

GENERACIÓN DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *AGAVE SALMIANA* Otto Y SU COLONIZACIÓN POR *GLOMUS INTRARADICES*

GENERATION OF TRANSFORMED ROOTS OF *AGAVE SALMIANA* Otto AND THEIR COLONIZATION BY *GLOMUS INTRARADICES*

Guillermo Rodríguez Hernández^{1*}, Francisco Morales Domínguez², Rafael Gutiérrez Campos², Sergio Aguilar Espinosa³ y Eugenio Pérez Molphe-Balch²

¹Unidad Académica de Agronomía, Universidad Autónoma de Zacatecas. Km 15.5 Carr. Zacatecas-Villanueva Cieneguillas, Zac. 98170, Zacatecas, Zac. México. Tel. y Fax: 01 (492) 924-4147. ²Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940. 20100, Aguascalientes, Ags., México. ³Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima. Km. 40 Autopista Colima-Manzanillo. 28100, Tecmán, Col., México.

* Autor para correspondencia (grodri@uaz.edu.mx)

RESUMEN

El presente estudio es el primer reporte sobre la inducción de raíces transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* en *Agave salmiana* Otto, así como del establecimiento de un hongo micorrízico en las mismas. Para lograr lo anterior se inocularon plantas germinadas *in vitro* con diferentes concentraciones de bacteria y de acetosiringona en varios sitios (hoja, tallo y raíz). El tiempo de cocultivo en oscuridad fue de 6 d. Las raíces transformadas se presentaron a los 25 d después de la inoculación. La mayor eficiencia de transformación resultó de la inoculación al tallo con 1×10^9 bacterias mL^{-1} y 200 μM de acetosiringona, condiciones en las que se obtuvo 63 % de raíces transformadas. La naturaleza transgénica de las raíces generadas se verificó mediante un ensayo histoquímico para detectar actividad de GUS y los transgenes se amplificaron en muestras de ADN de raíz a través de PCR. Se detectó actividad de GUS en 80 % de los tejidos probados, mientras que los genes *rolB* y *nptII* se amplificaron en 60 % de las muestras de ADN analizadas por PCR. Se demostró la capacidad de *Glomus intraradices* para colonizar *in vitro* las raíces transformadas de *A. salmiana*, con una eficiencia de colonización de 70 %. Se logró la recuperación de esporas hijas, con un promedio de 300 esporas hijas por cultivo, a los 6 meses de iniciada la inoculación.

Palabras clave: *Agrobacterium rhizogenes*, Acetosiringona, GUS, micorrizas.

SUMMARY

The present study is the first report on the induction of transformed roots in *Agave salmiana* Otto using *Agrobacterium rhizogenes*, as well as of the establishment of a micorrhizic fungus in the same roots. To achieve this, *in vitro* germinated plants were inoculated with several bacteria and acetosyringone concentrations, in several places (leaf, stem and root). The time of cocultivation in darkness was of 6 d. Transformed roots were presented to the 25 d after inoculation. The higher transformation efficiency resulted from stem inoculation with 1×10^9 bacteria mL^{-1} and 200 μM acetosyringone, condition in which 63 % of transformed roots was obtained. The transgenic nature of the generated roots was verified by means of the GUS assay and the transgenes were amplified through PCR in samples of root DNA. GUS activity was detected in 80 % of the proven roots, while *rolB* and *nptII* genes were amplified in 60 % of the DNA root samples analyzed by

PCR. The ability of *Glomus intraradices* to colonize *in vitro* the transformed roots of *A. salmiana* was demonstrated with an efficiency of 70 %. The recovery of daughter spores was achieved with an average of 300 daughter spores per culture dish, after 6 months of inoculation.

Index words: *Agrobacterium rhizogenes*, Acetosyringone, GUS, micorrizas.

INTRODUCCIÓN

Agave salmiana Otto es la especie de maguey más abundante del Altiplano Potosino-Zacatecano (Gentry, 1982), donde se utiliza ampliamente para la elaboración de bebidas alcohólicas como el mezcal (Rzedowski, 1978). Posee ventajas importantes con respecto a otras especies, como bajo requerimiento de agua y rusticidad, pero el aprovechamiento de este agave se ve limitado por su lento desarrollo, ya que requiere por los menos de ocho años para llegar a maduración (Harborne, 1982; Nobel *et al.*, 1996), y por su baja tasa de multiplicación que impide el establecimiento de extensas plantaciones comerciales. Por otro lado, su reproducción casi exclusivamente asexual dificulta su mejoramiento genético por métodos convencionales.

Por lo anterior, un aspecto interesante en el caso de esta especie, y del resto de los agaves, es la aplicación de técnicas biotecnológicas que puedan facilitar su propagación, estudio, manejo y en un futuro su mejoramiento. Al respecto, se ha reportado ya la micropropagación de algunas especies (Robert *et al.*, 1992), así como su estudio mediante el uso de marcadores moleculares (Gil-Vega *et al.*, 2001). La generación y cultivo de raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* es otra posibilidad biotecnológica interesante para esta especie. Estas raíces podrían ser utilizadas para el estudio y producción de metabolitos de interés, para la introducción de genes foráneos que puedan

conferir ventajas agronómicas al sistema radical, para la generación de plantas transgénicas completas y para el estudio de la interacción de las raíces con organismos benéficos del suelo, como las micorrizas. Esta última interacción resulta vital para el desarrollo de la planta, por lo que su mejor conocimiento podría contribuir de forma importante al manejo del *A. salmiana*.

A. salmiana no ha sido reportada como susceptible a la transformación con *A. rhizogenes*, por lo que no hay trabajos con raíces transformadas de la misma. Los únicos intentos reportados para obtener raíces transformadas de plantas de la familia *Agavaceae* fueron hechos con *Dracaena* sp. y *Sanseveria trifasciata*, y en ambos casos se obtuvieron resultados negativos (De Cleene y De Ley, 1981). En este trabajo se estudió la susceptibilidad del *A. salmiana* a la transformación con *A. rhizogenes*, y la capacidad de estas raíces para ser colonizadas por *Glomus intraradices*, una micorriza importante en varias especies de plantas, con el propósito de generar herramientas para el estudio y mejoramiento de esta especie de *Agave*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se usaron plántulas de *Agave salmiana* germinadas *in vitro*, derivadas de plantas silvestres sanas y en fructificación ubicadas en una localidad del altiplano Potosino-Zacatecano, con clima seco estepario (BS) (García, 1970), a los 100° 31' 41" LO y 22° 03' 15" LN. A las plantas seleccionadas se les cortó el escapo floral y se colectó la panícula junto con las cápsulas que contenían las semillas. Las cápsulas se desinfectaron superficialmente, lavándolas tres veces con agua corriente y Tween 20® (1 mL L⁻¹) en agitación durante 15 min; enseguida se agregó oxiclورو de cobre 5 g L⁻¹ y se mantuvieron en agitación por otros 15 min, seguido por un lavado con etanol 70 % y otro más con hipoclorito de sodio 5 %. Finalmente, se agregó peróxido de hidrógeno (3 % v/v) y se mantuvieron en agitación continua por 10 min, pasados los cuales se eliminó la solución por decantación. Una vez desinfectadas las cápsulas, se les desprendió la cubierta en la campana de flujo laminar y se colectaron las semillas, las cuales fueron inoculadas en frascos de vidrio que contenían 30 mL de medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) a 100 %, pH 5.7, con 3 % (p/v) de sacarosa y gelificado con 8 g L⁻¹ de agar (Sigma-Aldrich). Los recipientes fueron incubados en condiciones de fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad y a 25 °C hasta la germinación de las semillas y obtención de plántulas de 4 a 6 cm.

Cepa bacteriana

Para la inducción de raíces transformadas se utilizó la Cepa A4 de *A. rhizogenes*, la cual es del tipo agropina y contiene el plásmido silvestre pRi A4, que confiere el geno-

tipo de raíces pilosas (Porter, 1991), así como el plásmido pESC4 que actúa como vector binario. Este último contiene al gen marcador de selección *nptIII* bajo el control del promotor y terminador *nos*, y al gen reportero *uidA* bajo el control del promotor *Cab* (inducible por luz) y el terminador *ocs* (Jofre-Garfias *et al.*, 1997). La bacteria se mantuvo a 5 °C en cajas de Petri con medio YM sólido (Hooykaas *et al.*, 1977) con 50 mg L⁻¹ de rifampicina y 50 mg L⁻¹ de kanamicina.

Inducción de raíces transformadas

Se transfirieron colonias aisladas de *A. rhizogenes* tomadas de los cultivos mantenidos en medio YM sólido a medio líquido con los antibióticos antes mencionados, y se incubaron a 28 °C por 24 h con agitación continua a 120 rpm. La densidad de la bacteria se determinó a partir de la medición de absorbancia a 620 nm e interpolación con una curva patrón. La suspensión bacteriana se diluyó en medio YM fresco sin antibióticos a tres concentraciones bacterianas (1x10⁷, 1x10⁸ y 1x10⁹ bacterias por mL). A esta suspensión se le añadió acetosiringona (4-hydroxy-3'-5'-dimethoxyacetophenona, Aldrich) a tres concentraciones (0, 100 y 200 µM). Como sitios para la inoculación de las plantas germinadas *in vitro* se probaron tres órganos (raíz, tallo y hoja). Se probaron así un total de 27 tratamientos y tres testigos negativos en un diseño completamente al azar (Cuadro 1). Se inocularon un total de 50 plántulas por cada combinación de densidad bacteriana y concentración de acetosiringona, y el experimento completo se realizó dos veces.

Antes de la infección, los explantes fueron incubados en medio MS a 100 % durante 24 h. La infección se hizo por medio de punciones con una jeringa para insulina, la cual fue primeramente inmersa en la suspensión bacteriana con o sin acetosiringona y luego introducida en los tejidos. Se hicieron cinco punciones en cada sitio de inoculación (raíz, tallo y hoja) de cada plántula. Los testigos negativos se inocularon únicamente con medio YM. Una vez inoculadas, las plántulas se incubaron durante 6 d en oscuridad a 25 °C, para después ser transferidas a luz continua a la misma temperatura. A los 14 d de haber sido inoculadas, las plantas fueron transferidas a medio MS adicionado con 500 mg L⁻¹ de Claforán® (Russell) con el fin de eliminar a la bacteria (Okkels *et al.*, 1988; Tzfira *et al.*, 1996). Este antibiótico fue esterilizado por filtración en membrana de 0.22 µm. En este medio se observó la aparición de las raíces presuntamente transformadas. Los explantes con raíces fueron subcultivados a medio fresco cada 30 d con el fin de mantener y multiplicar el tejido transformado.

Cuadro 1. Generación de raíces transformadas en explantes de *Agave salmiana* tratadas con diferentes concentraciones de *Agrobacterium rhizogenes* y acetosiringona (Resultados conjuntos de dos experimentos).

Concentración bacteriana (Bacterias mL ⁻¹)	Acetosiringona (µM)	Tejido inoculado	Explantes que generan raíces transformadas (%)*
0	0	hoja	0 h
0	0	tallo	0 h
0	0	raíz	0 h
1x10 ⁷	0	hoja	1 g
1x10 ⁷	0	tallo	5 fg
1x10 ⁷	0	raíz	3 g
1x10 ⁷	100	hoja	2 g
1x10 ⁷	100	tallo	10 e
1x10 ⁷	100	raíz	5 fg
1x10 ⁷	200	hoja	3 g
1x10 ⁷	200	tallo	13 de
1x10 ⁷	200	raíz	7 f
1x10 ⁸	0	hoja	25 c
1x10 ⁸	0	tallo	40 b
1x10 ⁸	0	raíz	10 e
1x10 ⁸	100	hoja	35 b
1x10 ⁸	100	tallo	57 a
1x10 ⁸	100	raíz	15 de
1x10 ⁸	200	hoja	37 b
1x10 ⁸	200	tallo	58 a
1x10 ⁸	200	raíz	16 de
1x10 ⁹	0	hoja	24 c
1x10 ⁹	0	tallo	37 b
1x10 ⁹	0	raíz	9 ef
1x10 ⁹	100	hoja	40 b
1x10 ⁹	100	tallo	60 a
1x10 ⁹	100	raíz	17 d
1x10 ⁹	200	hoja	44 b
1x10 ⁹	200	tallo	63 a
1x10 ⁹	200	raíz	19 cd

* Porcentaje de explantes sometidos al tratamiento que generaron al menos una raíz que resultó positiva para el ensayo GUS, equivalente a la eficiencia de transformación de dicho tratamiento. Los porcentajes seguidos de la misma letra no son diferentes estadísticamente (Tukey-Kramer, 0.05). Se inoculó un total de 50 plántulas por tratamiento y el experimento completo se realizó dos veces.

Confirmación de la naturaleza transgénica de las raíces generadas

La confirmación de la transferencia de los genes bacterianos a las raíces se hizo mediante ensayos histoquímicos para la detección de la actividad de GUS y amplificación por PCR de los genes *rolB* y *nptII* en muestras de ADN extraídas del tejido vegetal. El ensayo histoquímico para la detección de la actividad de GUS se hizo en segmentos de las raíces presuntamente transformadas que se generaron con el método de Stomp (1992). Este método consiste en poner al tejido en contacto con una mezcla de reacción (amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.0, EDTA 10 mM, ferrocianuro de potasio 0.5 mM, ferricianuro de potasio 0.5 mM, Tritón X-100® 0.1 % v/v y X-Gluc 1 mM) e incubar por 8-16 h a 37 °C hasta observar el precipitado de color azul. Este análisis se hizo en todas las raíces generadas en los 27 tratamientos en los que se inoculó con *Agrobacterium rhizogenes*, y se determinó el porcentaje de plántulas (explantes) que generaron al menos una raíz positiva para el

ensayo GUS (Cuadro 1). Este porcentaje equivale a la eficiencia de transformación de cada tratamiento. A los datos obtenidos se les hizo un análisis de varianza, previa transformación (arcoseno), y se utilizó la prueba de Tukey-Kramer para la comparación de las medias.

Para el análisis por PCR, el ADN de las raíces presuntamente transformadas se extrajo con el método propuesto por Edwards *et al.* (1991). Se tomaron muestras de 50 mg y se congelaron con nitrógeno líquido; posteriormente se pulverizaron y homogeneizaron con 200 µL de la solución de extracción (SDS 0.5 %, NaCl 250 mM, Tris-HCl pH 8 1M, EDTA 0.25 M) y se centrifugaron a 14 000 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se añadió un volumen igual de isopropanol. La muestra se incubó en hielo por 5 min para precipitar el ADN y luego se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min. La pastilla se secó a 60 °C por 10 min y luego se resuspendió en 100 µL de TE (Tris-HCl pH 7.4 10 mM y EDTA pH 8 1 mM). Los genes a amplificar en el ADN vegetal fueron *nptII* y *rolB*. Para el gen *nptII* el iniciador 5' fue TATTCGGCTATGACTGGGCA, y el 3' GCCAACGCTATGTCCTGAT, que amplifican un segmento de 517 pb. Para *rolB* el iniciador 5' fue ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA y el 3' TTAGGCTTCTTCTTCAGGTTTACTGCAGC, que amplifican un segmento de 780 pb. La amplificación se hizo en un termociclador Perkin Elmer 480, bajo las siguientes condiciones: 94 °C por 4 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 3 min, 30 ciclos. Los productos de la amplificación se analizaron en un gel de agarosa a 1.25 % teñido con bromuro de etidio.

Inoculación de las raíces transformadas con *Glomus intraradices*

Se extrajeron esporas de *Glomus intraradices*, de acuerdo con el método propuesto por Gerdemann y Nicolson (1963). Después se utilizó el método de desinfección superficial de esporas para trabajar *in vitro*, propuesto por Mugnier y Mosse (1987), Diop *et al.* (1992) y Bago *et al.* (1998). Por otro lado, se seleccionaron y aislaron raíces ya probadas como transformadas, las cuales tenían 90 d de haberse generado y una longitud promedio de 7 cm; estas raíces se pusieron en contacto con esporas germinadas de *G. intraradices*, habiendo usado un grupo de tres esporas por raíz. Esto se llevó a cabo en medio mínimo (M) (Bécard y Fortín, 1988). A las esporas utilizadas se les rompió la latencia al dejarlas durante 24 h a 4 °C; posteriormente se incubaron en la oscuridad a 25 °C. Pasados 5 d se observó que las esporas comenzaron a formar tubos de germinación y en ese momento se pusieron en contacto con la raíz. La incubación se realizó en oscuridad a 25 °C. De la misma manera se inocularon segmentos similares de raíz no transformada como testigos. Se hicieron observaciones continuas al microscopio con el fin de analizar el proceso de infección, hasta

llegar a la recuperación de esporas hijas por medio de la técnica propuesta por Bago *et al.* (1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tiempo promedio de germinación para las semillas de *A. salmiana* fue de 5 d, periodo en el que pudo observarse la aparición de raíces y un poco más tarde el desarrollo de la parte aérea (Figura 1A). El porcentaje de germinación fue de 90 %. No se observó contaminación en los cultivos, por lo que el método de desinfección al que fueron sometidas las cápsulas fue satisfactorio. La ventaja de trabajar con cápsulas maduras aún cerradas, es que puede utilizarse un método drástico para la desinfección sin dañar las semillas, las cuales se encuentran en condiciones asépticas dentro de la cápsula. Las plántulas axénicas obtenidas fueron usadas como fuente de tejido para los experimentos de transformación.

En lo que se refiere a la generación de raíces transformadas, éstas comenzaron a aparecer a los 25 d después de la inoculación con *A. rhizogenes* (Figuras 1B, 1C y 1D). Estas raíces mostraron una excesiva pilosidad, característica de las raíces transformadas con esta bacteria (Figura 4A). En general, se obtuvieron raíces en todos los tratamientos probados y en los tres sitios de inoculación estudiados, no así en los testigos negativos inoculados con medio de cultivo sin bacteria. Sin embargo, se encontraron diferencias entre los tratamientos aplicados (Cuadro 1), ya que las eficiencias más altas se obtuvieron al inocular con 1×10^8 o 1×10^9 bacterias por mL, con adición de acetosiringona e inoculación al tallo de las plántulas. Con estas condiciones, de 57 a 63 % de los explantes inoculados generaron raíces transformadas. Esta eficiencia de transformación con *A. rhizogenes* es similar a la reportada previamente para algunas especies mexicanas de cactáceas (González-Díaz *et al.*, 2006).

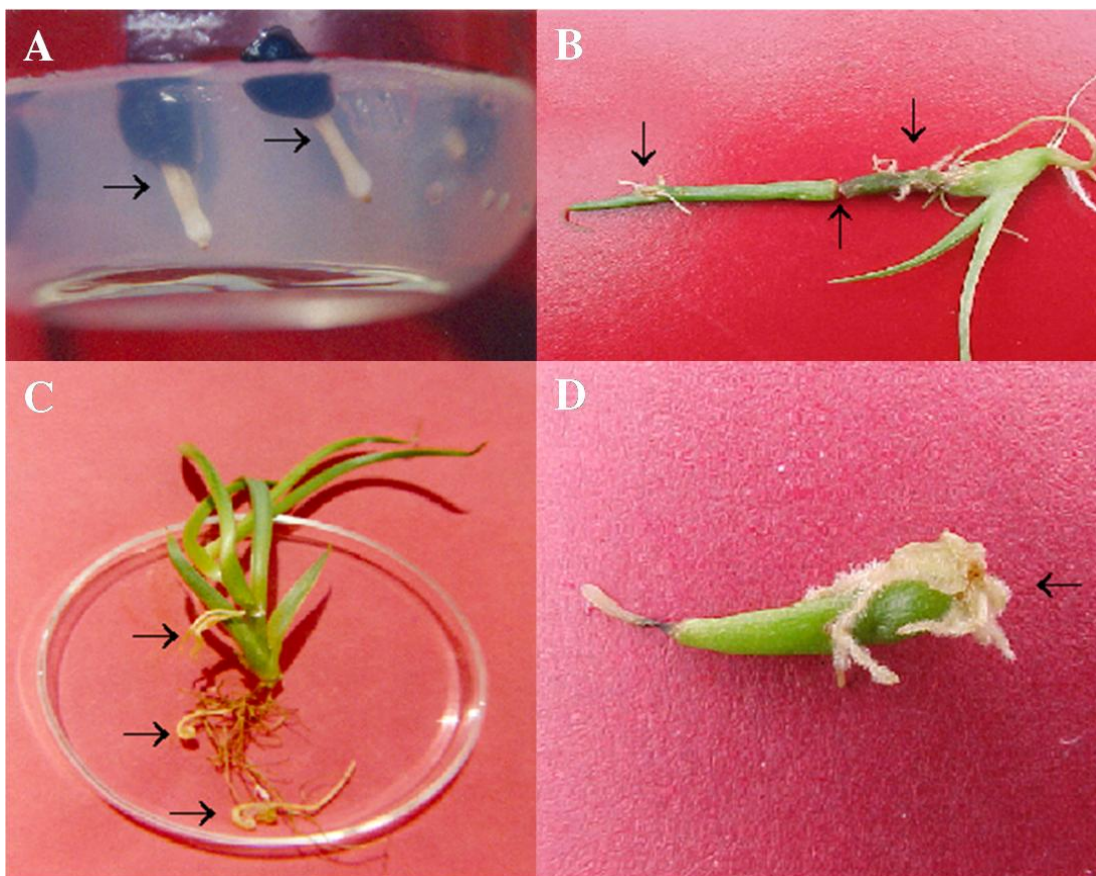


Figura 1. Generación de raíces transformadas en plantas de *Agave salmiana*. (A) Semillas germinando *in vitro* a los 5 d de incubación, que muestran la raíz principal emergida (Flechas). (B) Plántula a los 60 d de haber sido inoculada, que muestra inducción de raíces presuntamente transformadas en tallo y hoja (Flechas). (C) Planta a los 5 meses de haber sido inoculada que muestra crecimiento de raíces transformadas; éstas se diferencian de las raíces normales, las originales de la plántula, por que son más blancas y pilosas (Flechas). (D) Fragmento de hoja a los 60 d de haber sido inoculada, que muestra inducción de raíces transformadas en las punciones hechas en su parte basal.

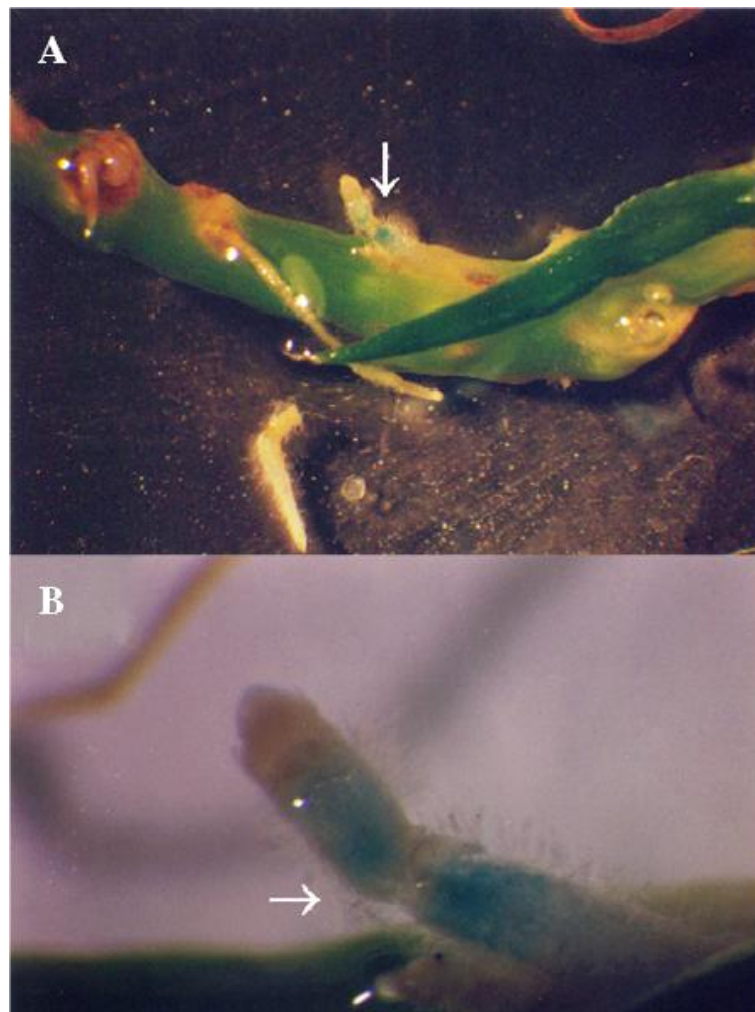


Figura 2. Actividad de GUS en raíces transformadas de *Agave salmiana*. (A) Raíz transformada surgiendo sobre un punto de inoculación en hoja a los 60 d de incubación (Flecha). En la misma plántula aparece otra raíz presuntamente transformada, pero que no mostró actividad de GUS. En la parte inferior de la fotografía aparece una raíz procedente de una planta no inoculada que fue usada como testigo negativo (T). (B) Amplificación de la raíz transformada, con coloración azul evidente en sus tejidos internos.

Se encontró que a mayor concentración bacteriana y de acetosiringona, la eficiencia de generación de raíces transformadas aumentó. El papel de la acetosiringona como inductora de los genes de virulencia de *Agrobacterium* (*vir*) y su uso para incrementar la eficiencia de transformación son ya bien conocidos. En el caso particular de la generación de raíces transformadas, la acetosiringona ha sido empleada con éxito en varias especies vegetales, entre ellas *Pinus maximartinezii* y *P. pinceana* (Villalobos *et al.*, 2002), naranjo agrio (*Citrus aurantium*) (Chávez-Vela *et al.*, 2003) y varias especies mexicanas de Cactáceas (González *et al.*, 2006). También resultó claro que independientemente de la concentraciones bacteriana y de acetosiringona empleadas, la inoculación en el tallo siempre resultó más eficiente que en hojas o raíz. En otras especies no relacionadas con *Agave* también se ha demostrado que la inoculación en tallo es más eficiente para la generación de raíces transformadas (Serna-

Pérez y Pérez-Molphe-Balch, 2004), lo cual tiene sentido ya que la parte basal del tallo es el sitio normal de la infección natural por *Agrobacterium rhizogenes*.

Los testigos en los que no se inoculó la bacteria no generaron raíces por lo que la aparición de éstas en los explantes cocultivados es ya una primera evidencia de transformación genética. En total, 80 % de las raíces analizadas mostraron clara actividad de GUS (Figuras 2A y 2B), lo cual es una segunda evidencia de su naturaleza transformada. El resto (20 %) no mostró actividad de GUS, tal vez porque fueron eventos de transformación en los que el tejido sólo recibió los genes silvestres *rol* presentes en el megaplásmido Ri, más no los genes localizados en el ADNt del plásmido binario ESC4. Esto es debido a que en este sistema de transformación, que utiliza un vector binario (pESC4) y el megaplásmido silvestre no desarmado (RiA4), lo que se busca es

la transferencia simultánea al genoma de la planta de genes procedentes de los dos plásmidos, lo cual no necesariamente sucede en todos los eventos de transformación. Pueden transferirse únicamente los genes incluidos en el ADNt del plásmido silvestre, lo cual originaría raíces transformadas, pero sin actividad de GUS. Para que ésta ocurra, deben transferirse simultáneamente estos genes junto con los del ADNt del vector binario. Las raíces normales tomadas de plántulas axénicas no inoculadas con la bacteria no mostraron actividad de GUS, por lo que puede descartarse la existencia de actividad endógena de este tipo en esta especie. Todas las raíces analizadas fueron incubadas bajo luz continua; esto es importante ya que el promotor *Cab* que controla al gen *uidA* en el plásmido utilizado es inducible por luz. Las raíces mantenidas en la oscuridad nunca mostraron actividad de GUS aun cuando el PCR haya demostrado que estaban transformadas.

Finalmente, el PCR también confirmó la naturaleza transgénica de varias líneas de raíces generadas (Figura 3), lo que constituyó una tercera evidencia de transformación genética. Se amplificaron los genes *rolB* y *nptII* a partir de muestras obtenidas de raíz, resultado que se obtuvo en 60 % de las muestras analizadas. La amplificación de estos dos genes es evidencia de la transferencia del ADNt de los plásmidos RiA4 y ESC4. En algunas muestras sólo se amplificó el gen *rolB*, más no el *nptII*, lo que puede indicar que sólo fue transferido el ADNt del plásmido RiA4 (*rolB*) y explicar el hecho de que algunas raíces con fenotipo de raíz pilosa hayan dado resultados negativos para el análisis GUS.

Los resultados anteriores demuestran que *Agave salmiana*, a pesar de ser una monocotiledónea, es susceptible a *Agrobacterium rhizogenes*. Ninguna especie de esta familia

está incluida en la lista de especies susceptibles a *A. rhizogenes* publicada por Porter (1991). Tampoco se encontraron trabajos más recientes en los que se pruebe la susceptibilidad de especies del género *Agave* a la transformación con esta bacteria.

En lo que se refiere al proceso de inoculación de raíces transformadas con *G. intraradices*, las esporas madre que se pusieron en contacto con las raíces germinaron a los 5 d; a los 25 d se pudo observar la continuación de la colonización, al extender las esporas madre el tubo germinativo, el cual penetró a la raíz transformada y posteriormente se ramificó. Las raíces normales usadas como testigos no fueron penetradas por el hongo micorrízico. Mediante la técnica de tinción de Phillips y Hayman (1970) se observó que la raíz transgénica fue colonizada en 70 % por *G. intraradices*, como se muestra en la Figura 4E.

A los 6 meses de la inoculación con *G. intraradices* se logró la recuperación de esporas hijas con un promedio de 300 esporas por caja Petri. Esto demuestra que el hongo micorrízico es capaz de completar su ciclo de vida en simbiosis con las raíces transformadas de *A. salmiana*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Diop *et al.* (1992), quienes en zanahoria (*Daucus carota*) observaron que la germinación de esporas ocurrió al cuarto día, y recuperaron 500 esporas hijas después de un año de haber iniciado el cultivo. En otro estudio hecho por Wenkart *et al.* (2001), se inoculó el hongo ectomicorrízico *Tuber melanosporum* en raíces transformadas de *Cistus incanus*; después de 5 meses se presentó la formación del manto externo y la red miceliar interna de Hartig; estos autores hicieron sus cultivos monoxénicos en el medio mínimo (M).

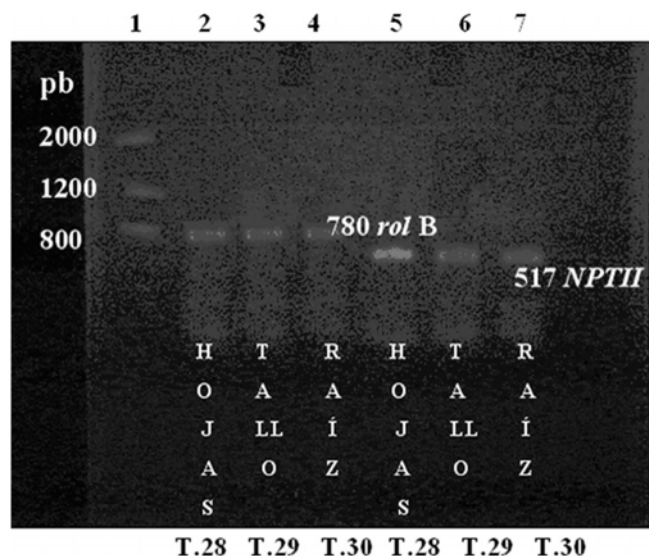


Figura 3. Gel de agarosa con las muestras de PCR de raíces transformadas. Carril 1: MPM 1 kb; Carriles 2, 3 y 4, amplificación del gene *rol B*; Carriles 5, 6 y 7, amplificación del gen *nptII*.

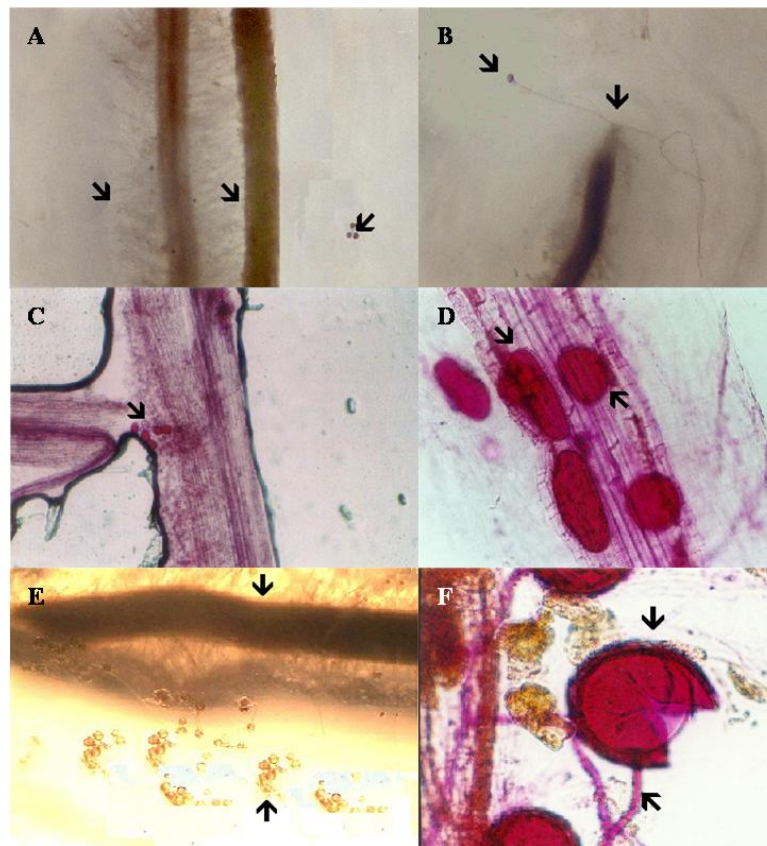


Figura 4. Respuesta a la colonización por *G. intraradices* en raíces transformadas de *A. salmiana*. (A) Flecha izquierda, raíz transformada; flecha al centro, raíz no transformada; flecha derecha, racimo de 3 esporas madre de *G. intraradices*. (B) La espora madre extendió su tubo germinativo hacia la raíz transformada, foto tomada a 25 d después de la inoculación. (C) Formación de cinco esporas hijas en una raíz transformada. (D) Flecha izquierda, formación de vesículas, Flecha derecha, formación de esporas en una raíz transformada. (E) Flecha arriba, raíz transformada, Flecha abajo, racimos de esporas. (F) Espora con hifa sustentora.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron raíces transformadas de *Agave salmiana* mediante la infección con *Agrobacterium rhizogenes*. Su naturaleza transgénica se demostró a través de su aparición en medio sin reguladores del crecimiento, la actividad de GUS y la amplificación por PCR de los genes foráneos introducidos en ADN extraído de las mismas. Ninguno de estos eventos ocurrió en los testigos negativos. Se demostró así que *Agave salmiana* es una especie susceptible a la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*, y que es posible generar raíces transformadas a través de este fenómeno, raíces que pueden tener aplicaciones importantes en estudios fitoquímicos, y podrían ser un paso intermedio para la obtención futura de plantas transgénicas completas. Además, se logró la colonización de las raíces transformadas por el hongo micorrízico *Glomus intraradices*, lo que abre la posibilidad de utilizar cultivos de estas raíces para el estudio de esta interacción en *Agave salmiana*.

BIBLIOGRAFÍA

- Bago B, C Azcón-Aguilar, Y Piché (1998) Architecture and development dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia* 90:52-62.
- Bécard G, J A Fortín (1988) Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108:211-218.
- Chávez-Vela N A, L I Chávez-Ortiz E Pérez-Molphe-Balch (2003) Transformación genética del naranjo agrio usando *Agrobacterium rhizogenes*. *Agrociencia* 37:629-639.
- De Cleene M, J De Ley (1981) The host range of infectious hairy root. *Bot. Rev.* 47:147-194.
- Diop T A, G Bécard, Y Piché (1992) Long-term *in vitro* culture of endomycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*, on Ri T-DNA transformed roots of carrot. *Symbiosis* 12:249-259.
- Draper J, R Scott, P Armitage, R Walden (1988) *Plant Genetic Transformation and Gene Expression: A Laboratory Manual*. Blackwell SCI. Pub. Oxford. 366 p.
- Edwards K, C Johnstone, C Thompson (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19:1349.
- García E (1970) Modificación al Sistema de Clasificación Climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República

- Mexicana). Instituto de Geografía de la UNAM, para la Comisión del Estudio del Territorio Nacional. 235 p.
- Gerdemann J W, T H Nicolson (1963)** Spores of mycorrhiza *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 46:235-244.
- Gil-Vega K, M González-Chavira, O Martínez de la Vega, J Simpson, G Vandemark (2001)** Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica* 119:335-341.
- González-Díaz M C, M E Pérez-Reyes, E Pérez-Molphe-Balch (2006)** *In vitro* analysis of susceptibility to *Agrobacterium rhizogenes* in 65 species of Mexican cacti. *Biol. Plant.* 50:331-337.
- Harborne J B (1982)** Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press, London. pp:5-14.
- Hooykaas P J J, P M Klapwijk, M P Nuti, R A Schilperoot, A Horsch (1977)** Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids to avirulent agrobacteria and *Rhizobium* ex plant. *J. Gen. Microbiol.* 98:477-484.
- Jofre-Garfias A E, N Villegas-Sepúlveda N, J L Cabrera-Ponce, R M Adame-Alvarez, L Herrera-Estrella, J Simpson (1997)** *Agrobacterium*-mediated transformation of *Amaranthus hypocondriacus*: light- and tissue-specific expression of pea chlorophyll a/b binding protein promoter. *Plant Cell Rep.* 16:847-852.
- Mugnier J, B Mosse (1987)** Vascular arbuscular mycorrhizal infections in transformed Ri T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology* 77:1043-1050.
- Murashige T, F Skoog (1962)** A revised medium growth and bioassays with tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nobel P S, A A Israel, N Wang (1996)** Growth, CO₂ uptake and responses of the carboxylating enzymes to inorganic carbon in two highly productive CAM species at current and doubled CO₂ concentrations. *Plant Cell Environ.* 19:585-592.
- Gentry M S (1982)** *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press. Tucson Arizona. 670 p.
- Okkels F T, M G Pedersen (1988)** The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics. *Acta Hort.* 225:199-208.
- Phillips J M, D S Hayman (1970)** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-160.
- Porter J R (1991)** Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10:387-421.
- Robert M L, J L Herrera, J L Chan, F Contreras (1992)** Micropropagation of *Agave* spp. In: Y P S Bajaj (ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 19. High-Tech and Micropropagation III. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. pp:306-329.
- Rzedowski J (1978)** *Vegetación de México*. Ed. Limusa. México, D. F. 373 p.
- Serna-Pérez A, E Pérez-Molphe-Balch (2004)** Generación de raíces y plantas transgénicas de toronja y lima dulce mediante el uso de *Agrobacterium rhizogenes*. *Rev. Fitotec. Mex.* 27:251-259.
- Stomp A M (1992)** Histochemical localization of β -glucuronidasa. In: S R Gallagher (ed). *GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression*. Academic Press. San Diego, CA. pp:103-113.
- Tzfira T, O Yarnitzky, A Vainstein, A Altman (1996)** *Agrobacterium rhizogenes* mediated DNA transfer in *Pinus halepensis* Mill. *Plant Cell Rep.* 16:26-31.
- Villalobos-Amador E, G Rodríguez-Hernández, E Pérez-Molphe-Balch (2002)** Organogenesis and *Agrobacterium rhizogenes*-induced rooting in *Pinus maximartinezii* Rzedowsky and *P. piniceana* Gordon. *Plant Cell Rep.* 20:779-785.
- Wenkart S, N Roth-Bejerano, D Mills, V Kagan-Zur (2001)** Mycorrhizal associations between *Tuber melanosporum* mycelia and transformed roots of *Cistus incanus*. *Plant Cell Rep.* 20:369-373.