

Variabilidad Genotípica de Cactáceas con crecimiento determinado de la raíz en la regeneración de raíces a partir de callos

SVELLANA SHISHKOVA^{1,3}, NORMA E. MORENO¹, VICENTE CASTILLO-DÍAZ¹, JESÚS ARELLANO² & JOSEPH G. DUBROVSKY¹

⁽¹⁾ DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, CUERNAVACA, MOR., MÉXICO.

⁽²⁾ CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, CUERNAVACA, MOR., MÉXICO.

⁽³⁾ email: sveta@ibt.unam.mx , sveta.shishkova@gmail.com

RESUMEN

En algunas cactáceas del Desierto de Sonora, la raíz primaria tiene crecimiento determinado: las células del meristemo apical de la raíz pasan solamente por unos pocos ciclos celulares y después se diferencian. Este tipo de crecimiento de la raíz primaria se encontró en estas cactáceas cultivadas bajo varias condiciones de crecimiento, y no se revirtió por ningún tratamiento probado. Los mecanismos involucrados en el mantenimiento del meristemo de la raíz y del crecimiento determinado de la raíz primaria en plantas, han sido poco comprendidos. En un estudio previo, establecimos un protocolo para la regeneración de raíces a partir de callos de *Stenocereus gummosus* y *Ferocactus peninsulæ* y evidenciamos que el patrón de crecimiento determinado de las raíces regeneradas, fue similar a aquel de la raíz primaria. En este trabajo, mostramos que el genotipo de la planta es muy importante para la regeneración de raíces a partir de callos de *S. gummosus* y *F. peninsulæ*. Estos hallazgos permitirán el futuro análisis del papel de ciertos genes de las Cactaceae en el patrón de crecimiento determinado de la raíz por la vía de la regeneración de raíces transgénicas a partir de callos transformados.

Palabras Clave: Cactaceae; crecimiento determinado de la raíz; cultivo *in vitro*; desarrollo de plantas.

ABSTRACT

*In some Sonoran Desert Cactaceae the primary root has a determinate root growth: the cells of the root apical meristem (RAM) undergo only a few cell division cycles and then differentiate. The determinate growth of primary roots in Cactaceae was found in plants cultivated under various growth conditions, and could not be reverted by any treatment tested. This mode of development is important for rapid lateral-root formation and a successful seedling establishment in a desert. The mechanisms involved in root meristem maintenance and determinate root growth in plants remain poorly understood. In our previous study, a protocol for root regeneration from callus of *Stenocereus gummosus* and *Ferocactus peninsulæ* was established, and it was shown that regenerated roots have the determinate growth pattern similar to that of the primary root. In this work we demonstrate that plant genotype is very important for the root regeneration from callus. These findings will permit future analysis of the role of certain Cactaceae genes in the determinate pattern of root growth via the regeneration of transgenic roots from transformed calli.*

Key Words: Cactaceae; determinate root growth; in vitro culture; plant development.

En algunas cactáceas del Desierto de Sonora, la raíz primaria tiene crecimiento determinado: las células del meristemo apical de la raíz pasan solamente por unos pocos ciclos celulares y después se diferencian (Dubrovsky, 1997). Como consecuencia, la raíz primaria deja de crecer (Figura 1). Mientras procede el agotamiento del meristemo, los pelos radicales se aproximan a la punta de la raíz hasta que la cubren completamente (Figura 2) y la cofia se pierde. La raíz primaria de las plántulas de las especies empleadas en el presente trabajo, *Stenocereus gummosus* y *Ferocactus peninsulæ*, crece durante 2 a 3 días después del inicio de la germinación (Dubrovsky, 1997), mientras que el crecimiento de la raíz primaria de otra especie, *Pachycereus pringlei*, dura de 6 a 8 días (Dubrovsky & Gómez-Lomelí, 2003). Este tipo de crecimiento es una adaptación a las condiciones del desierto, porque la terminación del crecimiento de la raíz primaria induce el desarrollo de las raíces laterales y así facilita el establecimiento rápido de la plántula. Muchas raíces laterales también presentan crecimiento determinado y de esta manera promueven el desarrollo de raíces laterales de segundo orden (Dubrovsky, 1999). El sistema radical desarrollado rápidamente permite a las plántulas jóvenes aprovechar el agua que es un recurso muy limitado. En la Figura 3 se muestran las plantas de *S. gummosus* y *F. peninsulæ* en su habitat natural.

S. gummosus, o pitaya agria, es una especie codominante del Desierto de Sonora. Esta especie presenta potencial económico para la producción de frutos para el consumo humano, que actualmente se recolectan en poblaciones silvestres y se venden en los mercados (Dubrovsky, 1999). Además, se vende como planta medicinal para los tratamientos de alta presión arterial, picadura de abeja, veneno de mantarraya y víboras (Encarnación-Dimayuga, 1996). Las especies del género *Ferocactus* se emplean en la medicina tradicional, elaboración de dulces, como forraje y como fuente de agua para animales domésticos; los botones florales y frutos se consumen por los indígenas (Del Castillo & Trujillo, 1991, citado por Maiti *et al.*, 2003). *P. pringlei*, o cardón, que también es una especie codominante del Desierto de Sonora, presenta un gran impacto en la fijación de suelos, prevención de la erosión y el mantenimiento de ecosistemas (Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada, 1978). Considerando la distribución y diversidad de usos de estas especies, es importante conocer su biología de desarrollo, para los fines de reforestación, cultivo y domesticación.

El crecimiento determinado de la raíz primaria se ha descrito solamente en algunas cactáceas, mientras que las raíces laterales o adventicias de algunas otras especies también presentan este tipo de crecimiento. Algunos ejemplos de esto son las raíces proteoides de plantas de la familia *Proteaceae* (Skene *et al.* 1996, revisión Shane & Lambers, 2005) y de otras familias (Dinkelaker *et al.* 1995), que se forman cuando las plantas crecen en suelos con una baja concentración de fosfatos; los agrupamientos de raíces laterales ("cluster roots") de *Opuntia arenaria* (Boke, 1979) y algunas raíces laterales de maíz (Varney & McCully 1991). Recientemente se reportó que las plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en medio con una baja concentración de fosfatos muestran crecimiento determinado irreversible de la raíz primaria. En este caso la proliferación celular cesa y la diferenciación celular se lleva a cabo en los sitios anteriormente ocupados por las zonas meristemática y de elongación (Sánchez-Calderón *et al.*, 2005). Las raíces primarias de plantas de *A. thaliana* crecidas en otras condiciones, por

ejemplo, en alta concentración de fosfatos, así como plantas privadas de potasio, nitrato, sulfuro o fierro, muestran el patrón indeterminado del crecimiento de la raíz.

Existen algunas mutantes de *A. thaliana* que muestran características de agotamiento del meristemo y, como consecuencia, del crecimiento determinado de la raíz primaria. Entre ellos podemos nombrar mutantes en los genes *SHORT ROOT (SHR)* y *SCARECROW (SCR)*, genes redundantes *PLETHORA1 (PLT1)* y *PLETHORA2 (PLT2)*, todos ellos codifican para factores de transcripción (Benfey *et al.*, 1993; Di Laurenzio *et al.*, 1996, Sabatini *et al.*, 2003; Aida *et al.*, 2004), así como varias mutantes en genes involucrados en el metabolismo, percepción o transporte de auxinas (ver revisión Jiang & Feldman, 2005).

A pesar de que la existencia del crecimiento determinado de la raíz de algunas especies se reportó hace 30 años, hasta la fecha los mecanismos que regulan este tipo de crecimiento se desconocen. Existe la hipótesis de que la organización del meristemo apical de la raíz depende de la formación y el mantenimiento del centro quiescente (Kerk & Feldman, 1995). De acuerdo con esta hipótesis, demostramos que en la raíz primaria de las plantas de la especie *S. gummosus* el centro quiescente no se establece durante los 2 ó 3 días que dura su desarrollo, y en la raíz primaria de *P. pringlei*, que crece durante más tiempo, el centro quiescente se establece solamente en la etapa inicial de desarrollo y luego desaparece (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2003). Evidenciamos también, que la muerte celular programada no participa en el proceso de agotamiento del meristemo, aunque ocurre en algunos tejidos de la punta de raíz de *S. gummosus* y *P. pringlei* (Shishkova & Dubrovsky, 2005).

Actualmente estamos empezando a desarrollar un proyecto dedicado a la identificación de los genes de las cactáceas con crecimiento determinado de la raíz primaria, que se expresan diferencialmente en las etapas inicial y terminal del crecimiento de la raíz determinada, y así elucidar los genes importantes para el crecimiento determinado. También planeamos analizar el papel de genes identificados, que podrían funcionar en procesos de mantenimiento y agotamiento del meristemo. Debido a varias razones, no se puede llevar a cabo el análisis del tipo de crecimiento de las raíces primarias de cactáceas transformadas genéticamente, porque para las especies de cactáceas de interés no es factible obtener semillas de plantas transgénicas. Por eso, estamos en el proceso de establecer un sistema artificial homólogo para analizar el papel de los genes de interés en el crecimiento determinado de la raíz en las cactáceas. Este sistema consiste en la obtención de callos transformados *in vitro* de las especies de cactáceas de interés, por *A. tumefaciens*, la regeneración de las raíces transgénicas a partir de estos callos y el análisis del tipo de crecimiento de las raíces regeneradas. En la etapa anterior de este trabajo demostramos que se puede regenerar raíces a partir de callos de *S. gummosus* y *F. peninsulæ*, y que estas raíces tienen el patrón determinado de crecimiento (García-Mendoza *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en esa etapa sugieren que la regeneración de raíces a partir de los callos de estas especies depende no solamente de las concentraciones de auxinas y citocininas, sino también de los genotipos de las plantas que originan los callos. En el presente trabajo evidenciamos la importancia del genotipo de estas cactáceas en la regeneración de raíces a partir de callos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal, condiciones de crecimiento, inducción y propagación de callo

Semillas de *Stenocereus gummosus* (Engelm.) Gibson & Horak y *Ferocactus peninsulae* (F.A.C. Weber) Britton & Rose, fueron colectadas y esterilizadas como lo describen Shishkova & Dubrovsky (2005). Las semillas fueron germinadas sobre medio MS al 50% (GibcoBRL-Life Technologies, Grand Island, NY, USA) en cajas de Petri mantenidas en posición horizontal. Las plántulas fueron cultivadas en una cámara de crecimiento a una temperatura de $29 \pm 1^\circ\text{C}$, intensidad luminosa de $190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperíodo de 12 h luz / 12 h oscuridad. Las mismas condiciones, fueron utilizadas para la inducción de callo, aunque también se utilizó oscuridad continua para propagación de callo y regeneración de raíces de *F. peninsulae*. Tres explantes de cada plántula de 14 días (2 cotiledones y un hipocotilo), fueron colocados sobre medio de inducción de callo (MIC), el cual contiene las sales MS, las vitaminas del medio de Gamborg B5, sacarosa al 3 % y agar al 0.8 %, suplementado con una auxina y una citocinina. Se utilizaron tres concentraciones de la auxina ácido 1-Naftalenacético (ANA o N cuando se hace referencia a la concentración en los medios en mg/L) y de la citocinina 6-Benciaminopurina (BA o B cuando se hace referencia a la concentración en los medios en mg/L) en tres diferentes MICs: N1B5, N5B1 y N5B5. Por cada caja de Petri se colocaron los explantes de seis plántulas en seis secciones correspondientes. Cuatro semanas después, los callos generados fueron separados de los explantes y se transfirieron a nuevas cajas de Petri con el MIC fresco correspondiente, para su propagación por otras cuatro semanas.

Regeneración de raíces a partir de callos

Cuatro semanas después, se colocaron diez fragmentos de callos de aproximadamente 0.5 cm de diámetro por cada caja de Petri que contenía medio de regeneración de raíces (MRR). El MRR contiene las sales y vitaminas de MS, sacarosa al 2 % y agar al 0.8 %, además fue suplementado con ANA solo o en combinación con BA [mg/l]. Se utilizaron de dos a cuatro MRR diferentes para regeneración de raíces a partir de callos, según la cantidad de callo generada por cada plántula. Para algunas plantas que produjeron poco callo se utilizaron solamente los MRRs N5 y N5B0.01 y para aquellas plántulas que generaron una mayor cantidad de callo, se utilizaron además los medios N3 y N3B0.01, estas últimas fueron la mayoría. Para analizar el impacto del genotipo y del medio de cultivo sobre la regeneración de raíces se registró y se dio seguimiento en cada subcultivo, al número de planta y tipo de explante. Para *S. gummosus*, la inducción de callo y la regeneración de raíces fue llevada a cabo solamente en condiciones de fotoperíodo, mientras que en *F. peninsulae*, el callo fue inducido en fotoperíodo de 12 h y después el callo proveniente de cada plántula fue dividido en dos; una mitad fue propagada en fotoperíodo y la otra fue propagada en oscuridad sobre el mismo MIC. Estos callos se incubaron otras cuatro semanas y después se transfirieron a los medios MRR. La etapa de regeneración de raíces se llevó a cabo en la misma condición que la propagación de callos, es decir, en fotoperíodo y en oscuridad. El número total de raíces regeneradas por cada caja de Petri fue registrado después de otras cuatro semanas y de

esta forma se analizó el efecto del genotipo y de la concentración de hormonas en el medio de cultivo. A menos que se establezca de otra manera, todos los reactivos utilizados, fueron de Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA).

Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANDEVA) y la significancia de las diferencias entre genotipos fue determinada de acuerdo con la prueba HSD de Tukey.

RESULTADOS

Los callos de cotiledones y de hipocótilo de *S. gummosus* y *F. peninsulae* se indujeron y se propagaron en tres medios MICs, A5B5, A5B1 y A1B5. En experimentos anteriores evidenciamos, que se induce una mayor cantidad de callo en el MIC A5B5 para ambas especies (Figura 4). En los MICs A5B1 y A1B5 se induce también una cantidad considerable de callo, aunque menos, que en el MIC A5B5. Empleamos estos tres medios con una relación auxina/citocinina igual a uno en MIC A5B5, igual a cinco en MIC A5B1 e igual a 0.2 en MIC A1B5, para saber si la relación entre auxina y citocinina en los medios para inducir y propagar los callos es importante para la regeneración de raíces a partir de estos callos. Para cada callo se registró su origen, es decir, el número de la planta y tipo de explante del que se originó.

Como en los experimentos anteriores encontramos que la regeneración de raíces a partir de callos de *S. gummosus* es eficiente solamente en la condición de fotoperiodo, mientras que para *F. peninsulae* tanto fotoperiodo, como oscuridad no impiden la regeneración de las raíces, los callos de *S. gummosus* se indujeron y se cultivaron solamente en fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad. Los callos de *F. peninsulae* se indujeron en fotoperiodo, y posteriormente se dividieron en dos partes para su propagación y posterior inducción de raíces en dos condiciones, fotoperiodo y oscuridad permanente. Para la regeneración de raíces, diez fragmentos de callos con un diámetro de 0.5 cm aproximadamente, se transfirieron a cajas Petri conteniendo los MRRs N5 y N5B0.01; para algunas plantas de *S. gummosus*, que formaron una mayor cantidad de callo, también se transfirieron a los MRRs N3 y N3B0.01.

Después de las cuatro semanas de cultivo en los MRRs, analizamos los resultados de regeneración de las raíces a partir de los callos. Como nuestro objetivo principal es usar el sistema de regeneración de raíces para el estudio del crecimiento determinado de la raíz, en todos los experimentos estuvimos revisando el patrón determinado del crecimiento de las raíces regeneradas. Previamente se demostró que la presencia de los pelos radicales en la punta de raíz es una simple indicación morfológica de la terminación del crecimiento de la raíz (Dubrovsky, 1997). Después de cuatro semanas del cultivo de callos en los MRRs, los pelos radicales cubrían la punta de muchas de las raíces regeneradas. También, para algunas raíces regeneradas, en algún momento de su desarrollo se pudo observar la punta no cubierta por los pelos radicales, que correspondía a las zonas meristemática y de la elongación, pero después de unos días, la misma raíz cesaba su crecimiento y los pelos radicales llegaban a cubrir la punta (Figura 5 a, b). Las raíces regeneradas separadas de los callos y cultivadas en cajas Petri en posición vertical, en medio MS sin fitohormonas por 30 días ya no crecieron,

o crecieron unos pocos milímetros y cesaron el crecimiento (Figura 6). En su totalidad, las raíces regeneradas de ambas especies de cactáceas tuvieron el mismo patrón de crecimiento determinado.

Llevamos a cabo un experimento control empleando una especie con crecimiento indeterminado de la raíz: tabaco (*Nicotiana tabacum* L). Para la inducción y propagación del callo en este caso se utilizó el MIC N1B0.2. Las raíces de tabaco se regeneraron a partir de callos en oscuridad después de las cuatro semanas de cultivo en el MRR N1 (Figura 7). Las raíces regeneradas a partir de callos de tabaco siempre tuvieron una parte distal de la raíz no cubierta por pelos radicales. Además, las raíces de tabaco separadas de los callos y cultivadas en cajas Petri en posición vertical, continuaron su crecimiento todo el tiempo del experimento, es decir, de 4 a 6 semanas. Como lo señalamos anteriormente, esto no ocurrió con las raíces regeneradas de las cactáceas (Figuras 6, 7). Estas observaciones confirman que el crecimiento determinado de las raíces regeneradas de las cactáceas se debe al programa genético de desarrollo de la raíz en estas especies, y no a las particularidades de la regeneración de las raíces en el cultivo *in vitro*.

Como todas las raíces regeneradas de las cactáceas tuvieron patrón determinado de crecimiento, procedimos al análisis de la eficiencia de la regeneración de raíces a partir de los callos en función de los MICs y MRRs empleados, el tipo de explante (cotiledón o hipocótilo), y el genotipo de la planta. Para esto, se registró la cantidad de raíces regeneradas a partir de 10 fragmentos de callo que se colocaban en cada caja Petri (Tablas 1 y 2). Estos 10 callos siempre provenían del mismo explante y de la misma planta. Los datos obtenidos se agruparon por número de planta y tipo del explante. Encontramos que la eficiencia de la regeneración de raíces dependería en gran parte del genotipo de la planta que dio origen al callo, y en menor grado del tipo de explante o variación de fitohormonas en los MICs y MRRs.

Para ambas especies, los callos derivados de aproximadamente la mitad de las plantas, no regeneraron raíces o regeneraron muy pocas, como una o dos raíces en diez fragmentos de callos (estas plantas están marcadas con un asterisco “*” en las Tablas 1 y 2). Esta eficiencia muy baja de la regeneración de raíces se encontró para callos inducidos a partir tanto de cotiledones, como de hipocotilos, en todos los MICs y cultivados en todos los MRRs. Para algunas de las plantas de este grupo, analizamos la regeneración de raíces en hasta 160 fragmentos de callos derivados del mismo explante, por ejemplo, callos de cotiledones de la planta G1-5 de la tabla 1, y ninguno de ellos regeneró raíces. La regeneración de raíces fue más eficiente para la otra mitad de plantas de ambas especies. Para *S. gummosus*, aproximadamente una cuarta parte del número total de las plantas presentó la regeneración más eficiente de raíces a partir de callos derivados de hipocotilo, en comparación con los callos derivados de cotiledones (plantas con estos genotipos están marcadas con dos asteriscos “**” en la Tabla 1). En la cuarta parte restante de las plantas se observó una eficiencia similar en la regeneración de raíces en callos derivados de ambos tipos de explantes (plantas marcadas con tres asteriscos “***” en la Tabla 1), o una regeneración más eficiente de las raíces a partir de callos derivados de cotiledones, que a partir de los callos derivados de hipocotilo (plantas

marcadas con cuatro asteriscos “****” en la Tabla 1). El análisis de varianza de una vía de la regeneración de raíces para algunos genotipos de *F. peninsulæ* evidenció que no hubo diferencia significativa en eficiencia de la regeneración de las raíces entre los diferentes MICs o diferentes MRRs, probablemente debido a la variabilidad alta de la respuesta entre plantas individuales. Algunos genotipos fueron claramente diferentes de otros en su eficiencia de regeneración de raíces ($P < 0.05$).

Para la otra especie, *F. peninsulæ*, desde los experimentos preliminares supimos que es posible regenerar raíces a partir de callos en condiciones tanto de fotoperiodo, como de oscuridad; aunque anteriormente no se evaluó cual de estas dos condiciones es más favorable. Es por eso que incluimos al análisis no solamente el tipo de explante que originó los callos y los MICs y MRRs, sino también la condición de cultivo, fotoperiodo u oscuridad permanente. Encontramos mayor variabilidad dentro de la segunda mitad de las plantas, en los callos de las cuales regeneraron raíces. Similar a los datos de *S. gummosus*, aproximadamente la mitad de este grupo de plantas de *F. peninsulæ*, o la cuarta parte del número total de plantas, demostró una regeneración de raíces más eficiente a partir de callos generados de hipocotilo (plantas marcadas con dos asteriscos “**” en la Tabla 1). En la otra cuarta parte de las plantas se observaron patrones variables. Por ejemplo, algunas plantas presentaron una regeneración de raíces más eficiente en fotoperiodo, que en la oscuridad, en los callos derivados de cotiledones (“**1” en la Tabla 2); mientras que para otras plantas se observó una regeneración de raíces más eficiente en la oscuridad, que en fotoperiodo, a partir de los callos generados de ambos tipos de explantes (“**2” en la Tabla 2). Aparentemente, en los dos MRRs empleados en este análisis, los callos de algunas plantas regeneran más raíces en oscuridad, mientras que los callos de algunas otras plantas regeneran más raíces en fotoperiodo. Para una planta, se observó la regeneración más eficiente de raíces en el MRR suplementado con una pequeña cantidad de BA, comparado con el MRR sin BA a partir de callos inducidos en ambos tipos de explantes y en ambas condiciones de crecimiento. El análisis de varianza de tres factores de la regeneración de raíces para cuatro genotipos seleccionados de *F. peninsulæ* evidenció que no hubo diferencia significativa entre los diferentes MICs o MRRs, entre cotiledones versus hipocotilos, ni entre condiciones de fotoperiodo versus oscuridad (Tabla 3). El análisis de varianza de dos factores demostró una clara diferencia entre los genotipos ($p < 0.0003$); y una fuerte interacción entre el genotipo y la condición, para los callos inducidos tanto de cotiledones como de hipocotilos (Tabla 4).

DISCUSIÓN

En cactáceas, las técnicas del cultivo de tejidos y regeneración *in vitro* se han usado principalmente con fines de micropropagación (Rubluo *et al.* 2002, Perez-Molpe-Bach *et al.* 2002). Existen escasas publicaciones sobre regeneración de brotes a partir de callos, por ejemplo, Moebius-Goldammer *et al.* (2003). Aunque desde el trabajo de Skoog & Miller (1957) se sabe que para algunas especies de plantas, altos niveles de auxina en el medio de cultivo, promueven la formación de raíces, las técnicas comunes de regeneración de plantas a partir de callos implican la regeneración de brotes primero y el enraizamiento posterior de

los brotes regenerados. No es común que para cactáceas ni para otras especies vegetales se empleen sistemas de regeneración de raíces a partir de callos, similares a lo que necesitamos nosotros. Por lo tanto, al principio de este trabajo nos enfrentamos con una tarea difícil: el reto de establecer un protocolo para la regeneración de las raíces a partir de callos. Las condiciones, las formulaciones de los medios de cultivo y las concentraciones de la auxina ANA y la citocinina BA elegidas, permitieron cumplir satisfactoriamente este objetivo.

Sin embargo, encontramos variabilidad significativa en las respuestas de distintas plantas a las concentraciones de fitohormonas en los medios de cultivo. Observamos una eficiencia variable de la inducción de callos a partir de explantes de diferentes plantas en el mismo MIC (Figura 4). Llevando a cabo el análisis de la formación de callos y regeneración de raíces, evidenciamos que el genotipo de las plantas influye significativamente en la eficiencia de regeneración de raíces a partir de callos. Desde hace tiempo se sabe que el genotipo de las plantas es importante para las respuestas morfogénicas en el cultivo *in vitro* (se pueden encontrar varios ejemplos de este fenómeno, uno de ellos es el artículo de Lutova *et al.* 1994). Para especies con polinización cruzada, como las cactáceas con que estamos trabajando, este efecto es predecible. (Como cada planta con que estuvimos trabajando, se caracteriza por su genotipo único, en el contexto de este trabajo podemos usar los términos “planta” y “genotipo” como sinónimos.) Los callos obtenidos a partir de cotiledones y de hipocotilo de la misma planta generalmente mostraban una capacidad muy similar de regenerar raíces en dos o cuatro MRRs utilizados. Esta capacidad fue alta para algunas plantas, mediana para otras, muy baja o nula para el resto de los genotipos. Además, para los callos inducidos en tres diferentes MICs encontramos plantas en una proporción similar con estos tres tipos de capacidad de regenerar raíces. Entonces, la influencia del genotipo de las plantas utilizadas sobre la regeneración de raíces es más fuerte que la influencia de las concentraciones de hormonas en los medios de cultivo y el tipo de explante que generó los callos. Aplicando el análisis de varianza, no encontramos diferencias significativas en la eficiencia de regeneración de las raíces, entre los MICs con tres diferentes proporciones en la concentración de auxina/citocinina: 1 (N1B1, N5B5), 0.2 (N1B5) o 5 (N5B1) que utilizamos. Interesantemente, para la especie *S. gummosus* logramos la regeneración eficiente de raíces solamente en condición de fotoperiodo, mientras que *F. peninsulae* mostró capacidad de regenerar raíces tanto en fotoperiodo como en oscuridad. Estas diferencias podrían estar relacionadas con diferencias en el hábito de crecimiento de estas especies: en la naturaleza, *S. gummosus* forma muchas raíces adventicias en ramas troncales, lo que no se observa para las plantas de *F. peninsulae*. Aunque de los estudios de mutantes de *A. thaliana* se conocen algunos genes que pueden estar involucrados en la regulación del crecimiento determinado de la raíz, los mecanismos que regulan este tipo de crecimiento se desconocen. Debido a que la raíz primaria de todas las plantas de las cactáceas que estamos estudiando en todas las condiciones presenta el patrón determinado de desarrollo, estas especies representan un sistema modelo idóneo para la investigación de los mecanismos de este tipo de crecimiento, es decir, del mantenimiento y agotamiento del meristemo. Para investigar los mecanismos genéticos de este tipo de crecimiento, es necesario encontrar los genes potencialmente involucrados en este tipo de

crecimiento, que es la tarea que estamos empezando a llevar a cabo y, de esta forma, analizar el efecto de estos genes en el desarrollo de la raíz. Para hacerlo en raíces primarias transgénicas, tendríamos que obtener plantas transgénicas, semillas de estas plantas y germinarlas, lo que no es factible para las especies de cactáceas con crecimiento determinado. Las plantas transgénicas de las especies en cuestión (en el caso de poder elaborar el protocolo de la regeneración de plantas transformadas) tardarían varios años para llegar al estado reproductivo. Además, muchas especies de cactáceas son autoincompatibles, entonces, tener una planta en floración no garantizaría la obtención de semillas, se necesitarían por lo menos dos plantas transgénicas que florezcan simultáneamente. *S. gummosus* es una especie autoincompatible (Clark-Tapia & Molina-Freaner, 2003), las especies del género *Ferocactus*, al parecer, también son autoincompatibles (McIntosh, 2002).

Todas las raíces regeneradas y analizadas de ambas especies utilizadas mostraron patrón determinado de crecimiento. Este descubrimiento nos permite desarrollar un sistema artificial de análisis de los efectos de sobreexpresión o inhibición de los genes en raíces transgénicas regeneradas, que consiste en obtención de callos transformados con el uso de agrobacterias y la regeneración de raíces transgénicas a partir de estos callos. Para el día de hoy, demostramos la posibilidad de obtener callos de *S. gummosus* transformados por *Agrobacterium tumefaciens* y estamos en el proceso de obtener las raíces de estos callos. El estudio de los mecanismos de crecimiento determinado en las cactáceas desérticas será de mucha utilidad, tanto para ampliar el conocimiento general sobre los mecanismos del desarrollo de la raíz, como para entender mejor cómo se adaptan las cactáceas a los ambientes áridos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el excelente apoyo técnico de Selene Napsucialy Mendívil, la ayuda de Natalia Doktor en la elaboración de las figuras, y el apoyo financiero de DGAPA-PAPIIT (Universidad Nacional Autónoma de México), proyecto IN227206. Agradecemos también la participación de los estudiantes de licenciatura/pregrado E. Edith García Mendoza en la etapa de elaboración del sistema de regeneración de raíces anterior a este trabajo y Epifanio Sevilla Mendoza en experimentos de la etapa inicial de este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Aida, M., D. Beis, R. Heidstra, V. Willemsen, I. Blilou, C. Galinha, L. Nussaume, Y.-S. Noh, R. Amasino, & B. Scheres. 2004. The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell* 119(1):109-120.
- Benfey, P. N., P. J. Linstead, K. Roberts, J. W. Schiefelbein, M.-T. Hauser, & R. A. Aeschbacher. 1993. Root development in Arabidopsis: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* 119(1):57-70.
- Boke, N. H. 1979. Root glochids and root spurs of *Opuntia arenaria* (Cactaceae). *Am J Bot* 66(9):1085-1092.
- Bravo-Hollis & R. E. Sánchez-Mejorada. 1978. Las Cactáceas de México. 2da Ed. Volumen I, Instituto de Biología, UNAM. Cd. México.

- Clark-Tapia, R., & F. Molina-Freaner. 2003. The genetic structure of a columnar cactus with a disjunct distribution: *Stenocereus gummosus* in the Sonoran Desert. *Heredity* 90(6):443-50.
- Di Laurenzio, L., J. Wysocka-Diller, J. E. Malamy, L. Pysh, Y. Helariutta, G. Freshour, M. G. Hahn, K. A. Feldmann, & P. N. Benfey. 1996. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell* 86(3):423-433.
- Dinkelaker, B., C. Hengeler & H. Marschner. 1995. Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. *Bot. Acta* 108(2):183-200.
- Dubrovsky, J. G. 1997. Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert Cactaceae; its organization, cellular basis, and ecological significance. *Planta* 203(1):85-92.
- Dubrovsky, 1999. Desarrollo del sistema radical durante la ontogénesis de plantas del género *Stenocereus* (Cactaceae). En: Pimienta, E. (Ed.), *El pitayo en Jalisco y especies afines en México*. 133-173. Universidad de Guadalajara, Jalisco.
- Dubrovsky, J. G. & Gómez-Lomelí, L.F. 2003. Water deficit accelerates determinate developmental program of the primary root and does not affect lateral root initiation in a Sonoran Desert cactus (*Pachycereus pringlei*, Cactaceae). *Am. J. Bot.* 90(6):823-831.
- Encarnación-Dimayuga, R. 1996. *Medicina Tradicional y Popular de Baja California Sur*. 1ra Ed. SEP-UABCS. La Paz.
- García-Mendoza, E.E., S. Shishkova & J.G. Dubrovsky. 2003. Root regeneration from callus in some cactaceae. XI National Congress of Biochemistry and Molecular Biology of Plants and 5th Symposium Mexico - USA, Acapulco, Mexico, November 3-7, 2003.
- Jiang, K. & L. J. Feldman. 2005. Regulation of root apical meristem development. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 21:485-509.
- Kerk N. M., & L. J. Feldman 1995. A biochemical model for the initiation and maintenance of the quiescent center: implications for organization of root meristems. *Development* 121(9):2825-2833.
- Lutova L. A., L. V. Bondarenko, I. S. Buzovkina, E. A. Levashina, O. N. Tikhodeev, L. T. Hodjaiova, N. V. Sharova, & S. O. Shishkova. 1994. The influence of plant genotype on regeneration processes. *Russ. J. Genet.* 30(10):928-936.
- Maiti R.K., A. Baquie-Leal, & V.P. Singh. 2003. A review on *Ferocactus* species of Cactaceae. *Crop Research* 26(2):208-218.
- McIntosh M. E. 2002. Plant size, breeding system, and limits to reproductive success in two sister species of *Ferocactus* (Cactaceae) *Plant Ecology* 162(2):273-288.
- Moebius-Goldammer, K. G., M. Mata-Rosas, & V. M. Chavez-Avilla. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 39(4):388-393.
- Perez-Molpe-Bach, E., M. E. Pérez-Reyes, C. A. Davila-Figueroa, & E. Villalobos-Amador. 2002. *In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran Desert. *Hortiscience* 37(4):693-696.

- Rodríguez-Rodríguez F., S. Shishkova, S. Napsucialy-Mendivil & J. G. Dubrovsky. 2003.** Apical meristem organization and lack of quiescent center establishment in Cactaceae roots with determinate growth. *Planta* 217(6):849-857.
- Rubluo, A., T. Marín-Hernández, K. Duval, A. Vargas, & J. Marquez-Guzmán. 2002.** Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sanchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia Horticulture* 95(4): 341-349.
- Sabatini, S., D. Beis, H. Wolkenfelt, J. Murfett, T. Guilfoyle, J. Malamy, P. Benfey, O. Leyser, N. Bechtold, P. Weisbeek, & B. Scheres. 1999.** An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99(5):463-472.
- Sánchez-Calderón, L., J. López-Bucio, A. Chacón-López, A. Cruz-Ramírez, F. Nieto-Jacobo, J. G. Dubrovsky & L. Herrera-Estrella. 2005.** Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell. Physiol.* 46(1):174-184.
- Shishkova, S. & J.G. Dubrovsky. 2005.** Developmental programmed cell death in primary root of Sonoran Desert Cactaceae. *Am. J. Bot.* 92(9):1590-1594.
- Shane, M. W. & H. Lambers. 2005.** Cluster roots: A curiosity in context. *Plant and Soil* 274(1-2):101-125.
- Sken, K. R., M. Kierans, J. I. Sprent & J. A. Raven. 1996.** Structural aspects of cluster root development and their possible significance for nutrient acquisition in *Grevillea robusta* (Proteaceae) *Ann. Bot.* 77(5):443-451.
- Varney & McCully. 1991.** The branch roots of *Zea*. II. Developmental loss of the apical meristem in field-grown roots. *New Phytol.* 118(4):535-546

Tabla 1. Número de raíces regeneradas a partir de callos de *S. gummosus*.

# de planta (genotipo)	Callos de cotiledones				Callos de hipocotilos			
	MRR				MRR			
	N3	N3 B0.01	N5	N5 B0.01	N3	N3 B0.01	N5	N5 B0.01
MIC: ANA 5 mg/l, BA 5 mg/l								
G1-5*	0/30	0/40	0/50	0/40	0/10	0/10	1/10	1/10
G2-5*	1/20	0/10	0/10	0/20	0/10	0/10	0/10	0/10
G3****	-	-	54 / 40	53 / 40	-	-	9 / 10	17 / 10
G3-5***	6/10	11/10	6/10	24/10	19/20	-	17/10	14/10
G4*	-	-	0 / 30	0 / 30	-	-	0 / 30	0 / 30
G5**	-	-	2 / 20	0 / 20	-	-	10 / 20	30 / 20
G6**	-	-	2 / 20	0 / 20	-	-	13 / 20	13 / 20
G7****	-	-	15 / 20	17 / 20	-	-	6 / 20	9 / 20
G9*	-	-	0 / 10	2 / 20	-	-	0 / 10	0 / 10
G11-5*	-	-	0 / 10	0 / 10	-	-	0 / 10	1 / 10
G14-5**	-	-	3 / 20	6 / 20	-	-	32 / 20	26 / 20
MIC: ANA 5 mg/L, BA 1 mg/L								
G21-5***	5/10	21/20	18/20	40/10	6/10	69/20	25/20	72/20
G24*	-	-	0 / 20	0 / 20	-	-	0 / 20	0 / 20
G24-5**	-	-	1 / 10	0 / 10	-	-	8 / 10	15 / 10
G25*	-	-	0 / 10	0 / 10	-	-	0 / 10	0 / 10
G25-5***	-	-	15 / 10	12 / 10	-	-	14 / 10	6 / 10
G26*	-	-	0 / 20	0 / 20	-	-	0 / 20	1 / 20
G28-5*	-	-	0 / 30	0 / 30	-	-	0 / 10	1 / 10
G29*	-	-	2 / 20	0 / 20	-	-	0 / 50	2 / 50
G30****	-	-	61 / 30	74 / 30	-	-	2 / 20	24 / 20
G31*	-	-	0 / 10	0 / 10	-	-	2 / 20	2 / 20
MIC: ANA 1 mg/L, BA 5 mg/L								
G23-5**	-	-	8 / 30	19 / 30	-	-	60 / 16	28 / 15
G27*	-	-	0 / 30	0 / 30	-	-	0 / 30	0 / 30
G33*	-	-	0 / 20	0 / 20	-	-	0 / 20	0 / 20
G34*	-	-	0 / 10	1 / 10	-	-	1 / 10	1 / 10
G37**	-	-	18 / 20	8 / 20	-	-	23 / 20	34 / 20
G38**	6 / 10	9 / 10	3 / 10	12 / 10	27 / 10	23 / 10	58 / 10	30 / 10
MIC: ANA 1 mg/L, BA 1 mg/L								
G41-5***	-	-	10 / 10	9 / 10	-	-	11 / 10	19 / 10
G42*	-	-	0 / 20	0 / 20	-	-	0 / 20	1 / 20
G44*	-	-	0 / 30	0 / 30	-	-	0 / 30	1 / 30
G49-5*	-	-	0 / 10	0 / 10	-	-	0 / 10	0 / 10

Se muestran los resultados para las plantas representativas de dos experimentos independientes para *S. gummosus* (Tabla 1) y un experimento para *F. peninsulæ* (Tabla 2).

n / m : número de raíces regeneradas (n) en (m) fragmentos de callos.

- : no se analizó (para *S. gummosus* solamente para las plantas que formaron más callo, se realizó el análisis de regeneración de las raíces en 4 RMMs, para el resto de plantas se usaron 2 MRRs). Con asteriscos se muestran patrones de regeneración de raíz (ver texto).

Tabla 2. Número de raíces regeneradas a partir de callos de *F. peninsulæ*.

Planta # (geno-tipo)	Callos de cotiledones				Callos de hipocotilos			
	Fotoperíodo		Oscuridad		Fotoperíodo		Oscuridad	
	N5	N5 B0.01	N5 B0.01	N5	N5	N5 B0.01	N5 B0.01	
MIC: ANA 5 mg/L, BA 5 mg/L								
101*	0/10	0/10	1/10	1/10	0/20	0/20	0/20	0/20
103*	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
104*	0/10	0/10	0/10	0/10	1/20	1/20	0/20	0/20
108**2	1/10	1/10	0/10	0/10	5/10	7/10	0/10	0/10
109**1	1/10	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	8/10	4/10
110***1	16/20	19/20	10/20	12/20	4/20	4/20	4/20	3/20
111*	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
114***2	3/20	9/20	14/20	27/40	3/10	11/20	12/10	21/20
118**1	0/20	1/20	0/20	2/20	0/20	0/20	12/10	12/10
119**1	0/10	0/10	2/10	6/10	0/10	0/10	11/10	13/10
MIC: ANA 5 mg/L, BA 1 mg/L								
314*	0/30	0/30	0/10	0/10	0/30	0/30	0/10	0/10
MIC: ANA 1 mg/L, BA 5 mg/L								
362*	0/20	0/20	0/10	0/10	0/20	0/20	0/10	0/10

Tabla 3. Datos del análisis de varianza de tres factores para 4 genotipos de *F. peninsulæ*.

Fuente	gl	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
Explante (A)	1	94.46	0.06	p>0.81
Medio de cultivo (B)	1	175.78	0.1	p>0.75
Fotoperíodo vs Oscuridad (C)	1	50.15	0.03	p>0.86
A x B	1	7.04	0	p=1.00
A x C	1	3.14	0	p=1.00
B x C	1	112.5	0.07	p>0.79
A v B x C	1	28.12	0.02	p>0.89
Error	24	1708.98		
Total	31			

No existe diferencia significativa ($p>0.05$) entre el tipo de explante (A), medio (B) o condición de cultivo (C).

Tabla 4. Datos del análisis de varianza de dos factores para 4 genotipos de *F. peninsulæ*.

Fuente	Cotiledón		Hipocotilo	
	Valor de F	Probabilidad	Valor de F	Probabilidad
Genotipo (A)	112.06	p<0.00026	126.77	p<0.0003
Fotoperíodo vs Oscuridad (B)	1.81	p>0.25	0.01	p>0.92
A x B	155.44	p<0.00014	22.46	p<0.0060

Existe diferencia significativa ($p<0.0003$) entre los genotipos (A) para callos inducidos tanto de cotiledones como de hipocotilos, mientras que la influencia de la condición de cultivo (B) no es significativa ($p>0.05$).

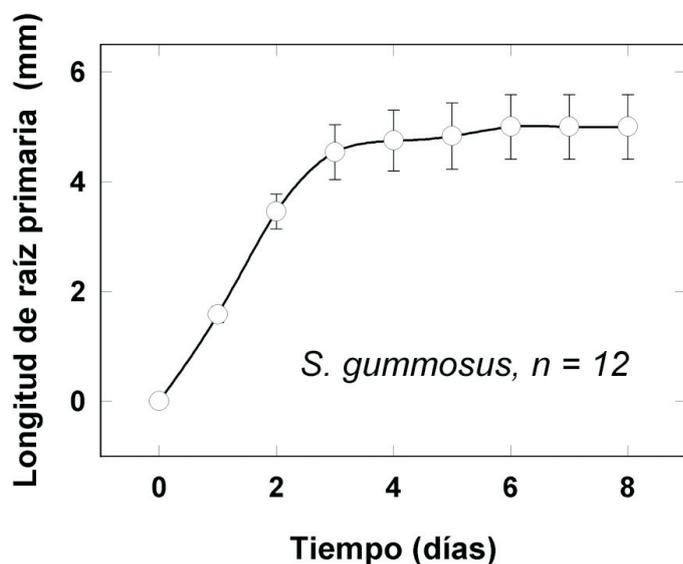


Figura 1
Cinética de crecimiento de la raíz primaria de *S. gummosus*. Las plantas se germinaron en cajas de Petri en papel filtro mojado con agua destilada.

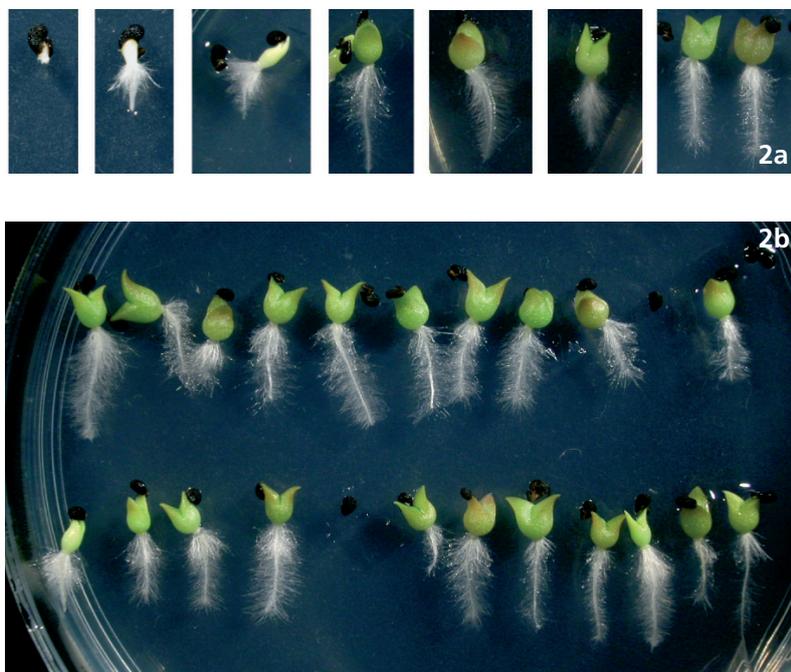


Figura 2

Plántulas de *S. gummosus* cultivadas en cajas de Petri en posición vertical. (a): Arriba se muestran plántulas en diferentes etapas del desarrollo; desde el inicio de la germinación hasta llegar a la etapa terminal del desarrollo de la raíz primaria, cuando se agota el meristemo y pelos radicales cubren la punta de la raíz. (b): plántulas en una caja de Petri después de 7 días de la siembra de las semillas; raíces de prácticamente todas las plántulas terminaron su crecimiento. Note los pelos radicales que cubrieron completamente la punta de la raíz.



Figura 3

Plantas en su hábitat natural.
(a): *F. peninsulae*.
(b, c): *S. gummosus*.



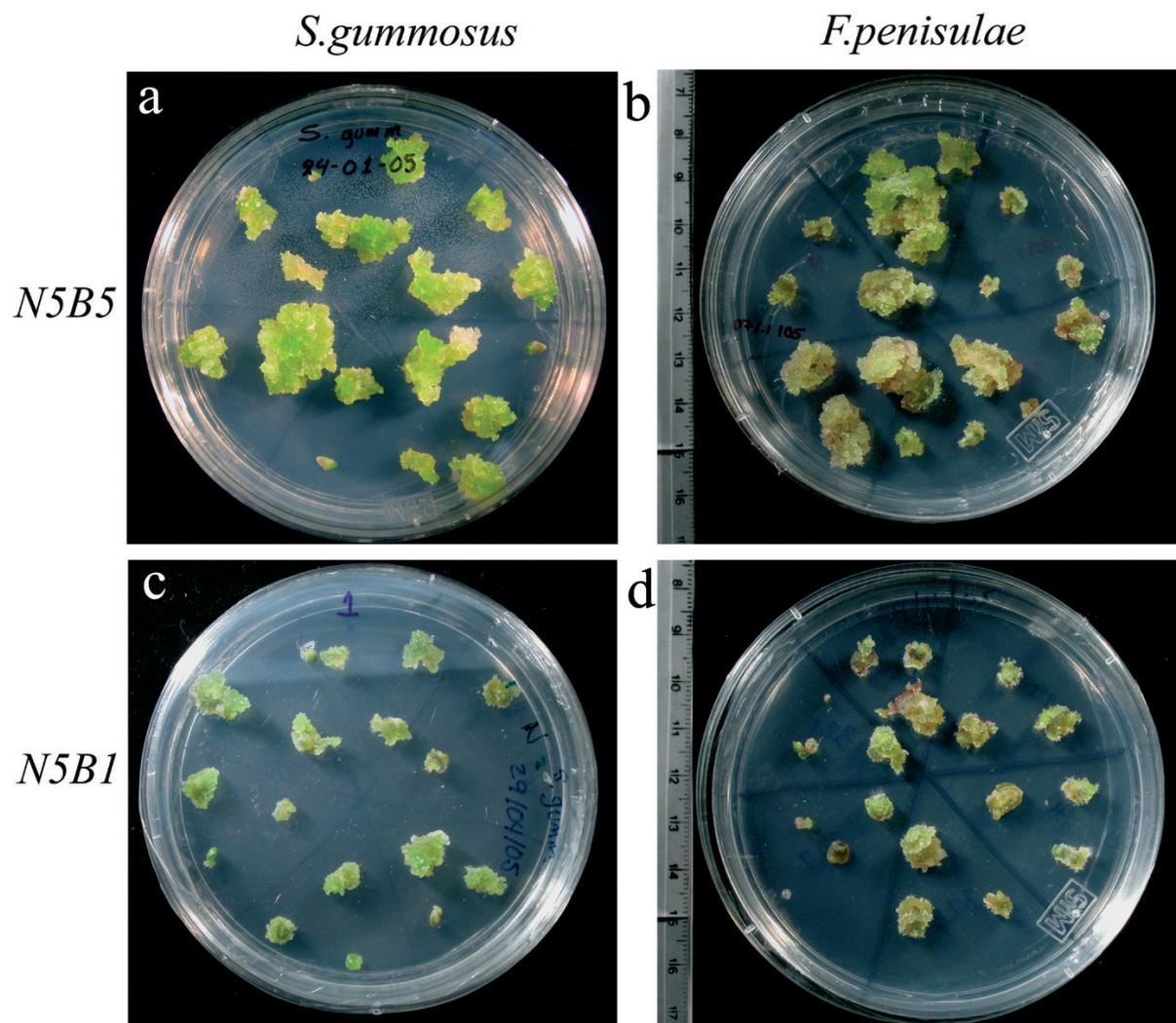


Figura 4
Callos de *S. gummosus* (a, c) y *F. peninsulae* (b, d) inducidos en MICs A5B5 (a, b) y A5B1 (c, d).

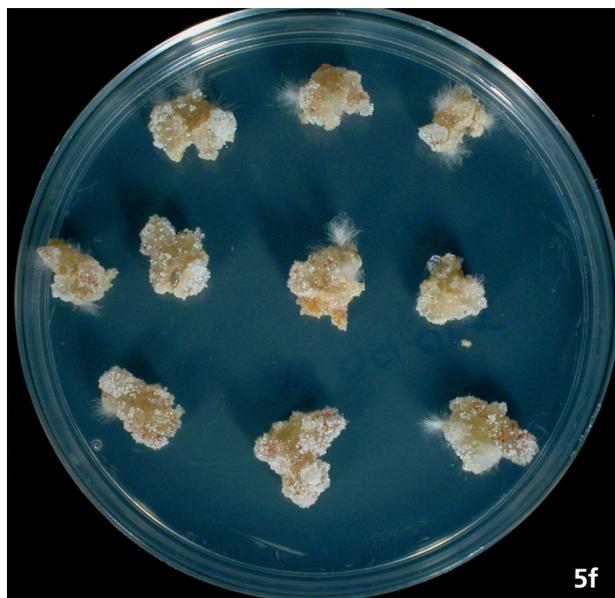
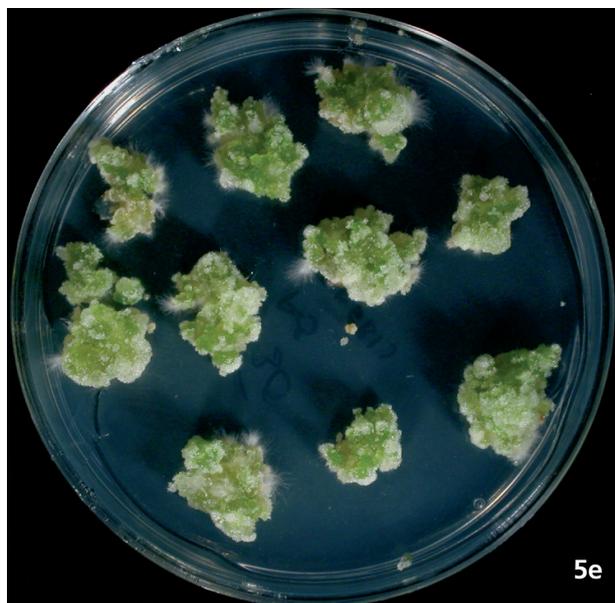


Figura 5.

Raíces regeneradas a partir de callos de *S. gummosus* y *F. peninsulae*.

(a): Una raíz regenerada de *S. gummosus*, que todavía no termina su crecimiento. Se puede observar la punta de la raíz no cubierta por pelos radicales.

(b): La misma raíz dos días después. Los pelos radicales cubren la punta.

(c, d): Cajas de Petri que contienen raíces regeneradas en callos de *S. gummosus* en condición de fotoperíodo (e) y (f). *S. peninsulae* en condición de oscuridad (f).

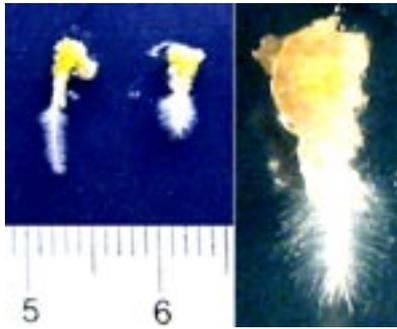


Figura 6

Raíces regeneradas de *S. gummosus* aisladas con un pequeño fragmento del callo de origen y cultivadas en medio MS sin fitohormonas por 30 días. Para las dos raíces de la izquierda se muestra una regla del sistema métrico (en mm y cm), la magnificación para la raíz del lado derecho es de aproximadamente 3 veces.

Figura 7

(a, b): Raíces regeneradas a partir de callos de tabaco. (c): Una raíz de tabaco regenerada y aislada del callo, cultivada en medio MS sin fitohormonas por 15 días. Durante todo este tiempo, la raíz siguió creciendo y formó varias raíces laterales.

