



RESUMEN

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



ABSTRACT

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