtuvo el nivel de identidad para cada secuencia. Las secuencias se alinearon con la herramienta online ClustalW.

Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos de *A. rhizogenes* y AIB en las raíces y conocer las diferencias entre estos, se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA). Posteriormente para identificar los tratamientos entre los cuales existía diferencia para las medias de cada par posible entre los tratamientos se realizó una prueba de Tukey.

RESULTADOS

Análisis morfológico, porcentaje de enraizamiento

Transcurridos los 2 meses posteriores a la inoculación se realizó un análisis morfológico de 10 raíces seleccionadas por cada lote (Figura 3): En el lote A (Control) solo un 50% de las plántulas formaron raíces nuevas y pequeñas sin lignificación, mientras que el 50% restante solo formó callos en la zona donde se cortó la raíz. El 90% de mezquites del lote B (raíces con *A. rhizogenes*) y lote C (raíces con AIB 3 ppm) formaron raíces nuevas y lignificadas en la zona donde se realizó la infección o donde se agregaron las hormonas. Las raíces de ambos lotes produjeron numerosas ramificaciones a lo largo de la raíz principal. El 100% de las plantas del lote D (raíces con *A. rhizogenes* + AIB 3 ppm) desarrollaron raíces nuevas lignificadas con numerosas ramificaciones a lo largo de la raíz principal.

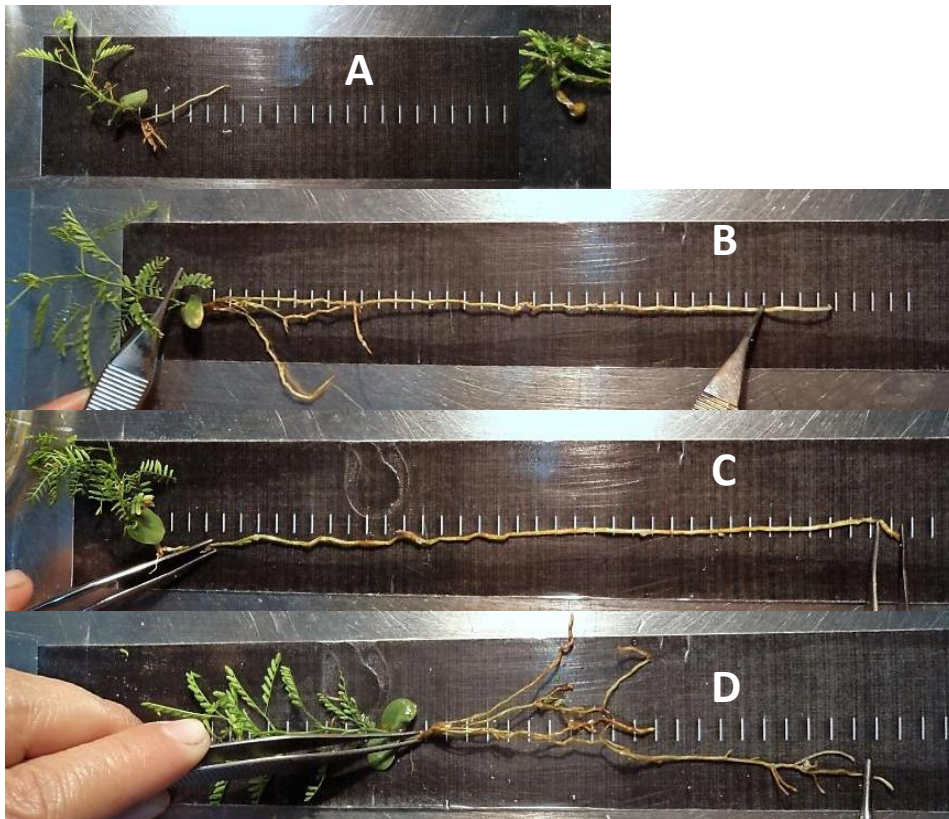


Figura 3. Mezquites tras 2 meses posteriores a la aplicación del tratamiento: A) Control, B) *A. rhizogenes*, C) AIB 3 ppm, D) *A. rhizogenes* + AIB 3 ppm.

Diez plántulas de mezquite de una semana a las que no se le cortó la raíz fueron inoculadas con *A. rhizogenes* a lo largo de la misma mediante una jeringa de 1ml. Transcurridos 2 días de co-cultivo en medio M, estas fueron desinfectadas y transferidas a cajas Petri con medio M suplementado con rifampicina 50 mg L-1 para posteriormente trasladarse a un cuarto de crecimiento en total oscuridad a 27°C. Tras una semana en el cuarto de crecimiento las raíces se fotografiaron en el laboratorio de microscopia de la FES-Iztacala. Los resultados mostraron que el 100% de las raíces inoculadas con *A. rhizogenes* desarrollaron pelos radiculares y primordios a lo largo de sus raíces, los cuales no mostraron ningún tipo de lignificación mientras que grupo Control no mostró formación de pelos radiculares ni primordios a lo largo de la raíz principal (Figura 4).

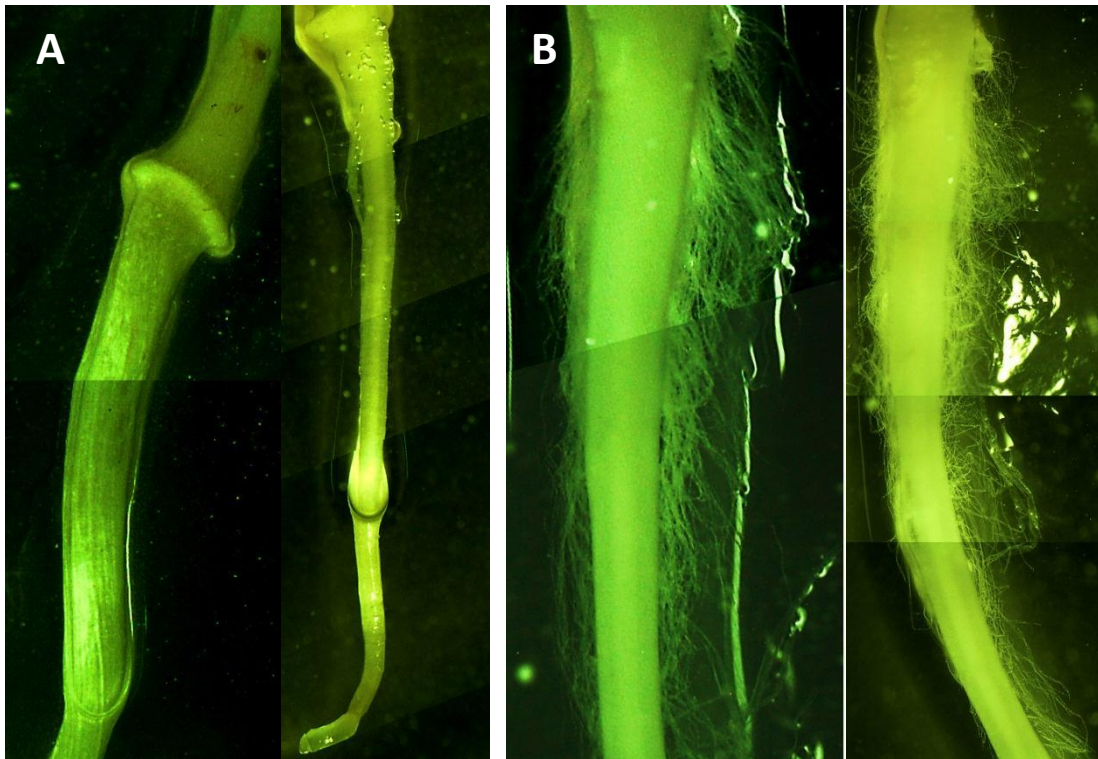


Figura 4. Formación de pelos radicales a 4X: Raíces de Mezquite inoculadas con *A. rhizogenes* en medio M (B), Control en medio M (A).

Biomasa

Las raíces, después de ser fotografiadas y de realizar el análisis morfológico fueron cortadas para determinar la biomasa. Los resultados de biomasa (peso húmedo) de 10 raíces por tratamiento (Grafico 1) revelaron que el lote A, obtuvo un resultado esperado ya que al no ser tratado con la bacteria ni suplementado con hormonas presento un crecimiento mínimo de raíces con 0.1444 g totales, seguido por el lote B que produjo 273% y el lote C con 353% más biomasa con respecto al lote A. El tratamiento que mayor biomasa produjo fue la combinación de *A. rhizogenes* + AIB 3 ppm perteneciente al lote D, el cual cuadruplicó la cantidad obteniendo un 427% más biomasa.

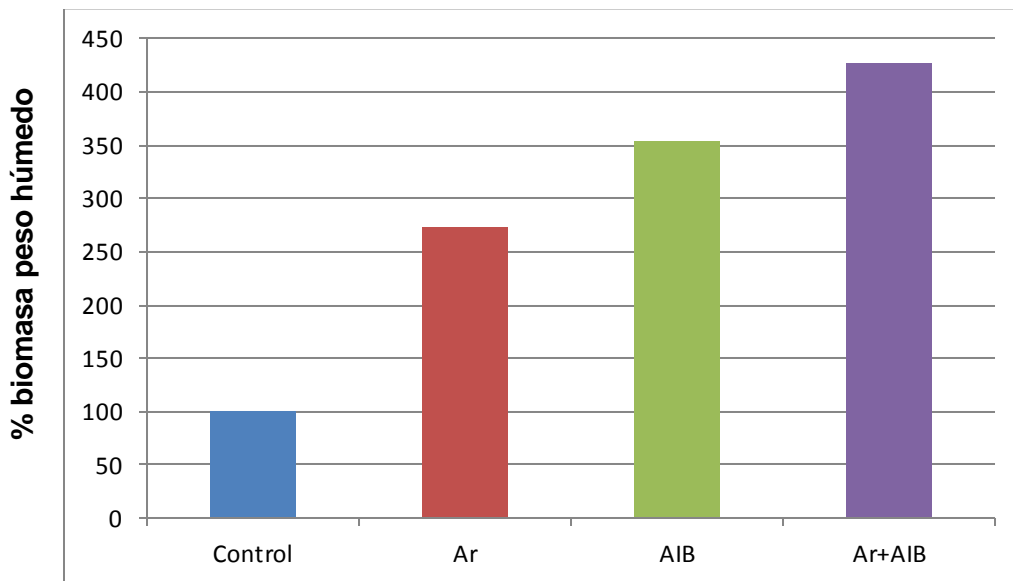


Grafico 1. Porcentaje de biomasa peso húmedo: *A. rhizogenes* (Ar), Acido 3-Indol butírico 3ppm (AIB), *A. rhizogenes* + Acido 3-Indol butírico 3ppm (Ar+AIB). Control.

Longitud de raíces

El análisis de ANOVA de un factor demostró que entre los tratamientos existieron diferencias tanto para los parámetros de longitud, número de brotes y área foliar. Los datos de longitud de las raíces fueron analizados con la prueba de comparación de medias Tukey con una significancia de 0.95 (Apéndice 3) el cual determinó los grupos entre los cuales existió diferencia. La mayor diferencia significativa se presentó en el lote D, donde las plántulas desarrollaron 287% raíces más largas que el lote A, mientras que los lotes C con 245% y B con 219%, estadísticamente no mostraron diferencias significativas entre sí (Grafico 2). El mismo comportamiento fue observado para la biomasa.

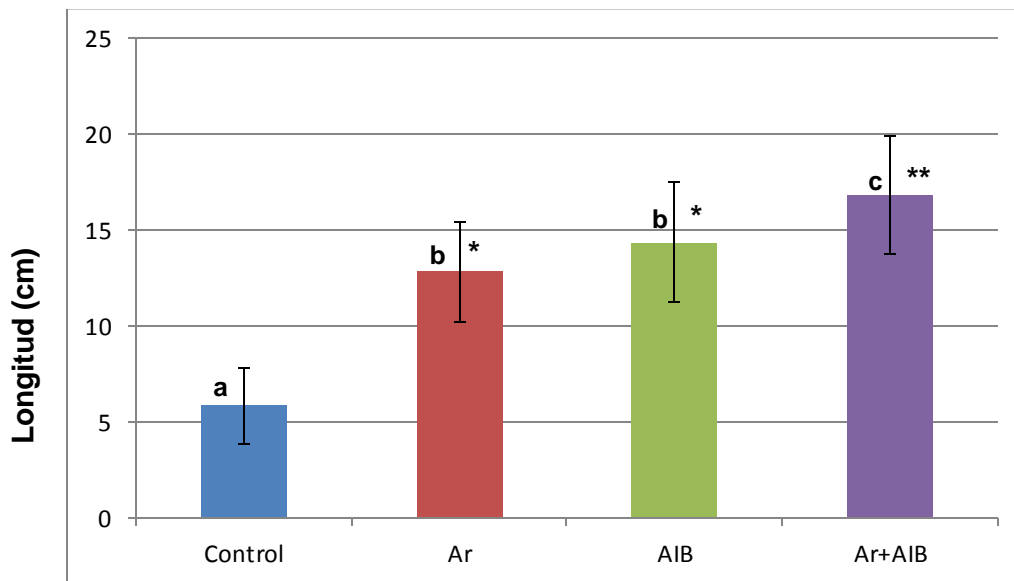


Grafico 2. Longitud: +/- E.E: *A. rhizogenes* (Ar), Acido 3-Indol butírico 3ppm (AIB), *A. rhizogenes* + Acido 3-Indol butírico 3ppm (Ar+AIB), Control. E.E: Error estándar, * :Nivel de significancia

Número de primordios

La cantidad de primordios o brotes en las raíces del lote D fue significativamente mayor (de acuerdo a la comparación de medias Tukey con una significancia de 0.95 (Apéndice 4), con un 475% más primordios respecto al lote A. El lote B con un 300% de brotes y lote C con 287.5% no mostraron diferencias significativas entre sí pero a pesar de esto, el lote B tuvo mayor de primordios que el lote tratado con AIB 3 ppm, Éste parámetro fue el único en donde el tratamiento de *A. rhizogenes* promovió mejores resultados que el AIB 3 ppm (Grafico 3).

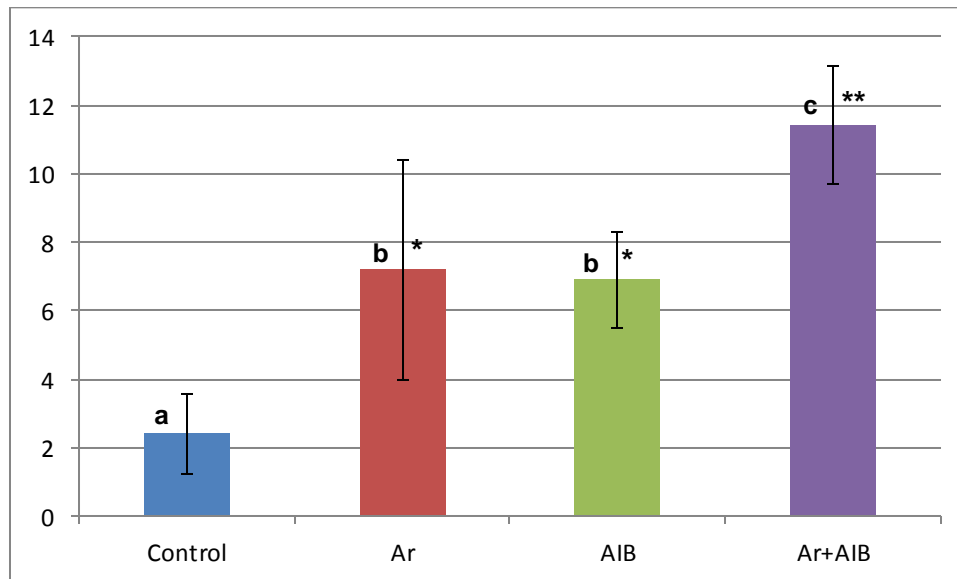


Grafico 3. Número de brotes: +/- E.E: *A. rhizogenes* (Ar) 7.2, Acido 3-Indol butírico 3ppm (AIB) 6.9, *A. rhizogenes* + Acido 3-Indol butírico 3ppm (Ar+AIB) 11.4, Control 2.4. E.E: Error estándar, * :Nivel de significancia

Área foliar

El área foliar fue el parámetro donde la mayor diferencia significativa corresponde al lote C (Apéndice 5). Para este parámetro sin importar la ausencia de raíces en el lote A, el 100% de los mezquites desarrollaron un área foliar mínima. El lote C presentó la mayor área foliar de todos los tratamientos con 188% más con respecto al Control, a pesar de no ser el que mostró la longitud de raíces superior, ni presentar el mayor número de brotes en la raíz. El lote D (área foliar de 153%) que había mostrado mayores diferencias significativas en biomasa, longitud y número de brotes, no mostró ser diferente respecto al lote B tratado con *A. rhizogenes* con un área foliar de 143% (Grafico 4.).

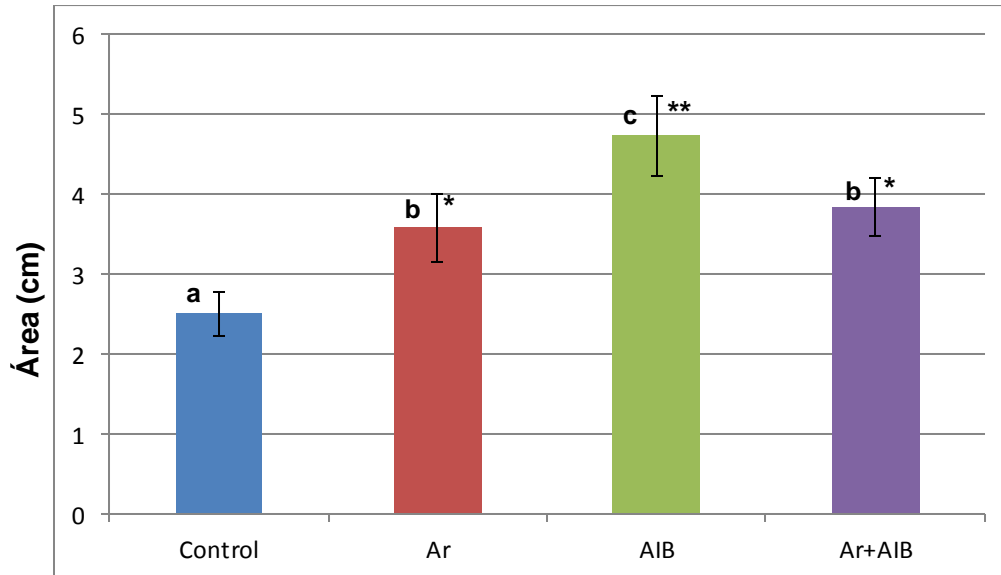


Grafico 4. Area foliar: +/- E.E: *A. rhizogenes* (Ar) 3.58 cm, Acido 3-Indol butírico 3ppm (AIB) 4.73cm, *A. rhizogenes* + Acido 3-Indol butírico 3ppm (Ar+AIB) 3.84 cm, Control 2.51 cm.

E.E: Error estándar, * :Nivel de significancia

Verificación de la transformación por pruebas de biología molecular

El gradiente de temperatura de alineamiento óptima para ambos oligonucleótidos se determinó mediante un gel de agarosa, donde se observó que la temperatura de alineamiento óptima para *rolB* fue de 67°C y para *virD* 68°C (Figura 5 y 6).

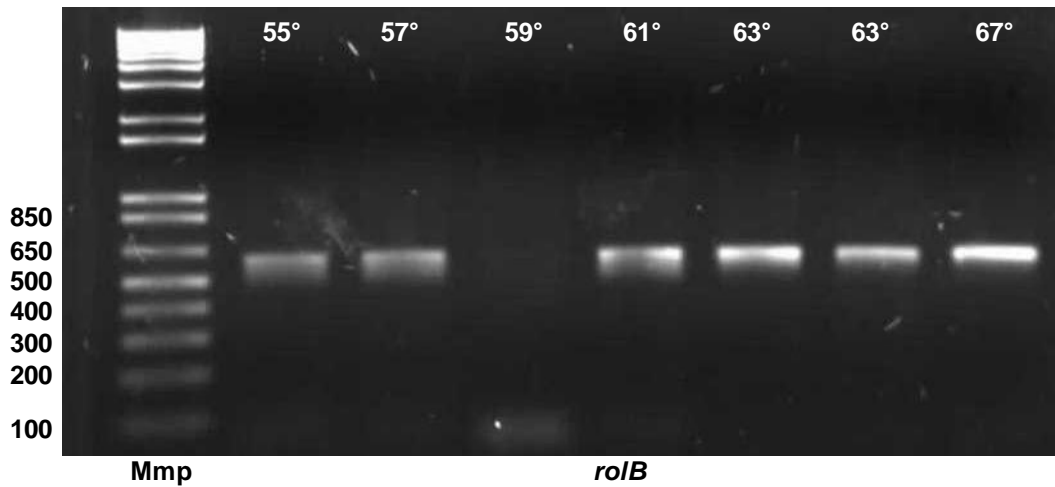


Figura 5. Productos de la amplificación para *rolB* mediante el gradiente de temperatura donde 67°C fue óptima.

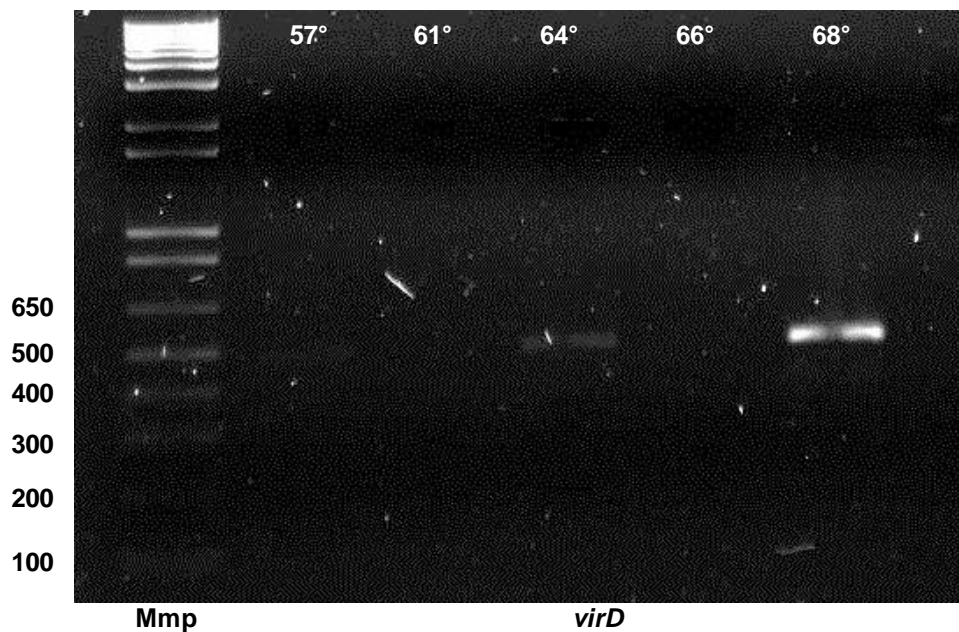


Figura 6. Productos de la amplificación para *virD* mediante el gradiente de temperatura donde 68°C fue óptima.

De las raíces obtenidas de cada tratamiento, se realizó la extracción y amplificación de ADN para buscar el fragmento del gen *roIB* el cual es transferido a la raíz. Debido al que el gen *virD* solo está involucrado en la virulencia de *Agroacterium* hacia el hospedero, éste no se transfiere al genoma de la planta por lo que sirvió para descartar la contaminación residual por la bacteria en las raíces. Los resultados mostraron que no existió contaminación residual por la bacteria tras la desinfección de las raíces en los lotes A, B y D a los cuales se les realizó la extracción y amplificación de ADN ya que al usar los oligonucleótidos diseñados en ningún caso se amplificó el fragmento esperado para *virD* (Figura 7). Sin embargo, de manera imprevista y a pesar de descartar la contaminación residual en el lote Control, se obtuvo un fragmento el cual solo era esperado para el gen *roIB* que indica la incorporación de plásmido Ri al genoma del hospedero y con éste, la transformación exitosa de las raíces (Figura 8).

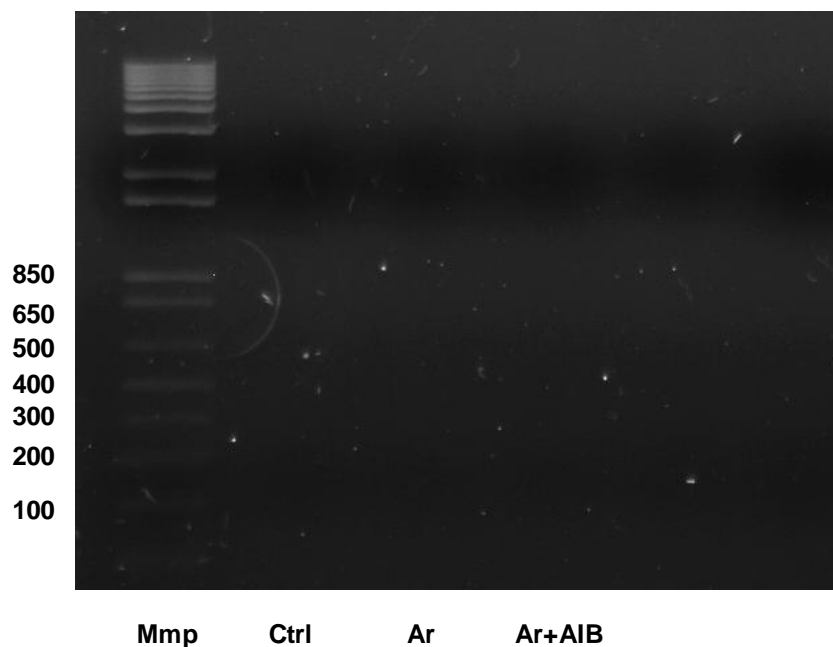


Figura 7. Amplificación del gen *virD* en raíces desinfectadas: *A. rhizogenes* (Ar), *A. rhizogenes* + AIB 3ppm (Ar+AIB). Control (Ctrl).

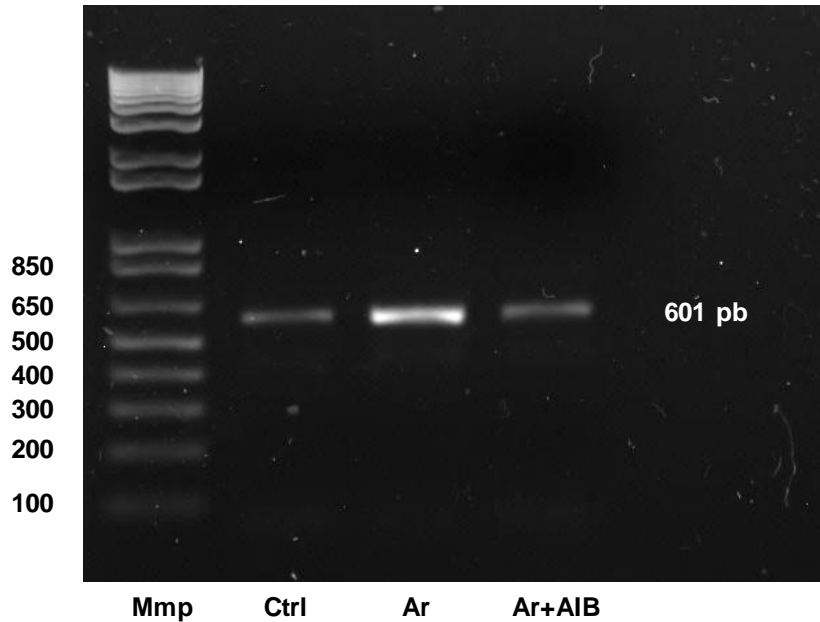


Figura 8. Amplificación del gen *rolB* en raíces: *A. rhizogenes* (Ar), *A. rhizogenes* + AIB 3ppm (Ar+AIB). Control (Ctrl). Se encontró un fragmento correspondiente al gen en todos los lotes. Concentración relativa de ADN Ar: 6565.598, Ar+AIB: 1789.941, Ctrl: 1398.577.

Las secuencias de los fragmentos mostrados en el gel correspondiente a los lotes A y B se compararon con los depositados en las bases de datos para comprobar que estos correspondieran con el gen *rolB* de *A. rhizogenes*. Para ellos las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos Forward 5'GAACTGTGTGATGCCGCAAG 3' y Reverse 3' CACGAGATCTCACAAAAGCCTG 5' fueron alineadas y se obtuvo la secuencia consenso para ambas muestras. Así, se obtuvieron dos secuencias, la primera con 521 pb para el Control (Figura 9) y la segunda con 570 pb para las raíces tratadas con *Agrobacterium* (Figura 10). Con la herramienta online ClustalW 2.1 a éstas se les realizó un alineamiento múltiple para determinar su identidad con respecto al fragmento del gen *rolB* a partir del cual se diseñaron los oligonucleótidos. El análisis mostro una fuerte similitud entre las secuencias analizadas. Sólo en la secuencia del lote Control, se encontraron dos diferencias en las bases (A por G y A por C) respecto a las secuencias de lote B y la original de *rolB* (Figura 11).

GGAGCGGTTTCCAATGCCTTGCCGCACGAAGAAGGTGCAGGCTACCTCCCTGACGTACACA
TTTGTCACTTTTAACTCCAGCAGGTGAATGAACAAGGTACTTGCAAAAATGGCGATAAAAC
CTTCCAGATCAGGTTCTTCCACGCGGCGGTGCGGCCAAGCAATGTTGTGAGCACGGACCAT
CTCCTGGAGGGCGAGGTCGCTACGATAGGGTTGCATCGTGGTCGCCAGCACGGCCTCTAAT
CCAAACGTGATGGATTTTTCCTCCAGTACTTTCTGCATCTTCTCGCGAGATAGATAGACAA
ATACATGTCGGTCGTTTTCTCTGGCCAAATCCGGTTGATCGACAAGCATGGGGGGATGATA
ACATACTTTGTTTTTTAGAAAGATGGGCCAGTTGTTTAAGTATGACCACCGGCGGACGGTTT
TCCTCCAAATCAAGCACGCCTTGGGCCACCTTTTCTGGAAATCCATGAGAGTTTTGCTAT
AGACTTGGCTATAGATTAAAAATGCAAATTGGA

Figura 9. Secuencia consenso obtenidas de las raíces del lote A, Control.
521 pb.

CCGCAAGCAATGACGTCATAGGAGCGGTTTCCAGTGCCTTGCCGCACGAAGAAGGTGCAGG
CTACCTCCCTGCCGTACACATTTGTCACTTTTAACTCCAGCAGGTGAATGAACAAGGTACT
TGCAAAAATGGCGATAAAACCTTCCAGATCAGGTTCTTCCACGCGGCGGTGCGGCCAAGCA
ATGTTGTGAGCACGGACCATCTCCTGGAGGGCGAGGTCGCTACGATAGGGTTGCATCGTGG
TCGCCAGCACGGCCTCTAATCCAAACGTGATGGATTTTTCCTCCAGTACTTTCTGCATCTT
CTCGCGAGATAGATAGACAAATACATGTCGGTCGTTTTCTCTGGCCAAATCCGGTTGATCG
ACAAGCATGGGGGGATGATAACATACTTTGTTTTTTAGAAAGATGGGCCAGTTGTTTAAGTA
TGACCACCGGCGGACGGTTTTTCCTCCAAATCAAGCACGCCTTGGGCCACCTTTTCTGGAA
ATCCATGAGAGTTTTGCTATAGACTTGGCTATAGATTAAAAATGCAAATTGGATCTCATTG
AACAAAGTTAAGCTGGTTCCAG

Figura 10 Secuencia consenso obtenidas de las raíces del lote B, tratadas
con *A. rhizogenes*. 570 pb.

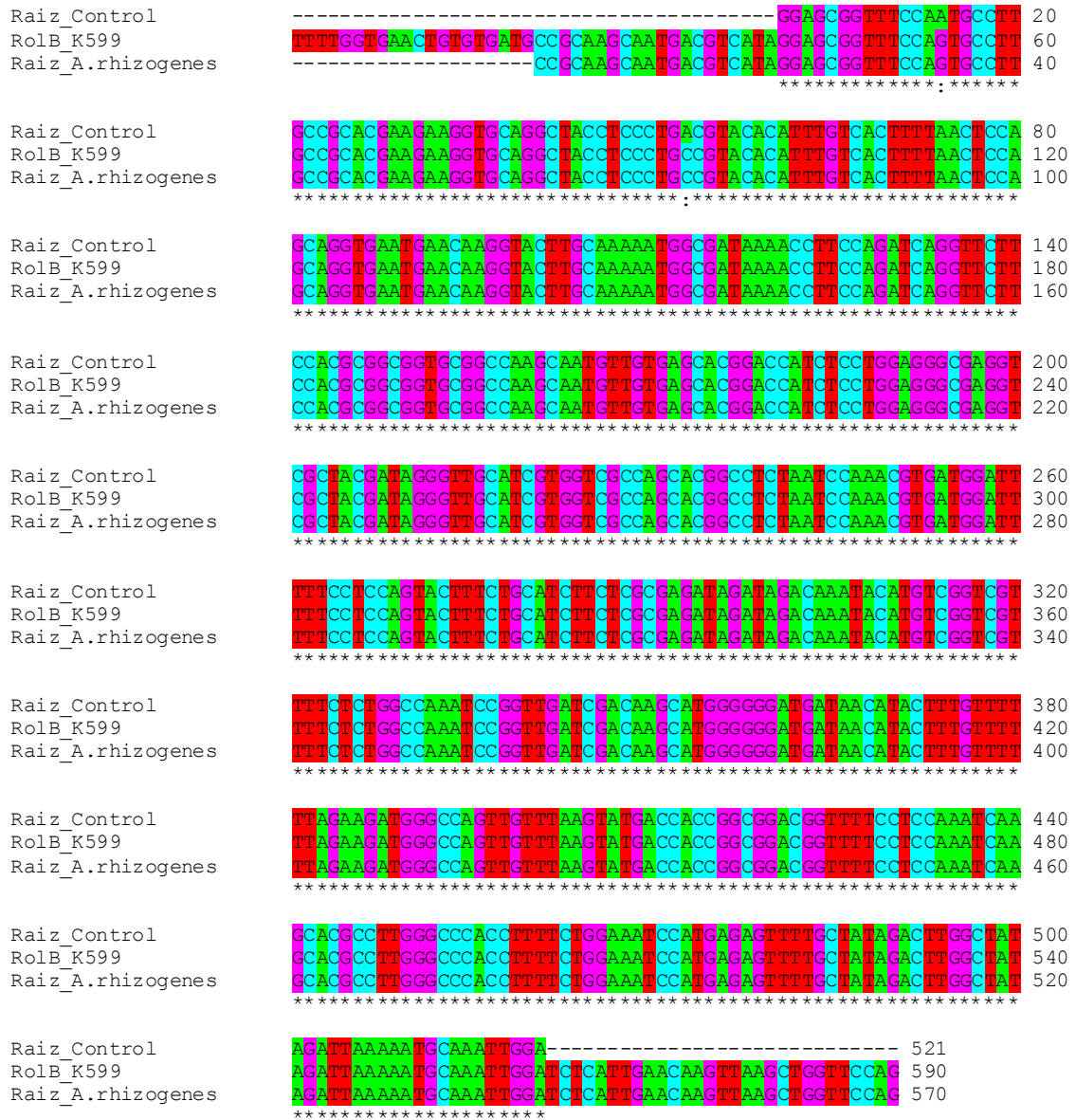


Figura 11. Alineamiento múltiple de secuencias con ClustalW: Se comparan las secuencias consenso de los lotes A y B contra la secuencia original de rolB.
 *: Áreas de las secuencias idénticas, :: Áreas de las secuencias fuertemente similares.

Al comprar las secuencias del lote Control y B con las depositadas en el NCBI mediante la herramienta BLAST, la búsqueda arrojó 5 secuencias idénticas en ambos casos pero con diferentes niveles de identidad. En todos los casos el valor de E fue de 0.0 lo cual representa una fuerte identidad entre las secuencias. La secuencia del lote B mostró un resultado esperado con una identidad máxima de 100% con la secuencia *A. rhizogenes* plasmid Ri T-ADN region (Referencia NCBI: EF433766.1) y una identidad mínima de 98% con *A. rhizogenes* genes *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD* (Referencia NCBI: X64255.1) (Tabla 2).

Raíz <i>A. rhizogenes</i>	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Agrobacterium rhizogenes plasmid Ri T-ADN region	1053	1053	100%	0.0	100%	EF433766.1
Agrobacterium rhizogenes plasmid pRi2659 T-ADN sequence, ORF2, ORF3, ORF4, ORF8, ORF10, ORF11, ORF12, ORF13, ORF13a, ORF14 and cus gene	1042	1042	100%	0.0	99%	AJ271050.1
<i>A. rhizogenes</i> (NCPB2659) ADN from central region of the cucumopine T-ADN	1042	1042	100%	0.0	99%	Z29365.1
Agrobacterium rhizogenes plasmid pRi1724 ADN, complete sequence	981	981	100%	0.0	98%	AP002086.1
Agrobacterium rhizogenes plasmid pRi1724 <i>rolA</i> , <i>rolB</i> , <i>rolC</i> gene, partial and complete cds	981	981	100%	0.0	98%	AB006689.1
<i>A. rhizogenes</i> genes <i>rolA</i> , <i>rolB</i> , <i>rolC</i> , <i>rolD</i>	976	976	100%	0.0	98%	X64255.1

Tabla 2. Resultados del análisis BLAST: Muestra las secuencias con mayor identidad para la secuencia de las raíces tratadas con *A. rhizogenes*.

La secuencia del lote Control, corresponde a un fragmento específico del plásmido Ri con una identidad máxima del 99% con *A. rhizogenes* plasmid Ri T-ADN region (Referencia NCBI: EF433766.1) y con *A. rhizogenes* genes *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD* con una identidad de 98% (Referencia NCBI: X64255.1) (Tabla 3).

Raíz control	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Agrobacterium rhizogenes plasmid Ri T-ADN region	952	952	100%	0.0	99%	EF433766.1
Agrobacterium rhizogenes plasmid pRi2659 T-ADN sequence, ORF2, ORF3, ORF4, ORF8, ORF10, ORF11, ORF12, ORF13, ORF13a, ORF14 and cus gene	941	941	100%	0.0	99%	AJ271050.1
Arhizogenes (NCPB2659) ADN from central region of the cucumopine T-ADN	941	941	100%	0.0	99%	Z29365.1
Agrobacterium rhizogenes plasmid pRi1724 ADN, complete sequence	885	885	100%	0.0	98%	AP002086.1
Agrobacterium rhizogenes plasmid pRi1724 rolA, rolB, rolC gene, partial and complete cds	885	885	100%	0.0	98%	AB006689.1
Arhizogenes genes rolA, rolB, rolC, rolD	880	880	100%	0.0	98%	X64255.1

Tabla 3. Resultados del análisis BLAST: Muestra las secuencias con mayor identidad para la secuencia de las raíces Control.

Con el fin de determinar la similitud entre los productos codificados por las secuencias del lote Control y el lote B con las depositadas en el banco de datos del NCBI, se tradujeron a proteínas con la herramienta SIXFRAME de Biology WorkBench 3.2 en donde para ambas muestras se obtuvo una secuencia idéntica de 168 amino ácidos. Obtenidos los productos (Figura 12), las mismas se usaron para realizar una búsqueda de proteínas homologas (BLASTp). Para ambos casos se observó una similitud con 36 secuencias depositadas en la base, de las cuales solo 7 superaron el 80% de identidad máxima (Tabla 4) y con valores para E cercanos a 0. La única secuencia con un 100% de identidad máxima correspondió a hypothetical protein [*A. rhizogenes*] (Referencia NCBI: ABS11824.1). Además, también se obtuvo una identidad del 83% con protein tyrosine phosphatase [*Catharanthus roseus*] >gb|ABI54190.1| tyrosine phosphatase RoIB [*Catharanthus roseus*] (Referencia NCBI: ABI54184.1).

```
MDFQKRWAQGVL DLEENRPPVVI LKQLAHL LKNKVCYHPPMLVDQ PDLARENDRHVFVYLS
REKMQKVL EEKSI TFGLEAVLAT TMQPYRSDLALQEMVRAHNI AWP HRRVEEPDLEGFIAI
FASTLFIHLLELKV TENVYGREVACTFFVRQGTG NR
```

Figura 12. Traducción a proteínas: Marco abierto de lectura para las secuencias Control y lote B

Proteínas secuencia Control	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
hypothetical protein [Agrobacterium rhizogenes]	331	331	100%	2.00E-112	100%	ABS11824.1
RecName: Full=Protein-tyrosine phosphatase RoIB; Short=ROL B protein >emb CAA45540.1 roIB [Agrobacterium rhizogenes]	325	325	100%	3.00E-110	98%	P49409.1
hypothetical protein pRi1724_p016 [Agrobacterium rhizogenes]>dbj BAA22335.1 hydrolyze phytohormone glucoside [Agrobacterium rhizogenes]>dbj BAB16134.1 riorf15 [Agrobacterium rhizogenes]>prf 2009229C roIB gene	325	325	100%	8.00E-110	98%	NP_066596.1
ORF11 [Agrobacterium rhizogenes] >emb CAB65895.1 hypothetical protein, homologous to ORF11 of pRiA4 [Agrobacterium rhizogenes]	302	302	100%	4.00E-101	93%	CAA82552.1
protein tyrosine phosphatase [Catharanthus roseus] >gb ABI54190.1 tyrosine phosphatase RoIB [Catharanthus roseus]	280	280	99%	8.00E-93	83%	ABI54184.1
RoIB, partial [Agrobacterium rhizogenes]	280	280	99%	9.00E-93	83%	ACH81986.1
RecName: Full=Protein-tyrosine phosphatase RoIB; Short=ROL B protein >emb CAA27163.1 unnamed protein product [Agrobacterium rhizogenes] >gb ABR18542.1 hypothetical protein [Catharanthus roseus]	279	279	99%	2.00E-92	83%	P20402.1

Tabla 4. Resultados del análisis BLAST para proteínas: Muestra las secuencias con mayor identidad para la muestra de las raíces Control.

Con la finalidad de descartar la posibilidad de que las raíces del grupo Control se hubieran contaminado con la bacteria, se obtuvieron raíces de mezquite de 6 meses de edad donadas por la Biol. Marta Santiago, las cuales se encontraban en un sustrato de arena estéril y raíces de frijol de 10 días sin ningún tratamiento. A ambas se les extrajo su ADN y se sometió a amplificación por PCR con los oligonucleótidos de *roIB* (Figura 13). Se reveló la amplificación de un fragmento con el peso esperado para este gen en ambas raíces. Sin embargo, en las muestras de frijol a pesar de obtener una banda con el peso esperado para *roIB* (600 pb aproximadamente), se reveló otro fragmento no secuenciado de aproximadamente 800 pb lo cual podría indicar que el oligonucleótido pudo amplificar otras regiones no pertenecientes a *roIB*.

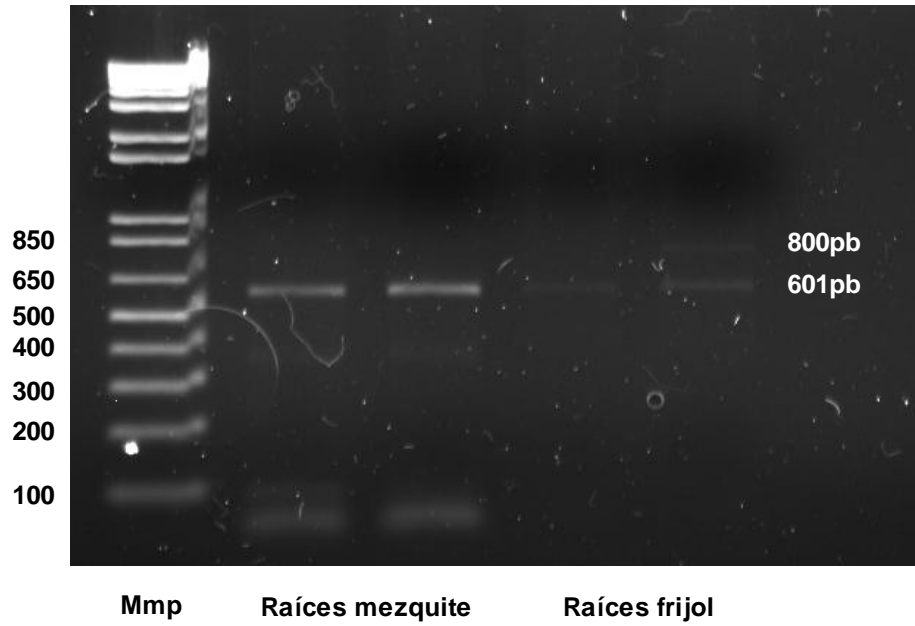


Figura 13. Amplificación del gen *roIB* en raíces de mezquite y frijol: Se observa un fragmento correspondiente al gen en ambas raíces. Concentración relativa de ADN mezquite: 6159.861, frijol: 1035.012.

DISCUSIÓN

AIB

La aplicación exógena de auxinas ha demostrado inducir exitosamente la formación de raíces adventicias en tallos, esquejes y explantes del género *Prosopis* ya que varias especies muestran una buena capacidad en enraizamiento con éstas, principalmente AIB. *Prosopis juliflora* ha alcanzado tasas de hasta 90% de enraizamiento y *Prosopis glandulosa* hasta un 100%. Sin embargo, estas usan grandes cantidades de hormonas como se ve en los resultados obtenidos por Felker (1998), adicionando dosis de 6000 a 9000 ppm de AIB sobre varetas del crecimiento terminal de ramas han dado resultados satisfactorios con un 50 a 100% de enraizamiento en diversas especies de mezquite. Por otro lado Oberschelp y Marcó (2010), en estacas herbáceas de *P. alba* de 6 años de edad con dosis de 5 ppm de AIB se obtuvo un porcentaje del 45% a los 2 meses de tratamiento.

Para *P. laevigata*, se han obtenido resultados exitosos a dosis menores de AIB, como las repostadas por Olvera (2006), que en esquejes suplementados con AIB a dosis 100 ppm obtuvo un 80% de enraizamiento. No obstante, los resultados obtenidos con dosis mínimas de AIB 3 ppm en plantas de 2 meses de edad sin raíz en éste trabajo, indican que existen diferencias con los estudios antes mencionados ya que a ésta dosis obtuvo un 90% de enraizamiento. Esto puede deberse a la edad y estado en el que se encontraban los mezquites, ya que al contar aún con las hojas jóvenes y yemas, las cuales son la principal fuente de auxinas endógenas que son transportadas a la zona de enraizamiento, permiten la rizogénesis en ausencia de hormonas exógenas (Hartmann *et al.*, 1997). A su vez, las hojas permiten la producción de carbohidratos derivados de la fotosíntesis, los cuales funcionan como fuente de energía para el proceso rizogénico (Gutiérrez, 1997). Al interactuar las auxinas secretadas por las raíces transformadas con secciones de las raíces no transformadas, éste efecto se puede ver potencializado ya que aún a muy bajas concentraciones promueven el

desarrollo de raíces laterales así como participar en las respuestas de crecimiento de tallo y raíz al estímulo de luz y gravedad (Martínez, 2004).

Contrario a lo esperado, éste tratamiento de hormonas exógenas fue el que obtuvo mayores diferencias significativas para los resultados de área foliar ya que desarrolló un 188% más área foliar que el control. Este patrón de respuesta ha sido encontrado en gran cantidad de otras especies, donde normalmente se da un aumento en la capacidad de enraizamiento al aumentar la dosis de auxina hasta alcanzar un óptimo. Como se ha indicado, los efectos positivos de las auxinas en el enraizamiento han sido asociados a sus efectos sobre la división celular, el aumento de transporte de carbohidratos y otros cofactores que pueden mejorar el desarrollo foliar (Ruiz y Mesén, 2010).

El nivel endógeno de auxinas es uno de los principales factores que más se ha relacionado con la capacidad rizogénica. Se ha atribuido un papel especialmente importante en éste proceso de controlar las peroxidasas, las cuales son enzimas cuya función primaria es oxidar moléculas a expensas de peróxido de hidrógeno (Olvera, 2006). Existen varias isoenzimas de la AIAoxidasa, sin embargo las auxinas sintéticas como es el caso del AIB no son destruidas por éstas oxidadasas, por lo que persisten en la planta mucho más tiempo que el AIA (Salisbury, 1994). Por tanto se puede atribuir que este efecto en la producción de raíces adventicias por AIB, se debe a que la enzima AIAoxidasa presenta menos afinidad por esta hormona y por lo tanto ésta permanece más tiempo en la planta (Quintanar, 2006) y así potencia su acción rizogénica.

Las auxinas rápidamente ocasionan la acumulación transitoria de tres familias de genes: SAURs, genes tipo GH3 y Aux/IAA (Abel y Theologis, 1996). Aunque se desconoce la función exacta de estos genes, varios de ellos están involucrados en la conjugación y degradación de auxinas y en mermar la señal por la hormona. Las proteínas AUX/IAA forman dímeros con los factores de transcripción ARF (Auxin Response Factors) inhibiendo la unión a elementos de promotor que responden a auxinas (Liscum y Reed 2002). Una vez degradados AUX/IAA, los

factores ARFs pueden formar homodímeros e inducir la expresión de varios genes blanco y desatar distintas respuestas fisiológicas comúnmente medidas como respuestas de crecimiento (Li *et al.*, 1991).

El efecto del mayor porcentaje de enraizamiento del AIB está en función a la mayor estabilidad de esta hormona en el interior de las plantas que el AIA y a su posterior conversión en AIA a través de la β -oxidación (Olvera, 2006). Lo ocurrido en el grupo control que sólo contaba con la producción de AIA endógenas, sólo el 50% de mezquites formaron raíces nuevas y no se desarrollaron completamente, además de no producir una área foliar, brotes, biomasa así como una longitud de raíces en cantidad significativa, cabría sugerir que ésta respuesta podría ser dependiente de la adición de hormonas exógenas (Trejo, 2007).

A. rhizogenes

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se demostró que *P. laevigata* fue susceptible a la infección con *A. rhizogenes* al lograr inducir el enraizamiento. Una de las principales diferencias se observó en el número de brotes con el tratamiento de *A. rhizogenes* ya que este desarrolló una mayor cantidad de brotes que el sometido a AIB 3 ppm. Estos mezquites al ser inoculados aun siendo plántulas, sus células se encuentran en etapa embrionaria y con una mayor división celular además de presentar una gran cantidad de células indeterminadas, las cuales son más susceptibles a la integración del T-ADN y expresión del plásmido Ri (Aird *et al.*, 1988). Aunado a esto, el corte realizado en el tejido vegetal estimula la producción de algunos compuestos fenólicos como la acetosiringona que atrae por quimiotaxis a *Agrobacterium* para proveerle acceso a los sitios de reconocimiento sobre la superficie celular (Rodríguez, 2002). En este sentido podría sugerirse que incrementando el tiempo dentro la cámara de crecimiento, así como el tiempo de co-cultivo, cada brote en la raíz formará raíces verdaderas con el gen *rolB* incorporado lo cual incrementará la producción de auxinas, que a su vez, promoverán nuevos brotes en estas raíces y así incrementar la longitud y biomasa para este tratamiento.

***A. rhizogenes* + AIB**

En este estudio, el tratamiento de *A. rhizogenes* suplementado con AIB 3 ppm en general reforzó el efecto positivo de esta interacción ya que siempre presentó una mayor efectividad y diferencia significativa en porcentaje de enraizamiento, biomasa, longitud así como el número de brotes comparado con a los otros tratamientos.

Estos resultados no difieren de los reportados por Caro (2000), en donde segmentos unicodales de plántulas de 1 mes de edad de *P. chilensis* en medio MB suplementado con *A. rhizogenes* LBA 9402 en combinación con AIB 3 ppm muestran mejor respuesta al enraizamiento y biomasa con este tratamiento. En especies como pino (Li y Leung, 2003), también se ha observado este patrón, donde al inocular material vegetal con *A. rhizogenes* y cultivar en un medio suplementado con AIB, no sólo el porcentaje de enraizamiento aumenta sino que también el número de raíces. En este sentido Ercan *et al.*, (1999) reporta que los síntomas producidos por esta bacteria son debido al aumento de la sensibilidad de las células vegetales al efecto de las auxinas exógenas, más que a la producción de hormonas endógenas por la propia planta.

A pesar de las altas tasas de enraizamiento, biomasa y longitud reportadas tanto en este trabajo y por Caro (2000), no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos que utilizaron en forma separada la inducción mediada por *A. rhizogenes* o por auxina. La elección de una u otra vía rizogénica, en última instancia, dependerá del comportamiento de las microplantas en campo, como por ejemplo una mayor supervivencia y crecimiento o de acuerdo a los fines que se persigan.

Factores que influyen en el enraizamiento

La temperatura óptima de enraizamiento reportada para mezquite es de 35°C así como un fotoperiodo de 12 horas, mientras que la temperatura óptima para la infección con *A. rhizogenes* es de 23°C, esta discrepancia en las temperaturas óptimas es una desventaja en el enraizamiento de *Prosopis*. Sin embargo, en este

trabajo, la temperatura a la cual se mantuvo la cámara de crecimiento no pareció influir de manera perjudicial en el enraizamiento de *P. laevigata* inoculado con la bacteria + AIB 3ppm, ya que éste se encontraba muy por debajo (27°C) de las reportadas como óptimas para mezquite. Felker (2005), encontró que la temperatura de 33°C influyó de manera positiva en explantes de *P. alba* inoculados con *A. rhizogenes* Tiger 232 más AIB 9000 mg/l, ANA 800 mg/l y tiamina HCl ya que se obtuvo un porcentaje de enraizamiento del 80% en explantes obtenidos de plantas de 21 años.

Factores como el medio o sustrato donde las raíces se desarrollan, juegan un papel importante en el crecimiento de éstas. Se observaron diferencias tanto en el medio M, donde las plántulas de una semana inoculadas con la bacteria formaron el fenotipo característico de las raíces en cabellera ya que medios con alta concentración salina como el Murashige & Skoog (MS), favorecen la formación de raíces en cabellera en algunas plantas mientras que medios de baja concentración osmótica tal como BTM incrementan la proliferación bacteriana (Caro, 2000). Sin embargo, el sustrato agrolita suplementada con solución Hoagland favoreció el desarrollo de raíces verdaderas y lignificadas con gran cantidad de primordios.

Análisis moleculares

Los resultados morfológicos demostraron el efecto positivo que *Agrobacterium* produjo en mezquite, así como los resultados obtenidos en el gel de agarosa, la secuencia de 570pb y su análisis BLAST que arrojó una identidad máxima con el plásmido Ri de *A. rhizogenes* (Referencia NCBI: EF433766.1), comprobaron la transformación de las raíces que fueron tratadas con la bacteria ya que este sistema permitió la posibilidad de introducir el gen de interés *rolB* que incrementó la respuesta a reguladores del crecimiento por parte de los tejidos transformados al sistema radical de *P. laevigata* el cual fue el responsable del desarrollo del mismo sin afectar con ello a la parte aérea, pigmentación, hojas en forma desigual, reducida dominancia apical o pérdida de geotropismo, conservando sus características forestales deseadas.

Debido a que *A. rhizogenes*, para estimular el enraizamiento involucra controversialmente el hecho de transferir su ADN a la planta, estos organismos se consideran genéricamente modificados. Se sabe que *A. rhizogenes* puede estimular el enraizamiento de varias especies recalcitrantes sin necesariamente estar transformadas, sin embargo dado a que esta infección puede ocurrir de forma natural las plantas infectadas no deberían considerarse transgénicas. El único problema que existe con esta bacteria es la posibilidad de expandirla como patógeno dentro de un nuevo ambiente (Felker, 2005).

Ante los resultados obtenidos mediante secuencia del grupo control de 521 pb (Figura 9) que al realizar un análisis Blast correspondió a una región del plásmido de *A. rhizogenes* (Referencia NCBI: EF433766.1), se podría sugerir algún tipo de contaminación externa y a pesar de que éste lote siempre se mantuvo en condiciones asépticas se desinfectó previamente a la extracción del ADN. La contaminación residual por la bacteria se descartó mediante la amplificación del gen *virD*, el cual no se transfiere al genoma de la planta se utiliza para descartar la presencia de la bacteria en la raíz. No obstante, el hecho de que se presentó una secuencia homologa al gen *rolB* de *Agrobacterium rhizogenes* dentro de las plantas Control, no implica que éstas se encuentren transformadas debido a que no expresaron ningún fenotipo característico de las raíces en cabellera ya que podrían carecer de los mecanismos de activación de producción no solo de auxinas sino también de citocininas u opinas.

Como se ha mencionado anteriormente, la región T-ADN_L porta aproximadamente 18 potenciales genes, de los cuales *rolA, B, C* y *D* tienen un papel importante en la inducción de las raíces en cabellera, aunque nada se sabe acerca de las proteínas codificadas por estos genes. La región T-ADN_R porta genes responsables de la síntesis de opinas y dos genes para la biosíntesis de las auxinas referidos como *aux1* y *aux2* los cuales se encuentran de manera natural en las plantas, así como genes homólogos a *rolB* pero la función de estos genes aún son desconocidas. Se han realizado diversos experimentos para demostrar que los genes *aux* no juegan un papel importante en la formación de raíces en cabellera como lo hacen

los genes *rol*, sin embargo se han reportado estudios en donde los genes *aux* son indispensables en la formación de raíces en cabellera (Nemoto *et al.*, 2009).

A pesar de que la secuencia de *rolB* se presentó en las plantas Control, en la literatura no se ha encontrado reporte alguno sobre la presencia de *A. rhizogenes* en regiones de Puebla, sin embargo se sabe que el mezquite sufre la incidencia de *Agrobacterium tumefaciens* (CONAZA, 1994). En plantaciones de durazno, dentro del estado de México se ha identificado *A. tumefaciens* (González *et al.*, 2005). Tanto *A. tumefaciens* como *A. rhizogenes* infectan a más de 600 especies ubicadas dentro de 90 familias de dicotiledóneas que van desde frutales, ornamentales y forestales. Además contienen un plásmido de entre 200 y 800 kb denominado plásmido Ti (tumor inducing) o Ri los cuales son genéticamente similares al compartir genes homólogos en el T-ADN (Gelvin, 2010). Cabe destacar que no existieron diferencias entre las secuencias de las raíces tratadas con *A. rhizogenes* y la original de *rolB* extraída del banco de datos, sin embargo la secuencia del grupo control fue la única que mostró dos cambios de pares de bases a lo largo de la misma lo cual indicaría que una vez que fue recombinada la secuencia, ésta ha sufrido sustituciones. Con el fin evidenciar la eliminación total de las bacterias mediante la desinfección de las raíces inoculadas o así como presencia de *Agrobacterium* en el área de estudio se sugiere realizar pruebas como las reportadas por Alippi (2011), que desarrollaron técnicas precisas que permiten detectar la presencia de especies de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal o suelo que mediante PCR's específicos sobre los genes *virC1* y *virC2* así como bioensayos en plántulas se reduce la posibilidad de obtener falsos negativos y/o falsos positivos.

Una de las grandes ventajas que se aprecian a través de la generación de raíces por *A. rhizogenes* es la ausencia de la fase de formación de callos que provoca variación somaclonal. La presencia de raíces en cabellera en *P. laevigata* posibilitaría además la obtención de individuos con mejor desempeño de implantación y un camino posible para el mejoramiento de la especie a través de la transformación de las raíces mediante esta bacteria. La incapacidad para inducir

la formación de raíces adventicias es a menudo, factor limitante en el cultivo de tejidos de especies recalcitrantes en las que la maduración frecuentemente va acompañada de una reducida capacidad de enraizamiento. En algunas especies, la habilidad para formar raíces está ausente en la fase de maduración, esto ha afectado grandemente la explotación genética de plantas leñosas hortícolas, forestales y silvestres (Haissig, 1992). Por otro lado, se menciona que las especies leñosas son muy difíciles de clonar *in vitro*, debido a que su capacidad de regeneración es débil, presentan dormancia, entre otras características que dificultan su propagación (Pierik, 1990).

Es bien sabido que los programas clásicos de mejoramiento genético de especies forestales son lentos y tediosos, resultando sumamente difícil introducir genes de interés específicos a través de ciclos de cruzamiento de líneas parentales. Sin embargo, como se observó en los resultados obtenidos en este trabajo, *A. rhizogenes* mostró, como alternativa a los tratamientos de grandes cantidades de hormonas exógenas, ser un factor importante en la rizogénesis de mezquite. Las raíces transformadas obtenidas de éste árbol posibilitarían posteriormente el establecimiento de cultivos *in vitro* de raíces como una alternativa para llevar a cabo diferentes estudios como los implicados en el proceso de rizogénesis, estudios relacionados con diferentes tipos de estrés abiótico, producción de metabolitos secundarios, cultivos monoxénicos con HMA y nodulación con *Rhizobium*, los cuales proporcionen información para el mantenimiento y fitomejoramiento de esta especie.

CONCLUSIONES

El tratamiento con AIB 3 ppm mostró un efecto positivo en el enraizamiento y área foliar del mezquite ya que con éste tratamiento se duplicó el área foliar respecto al control. Se determinó que *P. laevigata* es susceptible a la infección con *A. rhizogenes* al lograr inducir el enraizamiento y una mayor cantidad de brotes que los lotes sometidos a AIB 3 ppm. A pesar de las altas tasas de enraizamiento, biomasa y longitud, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos que usan de forma separada *A. rhizogenes* o AIB. Las plántulas sometidas a *A. rhizogenes* + AIB 3 ppm en general mostraron sinergia. Éste tratamiento presentó una mayor efectividad y diferencia significativa en cuanto al porcentaje de enraizamiento, biomasa, longitud así como el número de brotes comparado con a los otros tratamientos.

El sustrato desempeñó un papel importante en el crecimiento de las raíces, ya que se observaron diferencias tanto en el medio M, donde las plántulas inoculadas formaron el fenotipo característico de las raíces en cabellera, mientras que la agrolita favoreció el desarrollo de raíces verdaderas y lignificadas con gran cantidad de primordios.

El sistema de *A. rhizogenes*, permitió introducir el gen de *rolB* al genoma de la planta, ya que la secuencia de 570pb obtenida con los oligonucleótidos diseñados y su análisis determinó que la secuencia corresponde al plásmido Ri de *A. rhizogenes*, comprobando así la transformación de las raíces. Morfológicamente, la bacteria no pareció afectar la parte aérea de la planta, así como su pigmentación, no produjo hojas en forma desigual, reducida dominancia apical o pérdida de geotropismo, conservando sus características forestales deseadas.

PERSPECTIVAS

Debido a que durante la realización de este trabajo se encontraron algunas discrepancias en la literatura con otras especies forestales, se propone realizar estudios posteriores en donde se modifique algunas variables tales como:

- Incrementar la temperatura de la cámara de crecimiento a 35°C debido a que es la reportada como óptima para mezquite.
- Probar diferentes cepas bacterianas de *A. rhizogenes*, ya que la patogenicidad de la bacteria para cada especie vegetal depende de la cepa bacteriana.
- Incrementar el tiempo de co-cultivo de la bacteria y mezquite.
- Mantener las raíces inoculadas en medio MS ya que favorece la formación de raíces en cabellera en algunas plantas.
- Descartar la contaminación bacteriana en las raíces buscando más regiones específicas de la bacteria tales como *virC1* y *virC2*.
- Buscar en otras especies vegetales propias del área de estudio el gen *rolB*.

LITERATURA CITADA

- Abel, S., Theologis, A. 1996. Early genes and auxin action. *Plant Physiology* 111: 9-17.
- Aird, E. L. D., Hamill, J.D. y Rhodes, M. J. C. 1988. Cytogenetic analysis of hairy roots cultures from a number of plant species transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 15: 47- 57.
- Alippi, A. M., López, A. C., Balatti, A. C. 2011. Métodos para la detección de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua. *Revista Argentina de Microbiología*. 43: 278 – 286.
- Antezana, C., Atahuachi, M., Arrázola, S., Fernández, E., Navarro, G. 2000. Ecología y biogeografía del género *Prosopis* (mimosaceae) en Bolivia. *Revista Boliviana de Ecología*. 8: 25 – 36.
- Arias, A., Valverde, M., Reyes, J. 2000. Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Pueblall. Instituto Nacional de Ecología. pp 63.
- Bécard, G., Fortin, J. A. 1988. Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on Ri T- DNA transformed roots. *New Phytologist*. 108:211- 218.
- Benítez, B. A. 2005. Avance recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas. Editorial Reverté. España. pp 27.
- Bergmann, B. A., Stomp, A.M. 1994. Effect of genotype on rooting of hypocotyls and *in vitro* produced shoots of *Pinus radiata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 39: 195-202.
- Blanco, M., Valverde, R., Gómez, L. 2003. Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía Costarricense*. 27(001):19-28. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., Barker, D. G. 2001. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 6: 695 - 700.
- Bolton, G. W., Gordon, M.P., Neater, E.W. 1986. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci required for virulence. *Science*. 232: 983 - 985.
- Braun, R. H., Eady, C., Christey, M. C., Shaw, M., Pither-Joyce, M., McCallum, J. 2002. The use of hairy root cultures for the study of sulfur metabolism in plants, in *Microbes and Molecules*. A combined meeting of the NZSBMB, NZSPP and NZMS, November 26 - 29. University of Canterbury, Christchurch, New Zealand. pp. 208.
- Buendía, L., Orozco, J., Cruz, F., J Vernon, E. 2005. Propagación *in vitro* de mezquite (*Prosopis laevigata* H & B EX WILLD JOHNSTON). Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa.

Caro, L. A., Polci, P.A., Lindström, L.I., Echenique, C.V., Hernández, L.F. 2002. Micropropagation of *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz from young and mature plants. *Biocell*. 26:25-33.

Caro, L., Marinangeli, P., Curvetto, N.R., Hernández, C. 2000. *Agrobacterium rhizogenes* vs. inducción auxínica para la rizogénesis *in vitro* de *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz. *Multequina*. 9:47-53.

Cervantes, R. 2002. Plantas de importancia económica en las zonas áridas y semiáridas de México. México, D.F. Instituto de Geografía UNAM. pp 155.

Chávez, V. N., Chávez, O. L., Pérez, M. E. 2003. Transformación genética del naranjo agrio usando *Agrobacterium rhizogenes*. *Agrociencia*. 37(006): 629-639. Colegio de Postgraduados. Texcoco, México.

Cheon, C.-I., Lee, N. G., Siddique, A. M., Bal, A. K., Verma, D. P. S. 1993. Roles of plant homologues of Rab1p and Rab7p in the biogenesis of the peribacteroid membrane, a subcellular compartment formed de novo during root nodule symbiosis. *EMBO*. 12:4125 - 4135.

Christey, M. C. 2001. Use of Ri mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 37:687 - 700.

Combard, A., Brevet, J., Borowski, D., Cam, K., and Tempé, J. 1987. Physical map of the T-DNA region of *Agrobacterium rhizogenes* strain NCPPB2659. *Plasmid*. 18:70-75.

CONAZA (Comisión Nacional de las Zonas Áridas). 1994. Mezquite. *Prosopis* spp. Cultivo alternativo para las zonas áridas y semiáridas de México. Instituto Nacional de Ecología. Mexico. Pp 31.

Crane, C., Wright, E., Dixon, R.A., Wang, Z. 2006. Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens* transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes* transformed hairy roots. *Planta*. 223(6):1344-1354.

Damiano C, Monticelli S (1998). *In vitro* fruit trees rooting by *Agrobacterium rhizogenes* wild type infection. *Electronic Journal of Biotechnology* 1:1-7.

Dandekar, A. M., 1992. Transformation in Biotechnology of perennial fruit crops. Eds. Hammerschlag. F. A., Litz, R. E. CAB International. Cambridge. pp. 141-158.

Díaz, C. L., Melchers, L. S., Hooykaas, P. J. J., Lugtenberg, B. J. J., and Kijne, J. W. 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the Rhizobium-legume symbiosis. *Nature*. 338:579 - 581.

Díaz, C. L., Spaink, H. P., and Kijne, J. W. 2000. Heterologous rhizobial lipochitin oligo saccharides and chitin oligomers induce cortical cell divisions in red clover roots, transformed with the pea lectin gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 13:268 - 276.

Downs, C. G., Christey, M. C., Davies, K. M., King, G. A., Sinclair B. K., Stevenson, D. G. 1994. Hairy roots of *Brassica napus*: II. Glutamine synthetase overexpression alters ammonia assimilation and the response to phosphinothricin. *Plant Cell Reports*. 14:41- 46.

Estrada, N. G., Alvarado, A. X., Elías, O. J., Díaz, C. C., Santana, O., Murillo, E., Guillen, G., Sánchez, G. N., Acosta, J., Quinto, C., Li, D., Gresshoff, P., Sánchez, F. 2006. *Agrobacterium rhizogenes*. Transformation of the *Phaseolus* spp.: A Tool for Functional Genomics. 19:1385 - 1393.

Ercan, G., S. Yuce, K. Turgut., M. Taskin. 1999. *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root formation in some *Rubia tinctorum* L. populations grown in Turkey. Turkish Journal of Botany. 23:373 - 377.

Felker, P. 1998. Review off applied aspects of *Prosopis*. Tewari, J.C.; N.M. Pasiecznik; L.N. Harsh and P.J.C. Harris (eds.). *Prosopis* species in the arid and semiarid zones of India. HDRA and The *Prosopis* Society of India. pp 11-15.

Felker, P., Medina, D., Soulier, C., Velicce, G., Velarde, M., González, C. 2005. A survey of environmental and biological factors (*Azospirillum* spp, *Agrobacterium rhizogenes*, *Pseudomonas aurantiaca*) for their influence in rooting cuttings of *Prosopis alba* clones. Journal of Arid Environments. 61:227- 247

Ffolliot, P.F., Thames, J.L., 1983. Recolección, manipuleo, almacenaje y pretratamiento de las semillas de *Prosopis* en América Latina. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Roma.

García, M. M., Tapia, M. M. 2007. Aspectos demográficos de *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox*, especies utilizadas como leña en Colonia San Martín, Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de Licenciatura en Biología. FES- Iztacala, UNAM.

García, M.E., Galindo, A.S. 1986. The Uses of Mesquite (*Prosopis* spp) in the Highlands of San Luis Potosí, México. Forest Ecology and Management. 16:49 – 56

Gelvin S. B. (2010). *Agrobacterium* and plant genes involved in T-ADN transfer and integration. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 51: 223 - 56.

Gómez, F., J. Signoret, y M.C. Abuín. 1970. Mezquites y Huizaches. Algunos Aspectos de la Economía, Ecología y Taxonomía de los Géneros, *Prosopis* y *Acacia* en México. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, A. C. México, D.F.

Gómez, L. J.F. 2010. Técnicas básicas para el establecimiento de cultivos monoxénicos en raíces transformadas y sus aplicaciones. Universidad autónoma de Tlaxcala. pp 70.

González, R. M. A., Silva, R. H. V., Mascorro, G. J. O. 2005. Ensayo *in vitro* del péptido antimicrobiano melitina contra diferentes bacterias fitopatógenas. Revista mexicana de fitopatología. 23 (02):176 - 182.

Goor, Y.A., 1964. Métodos de plantación forestal en zonas áridas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Cuaderno de fomento forestal 16, Roma.

Gutiérrez, B. 1997. Consideraciones sobre la fisiología y el estado de madurez en el enraizamiento de estacas de especies forestales. Santiago, Chile. Ciencia e Investigación Forestal. 9(2):261 - 277.

- Haissig, B. E., Davis, T. D. Reimenschneider, D. E. 1992. Researching the controls of adventitious rooting . *Physiologia Plantarum*. 84:310-317.
- Hartmann, H. T., D. Kester, F. T., Davies y R. L. Geneve. 1997. *Plant propagation; principles and practices*. New Jersey, Prentice-Hall International. pp770.
- Hildebrandt U., Janetta K., Bothe, H. 2002. Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(4):1919 - 1924.
- Jones, O.P. (1983). *In vitro* propagation of tree crops. Pp. 139 - 159 in: *Plant Biotechnology*, edited by S.H. Mantell & H. Smith, Soc. exptl Biol., Seminar Series 18, Cambridge Univ. Press, Britain.
- Lee, N. G., Stein, B., Suzuki, H., Verma, D. P. 1993. Expression of antisense nodulin-35 RNA in *Vigna aconitifolia* transgenic root nodules retards peroxisome development and affects nitrogen availability to the plant. *The Plant Journal*. 3(4):599 - 606.
- Li, M., and D. Leung. 2003. Root induction in radiate pine using *Agrobacterium rhizogenes*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6(3): 254 - 270.
- Li, Y., Hagen, G., Guilfoyle, T. 1991. An Auxin-Responsive Promoter Is Differentially Induced by Auxin Gradients during Tropisms. *Plant Cell* 3: 1167-1175.
- Mares, A., Enders, A., Kingsolver, M., Neff, L., Simpson, B. 1977. *Prosopis* as a niche component. pp 123-149. En. *Mesquite: Its Biology in two Desert Ecosystems*. Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg, PA.
- Martínez, S. J. A. 2004. Crecimiento y desarrollo vegetal. (en línea: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Crecimiento%20y%20desarrollo.pdf>).
- McAfee, B.J., White, E. E., Pelcher, L.E., Lapp, M.S., (1993). Root induction in pine (*Pinus*) and larch (*Larix*) spp. using *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34: 53-62.
- Mora, R. G. A., López M. M. 2010. Obtención de plantas quimeras con raíces transformadas en *Phaseolus vulgaris* variedad regional 87. CIDIR-IPN.
- Mugnier J., Mosse B. 1987. Vesicular arbuscular mycorrhizal infections in transformed Ri T-ADN roots grown axenically. *Phytopathology*. 77:1043 - 1050.
- Mugnier, J. 1997. Mycorrhizal interactions and the effects of fungicides, nematicides and herbicides on hairy root cultures. En. *Hairy Roots Culture and Applications* (Doran, P. M., ed.), Harwood Academic, Amsterdam, The Netherlands, pp. 123 - 132.
- Nemoto, K., Hara, M., Suzuki, M., Seki, H., Oka, A., Muranaka, T., Mano, Y. 2009. Function of the aux and rol genes of the Ri plasmid in plant cell division in vitro. *Plant Signalin & Behavior*.4(12):1145-7.

- Nilsson, O., Olsson, O. 1997. Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes* rol genes in the formation of hairy roots. *Physiologia Plantarum*. 100. pp 463 - 473.
- Oberschelp, G. P. J., M. A. Marcó. 2010. Efecto del ácido 3-indolbutírico sobre el enraizamiento adventicio y la altura de plantines clonales de *Prosopis alba* Grisebach. *Quebracho*.18(1,2):112 - 119.
- Olvera, H. M. T. 2006. Evaluación de los reguladores auxínicos AIA, AIB y p-Nitrofenil-Indol- 3-Acetato en la rizogénesis de *Prosopis laevigata*, *Cercidium praecox* y *Mimosa luisana* de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de Licenciatura en Biología. FES-Iztacala, UNAM.
- Orozco, V. J. 1996. Efecto de Bencilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (ANA) en el establecimiento de cultivos *in vitro* de explantes nodales de *Prosopis leavigata* (Mezquite). Tesis de Licenciatura en Biología. ENEP-Iztacala, UNAM.
- Osuna, L. E., Meza, S. R. 2003. Alternativas para la explotación sostenible del mezquite de baja california sur. Folleto Técnico Núm. 8. INIFAP.
- Pennington, T., J. Sarukán. 1998. Árboles Tropicales de México. Segunda edición. UNAM - Fondo de Cultura Económica. México.
- Petit, A., Stougaard, J., Kühle, A., Marcker, K. A., and Tempé, J. 1987. Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus*: A system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. *Molecular Genetics and Genomics* 207:245 - 250.
- Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Madrid. Mundi-Prensa. 326p.
- Potrykus, I., Bilang, R., Futterer J., Sauter C., Schrott M., Spangenberg G. 1998. Genetic engineering of crop plants. In: *Agricultural Biotechnology*. Ed. by Arie Altman. Marcel Dekker, Inc. New York. pp 770.
- Quandt, H.J., Pfler, A., Broer, I. 1993 Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: A fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 6:699–706.
- Quintanar, Z. R. E. 2006. Síntesis de derivados de auxinas y la evaluación de su efecto promotor de raíces adventicias en *Dendranthema grandiflora* y *Dianthus caryophyllus*. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Riov, J., Epstein, E. 1988. Comparison of movement and metabolism of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid in mung bean cuttings. *Physiologia Plantarum*. 74:556 - 560.
- Rivas, W. C. 2007. Plantas y cultivos transgénicos. En línea: <http://www.uned.es/experto-biotecnologia-alimentos/TrabajosSelecc/CristinaRivas.pdf>
- Rodríguez, H. G. 2002. Inducción del enraizamiento en *Agave salmiana* Otto con *Agrobacterium rhizogenes* y colonización de raíces transformadas por *Glomus intraradices*. Tesis de doctorado. Universidad de Colima.

- Rojas, M. L.I. 2007. respuestas fisiológicas y moleculares al estrés por sequía de plántulas de *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd) M. C. Johnston. (Fabaceae : Mimosoideae). Tesis de Licenciatura en Biología. FES-Iztacala, UNAM
- Ruiz, S. H., Mesén. F. 2010. Efecto del ácido indolbutírico y tipo de estacilla en el enraizamiento de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Agronomía Costarricense* 34(2): 259 - 267.
- Rzedowski, G. C. de, Y J. Rzedowski. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2ª ed. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán. pp 259.
- Salisbury, F.B., Ross, C.W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo editorial Iberoamericana. México. 759p.
- Santiago, S. M. 2003. Efecto del estrés lumínico sobre la actividad y expresión de isoenzimas de peroxidasas en *Neobuxbaumia tetetzo* en Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis de Licenciatura en Biología. FES-Iztacala, UNAM.
- Savka, M. A., Ravillion, B., Noel, G. R., and Farrand, S. K. 1990. Induction of hairy roots on cultivated soybean genotypes and their use to propagate the soybean cyst nematode. *Phytopathology* 80:503 - 508.
- Stanton, B.G. 2003. Improving plant genetic engineering by manipulating the host. *Trends in Biotechnology*. 21(3):95 - 98.
- Stiller, J., Martirani, L., Tuppale, S., Chian, R.-J., Chiurazzi, M., Gresshoff, P. M. 1997. High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany*. 48:1357 - 1365.
- Stomp, A. M., Loopstra, C., Chilton, W.S., Sedroff, R.R., Moore, L.W. 1990. Effect of genotype on rooting of hypocotyls and *in vitro* produced shoots of *Pinus radiata*. *Plant Physiology* 92:1226 - 1232.
- Taylor, C., Fuchs, B., Collier, R., Lutke, K. Generation of Composite Plants Using *Agrobacterium rhizogenes*. En. *Methods in Molecular Biology*, vol. 343: *Agrobacterium* Protocols. 2006.
- Tempé, J., Casse- Delbart, F. 1989. Plant gene vectors and genetic transformation: *Agrobacterium* Ri plasmids. *Cell culture and somatic cell genetics of plants. Molecular Biology of plant Nuclear Genes* Ed. 6:26- 51.
- Tiwari, P., Adholeya, A. 2002. *In vitro* co-culture of two AMF isolates *Gigaspora margarita* and *Glomus intraradices* on Ri T-DNA transformed roots. *FEMS. Microbioly Letters*. 2;206(1):39-43.
- Trejo, E. J., Valdez T. R., Trejo, T. G., Cruz, S. F., Rodríguez, M. M. 2007. Influencia de auxinas y citocininas en la inducción de callos en hipocotilo de *Prosopis laevigata*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

Tzfira, T., Citovsky, V. 2002. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends in Cell Biology*. 12(3):121-129.

Uozumi, N., Kobayashi, T. 1997. Artificial seed production through hairy root regeneration, in *Hairy Roots: Culture and Applications* (Doran, P. M., ed.), Harwood Academic, Amsterdam, The Netherlands, pp. 113–122.

Van der Salm, T.P.M., Hanisch ten Cate, C. H., Dons, H. J. M. 1996. Prospects for applications of rol genes for crop improvement . *Plant Molecular. Biology Reporter* 14:207 - 228.

Van de Velde, W., Mergeay, J., Holsters, M., Goormachtig, S. 2003. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Sesbania rostrata*. *Plant Sci*. 165:1281 - 1288.

Villa, I. M., Bórquez, H. R. 2006. El mezquite, un símbolo de riqueza de nuestros recursos naturales. Entorno académico. Instituto Tecnológico superior de Cajeme. SONORA. Año 4 numero 6.

White, T. L., Adams, W. T., Neale, D. B. 2007. “Forest Genetics”. CABI Publishing. CAB International, Wallingford, UK. 704 p.

Whiteman, K., Him, R., Scheffer, R.J., Strobel, G.A., 1988. Factors influencing root formation in dicots by *Agrobacterium rhizogenes*. *Canadian Journal of Botany* 66, 642 - 644.

Woodward W.A., Bartel Bonnie. 2005. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany*. 95:707-735.

Xie, D., Wang, L., Ye H., li G. 2000. Isolation and production of artemisinin and stigmasterol in hairy root cultures of *Artemisia annua*. *Planta Medica*. 63:161-166.

Zepeda, A. J., Carrera, P. J., Sánchez, R. O. 1999. Obtención de L-arabinosa a partir de la goma de mezquite. División de ciencia básicas e ingeniera, UAM-Iztapalapa.

Zupan, J.R., Zambryski, P. 1995. Transfer of T-ADN from *Agrobacterium* o the plant cell. *Plant Physiology*. 107:1041 - 1047.

APÉNDICES

APÉNDICE 1. Secuencia completa del gen *roIB* de *A. rhizogenes* K599

TCAAGTCGCCGAGGTTTTCTTTCTTCAGATTTACTATAGCAGGCTTCATATCACCCCTCTTCACGTTTTCTGGTTG
 GGTCCCCGAGAGCCGAGGGTGGAGTCTGGCTCCGGTGACGGTACCGCCGGTTCGTGGCATCACGCCAGCATTTTT
 TGGTGAAGTGTGTGATGCCGCAAGCAATGACGTCATAGGAGCGGTTTTCCAGTGCCTTGCCGCACGAAGAAGGT
 GCAGGCTACCTCCCTGCCGTACACATTTGTCACTTTAACTCCAGCAGGTGAATGAACAAGGTACTTGCAAAA
 ATGGCGATAAAACCTTCCAGATCAGGTTCTTCCACGCGGGTGCGGCCAAGCAATGTTGTGAGCACGGACCA
 TCTCCTGGAGGGCGAGGTCGCTACGATAGGGTTGCATCGTGGTGCACGACGGCCTTAATCCAAACGTGAT
 GGATTTTTCTCCAGTACTTTCTGCATCTTCTCGCGAGATAGATAGACAAATACATGTCGGTTCGTTTTCTCTG
 GCCAAATCCGGTTGATCGACAAGCATGGGGGGATGATAACATACTTTGTTTTTTAGAAAGATGGGCCAGTTGTT
 TAAGTATGACCACCGGCGGACGGTTTTCTCCAAATCAAGCACGCCTTGGGCCACCTTTTTCTGGAAATCCAT
 GAGAGTTTTGCTATAGACTTGGCTATAGATTAATAATGCAAAATGGATCTCATTGAACAAGTTAAGCTGGTTC
 CAGGCTTTTGTGAGATCTCGTGTTGAAAGCGTTGAAGGAATAGTAATCGAGGAGGCATTGTGATGTGAGGTT
 GGGGATAACTGTGGAATAACGGCAAGTTCAGTGCCAT

APÉNDICE 2. Secuencia completa del gen *virD* de *A. rhizogenes* K599

ATGAAACCGTCGGGAAGCTCAAAAACCTGGATACGCCGGGTTCGGCTAGATCCTCGCCCCAGGTTTCGCGCAGGGG
 TTACGCCTGTCTTCATCCCAAAGAGCCTTGAACCGTTTTGCTTGTCTCCCATCTGACGGCCAAATGGATCAC
 CGGGAAAATTTATCTGCGCAATTCGCTTACGATGGAATGAGACTGGGCGCAGCCGAGCGGTCCGCGTACGAGA
 CATGGGATAGAGCGGACCGGCCGAGTTGGAAAGACCTGATACTGAGCGCTCGCCTGAACGCGATTGACAGTTT
 CGCTTGGAAATGTGATGTGCGGAGAAAGTACCTCTTCAACTTTTTGTTTATGATGGTGTTCCTCTGGCGGAAGGG
 GAACGGCATGCCTACGAGGAATGGGTGGAGCCGGGACAGCCCAGTTGGCAACAACCTCGTTGTGAACGCGCGTA
 TTGAAGAGCTAAACACCTCTGCTGCAATTCGAATGAGTGTAGTCCCCTTCAAGAGGAATTCCGATCGGAGGC
 GCCTAAGCGTAAGCGGACAAGCTCCATTGGTCAAAAGAAGGTTTCCCTGAACCATTCGAATTTGATGGGATG
 AGACTCGGCTCGCCTGAGCGCGAAGCATATGAGAATTGGAGTAAACCGCAACCGCCATCCTGGAAAGACCTGA
 TAGTTGACAGCCCGTCTTGACGCAATCGACACCTCCACCTGGCTCAACGAATCAAATGACACCTCGGTCTTCGA
 GTACGAAGCGTCCCGCTTGGGGAGGGGGAACGCCTAGCATATGAAAAATGGCTCAAGCCCGCAACAGGA
 TGGGAAGACCTGGTTGTGACGCACGCGTTGCGGAATTGCACCAGTCTGCTCCGACGTGGTGCGAACACCAAC
 CAGGCAACGACGTTTTCTTCAACGAGTCCGGGCGCATCTCGGGCGTCCCAATTAACGCCGAGCAGGTGTGCGG
 TGCGTTCTTCTGATGATGAGTGGCGCTCGGAGCAGCCGAGCGCGCTGCGCATGATCGTTGGAGCAGGCCG
 GACCGGCCACCTGGGAAGATCTTATCATAGTTCGCGCGCAAGCTGCTATCGAAGGCGGTGCCGTTTTGAATG
 GGATGATCGGGAAGACATCTTCTCAGTCTTTTTTATACGAGGGAATGTTGCTTGGGGATGCGGAGCGTCAGGC
 GTACGGACGGTGGAGGCAGCTAGCCCAGCCGCGGTGGCAAAATCTGGTGGTGAACGCGCGCCTGGCAGAGCTC
 GACCCGGCGGCTGGATTCCCGATGAACATGATCCGTCTGAGGATGGCGGGGCGACTGGTCTTCTGTGCGAAG
 CAAGCACGACCAATAAGTCCCGCTCAGTTTAGGTGATCAACCGGAAGCGCGCTCGCCTAGTCTCGCACGTGA
 GCCAGCACAAACAGCCGACTCACGTGCAAAACCTGACGTGCGCACAAATTGGAAGCAAGACGTGCTCTATATTT
 GGGCCCTCTGGGAGGGATGCAGACCAACCGCCAGCATCGCCGACAGTAATCGCCTCGACGAGGTAAGCAAAG
 TTAAACGGCTGGGTGCCAAGAGCCGTGAGGCGCTAAAGCAACGGCCTATGACGTAATTTCAAGTGCAGAAAG
 ACTGTGCTCTCACGAGGGTTGTTTACGAGTTTCACTCAGCCAGAAAAAGCCGCTTGCTCGAGAAGCGAC
 AATATCGGCACCTTATGGAAGTCAAAAAACGAACGAGCTCGGCTTGGCAGGAGACCGGGAAATACGAGTCCG
 AGCATATTTTCGGGTTCAAGGTTGTCCACGATAACCCTGCGCTCGACCAAGAGGGCCGGCGGCTGGAAAGGCC
 TATGCCCCCTATCTCGAATGCAAGGAACCTCATCGACAACATGTTGGTACGGGAAGGGGGCGGACCCGACTG
 GTGGGGCGCGGCTGGCCAGATGACGCAAGTTACCCTCGGATCAAAGGGCAACTCTATCGGACCCTGTTGCGT
 CCACGGAAGGTGCAACGGCGTCAAACGGGTATCAATTAACAGCTAGGCTACGCACACCAGCTCGCTAACGA
 CGGGCTGCAGAGCGAAACGCGATGGGGTTATCATGCGGCTTCAGGTCGCGACTACTAGCTACAACATACG
 GTAAGCCGCGATCCGGTACTTTCTCCGCCAGTAAAGAGCAAGCTCCGGAATTGTTGCACCTTGGGCCACGTG
 GCCAGACAGAAGCTGTACTCGCTCGGAAACAGCATTGACAGGAAGATGGCCAACACGCGAGCGTGAGCAGCA
 AGTCTATCGAGAGTTTTTAGCCCTTTATGACGTCAAGAAGGACCTGGAGGCCAAGACACTTGGGTTGCGGAAG
 AAAAAAGCTGCGCTTGTTCGCGTTGAACCGGACTGCCGCTCAATAGGCACTTACCCTTGAAAGCCCAAT
 CGTCGAGCGCAGAAGTTGAAAAAGCAACTCACGAGTTTGTGATGAACGACGGTTTTATGATCCGCGGATCGCG
 TCGGGACAAAGCATTACAACGGTGA

APÉNDICE 3. ANOVA/Tukey Longitud

<i>Mean</i>	<i>n</i>	<i>Std. Dev</i>	
2.19818	10	1.302429	Control
3.49699	10	1.109396	Ar
3.66379	10	1.260093	AIB
4.03292	10	1.077540	Ar+AIB
3.34797	40	1.341786	Total

ANOVA
table

<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Treatment	19.131091	3	6.3770303	4.49	0.0089
Error	51.084071	36	1.4190020		
Total	70.215161	39			

Post hoc analysis

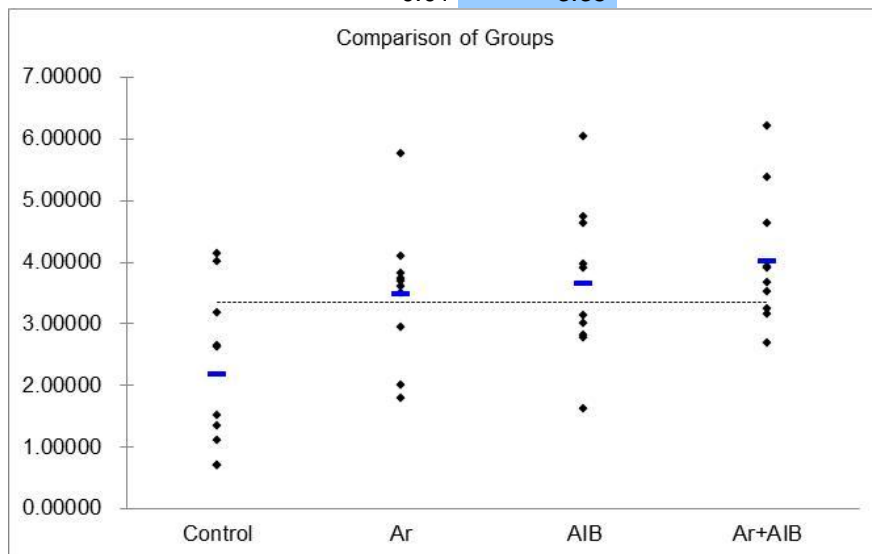
p-values for pairwise t-tests

Tukey simultaneous comparison t-values (d.f. = 36)

	Control	Ar	AIB	Ar+AIB
	2.19818	3.49699	3.66379	4.03292
Control	2.19818			
Ar	3.49699	2.44		
AIB	3.66379	2.75	0.31	
Ar+AIB	4.03292	3.44	1.01	0.69

critical values for experimentwise error rate:

0.05	2.70
0.01	3.35



APÉNDICE 4. ANOVA/Tukey
No. De primordios

Mean	n	Std. Dev	
1.40146	10	1.019758	Control
2.27310	10	1.677640	Ar
2.53161	10	1.049321	AIB
3.36119	10	0.818152	Ar+AIB
2.39184	40	1.341303	Total

ANOVA table

Source	SS	df	MS	F	p-value
Treatment	19.541213	3	6.5137377	4.63	0.0077
Error	50.623469	36	1.4062075		
Total	70.164682	39			

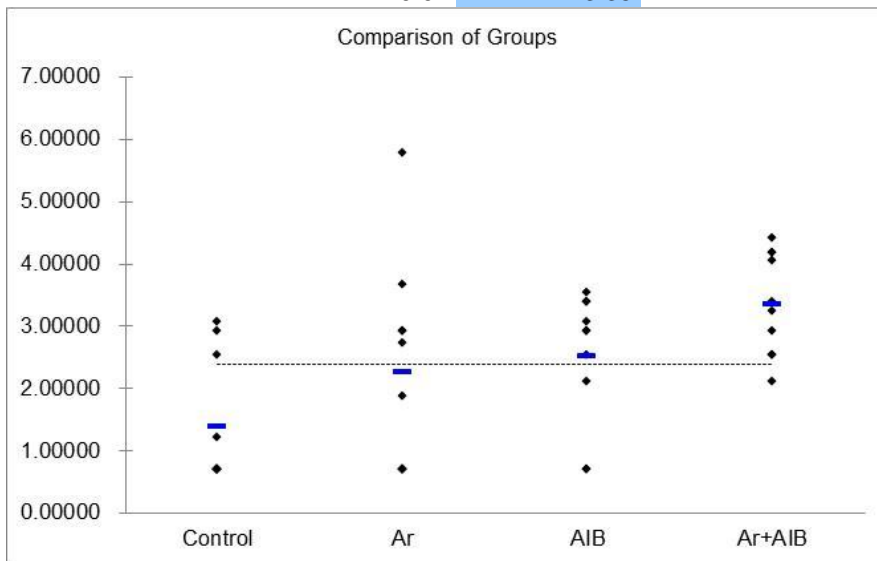
Post hoc analysis

Tukey simultaneous comparison t-values (d.f. = 36)

	Control	Ar	AIB	Ar+AIB
Control	1.40146			
Ar	1.64	2.27310		
AIB	2.13	0.49	2.53161	
Ar+AIB	3.70	2.05	1.56	3.36119

critical values for experimentwise error rate:

0.05	2.70
0.01	3.35



APÉNDICE 5. ANOVA/Tukey
Área Foliar

	<i>Mean</i>	<i>n</i>	<i>Std. Dev</i>	
	2.5125	10	0.88458	Control
	3.5860	10	1.33925	Ar
	4.7325	10	1.55970	AIB
	3.8431	10	1.16363	Ar+AIB
	3.6685	40	1.45287	Total

ANOVA
table

<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Treatment	25.05723	3	8.352411	5.25	0.0041
Error	57.26492	36	1.590692		
Total	82.32216	39			

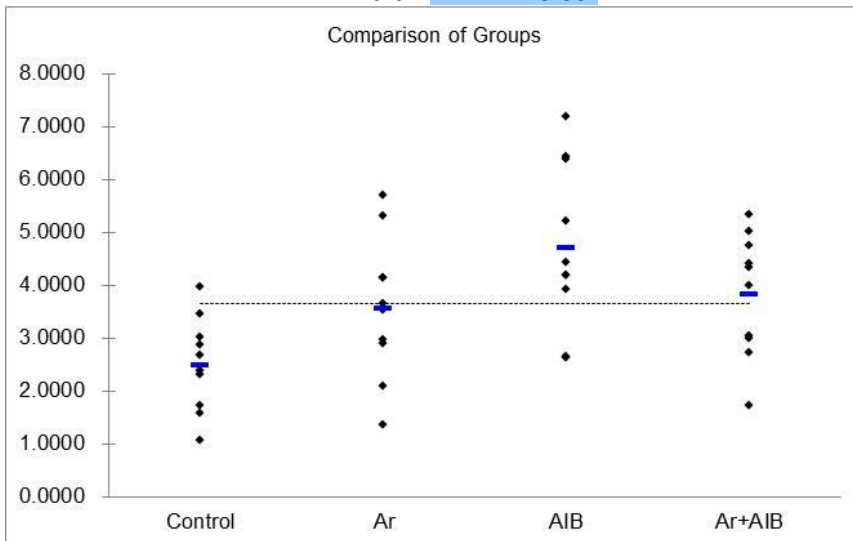
Post hoc analysis

Tukey simultaneous comparison t-values (d.f. = 36)

		Control	Ar	Ar+AIB	AIB
		2.5125	3.5860	3.8431	4.7325
Control	2.5125				
Ar	3.5860	1.90			
Ar+AIB	3.8431	2.36	0.46		
AIB	4.7325	3.94	2.03	1.58	

critical values for experimentwise error rate:

0.05	2.70
0.01	3.35



ANEXOS**ANEXO 1. Formulación del medio YEB****YEB Líquido (250ml)**

Levadura 0.25 g
 Peptona 1.25 g
 Caseína 1.25 g
 MgSO₄ 0.1225 g
 Sacarosa 1.25 g
 *Rifampicina 12.5 mg

Ajustar pH a 7.2

Esterilizar

* La Rifampicina se agrega después de esterilizar

YEB Sólido (250ml)

Levadura 0.25 g
 Peptona 1.25 g
 Caseína 1.25 g
 MgSO₄ 0.1225 g
 Sacarosa 1.25 g
 *Rifampicina 12.5 mg
 Agar 1g

ANEXO 2. Formulación de medio Mínimo (M)**Macronutrientes**

	mg litro⁻¹
KNO ₃	80
MgSO ₄ . 7H	731
KH ₂ PO ₄	4.8
KCl	65
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	288

Micronutrientes

ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2.65
H ₃ BO ₄	1.5
KI	0.75
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.0024
CuSO ₄ . 7H ₂ O	0.13
MnCl ₂ . 4H ₂ O	6.0

Fierro

NaFeEDTA	8.0
----------	-----

Suplementos orgánicos

Tiamina - HCl	0.1
Ácido Nicotínico Ac. libre	0.5
Piridoxina – HCl	0.1
Glicina	3.0
Myo – Inositol	50.0
Sacarosa	10,000.00
Agar	3,000.00
pH	5.5
Esterilizar	

ANEXO 3. Formulación de Solución nutritiva Hoagland

Macronutrientes	g litro-1
KNO ₃	10.11
KH ₂ PO ₄	2.72
Ca(NO ₃) ₂	16.41
MgSO ₄ .	4.8
Micronutrientes	
H ₃ BO ₄	2.86
MnCl ₂ 4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.22
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.08
H ₂ MoO ₄ H ₂ O	0.02

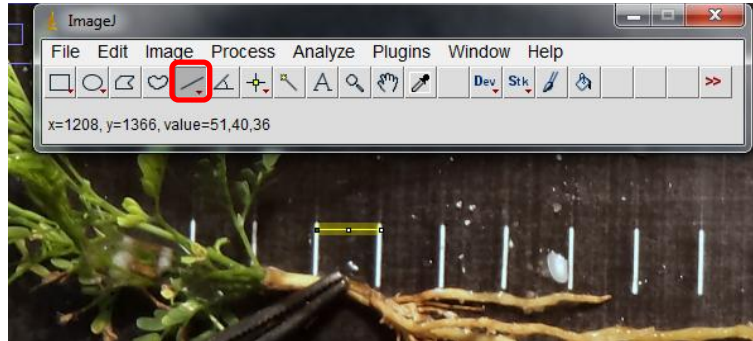
ANEXO 4. Medición de raíces (longitud)

ImageJ v1.46 es un software de edición, análisis y procesamiento de imágenes. Así como el cálculo de áreas y estadísticas del valor de los píxeles en selecciones definidas. Puede medir distancias y ángulos, crear histogramas de densidad y trazos de líneas perfiladas y dispone de calibración espacial para medir dimensiones del mundo real en unidades como los milímetros.

1. Se fotografió la plántula extendiendo su raíz sobre una escala de 0.5cm.

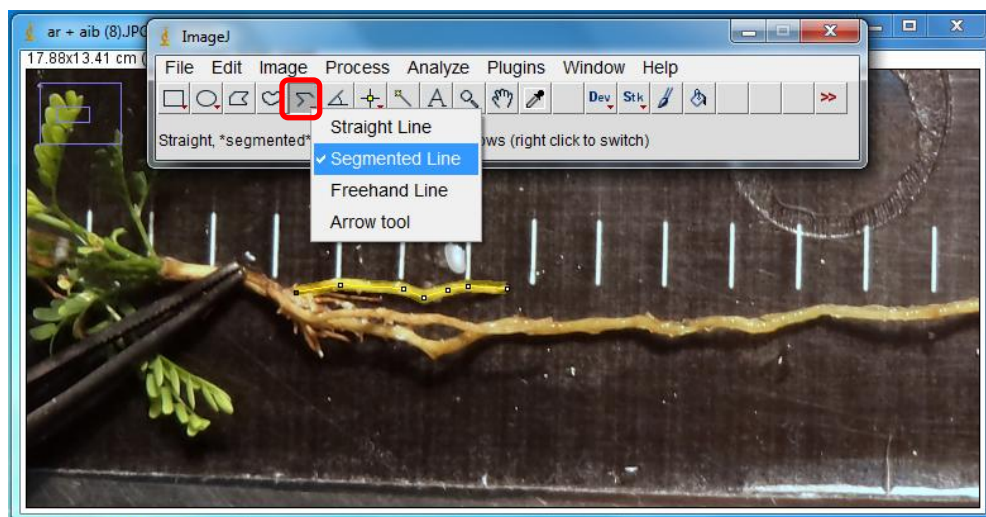


2. Ejecutar el programa ImageJ v1.46 y abrir la imagen deseada mediante el menú “File > Open”. Una vez abierta la fotografía, se selecciona la herramienta “Straight Line” y se traza una línea sobre la imagen para establecer la escala.

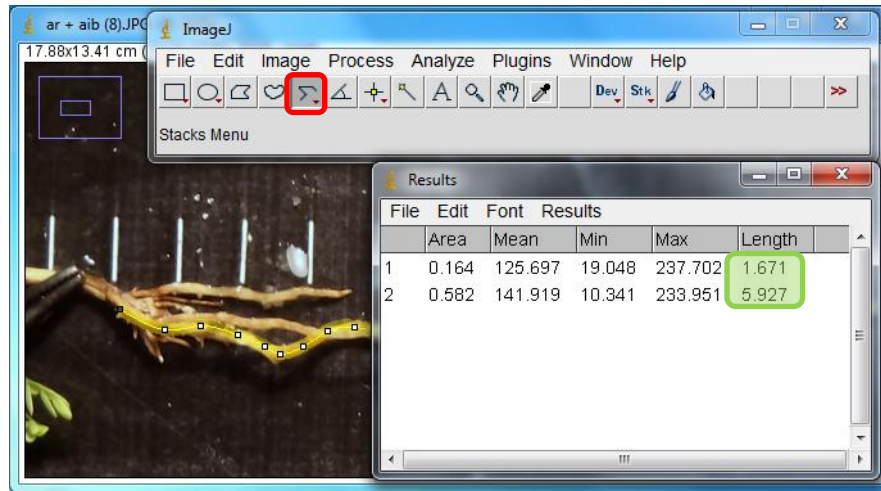


3. Para establecer la escala se selecciona el menú “Analyze > Set Scale” la cual abrirá una ventana de dialogo donde se cambiaron los parámetros “Known distance” que equivale a 0.5, “Unit of length” a cm, se activa la opción “Global” y finalmente “OK”.

4. Con el botón secundario, seleccionar la herramienta “Segmented Line” y trazar una línea a lo largo de la raíz de la cual se quiere obtener la longitud.

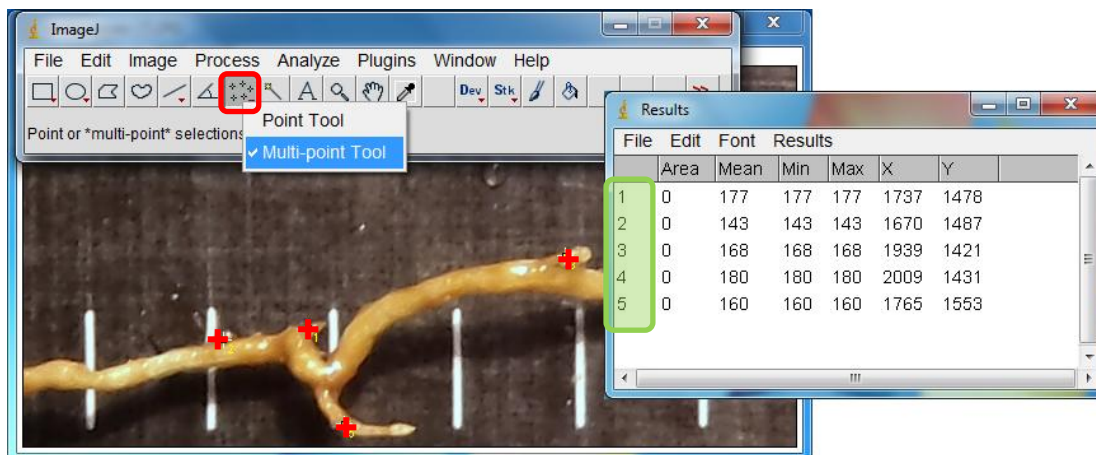


5. Para obtener la longitud en cm, se debe seleccionar el menú “Analyze > Measure” con lo que se desplegara una ventana de dialogo la cual contendrá la longitud de la raíz. Sin cerrar la ventana de dialogo, se llevaron a cabo las mediciones de las raíces restantes de la imagen siguiendo los puntos 5 y 6.



Número de primordios

Ejecutar el programa ImageJ v1.46 y abrir la imagen deseada mediante el menú File > Open. Abierta la fotografía, seleccionando la herramienta “Multi-point Tool” se marcan los primordios a lo largo de la raíz. Para obtener el número total de primordios se debe seleccionar el menú “Analyze > Measure” con lo que se desplegara una ventana de dialogo el cual contendrá el número total de primordios.



ANEXO 5. Extración de ADN bacteriano.

1. Centrifugar brevemente suspensiones bacterianas y re suspender cada paquete en 200 μ l de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, Na₂EDTA 0.1mM). Agregar a la suspensión bacteriana 200 μ l de solución de lisis 2X (Triton-X 100 4%, SDS 2%, NaCl 200 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8) más 10 μ l de enzima Proteinaza K (10 mg/mL).
2. Agitar suavemente las muestras e incubarlas durante 30 minutos a 55°C.
3. Mezclar la suspensión con medio volumen de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamilico (24:24:1), agitar por unos segundos y centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm.
4. Separar la fase acuosa y mezclarla con 200 μ l de Cloroformo-Isoamilico (24:1), agitar por unos segundos y centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm. Se separa la fase acuosa y mezclarla 200 μ l de Acetato de amonio 7.5M.
5. Dejar reposar la mezcla en hielo durante 10 minutos. Centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm y si existe algún precipitado, pasar la mezcla a un tubo nuevo y agregare 400 μ l de Isopropanol.
6. Dejar incubando la muestra a -20°C durante 2 horas para posteriormente centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm.
7. Enjuagar las pastillas de ADN obtenidas con 1mL de Etanol helado al 70% y centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm. Decantar el Etanol y secar hasta su total evaporación. Resuspender en 20 μ l de Buffer TE.
8. Comprobar la presencia de ADN en un gel de agarosa.

ANEXO 6. Protocolo de extracción con ZR PLANT/SEED DNA KIT™

1. Antes de comenzar se debe preparar la columna Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filters (tapa verde). Se retira la base, se coloca en un tubo colector y se centrifugar a 8,000 x g, durante 3 minutos para eliminar polisacáridos y polifenoles.
2. Macerar 150mg de tejito en nitrógeno líquido, transferirlo al tubo de lisis ZR BashingBead y agregar 750µl de Plant/Seed DNA Binding Buffer. Agitar en vortex durante 1 minuto.
3. Centrifugar a 10,000 x g durante 1 minuto y transferir 400 el sobrenadante al tubo Zymo-Spin™ IV Spin Filter (tapa naranja) en un tubo colector y centrifugar a 7,000 rpm durante un minuto.
4. Añadir 1,200µl de Plant/Seed DNA Binding Buffer al filtrado en el tubo colector y mezclar.
5. Transferir 800µl de la mezcla a la columna Zymo-Spin™ II Column en un tubo de colección y centrifugar a 10,000 x g durante 1 minuto.
6. Eliminar el eluido y repetir el paso anterior.
7. Añadir 200µl de DNA Pre-Wash Buffer al la columna Zymo-Spin™ II Column en un nuevo tubo de colección y centrifugar a 10,000Xg durante 1 minuto.
8. Añadir 500µl de Plant/Seed DNA Wash Buffer a la columna Zymo-Spin™ II Column y centrifugar a 10,000 x g durante 1 minuto.
9. Transferir la columna Zymo-Spin™ II Column a un tubo de colección nuevo y añadir 50-100µl de DNA Elution Buffer directamente sobre la columna y centrifugar a 10,000 x g durante 30 segundos para eluir el ADN.
10. Transferir el eluido de ADN al tubo previamente preparado Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filters y centrifugar exactamente a 8,000 x g durante 1 minuto.

ANEXO 7. Gel de agarosa 1% (20 ml)

Agarosa	0.20g
Agua Bidestilada estéril	18ml
Buffer TBE 10x	2ml
Bromuro de etidio	1mg/ml